



## **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE PAPA**

**(*Solanum tuberosum* L.) Y TRANSFORMACIÓN CON  
GENES REPORTEROS**

**T E S I S**

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN HORTICULTURA

PRESENTA:

**ROSE ONAMU**

**CHAPINGO, MÉXICO. MAYO 2012**

**CHAPINGO, MÉXICO. MAYO 2012.**



COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

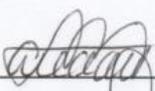


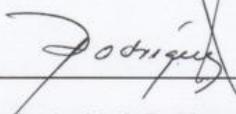
**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE PAPA  
(*Solanum tuberosum* L.) Y TRANSFORMACIÓN CON GENES  
REPORTEROS.**

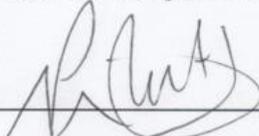
Tesis realizada por Rose Onamu bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

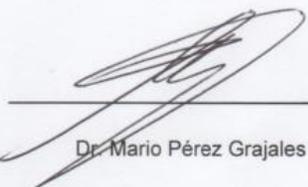
**DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

DIRECTOR:   
Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR:   
Dr. Jaime Sahagún Castellanos

ASESOR:   
Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:   
Dr. Joel Pérez Nieto

LECTOR EXTERNO:   
Dr. Mario Pérez Grajales

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Rose Onamu nació el 10 de mayo de 1965 en Nairobi, Kenya. Sus padres son el señor y la señora Onamu. Rose es la tercera de una familia de diez hijos, compuesta de siete mujeres y tres hombres. Recibió su educación primaria en la escuela Makande de Mombasa, un poblado situado en la región costera de Kenya. Terminó su educación secundaria y preparatoria en la escuela Highland's situada en Eldoret, Kenya. Completó sus estudios universitarios en la Universidad de Nairobi, Kenya, obteniendo un título en Agricultura General. Posteriormente, obtuvo el grado de Maestro en Horticultura, también por la Universidad de Nairobi, Kenya.

Rose mostró interés por las plantas mientras estuvo bajo la tutela de su tío, el señor Ernest Irangi en Njoro, durante sus vacaciones. Su tío fue un prominente cultivador de trigo, fomentó en ella la dedicación por las ciencias biológicas, especialmente la genética y el mejoramiento. Juntos visitaron la Estación de Mejoramiento de Plantas ubicada en Njoro, Kenia y se reunieron con su amigo el Dr. Ogema.

Rose participó durante seis meses en el Servicio Nacional de la Juventud donde aprendió que la pericia se adquiere con paciencia, perseverancia y persistencia, lo que moldea el carácter y la iniciativa.

Rose ha trabajado como maestra en un Instituto, enseñando producción vegetal y animal. También trabajó en un programa agroforestal ayudando a los agricultores a integrar el cultivo de árboles en sus granjas. Durante los años 2000 a 2009 trabajó como Inspector Vegetal en la Estación Cuarentenaria de Plantas ubicada en Kenya y su labor consistió en vigilar, regular y evaluar la entrada y salida del país de material vegetal libre de patógenos, incluyendo el cribado de plantas modificadas genéticamente y la liberación de semillas y nuevas variedades de plantas. También ha desarrollado actividades estratégicas como funcionaria,

planeando y colaborando con centros internacionales en un ambiente multicultural y multidisciplinario.

Rose está casada con el señor Steven Charles Munyasia. Es madre de cinco hijos: Eunice, Edelquine, Miriam, Samora y Mwasicho. Cuando Rose no está trabajando en cuestiones académicas se dedica a la lectura de libros, a ver películas sensibles, a escuchar música, a cantar, a cocinar para su familia y amigos, a atender sus cultivos de caña de azúcar, maíz, hortalizas y a los pollos y vacas de su granja. Le gusta nadar, atender grupos de mujeres, socializar y viajar.

Rose es cristiana, ama al señor y le gustaría nacer otra vez.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo no habría sido posible sin la ayuda de varias personas.

Agradezco a mi comité tutorial por su dirección y estímulo.

A mi Director de Tesis Dr. Juan Porfirio Legaria Solano, por su dirección estricta y por su ánimo. También, por el seguimiento y evaluación constantes del progreso de este trabajo. Por su ayuda en la traducción de la tesis al idioma español. Yo no olvidaré los pequeños secretos que hacen de una investigación un éxito....'hasta que sale'.

Agradezco a la administración de la Universidad Autónoma Chapingo por proporcionarme un ambiente agradable para realizar mis estudios.

Agradezco su amistad a mis amigos Esbeidy, Emigdio, Nadia, Humberto y Tere, sin los que la vida en México me habría sido muy difícil.

Gracias a mi familia por su paciencia y por su ánimo para continuar con mis estudios. No es fácil para una mamá Africana estar lejos de su hogar.

Por último, yo estoy muy agradecida con la Secretaría de Relaciones Exteriores (SRE) de México por haberme proporcionado la beca que me permitió realizar mis estudios doctorales.

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Que me inspiró y alentó a luchar por ello (Exodus 14:14).

### **A mis padres**

Que me criaron con amor y me enseñaron que la vida es dulce y divertida.

### **A mi tío Mr Ernest Irangi**

Por estimular mi interés por el estudio de las plantas.

### **A mi amado esposo Mr Steven Charles Munyasia, hijos y nietos**

Por identificar el talento y animarme a continuar mis estudios.

### **A mis hermanos, hermanas, sobrinos y sobrinas**

Por su apoyo constante.

### **A mis hermanas Dr. Beatrice Onamu y Ebby Onamu**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAG.</b>
CONTENIDO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .	ix
ÍNDICE DE CUADROS .....	xii
ÍNDICE DE CUADROS .	xii
RESUMEN .....	xv
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Objetivo General .....	10
Objetivos Particulares .....	10
REFERENCIAS.....	11
II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE PAPA ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) CON MARCADORES RAPD E ISSR .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
REFERENCIAS.....	43
III. COMPARACIÓN ENTRE MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES PARA DISCRIMINAR ENTRE GENOTIPOS DE PAPA ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) CULTIVADOS EN MÉXICO .....	51
MATERIALES Y MÉTODOS .....	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
REFERENCIAS.....	77
IV. DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE VARIEDADES DE PAPA ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) CULTIVADAS EN MÉXICO USANDO MARCADORES RAPD E ISSR.....	82
MATERIALES Y MÉTODOS .....	87

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
LITERATURA CITADA.....	108
V. ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS DE REGENERACIÓN PARA TRES VARIEDADES DE PAPA ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) CULTIVADAS EN MÉXICO .	115
MATERIALES Y MÉTODOS .....	118
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	121
REFERENCIAS.....	134
VI. TRANSFORMACIÓN DE DOS VARIEDADES DE PAPA ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) CULTIVADAS EN MÉXICO USANDO <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	138
MATERIALES Y MÉTODOS .....	141
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	146
VII. DISCUSIÓN GENERAL .....	161
VIII. CONCLUSIONES GENERALES .....	163

## ÍNDICE DE FIGURAS

PAG.

### CAPÍTULO II

- Figura 1. Patrones de productos de amplificación obtenidos con los iniciadores RAPD D10 (A) e ISSR P2 (B) para 35 accesiones de papa (*Solanum tuberosum* L.) como se indican en el Cuadro 1..... 31
- Figura 2. Dendrograma de relaciones generado con datos de RAPD (A), ISSR (B) y consenso RAPD + ISSR (C), usando el coeficiente de similitud de Jaccard. .... 33
- Figura 3. Gráficas en 2D generadas mediante escalado multidimensional y usando datos de RAPD (A), ISSR (B) y consenso RAPD + ISSR (C), para 35 genotipos de papa. .... 34
- Figura 4. Gráfica en 3D generada mediante escalado multidimensional y usando datos consenso RAPD + ISSR para 35 genotipos de papa. .... 41

### CAPÍTULO III

- Figura 1. Dendrograma generado a partir de datos cuantitativos, utilizando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa..... 63
- Figura 2. Dendrograma generado de datos cualitativos usando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa..... 65
- Figura 3. Dendrograma generado a partir de un análisis de datos cualitativos y cuantitativos combinados usando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa. .... 66
- Figura 4. Dendrograma generado a partir de datos de marcadores moleculares consenso RAPD + ISSR usando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa. .... 67
- Figura 5. Dendrograma generado a partir de un análisis combinado de marcadores morfológicos y moleculares usando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa. .... 72
- Figura 6. Gráfica en 2D generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos cuantitativos de 15 cultivares de papa. .... 73

Figura 7. Gráfica en 2D generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos cualitativos de 15 cultivares de papa.....	73
Figura 8. Gráfica en 2D generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos combinados cuantitativos y cualitativos de 15 cultivares de papa. ....	74
Figura 9. Gráfica en 2D generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos consenso RAPD + ISSR de 15 cultivares de papa. ....	75
Figura 10. Gráfica en 2D generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos morfológicos y moleculares de 15 cultivares de papa. ....	75

#### **CAPÍTULO IV**

Figura 1. Dendrograma of similitudes entre 15 cultivares de papa, obtenido utilizando coeficientes de similitud de Jaccard´s (1908). Detalles acerca de los cultivares en Cuadro 1. ....	98
--	----

#### **CAPÍTULO V**

Figura 1. Porciento de callos inducidos para cada tratamiento en tres cultivares de papa usando nudos, entrenudos y segmentos de hojas como explantes. Datos promedio se tomaron después de cuatro semanas de crecimiento en medio de inducción de callos. CRM= Cambray Rosa Morelos, ATL= Atlantic, ALFA= Alpha. C1= CIMI, C2=CIM2, C3= CIM3, C4=Control (detalles en el Cuadro 1). L= Hoja, N= Nudos e IN=Entrenudos. ....	127
--	-----

Figura 2. Porcentaje de regeneración de brotes para cada tratamiento en tres cultivares de papa usando nudos, entrenudos y hojas como explantes. CRM= Cambray Rosa Morelos, ATL= Atlantic, ALFA= Alpha. T1= Combinación de medios 1, T2= Combinación de medios 2, T3= Combinación de medios 3, T4= Combinación de medios 4 y T5= Control (detalles en Cuadro 2). L= Hoja, N= Nudos e IN=Entrenudos. ....	129
--	-----

Figura 3. Número de brotes regenerados por explante para cada tratamiento en tres cultivares de papa usando nudos, entrenudos y hojas como explantes. CRM= Cambray Rosa Morelos, ATL= Atlantic, ALFA= Alpha. T1= Combinación de medios 1, T2= Combinación de medios 2, T3= Combinación de medios 3, T4=	
---	--

Combinación de medios 4 y T5= Control (detalles en Cuadro 2). L= Hoja, N= Nudos e IN=Entrenudos. .... 131

Figura 4. Número de días a regeneración de brotes para cada tratamiento en tres cultivares de papa usando nudos, entrenudos y hojas como explantes. CRM= Cambray Rosa Morelos, ATL= Atlantic, ALFA= Alpha. T1= Combinación de medios 1, T2= Combinación de medios 2, T3= Combinación de medios 3, T4= Combinación de medios 4 y T5= Control (detalles en Cuadro 2). L= Hoja, N= Nudos e IN=Entrenudos. .... 132

Figura 5. A) Inducción de callos en explantes de hojas, B) Inducción de brotes a partir de hojas como explantes, C) Regeneración de brotes a partir de nudos y D) Enraizamiento de plántulas en medio MS0. .... 133

## CAPÍTULO VI

Figura 1. Esquema de la construcción en el vector pBI121 utilizada para transformar cultivares de papa. Abreviaciones: RB, borde derecho del T-DNA; NOS-Ter, terminador NOS; GUS, gen que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa; CaMV 35S Pro, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; nptII, gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa y confiere resistencia al antibiótico kanamicina; NOS-Pro, promotor NOS; LB, borde izquierdo del T-DNA. .... 141

Figura 2. Inducción de callos a partir de entrenudos en medio de selección (A). Regeneración de brotes en medio selectivo conteniendo kanamicina (B and C). Planta transgènica de papa en medio de enraizamiento (D). .... 148

Figura 3. Localización histoquímica de la actividad de GUS (color azul) en hojas de plantas de papa transformadas. A. Hojas de plantas transgènicas y no transgènicas del cultivar Alpha. B. Hojas de plantas transgènicas y no transgènicas del cultivar Cambray Rosa Morelos. .... 151

Figura 4. Planta completa expresando la actividad GUS (Color azul). .... 150

Figura 5. Amplificación por PCR de un segmento del gen *nptII* de plantas transformadas. Carril 1, marcador de peso molecular 1 kb. Carril 2, Cultivar Cambray Rosa Morelos transformado (TC). Carriles 3 y 4, Alpha transformada (TA). Carriles 5 y 6, plantas no transformadas de Cambray Rosa Morelos y Alpha, respectivamente. .... 153

## ÍNDICE DE CUADROS

PAG.

### CAPÍTULO I

Cuadro 1. Lista de marcadores comúnmente disponibles..... 5

### CAPÍTULO II

Cuadro 1. Origen geográfico de los genotipos usados en el estudio. .... 24

Cuadro 2. Lista de iniciadores RAPD, su secuencia, número de productos amplificados y porcentaje de mono y polimorfismo detectados..... 30

Cuadro 3. Lista de iniciadores ISSR, sus secuencias y temperatura de alineamiento, número de productos amplificados y porcentaje de mono y polimorfismo detectados..... 36

### CAPÍTULO III

Cuadro 1. Lista de cultivares, su origen y tipo utilizados en el presente estudio.. 58

Cuadro 2. Puntaje o calificación otorgada a diferentes caracteres morfológicos evaluados en variedades de papa..... 60

Cuadro 3. Lista de iniciadores RAPD e ISSR, secuencias 5'-3' y polimorfismo detectado..... 61

Cuadro 4. Matriz de correlaciones entre marcadores y valores de  $r$  a  $p < 0.05$ . ... 68

### CAPÍTULO IV

Cuadro 1. Lista de cultivares, su origen y tipo, utilizados en el presente estudio.89

Cuadro 2. Lista de iniciadores RAPD e ISSR, secuencias 5'-3' y polimorfismo detectado..... 90

Cuadro 3. Lista de iniciadores, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por cultivar y total..... 94

Cuadro 4. Valores de similitud genética entre cultivares de papa según el coeficiente de Jaccard's (1908) con marcadores RAPD e ISSR.....	97
Cuadro 5. Diversidad genética entre y dentro de cultivares de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.). .....	100
Cuadro 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos del Grupo 1 Europa, Grupo 2 Norteamérica y Grupo 3 México, usando 5 marcadores RAPD y 5 ISSR. Las abreviaciones indican: df= grados de libertad, SS= Suma de cuadrados .....	102
Cuadro 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos del Grupo 1 Cultivares mejorados de Europa, Grupo 2 Cultivares mejorados de Norteamérica, Grupo 3 Cultivares mejorados de México y Grupo 4 Variedades criollas de México usando 5 marcadores RAPD y 5 ISSR. Las abreviaciones indican: df= grados de libertad, SS= Suma de cuadrados. ....	105

## **CAPÍTULO V**

Cuadro 1. Medios para la inducción de callos. ....	119
Cuadro 2. Combinaciones de medios. ....	119
Cuadro 3. Niveles significativos de influencia de diferentes tipos de explante, cultivares y tratamientos sobre características de plantas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) crecidas <i>in vitro</i> . ....	122
Cuadro 4. Efecto de diferentes tipos de explante, cultivares y tratamientos sobre características de plantas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) crecidas <i>in vitro</i> .....	122
Cuadro 5. Efectos de interacción entre diferentes cultivares, tipos de explante y tratamientos sobre características de plantas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) crecidas <i>in vitro</i> . ....	123

## **CAPÍTULO VI**

Cuadro 1. Cultivares, explantes y medios de cultivo utilizados para la transformación de plantas de papa. ....	142
Cuadro 2. Efecto de protocolos de transformación, tratamientos y explantes sobre características de regeneración de la papa.....	149

Cuadro 3. Número total de plantas, número de plantas expresando el gen GUS, número de plantas que no expresaron el gen GUS y porcentaje de plantas transformadas, para cada cultivar. .... 150

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) Y TRANSFORMACIÓN CON GENES REPORTEROS

Rose Onamu<sup>1¶</sup>; Juan Porfirio Legaria Solano<sup>2</sup>

### RESUMEN

En el presente estudio se realizó la caracterización de genotipos de papa cultivados en México usando marcadores morfológicos y moleculares tipo RAPD e ISSR. Si bien ambos tipos de marcadores permitieron diferenciar a los genotipos, los marcadores moleculares probaron ser más eficientes para analizar la diversidad genética entre los cultivares de papa estudiados. Considerable diversidad genética se observó entre los genotipos de papa. También, se establecieron protocolos de regeneración eficiente para tres genotipos de papa. Se evaluó algunas variables como factores afectando la inducción de callos para la regeneración de brotes, número de brotes por explante y número de días a regeneración de brotes. La eficiencia de regeneración fue altamente dependiente del genotipo, las condiciones de cultivo y tipo de explante. Por último, se logró la transformación de dos cultivares de papa (Alpha y Cambray Rosa Morelos) usando a *Agrobacterium tumefaciens*. La eficiencia de transformación fue alta y anduvo en un rango de 85 a 90 %.

<sup>1</sup> Autor de la tesis. <sup>2</sup> Director de la tesis.

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) GENOTYPES AND TRANSFORMATION WITH REPORTER GENES

Rose Onamu<sup>1¶</sup>; Juan Porfirio Legaria Solano<sup>2</sup>

### ABSTRACT

In the present study, we characterized potato genotypes grown in Mexico using morphological and molecular markers of RAPD and ISSR types. Although both morphological and molecular markers differentiated among the potato genotypes, molecular markers proved to be more efficient in analyzing genetic diversity among the potato cultivars studied. Considerable genetic diversity was observed among the potato genotypes. Efficient regeneration protocols for three potato cultivars grown in Mexico were established. Factors affecting callus induction shoot regeneration, numbers of shoots per explant and number of days to shoot regeneration were considered. Regeneration efficiency was highly dependent on genotype, culture conditions and type of explants used. We transformed two potato cultivars grown in Mexico using *Agrobacterium tumefaciens*. Successful transformation was achieved ranging from 85 to 90 %.

<sup>1</sup> Author of the thesis. <sup>2</sup> Thesis Director.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## Taxonomía y Cultivo de la Papa

La papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.) consta de un 'pool genético' secundario extremadamente grande que se compone de tubérculos silvestres comestibles muy relacionados, más tubérculos pequeños no comestibles, extremadamente tóxicos (Vreugdenhil *et al.*, 2007). Todas las papas cultivadas y silvestres se clasifican dentro de la sección petota (Huaman, 1986).

Las papas fueron domesticadas en el Sur de Perú, en la región de los Andes hace aproximadamente 10000 años. *Solanum tuberosum* se originó de especies silvestres, del complejo *Solanum brevicaulis* Bitter (Ugent, 1970; Van den Berg *et al.*, 1998; Miller y Spooner, 1999) en el Sur de Perú (Spooner *et al.*, 2005). Tres especies domesticadas raras (*S. ajanhuiri* Juz. & Bukasov, *S. curtilobum* Juz. & Bukasov y *S. juzepczukii* Bukasov) se formaron más tarde por hibridación de *S. tuberosum* con especies silvestres más distantemente relacionadas de las series *Acaulia* Juz. y *Megistacroloba* Cárdenas & Hawkes. Una clasificación más reciente reconoce alrededor de 100 especies silvestres y 4 cultivadas (incluyendo a *Solanum tuberosum*) (Ovchinnikova *et al.*, 2011).

## Poliploidia

El genoma haploide de la papa consiste de 12 cromosomas ( $x= 12$ ). Las especies de papa cultivadas tienen un número de cromosomas que varía del diploide

( $2n=2x=24$ ) al pentaploide ( $2n=5x=60$ ). Las especies silvestres incluyen todos los niveles de ploidía indicados para las especies cultivadas más el hexaploide ( $2n=6x=72$ ) (Huaman, 1986; Hawkes, 1990). La papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.) es una especie autotetraploide ( $2n=4x=48$ ).

## **Botánica**

La papa es una planta herbácea, de 0.5 a 1 m de altura. Las hojas son alternadas e irregularmente compuestas. La inflorescencia consiste de varias flores. Las flores son pentámeras, actinomorfas, perfectas y tienen corolas simpétalas coloridas.

Los frutos son bayas, ausentes en varios cultivares (Burbank, 1921) y bicarpelares. Los tubérculos se forman de rizomas bajo el suelo, de los que desarrollan raíces adventicias para formar una masa fibrosa (Burton, 1969).

La papa es una planta alógama, polinizada por insectos. Especies diploides cultivadas y silvestres son autoincompatibles. Sin embargo, la papa cultivada tetraploide es autocompatible con un promedio de cruzamiento natural de 40 % (Brown, 1993). La capacidad de las papas para cruzarse entre sí es afectada por el nivel de ploidía y tipo de especie. En adición, el balance de número de endospermo (EBN) también afecta su capacidad para cruzarse y anda en un rango de 1 a 4. Especies silvestres diploides y tetraploides tienen un EBN de 2, mientras que las tetraploides cultivadas lo tienen de 4 (Jansky y Hamernik, 2009).

## **Cultivo y Distribución**

La papa se cultiva en 149 países entre las latitudes 65° N a 50° S y altitudes del nivel del mar hasta los 4500 m, con una concentración de diversidad en la región de los Andes (Spooner y Van den Berg 1992; Hijmans, 2001). Las especies silvestres de *Solanum* se distribuyen desde el Suroeste de los Estados Unidos (38° N), el área de México y Centroamérica hasta Argentina y Chile (41° S) (Hawkes, 1990; Spooner y Hijmans, 2001). Las poblaciones criollas de México y Centroamérica son recientes, se introdujeron después de la conquista (Ugent, 1968). El Valle de Toluca en México es considerado un centro secundario de diversidad genética, con gran variedad de formas y colores de tubérculo no encontrados en los cultivares mejorados modernos (Hawks, 1990).

### **La papa en México**

La superficie cultivada de papa en México varía entre 55 y 81 mil hectáreas, de las que 52 % es cultivada en temporal y el resto bajo condiciones de riego. El rendimiento promedio bajo riego es de 21.6 ton. ha<sup>-1</sup> y en temporal de 10.5 ton. ha<sup>-1</sup>. El 77 % de la producción comercial total se dedica al consumo en fresco, 15 % para la industria y sólo 8 % se utiliza como semilla (Parga *et al.*, 2005; CONPAPA, 2008).

En 2008, la superficie cosechada fue de 60242 ha, con una producción de 1670,148 toneladas y rendimiento de 27.7 ton. ha<sup>-1</sup>. La papa ocupa el quinto lugar en importancia como cultivo industrial y constituye una fuente de empleo en las áreas rurales, dado que representa alrededor de 70 salarios por hectárea (SIAP,

2010). Los estados principales donde se cultiva la papa en México son: Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (SAGARPA, 2010).

## **Marcadores Moleculares**

### **Técnicas Básicas de Marcadores Moleculares**

Las técnicas básicas de marcadores moleculares pueden clasificarse dentro de dos categorías: 1) Técnicas que se basan en hibridación y 2) Técnicas basadas en la PCR.

### **Tipos de Marcadores y Técnicas basadas en la PCR**

Después de la invención de la tecnología PCR (Reacción en cadena de la ADN polimerasa) (Mullis y Faloona, 1987), se desarrollaron un gran número de métodos para la generación de marcadores moleculares, principalmente debido a su alta simplicidad y alta probabilidad de éxito. Las técnicas basadas en la PCR pueden subdividirse en dos categorías: i) técnicas que utilizan iniciadores arbitrarios o de secuencias no específicas y; ii) técnicas que utilizan iniciadores específicos. Las técnicas basadas en secuencias, a su vez se pueden clasificar en cuatro subcategorías: (i) marcadores basados en secuencias repetidas; (ii) marcadores basados en ARN mensajeros; (iii) marcadores basados en ADN y (iv) marcadores basados en polimorfismos de nucleótidos únicos. En el Cuadro 1 se indican algunas características de las tecnologías comúnmente disponibles. Sólo una selección de los marcadores usados en el presente estudio serán aquí discutidos.

Cuadro 1. Lista de marcadores comúnmente disponibles.

<b>Marcadores basados en hibridación</b>	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)
	Polimorfismos en la conformación de cadenas sencillas (SSCP)
	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)
<b>Marcadores basados en la PCR</b>	Polimorfismos en el ADN amplificados al azar (RAPD)
	Etiquetado de intrones (IT)
	Etiquetado del codón de inicio (SCoT)
	Sitios de secuencias etiquetadas (STS)
	Regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCAR)
	Iniciadores al azar-PCR (RP-PCR)
	Iniciadores arbitrarios-PCR (AP-PCR)
	Oligonucleótidos-PCR (OP-PCR)
	Polimorfismos en la conformación de cadenas sencillas-PCR (SSCP-PCR)
	Análisis de pequeños oligos de ADN (SODA)
	Huellas de ADN amplificado (DAF)
	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)
	Polimorfismos amplificados de secuencias relacionadas (SRAP)
	Polimorfismos amplificados de regiones etiquetadas (TRAP)
	Polimorfismos de inserciones/deleciones (Indel)
<b>Marcadores basados en secuencias repetidas</b>	ADN satélite
	ADN microsatélite (unidades repetidas conteniendo 2-5 bp)
	ADN minisatélite (unidades repetidas conteniendo mas de 5 bp)
	Secuencias simples repetidas (SSR) o polimorfismos en la longitud de secuencias simples (SSLP)
	Secuencias cortas repetidas (SRS)
	Secuencias repetidas una tras otra (TRS)
<b>Marcadores basados en ARNm</b>	Despliegue diferencial (DD)
	Transcripción reversa- PCR (RT-PCR)
	Despliegue diferencial transcripción reversa-PCR (DDRT-PCR)

	Análisis de diferencias representativas (RDA)
	Sitios de secuencias etiquetadas (STS)
	Análisis serial de la expresión génica (SAGE)
<b>Marcadores basados en polimorfismos de nucleótidos únicos</b>	Polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP)

### **Secuencias Internas Simples Repetidas (ISSR)**

Las secuencias internas simples repetidas (ISSR) son una técnica que utiliza iniciadores con repeticiones anclados o no anclados para amplificar secuencias de ADN entre dos SSR invertidos (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Son marcadores multiloci arbitrarios producidos por amplificación de PCR con un iniciador microsatélite. Los marcadores ISSR no requieren un conocimiento *a priori* de las secuencias blanco SSR, son universales, fáciles de manipular, altamente reproducibles debido a la longitud del iniciador usado y a la alta astringencia adquirida por la temperatura de alineamiento y además, proveen huellas genéticas altamente polimórficas (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001). Han sido utilizados con gran éxito para determinar diversidad genética en papa (Bornet *et al.*, 2002).

### **Polimorfismos en el ADN Amplificados al Azar (RAPD)**

Los RAPDs son una técnica que se basa en la amplificación de regiones discretas del genoma usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

La técnica no requiere conocimiento previo del genoma a analizar, es barata, simple y rápida (Karp *et al.*, 1997). Si bien la técnica es limitada en reproducibilidad, son marcadores dominantes y muestran problemas con la homología de las bandas, los RAPDs son muy útiles para la construcción de mapas genéticos (Pérez *et al.*, 1999), analizar la diversidad genética (Mori *et al.*, 1993; Milbourne *et al.*, 1997; McGregor *et al.*, 2000; Orona-Castro *et al.*, 2006; Yasmín *et al.*, 2006) y conducir estudios de taxonomía y filogenia en papa (Miller y Spooner, 1999; Isenegger *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003).

La información sobre identificación, diversidad genética y relaciones entre cultivares es importante para la conservación eficiente, mejoramiento y utilización de los recursos fitogenéticos. Previamente, esta información se ha obtenido usando marcadores morfológicos (Huamán *et al.*, 1977; Ortiz y Huamán, 1994; Hijmans y Spooner, 2001). Sin embargo, estos marcadores son limitados, complejos y fuertemente influenciados por el ambiente (Semagn, 2006). Si bien los marcadores bioquímicos son limitados e influenciados por las condiciones ambientales y la etapa de desarrollo de la planta, ellos también se han utilizado para describir cultivares de papa (Desborough y Peloquin, 1968; Stegemann y Loeschecke, 1976; Oliver y Martínez-Zapater, 1985; Douches y Ludlam, 1991). En el pasado reciente, los marcadores moleculares se han venido utilizando en forma extensiva para complementar los métodos antes mencionados y sobrepasar algunas de sus limitaciones. En México, existe información limitada sobre la identificación, diversidad genética y relaciones entre los genotipos de papa (Becerra y Paredes, 2000).

## **Regeneración *in vitro* y Transformación Genética de Plantas Cultivadas**

El cultivo de tejidos vegetales se ha utilizado para la multiplicación rápida de plantas clonalmente propagadas tales como la banana, cassava, camote y papa (Hartmann y Kester, 2011). La técnica también se ha usado para producir haploides, dobles haploides, poliploides y variantes somaclonales con características deseables (Bradshaw, 2007; Akin-Idowu *et al.*, 2009). Recientemente, las técnicas se han aplicado para regenerar plantas transformadas utilizando métodos de Ingeniería Genética (Bradshaw, 2010).

El cultivo de tejidos es un proceso por el que piezas pequeñas de tejido vivo (explantes) se aíslan de una planta y se cultivan asépticamente por periodos indefinidos de tiempo en un medio nutritivo. El cultivo de tejidos permite propagar germoplasma útil bajo condiciones de laboratorio. Para que el cultivo de tejidos sea exitoso es mejor iniciar con un explante rico en células indiferenciadas e indeterminadas; por ejemplo los del cortex o de tejido meristemático debido a que tales células son capaces de proliferar rápidamente.

Los explantes más comunes son yemas, puntas de brotes, puntas de raíces, segmentos nodales o semillas germinando.

El cultivo de tejidos vegetales es útil para los investigadores o los propagadores de plantas para alcanzar alguno de los objetivos siguientes:

- Eliminar virus de plantas infectadas
- Multiplicación rápida de clones
- Propagación vegetativa de especies difíciles de propagar
- Multiplicación rápida de plántulas

Un panorama general acerca de las vías que pueden llevar a la regeneración de plantas a través del cultivo de tejidos se discute en esta sección: **Organogénesis:** es una vía de desarrollo en que raíces o brotes son inducidos a diferenciarse a partir de una célula o grupos de células.

**Embriogénesis:** Una célula o un grupo de células se diferencian para producir embriones somáticos semejantes a embriones cigóticos.

La morfogénesis puede ocurrir directamente de los explantes o indirectamente vía la formación de callos desdiferenciados. Existen varias vías de regeneración:

- Organogénesis indirecta vía callos
- Organogénesis directa a partir de explantes
- Embriogénesis directa
- Embriogénesis indirecta a partir de callos

La regeneración de plantas completas vía cultivo de tejidos ha hecho posible introducir genes foráneos en células vegetales y obtener plantas transgénicas. La mayoría de los estudios de transformación se han conducido con la intención de transferir genes o caracteres esperando incrementar la resistencia de las papas en contra de predadores y patógenos (Wierenga *et al.*, 1996; Hefferon *et al.*, 1997; Lyapkova *et al.*, 2001; Urwin *et al.*, 2001; Naimov *et al.*, 2001; Chue *et al.*, 2004) o para modificar vías metabólicas como las involucradas en síntesis de almidón y sacarosa (Wolters *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999).

Para la transformación de plantas se han desarrollado diferentes técnicas: transformación mediada por *Agrobacterium*, bombardeo de partículas, microinyección, tratamiento de protoplastos con PEG y la electroporación de

protoplastos. Sin embargo, los métodos basados en *Agrobacterium* y el de bombardeo de partículas son los más utilizados. La regeneración vía callos es adecuada para la transformación mediada por *Agrobacterium*, mientras que la regeneración directa es más adecuada cuando se bombardean partículas. Existe limitada información sobre la regeneración y transformación de genotipos de papa cultivados en México.

### **Objetivo General**

Caracterizar, regenerar y transformar genotipos de papa.

### **Objetivos Particulares**

- Caracterizar y analizar la diversidad genética de genotipos de papa cultivados en México mediante marcadores morfológicos y moleculares tipo RAPD e ISSR.
- Establecer protocolos de regeneración para tres cultivares de papa cultivados en México.
- Transformar dos cultivares de papa mediante *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el plásmido pBI121 que contiene el promotor 35S, el gen de selección *nptII* que confiere resistencia a kanamicina y el gen reportero *uidA* que codifica para una  $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

## REFERENCIAS

Akin-Idowu, P. E., D.O. Ibitoye, O.T. Ademoyegun. 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *Afric. J. Biotechno.* 8 (16): 3782-3788

Becerra V V, Paredes CM. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc. (Chile)* 60(3):270-281.

Bornet, B., Branchard M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19:209-215.

Bornet, B., F. Goraguer, G. Joly, M. Branchard. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45( 3): 481-484.

Bradshaw, J.E. 2010. Root and tuber crops. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 300p.

Bradshaw, J.E. 2007. Breeding potato as a major staple crop. In: Kang, M.S, Priyadarshan, P.M (eds.) Breeding major food staples. Blackwell, Oxford, pp. 277-332.

Brown, C.R. 1993. Out crossing rate in cultivated autotetraploid potato. *Am. Potato J.* 70:725-734.

Burbank, L. 1921. How Plants are trained to Work for Man: Grafting and Budding, Benton, Chicago et alibi. 1197 pp.

Burton, W. G. 1969. Potato. In: Encyclopaedia Britannica, Volume 18, pp. 95-134.

Chue ML, Zhao KJ, He ZM, Ramalingam S, Fung KL (2004). An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta* 220: 717-730.

Confederación Nacional de Productores de Papa (CONPAPA). 2008. Informe sobre la superficie y producción de papa en México. D. F., México. 20 p.

Desborough S, Peloquin SJ. 1968. Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *Amer. Potato J.* 45:220-229.

Douches D.S., K. Ludlam. 1991. Electrophoretic characterization of North American potato cultivars. *Amer. Potato. J.* 68:767-780.

Edwards A, Fulton DC, Hylton CM, Jobling SA, Gidley M, Rossner U, Martin C, Smith AM. 1999. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J.* 17: 251-261.

Hartmann, H.T., D.E. Kester (eds.) 2011. Plant propagation: principles and practices. 8<sup>th</sup> Edn. Prentice Hall, One lake street, NJ. 869 p.

Hawkes JG. 1990. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Oxford: Belhaven Press.

Hefferon KL, Khalilian H, AbouHaidar MG. 1997. Expression of the PVY (O) coat protein (CP) under the control of the PVX CP gene leader sequence: protection under greenhouse and field conditions against PVY (O) and PVY (N) infection in three potato cultivars. Theor. Appl. Genet. 94: 287-292.

Hijmans RJ, Spooner DM. 2001. Geographic distribution of wild potato species. Amer. J. Bot. 88(11):2101-2112.

Hijmans, R.J. 2001. Global distribution of the potato crop. Am J. Potato Res. 78:403-412.

Huamán Z, Williams JT, Salhuana W, Vincent N. 1977. Descriptors for the cultivated potato and for the maintenance and distribution of germplasm collections. Consultative Group on International Agricultural Research. Rome, International Board for Plant Genetic Resources (I.B.P.G.R.). 47 p.

Huaman, Z. 1986. Systematic botany and morphology of the potato. Technical Information Bulletin 6. International Potato Center, Lima, Peru. 22pp. 2<sup>nd</sup>Edn.

Isenegger DA, Taylor PWJ, Ford R, Franz P, McGregor GR, Hutchinson J. (2001). DNA fingerprinting and genetic relationships of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) commercially grown in Australia. Aust. J. Agric. Res. 52 (9):911-918.

Jansky, S., A. Hamernik. 2009. The introgression of 2x 1EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. Genet. Resour. Crop Evol. 56:1107-1115.

Karp A, Kresovich S, Bhat KV, Ayada WG, Hodgkin T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Tech. Bull. No. 2.

Lyapkova NS, Loskutova NA, Maisuryan AN. 2001. Transformed potato plants carrying the gene of the antifungal peptide of *Amaranthus caudatus*. Appl. Biochem. Microbiol. 37: 301-305.

McGregor, C.E., C.A. Lambert, M.N. Greyling, J.H. Louw, L. Warnich. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica 113:135–144.

Milbourne, D., R. Meyer, J.E. Bradshaw, E. Baird, N. Bonar, J. Provan, W. Powell, R. Waugh. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Mol. Breed. 3:127–136.

Miller JT, Spooner DM (1999). Collapse of species boundaries in the wild potato *Solanum brevicaulle* complex (*Solanaceae* spp. Sect. *Petota*): molecular data. Plant Syst. Evol. 214(1-4):103-130.

Mori M, Hosaka K, Umemura Y, Kaneda C. 1993. Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs. *Jpn. J. Genet.* 63:167-174.

Mullis, K.B., F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:350-355.

Naimov S, Weemen-Hendriks M, Dukijandjiev S, De Maagd RA. 2001. *Bacillus thuringiensis*-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5328-5330.

Oliver JL, Martinez-Zapata JM. 1985. A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns. *Theor. Appl. Genet.* 69:305-311.

Orona-Castro, F., V. Pecina-Quintero, A. Rocha-Peña, M.A. Cadena-Hinojosa, O.O. Martínez de la Vega, y I.H. Almeyda-León. 2006. Caracterización molecular de genotipos comerciales y elite de papa. *Agric. Téc. Méx.* 2(32):171-180.

Ortiz R, Huama Z. 1994. Inheritance of morphological and tuber characteristics. In: Bradshaw JE, Mackay GR. (eds) *Potato Genetics*. CAB International, pp 263-279.

Ovchinnikova, A., E. Krylova, T. Gavrilenko, T. Smekalova, M. Zhuk, S. Knapp, D.M. Spooner. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section *petota*: *Solanaceae*). *Bot. J. Linnaean Soc.* 165:107-155.

Parga, T. V. M.; García, G. S. J.; Villavicencio, G. E. E.; Sánchez, S. J. A.; Sánchez, V. I.; Contreras, R. F. J.; Arellano, G. M. A.; Covarrubias, R. J. M.; Rubio, C. O. A. y Fernández, E. J. 2005. Tecnología para producir papa en Coahuila y

Nuevo León. INIFAPCIRNE.Campo Experimental Saltillo. Saltillo, Coahuila. México. Folleto técnico. Núm. 5. 164 p.

Perez F, Menedez A, Dehae P, Quiros CF. 1999. Genomic structural differentiation in *Solanum* comparative mapping of the A- and E- genomes.Theor. Appl. Genet. 98:1183-1193.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Cultivo de papa. México, D. F.

Semagn, K., Å. Bjørnstad, and M.N. Ndjondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. Afr. J. Biotechnol. 5(25):2540-2568.

Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola 2006 en México. URL: <http://www.siap.gob.mx/>.

Spooner DM, Mclean K, Ramsay G, Waugh R, Bryan GJ. 2005. A single domestication for potato based on multilocus AFLP genotyping. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 120:14 694–14 699.

Spooner DM, van den Berg RG. 1992. An analysis of recent taxonomic concepts in wild potatoes (*Solanum* spp. sect. *Petota*). Genetic Resources and Crop Evolution 39:23–37.

Spooner, D.M., R.J. Hijmans. 2001. Potato systematics and germplasm collecting 1989-2000. Am. J. Potato Res. 78: 237-268.

Stegemann H, Loeschecke V. 1976. Index EuropäischerKartoffelsorten. Parey P (ed.). Bestimmungdurchelektrophoretische. Spektren. Berlín, pp 214.

Sun G, Wang-Pruski G, Mayich M, De Jong H. 2003. RAPD and pedigree-based genetic diversity estimates in cultivated diploid potato hybrids. Theor. Appl. Genet. 107:110-115.

Ugent D. 1968.The potato in Mexico: geography and primitive culture. Economic Botany 22: 108–123.

Ugent D. 1970.The potato: what is the origin of this important crop plant, and how did it first become domesticated?. Science 170: 1161–1166.

Urwin PE, Troth KM, Zubko EI, Atkinson HJ. 2001. Effective transgenic resistance to *Globodera palida* in potato field trials. Mol. Breed. 8: 95-101.

Van den Berg RG, Miller JT, Ugarte ML, Kardolus JP, Villand J, Nienhuis J, Spooner DM. 1998. Collapse of morphological species in the wild potato *Solanum*

*brevicaule* complex (Solanaceae: sect. *Petota*). American Journal of Botany 85: 92–109.

Vreugdenhil, D., J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, D.K.L. Mackrorn, M.A. Talor, H.A. Ross. 2007. Potato biology and biotechnology advances and perspectives. Vol. 2. Collier, New York. 352 pp.

Welsh, J., M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

Wierenga JM, Norris DL, Whalon ME. 1996. Stage specific mortality of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on transgenic potatoes. J. Entomol. 89: 1047-1052.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531–6535.

Wolters AMA, Janssen EM, Rozeboom-Schippers MGM, Jacobsen E, Visser RGF. 1998. Composition of endogenous alleles can influence the level of antisense inhibition of granule-bound starch synthase gene expression in tetraploid potato plants. Mol. Breed. 4: 343-358.

Yasmin, S., M.S. Islam, M. Kondoker, M. Nasiruddin, S. Alam. 2006. Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Biotechnol.* 5(1):27-31.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.

## II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CON MARCADORES RAPD E ISSR

### RESUMEN

Diecinueve iniciadores RAPD y cinco iniciadores ISSR se utilizaron para caracterizar 35 accesiones de papa. Se generó un total de 222 y 82 *loci* con los iniciadores RAPD e ISSR, respectivamente. Los iniciadores ISSR y RAPD revelaron 81.45 y 82.96 % de polimorfismo. La prueba de Mantel no mostró correlación entre las matrices de similitud de RAPD e ISSR (0.27) y RAPD y RAPD + ISSR (0.47). Sin embargo, se detectó un valor alto y positivo (0.74) de correlación entre las matrices de similitud de ISSR y RAPD + ISSR. Los marcadores ISSR fueron más eficientes comparados a los RAPD debido a su mayor aportación e influencia a los datos consenso. El uso de datos consenso generó información más confiable relacionada con la diversidad genética en papa. Los marcadores RAPD e ISSR diferenciaron con éxito a las accesiones de papa.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum.*, marcadores moleculares, RAPD, ISSR.

### SUMMARY

Nineteen RAPD and five ISSR primers were used to characterize 35 potato accessions. A total of 222 and 82 *loci* were generated by the RAPD and ISSR primers, respectively. Both RAPD and ISSR primers revealed 81.45 and 82.98 % polymorphism, respectively. Mantel test showed no correlation between RAPD and

ISSR (0.27), RAPD and RAPD + ISSR (0.47) similarity matrices. However, a high level of correlation (0.74) was observed between ISSR and RAPD + ISSR similarity matrices. The ISSR marker was found to be more efficient compared to RAPD marker, thereby influencing more the consensus data. The use of consensus data generated more information related to genetic diversity in potato. RAPD and ISSR markers successfully differentiated between the potato accessions.

**Key words:** *Solanum tuberosum* L., molecular markers, RAPD, ISSR.

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) tiene un lugar preponderante a nivel mundial entre los cultivos económicamente más importantes. Ocupa el lugar cuatro después del arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y maíz (*Zea mays* L.) (Horton, 1987). En México, la papa se cultiva anualmente en una superficie de 64, 000 ha, con una producción de 1.7 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 27 ton. ha<sup>-1</sup> (FAOSTAT, 2007). La papa se cultiva principalmente en los estados de Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (SAGARPA, 2010).

Si bien México no es centro de origen de las papas, existe gran diversidad de germoplasma. Las variedades de papa cultivadas en México se diferencian en tres grupos: genotipos provenientes de Europa, de USA, y aquellos mejorados por organismos nacionales como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Ferroni, 1981). El primer grupo representa 50 %

de las variedades cultivadas (Alpha), el segundo 38 % y el último alrededor de 8 %. Los centros principales de diversidad y producción de papas nativas en México son las zonas aledañas al Nevado de Toluca y al Pico de Orizaba (Ugent, 1968). La información disponible sobre diversidad genética y relaciones existentes entre las variedades de papa cultivadas en México es muy limitada, lo que impide su uso en programas de mejoramiento (Becerra y Paredes, 2000).

La identificación de las accesiones, los estudios sobre diversidad genética y las relaciones que guardan entre sí las variedades es de importancia crucial para el desarrollo de los programas de mejoramiento genético. Históricamente, ello se ha llevado a cabo en papa a través del uso de marcadores morfológicos (Huamán *et al.*, 1977; Ortiz y Huamán, 1994; Hijmans y Spooner, 2000). Sin embargo, estos marcadores son escasos, complejos y muy influenciados por el ambiente (Semagn, 2006). Si bien los marcadores bioquímicos también son escasos e influenciados por el ambiente y etapas de desarrollo de la planta, han sido usados para describir cultivares de papa (Desborough y Peloquin, 1968; Stegemann y Loeschecke, 1976; Oliver y Martinez-Zapater, 1985; Douches y Ludlam, 1991). Para complementar estas técnicas y subsanar algunas de sus limitantes, recientemente se han desarrollado marcadores moleculares, basados en hibridación o en la PCR (Semagn, 2006). Los RFLP son marcadores basados en hibridación y se han utilizado extensivamente para construir mapas genéticos (Bonierbale *et al.*, 1988), y conducir estudios de filogenia y diversidad en papa (Görg *et al.*, 1992; Ritter, 2000). Sin embargo, la obtención de estos marcadores consume tiempo, son caros y requieren soporte técnico de alto nivel (Rajapakse *et al.*, 1995; Karp *et al.*, 1997).

Entre las técnicas basadas en la PCR se encuentran los RAPD e ISSR (Reddy *et al.*, 2002). Estos marcadores son sencillos, rápidos de obtener, económicos, requieren un nivel mínimo de soporte técnico y no necesitan conocimiento previo de la secuencia del genoma a estudiar (Ward y Grewe, 1995; Jones *et al.*, 1997; Karp *et al.*, 1997). Los RAPDs son una técnica que se basa en la amplificación de regiones discretas del genoma utilizando la Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR) con iniciadores oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Si bien son limitados en cuanto a reproducibilidad, son marcadores dominantes y muestran problemas con la homología, la técnica ha sido útil para la construcción de mapas genéticos (Pérez *et al.*, 1999), analizar diversidad genética (Mori *et al.*, 1993; Milbourne *et al.*, 1997; McGregor *et al.*, 2000; Orona-Castro *et al.*, 2006; Yasmin *et al.*, 2006) y conducir estudios taxonómicos y filogenéticos en papa (Miller y Spooner, 1999; Isenegger *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003). Los ISSR utilizan iniciadores SSR anclados o no anclados para amplificar secuencias de ADN entre dos SSRs invertidos hechos de la misma secuencia. Los ISSR fueron primero utilizados por Zietkiewicz *et al.* (1994) para diferenciar rápidamente entre individuos cercanamente relacionados. La técnica combina la mayoría de las ventajas del análisis con marcadores AFLP y microsatélites con la universalidad de los RAPD (Bornet y Branchard, 2001, 2004). Los ISSR se han utilizado con éxito en papa para determinar huellas genéticas (Prevost y Wilkinson, 1999; Bornet y Branchard, 2001) y para estudios de diversidad (Bornet *et al.*, 2002).

Se da un uso limitado a la gran diversidad de las papas existentes en México debido a la poca información disponible acerca de la composición genética de los

materiales. La información genética es de la mayor importancia para la conservación, mejoramiento y uso de los recursos genéticos. En este trabajo se realizó la caracterización de genotipos de papa cultivados en México utilizando marcadores moleculares RAPD e ISSR.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Treinta y cinco accesiones de papa se colectaron en varios estados de la República Mexicana y del Banco de Germoplasma del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (Cuadro 1). Se obtuvieron secciones de cinco tubérculos seleccionados para su análisis.

### **Purificación de ADN**

La purificación del ADN se hizo de acuerdo al protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Secciones de tubérculos de 0.3g se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. La muestra se colocó en un microtubo (Eppendorf) de 1.5 mL que contenía 600 µL de amortiguador de extracción (20 mL Tris-HCL 1 M, pH 8.0; 20 mL EDTA 0.5 M, pH 8.0; 20 mL NaCl 5 M; 35 µL β-mercaptoetanol; 40 mL dodecil sulfato de sodio 20 %) y se incubó a 65 °C por 10 min, con inversión ocasional de los tubos.

Cuadro 1. Origen geográfico de los genotipos usados en el estudio.

No.	Genotipo	Origen		Genotipo	Origen		Genotipo	Origen
1	Cambray Rosa Morelos	México	13	286 -60	U.S.A	25	Gigant	Europa
2	Criolla Edo Mex	México	14	306 -54	U.S.A	26	Alfa Chica	México
3	279 - 17	U.S.A	15	277 -35	U.S.A	27	Cambray Blanca Edo Mex	México
4	286 -31	U.S.A	16	263 -83	U.S.A	28	Tollocan	México
5	263 -68	U.S.A	17	286 -35	U.S.A	29	Mochis DF	México
6	314 -47	U.S.A	18	286 -40	U.S.A	30	Cambray Rosa DF	México
7	Alfa Grande	Europa	19	LB5 -92	U.S.A	31	Cambray DF Blanca	México
8	Atlantic	U.S.A	20	286 -9	U.S.A	32	Criolla Blanca Puebla	México
9	Armada	Europa	21	Montserrat	Europa	33	Criolla Rosa Puebla	México
10	Fianna	Europa	22	254 -83	U.S.A	34	Papa Chica	México
11	LB5 -5	U.S.A	23	Mondial	Europa	35	Cambray Rosa	México

							Edo Mex	
12	215 - 77	U.S.A	24	176 -62	U.S.A			

Después, se adicionó 200  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio 5M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó a 8000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 700  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío (-20 °C). Se mezcló por inversión e incubó a -20 °C por 30 min y centrifugó por 5 min a 8000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó, se recobró el precipitado y se disolvió en 200  $\mu\text{L}$  de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  10 mM, pH 8.0).

Para eliminar el ARN se añadió 2  $\mu\text{L}$  de ARNasa A y se incubó a 37 °C por 1 h. Después se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M mas 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20 °C por 2 h Se centrifugó a 8000 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 300  $\mu\text{L}$  de etanol a 70 %. La pastilla se secó y se disolvió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  1 mM, pH 8.0) a 4 °C. La concentración del ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro Genesys 10 uv Scanning® (Thermo Scientific) y se verificó la calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa a 0.8 % (w/v). El ADN se utilizó en subsecuentes reacciones de PCR.

### **Condiciones de reacción para RAPD**

Se probó un total de 25 iniciadores RAPD de las series A, B y D de Operon® (Operon technologies Inc, Alameda, CA, USA) de los que se seleccionó diecinueve que mostraron polimorfismo y patrones de bandas claras y nítidas (Cuadro 2). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne®

TC-512. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , que incluyó 4.2  $\mu\text{L}$  agua doble destilada estéril, 10  $\mu\text{L}$  de dNTPs (500  $\mu\text{M}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 10X (Tris-HCl 750 mM, pH 8.8;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  200 mM; Tween 20 a 1 % (v/v)); 1.0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM); 3.0  $\mu\text{L}$  de iniciador a una concentración de 10 pM; 0.3  $\mu\text{L}$  de enzima Taq ADN polimerasa a una concentración de 5U  $\mu\text{L}^{-1}$ ; y 4.0  $\mu\text{L}$  de ADN genómico a una concentración de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a 94 °C, 2 min; 38 ciclos [94 °C por 30 s, 40 °C, por 30 s, 72 °C por 90 s]; con una extensión de 72 °C por 2 min. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), por 1 h a 120 V. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) por 15 min; el exceso de colorante se eliminó lavando el gel con agua destilada por 5 min y se documentó bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

### **Condiciones de reacción para ISSR**

Para las reacciones ISSR, se usaron cinco iniciadores de un total de 10 probados (Cuadro 2). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen y con reactivos semejantes a los RAPD excepto para las condiciones de reacción: 94 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 30 s, temperatura específica de alineamiento por 45 s y 72 °C por 2 min y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. La temperatura de alineamiento estuvo en un rango de 40 a 58 °C y los ciclos se redujeron a 30. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa a 1.5 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH

7.6; 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA), por 1 h a 120 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) por 15 min y el exceso de colorante se eliminó enjuagando en agua destilada por 15 min y documentados bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

### **Análisis de los datos**

Los materiales se compararon en base a sus similitudes y diferencias en los patrones de bandas. Un valor de 1 se asignó para la presencia de una banda y un 0 para su ausencia. Se construyó una matriz básica de datos para obtener un dendrograma de relaciones entre las accesiones usando el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908) y con el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). Se hizo un análisis de remuestreo (Bootstrapping, 1000 repeticiones) con la finalidad de obtener datos numéricos consistentes del árbol generado por el programa estadístico Free Tree versión 0.9.1.50 (Hampl *et al.*, 2001). La prueba de Mantel (Mantel, 1967) se efectuó para determinar correlaciones entre matrices de similitud, usando el programa Mantel Nonparametric Test Calculator para Windows Versión 2.0 (1999-2007) (Liedloff, 1999). Se realizó un Escalado Multidimensional utilizando el programa NTSYS-pc Versión 2.1 (Rohlf, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### RAPD

Se amplificaron diecinueve de los 25 iniciadores probados de las series A, B y D de Operon (Cuadro 2). Se evaluó un total de 222 *loci* y de ellos 184 mostraron polimorfismo. El promedio de polimorfismo detectado con los iniciadores RAPD fue de 82.9 %. Los iniciadores A19, D04 y D10 revelaron 100 % de polimorfismo. El número promedio de bandas fue de 11.15, con oscilaciones entre 4 y 17.

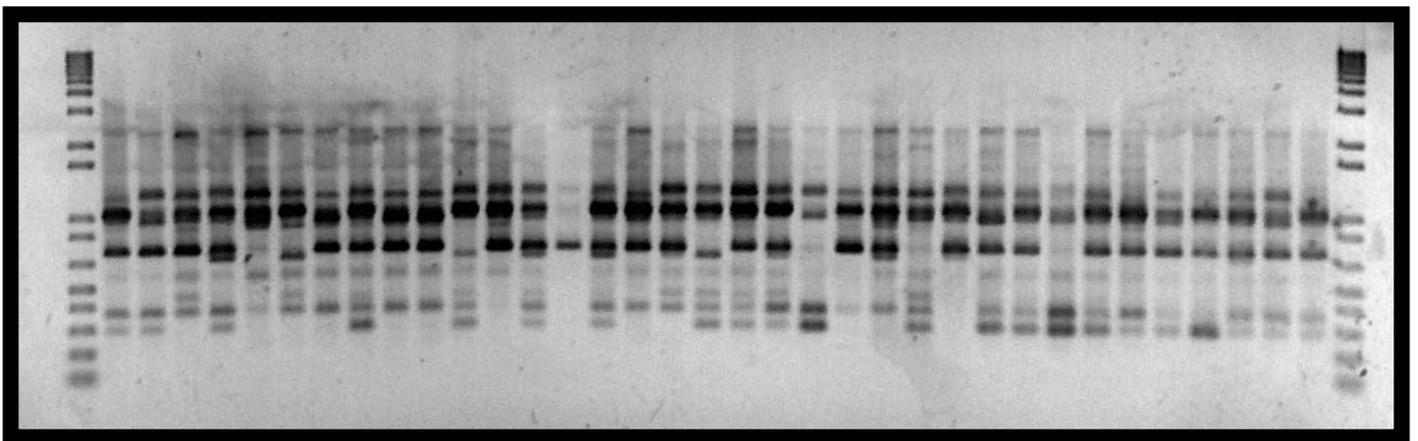
Cuadro 2. Lista de iniciadores RAPD, su secuencia, número de productos amplificados y porcentaje de mono y polimorfismo detectados.

<b>Iniciador RAPD</b>	<b>Secuencia 5'- 3'</b>	<b>Productos amplificados</b>	<b>Monomorfismo %</b>	<b>Polimorfismo %</b>
<b>A02</b>	TGC CGA GCT G	14	21.43	78.57
<b>A3</b>	AGT CAG CCA C	14	14.28	85.72
<b>A05</b>	AGG GGT CTT G	12	25	75
<b>A13</b>	CAG CAC CCA C	10	40	60
<b>A19</b>	CAA ACG TCG G	13	0	100
<b>A09</b>	GGG TAA CGC C	7	28.57	71.43
<b>D05</b>	TGA GCG GAC A	12	16.66	83.33
<b>D07</b>	TTG GCA CGG G	10	30	70
<b>D04</b>	TCT GGT GAG G	4	0	100
<b>D10</b>	GGT CTA CAC C	17	0	100
<b>D11</b>	AGC GCC ATT G	11	27.27	72.72
<b>D18</b>	GAG AGC CAA C	13	23.07	76.92
<b>D20</b>	ACC CGG TCA C	12	16.66	83.33
<b>D01</b>	ACC GCG AAG G	9	11.11	88.88
<b>D03</b>	GTC GCC GTC A	15	6.66	93.33
<b>D06</b>	ACC TGA ACG G	9	11.11	88.88
<b>D09</b>	CTC TGG AGA C	11	9.09	90.90
<b>D02</b>	GGA CCC AAC C	10	20	80
<b>B05</b>	TGC GCC CTT C	9	22.22	77.77
<b>Media</b>		<b>11.15</b>	<b>17</b>	<b>82.98</b>

El análisis de los patrones RAPD permitió estimar las similitudes y diferencias genómicas entre los cultivares. La Figura 1A muestra un ejemplo de los patrones de bandas generados utilizando el iniciador D10, que mostró diferencias entre los genotipos evaluados.

### A RAPD

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 M



### B ISSR

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 M

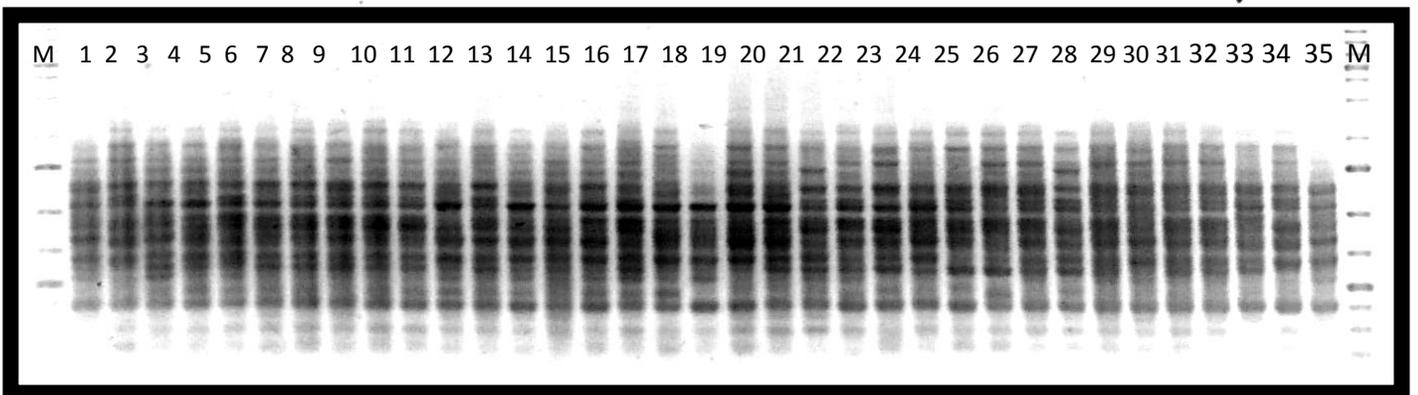


Figura 1. RAPD D10 (A) e ISSR P2 (B) para 35 accesiones de papa (*Solanum tuberosum* L.) como se indican en el Cuadro 1.

La Figura 2A muestra un dendrograma de relaciones entre los diferentes genotipos de papa. Se observa la formación de ocho grupos a un coeficiente de Jaccard de 0.60. La variedad Tollocan formó el primer grupo. LB5-5 el segundo, el tercero incluyó a Montserrat, el cuarto grupo a 306-54, mientras que el quinto fue un grupo muy homogéneo con Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa Edo Mex, que probablemente representan el mismo genotipo. Gigant formó el grupo sexto y 176-62 el séptimo. El grupo octavo incluyó al resto de las accesiones. Este gran grupo consistió de dos subgrupos. El primer subgrupo a su vez se puede dividir en cinco sub-subgrupos por la relación que guardan entre sí las variedades. El primero incluyó variedades mexicanas con tubérculos de piel color blanco (Cambray Blanca, Mochis, Criolla Blanca) y Atlantic que es de U.S.A. El segundo consistió de las variedades europeas Alfa Grande, Fianna y Armada. El tercero agrupó a clones de U.S.A (286-31, 215-77 y 263-68). El cuarto incluyó a 314-47, 279-17, Criolla Edo Mex y Papa Chica. El quinto consistió de algunas variedades mexicanas que sintetizan antocianinas y tienen cubiertas de tubérculos coloreadas (Criolla Rosa Puebla, Alfa Chica, Cambray Rosa DF y 254-83). El segundo subgrupo comprendió dos sub-subgrupos. Mondial, una variedad europea conformó el primer sub-subgrupo que fue el más divergente a un coeficiente de similitud de 0.65. El segundo incluyó a los clones de U.S.A. (LB5-5, 286-35, 277-35, 263-83, 286-60, 286-40 y 286-9).

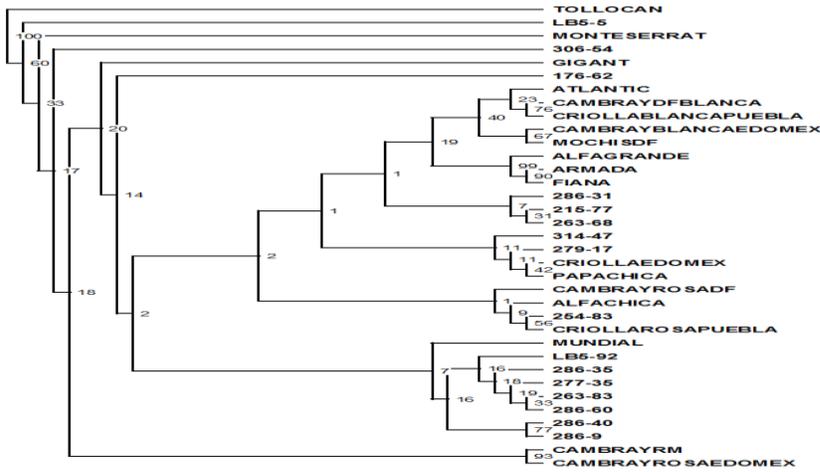
El promedio de similitud entre pares de cultivares fue de  $0.61 \pm 0.02$ , con un rango de 0.46 a 0.87. Los valores más altos de similitud se obtuvieron entre las variedades europeas Fianna y Armada (0.87), Alfa Grande y Armada (0.83) Alfa

Grande y Fianna (0.81) y Cambray Blanca DF y Mochis (0.81). Los coeficientes de similitud más bajos se registraron entre LB5-5 y Tollocan (0.46), seguido por Cambray Rosa Morelos (0.48) y Gigant y Tollocan (0.48). Tollocan fue la más divergente del resto de las accesiones a un coeficiente de similitud de 0.53 (Figura 2A).

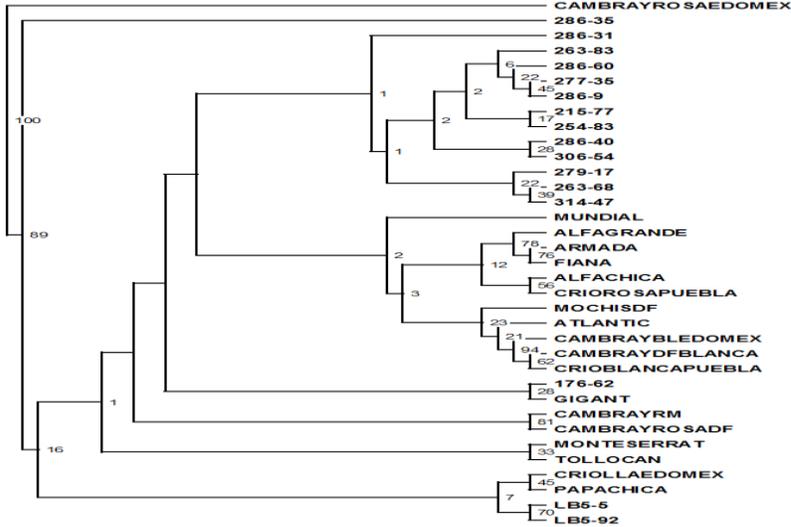
El análisis de Escalado Multidimensional (MDA) realizado con las 35 accesiones de papa claramente las separó en dos grupos (Figura 3A). El primer grupo se constituyó con los clones de U.S.A (LB5-5, LB-92, 306-54, 263-83, 286-35, 286-60, 277-35, 286-31, 286-40 y 286-9). Este grupo también incluyó a los clones de la serie 286. El segundo grupo incluyó a variedades mexicanas, europeas y al resto de los clones de U.S.A (Cambray Blanca Edo Mex, Criolla Blanca Puebla, Cambray DF Blanca, Mochis, Cambray Rosa DF, Cambray Rosa Morelos, Cambray Rosa Edo Mex, Criolla Edo Mex, Criolla Rosa Puebla, Papa Chica y Alfa Chica, Tollocan, Fianna, Armada, Alfa Grande, Mundial, Gigant, Montserrat, Atlantic, 279-17, 263-68, 215-77, 314-47, 254-83 y 176-62).

El análisis de escalado multidimensional proporcionó información adicional sobre las relaciones genéticas que guardan entre sí las accesiones estudiadas. El uso de marcadores RAPD para identificar o establecer relaciones entre cultivares de papa está bien documentado (Mori *et al.*, 1993; Orona-Castro *et al.*, 2006; Yasmin *et al.*, 2006 y Rocha *et al.*, 2010).

A



B



C

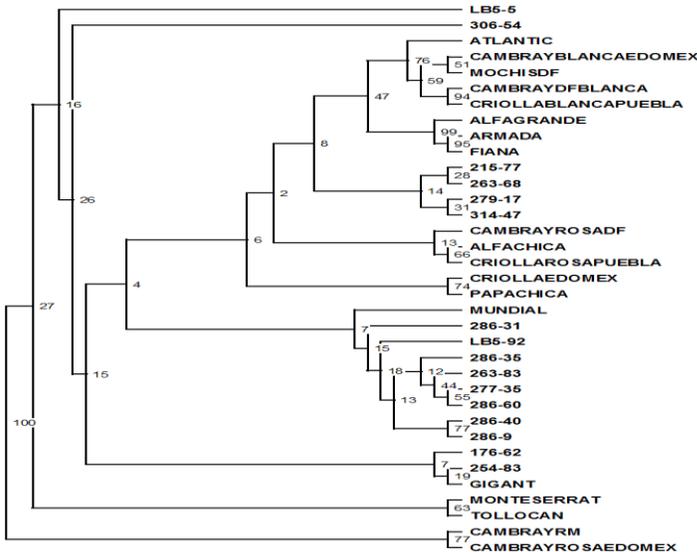


Figura 2. Dendrograma de relaciones generado con datos de RAPD (A), ISSR (B) y consenso RAPD + ISSR (C), usando el coeficiente de similitud de Jaccard.

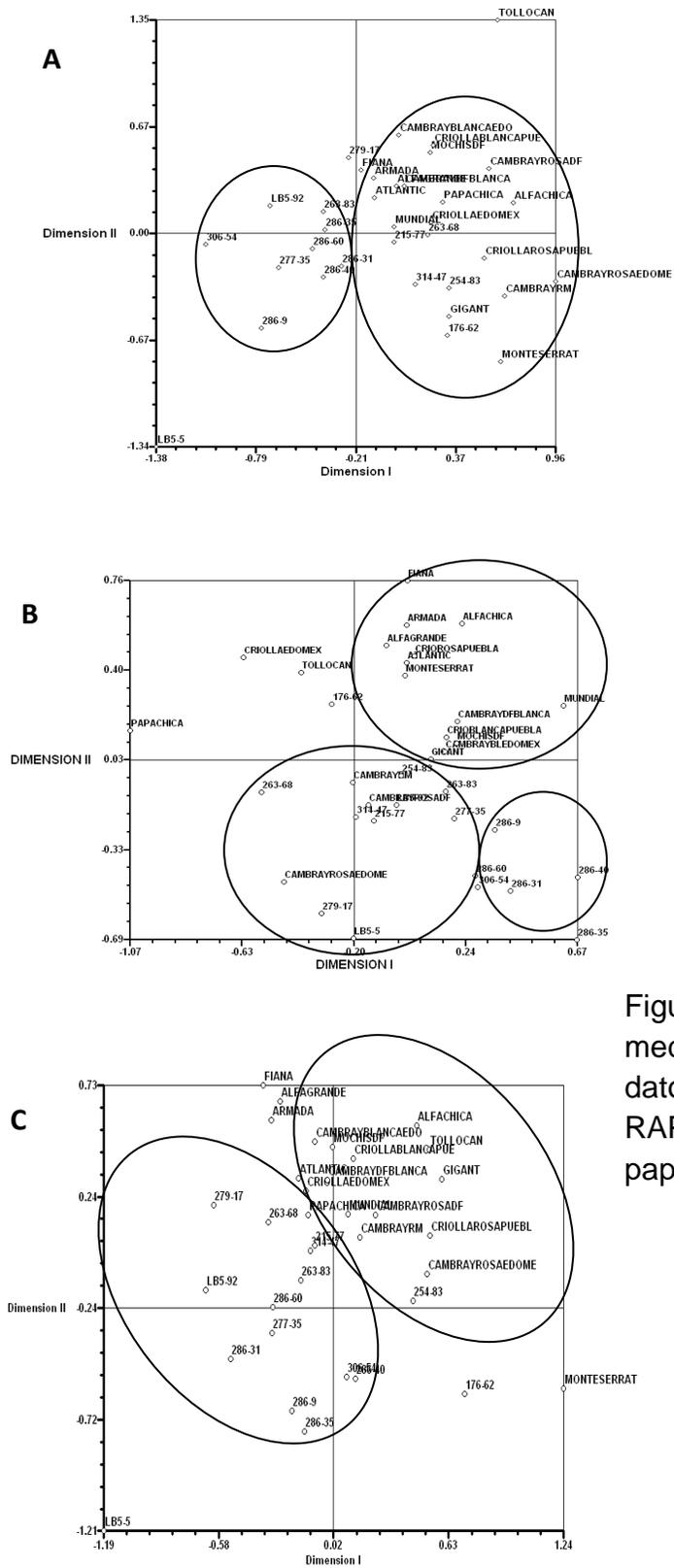


Figura 3. Gráficas en 2D generadas mediante escalado multidimensional y con datos de RAPD (A), ISSR (B) y consenso RAPD + ISSR (C), para 35 genotipos de papa.

## ISSR

Se utilizó cinco iniciadores ISSR para evaluar los genotipos de papa (Cuadro 3). Se estudió un total de 82 *loci* de los que 66.7 (81.4 %) fueron polimórficos. El promedio de polimorfismo detectado fue 81.4 %, que fue comparable al promedio obtenido utilizando iniciadores RAPD (82.9 %). El número de bandas promedio fue de 16.4, oscilando entre 14 y 21.

Cuadro 3. Lista de iniciadores ISSR, sus secuencias y temperatura de alineamiento, número de productos amplificados y porcentaje de mono y polimorfismo detectados.

Iniciador ISSR	Secuencia T <sub>A</sub>	5´- 3´	Productos amplificados	Monomorfismo (%)	Polimorfismo total (%)
P1	GAGCAACAACAACAACAA 48		14	14.29	85.71
P2	CTGAGAGAGAGAGAGAGA G 58		18	22.23	77.77
P3	AGAGAGAGAGAGAGAGTG 45		21	14.29	85.71
P4	ATGATGATGATGATG 40		14	28.58	71.42
P5	AGAGAGAGAGAGAGAG 45		15	13.33	86.66
	<b>Media</b>		<b>16.4</b>	<b>18.54</b>	<b>81.45</b>

El análisis de ISSR permitió estimar las similitudes y diferencias genómicas entre los materiales. La Figura 1B muestra los patrones de bandas obtenidos usando el iniciador ISSR P2, que mostró diferencias entre los genotipos de papa evaluados.

La Figura 2B muestra un dendrograma de relaciones de similitud entre los diferentes genotipos de papa. Los resultados indican la formación de siete grupos a un coeficiente de Jaccard de 0.70. Cambray Rosa Edo Mex formó el primer grupo y 286-35 el segundo. El tercer grupo consistió de dos subgrupos homogéneos, el primero constituido con LB5-5 y LB5-92 y el segundo con Criolla Edo Mex y Papa Chica. Tres agrupamientos homogéneos de Montserrat y Tollocan, Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF, Gigant y 176-62, formaron los grupos cuarto, quinto y sexto, respectivamente. Cambray Rosa Edo Mex formó el grupo más divergente del resto de los genotipos a un coeficiente de similitud de 0.47. El séptimo grupo consistió del resto de las accesiones. Este grupo se dividió en dos subgrupos; el primero consistió de clones de papa de U.S.A (286-35, 286-31, 263-83, 286-60, 277-35, 286-9, 215-77, 254-83, 286-40, 306-54, 279-17, 263-68 y 314-47). El segundo se constituyó de cuatro sub-subgrupos: el primero lo formó Mondial, el segundo consistió de variedades europeas (Alfa Grande, Armada y Fianna). Alfa Chica y Criolla Rosa Puebla que son variedades mexicanas de piel coloreada por sintetizar antocianinas formaron el sub-subgrupo tres. El cuarto sub-subgrupo consistió de variedades mexicanas con tubérculos de piel color blanco como Cambray Blanca Edo Mex, Criolla Blanca Puebla, Cambray DF Blanca, Mochis y Atlantic, una variedad de U.S.A. La formación del subgrupo de clones de papa de U.S.A fue muy distinto entre ISSRs y RAPDs.

Los valores más altos de similitud se registraron entre Cambray DF Blanca y Criolla Blanca Puebla (0.95), Cambray Blanca Edo Mex y Criolla Blanca Puebla (0.94), Cambray Blanca Edo Mex y Cambray DF Blanca (0.92). Las variedades europeas también mostraron altos valores de similitud: Fianna y Armada (0.92), Alfa Grande y Fianna (0.88) y Alfa Grande y Armada (0.86). Los valores más bajos de similitud se obtuvieron entre Cambray Rosa Edo Mex y Montserrat (0.40), Cambray Rosa Edo Mex y 263-68 (0.42) y Cambray Rosa Edo Mex y Armada (0.42).

El análisis de escalado multidimensional (MDA) realizado con 35 accesiones de papa y 5 marcadores ISSR las dividió claramente en tres grupos diferentes (Figura 3B). El primer grupo consistió de la variedad mexicana Cambray Rosa y clones de U.S.A (LB5-5, 279-17, 263-68, 254-83, 263-83, 277-35, 215-77, 314-17, LB5-92, 254-83 y 176-62). El segundo grupo lo constituyeron todas las variedades europeas y variedades mexicanas con tubérculos de piel color blanco (Fianna, Armada, Alfa Grande, Alfa Chica, Montserrat, Mondial, Cambray DF Blanca, Criolla Blanca Puebla, Mochis, Cambray Blanca Edo Mex y Gigant) aparte de Criolla Rosa Puebla que es de cáscara rosada y Atlantic de U.S.A. El tercer grupo se formó principalmente con clones de la serie 286 de U.S.A (286-9, 286-60, 286-31, 286-40, 286-35 y 306-54).

En el presente estudio se detectó alto nivel de polimorfismo mediante el uso de marcadores ISSR. En estudios semejantes, los marcadores ISSR han mostrado ser bastante promisorios para la identificación de cultivares de papa (Prevost y Wilkinson, 1999; Bornet *et al.*, 2002).

## **Análisis Combinado**

La Figura 2C muestra un dendrograma de relaciones de similitud entre los diferentes genotipos de papa utilizando un análisis combinado con marcadores RAPD e ISSR. Los resultados muestran la formación de seis grupos. El primero consistió de un grupo homogéneo formado con Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa Edo Mex. Montserrat y Tollocan formaron el segundo grupo. El tercero con LB5-5, el cuarto 306-54, el quinto 176-62, 254-83 y Gigant. El sexto grupo consistió del resto de las accesiones. Este grupo se dividió en dos subgrupos. El primer subgrupo se dividió en 5 sub-subgrupos. El primer sub-subgrupo se formó con Atlantic de U.S.A y variedades mexicanas color blanco (Cambray Blanca Edo Mex, Mochis, Cambray DF Blanca y Criolla Blanca Puebla). El segundo consistió de variedades europeas (Alfa Grande, Armada y Fianna), el tercero lo constituyeron clones de U.S.A (215-77, 263-68, 279-17 y 314-47). El cuarto sub-subgrupo consistió de variedades mexicanas de piel color rosa pigmentadas con antocianinas (Cambray Rosa DF, Alfa Chica, y Criolla Rosa Puebla). El quinto consistió de variedades mexicanas con tubérculos de piel color roja: Criolla Edo Mex y Papa Chica. El segundo subgrupo se constituyó de dos sub-subgrupos. El primero lo formó Mondial y el segundo el resto de los clones (LB5-92, 286-35, 286-83, 277-36, 286-60, 286-40 y 286-9) de U.S.A. El análisis combinado claramente agrupó a los clones de la serie 286 de U.S.A en este segundo subgrupo.

Los valores de similitud más altos se registraron entre las variedades europeas Fianna y Armada (0.88), Alfa Grande y Armada (0.84), Alfa Grande y Fianna (0.83)

las variedades mexicanas color blanco Cambray DF Blanca y Criolla Blanca Puebla (0.87), Cambray Blanca Edo Mex y Criolla Blanca Puebla (0.82) y Cambray Blanca Edo Mex y Cambray DF Blanca (0.80). Los valores más bajos de similitud se obtuvieron entre Cambray Rosa Edo Mex y Tollocan (0.48), Cambray Rosa Edo Mex y LB5-5 (0.48) y Cambray Rosa Edo Mex y Mondial (0.49).

El análisis de escalado multidimensional (MDA) llevado a cabo con 35 accesiones de papa y 19 iniciadores RAPD y 5 iniciadores ISSR separó claramente a los materiales en dos grupos distintos (Figura 3C). El primer grupo se formó principalmente con clones de la serie 286 de U.S.A, el segundo consistió de todas las variedades de papa restantes. Un agrupamiento semejante se obtuvo mediante el análisis tridimensional (Figura 4).



regiones repetidas o no repetidas del genoma (Ghislain *et al.*, 2006). El análisis entre RAPD y RAPD + ISSR (datos consenso) mostró también correlación baja y positiva (0.47), mientras que la generada entre los ISSR y RAPD + ISSR fue alta y positiva (0.74). Con solo 5 iniciadores ISSR fue posible detectar un nivel de polimorfismo (81.45 %) comparable al detectado usando 19 iniciadores tipo RAPD (82.98 %). Los marcadores moleculares ISSR se ha reportado son muy poderosos para analizar diversidad genética en papa (Bornet *et al.*, 2002), y en relación a RAPD en otras especies vegetales (Rus-Kortekas *et al.*, 1994; Nagaoka y Ogihara, 1997; Raina *et al.*, 2001). Esto puede explicar la correlación alta y positiva obtenida mediante la prueba de Mantel entre matrices de similitud de ISSR y RAPD + ISSR. La aplicación de marcadores complementarios en conjunto tales como RAPD e ISSR puede proporcionar información más confiable acerca de la diversidad genética, que utilizar por ejemplo marcadores RAPD por separado.

En conclusión, los marcadores RAPD e ISSR permitieron discriminar con éxito entre las 35 accesiones diferentes de papa usadas en el presente estudio. Los datos consenso proporcionaron información confiable en relación a los genotipos.

## REFERENCIAS

Becerra V V, Paredes CM. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc. (Chile)* 60(3):270-281.

Bonierbale M, Plaisted RL, Tanksley SD. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120:1095-1103.

Bornet B, Branchard M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19:209-215.

Bornet B, Goraguer F, Joly G, Branchard M. 2002. Genetic diversity in european and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45(3): 481-484.

Dellaporta S.L., J. Wood, J.B. Hicks. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol. Boil. Rep.* 1 (4):19-21.

Desborough S, Peloquin SJ. 1968. Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *Amer. Potato J.* 45:220-229.

Douches DS, Ludlam K. 1991. Electrophoretic characterization of North American potato cultivars. *Amer. Potato. J.* 68:767-780.

FAOSTAT. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. 13 Feb. 2007. <<http://faostat.fao.org/site/336/default.aspx>>.

Ferroni MA. 1981. El potencial de la papa como recurso alimenticio y como fuente de ingreso. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Programa Regional Cooperativo de Papa. Toluca, Edo. de México, México. 30 p. (Publicación Especial Núm. 1.).

Ghislain M, Andrade D, Rodríguez F, Hijmans RJ, Spooner DM. 2006. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theoretical Applied Genetic* 113: 1515–1527.

Görg R, Schachtschabel U, Ritter E, Salamini F, Gebhardt C. 1992. Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Sci.* 32:815-819.

HAMPL V, A. Pavlicek, J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 5:731-735.

Hijmans RJ, Spooner DM. 2001. Geographic distribution of wild potato species. *Amer. J. Bot.* 88(11):2101-2112.

Horton D. 1987. Potatoes. West View Press, Boulder, Colorado, U.S.A. pp 164.

Huamán Z, Williams JT, Salhuana W, Vincent N. 1977. Descriptors for the cultivated potato and for the maintenance and distribution of germplasm collections. Consultative Group on International Agricultural Research. Rome, International Board for Plant Genetic Resources (I.B.P.G.R.). 47 p.

Isenegger DA, Taylor PWJ, Ford R, Franz P, McGregor GR, Hutchinson J. 2001. DNA fingerprinting and genetic relationships of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) commercially grown in Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 52 (9):911-918.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44:223-70.

Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sale F, Van de Wiel C, Bredemeijer G, Buiatti M, Maestri E, Malcevshi A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3:381–390.

Karp A, Kresovich S, Bhat KV, Ayada WG, Hodgkin T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Tech. Bull. No. 2.

Liedloff AC. 1999. Mantel Nonparametric test Calculator. Version 2.0. School of National Resource Sciences, Queensland University of Technology, Australia.

Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209–220.

McGregor CE, Lambert CA, Greyling MN, Louw JH, 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.

Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W, Waugh R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3:127–136.

Miller JT, Spooner DM. 1999. Collapse of species boundaries in the wild potato *Solanum brevicaulle* complex (*Solanaceae*, sp. Sect. *Petota*): molecular data. *Plant Syst. Evol.* 214(1-4):103-130.

Mori M, Hosaka K, Umemura Y, Kaneda C. 1993. Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs. *Jpn. J. Genet.* 63:167-174.

Nagaoka T, Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94:597-602.

Oliver JL, Martinez-Zapata JM. 1985. A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns. *Theor. Appl. Genet.* 69:305-311.

Orona-Castro F, Pecina-Quintero V, Rocha-Peña A, Cadena-Hinojosa MA, Octavio Martínez de la Vega O, Almeyda-León IH. 2006. Caracterización molecular de genotipos comerciales y elite de papa. *Agric. Téc. Méx.* 2(32):171-180.

Ortiz R, Huama Z. 1994). Inheritance of morphological and tuber characteristics. In: Bradshaw JE, Mackay GR. (eds) *Potato Genetics*. CAB International, pp 263-279.

Perez F, Menedez A, Dehae P, Quiros CF. 1999. Genomic structural differentiation in *Solanum* comparative mapping of the A- and E- genomes. *Theor. Appl. Genet.* 98:1183-1193.

Prevost A, Wilkinson MJ. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.

Rajapakse S, Bethoff LE, He G, Estager AE, Scorza R, Verde I, Ballard RE, Baird WV, Callahan A, Monet R, Abbott AG. 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:503-510.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA. 2002. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-12.

Ritter A. 2000. Aplicación de la biotecnología a la mejora genética de la patata. In: Vitoria-Gasteiz. PATATA, España, pp. 8.

Rocha EA, Luciano V P, Henrique de Carvalho H, Guimarães CT. 2010. Molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 10:204-210.

Rohlf FJ. 2000. Programme NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1. Exeter Software, New York, pp 83.

Rus-Kortekaas W, Smulders MJM, Arens P, Vosman B. 1994. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 37: 375–381.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Cultivo de papa. México, D. F. p. 550-563.

Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop MN. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5(25):2540-2568.

Stegemann H, Loeschecke V. 1976. Index Europäischer Kartoffelsorten. Parey P (ed.). Bestimmung durch elektroforetische Spektren Berlin, pp 214.

Sun G, Wang-Pruski G, Mayich M, De Jong H. 2003. RAPD and pedigree-based genetic diversity estimates in cultivated diploid potato hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 107:110-115.

Ward RD, Grewe PM. 1995. Appraisal of molecular techniques in fisheries. In: Carvalho GR, Pitcher TJ. (eds) *Molecular genetics in fisheries.*, Chapman and Hall, London, pp 29-54.

Welsh, J., M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531–6535.

Yasmin S, Islam MS, Kondoker M, Nasiruddin M, Alam S. 2006. Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Biotechnol.* 5(1):27-31.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.

### **III. COMPARACIÓN ENTRE MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES PARA DISCRIMINAR ENTRE GENOTIPOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CULTIVADOS EN MÉXICO**

#### **RESUMEN**

Quince cultivares de papa sembrados en México se caracterizaron utilizando marcadores morfológicos y moleculares. Se evaluó tanto caracteres cuantitativos como cualitativos usando una escala categorial. Se comparó la eficiencia de los marcadores morfológicos contra marcadores moleculares RAPD e ISSR para discriminar entre los genotipos de papa estudiados. Ambos tipos de marcadores fueron exitosos para diferenciar a los genotipos. La prueba de Mantel mostró baja correlación entre las matrices de similitud morfológica y molecular.

**Palabras clave:** Caracterización, marcadores morfológicos, marcadores moleculares, *Solanum tuberosum*.

#### **SUMMARY**

Fifteen potato cultivars grown in Mexico were characterized using morphological and molecular markers. The morphological characters included both quantitative and qualitative characters and were scored based on a categorical scale. The efficiency of morphological markers was compared with RAPD and ISSR molecular markers to discriminate between potato genotypes studied. Both markers successfully differentiated between the potato cultivars studied. The Mantel test

showed low correlation between the morphological and molecular similarity matrixes.

**Key words:** Characterization, morphological markers, molecular markers, *Solanum tuberosum*.

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos mas importantes a nivel mundial (Gopal y Khurana, 2006). Ocupa el cuarto lugar en producción para consumo humano, superado solamente por el trigo, arroz y maíz (Ross, 1986). En México, la papa se cultiva anualmente en una superficie de 64,000 ha, con una producción de 1.7 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 27 ton/ha (FAOSTAT, 2007). La papa se cultiva principalmente en los estados de Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (SAGARPA, 2010).

La información sobre identificación, diversidad genética y relaciones entre los genotipos de papa es de gran importancia para la conservación eficiente, e impulsar programas de mejoramiento y utilización de los recursos genéticos de papa. México es un país rico en diversidad de genotipos de papa. Sin embargo, estos recursos genéticos no se han aprovechado adecuadamente debido a la limitada información disponible sobre sus características y diversidad genética (Becerra y Paredes, 2000).

La caracterización morfológica es el primer paso en el mejoramiento de los cultivos y programas de conservación (Smith y Smith, 1989). Las características morfológicas se han venido utilizando para estudiar la diversidad genética, identificar plantas cultivadas y conservar los recursos genéticos. A la fecha, los marcadores morfológicos establecen las bases para identificar y diferenciar variedades. Algunas limitantes de los marcadores morfológicos son: su obtención es tardada, son complejos, limitados, subjetivos, son influenciados por el ambiente, son caros e involucran estados de desarrollo específicos del cultivo.

Varios investigadores han reportado diversidad genética entre genotipos de papa usando marcadores morfológicos (Ahmadizadah y Felenji, 2011; Solís *et al.*, 2007; Arslanoghu *et al.*, 2011). Chimote *et al.* (2007) usó con éxito marcadores morfológicos para estudiar la diversidad genética y relaciones entre genotipos de papa de la India y seleccionó progenitores superiores.

Los marcadores moleculares han revolucionado la forma de conducir los estudios sobre diversidad genética. Entre los marcadores moleculares desarrollados, los marcadores basados en la PCR son rápidos, más objetivos, simples y abundantes, no afectados por el ambiente y pueden analizarse en cualquier etapa de desarrollo del cultivo. Los marcadores RAPD e ISSR son simples, económicos, rápidos y discriminan efectivamente entre genotipos de papa (Bornet *et al.*, 2002; McGregor *et al.*, 2000; Milbourne *et al.*, 1997; Orona-Castro *et al.*, 2006; Prevost y Wilkinson, 1999; Rocha *et al.*, 2010; Yasmin *et al.*, 2006). Algunas de sus limitaciones incluyen su naturaleza dominante, inversión inicial alta y soporte técnico alto. En el presente estudio se caracterizó a cultivares de papa usando caracteres

morfológicos y se les comparó contra marcadores RAPD e ISSR en cuanto a su eficiencia para discriminar entre los genotipos de papa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Caracterización morfológica**

Quince genotipos de papa (Cuadro 1) se evaluaron en un invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo, bajo condiciones controladas. Tres tubérculos de cada cultivar se sembraron en macetas de 20 cm de diámetro. Se tuvo cuatro repeticiones mantenidas en un diseño completamente al azar para contar con  $12 \times 15 = 60$  plantas. Doce individuos se evaluaron para caracteres morfológicos para cada cultivar. Se estudió a quince caracteres morfológicos (Cuadro 2). Fertilizantes e insecticidas se aplicaron de acuerdo a recomendaciones técnicas para el cultivo de la papa. Se usó a descriptores varietales recomendados por UPOV (2004) modificados para caracterizar a los cultivares.

### **Caracterización molecular**

La purificación del ADN se llevó a cabo según Dellaporta *et al.* (1983). La concentración del ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Genesys 10 UV Scanning® (Thermo Scientific) y la calidad se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa a 0.8 % (p/v). El ADN obtenidos se usó en subsecuentes reacciones de PCR.

### **Condiciones de reacción para RAPD**

Se probó un total de 25 iniciadores RAPD de las series A, B y D de Operon® (Operon technologies Inc, Alameda, CA, USA) de los que se seleccionó cinco que mostraron polimorfismo y patrones de bandas claras y nítidas (Cuadro 3). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne® TC-512. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , que incluyó 4.2  $\mu\text{L}$  agua doble destilada estéril, 10  $\mu\text{L}$  de dNTPs (500  $\mu\text{M}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 10X (Tris-HCl 750 mM, pH 8.8;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  200 mM; Tween 20 a 1 % (v/v)); 1.0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM); 3.0  $\mu\text{L}$  de iniciador a una concentración de 10 pM; 0.3  $\mu\text{L}$  de enzima Taq ADN polimerasa a una concentración de 5U  $\mu\text{L}^{-1}$ ; y 4.0  $\mu\text{L}$  de ADN genómico a una concentración de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a 94 °C, 2 min; 38 ciclos [94 °C por 30 s, 40 °C, por 30 s, 72 °C por 90 s]; con una extensión de 72 °C por 2 min. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM  $\text{Na}_2$  EDTA), por 1 h a 120 V. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) por 15 min; el exceso de colorante se eliminó lavando el gel con agua destilada por 5 min y se documentó bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

### **Condiciones de reacción para ISSR**

Para las reacciones ISSR, se usaron 5 iniciadores de un total de 10 probados (Cuadro 3). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen y con reactivos semejantes a los RAPD excepto para las condiciones de reacción: 94 °C

por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 30 s, temperatura específica de alineamiento por 45 s y 72 °C por 2 min y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. La temperatura de alineamiento estuvo en un rango de 40 a 58 °C y los ciclos se redujeron a 30. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA), por 1 h a 120 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) por 15 min y el exceso de colorante se eliminó enjuagando en agua destilada por 15 min y documentados bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

### **Análisis estadístico**

Los datos morfológicos se analizaron utilizando el coeficiente SM (Sokal y Michener, 1958) y el programa NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000). Para los datos moleculares se asignó un valor de uno (1) a la presencia de una banda y de cero (0) a la ausencia de la misma. Para el análisis de estos datos también se usó el coeficiente de concordancia simple (SM) (Sokal y Michener, 1958) y el programa NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000). Se obtuvo un dendrograma de relaciones entre las accesiones utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). Se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967) para obtener correlaciones entre matrices de similitud, usando el programa Mantel Nonparametric Test calculator para Windows Versión 2.0 (1999-2007) (Liedloff, 1999). Finalmente, el escalado multidimensional no métrico se realizó mediante el programa NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización morfológica

Los caracteres cuantitativos diferenciaron a los 15 cultivares en tres grupos (Figura 1). Los cultivares fueron discriminados dentro de un rango de 0.00 a 1.00. El primer grupo consistió de Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF, que también formaron el grupo más divergente. El segundo grupo se dividió en dos subgrupos. Papa Chica formó el primer subgrupo, y el segundo integró a Mondial, Fianna, Atlantic, Mochis, Montserrat y Criolla Edo Mex. El tercer grupo también se dividió en dos subgrupos. El primero consistió de Alfa, Tollocan y Criolla Blanca Puebla. El segundo subgrupo se formó con Armada, Gigant y Cambray Blanca Edo Mex. La más alta similitud (1.00) se observó entre Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF, Criolla Edo Mex y Mochis, Criolla Edo Mex y Montserrat. Algunos cultivares que mostraron similitudes más bajas (cercas a 0.00) fueron Cambray Blanca Edo Mex y Mochis, Montserrat, Atlantic, Fianna y Cambray Rosa Morelos. Fianna y Armada fueron los cultivares que mostraron los valores más bajos de similitud (0.00) usando caracteres cuantitativos.

Cuadro 1. Lista de cultivares, su origen y tipo utilizados en el presente estudio.

<b>Número</b>	<b>Abreviaciones</b>	<b>Detalles</b>	<b>Origen</b>	<b>Tipo</b>
1	CRM	CAMBRAY ROSA MORELOS	México	Variedad criolla
2	CE	CRIOLLA EDO MEX	México	Variedad criolla
3	AGE	ALFA	Europa	Cultivar mejorado
4	ATL	ATLANTIC	U.S.A	Cultivar mejorado
5	ARM	ARMADA	Europa	Cultivar mejorado
6	FIO	FIANNA	Europa	Cultivar mejorado
7	MOTE	MONTSERRAT	Europa	Cultivar mejorado
8	MDL	MONDIAL	Europa	Cultivar mejorado
9	GIG	GIGANT	Europa	Cultivar mejorado
10	CBLANC	CAMBRAY BLANCA EDO MEX	México	Variedad criolla
11	TOLL	TOLLOCAN	México	Cultivar mejorado
12	MOCH	MOCHIS	México	Cultivar mejorado
13	CAMB RD	CAMBAYROSA DF	México	Variedad criolla
14	CRIO BP	CRIOLLA BLANCA PUEBLA	México	Variedad criolla
15	PAPA CHIC	PAPA CHICA	México	Variedad criolla

Los caracteres cualitativos discriminaron a los 15 cultivares en tres grupos (Figura 2). Los coeficientes de similitud variaron entre 0.00 y 0.89. El primer grupo

consistió de Cambray Rosa Morelos, Cambray Rosa DF y Papa Chica. Éste fue el grupo mas divergente del resto de los cultivares. El segundo grupo lo formaron Cambray Blanca Edo Mex y Mochis. El tercer grupo se dividió en tres subgrupos. El primer subgrupo consistió de Alfa, Armada y Fianna. Atlantic y Mondial formaron el segundo subgrupo y el tercero se integró con Criolla Blanca Puebla, Gigant, Montserrat, Tollocan y Criolla Edo Mex. Alta similitud (0.89) se registró entre Armada y Fianna y Montserrat y Tollocan. Cambray Rosa Morelos y Armada fueron los más distantes (0.00).

Un análisis combinado de caracteres cualitativos como cuantitativos permitió la formación de cuatro grupos (Figura 3). Los cultivares agruparon en un rango de similitud entre 0.067 a 0.87. El primer grupo consistió de Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF, que también fue el grupo más divergente. Papa Chica formó el segundo grupo. El tercero agrupó a Alfa, Armada y Cambray Blanca Edo Mex. El cuarto grupo se subdividió en tres subgrupos. Fianna y Mochis constituyeron el primer subgrupo, mientras que Atlantic y Mondial formaron el segundo. El tercero lo integraron Criolla Edo Mex, Montserrat, Tollocan, Gigant y Criolla Blanca Puebla. Alta similitud se detectó entre Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF, Montserrat y Tollocan, Armada y Gigant, Gigant y Criolla Blanca Puebla, Tollocan y Criolla Blanca Puebla. Los menores coeficientes de similitud se obtuvieron para Cambray Rosa Morelos y Armada, Cambray Rosa Morelos y Alfa, Cambray Blanca Edo Mex y Criolla Edo Mex, Cambray Blanca Edo Mex y Cambray Rosa Morelos.

Cuadro 2. Puntaje o calificación otorgada a diferentes caracteres morfológicos evaluados en variedades de papa.

Caracter	Puntaje		7/5/3/1		
	7	5	3	1	
1 Altura de planta	Alta	Intermedia	Baja		
2 Hábito de crecimiento	Extendido	Semi-extendido	Erecto		
3 Intensidad de pigmentación del tallo	Fuerte	Moderada	Débil	Verde	
4 Silueta de la hoja	Abierta	Intermedia	Cerrada		
5 Ancho de las hojas	Ancha	Mediana	Angosta		
6 Coalescencia de las hojas	Alta	Moderada	Baja		
7 Madurez del tubérculo	Tardía	Intermedia	Temprana		
8 Hojas secundarias	Altas	Moderadas	Pocas	Ausentes	
9 Tamaño de hojas	Grandes	Medianas	Pequeñas		
10 Longitud de hojuelas-ve	Largas	Medianas	Cortas		
11 Longitud de hojuelas +ve	Largas	Medianas	Cortas		
12 Ancho de la hoja terminal	Ancha	Mediana	Angosta		
		<b>Puntaje</b>	<b>5/4/3/2/1</b>		
	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
13 Tipo de planta			Frondosa	Intermedia	Tipo copa
14 Forma del tubérculo			Oblongo	Ovalado	Redondo
15 Color de cubierta del tubérculo				Roja	Blanca

Cuadro 3. Lista de iniciadores RAPD e ISSR, secuencias 5'-3' y polimorfismo detectado.

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Polimorfismo (%)</b>
<b>RAPD</b>		
<b>A02</b>	TGC CGA GCT G	77.70
<b>A05</b>	AGG GGT CTT G	92.30
<b>D10</b>	GGT CTA CAC C	90.90
<b>D11</b>	AGC GCC ATT G	94.40
<b>D02</b>	GGA CCC AAC C	87.50
<b>ISSR</b>		
<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Polimorfismo (%)</b>
<b>P1</b>	GAG CAA CAA CAA CAA CAA	57.10
<b>P2</b>	CTG AGA GAG AGA GAG AGA G	80.00
<b>P3</b>	AGA GAG AGA GAG AGA GTG	92.80
<b>P4</b>	ATG ATG ATG ATG ATG	78.60
<b>P5</b>	AGA GAG AGA GAG AGA G	92.80

El análisis molecular de datos consenso de RAPD e ISSR discriminó a los 15 cultivares en siete grupos (Figura 4). Las similitudes anduvieron en un rango de 0.616 a 0.94. Cambray Rosa Morelos formó el primer grupo, que también fue el más alejado del resto. Mondial formó el segundo grupo. El tercer grupo consistió de Montserrat y Tollocan. Criolla Edo Mex y Papa Chica formaron el cuarto grupo. Gigant formó el quinto. El sexto grupo consistió de cultivares mexicanos (Mochis, Cambray Blanca Edo Mex, Cambray Rosa DF y Criolla Blanca Puebla) y Atlantic de Norteamérica. El séptimo grupo consistió de cultivares europeos (Alfa, Armada y Fiana). Alta similitud se observó entre Fianna y Armada (0.90), Alfa y Armada, Cambray Blanca Edo Mex y Cambray Rosa DF. Cambray Rosa Morelos y Mondial fueron los más distantes (0.62).

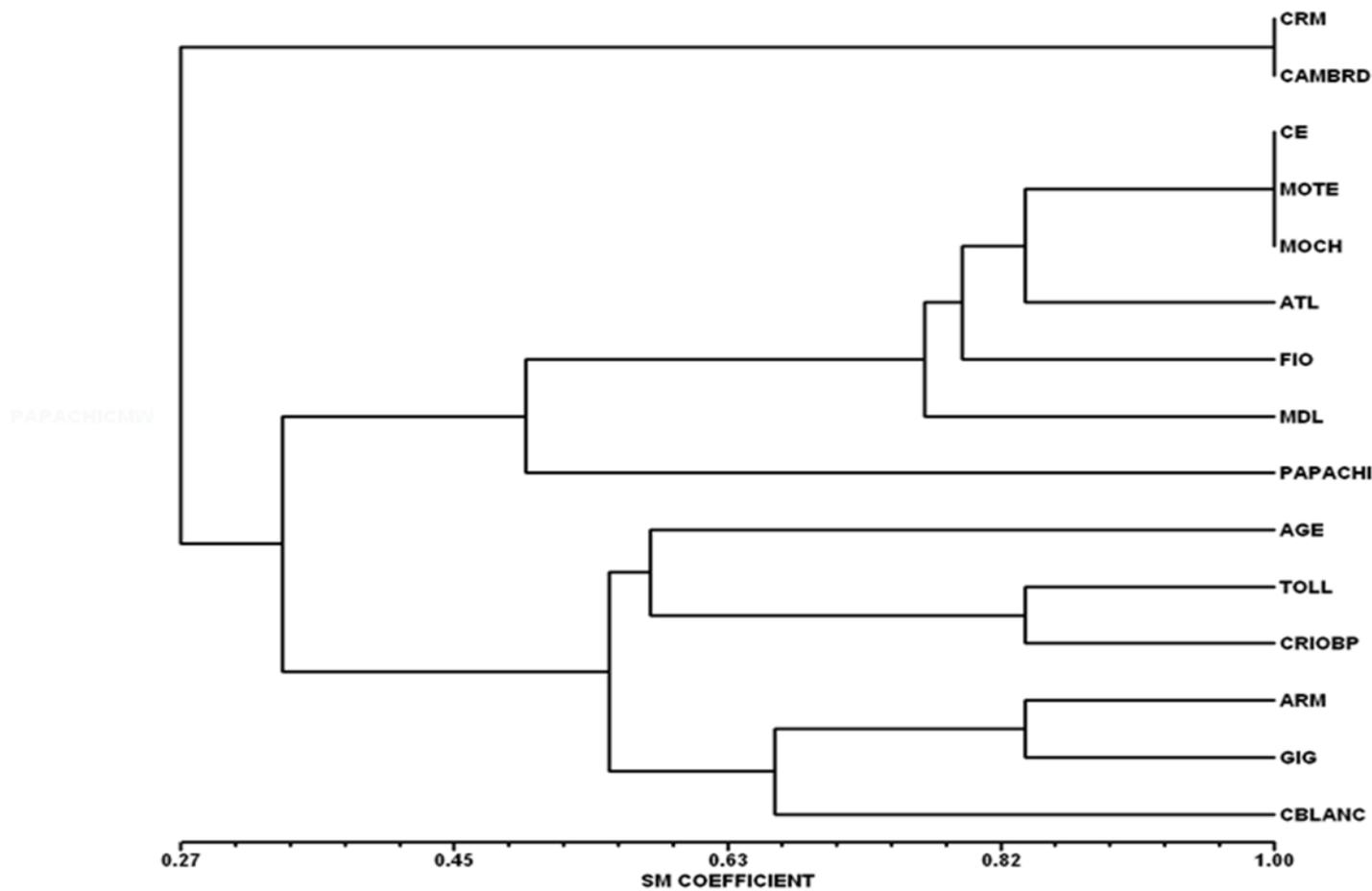


Figura 1. Dendrograma generado a partir de datos cuantitativos (cuadro 2), según el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa (cuadro 1).

Un análisis combinado usando tanto marcadores moleculares como morfológicos permitió la formación de cinco grupos (Figura 5). Los cultivares se distribuyeron en un rango de similitudes entre 0.58 a 0.91. Cambray Rosa Morelos formó el primer grupo y fue el más divergente del resto de los cultivares. Criolla Edo Mex, Papa Chica, Montserrat y Tollocan formaron el segundo clado. Mondial formó el tercer grupo y Gigant el cuarto. El quinto grupo se dividió en dos subgrupos. El primero consistió de Alfa, Armada y Fianna. El segundo integró a los cultivares mexicanos Cambray Blanca Edo Mex, Cambray Rosa DF, Criolla Blanca Puebla y Mochis. Atlantic, un cultivar norteamericano también pertenece a este subgrupo. Alta similitud se observó entre Armada y Fianna, Armada y Alfa, Cambray Rosa DF y Criolla Blanca Puebla. Los menos relacionados fueron Cambray Rosa Morelos y Mondial, Papa Chica y Mondial, Fianna y Cambray Rosa Morelos.

La caracterización morfológica de plantas es el primer paso para el mejoramiento de los cultivos o evaluación de los recursos genéticos. En el presente estudio, la prueba de Mantel mostró baja correlación entre los caracteres cualitativos y los cuantitativos (0.317) (Cuadro 4).

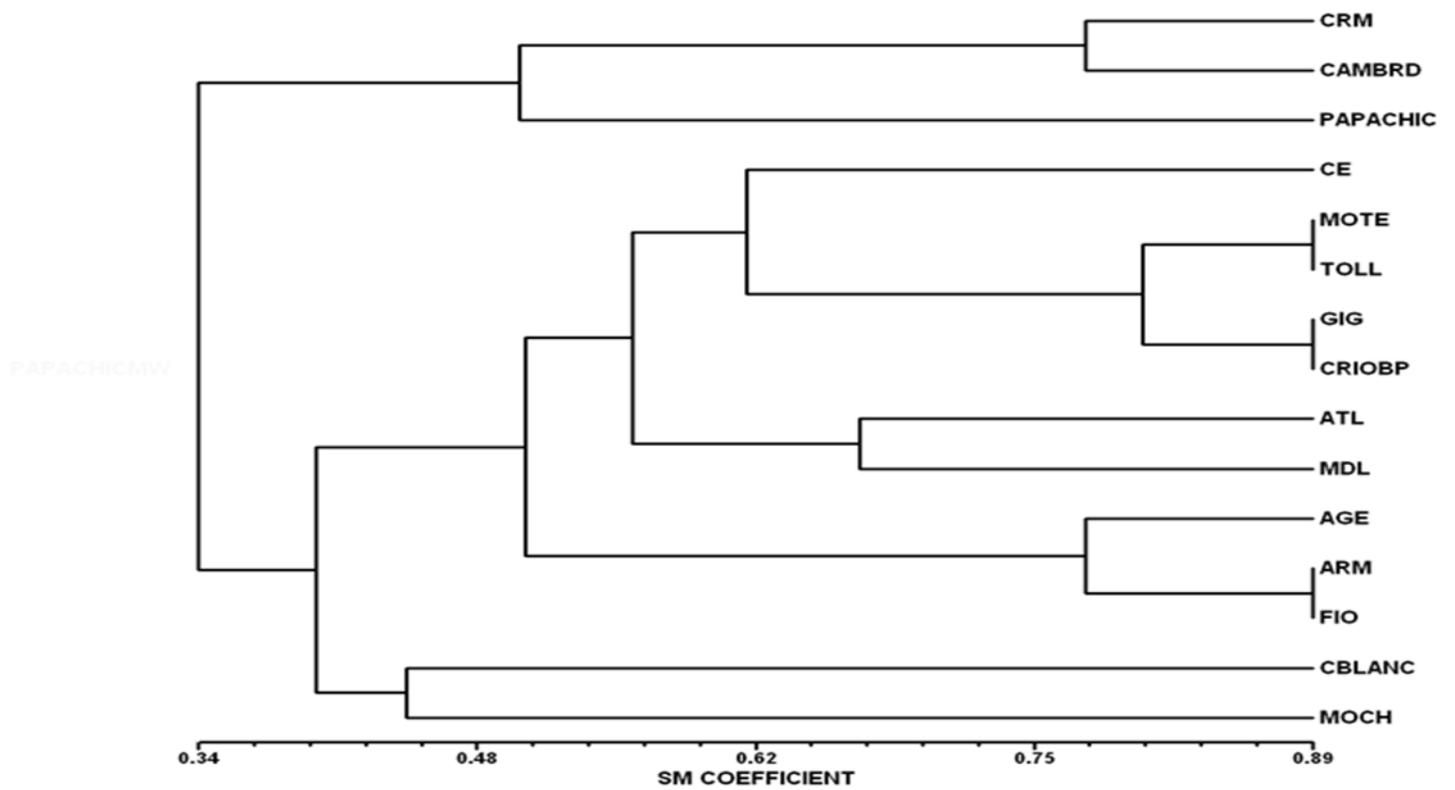


Figura 2. Dendrograma generado de datos cualitativos usando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa (cuadro 1).

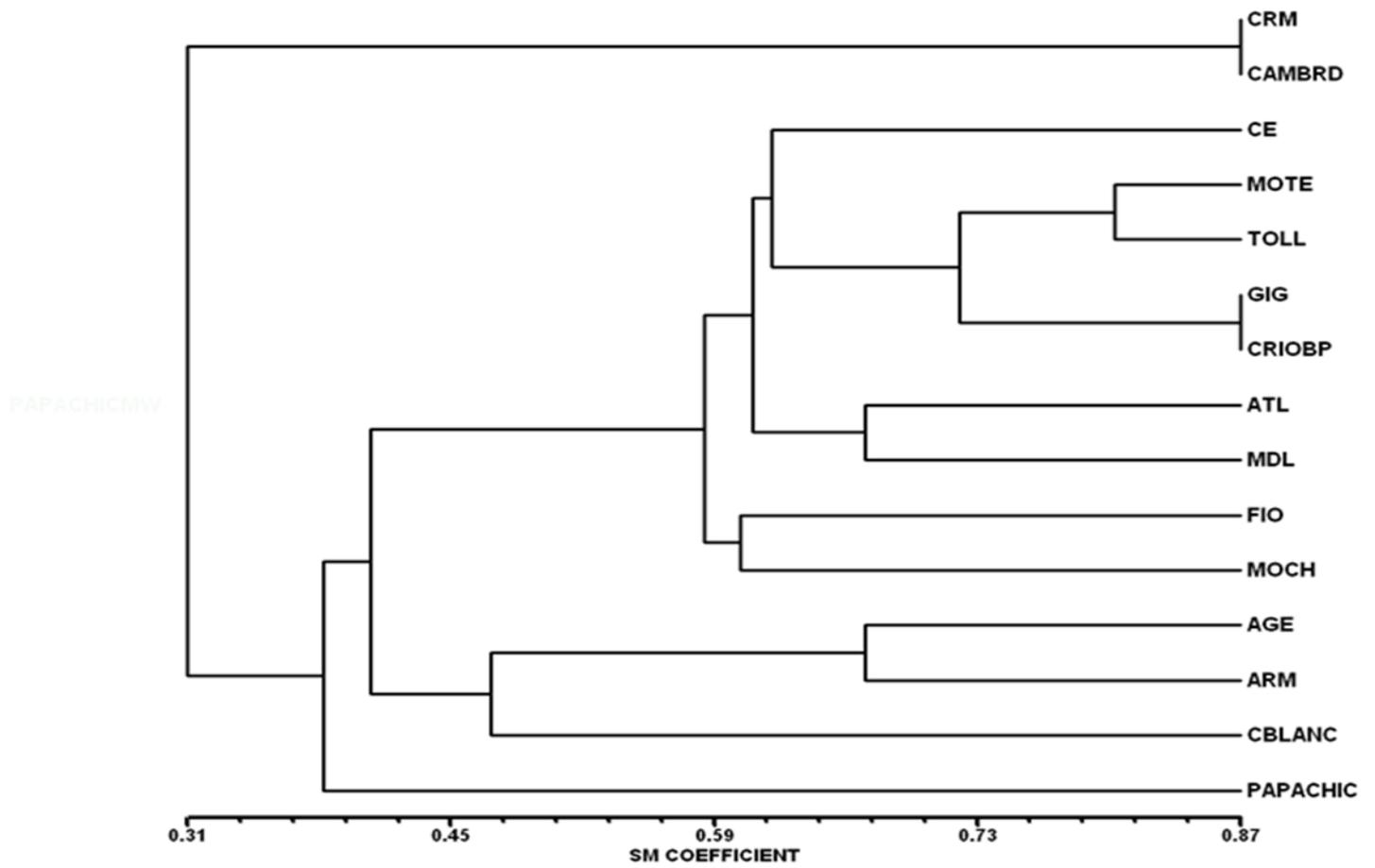


Figura 3. Dendrograma generado a partir de un análisis de datos cualitativos y cuantitativos combinados usando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa (cuadro 1).

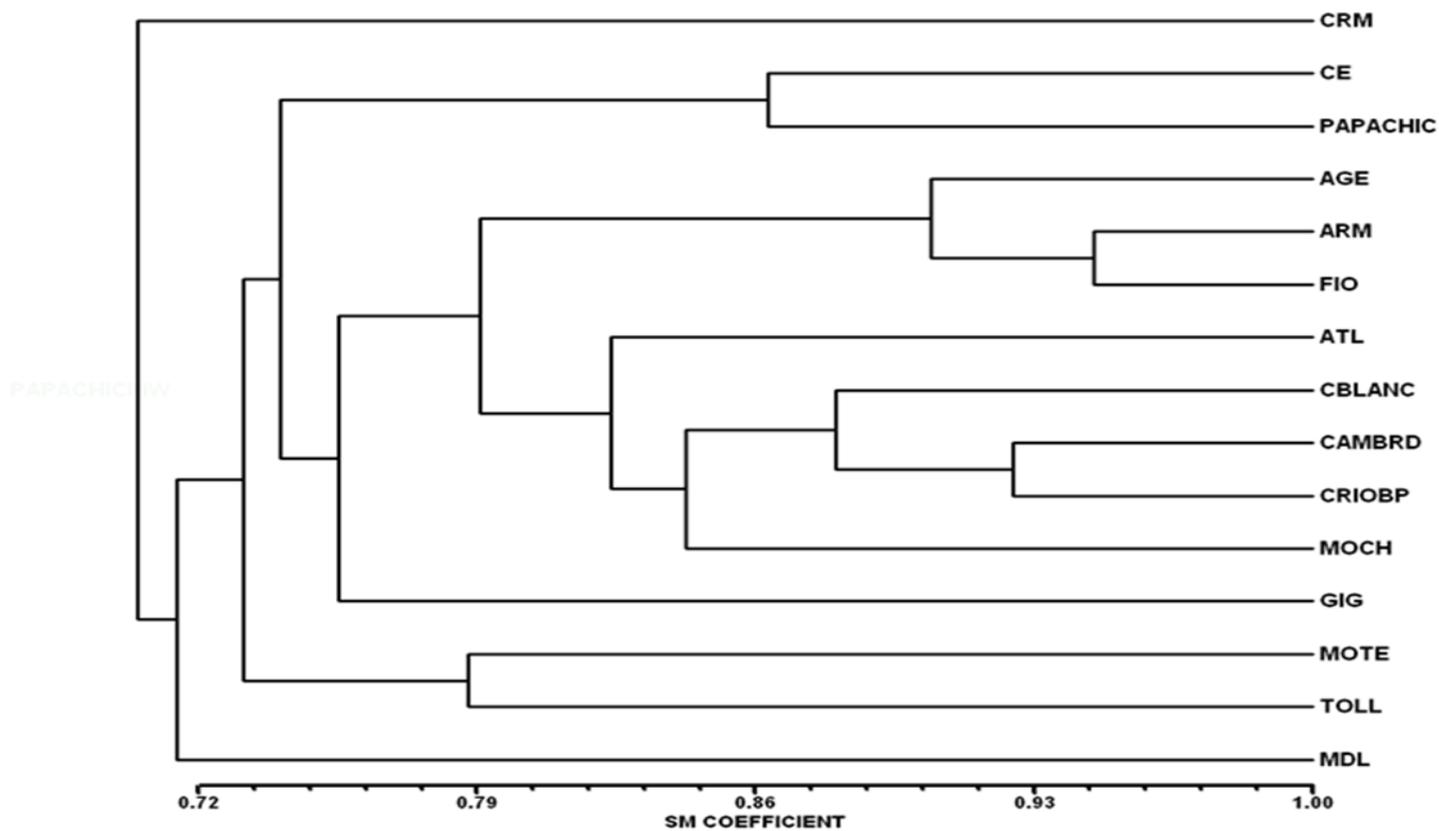


Figura 4. Dendrograma generado a partir de datos de marcadores moleculares consenso RAPD + ISSR usando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa (cuadro 1).

Cuadro 4. Matriz de correlaciones entre marcadores y valores de r a  $p < 0.05$ .

No.	Matriz de Correlaciones	r
1	Cualitativos vs Cuantitativos	0.317
2	Combinados Cuantitativos y Cualitativos vs Cualitativos	0.824
3	Combinados Cuantitativos y Cualitativos vs Cuantitativos	0.799
4	Combinados Morfológicos y Moleculares vs Cualitativos	0.326
5	Combinados Morfológicos y Moleculares vs Cuantitativos	0.0753
6	Combinados Morfológicos y Moleculares vs Combinados Cuantitativos y Cualitativos	0.252
7	Combinados Morfológicos y Moleculares vs Moleculares	0.957
8	Combinados Cuantitativos y Cualitativos vs Moleculares	-0.038

Ello quedó demostrado debido a que cultivares diferentes fueron asignados a grupos diferentes usando uno u otro tipo de marcador. Fianna, Armada y Alfa fueron asignados a grupos diferentes usando caracteres cuantitativos, mientras que los mismos cultivares fueron asignados al mismo grupo cuando se usó caracteres cualitativos (Figuras 1 y 2). Se obtuvo una correlación alta entre matrices de caracteres morfológicos combinados y los respectivos caracteres cuantitativos y cualitativos por separado (Cuadro 4). El análisis de caracteres morfológicos combinados resultó en un dendrograma que fue muy semejante a los obtenidos usando caracteres cuali o cuantitativos por separado. Atlantic y Mondial fueron colocados en el mismo subgrupo como se observó en el dendrograma generado analizando caracteres cualitativos (Figuras 2 y 3). Cambray Rosa Morelos, Cambray Rosa DF y Papa Chica agruparon juntas como se muestra en el dendrograma para caracteres cuantitativos (Figuras 1 y 3).

La caracterización molecular de plantas ha probado ser una herramienta útil para la identificación de cultivares, evaluar diversidad genética y para estudios

filogenéticos (Semagn *et al.*, 2006). Los marcadores moleculares son abundantes, rápidos, simples y no son influenciados por el ambiente (Lörz y Wenzel, 2009). La prueba de Mantel mostró baja y negativa correlación entre matrices generadas con marcadores morfológicos y moleculares (-0.3) (Cuadro 4). Esto puede deberse a que los dos análisis se conducen a niveles diferentes, genotípico y fenotípico. Los cultivares que agruparon juntos usando marcadores morfológicos fueron colocados en grupos diferentes usando marcadores moleculares, lo que sugiere que ellos son fenotípicamente similares pero genotípicamente diferentes, mostrando plasticidad. Fianna agrupó con Mochis usando marcadores morfológicos. A la inversa, Fianna agrupó con Alfa y Armada usando marcadores moleculares. Cambray Rosa Morelos agrupó junto con Cambray Rosa DF usando marcadores morfológicos. Sin embargo, los dos cultivares fueron colocados en grupos diferentes usando marcadores moleculares (Figuras 3 y 4). Cultivares que fueron genotípicamente similares pero morfológicamente diferentes incluyeron a Fianna y Armada, Criolla Edo Mex, Papa Chica y Atlantic, Cambray Rosa DF, Cambray Blanca Edo Mex, Criolla Blanca Puebla y Mochis.

Los marcadores moleculares son abundantes y amplifican una amplia región del genoma. Considerando esto, ellos pueden discriminar entre individuos altamente relacionados. La prueba de Mantel para asociación entre las matrices derivadas de datos moleculares y morfológicos indicó una pobre correlación, mostrando que los dos métodos discriminan de manera muy diferente entre los genotipos. Baja correlación entre marcadores morfológicos y moleculares se ha reportado para varios cultivos (Karuri *et al.*, 2010; Koehler-Santos *et al.*, 2003; Ferriol *et al.*, 2004; Bushehri *et al.*, 2005) y estos autores sugieren que ello puede resultar debido a la

naturaleza independiente de las variaciones morfológicas y moleculares. La baja correlación puede deberse también al hecho de que una gran porción de variación detectada por los marcadores moleculares es no-adaptativa y por tanto no está sujeta a la selección natural o artificial como sucede con los caracteres fenotípicos, que en adición a la presión de selección también son influenciados por el ambiente (Vieira *et al.*, 2007). La prueba de Mantel mostró una correlación alta y positiva entre matrices combinadas de marcadores morfológicos y moleculares vs marcadores moleculares (0.957) (Cuadro 4). Combinar datos morfológicos y moleculares agrupó a los cultivares según un patrón semejante al que resulta usar solo marcadores moleculares (Figuras 4 y 5). Probablemente los marcadores moleculares tienen mayor influencia sobre el análisis combinado debido al mayor número de *loci* incluidos en el análisis.

## **Escalado multidimensional**

### **Caracteres morfológicos**

El escalado multidimensional utilizando caracteres cuantitativos dividió a los cultivares de papa en cinco grupos (Figura 6). Cultivares que muestran hojas grandes, con gran longitud y ancho de hojas secundarias agruparon juntos (Cambray Blanca Edo Mex, Armada, Gigant, Criolla Blanca Puebla y Tollocan). Cultivares con hojas de tamaño mediano, longitud y anchos medianos de hojas secundarias formaron un segundo grupo (Fianna, Mondial, Mochis, Montserrat, Criolla Edo Mex y Papa chica). Atlantic formó su propio grupo en base a hojas de tamaño pequeño y longitud y anchos medianos de hojas secundarias. Alfa también

formó un grupo separado en base a la característica hoja terminal de tamaño pequeño. Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF agruparon juntas en relación a hojas de tamaño pequeño y longitud y ancho de hojas secundarias de tamaño pequeño.

Los caracteres cualitativos agruparon a los cultivares en tres grupos (Figura 7). Cambray Blanca Edo Mex formó un grupo separado en base a presencia moderada de hojas secundarias y hoja terminal pequeña. Los cultivares con tubérculos rojos y redondos y que no mostraron coalescencia de hojas terminales con hojas primarias agruparon juntos (Papa chica, Criolla Edo Mex, Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF). El resto de los cultivares formó otro grupo en base a hojas terminales de tamaño medio, estructura de hoja abierta y tubérculos de cubierta o piel color blanco.

La gráfica generada usando la combinación de datos de marcadores morfológicos dividió a los cultivares en cuatro grupos (Figura 8). Se formaron grupos semejantes a cuando se usó solo marcadores cualitativos a excepción de un cuarto grupo integrado por Atlantic, Mochis y Papa Chica en base a longitud y ancho medianos de hojas secundarias.

Los marcadores moleculares dividieron a los cultivares en cinco grupos (Figura 9). La gráfica obtenida usando marcadores morfológicos y moleculares combinados dividió también a los cultivares en cinco grupos integrándolos en patrones semejantes a los obtenidos con marcadores moleculares (Figura 10).

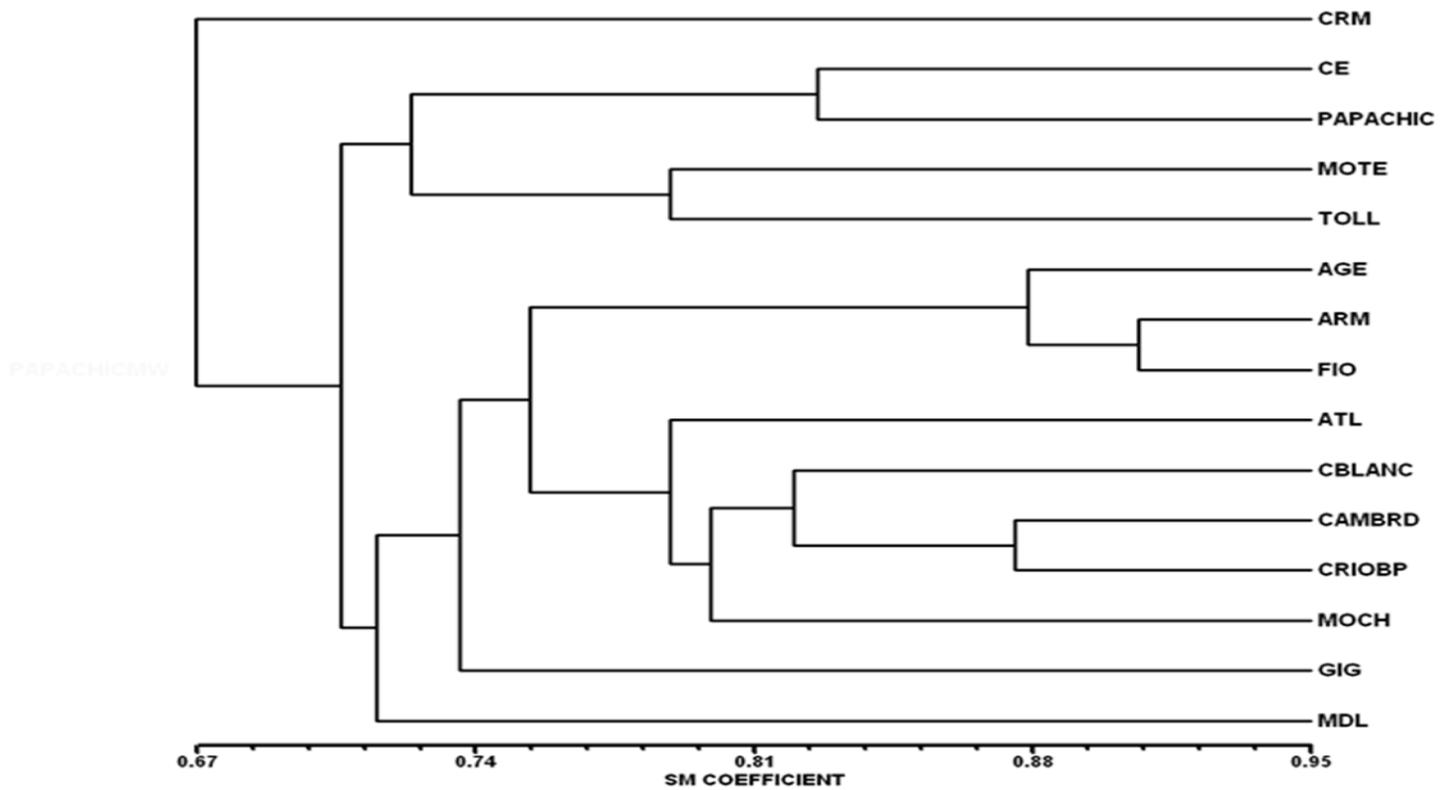


Figura 5. Dendrograma generado a partir de un análisis combinado de marcadores morfológicos y moleculares usando el coeficiente de concordancia simple (SM) para 15 cultivares de papa (cuadro 1).

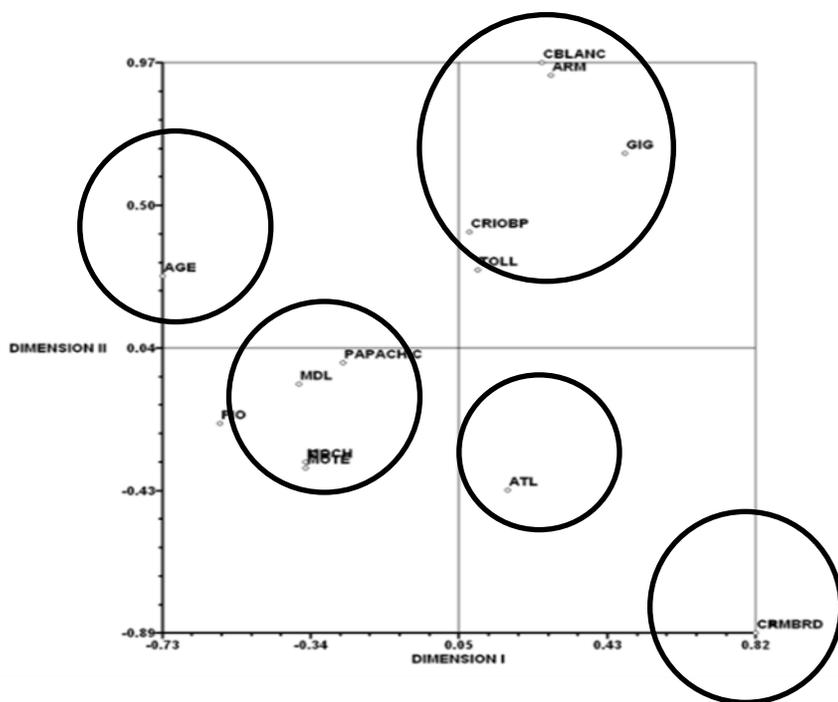


Figura 6. Gráfica en dos dimensiones generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos cuantitativos de 15 cultivares de papa.

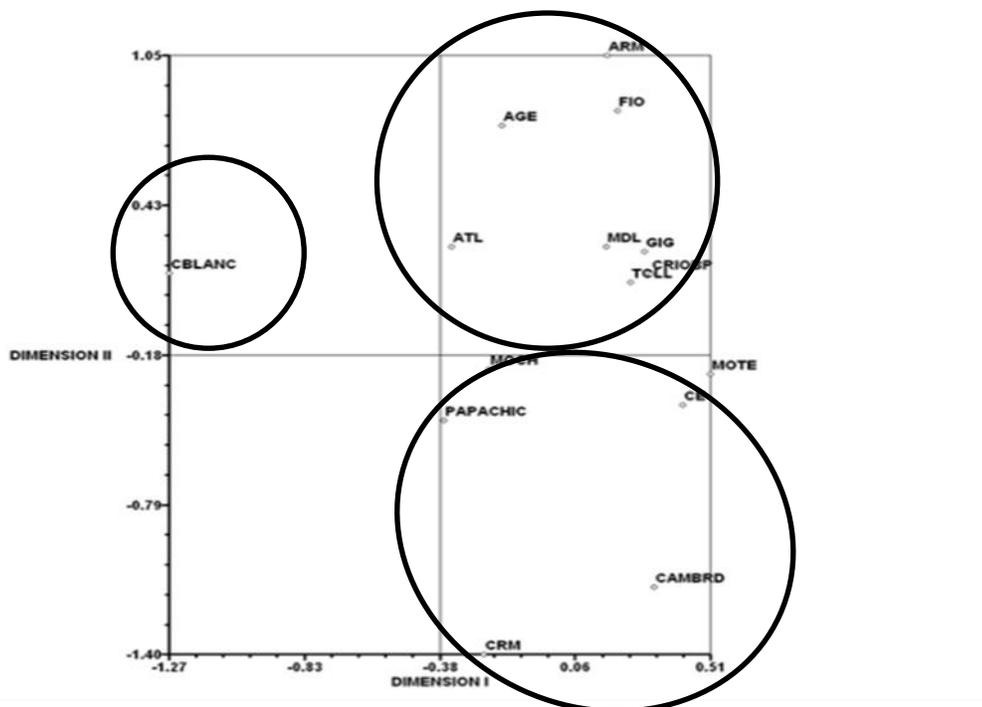


Figura 7. Gráfica en dos dimensiones generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos cualitativos de 15 cultivares de papa.

Los dendrogramas y el escalado multidimensional agruparon a los cultivares un poco diferente cuando se usaron marcadores morfológicos. Algunos cultivares mantuvieron su agrupamiento usando ambos métodos. Esto se observó también en tres grupos separados formados por Cambray Rosa Morelos, Gigant y Fianna, Armada y Alfa, usando marcadores moleculares. Resultados semejantes se observaron usando datos de marcadores morfológicos combinados y marcadores moleculares.

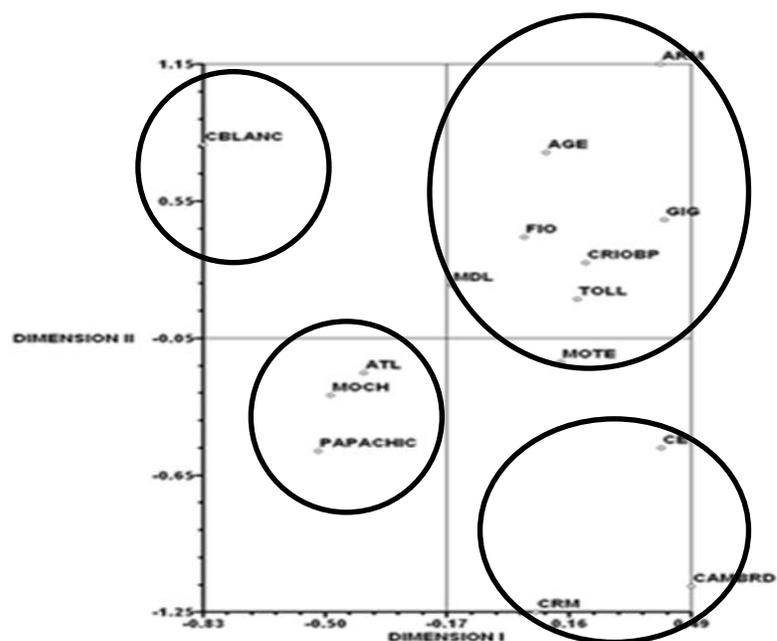


Figura 8. Gráfica en dos dimensiones generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos combinados cuantitativos y cualitativos de 15 cultivares de papa.

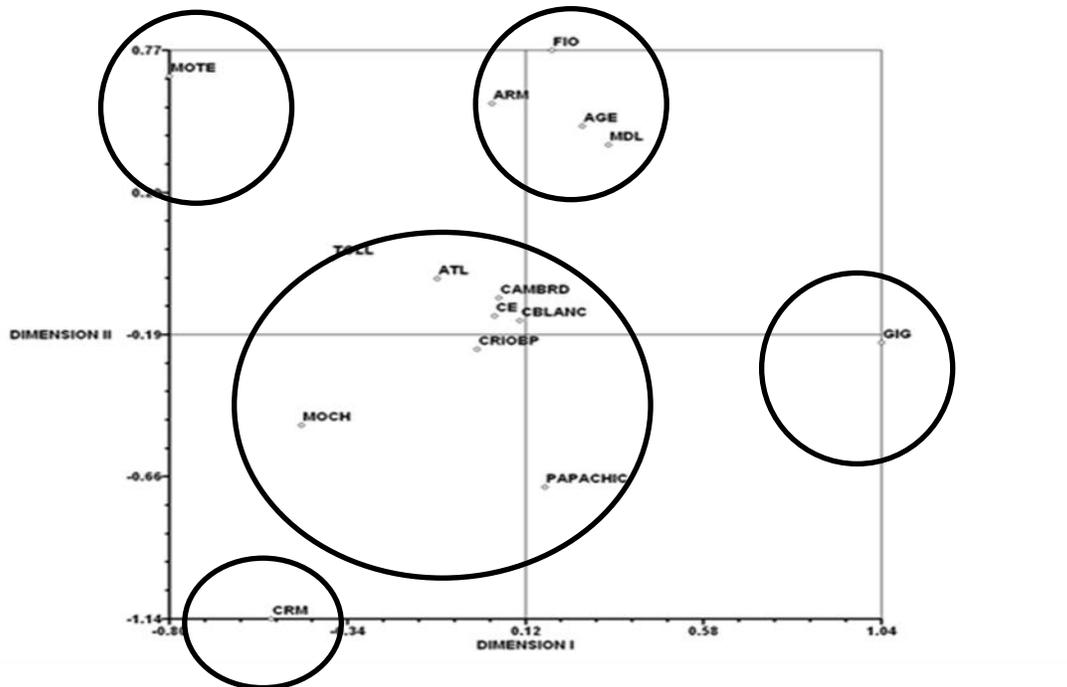


Figura 9. Gráfica en dos dimensiones generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos consenso RAPD + ISSR de 15 cultivares de papa.

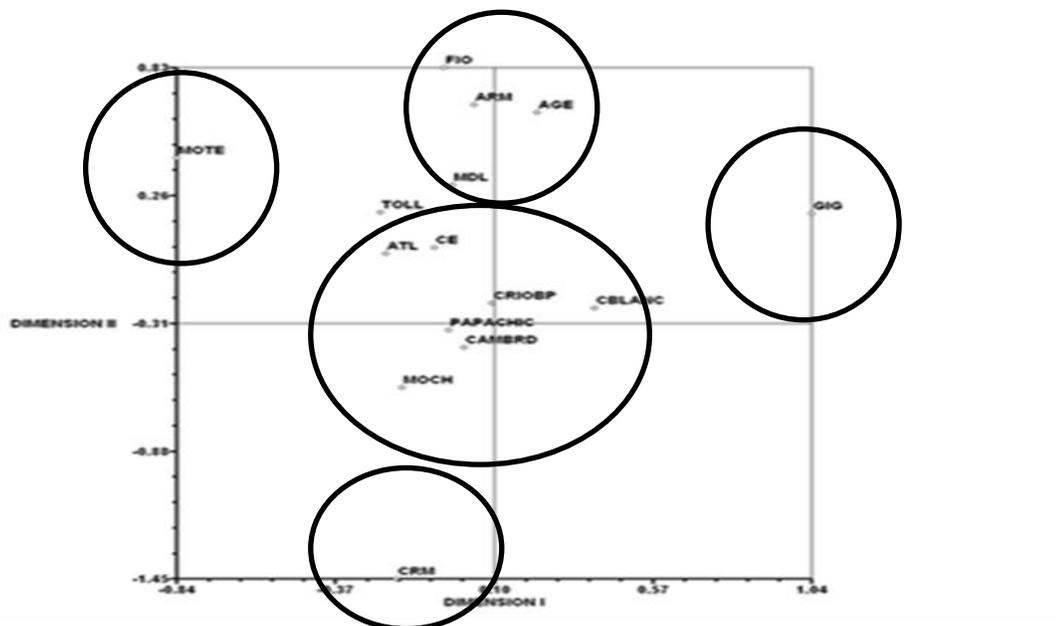


Figura 10. Gráfica en dos dimensiones generada mediante un análisis de escalado multidimensional usando datos morfológicos y moleculares de 15 cultivares de papa.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio, los marcadores morfológicos y moleculares diferenciaron entre los cultivares de papa. Los marcadores moleculares discriminaron completamente entre todos los 15 cultivares analizados. Sin embargo, los marcadores morfológicos fueron incapaces de discriminar completamente entre algunos de ellos. Ambos marcadores mostraron diversidad genética entre los cultivares. Los marcadores moleculares fueron más eficientes en comparación con los morfológicos. El análisis molecular reflejó la expresión verdadera de los genotipos, mientras que el análisis morfológico reflejó la expresión del genotipo, del ambiente y su interacción. Las características morfológicas son inconsistentes y pocas, mientras que el análisis molecular parece proveer más exactitud y fidelidad a las estimaciones y por tanto utilidad a las medidas de diversidad genética.

Sin embargo, es importante para los programas de mejoramiento seleccionar líneas en base a la diversidad genética y parámetros agro-morfológicos, que serán luego utilizadas para la obtención de nuevas variedades.

## REFERENCIAS

Ahmadizadeh, M., H. Felenji. 2011. Evaluating diversity among potato cultivars using Agro-morphological and yield components in fall cultivation of Jiroft area. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 11(5): 655-662.

Arslanoglu, F., S. Aytac, E.K. Oner. 2011. Morphological characterization of the local potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes collected from the Eastern Black Sea region of Turkey. *African J. Biotechnol.* 10(6) 922-932.

Becerra, V.V., C.M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc. (Chile)* 60(3):270-281.

Bornet, B., F. Goraguer, G. Joly, M. Branchard. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45( 3): 481-484.

Bushehri, A., S. Torabi, M. Omid, M. Ghannadha, 2005. Comparison of genetic and morphological distance with heterosis with RAPD markers in hybrids of barley. *Int. J. Agric. Biol.* 7: 592–595

Chimote, V.P., D. Pattanayak, P.C. Naik. 2007. Molecular and morphological divergence studies in Indian potato varieties. *Indian J. Biotechnol.* 6:216-223.

Dellaporta S.L., J. Wood, J.B. Hicks. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1 (4):19-21.

FAOSTAT. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. 13 Feb. 2007. <<http://faostat.fao.org/site/336/default.aspx>>.

Ferriol, M., B. Pico, D. Fernandez, F. Nuez. 2004. Molecular diversity of germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers. *Crop Sci.* 44: 653–664.

Karuri, H.W., E.M. Ateka, R. Amata, A.B. Nyende, A.W.T. Muigai, E. Mwasame, S.T. Gichuki. 2010. Evaluating diversity among Kenyan sweet potato genotypes using morphological and SSR markers. *Int. J. Agric. Biol.* 12: 33–38

Koehler-Santos, P., A.L. Dornelles and L.B. de Freitas. 2003. Characterization of mandarin citrus germplasm from southern Brazil by morphological and molecular analysis. *Pesq. Agropec. Bras.* 38:797–806

Liedloff AC. 1999. Mantel Nonparametric test Calculator. Version 2.0. School of National Resource Sciences, Queensland University of Technology, Australia.

Lörz, H., G. Wenzel (eds). 2009. Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 55. Springer-Verlag, Berlin.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209–220.

McGregor, C.E., C.A. Lambert, M.N. Greyling, J.H. Louw, L. Warnich. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113:135–144.

Milbourne, D., R. Meyer, J.E. Bradshaw, E. Baird, N. Bonar, J. Provan, W. Powell, R. Waugh. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3:127–136.

Orona–Castro, F., V. Pecina–Quintero, A. Rocha–Peña, M.A. Cadena–Hinojosa, O.O. Martínez de la Vega, I.H. Almeyda–León. 2006. Caracterización molecular de genotipos comerciales y elite de papa. *Agric. Téc. Méx.* 2(32):171-180.

Prevost, A., M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.

Rocha, E.A., L.V. Paiva, H.H. de Carvalho, C.T. Guimaraes. 2010. Molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers. *Crop Breed. App. Biotechnol.* 10: 204-210.

Rohlf, F.J. 2000. Programme NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1. Exeter Software, NewYork.

Ross, H. 1986. Potato Breeding - Problems and Perspectives. J. Plant Breed. Supplement 13: 1-132.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Cultivo de papa. México, D. F.

Semagn, K., Å. Bjørnstad, and M.N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. Afr. J. Biotechnol. 5(25):2540-2568.

Smith, J.S.C., O.S. Smith, 1989. The description and assessment of distances between inbred lines of maize: The utility of morphological, biochemical and genetic descriptors and a scheme for the testing of distinctiveness between Inbred Lines. Maydica 34: 151-161.

Sokal, R.R. and C.D. Michener, 1958. "A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships". University of Kansas Scientific Bulletin 38: 1409–1438

Solis, J. S., D.M. Ulloa, L.A. Rodriguez. 2007. Molecular description and similarity relationships among native germplasm potatoes (*Solanum tuberosum* spp) using morphological data and AFLP markers. Electronic Journal of Biotechnology. ISSN: 0717-3458. 10(3):11-20.

UPOV 2004: Potato Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability for potato (*Solanum tuberosum* L.). International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Document TG/88/6: 1-24.

Vieira, E., F. Carvalho, I. Bertan, M. Kopp, P. Zimmer, G. Benin, J. da Silva, I. Hartwig, G. Malone, A. de Oliveira. 2007. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. Gen. Mol. Bio. 30:392–399.

Yasmin, S., M.S. Islam, M. Kondoker, M. Nasiruddin, S. Alam. 2006. Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. Biotechnol. 5(1):27-31.

#### **IV. DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE VARIEDADES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CULTIVADAS EN MÉXICO USANDO MARCADORES RAPD E ISSR**

##### **RESUMEN**

Un análisis de datos consenso de RAPD e ISSR se utilizó para estudiar la diversidad genética y estructura poblacional en quince cultivares de papa (9 cultivares mejorados de Europa, N. América y México, y 6 cultivares criollos mexicanos) sembrados en México. Las amplificaciones usando cinco iniciadores decámeros al azar y cinco iniciadores ISSR generaron 138 bandas de las que 116 (84.4 %) fueron polimórficas. El coeficiente de similitud mas alto (0.89) se detectó entre los cultivares Fianna y Armada. En contraste, el coeficiente de similitud más bajo (0.55) se obtuvo entre Tollocan y Cambray Rosa Morelos. Bajo polimorfismo en un rango de 10.14 a 31.16 y baja diversidad genética oscilando entre 0.04 y 0.11 se encontraron dentro de las poblaciones de papa. El alto nivel de diferenciación genética entre cultivares ( $G_{ST} = 0.71$ ) y bajos valores de flujo genético ( $N_m = 0.19$ ) a través de todos los *loci* indicaron que el nivel de divergencia genética entre los 15 cultivares es alta. El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) reveló una contribución significativa de las diferencias entre regiones, entre cultivares, entre y dentro de las poblaciones a la diversidad genética total de los cultivares de papa estudiados. Datos consenso usando marcadores RAPD e ISSR fueron muy útiles para el estudio de la diversidad genética y estructura de poblaciones en cultivares de papa.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum* L., RAPD, ISSR, diversidad genética, estructura de poblaciones.

## SUMMARY

RAPD and ISSR consensus data analysis was used to study the genetic diversity and population structure in fifteen potato cultivars (9 improved cultivars from Europe, N. America and Mexico, and 6 Mexican landraces) grown in Mexico. Amplification with five decamer random primers and five ISSR primers generated 138 markers of which 116 (84.4 %) were polymorphic. The highest coefficient of similarity was demonstrated between Fianna and Armada cultivars which had a value of 0.89. In contrast, the lowest coefficient of similarity was obtained between Tollocan and Cambray Rosa Morelos cultivars with a value of 0.55. Low polymorphism ranging from 10.14 to 31.16 and low genetic diversity ranging between 0.04 and 0.11 were demonstrated within the potato cultivar populations. The high level of cultivar differentiation ( $G_{ST} = 0.71$ ) and low level of gene flow ( $N_m = 0.19$ ) across all *loci* reflected that the level of genetic divergence among the fifteen cultivars was high. AMOVA revealed significant contribution of differences among regions, among type of cultivar, among populations and within populations to the total genetic diversity of potato cultivars studied. Consensus data using RAPD and ISSR markers was found to be useful in studying genetic diversity and population structure in potato cultivars.

**INDEX WORDS.** *Solanum tuberosum* L., RAPD, ISSR, genetic diversity, population structure.

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos mas importantes a nivel mundial (Gopal y Khurana, 2006). Ocupa el cuarto lugar en producción para consumo humano, superado solamente por el trigo, arroz y maíz (Ross, 1986). Clasificaciones recientes reconocen alrededor de 100 especies silvestres y cuatro cultivadas (incluyendo a *Solanum tuberosum*) (Ovchinnikova *et al.*, 2011). En México, la papa se cultiva anualmente en una superficie de 64,000 ha, con una producción de 1.7 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 27 ton/ha (FAOSTAT, 2007). La papa se cultiva principalmente en los estados de Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (SAGARPA, 2010).

Si bien México no es centro de origen de las papas, existe gran diversidad de germoplasma. Las variedades de papa cultivadas en México se diferencian en tres grupos: genotipos provenientes de Europa, de USA, y aquellos mejorados por organismos nacionales como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Ferroni, 1981). El primer grupo representa el 50 % de las variedades cultivadas (Alpha), el segundo el 38 % y el último alrededor del 8%. Los centros principales de diversidad y producción de papas nativas en

México son las zonas aledañas al Nevado de Toluca y al Pico de Orizaba (Ugent, 1968).

Los cultivares europeos han sido fuertemente seleccionados para características deseables de modo que son menos diversos comparados con el 'pool' genético de Norteamérica y probablemente con el de México, especialmente las variedades criollas. En México existen fuertes diferencias entre los tipos de papas que cultivan diferentes agricultores. En el norte del país existen grandes unidades de producción donde predominan estándares tecnológicos avanzados, mientras que en el centro y sur predominan pequeñas unidades con pocos recursos.

Solo el 23 % de la tierra dedicada al cultivo de la papa se cultiva con semilla certificada, que se compra por productores a gran escala. Los pequeños productores casi no utilizan semilla certificada o material limpio. La mayoría de los productores pequeños utilizan semilla de la cosecha anterior o compran tubérculos destinados al mercado en fresco por los productores grandes. Los productores pequeños o intermedios siembran cultivares nativos coloridos que no tienen un sistema de distribución formal (Qaim, 1998). Las papas cultivadas se propagan como clones para mantener su pureza, sin embargo, la diversidad genética se mantiene a través de cruces amplias y desarrollando nuevos cultivares.

Si bien existe gran diversidad de papas en México, este rico recurso genético no se utiliza como debiera debido a la escasa información genética existente (Becerra y Paredes, 2000) y al aislamiento sexual resultante de incompatibilidad entre especies 1EBN en México y especies 2EBN y 4 EBN de Suramérica

(Jansky y Hamernik, 2009). El conocimiento de la diversidad genética del germoplasma y los patrones de estructura poblacional entre materiales a mejorar y cultivares es importante para el desarrollo de estrategias de conservación adecuadas, para el mejoramiento genético y para la utilización de las plantas cultivadas. Información previa acerca de la diversidad genética ha sido obtenida usando marcadores morfológicos (Hijmans y Spooner, 2000) e isoenzimas (Douches y Ludlam, 1991). Estas técnicas aunque han sido útiles, presentan algunas limitantes como el ser altamente influenciadas por las condiciones ambientales y el bajo número de marcadores que presentan (Semagn, 2006). El desarrollo de marcadores más simples, más económicos y más fáciles de obtener, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han mejorado en gran medida la información genética disponible (Powell *et al.*, 1995). Tales marcadores incluyen a los RAPD e ISSR que se han utilizado extensivamente para caracterizar genotipos de papa (Bornet *et al.*, 2002; McGregor *et al.*, 2000; Milbourne *et al.*, 1997; Orona-Castro *et al.*, 2006; Prevost *et al.*, 1999; Yasmin *et al.*, 2006).

Los RAPD (polimorfismos en el ADN amplificados al azar) e ISSR (intersecuencias simples repetidas) han llegado a ser muy populares en estudios de poblaciones de plantas (Bartish *et al.*, 1999; Bussell, 1999; Nybom y Bartish, 2000). En el presente estudio se caracterizó la diversidad genética dentro y entre cultivares de papa usando datos consenso de marcadores RAPD e ISSR para maximizar la generación de datos genéticos más confiables.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Quince cultivares de papa se obtuvieron en varios estados de la República Mexicana de fuentes de semilla certificada, del Banco de Germoplasma del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo y productores locales (Cuadro 1). Se obtuvieron secciones de cinco tubérculos seleccionados al azar por cultivar para tener un total de 75 individuos para su análisis. Las muestras incluyeron nueve cultivares mejorados y seis variedades criollas.

### Purificación del ADN

La purificación del ADN se hizo de acuerdo al protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Secciones de tubérculos pesando 0.3 g se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. La muestra se colocó en un microtubo (Eppendorf) de 1.5 mL que contenía 600  $\mu$ L de amortiguador de extracción (20 mL Tris-HCL 1 M, pH 8.0; 20 mL EDTA 0.5 M, pH 8.0; 20 mL NaCl 5 M; 35  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol; 40 mL dodecil sulfato de sodio 20 % ) y se incubó a 65 °C por 10 min, con inversión ocasional de los tubos.

Después, se adicionó 200  $\mu$ L de acetato de potasio 5M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó a 8000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 700  $\mu$ L de isopropanol frío (-20 °C). Se mezcló por inversión e incubó a -20 °C por

30 min y centrifugó por 5 min a 8000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó, se recobró el precipitado y se disolvió en 200  $\mu$ L de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  10 mM, pH 8.0). Para eliminar el ARN se añadió 2  $\mu$ L de ARNasa A y se incubó a 37 °C por 1 h. Después se adicionó 20  $\mu$ L de acetato de sodio 3M mas 200  $\mu$ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20 °C por 2 h. Se centrifugó a 8000 x  $g_n$  por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 300  $\mu$ L de etanol al 70 %. La pastilla se secó y se disolvió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  1 mM, pH 8.0) a 4 °C. La concentración del ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro Genesys 10 uv Scanning® (Thermo Scientific) y se verificó la calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % (w/v). El ADN se utilizó en posteriores reacciones de PCR.

Cuadro 1. Lista de cultivares, su origen y tipo, utilizados en el presente estudio.

Número	Abreviación	Detalles	Origen	Tipo
1	CRM	CAMBRAY ROSA MORELOS	México	Variedad Criolla
2	CE	CRIOLLA EDO MEX	México	Variedad Criolla
3	AGE	ALFA GRANDE	Europa	Cultivar mejorado
4	ATL	ATLANTIC	U.S.A	Cultivar mejorado
5	ARM	ARMADA	Europa	Cultivar mejorado
6	FIO	FIANNA	Europa	Cultivar mejorado
7	MOTE	MONTSERRAT	Europa	Cultivar mejorado
8	MDL	MONDIAL	Europa	Cultivar mejorado
9	GIG	GIGANT	Europa	Cultivar mejorado
10	CBLANC	CAMBRAY BLANCA EDO MEX	México	Variedad Criolla
11	TOLL	TOLLOCAN	México	Cultivar mejorado
12	MOCH	MOCHIS	México	Cultivar mejorado
13	CAMB RD	CAMBRAY ROSA DF	México	Variedad Criolla
14	CRIO BP	CRIOLLA BLANCA PUEBLA	México	Variedad Criolla
15	PAPA CHIC	PAPA CHICA	México	Variedad Criolla

### Condiciones de reacción para RAPD

Cinco iniciadores RAPD de las series A y D Operon® (Operon Technologies Inc, Alameda, CA, USA) se seleccionaron de un total de 25 (Cuadro 2). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne® TC-512. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 25 µL, que incluyó 4.2 µL agua doble destilada estéril, 10 µL de dNTPs (500 µM), 2.5 µL de amortiguador 10X (Tris-HCl

750 mM, pH 8.8; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 mM; Tween 20 a 1 % (v/v)); 1.0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 3.0 µL de iniciador a una concentración de 10 pM; 0.3 µL de enzima Taq ADN polimerasa a una concentración de 5U µL<sup>-1</sup>; y 4.0 µL de ADN genómico a una concentración de 10 ng µL<sup>-1</sup> .

Cuadro 2. Lista de iniciadores RAPD e ISSR, secuencias 5´-3´ y polimorfismo detectado.

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia (5´-3´)</b>	<b>Polimorfismo (%)</b>
<b>RAPD</b>		
<b>A02</b>	TGC CGA GCT G	77.70
<b>A05</b>	AGG GGT CTT G	92.30
<b>D10</b>	GGT CTA CAC C	90.90
<b>D11</b>	AGC GCC ATT G	94.40
<b>D02</b>	GGA CCC AAC C	87.50
<b>ISSR</b>		
	<b>Secuencia (5´-3´)</b>	<b>Polimorfismo (%)</b>
<b>P1</b>	GAG CAA CAA CAA CAA CAA	57.10
<b>P2</b>	CTG AGA GAG AGA GAG AGA G	80.00
<b>P3</b>	AGA GAG AGA GAG AGA GTG	92.80
<b>P4</b>	ATG ATG ATG ATG ATG	78.60
<b>P5</b>	AGA GAG AGA GAG AGA G	92.80

Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a 94 °C, 2 min; 38 ciclos [94 °C por 30 s, 40 °C, por 30 s, 72 °C por 90 s]; con una extensión de 72 °C por 2 min. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA), por 1 h a 120 V. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) por 15 min; el exceso de colorante se eliminó lavando el gel con agua destilada por 5 min y se documentó bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

### **Condiciones de reacción para ISSR**

Para las reacciones ISSR, se usaron 5 iniciadores de un total de 10 probados (Cuadro 2). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen y con reactivos semejantes a los RAPD excepto para las condiciones de reacción: 94 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, temperatura específica de alineamiento por 45 s y 72 °C por 2 min y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. La temperatura de alineamiento estuvo en un rango de 40 a 58 °C y los ciclos se redujeron a 30. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA), por 1 h a 120 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) por 15 min y el exceso de colorante se eliminó enjuagando en agua destilada por 15 min y documentados bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

## **Análisis de los datos**

Todos los geles fueron evaluados para visualizar y registrar el número de bandas mono y polimórficas. La evaluación se llevó a cabo en forma cuidadosa e independiente por dos miembros del laboratorio. Bandas difusas o dudosas no fueron consideradas para el análisis. Se asumió que bandas del mismo peso molecular en diferentes individuos son idénticas. La presencia de una banda se indicó con un uno (1) y la ausencia con un cero (0).

El análisis de los datos se realizó utilizando los paquetes estadísticos NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000) y POPGEN32 (Yeh *et al.*, 1997). Para estimar parámetros de polimorfismo a nivel de poblaciones la matriz de datos de presencia/ausencia se analizó con el programa POPGEN32. Los parámetros genéticos evaluados al nivel de poblaciones fueron el porcentaje de *loci* polimórficos (P), el número de alelos por locus ( $N_a$ ), el número efectivo de alelos por locus ( $N_e$ ), el índice de Shannon (I) y el índice de diversidad genética de Nei (1973) (H). Además, se calculó el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{ST}$ ), el número de individuos migrantes ( $N_m$ ) y el índice de identidad genética de Nei (1972).

Para describir la estructura genética y la variabilidad entre las poblaciones se realizó un Análisis de Varianza Molecular No-paramétrica (AMOVA, por sus siglas en inglés) utilizando el programa GenAlEx 6.2 (Peakall y Smouse, 2006) con 999 permutaciones, donde los componentes de varianza se dividieron entre individuos, dentro de poblaciones, entre poblaciones dentro de regiones y entre regiones o grupos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Patrones de iniciadores

Diez iniciadores (5 RAPD y 5 ISSR) se utilizaron para amplificar el ADN de 5 individuos de cada una de las 15 variedades de papa cultivadas en México (Cuadros 1 y 2). Se estudiaron 138 *loci*. El número promedio de bandas revelado por un iniciador dado fue de 13.8, oscilando entre 9 y 18 (Cuadro 3). El análisis de las variedades basado en RAPD e ISSR permitió estimar la similitud genética y las diferencias existentes dentro y entre los genotipos estudiados.

### Análisis de agrupamientos

El análisis de grupos usando el coeficiente de similitud de Jaccard separó a los cultivares en seis grupos diferentes (Figura 1). El primer grupo lo formaron Tollocan y Montserrat y fue el más divergente del resto de los cultivares. Gigant formó el segundo grupo, Mondial el tercero, Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF constituyeron el cuarto grupo, mientras que Criolla Edo Mex y Papa Chica formaron el quinto. El sexto grupo lo integró el resto de los cultivares. Este grupo se dividió en dos subgrupos. El primero consistió de cultivares europeos (Alfa Grande, Armada y Fianna). El segundo subgrupo se formó con el cultivar mexicano mejorado Mochis, variedades criollas con tubérculos de piel blanca (Cambray Blanca Edo Mex y Criolla Blanca Puebla) y Atlantic de Norteamérica.

Cuadro 3. Lista de iniciadores, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por cultivar y total.

<b>Iniciador</b>	<b>A02</b>	<b>A05</b>	<b>D10</b>	<b>D11</b>	<b>D02</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>Promedio</b>
<b>Prod amp</b>	9	13	11	18	16	14	15	14	14	14	13.80
<b>CRM*</b>	55.50	30.70	18.20	22.20	12.50	0.00	13.30	35.70	35.70	21.40	24.50
<b>CE</b>	11.10	30.70	9.10	44.40	6.30	0.00	6.60	21.40	14.30	21.40	16.50
<b>AGE</b>	33.30	38.40	45.50	27.70	37.50	0.00	0.00	35.70	7.10	14.30	24.00
<b>ATL</b>	44.40	15.40	54.50	22.20	43.70	21.40	20.00	50.00	7.10	42.80	32.20
<b>ARM</b>	33.30	15.40	18.20	0.00	50.00	7.10	20.00	21.40	14.30	14.30	19.40
<b>FIO</b>	11.10	15.40	36.40	0.00	25.00	0.00	6.60	14.30	21.40	7.10	13.70
<b>MOTE</b>	33.30	46.20	54.50	16.70	31.30	7.10	0.00	35.70	35.70	14.30	27.48
<b>MDL</b>	33.30	15.40	27.30	5.50	6.30	7.10	13.30	14.30	14.30	0.00	13.70
<b>GIG</b>	33.30	23.10	27.30	16.70	18.70	7.10	13.30	14.30	14.30	21.40	19.00
<b>CBLANC</b>	0.00	23.10	18.20	5.50	6.30	14.30	6.60	7.10	21.40	0.00	10.25
<b>TOLL</b>	22.20	46.20	36.40	11.10	6.30	0.00	13.30	21.40	35.70	14.30	20.69
<b>MOCH</b>	22.20	46.20	63.60	33.30	12.50	7.10	0.00	35.70	50.00	28.60	29.92
<b>CAMB RD</b>	22.20	23.10	18.20	0.00	12.50	7.10	6.60	35.70	57.10	7.10	18.96
<b>CRIO BP</b>	0.00	46.20	18.20	5.50	0.00	7.10	13.30	28.60	28.60	0.00	14.75
<b>PAPA CHIC</b>	11.10	46.20	18.20	5.50	0.00	7.10	13.30	28.60	28.60	0.00	14.75
<b>Total</b>	77.70	92.30	90.90	94.40	87.50	57.10	80.00	92.80	78.60	92.80	84.41

\*Detalles de las variedades en el Cuadro 1.

El uso de datos consenso de RAPD e ISSR diferenció con éxito a los cultivares de papa sembrados en México. Sin embargo, el análisis no agrupó completamente a los materiales en base a su origen geográfico. Algunos caracteres como el color de piel de los tubérculos fueron claramente agrupados en grupos separados. Esto se demuestra al observar que las variedades criollas con piel de tubérculo color rojo como Cambray Rosa Morelos, Cambray Rosa DF, Criolla Edo Mex y Papa Chica pertenecen a un grupo separado de los cultivares y variedades criollas que tienen tubérculos con color de piel blanca. El coeficiente de similitud de Jaccard osciló entre 0.55 y 0.89. Orona *et al.* (2006), demostraron la existencia de diversidad genética entre cultivares de papa sembrados en México utilizando marcadores RAPD y SSR. Estos investigadores obtuvieron coeficientes de similitud en un rango de 0.52 a 0.87 y 0.60 a 0.90 para RAPD y SSR, respectivamente. De igual manera, Rocha *et al.* (2010), reportaron diversidad genética presente entre cultivares de papa norteamericanos y europeos crecidos en Brasil con coeficientes de similitud en un intervalo de 0.50 a 0.73 y de 0.46 a 0.72, usando marcadores RAPD y SSR, respectivamente.

Si bien algunos cultivares europeos agruparon a los genotipos (Fianna, Armada y Alfa Grande), indicando alta similitud entre los mismos, no se puede ignorar la existencia de algún grado de diversidad genética en el 'pool' europeo debido a que el resto de los cultivares formó parte de otros grupos diferentes (Gigant, Montserrat y Mondial) (Figura 1). Entre las variedades criollas de México existe diversidad genética, esto quedó demostrado en virtud de que los cultivares con tubérculos con cubiertas blancas formaron grupos separados en relación a los

cultivares con tubérculos con color de piel roja (Figura 1). Ispizua *et al.* (2007), reportaron alta (0.55) diversidad genética entre variedades criollas del noroeste de Argentina usando marcadores SSR. Tollocan, un cultivar mejorado mexicano y Montserrat de Europa fueron los más divergentes del resto de cultivares sembrados en México, con un valor de remuestreo igual a 100 (Figura 1). Estos dos cultivares podrían ser utilizados individualmente como progenitores adecuados en programas de mejoramiento para mejorar la diversidad genética. El coeficiente de similitud más alto se obtuvo entre Fianna y Armada con un valor de 0.89 (Cuadro 5). Bornet *et al.* (2002) y Rousselle *et al.* (1996) reportaron alta similitud entre cultivares europeos debido a que han sido mejorados fuertemente y tienden a mostrar variabilidad genética baja. Lunga'ho *et al.* (2011) reportaron variabilidad genética baja entre accesiones de papa europeas comparadas con accesiones de Suramérica procedentes del Centro Internacional de la Papa (CIP) en Kenia. En contraste, un coeficiente de similitud bajo se obtuvo entre Tollocan y Cambray Rosa Morelos con un valor de 0.55. (Cuadro 4). Tollocan es un cultivar mejorado mexicano mientras que Cambray Rosa Morelos es una variedad criolla, esto puede explicar la amplia variabilidad detectada. Estos resultados demuestran la existencia de amplia variabilidad genética dentro del 'pool' genético mexicano.

Cuadro 4. Valores de similitud genética entre cultivares de papa según el coeficiente de Jaccard's (1908) con marcadores RAPD e ISSR.

Cultivares	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1														
2	0.67	1													
3	0.64	0.74	1												
4	0.65	0.74	0.77	1											
5	0.63	0.71	0.84	0.77	1										
6	0.62	0.68	0.83	0.74	<b>0.89</b>	1									
7	0.56	0.61	0.59	0.61	0.6	0.59	1								
8	0.58	0.63	0.64	0.68	0.68	0.66	0.59	1							
9	0.63	0.62	0.67	0.67	0.64	0.65	0.57	0.64	1						
10	0.63	0.71	0.74	0.78	0.75	0.74	0.57	0.66	0.68	1					
11	<b>0.55</b>	0.62	0.61	0.62	0.59	0.58	0.64	0.57	0.55	0.6	1				
12	0.65	0.68	0.68	0.77	0.7	0.71	0.61	0.67	0.64	0.82	0.61	1			
13	0.7	0.68	0.64	0.68	0.66	0.64	0.6	0.62	0.63	0.7	0.63	0.73	1		
14	0.65	0.68	0.71	0.79	0.71	0.71	0.6	0.66	0.67	0.83	0.58	0.8	0.68	1	
15	0.61	0.77	0.64	0.66	0.63	0.62	0.6	0.62	0.59	0.64	0.6	0.67	0.67	0.66	1

1=Cambray Rosa Morelos, 2=Criolla Edo mex, 3=Alpha grande, 4= Atlantic, 5= Armada, 6= Fianna, 7=Montserrat, 8=Mondial, 9= Gigant, 10=Cambray Blanca Edo Mex, 11= Tollocan, 12= Mochis, 13= Cambray Rosa DF, 14= Criolla Blanca Puebla, 15= Papa Chica.

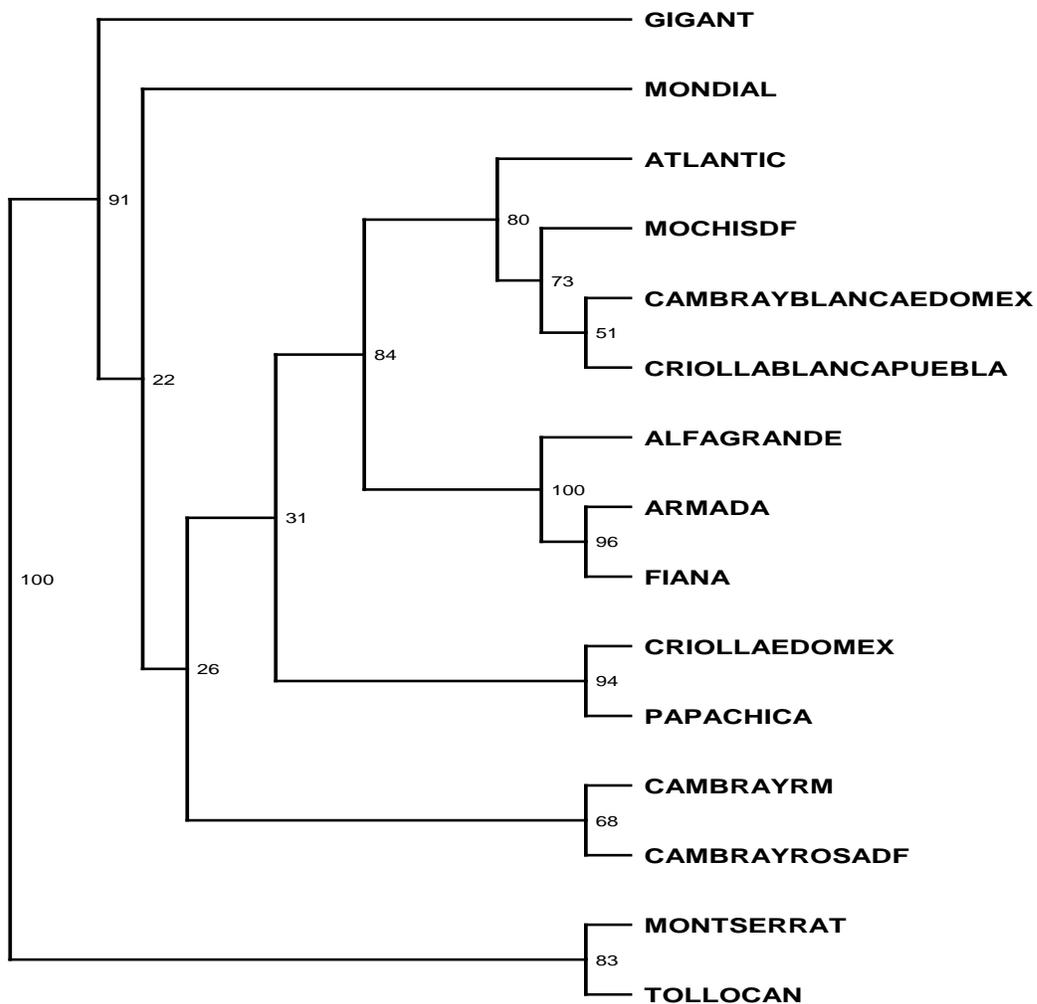


Figura 1. Dendrograma de similitudes entre 15 cultivares de papa, obtenido utilizando coeficientes de similitud de Jaccard's (1908). Detalles acerca de los cultivares en Cuadro 1.

## Diversidad genética y diferenciación

El porcentaje de *loci* polimórficos (P) entre los cultivares fue de 86.23 % (Cuadro 5). Generalmente, hubo bajo polimorfismo dentro de los cultivares, en un rango de 10.14 % para Cambray Blanca Edo Mex a 31.16 % para Atlantic. Estos valores también indican que las poblaciones de papa cultivadas en México presentan baja variabilidad genética. Estos resultados coinciden con los de Yasmin *et al.* (2006), que demostró la existencia de baja variabilidad dentro de cultivares clonales de papa. El coeficiente de diversidad (H) de Nei (1973) para todos los *loci* estudiados para los quince cultivares fue 0.29 (Cuadro 5). Los coeficientes variaron de 0.04 para Cambray Blanca Edo Mex a 0.11 en Atlantic. Estos valores, igual que el porcentaje de *loci* polimórficos reflejan baja diversidad genética dentro de las poblaciones. En cuanto al número de alelos por locus ( $N_a$ ) y al número efectivo de alelos por locus ( $N_e$ ), Atlantic lideró entre los cultivares con valores de 1.31 y 1.20, respectivamente. El coeficiente de diferenciación genética entre los cultivares fue alto ( $G_{ST} = 0.71$ ), e indica que aproximadamente 71% de la variación detectada puede atribuirse a diferencias entre los cultivares. El resto (29%) representa diversidad genética dentro de cultivares. En base al coeficiente de diferenciación genética total entre los cultivares ( $G_{ST}$ ) el nivel de flujo génico estimado ( $N_m$ ) fue de 0.19 (Cuadro 5). Esto indica que hay menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones, lo que también explica el alto nivel de diferenciación.

Cuadro 5. Diversidad genética entre y dentro de cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.).

	<b>Población</b>	<b>P( %)</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>H (Nei)</b>	<b>I (Shannon)</b>	<b>G<sub>ST</sub></b>	<b>Nm</b>
1	CAMBRAY ROSA MORELOS	23.19	1.23(0.42)	1.16(0.33)	0.09(0.18)	0.13(0.25)		
2	CRIOLLA EDO MEX	17.39	1.17(0.38)	1.15(0.34)	0.08(0.18)	0.11(0.23)		
3	ALFA GRANDE	23.91	1.23(0.43)	1.20(0.37)	0.10(0.20)	0.15(0.27)		
4	ATLANTIC	31.16	1.31(0.46)	1.20(0.36)	0.11(0.19)	0.16(0.26)		
5	ARMADA	19.57	1.19(0.40)	1.14(0.32)	0.08(0.17)	0.11(0.24)		
6	FIANNA	13.04	1.13(0.34)	1.10(0.29)	0.05(0.15)	0.08(0.21)		
7	MONTSERRAT	26.09	1.26(0.44)	1.20(0.37)	0.11(0.19)	0.16(0.27)		
8	MONDIAL	12.32	1.12(0.33)	1.09(0.26)	0.05(0.14)	0.07(0.20)		
9	GIGANT	18.12	1.18(0.39)	1.15(0.35)	0.08(0.18)	0.11(0.25)		
10	CAMBRAY BLANCA EDO MEX	10.14	1.10(0.30)	1.07(0.24)	0.04(0.13)	0.05(0.18)		
11	TOLLOCAN	19.57	1.19(0.40)	1.14(0.32)	0.08(0.17)	0.11(0.24)		
12	MOCHIS	28.99	1.28(0.46)	1.25(0.42)	0.13(0.21)	0.18(0.30)		
13	CAMBRAY ROSA DF	18.12	1.18(0.39)	1.12(0.28)	0.06(0.16)	0.10(0.23)		
14	CRIOLLA BLANCA PUEBLA	14.49	1.14(0.35)	1.10(0.28)	0.05(0.15)	0.08(0.21)		
15	PAPA CHICA	17.39	1.17(0.38)	1.13(0.32)	0.07(0.17)	0.10(0.23)		
	<b>Entre cultivares</b>	<b>86.23</b>	<b>1.86(0.35)</b>	<b>1.49(0.36)</b>	<b>0.29(0.19)</b>	<b>0.43(0.24)</b>	<b>0.71</b>	<b>0.19</b>

p = porcentaje de *loci* polimórficos, Na = número de alelos por locus, Ne = número efectivo de alelos por locus, I = Índice de Shannon, H = diversidad genética de Nei's (1973), G<sub>ST</sub> = coeficiente de diferenciación genética, y Nm = número de individuos migrantes. Desviaciones estándar se indican entre paréntesis.

Las actividades humanas, la adaptación a zonas agroecológicas, la distribución, colonización, sistema de apareamiento, tamaño de las poblaciones y el método de propagación afectan el nivel de diversidad genética entre y dentro de poblaciones

(Hamrick y Godt, 1989, 1996; Rojas *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 1996, 1997; Sun y Wong, 2001). La diversidad genética dentro de los cultivares de papa fue baja, probablemente debido a la importancia de mantener pureza genética dentro y entre los cultivares mediante propagación vegetativa (clonal) y programas de certificación de semillas. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Yasmin *et al.* (2006). Estos investigadores reportaron diversidad genética baja dentro de cultivares clonales de papa cultivados en Bangladesh, usando marcadores tipo RAPD.

### **Análisis AMOVA**

El Análisis de varianza molecular (AMOVA), usando agrupamiento jerárquico en base a origen, poblaciones, e individuos dentro de poblaciones, reveló diferencias genéticas significativas ( $p \leq 0.001$ ) entre los tres grupos utilizados en este estudio (Cuadro 6). Una contribución de 7 % de la variabilidad genética total se puede atribuir a diferencias entre los grupos. La variación atribuida a diferencias entre los grupos puede acreditarse a los grupos 1 y 3 que están relacionados a 'pool' genéticos europeos y mexicanos, respectivamente (Cuadro 6). La contribución mas alta a la variabilidad genética total (62 %) puede atribuirse a entre poblaciones dentro de grupos y el grupo que más contribuyó fue el 2 que pertenece a Norteamérica (Cuadro 6). Los individuos dentro de las poblaciones contribuyeron con 31 % de la variación genética total. Estos resultados sugieren

que los 'pool' genéticos europeos y mexicanos pueden ser de gran importancia para proveer materiales superiores a programas de mejoramiento genético.

Cuadro 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos del Grupo 1 Europa, Grupo 2 Norteamérica y Grupo 3 México, usando 5 marcadores RAPD y 5 ISSR. Las abreviaciones indican: df= grados de libertad, SS= suma de cuadrados.

Fuente de variación	df	SS	Componente de varianza	% Variación Total	Valor P <sup>x</sup>
<b>Grupo 1 vs. 2 vs. 3</b>	2	197.40	1.38	7%	***
Entre poblaciones dentro de grupos	12	841.15	12.72	62%	***
Individuos dentro de poblaciones	60	388.00	6.46	31%	***
<b>Grupo 1 vs. Grupo 2</b>	1	56.69	0.00	0%	NS
Entre poblaciones dentro de grupos	5	333.93	12.00	64%	***
Individuos dentro de poblaciones	28	188.80	6.74	36%	***
<b>Grupo 1 vs. Grupo 3</b>	1	148.48	2.28	11%	***
Entre poblaciones dentro de grupos	12	841.15	12.76	60%	***
Individuos dentro de poblaciones	56	351.20	6.27	29%	***
<b>Grupo 2 vs. Grupo 3</b>	1	53.93	0.00	0%	NS
Entre poblaciones dentro de grupos	7	507.22	13.18	67%	***
Individuos dentro de poblaciones	36	236.00	6.55	33%	***

<sup>x</sup> = Probabilidad, NS=no significativo, \* = 0.05, \*\*= 0.01, \*\*\*= 0.001

<sup>y</sup> = Para detalles de los grupos ver Cuadro 1

Esfahani *et al.* (2009) reportaron baja (5 %) pero significativa ( $p \leq 0.002$ ) variabilidad genética atribuida a materiales de papa de origen americano y europeo cultivados en Irán. En adición, los mismos autores reportaron que la mayoría de la variabilidad genética puede acreditarse a entre poblaciones de papa. En contraste, Fu *et al.* (2009) demostraron la existencia de una reducida base genética en el germoplasma de papa de Canadá. Estos resultados realzan la importancia que tiene el analizar la estructura de las poblaciones para guiarse en la selección de materiales para el mejoramiento genético. Nosotros inferimos de estos estudios el conocimiento de que la mayor parte de la diversidad genética en los genotipos de papa se encuentra dentro de las regiones y no entre ellas.

El análisis de la diversidad genética AMOVA reveló diferencias significativas ( $p \leq 0.001$ ) entre los tipos de cultivar. Estas diferencias contribuyeron con 6 % de variabilidad genética total (Cuadro 7). Las variedades criollas mexicanas mostraron un relativamente alto nivel (71 %) de diversidad genética entre los cultivares en comparación con los cultivares mejorados (64 %). Estos resultados sugieren que hay un alto nivel de diversidad genética entre las variedades criollas mexicanas que puede explotarse. La diversidad genética dentro de las poblaciones mexicanas fue más baja de lo esperado (29%) en comparación con los cultivares mejorados (31 %). Probablemente las variedades criollas seleccionadas para este estudio pertenecen a aquellas más comúnmente cultivadas entre los agricultores locales, de tal modo que han sido sometidas a un proceso de selección a través de años que las ha hecho genéticamente más uniformes. Alternativamente, ello puede apuntar también a pérdida de genotipos

debido a estrés biótico o abiótico, a actividades humanas, reemplazo por otros cultivos, migración de agricultores a otras zonas u otros factores. La mayor variabilidad mostrada por los genotipos mejorados puede atribuirse a que los agricultores locales tienden a mezclar varios genotipos en una variedad o a cosechar en forma involuntaria tubérculos derivados de semilla botánica, incrementándose la variabilidad. Ispizua *et al.* (2007) reportaron 55.50 y 44.40 % de diversidad genética dentro y entre variedades criollas de papa cultivadas en el noroeste de Argentina. Los cultivares mejorados de Europa fueron significativamente diferentes de los cultivares mejorados y variedades criollas mexicanos. El único cultivar de Norteamérica incluido en el presente estudio no fue significativamente diferente de los cultivares europeos y mexicanos (Cuadro 7). Tanto los cultivares mexicanos como los europeos han influido en gran proporción en la variabilidad genética atribuida al tipo de cultivar.

Debido a su rica diversidad, las variedades criollas necesitan conservarse y explotarse. Probablemente la conservación *ex.situ* es una buena opción dado que en este estudio se encontró baja diversidad dentro de los genotipos (Han *et al.*, 2007).

La papa comercial se propaga en forma vegetativa (clonal) y cuando se distribuye a través de los sistemas de certificación formales se pone énfasis en la pureza del cultivar o semilla. Si bien hemos reportado bajos niveles de variabilidad genética dentro de los cultivares estudiados, los niveles indicados pueden considerarse elevados si se toma en cuenta la pureza que deben guardar los cultivares mejorados clonalmente propagados.

Cuadro 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos del Grupo 1 Cultivares mejorados de Europa, Grupo 2 Cultivares mejorados de Norteamérica, Grupo 3 Cultivares mejorados de México y Grupo 4 Variedades criollas de México usando 5 marcadores RAPD y 5 ISSR. Las abreviaciones indican: df= grados de libertad, SS= Suma de cuadrados.

Fuente de variación <sup>y</sup>	df	SS	Componente de varianza	% Variación Total	Valor P <sup>x</sup>
<b>Grupos 1+2+3 vs 4</b>	1	112.90	1.15	6%	***
Entre cultivares dentro de grupos	13	925.65	12.94	63%	***
Individuos dentro de cultivares	60	388.00	6.46	31%	***
<b>Cultivares mejorados</b>					
Entre cultivares dentro de grupos	8	545.15	12.23	64%	***
Individuos dentro de cultivares	36	250.80	6.96	36%	na
<b>Variedades criollas de México</b>					
Entre cultivares dentro de grupos	5	380.50	14.07	71%	***
Individuos dentro de cultivares	24	137.20	5.71	29%	na
<b>Grupo 1 vs. 2 vs. 3 vs 4</b>	3	261.32	1.00	5%	***
Entre cultivares dentro de grupos	11	777.23	12.83	63%	***
Individuos dentro de cultivares	60	388.00	6.46	32%	***
<b>Grupo 1 vs. 2</b>	1	56.69	0.00	0%	NS
Entre cultivares dentro de grupos	5	333.93	12.00	64%	***

Individuos dentro de cultivares	28	188.80	6.74	36%	***
<b>Grupo 1 vs. 3</b>	1	97.11	2.06	10%	***
Entre cultivares dentro de grupos	6	396.73	11.88	58%	***
Individuos dentro de cultivares	32	214.00	6.68	32%	***
<b>Grupo 1 vs. 4</b>	1	140.45	2.30	11%	***
Entre cultivares dentro de grupos	10	714.43	13.08	61%	***
Individuos dentro de cultivares	48	289.20	6.02	28%	***
<b>Grupo 2 vs. 3</b>	1	54.00	0.00	0%	NS
Entre cultivares dentro de grupos	1	62.80	10.91	57%	**
Individuos dentro de cultivares	12	98.80	8.23	43%	***
<b>Grupo 2 vs. 4</b>	1	55.32	0.00	0%	NS
Entre cultivares dentro de grupos	5	380.50	13.97	69%	***
Individuos dentro de cultivares	28	174.00	6.21	31%	***
<b>Grupo 3 vs. 4</b>	1	63.92	0.00	0%	NS
Entre cultivares dentro de grupos	6	443.30	13.53	68%	***
Individuos dentro de cultivares	32	199.20	6.22	32%	***

<sup>x</sup> = Probabilidad, na=no disponible, NS=no significativo, \* = 0.05, \*\* = 0.01, \*\*\* = 0.001

<sup>y</sup> = Detalles sobre los grupos en Cuadro 1

Dado que utilizamos un tamaño de muestra relativamente pequeño por cultivar debido a que esperábamos no detectar algún nivel de polimorfismo dentro de los cultivares mejorados de papa, nuestros resultados apuntan a debilidades en los sistemas de certificación y/o comportamiento de los agricultores que requieren ser evaluados y corregidos.

## CONCLUSIONES

El uso de datos consenso basados en marcadores RAPD e ISSR reveló con éxito un alto nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de papa estudiadas. La mayor parte de la variabilidad genética puede atribuirse a diferencias entre los cultivares de papa dentro de las regiones. El tipo de cultivar contribuyó en forma significativa a la variabilidad genética total. El 'pool' genético mexicano fue significativamente diferente del 'pool' genético europeo y ambos contribuyeron en forma significativa a la variabilidad total relacionada a tipo de cultivar. Las variedades criollas mexicanas son una fuente rica de diversidad genética y contribuyeron significativamente a la variabilidad genética entre cultivares. Los materiales mejorados presentan variabilidad genética relativamente alta dentro de cultivares posiblemente debido a contaminación con otros cultivares mejorados. La menor diversidad genética dentro de las poblaciones criollas podría ser causa de extinción de algunos de los cultivares. Por tanto se recomienda fehacientemente la conservación *ex situ* de estas variedades. Ello es crítico para los materiales criollos dado que podrían sucumbir al embate de estreses bióticos o abióticos en virtud de que son cultivados por unos pocos agricultores en zonas aisladas.

## LITERATURA CITADA

Bartish, I.V., N. Jeppsson, H. Nybom, 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Ecol.* 8: 791–802.

Becerra, V.V., C.M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc. (Chile)* 60(3):270-281.

Bornet, B., F. Goraguer, G. Joly, M. Branchard. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45(3): 481-484.

Bussell, J.D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Mol. Ecol.* 8: 775–789.

Dellaporta S.L., J. Wood, J.B. Hicks. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol. Boil. Rep.* 1 (4):19-21.

Douches, D.S., K. Ludlam. 1991. Electrophoretic characterization of North American potato cultivars. *Amer. Potato. J.* 68:767-780.

Esfahani, S.T., B. Shiran, B. Ghlolamreza. 2009. AFLP markers for the assessment of genetic diversity in European and North American potato Varieties cultivated in Iran. *Crop Breed. App. Biotechnol.* 9:75-86.

FAOSTAT. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. 13 Feb. 2007. <<http://faostat.fao.org/site/336/default.aspx>>.

Ferroni, M. A. 1981. El potencial de la papa como recurso alimenticio y como fuente de ingreso. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Programa Regional Cooperativo de Papa. Toluca, Edo. De México, México. 30 p. (Publicación Especial Núm. 1.).

Fu, Y.B., G.W. Peterson, K.W. Richards, T. R. Tarm, J.E. Percy. 2009. Genetic diversity of Canadian and exotic potato germplasm revealed by SSR markers. *Am. J. Pot. Res.* 86(1) 38-48.

Gopal, J., S.M.P. Khurana. 2006. Handbook of potato production, improvement and postharvest management. The Haworth Press, Inc., 10 Alice Street, Binghamton, NY.

Hijmans, R.J., D.M. Spooner. 2001. Geographic distribution of wild potato species. *Amer. J. Bot.* 88(11):2101-2112.

Hamrick, J.L., M.J.W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In* Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS [eds.], Plant population genetics, breeding and genetic resources, 43–63. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

Hamrick, J.L., M.J.W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 351: 1291–1298

Han, Y.C., C.Z. Teng, S. Zhong, M.Q. Zhou, Z.L. Hu, Y.C. Song. 2007. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in Central China detected by ISSR markers. *Aquatic Botany* 86(1):69-75.

Ispizua, V.N., I.R. Guma, F. Sergio, A.M. Clausen. 2007. Genetic diversity of potato landraces from North western Argentina assessed with simple sequence repeats (SSRs). *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54:1833-1848.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44:223-70.

Jansky, S., A. Hamernik. 2009. The introgression of 2x 1EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56:1107-1115.

Lunga'ho, C., N.G. cheminingua, B.F. Yong, S.I. Shibairo, M.J. Hutchinson. 2011. Genetic diversity of Kenyan potato germplasm revealed by SSR markers. *Am. J. Pot. Res.* 88(5): 424-434.

McGregor, C.E., C.A. Lambert, M.N. Greyling, J.H. Louw, L. Warnich. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113:135–144.

Milbourne, D., R. Meyer, J.E. Bradshaw, E. Baird, N. Bonar, J. Provan, W. Powell, R. Waugh. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3:127–136.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70:3321-3323.

Nybom, H., I.V. Bartish. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3: 93–114.

Orona–Castro, F., V. Pecina–Quintero, A. Rocha–Peña, M.A. Cadena–Hinojosa, O.O. Martínez de la Vega, I.H. Almeyda–León. 2006. Caracterización molecular de genotipos comerciales y elite de papa. *Agric. Téc. Méx.* 2(32):171-180.

Ovchinnikova, A., E. Krylova, T. Gavrilenko, T. Smekalova, M. Zhuk, S. Knapp, D.M. Spooner. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum section petota*: Solanaceae). *Bot. J. Linnaean Soc.* 165:107-155.

Peakall R, Smouse PE (2006) GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6:288–295

Powell, W., C. Orozco-Castillo, K.J. Chalmers, J. Provanand, R. Waugh. 1995. Polymerase chain reaction-based assays for the characterization of plant genetic resources. *Electroph.* 16:1726–1730.

Prevost, A., M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.

Qaim, M. 1998. Transgenic Virus Resistant Potatoes in Mexico: Potential Socioeconomic Implications of North-South Biotechnology Transfer. ISAAA Briefs No. 7. ISAAA: Ithaca, NY. pp. 48.

Rocha, E.A., L.V. Paiva, H.H. de Carvalho, C.T. Guimaraes. 2010. Molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers. *Crop Breed. App. Biotechnol.* 10: 204-210.

Rohlf, F.J. 2000. Programme NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1. Exeter Software, NewYork.

Ross, H. 1986. Potato Breeding - Problems and Perspectives. J. Plant Breed. Supplement, 13: 1-132.

Rousselle, P., Y. Robert, J.C. Crosnier. 1996. La pomme de terre. INRA édition, France (ITPT, ITCF). p 224.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Cultivo de papa. México, D. F. p. 550-563.

Semagn, K., Å. Bjørnstad, M.N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. Afr. J. Biotechnol. 5(25):2540-2568.

Sun, M. 1996. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. Conserv. Biol. 10: 785–795.

Sun, M. 1997. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. Amer. J. Bot. 84: 224–232.

Sun, M., K.C. Wong. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. Amer. J. Bot. 88(12): 2180-2188.

Ugent, D. 1968. The potato in Mexico: Geography and primitive culture. *Econ. Bot.* 22:108-123.

Yasmin, S., M.S. Islam, M. Kondoker, M. Nasiruddin, S. Alam. 2006. Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Biotechnol.* 5(1):27-31.

Yeh, F.C., R.C. Yai, T. Boyle. 1999. Popgene Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetics Analysis. Quick User Guide. Edmonton, Alberta, Canada, p28.

## V. ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS DE REGENERACIÓN PARA TRES VARIEDADES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CULTIVADAS EN MÉXICO

### RESUMEN

Se establecieron protocolos de regeneración *in vitro* para tres cultivares de papa sembrados en México. Protocolos de regeneración de uno y dos pasos se usaron para regenerar tres cultivares de papa (Alpha, Cambray Rosa Morelos y Atlantic), usando como explantes hojas, nudos y entrenudos. Las variables evaluadas y analizadas fueron: porcentaje de inducción de callos, regeneración de brotes, número de brotes por explante y número de días a regeneración. Se probaron tres tratamientos para inducir la formación de callos, modificados a partir de protocolos previamente reportados. Se investigó cuatro combinaciones de medios en base a su capacidad para inducir la regeneración de brotes. Tratamientos, cultivares y tipo de explante tuvieron un efecto significativo sobre todas las variables analizadas. La interacción entre tipo de explante y cultivar no tuvo un efecto significativo para todas las variables analizadas, excepto para la inducción de callos. La interacción entre cultivar, tipo de explante y tratamientos tuvo influencia significativa sobre todas las variables analizadas. La mejor respuesta para callogénesis se obtuvo con  $4\text{mgL}^{-1}$  BAP +  $1\text{mgL}^{-1}$  NAA, mientras que una combinación de medios en dos pasos de  $4\text{mgL}^{-1}$ BAP +  $1\text{mgL}^{-1}$ NAA seguido por  $2\text{mgL}^{-1}$  BAP +  $5\text{mgL}^{-1}$  GA<sub>3</sub> fue el mejor para la regeneración de brotes usando explantes de hoja en Cambray Rosa Morelos.

## SUMMARY

Regeneration protocols were established for three potato cultivars grown in Mexico. A two-step and one-step regeneration protocol was used to regenerate three potato cultivars (Alpha, Cambray Rosa Morelos and Atlantic), using leaf, node and inter nodal explants. Percentage callus induction, shoot regeneration, number of shoots per explant and number of days to regeneration were the variables analyzed. Three treatments from previously reported protocols with modifications were tested in inducing callus. Four media combinations were investigated in inducing shoot regeneration. Treatments, cultivars and type of explant had a significant effect on all variables analyzed. The interaction between explant and cultivar did not have a significant effect on all variables analyzed except callus induction. The interaction between cultivar, explant and treatments had a significant influence on all the variables analyzed. Best response for callogenesis was obtained with  $4\text{mgL}^{-1}$  BAP +  $1\text{mgL}^{-1}$  NAA, while a two-step media combination of  $4\text{mgL}^{-1}$  BAP +  $1\text{mgL}^{-1}$  NAA followed by  $2\text{mgL}^{-1}$  BAP +  $5\text{mgL}^{-1}$  GA3 was the best for shoot regeneration using leaf explants in Cambray Rosa morelos.

## INTRODUCCIÓN

La papa es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Gopal y Khurana, 2006). Es la cuarta especie más cultivada después del arroz, trigo y maíz (Ross *et al.*, 1986). En México, la papa se cultiva anualmente en alrededor de 64,000 ha con una producción de 1.7 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 27

toneladas por hectárea (FAOSTAT, 2007). La papa cultivada se ve sometida constantemente al efecto de estrés por factores tanto bióticos como abióticos y varias opciones se han llevado a cabo para amortiguar esos efectos, incluyendo la aplicación de métodos de mejoramiento convencional, así como métodos de biotecnología modernos (Bradshaw, 2010). El establecimiento de un protocolo de regeneración eficiente es un prerrequisito para la aplicación de técnicas de transformación de plantas (Soto *et al.*, 2007). Numerosos protocolos de regeneración se han desarrollado para papa. Comúnmente, métodos de regeneración de uno o dos pasos han sido reportados (Yasmin *et al.*, 2003; Shirin *et al.*, 2007; Elaleem *et al.*, 2009; Borna *et al.*, 2010; Chakravarty *et al.*, 2010, Shin *et al.*, 2011; Lancheros *et al.*, 2009; Trujillo *et al.*, 2001; Barreto *et al.*, 2009; López y Chaparro, 2007). En adición, estos autores reportan la influencia del genotipo, tipo de explante y condiciones de cultivo sobre la regeneración *in vitro* eficiente de los cultivares de papa. Dado que las respuestas *in-vitro* son genotipo dependientes, y varían entre especies y dentro de cultivares de la misma especie, es necesario optimizar las condiciones de regeneración para un genotipo de papa dado (Sarker y Mustafa, 2002). Pocos reportes están disponibles para la regeneración de variedades de papa comúnmente cultivadas en México. El objetivo de este estudio consistió en establecer protocolos de regeneración eficientes para tres variedades de papa cultivadas en México, dos de ellas mejoradas (Atlantic y Alpha) y una criolla (Cambray Rosa Morelos).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Tres cultivares de papa (Cambray Rosa Morelos, Atlantic y Alpha) se obtuvieron de proveedores. Los tubérculos se lavaron con detergente en agua corriente. Luego se secaron y almacenaron en bolsas de papel color café y gruesas a fin de mantener un ambiente de luz difusa para inducir brotación. Los brotes obtenidos se seccionaron en piezas de 1 cm de longitud, incluyendo las apices. Las secciones se lavaron con detergente y se enjuagaron en agua tres veces. Se llevaron a una campana de flujo laminar y se colocaron en alcohol al 70 % durante 30 segundos, para transferirse luego a una solución a base de Tween-20 al 10 % durante 20 minutos. Las secciones se lavaron tres veces en agua destilada estéril y se propagaron en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con GA<sub>3</sub>. Después de cada cuatro semanas, explantes nodales se prepararon para propagar en masa a los cultivares de papa. Explantes de cuatro a ocho semanas de edad se utilizaron en los experimentos de regeneración.

Reportes previos de protocolos de regeneración para otros cultivares se probaron con varias modificaciones como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Medios para la inducción de callos.

Series	Medio*	Reguladores de crecimiento mgL <sup>-1</sup>
C1	CIMI	4mg L-1BAP + 1mgL-1 NAA
C2	CIM2	2.25mgL-1BAP + 1.86mgL-1NAA + 10mgL-1 GA <sub>3</sub>
C3	CIM3	4mgL-1BAP + 1mgL-1 IAA
C4	Control	No hormonas

\* CIM=Medio de inducción de callos.

Cuadro 2. Combinaciones de medios.

Series	Combinaciones de medios*	Reguladores de crecimiento mgL <sup>-1</sup>
T1	CIMI SIMI	4mg L-1BAP + 1mgL-1 NAA 2mg L-1BAP + 5mg L-1GA <sub>3</sub>
T2	CIMI SIM2	4mg L-1BAP + 1mgL-1 NAA 4mgL-1BAP + 1mgL-1 IAA
T3	CIM2 SIM2	2.25mgL-1BAP + 1.86mgL-1NAA + 10mgL-1 GA <sub>3</sub> 4mgL-1BAP + 1mgL-1 IAA
T4	CIM3 SIM2	4mgL-1BAP + 1mgL-1 IAA 4mgL-1BAP + 1mgL-1 IAA
T5	Control	No hormonas

\*CIM=Medio para la inducción de callos, SIM= Medio para la inducción de brotes.

Entrenudos, nudos y segmentos de hoja de tres cultivares de papa cultivadas *in vitro* se utilizaron para la inducción de callos y la regeneración de plantas. Los explantes desinfectados se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) conteniendo tres diferentes combinaciones de hormonas para la inducción de callos (Cuadro 1). Los explantes con callos inducidos se transfirieron a un medio de inducción de brotes después de 3 a 4 semanas dependiendo de qué “tan prolífico” fue el crecimiento de los callos. Después de 4 a 6 semanas se observó la

formación de brotes y aquellos con 2 cm de longitud se transfirieron a medio de enraizamiento sin hormonas. Los brotes formaron raíces luego de una semana en medio sin reguladores de crecimiento. Todas las plantas cultivadas fueron crecidas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se adicionó diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa y agar a una concentración de 7 g L<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5.8 antes de esterilizar en autoclave a 121°C y 15 lb psi por 15 min. Las plantas cultivadas *in vitro* se crecieron en un cuarto de cultivo a temperatura de 26 °C y fotoperiodo de 16 horas.

### **Análisis estadístico de los datos**

Se usó treinta explantes por tratamiento, 10 explantes se colocaron por cada caja de petri y los tratamientos se repitieron tres veces. Los datos en porcentaje para inducción de callos y regeneración de brotes se transformaron usando la función arcoseno antes de realizar un análisis de varianza (ANOVA) (SAS Inst., 2002). Se hizo una comparación de medias utilizando la prueba de Duncan (Duncan's Multiple Range Test, DMRT) con el procedimiento de modelo lineal general ( $\alpha \leq 0.05$ ) de SAS (SAS Inst., Inc., 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de varianza para tratamientos, cultivares y tipos de explante muestran en el cuadro 3 efectos significativos ( $\alpha < 0.05$ ) en la inducción de callos, regeneración de brotes, número de brotes por explante y número de días a regeneración. El tipo de explante influyó significativamente en las variables medidas, a excepción del número de brotes por explante (Cuadro 3). La interacción entre cultivar y tipo de explante no diferieron significativamente en la mayoría de las variables analizadas, la excepción fue la inducción de callos. La interacción entre tratamiento y tipo de explante fueron significativa en todas las variables analizadas. La interacción entre los tres factores (tratamiento, cultivar y tipo de explante) mostró un efecto significativo sobre todas las variables dependientes analizadas (% de inducción de callos, % de regeneración de brotes, número de brotes por explante y número de días a regeneración). Varios investigadores han demostrado que la eficiencia de regeneración es dependiente del genotipo, las condiciones de cultivo y el tipo de explante (Shin *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Niveles de significación de influencia de diferentes tipos de explante, cultivares y tratamientos sobre características de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas *in vitro*.

Fuente de Variación	Inducción de allos (%)	Regeneración de brotes (%)	Número de brotes por explante	Número de días a regeneración
Tratamientos	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cultivar	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0294
Tipo de explante	<0.0001	<0.0001	0.0031	0.0109
Cultivar*Explante	0.0244	0.8323	0.1419	0.7148
Tratamiento*Cultivar	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0065
Tratamiento*Explante	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0126
Tratamiento*Explante*Cultivar	<0.0001	0.0003	0.0091	0.0008

Cuadro 4. Efecto de diferentes tipos de explante, cultivares y tratamientos sobre características de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas *in vitro*.

Fuente de Variación	Inducción de callos (%)	Regeneración de brotes (%)	Número de brotes por explante	Número de días a regeneración
<b>Tratamientos</b>				
1	68.37 a	17.97 c	10.1 ab	71.03 a
2	43.39 b	31.02 a	10.33 ab	77.97 a
3	34.72 c	22.66 b	13.72 a	92.49 a
4	0.00 d	18.65 bc	7.17 b	80.72 a
5	-	0.00 d	0.00 c	-
<b>Cultivar</b>				
Cambray Rosa Morelos	41.62 a	26.60 a	14.36 a	78.03 ab
Atlantic	31.00 c	10.22 c	2.89 c	88.65 a
Alpha	36.50 b	17.35 b	7.60 b	67.39 b
<b>Explante</b>				
Hoja	23.10 c	11.92 c	7.21 b	73.25 b
Nudos	48.43 a	25.81 a	11.43 a	74.52 ab
Entrenudos	37.53 b	16.45 b	6.22 b	81.95 a

En la misma columna, valores con la misma letra, son no significativamente diferentes (DMRT  $\alpha \leq 0.05$ ).

Cuadro 5. Efectos de interacción entre diferentes cultivares, tipos de explante y tratamientos sobre características de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) crecidas in vitro.

Cultivar	Explante	Tratamiento	Inducción de callos (%)	Regeneración de brotes (%)	Número de brotes por explante	Número de días a regeneración
		1	80 b-d	70 a	50 a	49.67 j
		2	43.3 bc	20 d-g	11.6 d-i	65 g-i
	Hoja	3	0 i	6.66 fg	18 c-g	88 b-d
		4	0 i	0 g	0 i	—
		5	—	0 g	0 i	—
Cambray Rosa Morelos		1	100 a	20 d-g	17.66 c-h	80 d-f
		2	67 c-e	63.3 ab	26.2 b-c	65.67 g-i
	Nudos	3	96.6 ab	40 b-e	21.2 b-f	83.33 c-e
		4	0 i	60 ab	16.2 c-h	95.67 bc
		5	—	0g	0 i	—
		1	70 c-e	6.66 fg	12.5 c-i	80 d-f
		2	63.3 d-f	56.7 ab	16.2 c-h	72 e-g
	Entrenudos	3	76.6 cd	20 d-g	17.6 c-h	95.67 bc
		4	0 i	43.3 b-d	8.3 e-i	70 f-h
		5	—	0 g	0 i	—
		1	80	0 g	0 i	—
		2	0 i	23.3 d-g	11 d-i	72.67 e-g
	Hoja	3	0 i	0 g	0 i	—
		4	0 i	0 g	0 i	—
		5	—	0 g	0 i	—

Atlantic		1	96.6 ab	10 fg	3 hi	86 b-d
		2	70 c-e	50 a-c	16.4 c-h	86.67 b-d
	Nudos	3	40 g	0 g	0 i	–
		4	0 i	16.6 e-g	6 g-i	86 b-d
		5	–	0 g	0 i	–
		1	76.6 cd	0 g	0 i	–
		2	50 fg	20 d-g	4 g-i	88 b-d
	Entrenudos	3	20 h	0 g	0 i	–
		4	0 i	3.3 g	3 hi	112.67 a
		5	–	0 g	0 i	–
		1	83.3 bc	0 g	5.6 g-i	65 g-i
		2	46.6 g	0 g	0 i	–
	Hoja	3	0 i	30 c-f	11.9 c-i	58.33 hi
		4	0 i	0 g	0 i	–
		5	–	0 g	0 i	–
Alpha		1	83.3 bc	20 d-g	3 hi	65.67 g-i
		2	70 c-e	20 d-g	4.9 g-i	68 f-i
	Nudos	3	73.3 cd	60 ab	32.8 b	55.33 ij
		4	0 i	20 d-g	24.1 b-d	75 d-g
		5	–	0 g	0 i	–
		1	76.6 cd	0 g	0 i	–
		2	40 g	16.6 e-g	2.7 hi	71.67 e-g
	Entrenudos	3	53.3 e-g	40 b-e	22 b-e	72.33 e-g
		4	0 i	6.66 e-g	7 f-i	75.33 d-g
		5	–	0 g	0 i	–

## **Inducción de callos**

Los tratamientos para la inducción de callos (Cuadro 1) tuvieron efecto significativo sobre la inducción de callos ( $\alpha \leq 0.05$ ) (Cuadro 3). El mejor tratamiento para la inducción de callos a través de cultivares y explantes fue el 1 (Cuadro 4). El cultivar que mostró la inducción más alta de callos fue Cambray Rosa Morelos (Cuadro 4). Los nudos mostraron la más alta proliferación de callos a través de tratamientos y cultivares (Cuadro 4). La interacción entre tratamiento, cultivar y explante tuvo un efecto significativo sobre la inducción de callos (Cuadro 3). La más alta inducción de callos (100%) se obtuvo usando explantes nodales para el cultivar Cambray Rosa Morelos con el tratamiento C1 (Figura 1). Esto no fue significativamente diferente para la inducción de callos en explantes nodales del cultivar Atlantic (96.6%) en el tratamiento C1 y explantes nodales de Cambray Rosa Morelos con el tratamiento C3 (Figura 1 y Cuadro 5). La mejor respuesta en inducción de callos para Alpha (83.3 %) se obtuvo con explantes de hoja y nudos en el tratamiento C1 (Figura 1). Inducción de callos comparable se observó usando el tratamiento C1 en explantes de hoja para los tres cultivares; Cambray Rosa Morelos, Atlantic y Alpha a 80, 80 y 83 %, respectivamente (Figura 1). No se observó inducción de callos en el tratamiento control, en el tratamiento C2 para Atlantic usando explantes de hoja, y en el tratamiento C3 para los tres cultivares usando explantes de hoja (Figura 1). La inducción de callos se ha promovido usando solamente auxinas o en combinación con bajas concentraciones de citocininas (Shirin *et al.*, 2007). Las respuestas al tipo y concentración de auxinas y citocininas son dependientes del genotipo y del tipo de explante utilizados (Mustafa y Sarker, 2002; Anjun y Ali, 2004). En el presente estudio se usó dos

tipos de auxinas (NAA y IAA) en combinación con BA para inducir la formación de callos. La mejor respuesta se obtuvo usando NAA y BA. Cingel *et al.* (2010) reportó resultados similares para genotipos de papa Serbios usando explantes de hoja. Barnerjee *et al.* (2006) usó BAP y NAA y obtuvo alta formación de callos usando explantes de hoja con *Solanum tuberosum* spp andigena. Borna *et al.* (2010), también indujo con éxito la formación de callos a partir de nudos y entrenudos en tres cultivares de papa usando NAA y BA. Soto *et al.* (2007) obtuvo 100% de inducción de callos usando entrenudos del cultivar Desireé con BAP y NAA en el medio de cultivo. La formación de brotes ocurre a través de organogénesis directa o indirecta. El proceso es dependiente del genotipo y para genotipos que sufren organogénesis indirecta la fase de callo es crucial, y es un prerequisite el establecer protocolos eficientes para la inducción de callos.

En el presente estudio también se probó un método de un paso usando BA y IAA. Explantes crecidos en este medio regeneraron brotes con baja intervención de callos. La mejor respuesta a formación de callos (96.6%) se obtuvo para Cambray Rosa Morelos usando nudos con el tratamiento C3 (Figura 1). Shin *et al.* (2011) también usaron BA y IAA para inducir la formación de callos en cinco cultivares de papa surcoreanos con un protocolo en dos pasos.

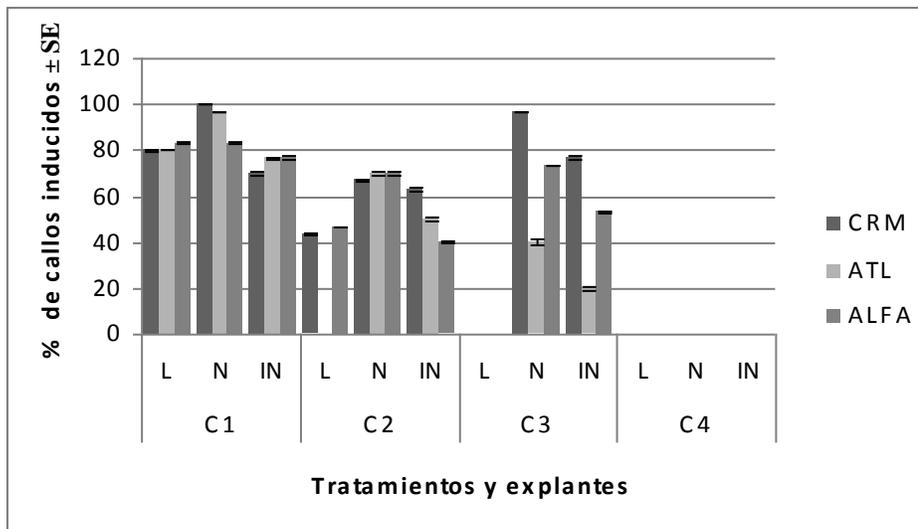


Figura 1. Porcentaje de callos inducidos para cada tratamiento en tres cultivares de papa usando nudos, entrenudos y segmentos de hojas como explantes. Datos promedio se tomaron después de cuatro semanas de crecimiento en medio de inducción de callos. CRM= Cambray Rosa Morelos, ATL= Atlantic, ALFA= Alpha. C1= CIM1, C2=CIM2, C3= CIM3, C4=Control (detalles en el Cuadro 1). L= Hoja, N= Nudos e IN=Entrenudos.

### Regeneración de brotes

Los tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre la regeneración de brotes ( $\alpha=0.05$ ) (Cuadro 3). El valor más alto de regeneración de brotes se obtuvo con el tratamiento T2 combinado a través de cultivares y explantes (Cuadro 4). Cambray Rosa Morelos mostró la regeneración de brotes más alta a través de tratamientos y explantes (Cuadro 4). Los nudos fueron los que tuvieron el número más alto de brotes a través de tratamientos y cultivares (Cuadro 4). La interacción entre

tratamientos, cultivares y tipo de explante tuvo un efecto significativo sobre la regeneración de brotes (Cuadro 3). La más alta regeneración de brotes (70%) se observó en Cambray Rosa Morelos usando explantes de hoja con el tratamiento T1 combinado (Figura 2). Esto no fue significativamente diferente de los tratamientos T2 y T4 usando Cambray Rosa Morelos con nudos y entrenudos como explantes y de T3 con Alpha usando nudos y T2 utilizando a Atlantic con nudos como explantes (Figura 2 y Cuadro 5). Cingel *et al.* (2010) observó alta regeneración de brotes (57-92 %) al usar combinaciones de hormonas similares a las nuestras con explantes de hoja de dos cultivares serbios de papa. El tratamiento T3 combinado regeneró el más alto número de brotes (60%) para Alpha usando explantes nodales (Figura 2). La mejor respuesta para Atlantic (50%) se observó con el medio T2 combinado usando nudos como explantes. Si bien el tratamiento C1 tuvo respuesta considerable para la inducción de callos (Figura 1), la respuesta para inducción de brotes no fue favorable para nudos y entrenudos para los tres cultivares con la combinación de medios T1 (Figura 2). Mejor regeneración de brotes con nudos y entrenudos como explantes se obtuvo cuando el medio de regeneración fue a base de BA y IAA. Sin embargo, esto no se observó para Atlantic con el tratamiento T3 cuando la formación de callo se indujo previamente con el tratamiento T2 (Figura 2). Respuestas semejantes fueron reportadas por Borna *et al.* (2010). Shin *et al.* (2011), usaron BAP y IAA durante la fase de formación de callo y GA<sub>3</sub> y BAP en la fase de regeneración y obtuvo 0-53 % y 0-63 % de regeneración para explantes nodales y entrenudos, respectivamente.

Un tratamiento de regeneración en un paso (T4) dio respuestas altas (60 %) con Cambray Rosa Morelos usando nudos como explantes. Sin embargo, mejor regeneración de brotes a partir de nudos se obtuvo con tratamientos en dos pasos para los tres cultivares de papa (Figura 2).

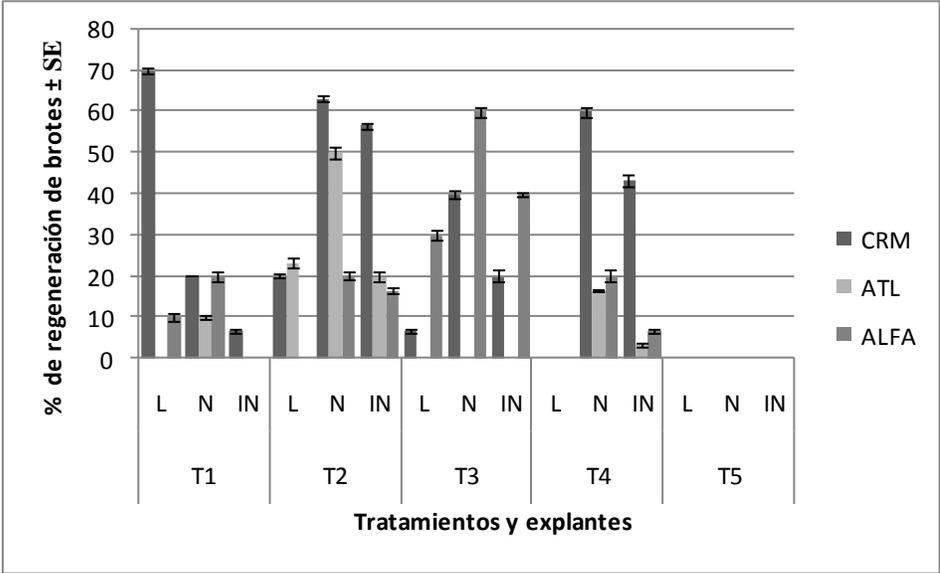


Figura 2. Porcentaje de regeneración de brotes para cada tratamiento en tres cultivares de papa usando nudos, entrenudos y hojas como explantes. CRM= Cambray Rosa Morelos, ATL= Atlantic, ALFA= Alpha. T1= Combinación de medios 1, T2= Combinación de medios 2, T3= Combinación de medios 3, T4= Combinación de medios 4 y T5= Control (detalles en Cuadro 2). L= Hoja, N= Nudos e IN=Entrenudos.

**Número de brotes por explante**

Los tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre el número de brotes regenerados por explante ( $\alpha=0.05$ ) (Cuadro 3). El más alto número de brotes por explante se obtuvo con la combinación de tratamientos T3 a través de cultivares y explantes (Cuadro 4). Ello no fue significativamente diferente para las combinaciones de tratamientos T1 y T2 (Cuadro 4). Cambray Rosa Morelos registró el mayor número de brotes por explante a través de tratamientos y explantes (Cuadro 4). Los nudos generaron el mayor número de brotes a través de tratamientos y cultivares (Cuadro 4). La interacción entre tratamiento, cultivar y explante tuvo efecto significativo sobre el número de brotes por explante (Cuadro 3). El más alto número de brotes por explante (50) se observó en Cambray Rosa Morelos usando hojas como explante con la combinación de tratamientos T1 (Figura 3). Le siguió Alpha con 32.8 usando nudos y el tratamiento T3 (Figura 3 y Cuadro 5). La mejor respuesta para brotación de Atlantic (16.4) se registró con la combinación de medios T2 usando nudos (Figura 3). Eliminar la hormona NAA del medio de regeneración de brotes T1 incrementó el número de brotes por explante en Cambray Rosa Morelos usando hojas como explantes. Sin embargo, este medio no incrementó el número de brotes en nudos y entrenudos en los tres cultivares (Figura 3). Resultados similares (10 brotes por explante) observó Cingel *et al.* (2010), usando hojas como explante. Barreto *et al.* (2009) también reportó alto número de brotes por explante (7) en papa var. Pastusa Suprema cuando no se adicionó auxinas al medio de regeneración de brotes. En el presente estudio reportamos la regeneración de un relativamente alto número de brotes por explante en comparación a estudios previos. Este número alto de brotes es comparable al reportado por Borna *et al.* (2010).

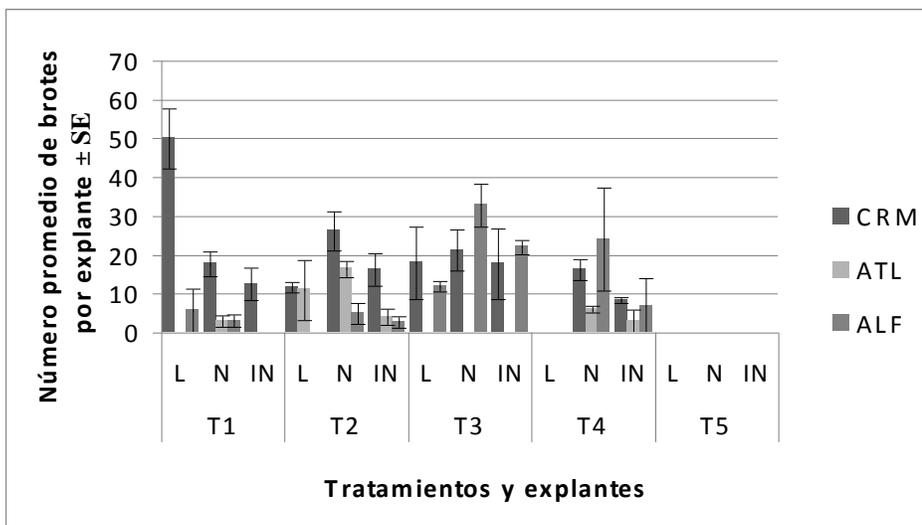


Figura 3. Número de brotes regenerados por explante para cada tratamiento en tres cultivares de papa usando nudos, entrenudos y hojas como explantes. CRM= Cambray Rosa Morelos, ATL= Atlantic, ALFA= Alpha. T1= Combinación de medios 1, T2= Combinación de medios 2, T3= Combinación de medios 3, T4= Combinación de medios 4 y T5= Control (detalles en Cuadro 2). L= Hoja, N= Nudos e IN=Entrenudos.

### Número de días a regeneración de brotes

Los tratamientos tuvieron influencia significativa sobre el número de días a regeneración de brotes ( $\alpha=0.05$ ). El número de días más corto para regenerar brotes (49.6) se observó en Cambray Rosa Morelos con la combinación de medios T1 usando hojas como explantes (Figura 4). A Alpha le tomó 55.3 días para regenerar brotes en el medio T3 usando nudos (Figura 4). A Atlantic le llevó 72.6 días regenerar brotes en medio T2 usando hojas como explantes (Figura 4).

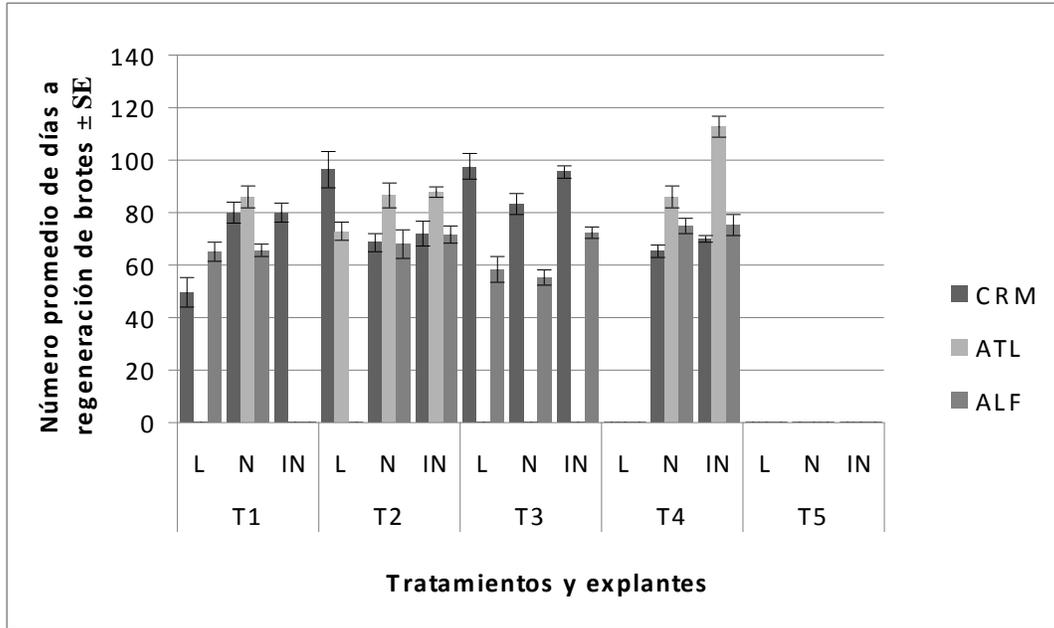


Figura 4. Número de días a regeneración de brotes para cada tratamiento en tres cultivares de papa usando nudos, entrenudos y hojas como explantes. CRM= Cambray Rosa Morelos, ATL= Atlantic, ALFA= Alpha. T1= Combinación de medios 1, T2= Combinación de medios 2, T3= Combinación de medios 3, T4= Combinación de medios 4 y T5= Control (detalles en Cuadro 2). L= Hoja, N= Nudos e IN=Entrenudos.

Finalmente, en la Figura 5 se muestran las fases de inducción de callos en explantes de hoja, inducción de brotes usando hojas como explantes, regeneración de brotes a partir de nudos y el enraizamiento de plántulas en medio MS0 para la variedad Cambray Rosa Morelos.

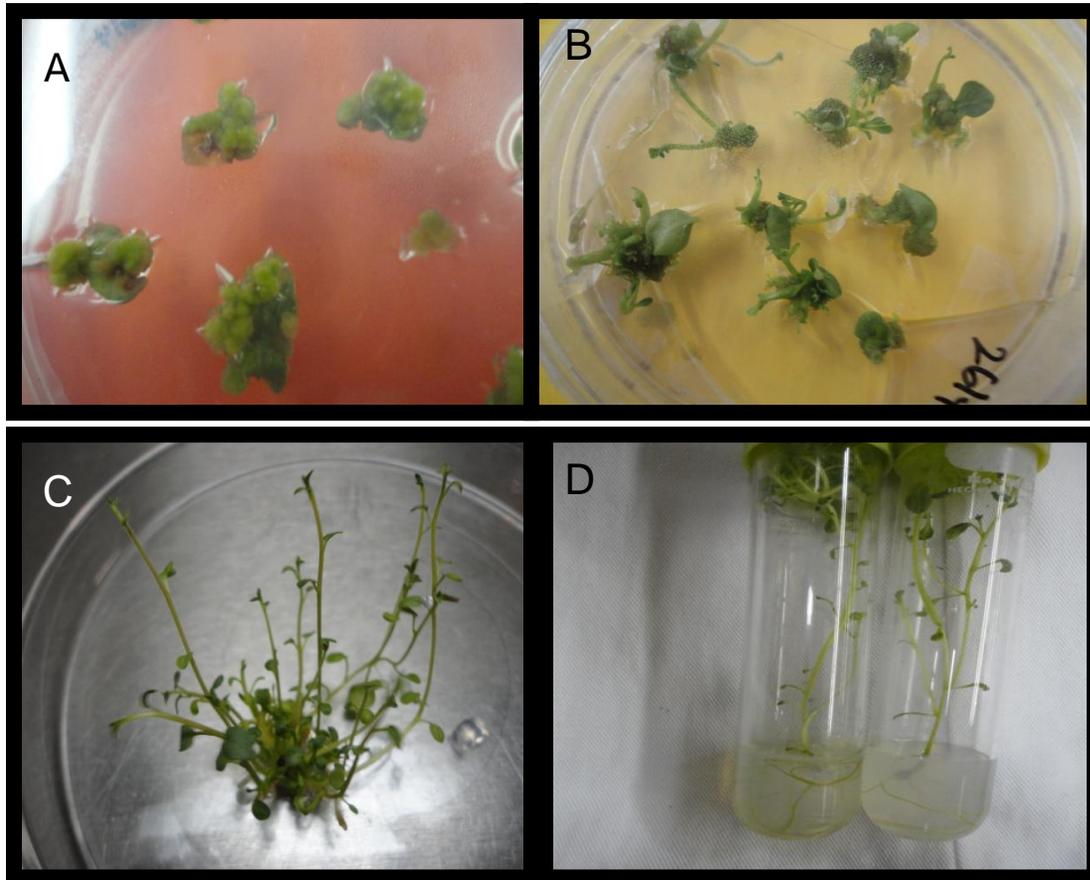


Figura 5. A) Inducción de callos en explantes de hojas, B) Inducción de brotes a partir de hojas como explantes, C) Regeneración de brotes a partir de nudos y D) Enraizamiento de plántulas en medio MS0.

## CONCLUSIONES

Se demostró claramente la dependencia de la eficiencia de regeneración con respecto a las condiciones de cultivo, el genotipo y tipo de explante. Se establecieron protocolos de regeneración para tres variedades cultivadas en México. Los mejores resultados se obtuvieron con protocolos de regeneración en dos pasos.

## REFERENCIAS

Ali, M. A., K.M. Nasiruddin, M.S. Haque, M.A.Z. Al Munsur. 2007. *In vitro* regeneration potentiality of six potato varieties from leaf and intermodal segments initiated calli with BAP. Bangladesh J. Crop Sci. 18(1):33-40.

Anjum, M., Ali, H. 2004. Effect of culture medium on shoot initiation from calluses of different origin in Potato (*Solanum tuberosum* L). Biotechnology 3: 194-199.

Banerjee, A.K., S. Prat, Hannapel, D.J. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Plant Science 170:732-738.

Barreto, J.P.J, A. Chaparro, J. Blanco. 2009. Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales. Agronomía Colombiana 25(1):16-25.

Borna R. S., M. I. Hoque, R. H. Sarker. 2010. *Agrobacterium* mediated Genetic Transformation for Local Cultivars of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Marker Genes. Plant Tissue Cult. & Biotech. 20(2): 145-155.

Bradshaw, J.E. 2010. Root and tuber crops. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 300p.

Chakravarty, B., G. Wang-Pruski. 2010. Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1: 409-416.

Chue ML, Zhao KJ, He ZM, Ramalingam S, Fung KL. 2004. An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta* 220: 717-730.

Cingel, A, V. Branka, V. D. A. Dragosavac, A. Smigocki, S. Ninkovic. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of two Serbian potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cv. Dragacevka and cv. Jelica). *African Journal of Biotechnology* 9(30): 4644-4650.

Elaleem, K.G.A, R.S. Modawi, M.M. Khalafalla. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. *Afric. J. Biotechnol.* 8 (11):2529-2534

FAOSTAT. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. 13 Feb. 2007. <<http://faostat.fao.org/site/336/default.aspx>>.

Gopal, J., S.M.P. Khurana. 2006. Handbook of potato production, improvement and postharvest management. The Haworth Press, Inc., 10 Alice Street, Binghamton, NY.

Lancheros, M.L.Y., A.C. Giraldo. 2009. Regeneracion y sensibilidad a manosa en entrenudos de papa (*Solanum tuberosum* spp. *andígena* Var Diacol Capiro). Acta biol. Colomb. 14(1):143-154.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.

Ross, H. 1986. Potato Breeding - Problems and Perspectives. J. Plant Breed. Supplement 13: 1-132.

SAS (2002) SAS/SAT User Guide version 9. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina

Sarker, R., Mustafa, B. 2002. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Two Indigenous Potato Varieties of Bangladesh. Plant Tissue Cult. 12: 69-77.

Shin, D. Y., E. S. Seong, J. K. Na, J. H. Yoo, W. H. Kang, B. K. Ghimire, J. D. Lim, C. Y. Yu. 2011. Conditions for regeneration and transformation of *Solanum tuberosum* cultivars using the cotton glutathione S-transferase (Gh-5) gene. African Journal of Biotechnology. 10(67): 15135-15141

Shirin F, Hossain M, Kabir MF, Roy M, Sarker SR. 2007. Callus Induction and Plant Regeneration from Internodal and Leaf Explants of Four Potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. World J. Agric. Sci. 3(1): 01-06.

Soto, N., Enriquez, GA., Ferreira, A., Corrada, M., Fuentes, A., Tiel, K. Pujol, M. 2007. Efficient transformation of potato stem segments from cv. Desiree using phosphinothricin as selection marker. Biotech Applicada 24:139-144.

Trujillo C, A.J. Rodriguez, S. Jaramillo, R. Hoyos, S. Orduz, R. Arango. 2001. One-step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. ssp andigena). Plant Cell Rep. 20:637-641.

Yasmin, S., Nasirudin, K., Begum, R. Taluker, S. 2003. Regeneration and establishment of Potato plantlets through callus formation with BAP and ANA. Asian Journal of Plant Sciences 2: 936-940.

## VI. TRANSFORMACIÓN DE DOS VARIEDADES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) CULTIVADAS EN MÉXICO USANDO *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

### RESUMEN

Dos cultivares de papa, Cambray Rosa Morelos y Alpha fueron transformados utilizando la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que porta el plásmido binario pBI121, que contiene el gen reportero que codifica para una  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*) y el gen de selección *nptII*, que codifica para una neomicina fosfotransferasa, y proporciona resistencia al antibiótico kanamicina. Los explantes de papa se inocularon usando una suspensión bacteriana por 30 minutos y luego se cocultivó durante 2 días en oscuridad, a temperatura ambiente. Los explantes agroinfectados se cultivaron durante 3 semanas en un medio de selección para inducir la formación de callos que posteriormente se transfirieron a un medio de selección para promover la inducción de brotes durante 3 a 5 semanas, dependiendo del tipo de explante y condiciones de cultivo. Se llevó a cabo un ensayo histoquímico para evaluar la expresión del gen *GUS* y un análisis por PCR para comprobar la integración de los genes en el genoma de la papa. Los brotes transformados dieron positivo al ensayo histoquímico y mostraron la coloración azul característica de la expresión del gen *GUS*. El análisis de PCR para detectar la presencia del gen *nptII*, por amplificación de una banda de 800 pb también dio positivo en las plantas transformadas, pero no estuvo presente en las no transformadas, lo que significó que hubo integración eficiente de los genes.

**Palabras clave:** *Solanum tuberosum*, transformación, *GUS*, gen *nptII*.

## SUMMARY

Two potato cultivars Cambray Rosa Morelos and Alpha were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harbouring binary plasmid pBI121 containing the GUS and *nptII* genes. The potato explants were inoculated using bacterial suspension for 30 min, then cocultivated for 2 days in the dark at room temperature. The explants were cultured in selection callus induction media for 3 weeks and transferred to selection shoot induction media for 3-5 weeks depending on the type of explant and culture conditions. GUS histochemical and PCR analysis were conducted on rooted shoots grown in media without hormones but supplemented with antibiotics. Transformed shoots tested positive for both GUS and PCR analysis for *nptII* kanamycine resistance gene.

**Key Words:** *Solanum tuberosum*, transformation, GUS and *nptII* genes.

## INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Gopal y Khurana, 2006). Ocupa el cuarto lugar en producción para consumo humano, superado solamente por el trigo, arroz y maíz (Ross, 1986). Clasificaciones recientes reconocen alrededor de 100 especies silvestres y cuatro cultivadas (incluyendo a *Solanum tuberosum*) (Ovchinnikova *et al.*, 2011). En México, la papa se cultiva anualmente en una superficie de 64,000 ha, con una producción de 1.7 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 27 ton. ha<sup>-1</sup> (FAOSTAT, 2007). La papa se cultiva principalmente en los estados de

Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (SAGARPA, 2010).

La papa es vulnerable a factores bióticos y abióticos y varias estrategias se han aplicado para reducir o evitar sus efectos. Entre ellas se incluyen la aplicación de métodos de mejoramiento tradicional que son complejos y toman largo tiempo para generar una variedad con las características deseadas (Grafius y Douches, 2008). Para remontar algunas de estas limitantes, se han aplicado algunas técnicas de ingeniería genética utilizando genes deseables obtenidos de diferentes organismos y los resultados han sido promisorios (Wierenga *et al.*, 1996; Hefferon *et al.*, 1997; Lyapkova *et al.*, 2001; Urwin *et al.*, 2001; Naimov *et al.*, 2001; Chue *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2001). En adición, la papa se ha manipulado usando ingeniería genética para modificar vías metabólicas comunes, tales como las involucradas en síntesis de sacarosa y almidón (Wolters *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999). Varios autores han reportado recientemente la transformación eficiente de algunos genotipos de papa (Cingel *et al.*, 2010; Chakravarty y Pruski, 2010; Borna *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2011). Sin embargo, los protocolos de transformación son altamente dependientes del genotipo y para cada genotipo dado de papa deben de optimizarse las condiciones de transformación (Vinterhalter *et al.*, 2008). También, existen pocos reportes sobre la transformación de cultivares de papa sembrados en México. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue transformar dos cultivares de papa sembrados en México usando *Agrobacterium tumefaciens* portando los genes *UidA* que codifica para una  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y *nptII* que confiere resistencia a kanamicina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcción del vector

La cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* portando el plásmido binario pBI121 conteniendo los genes GUS y *nptII* se usó para transformar a los cultivares de papa (Figura 1).

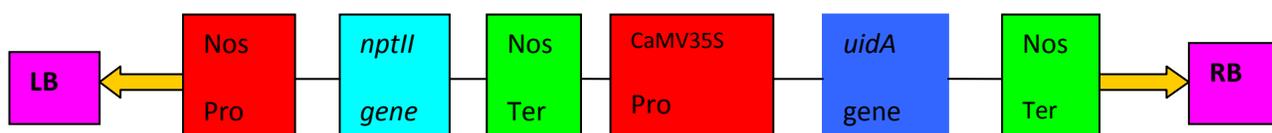


Figura 1. Esquema de la construcción en el vector pBI121 utilizada para transformar cultivares de papa. Abreviaciones: RB, borde derecho del T-DNA; NOS-Ter, terminador NOS; *uidA*, gen que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS); CaMV 35S Pro, promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; *nptII*, gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa y confiere resistencia al antibiótico kanamicina; NOS-Pro, promotor NOS; LB, borde izquierdo del T-DNA.

### Material vegetal

Las combinaciones de cultivares, explantes y tratamientos que mostraron resultados promisorios en experimentos de regeneración previos (datos no mostrados) se utilizaron en estudios de transformación posteriores. Dos cultivares de papa, Cambray Rosa Morelos y Alpha, fueron seleccionados. Los tubérculos se lavaron varias veces con detergente en agua corriente. Luego se secaron y almacenaron en bolsas gruesas de color café con luz difusa para obtener brotes.

Los brotes obtenidos se seccionaron en piezas de 1 cm de longitud incluyendo las puntas. Las secciones se lavaron con detergente y se enjuagaron en agua tres veces. Se llevaron a una campana de flujo laminar y se colocaron en alcohol a 70 % durante 30 segundos, para transferirse luego a una solución a base de Tween-20 a 10 % durante 20 minutos. Las secciones se lavaron tres veces en agua destilada estéril y se propagaron en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con GA<sub>3</sub>. Después de cada cuatro semanas, explantes nodales se prepararon para propagar en masa a los cultivares de papa. Explantes de cuatro a seis semanas de edad se utilizaron en los experimentos de transformación.

Explantes de hoja, nudos y entrenudos se usaron para Cambray Rosa Morelos, mientras que para Alpha se usó nudos y entrenudos como explantes (Cuadro 1). Combinaciones de dos tipos de medios se usaron para Cambray Rosa Morelos, mientras que para Alpha se utilizó una sola combinación, generándose un total de cinco tratamientos.

Cuadro 1. Cultivares, explantes y medios de cultivo utilizados para la transformación de plantas de papa.

<b>Cultivar</b>	<b>Explante</b>	<b>Medio para inducir formación de callos</b>	<b>Medio para regenerar brotes</b>
<b>Cambray Rosa Morelos</b>	Hoja	4mgL <sup>-1</sup> BAP + 1mgL <sup>-1</sup> NAA	2mgL <sup>-1</sup> BAP + 5mgL <sup>-1</sup> GA3
	Nudo	4mgL <sup>-1</sup> BAP + 1mgL <sup>-1</sup> NAA	4mgL <sup>-1</sup> BAP + 1mgL <sup>-1</sup> IAA
	Entrenudo	4mgL <sup>-1</sup> BAP + 1mgL <sup>-1</sup> NAA	4mgL <sup>-1</sup> BAP + 1mgL <sup>-1</sup> IAA
<b>Alpha</b>	Nudo	2.25mgL <sup>-1</sup> BAP + 1.86mgL <sup>-1</sup> NAA + 10mgL <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>	4mgL <sup>-1</sup> BAP + 1mgL <sup>-1</sup> IAA
	Entrenudo	2.25mgL <sup>-1</sup> BAP + 1.86mgL <sup>-1</sup> NAA + 10mgL <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub>	4mgL <sup>-1</sup> BAP + 1mgL <sup>-1</sup> IAA

Todas las plantas cultivadas *in vitro* crecieron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se adicionó las diferentes combinaciones de hormonas mas 30g L<sup>-1</sup> de sacarosa y agar a 7g L<sup>-1</sup>. El pH se ajustó a 5.8 antes de esterilizar el medio en una autoclave a 121°C y 15 lb psi por 15 min. Las plantas cultivadas *in vitro* se incubaron a 26 °C y 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

### **Crecimiento de *Agrobacterium***

*Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 almacenada en glicerol fue estriada en una caja de petri conteniendo medio YM sólido (extracto de levadura 0.4g, manitol 10.0g, NaCl 0.1g, MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0.2g and K<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>. 3H<sub>2</sub>O 0.5g en un litro de agua) a pH 7.0. Se adicionó 100mg L<sup>-1</sup> de estreptomicina y 50mg L<sup>-1</sup> de kanamycina para seleccionar colonias de *Agrobacterium* que portaban la construcción usada en el presente trabajo.

### **Transformación de *Agrobacterium***

Se colocó una mezcla de células de *Agrobacterium* (20 µL) y el plásmido pBI121 (1 ng/µL) en una cuveta estéril y se aplicó una corriente eléctrica de 2000kV durante 200 milisegundos. Luego, se adicionó 1 mL de medio YM. Se tomó 200µL de la solución bacteriana y se difundió con una asa de vidrio en una caja de petri conteniendo medio YM sólido. Las *Agrobacterium* transformadas se cultivaron durante 2-3 días en oscuridad a 28 °C. Las colonias de *Agrobacterium* transformadas se tomaron con un palillo estéril y se depositaron en 5 mL de un

medio YM con antibióticos. Las *Agrobacterium* se crecieron durante dos días en oscuridad a 28 °C.

### **Transformación de plantas**

Los explantes se colocaron en un medio de pretratamiento durante tres días bajo un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Luego, los explantes se inocularon en una suspensión bacteriana con acetosyringona a 100 uM con una dilución de 1:10 por 30 min. Posteriormente, los explantes se co-cultivaron en medio de inducción de callos en oscuridad y a temperatura ambiente por 2 días. Los explantes se lavaron dos veces en agua destilada estéril antes de incubarlos en agua destilada estéril conteniendo 500 mgL<sup>-1</sup> de cefotaxima por 30 min. Los explantes se secaron sobre papel filtro estéril y se cultivaron en medio de inducción de callos conteniendo 300 mgL<sup>-1</sup> de cefotaxima para eliminar a *Agrobacterium*. Los explantes se cultivaron sobre este medio durante 7 días antes de transferirlos a un medio de inducción de callos selectivo conteniendo 300 mgL<sup>-1</sup> de cefotaxima y 50 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina. Después de dos semanas en medio de inducción de callos selectivo, los explantes se transfirieron a un medio de regeneración de brotes selectivo. Los brotes formados con una longitud de 1-2 cm se colocaron en un medio de enraizamiento sin reguladores de crecimiento pero con 300 mgL<sup>-1</sup> de cefatoxima y 50 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina. Las plántulas transformadas se seleccionaron para posteriores análisis de combinaciones de tratamientos y explantes que mostraron una tasa promisoria de regeneración de brotes para cada cultivar. Treinta plántulas enraizadas de cada cultivar se sometieron luego al ensayo histoquímico de GUS y análisis de PCR.

## **Ensayo histoquímico de actividad de la $\beta$ -Glucuronidasa (GUS)**

El ensayo histoquímico para la detección visual de la expresión del gen GUS se realizó para 30 plantas regeneradas obtenidas de explantes transformados de cada cultivar de acuerdo con Jefferson (1987). El análisis histoquímico se hizo utilizando hojas de brotes resistentes a kanamicina y regenerados en medio selectivo. El análisis se llevó a cabo incubando las hojas en amortiguador-sustrato para GUS a 37 °C por 24 h. El amortiguador-sustrato GUS consistió de X-Gluc (1mM), ferricianuro de potasio (5mM), amortiguador fosfato de sodio (100mM), pH 7.0, y Tritón X-100 (0.1%). Luego, las hojas se sumergieron en una solución a base de metanol: acetona 3:1 para eliminar la clorofila y facilitar la observación de la expresión del gen GUS. Las hojas de plantas transformadas mostraron una coloración azul, lo que indicó integración estable del gen GUS y se registraron como GUS positivas. Finalmente, las hojas se preservaron en una solución de glicerol: agua, 1:1.

## **Análisis PCR**

ADN genómico se purificó de 30 posibles plantas transformadas de acuerdo a Dellaporta *et al.* (1983). La presencia del gen *nptII* transferido se confirmó mediante un análisis PCR usando iniciadores específicos (5'-ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGG-3' y 5'-GAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATA-3'), que delimitan a un fragmento de 800-bp de la región codificadora de *nptII*. Las condiciones empleadas para su amplificación fueron: 35 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 30 s y 72 °C por 45 s.

El análisis de los productos de PCR se hizo en geles de agarosa siguiendo procedimientos establecidos (Sambrook *et al.*, 1989).

### **Análisis estadístico de los datos**

Se usó 100 plantas por tratamiento, mismas que se distribuyeron colocando 10 por caja de petri y los tratamientos se repitieron tres veces. Se registró información en porcentaje para las variables inducción de callos y regeneración de brotes. Los promedios se compararon usando una prueba de Tukey con el procedimiento de modelo lineal general ( $\alpha = 0.05$ ) de SAS (SAS Inst., Inc., 2002).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Regeneración de brotes**

Un sistema en dos pasos se estableció previamente (datos no mostrados) para regenerar brotes de los cultivares estudiados. Explantes que mostraron alta tasa de regeneración de brotes se seleccionaron para usarlos en los experimentos de transformación.

### **Transformación**

La inducción de callos se observó luego de 3 a 7 días de cultivo y fue significativamente diferente de los controles positivos sin transformación y selección (Figura 2, Cuadro 2). Entre los tratamientos, el que mostró la más alta inducción de callos (78.66) fue observado para Cambray Rosa Morelos usando nudos como explantes. Esto no fue significativamente diferente de la inducción de

callos usando explantes de hoja. La mejor respuesta de inducción de callos para Alpha (60.67) se observó utilizando nudos como explante. La regeneración de brotes también fue significativamente diferente de los controles positivos (Figura 2, Cuadro 2). El porcentaje más alto de regeneración de brotes (67.00 %) se obtuvo con el cultivar Cambray Rosa Morelos usando nudos como explantes. También, los nudos regeneraron el mayor número de brotes (40.00 %) usando el cultivar Alpha. En lo referente al uso de hojas como explantes, el número de brotes por explante no fue significativamente diferente de los controles positivos (Cuadro 2). Los tratamientos no mostraron influencia significativa sobre el número de días a regeneración de brotes. El número de días a regeneración de brotes no fue significativamente diferente de los controles positivos (Cuadro 2). Protocolos de transformación se han reportado para influenciar las habilidades de regeneración de explantes en papa (Cingel *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2007; Chakravarty *et al.*, 2010). Se ha reportado que los productos químicos y procedimientos usados en los protocolos de transformación de plantas pueden tener efectos tóxicos sobre los tejidos vegetales (Chakravarty *et al.*, 2010; Miki y McHugh, 2004). Esto puede ser la razón del porque existen diferencias significativas para inducción de callos y regeneración de brotes entre el control positivo y los tratamientos.

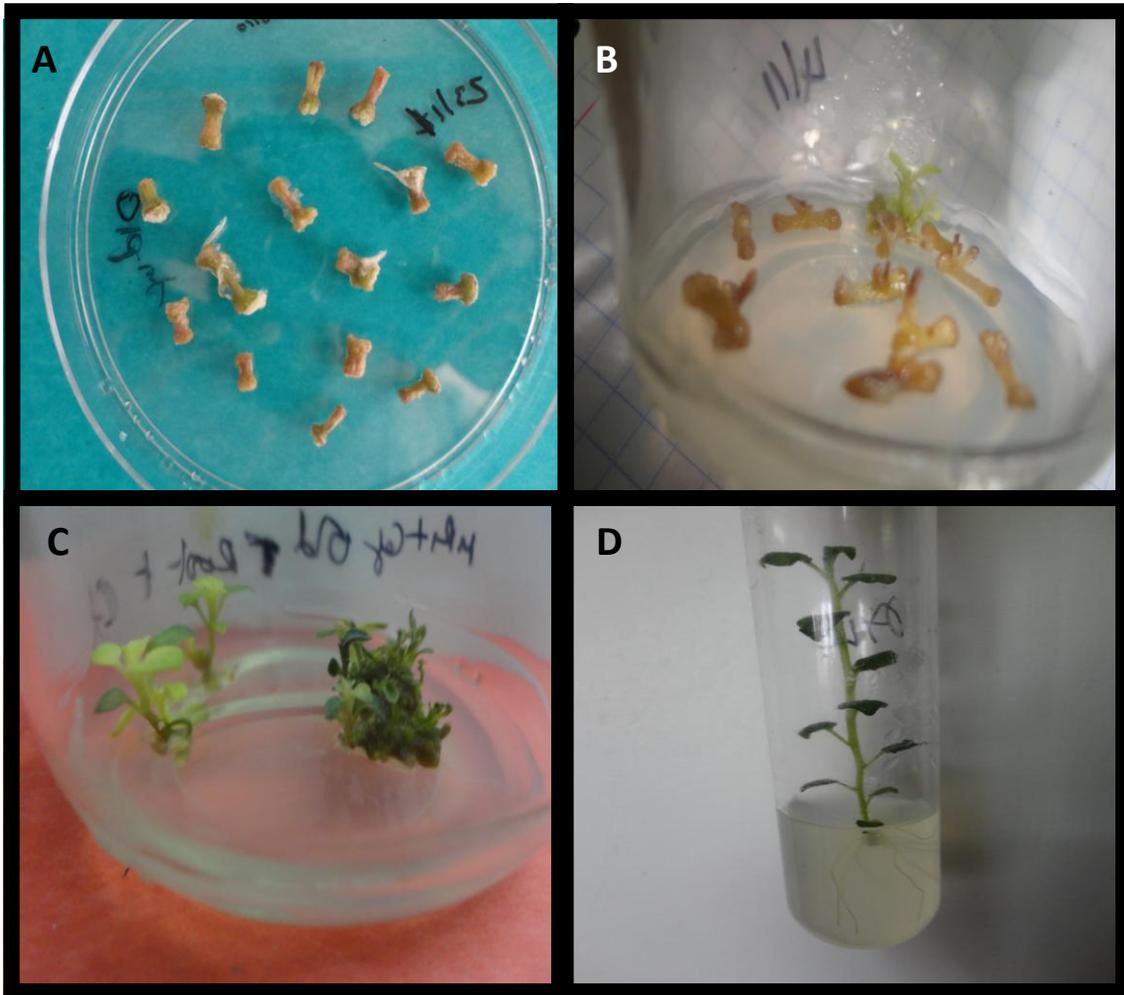


Figura 2. Inducción de callos a partir de entrenudos en medio de selección (A). Regeneración de brotes en medio selectivo con kanamicina (B and C). Planta transgènica de papa en medio de enraizamiento (D).

Varios autores han reportado mejores tasas de regeneración a partir de tallos como explantes comparado a usar hojas (Shin *et al.*, 2011; Chakravarty *et al.*, 2010). En contraste, Cingel *et al.* (2010) reportaron altos porcentajes de regeneración de brotes a partir de explantes de hojas transformados de dos

cultivares de papa Serbios. Probablemente, mejores resultados se pueden adquirir mediante la optimización de los protocolos de transformación basándose en el tipo de explante. La mejor respuesta para regeneración de brotes se observó usando nudos como explantes para ambos cultivares. Al respecto, Borna *et al.* (2010) también reportó altos porcentajes de regeneración a partir de nudos. Con base en los datos registrados en el presente estudio para nudos usados como explante, se obtuvo un total de 300 plantas transformadas independientes para ambos cultivares, 220 para Cambray Rosa Morelos y 80 para Alpha.

Cuadro 2. Efecto de protocolos de transformación, tratamientos y explantes sobre características de regeneración de la papa.

Tratamientos	Cultivar	Explante	Inducción de callos (%)	Regeneración de brotes (%)	Número de brotes por explante	Número de días a regeneración
<b>*Control positivo</b>						
1	CRM	Hoja	87.66 ab	76.33 a	42.33 a	49.66 a
2	CRM	Nudos	98.00 a	69.00 a	30.67 ab	60.66 a
3	CRM	Entrenudos	69.66 bc	62.67 ab	22.00 ab	67.67 a
4	Alpha	Nudos	86.00 ab	57.33 a-c	28.67 ab	58.33 a
5	Alpha	Entrenudos	83.00 ab	44.33 b-d	17.60 b	72.33 a
<b>Tratamientos</b>						
6	CRM	Hoja	74.66 bc	34.00 de	15.33 b	50.33 a
7	CRM	Nudos	78.66 bc	67.00 a	27.30 ab	52.33 a
8	CRM	Entrenudos	62.67 cd	42.67 b-d	20.67 ab	70.00 a
9	Alpha	Nudos	60.67 cd	40.00 c-e	24.00 ab	60.67 a
10	Alpha	Entrenudos	44.00 d	21.00 e	12.6 b	70.00 a

CRM=Cambray Rosa Morelos. \*Control positivo= tratamientos usados para establecer las condiciones de inducción de callos y regeneración sin previa transformación de los explantes: 1,2,3,4,5. Tratamientos= tratamientos usados luego de la transformación de los explantes con *Agrobacterium tumefaciens*: 6,7,8,9,10. También ver combinaciones de medios en el Cuadro 1.

## Ensayo histoquímico de GUS

Treinta plantas transformadas de cada cultivar se analizaron mediante ensayo histoquímico para detectar la expresión del gen GUS. Los resultados se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Número total de plantas, número de plantas expresando el gen GUS, número de plantas que no expresaron el gen GUS y porcentaje de plantas transformadas, para cada cultivar.

<b>Cultivar</b>	<b>Número total de plantas</b>	<b>Número de plantas que expresaron GUS</b>	<b>Número de plantas que no expresaron GUS</b>	<b>% de plantas que expresaron GUS</b>
Cambray Rosa Morelos	30	25	5	83.3
Alpha	30	27	3	90.0
Controles	10	0	10	0

Las hojas de las plantas de papa que fueron transformadas con el gen GUS (plantas GUS positivas) dieron una coloración azul (Figura 3). En comparación, las hojas de plantas no transformadas fueron incoloras (Figura 3). Plantas completas también expresaron GUS (Figura 4). Borna *et al.* (2010) también demostraron expresión de GUS en hojas y explantes nodales de cultivares de papa transformados usando el ensayo histoquímico de GUS. Igualmente, Beaujean *et al.* (1998) observaron coloración azul en hojas de plantas de papa transformadas.

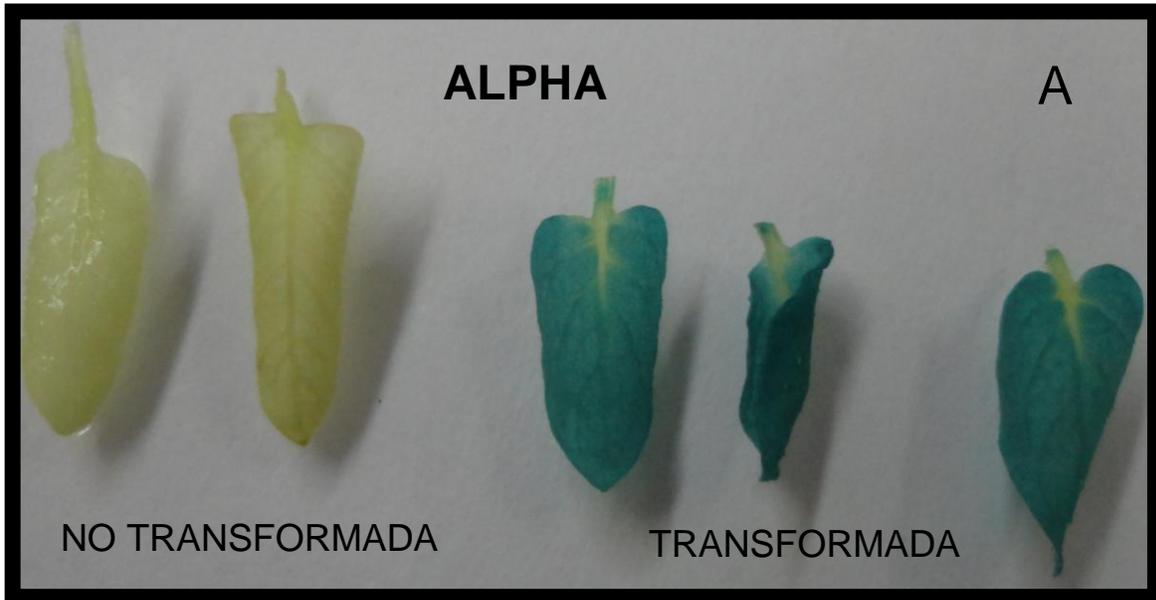


Figura 3. Localización histoquímica de la actividad de GUS (color azul) en hojas y planta de papa transformadas. A. Hojas de plantas transgénicas y no transgénicas del cultivar Alpha. B. Hojas de plantas transgénicas y no transgénicas del cultivar Cambray Rosa Morelos.



Figura 4. Planta completa de papa expresando la actividad de GUS (color azul).

### **Análisis PCR**

Brotos transgénicos fueron confirmados mediante la amplificación por PCR de un segmento del gen *nptII* integrado en el genoma de las plantas (Figura 5) utilizando cinco plantas transformadas seleccionadas al azar. Iniciadores específicos se usaron para este propósito como se indica en la sección de Materiales y Métodos. La banda de ADN amplificada se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa. Los resultados sugieren que la construcción completa, incluyendo el gen *nptII* se insertó en el genoma de la cinco plantas transformadas evaluadas. Esto, porque además de mostrar una banda de 800 pb, las plantas fueron GUS positivas.

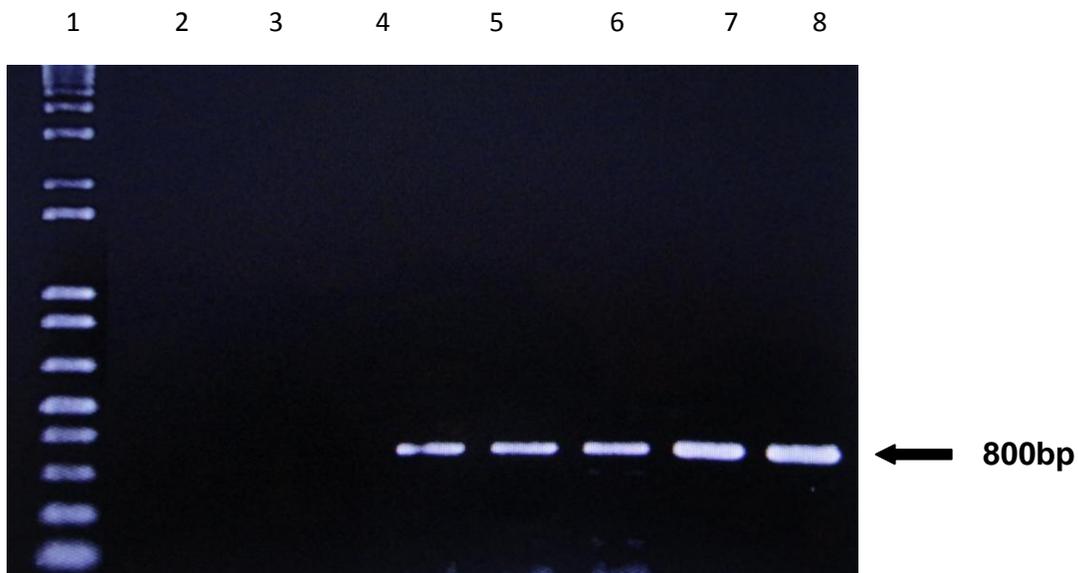


Figura 5. Amplificación por PCR de un segmento del gen *nptII* de plantas transformadas. Carril 1, marcador de peso molecular 1 kb. Carriles 2 y 3, plantas no transformadas de Cambray Rosa Morelos y Alpha, respectivamente. Carril 4-6, Cultivar Cambray Rosa Morelos transformado. Carriles 7 y 8, Alpha transformada.

En el presente estudio, las tasas de regeneración estuvieron entre 21 a 67% para los diferentes tipos explante utilizados, mientras que los porcentajes de transformación fueron de 85 a 90% entre los cultivares probados. Eficiencias de transformación semejantes a las nuestras han sido reportadas por algunos autores para otros cultivares (Beaujean *et al.*, 1998; Cingel *et al.*, 2010; Borna *et al.*, 2010; Chakravarty *et al.*, 2010). Igual que para nuestro estudio, estos investigadores usaron cultivares de la subespecie *tuberosum*. En contraste, bajas tasas de

regeneración han sido reportadas para la subespecie *andigena* (López y Chaparro, 2007; Valderama *et al.*, 2007; Trujillo *et al.*, 2001). Estos investigadores usaron un protocolo de transformación en un paso, comparado con el protocolo de transformación en dos pasos reportado en el presente estudio. En un estudio diferente donde se usó a la subespecie *andigena*, los investigadores obtuvieron alta eficiencia de regeneración y transformación usando un protocolo de regeneración en dos pasos (Banerjee *et al.*, 2006).

## CONCLUSIONES

El protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium* desarrollado en la presente investigación puede ser utilizado para obtener plantas transgénicas de papa con propósitos específicos. En este caso, el protocolo se desarrolló usando el gen reportero GUS y el marcador de selección *nptII*. Este protocolo podrá utilizarse en investigaciones futuras para transferir genes agronómicamente importantes a variedades cultivadas en México como Alpha y Cambray Rosa Morelos. Esta técnica puede ser explotada para obtener variedades de papa resistentes a enfermedades fúngicas o tolerantes a estrés ambiental.

## REFERENCIAS

Banerjee, A.K., S. Prat, Hannapel, D.J. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Science* 170:732-738.

Beaujean A, Sangwan RS, Lecardonnell A, Sangwan-Norreel BS. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *J. Exp. Bot.* 49:1589-1595.

Borna R. S., M. I. Hoque, R. H. Sarker. 2010. *Agrobacterium* mediated Genetic Transformation for Local Cultivars of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Marker Genes. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 20(2):145-155.

Chakravarty, B., G. Wang-Pruski. 2010. Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1:409-416.

Chue ML, Zhao KJ, He ZM, Ramalingam S, Fung KL. 2004. An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta* 220:717-730.

Cingel, A, V. Branka, V. D. A. Dragosavac, A. Smigocki S. Ninkovic. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of two Serbian potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cv. Dragacevka and cv. Jelica). African Journal of Biotechnology 9(30): 4644-4650.

Edwards A, Fulton DC, Hylton CM, Jobling SA, Gidley M, Rossner U, Martin C, Smith AM. 1999. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. Plant J. 17: 251-261.

FAOSTAT. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database. 13 Feb. 2007. <<http://faostat.fao.org/site/336/default.aspx>>.

Grafius, E.J., D.S. Douches. 2008. The present and future role of insect-resistant genetically modified potato cultivars. 195-221 pp. In: Integration of insect resistant genetically modified crops within IPM programmes. J. Romeis, A.M. Shelton, G.G. Kennedy (eds.) Springer Science B.V.

Gopal, J., S.M.P. Khurana. 2006. Handbook of potato production, improvement and postharvest management. The Haworth Press, Inc., 10 Alice Street, Binghamton, NY.

Hefferon KL, Khalilian H, AbouHaidar MG. 1997. Expression of the PVY (O) coat protein (CP) under the control of the PVX CP gene leader sequence: protection under greenhouse and field conditions against PVY (O) and PVY (N) infection in three potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 94:287-292.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS Fusion: -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.

Jeong MJ, Park SC, Byun MO. 2001. Improvement of salt tolerance in transgenic potato plants by glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene transfer. *Mol. Cell* 12:185-189.

López, A., A. Chaparro. 2007. Propuesta de un sistema de transformación de plantas de papa (*Solanum tuberosum* sp andigena var. Pastusa suprema) mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Colombiana* 25(1):16-25.

Lyapkova NS, Loskutova NA, Maisuryan AN. 2001. Transformed potato plants carrying the gene of the antifungal peptide of *Amaranthus caudatus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37:301-305.

Miki, B., S. McHugh. 2004. Selectable Marker Genes in Transgenic Plants: Applications, Alternatives and Biosafety. *J. Biotechnol.*107:193-232.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-479.

Naimov S, Weemen-Hendriks M, Dukiandjiev S, De Maagd RA. 2001. *Bacillus thuringiensis*-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330.

Ovchinnikova, A., E. Krylova, T. Gavrilenko, T. Smekalova, M. Zhuk, S. Knapp, D.M. Spooner. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section *petota*: *Solanaceae*). *Bot. J. Linnaean Soc.* 165:107-155.

Ross, H. 1986. Potato Breeding - Problems and Perspectives. *J. Plant Breed. Supplement.* 13:1-132.

SAS (2002) SAS/SAT User Guide version 9. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Cultivo de papa. México, D. F.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shin, D. Y., E. S. Seong, J. K. Na, J. H. Yoo, W. H. Kang, B. K. Ghimire, J. D. Lim, C. Y. Yu. 2011. Conditions for regeneration and transformation of *Solanum tuberosum* cultivars using the cotton glutathione S-transferase (Gh-5) gene. African Journal of Biotechnology 10(67):15135-15141.

Soto, N., Enriquez, GA., Ferreira, A., Corrada, M., Fuentes, A., Tiel, K. Pujol, M. 2007. Efficient transformation of potato stem segments from cv. Desiree using phosphinothricin as selection marker. Biotech. Aplicada 24:139-144.

Trujillo C, A.J. Rodriguez, S. Jaramillo , R. Hoyos , S. Orduz, R. Arango. 2001. One- step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. ssp andigena). Plant Cell Rep. 20:637-641.

Urwin PE, Troth KM, Zubko EI, Atkinson HJ. 2001. Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. Mol. Breed. 8:95-101.

Valderrama AM, N Velásquez, E. Rodríguez, A Zapata, M.A. Zaidi, I. Altosaar, R. Arango. 2007. Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Three Transgenic Andean Varieties of Potato Expressing *Bacillus thuringiensis* CryIAc protein. J. Econ. Entomol. 1:172-179.

Vinterhalter D, Zdravkovi-Kora S, Miti N, Dragjevi I, Cingel A, Raspor M, Ninkovi S. 2008. Protocols for *Agrobacterium*-mediated Transformation of Potato. In: Texeira

de Silva J. (ed.) Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology, Global Science Books, pp. 1-15.

Wierenga JM, Norris DL, Whalon ME.1996. Stage specific mortality of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on transgenic potatoes. J. Entomol. 89:1047-1052.

Wolters AMA, Janssen EM, Rozeboom-Schippers MGM, Jacobsen E, Visser RGF. 1998. Composition of endogenous alleles can influence the level of antisense inhibition of granule-bound starch synthase gene expression in tetraploid potato plants. Mol. Breed. 4:343-358.

## VII. DISCUSIÓN GENERAL

Tanto los marcadores morfológicos como los moleculares RAPD e ISSR fueron fructíferos para diferenciar entre los genotipos y cultivares de papa analizados. Sin embargo, los marcadores moleculares probaron ser mas eficientes para analizar la diversidad genética entre los cultivares estudiados.

La caracterización morfológica de las plantas es uno de los primeros pasos que se dan para cuando se inicia un programa de conservación o de mejoramiento genético. Sin embargo, los marcadores morfológicos tienen varias limitantes entre las que se encuentran, su bajo número de tal modo que no alcanzan a cubrir una parte considerable del genoma, son influenciados por el ambiente y por tanto no proporcionan estimadores consistentes, su obtención consume bastante tiempo y a largo plazo resultan caros.

Por otro lado, los marcadores moleculares son rápidos, abundantes, no son afectados por el ambiente y proporcionan estimadores consistentes de la diversidad genética. Algunas de las limitantes que presentan algunos marcadores moleculares es que son dominantes y no distinguen entre un genotipo homocigoto dominante de un heterocigoto y también pueden tener problemas de reproducibilidad. Además, los marcadores amplifican regiones del genoma que no son influenciados por factores evolutivos tales como la selección y la mutación y no están muy relacionados con caracteres fenotípicos o agromorfológicos importantes.

Protocolos de regeneración eficientes son un prerrequisito para la aplicación de técnicas de transformación de plantas. La eficiencia de regeneración fue muy dependiente del genotipo, las condiciones de cultivo y el tipo de explante utilizado. Se encontró que un protocolo de regeneración en dos pasos fue mas eficiente que el de un paso para los cultivares estudiados. Protocolos de regeneración en dos pasos se ha reportado dan resultados deseables con *Solanum tuberosum* L.

Se logró la transformación de dos cultivares de papa sembrados en México usando *Agrobacterium tumefaciens*. Transformación mediada por *Agrobacterium* ha sido demostrada por varios autores para cultivares diferentes a los nuestros, sin embargo, la respuesta a la transformación es dependiente del genotipo y también del tipo de explante utilizado. Algunos factores componentes de los protocolos de transformación, incluyendo el uso de los antibióticos usados para la selección, el tiempo de inoculación, el periodo de co-cultivación y el uso de acetosiringona pueden influir fuertemente en la regeneración y transformación de los cultivares.

Los programas de mejoramiento de especies cultivadas se verán muy beneficiados con las herramientas que ofrece la Biotecnología, mismas que pueden incrementar su eficiencia y efectividad.

## VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Tanto los marcadores morfológicos como los moleculares RAPD e ISSR fueron fructíferos para diferenciar entre los genotipos y cultivares de papa analizados. Sin embargo, los marcadores moleculares probaron ser mas eficientes para analizar la diversidad genética entre los cultivares estudiados.

La eficiencia de regeneración fue muy dependiente del genotipo, las condiciones de cultivo y el tipo de explante utilizado. Se encontró que un protocolo de regeneración en dos pasos fue mas eficiente que el de un paso para los cultivares estudiados.

Se logró la transformación de dos cultivares de papa (Alpha y Cambray Rosa Morelos) sembrados en México usando *Agrobacterium tumefaciens*.