

---

## ANÁLISIS GENÉTICO CON MARCADORES RAPD PARA LA RESISTENCIA A LA POLILLA DE LA PAPA (*Phthorimaea operculella*, Zeller), EN EL CRUCE *Solanum sparsipilum* x *Solanum phureja*

GENETIC ANALYSIS WITH RAPD MARKERS FOR POTATO TUBER MOTH RESISTANCE (*Phthorimaea operculella*, Zeller), IN *Solanum sparsipilum* x *Solanum phureja*

Luis Vivanco<sup>1</sup>

### Resumen

En este trabajo, el mejoramiento de la resistencia a la polilla del tubérculo de la papa (PTP) en variedades cultivadas de papa utilizó como fuente de resistencia el germoplasma de *Solanum sparsipilum*. El análisis genético se hizo con una población híbrida diplode  $F_1$  de 120 accesiones del cruce entre *Solanum sparsipilum*, diploide silvestre con resistencia observada a PTP, y *Solanum phureja*, diploide cultivado con susceptibilidad observada a PTP. A partir de las evaluaciones fenotípicas (antixenosis y antibiosis) en tubérculos de este cruce para la resistencia se obtuvieron tres grupos de descendientes: muy susceptible (HS), susceptible (S) y moderadamente resistente (MR).

Se utilizaron cebadores tipo RAPD para identificar marcadores de ADN asociados a la resistencia del tubérculo a PTP. Se probaron 131 cebadores en la población  $F_1$ . De éstos se usaron 77. La segregación de bandas observadas en la población  $F_1$  arrojó 58 marcadores RAPD para el alelo femenino. Diecinueve cebadores mostraron una desviación significativa de la esperada. Para el alelo masculino se localizaron 115 marcadores RAPD, 90 de los cuales no mostraron significativas distorsiones en la segregación.

Un análisis de independencia entre la segregación de los marcadores RAPD y los grupos fenotípicos de resistencia mostró quince marcadores RAPD con una relación de desequilibrio hacia los grupos fenotípicos, lo que sugiere una asociación con la resistencia a PTP. A partir de los resultados obtenidos se ordenaron tres marcadores RAPD en el mapa genético de las cromátides hembras y doce marcadores RAPD en el mapa genético de las cromátides masculinas. De éstos, dos marcadores mostraron una asociación con resistencia a PTP a nivel de antixenosis y otros trece mostraron una asociación con resistencia a PTP a nivel de antibiosis.

*Palabras clave:* papa, *Phthorimaea operculella*, resistencia, random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Solanum sparsipilum*, *Solanum phureja*, marcadores genéticos.

### Abstract

In this work, breeding for resistance to potato tuber moth (PTM) in cultivated potatoes is envisaged via germoplasm enhancement using *Solanum sparsipilum* as source of tuber resistance to PTM. A diplod population  $F_1$  of 120 hybrids has been developed to perform a genetic analysis from the offspring of a cross between a *Solanum sparsipilum* accession with tuber resistance to PTM and a cultivated diploid potato *Solanum phureja* accession with susceptibility to PTM. Phenotypic evaluations of the antixenosis and antibiosis tuber resistance to PTM have led to the grouping of the segregating population in three classes: highly susceptible (HS), susceptible (S) and moderately resistance (MR).

We have applied the RAPD technique to identify DNA markers linked to tuber resistance to PTM. Primer screening yielded 131 primers that are informative in the  $F_1$  population. We have used so far a total of 77 primers. We have scored band segregation in *Phu* x *Spl* offspring of 58 RAPD markers from the female parent. Nineteen primers deviated significantly from the expected segregation. For the male parent, we have analyzed the segregation of 115 RAPD markers. The majority, 90, did not show significant segregation distortions.

An independence analysis between RAPD markers segregation and resistance classes showed fifteen RAPD markers may be in linkage disequilibrium towards the phenotypic classes suggesting a link with PTM resistance. Then, three RPD

markers were ordered into genetic map of female chromatins and twelve RAPD markers are into genetic map from male chromatins. From these, two RAPD markers showed an association with antixenosis resistance and other thirteen markers showed an association with antibiosis resistance.

*Key words:* potato, *Phthorimaea operculella*, resistance, random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Solanum sparsipilum*, *Solanum phureja*, gene markers.

## INTRODUCCIÓN

La papa es una planta nativa de las partes más altas de los Andes (Gade, 1975) y constituye una de las principales fuentes de la alimentación mundial. En términos de preferencia dietética, la papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante del planeta (Cisneros *et al.*, 1995) y forma parte del segundo principal grupo de productos cultivados luego de los cereales (FAO, 2002). En cifras, 19.000.000 de hectáreas mundiales de tierra fértil corresponden a cultivos de papa, o sea una producción anual de 300.000.000 de toneladas métricas (FAO, 1995). Por este carácter cosmopolita, la papa es una de las plantas más expuestas a enfermedades y plagas (hay reportes de agentes patógenos para papa en casi todos los climas y regiones donde ésta es cultivada) (Uceda, 1996).

### La polilla de la papa (PTM, potato tuber moth).

Dentro del amplio espectro de patógenos, la “polilla de la papa” es el más nocivo entre los himenópteros, ya que ataca a este tubérculo tanto en el campo como en el lugar de almacenamiento (Attia, 1939). En el mundo han sido reportados cuatro tipos de polilla de la papa: *Phthorimaea operculella*, *Symmetrischema plaeseosema*, *Scrobipalpus absoluta* y *Scrobipalpus solanivora* (Nabi, 1978). De éstas, la que ha despertado el mayor interés económico y científico es *P. operculella* por dos razones principales: 1) Su amplia distribución: existen reportes de *P. operculella* en las Américas (Rocha *et al.*, 1990; Estrada y Valencia, 1988; Raman, 1988; Valencia, 1986), Asia (Islam *et al.*, 1990; Das, 1989; Raman, 1988; Lal, 1988), África (Parker y Hunt, 1989) y Europa (Ben Azoun, 1989). 2) Su particular incidencia en algunos miembros de la familia de las solanáceas: la larva de *P. operculella* ataca el follaje comiendo las hojas, brotes y yemas; en los tubérculos, horada galerías hasta hacerlos inservibles para el consumo humano (De Cristofaro *et al.*, 1999).

**Manejo integrado de plagas.** La observación de las interacciones coevolutivas insecto-planta ha mostrado que la planta desarrolla una amplia gama de mecanismos de resistencia al ataque del insecto, ya sea evitando, repeliendo, retardando o restringiendo el área de infestación y el daño inducido (Maxwell y Jennings, 1984). Entre las sustancias que están detrás de estos tipos de resistencias existen algunas inorgánicas (selenio, Se), metabolitos primarios e intermediarios (cisteína, aminoácidos aromáticos, etc.) y compuestos secundarios (alcaloides) producidos por la misma planta.

En 1984 se reportó un tipo particular de resistencia a PTP mediado por genes mayores en cuatro especies de solanáceas: *Solanum sparsipilum*, *S. commersonii*, *S. sucrense* y *S. tarijense* (Chávez, 1984). Una resistencia similar fue reportada por el doctor Iwanaga (1990) en híbridos del cruce *S. sparsipilum* x *S. phureja*. Estos datos despertaron el interés en implementar programas de fitomejoramiento mediado por la resistencia natural a PTP. A este nivel, la biología molecular ha permitido adelantar pasos significativos gracias al desarrollo de marcadores moleculares.

**Mejoramiento genético asistido.** Los marcadores moleculares, de acuerdo con el grado de variabilidad, pueden ser monomórficos (si son invariables en todos los organismos estudiados) o polimórficos (si son variables). Cuando varios de estos marcadores se asocian inequívocamente con un rasgo genético de interés se está ante un QTL (*quantitative trait loci*). La localización de QTL en el genoma es la base para la confección de mapas de ligamiento genético (Cantrell *et al.*, 2000; Tenkouano *et al.*, 1999). En la actualidad existen mapas de maíz (Burr *et al.*, 1988), arroz (Mohan *et al.*, 1997), papa y tomate (Tanksley *et al.*, 1992), entre otros.

**Marcadores tipo RAPD.** Los marcadores moleculares tipo RAPD (*random amplified polymorphic*), inicialmente desarrollados por el equipo del doctor Williams (1990), pronto se convirtieron en una de las herramientas más usadas en el fitomejoramiento (Weeden, 1992). El éxito de los RAPD radica en la versatilidad, la sencillez de protocolo (no requiere radiactividad para su visualización) y la seguridad de resultados (Mazur y Tingey, 1995). Marcadores tipo RAPD han sido usados en el fitomejoramiento de lechuga (Paran *et al.*, 1991), papa y tomate (Grandillo y Tanksley, 1996), manzana (Tartarini, 1996), eucalipto (Gaiotto *et al.*, 1997) y olivo (Hernández *et al.*, 2001), entre otros.

El objetivo de este trabajo fue identificar marcadores moleculares tipo RAPD asociados con la resistencia a PTP que puedan servir en programas de mejoramiento asistido de papa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Fuente de ADN.** Se utilizó como material de estudio una población de papa diploide (2n) segregante para el carácter de resistencia a PTP, obtenida del cruce *S. phureja* (susceptible a PTP, especie cultivada) y *S. sparsipilum* (resistente a PTP, especie silvestre). Luego de descartar los fenotipos anormales, esta progenie F<sub>1</sub> de papa se redujo de 400 a 258 genotipos, 120 de los cuales fueron seleccionados aleatoriamente para el estudio genético posterior. Esta población F<sub>1</sub> se encuentra en el banco de germoplasma del CIP-Lima in vitro en conservación y propagación, como material disponible para futuros estudios.

**Análisis fenotípico.** Se evaluaron dos tipos de resistencia a PTP en tubérculos (Iwanaga, 1990):

1. Resistencia por *antixenosis* o no preferencia (evaluación en almacén). El examen de antixenosis se desarrolló siguiendo el método de Smith (1989) en época de calor y con una duración de 120 días (con un desarrollo mínimo de cuatro generaciones de *P. operculella*).
2. Resistencia por *antibiosis* (evaluación en laboratorio). Se desarrollaron tres pruebas de laboratorio en condi-

ciones controladas de temperatura (25 a 30 °C), con una duración de veinte días tomando como método de referencia el desarrollado por Iwanaga con algunas modificaciones (Iwanaga *et al.*, 1990). Las pruebas de laboratorio evaluaron el desarrollo larval de *P. operculella* en el tubérculo.

Ambas pruebas de resistencia fueron llevadas a cabo por el Departamento de Entomología del Centro Internacional de la Papa (CIP) para los 120 genotipos elegidos de la población F<sub>1</sub>. Debido al número insuficiente de material requerido para la evaluación (número de tubérculos), se evaluaron 107 genotipos para antixenosis y 52 para antibiosis. En ambas pruebas se buscó determinar cuatro grados de resistencia: resistente (R), moderadamente resistente (MR), susceptible (S) y altamente susceptible (HS). Como controles susceptibles se usaron las variedades “Yungay”, “Revolución”, “Mariva”, “Ticahuasi”, “CCC1836.26” (*S. phureja*), y como control resistente “PI 1230502” (*S. sparsipilum*).

**Extracción del ADN.** Para la extracción del ADN de papa se siguió el método de Murray y Thompson (1980): bromuro cetil-trimetil-amonio (CTAB). La cuantificación y el control de calidad del ADN (libre de ARN) se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, usando como tampón de corrida 0.09 mM trisborato + 2 μM EDTA (TBE1X). Las bandas con bromuro de etidio fueron visualizadas por comparación con un marcador de corrida de concentración conocida (ADN del bacteriófago λ cortado con Pst1). El ADN fue almacenado a 4 °C hasta su utilización.

**Condiciones estándar de amplificación para RAPD.** Para la amplificación del ADN se siguió el protocolo utilizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Internacional de la Papa (Ghislain *et al.*, 1997), adaptación para papa del protocolo original del equipo de Williams (Williams *et al.*, 1992). Los cebadores usados fueron oligonucleótidos de diez pares de bases con secuencias al azar comprados a OPERON© Technologies, CA, USA. La amplificación fue llevada a cabo en una unidad de control térmico progra-

mable (termociclador) MJ Research modelo PTC-100™ bajo el siguiente programa de amplificación: 1) 94 °C por tres minutos; 2) 94 °C por un minuto, 35 °C por un minuto, 72 °C por dos minutos x 40 ciclos; 3) 72 °C por siete minutos.

**Corrida electroforética y visualización.** Las muestras se pusieron en geles de agarosa al 1.4%, usando como tampón de corrida TBE 1X. Las muestras fueron teñidas con bromuro de etidio (Et-Br) según la metodología descrita por Maniatis (1989). Las imágenes de los productos de amplificación se obtuvieron con una unidad Eagle Eye® II Still Video System (STRATAGENE, La Jolla, CA) y almacenadas en formato electrónico en Paint Shop Pro 4.1.

**Análisis de datos y construcción de mapas de ligamiento genético.** Se aplicó una prueba de significancia por  $\chi^2$  con un grado de libertad y un nivel de significación de 0.005 para asegurar que los marcadores usados en la construcción de los mapas de ligamiento genético presentaran una segregación mendeliana monogénica con distribución 1:1 para toda la población, con lo que se aseguró tener sólo marcadores para loci únicos, con el riesgo de no tener representado todo el genoma. Estos marcadores primero fueron agrupados por distancias de recombinación próximas y ordenados luego en las posiciones con mayor confianza según el método de análisis usado por el equipo de Lander (1987) para MAPMAKER/EXP versión 3.0. Para el agrupamiento de los marcadores se usó un LOD 5.0 y una distancia máxima de recombinación de 25 cM. Los marcadores agrupados fueron posteriormente ordenados en distancias de separación no mayores de 30 cM entre marcador y marcador.

**Asociación entre marcadores RAPD y resistencia fenotípica observada a PTP.** Se realizaron dos pruebas de independencia entre la segregación de los marcadores y el agrupamiento de los genotipos según las clases fenotípicas observadas, con el objeto de encontrar marcadores RAPD asociados con la resistencia a PTP evaluada en tubérculo: antixenosis (dos clases fenotípicas en una muestra de 52 genotipos) y antibiosis (tres

clases fenotípicas en una muestra de 107 genotipos). En estas pruebas se aplicó un  $\chi^2$  con uno y dos grados de libertad, respectivamente, y un nivel de significación de 0.05, bajo las hipótesis siguientes:

$H_0$ : la segregación es independiente del criterio de agrupamiento de los genotipos.

$H_a$ : la segregación es dependiente del criterio de agrupamiento de los genotipos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Análisis fenotípico.** Los 120 clones seleccionados al azar para el trabajo fueron evaluados tres veces en laboratorio y uno en almacén. Los resultados de estas evaluaciones mostraron que ningún híbrido resultó con un nivel de resistencia similar a *S. sparsipilum* (tabla 1). Esto podría deberse a dos razones: 1) Que la resistencia de *S. sparsipilum* estaría mediada por uno o más componentes recesivos que no se han recobrado en el híbrido  $F_1$ . Para recobrar este tipo de componentes se necesita una población  $F_2$  por retrocruce (Staub y Serquen, 1996) con *S. sparsipilum*. Sin embargo, en papa se presenta la particularidad de no existir genotipos puros para las especies en estudio por lo que siempre se debe trabajar con las  $F_1$ . 2) Que el tamaño de la muestra (120 híbridos) podría no ser suficiente para evidenciar un tipo de resistencia controlada por muchos genes (resistencia cuantitativa, QTL) y por tanto los genotipos con una resistencia similar al carácter paterno no habrían podido ser identificados.

**Análisis genético.** Se probaron 186 cebadores buscando polimorfismos entre parentales. De

**Tabla 1.** Análisis de resistencia fenotípica de la población híbrida ( $F_1$ ) del cruce *S. phureja* x *S. sparsipilum* a la acción de PTP

Resistencia fenotípica a PTP	Antixenosis	Antibiosis
Resistente (R)	0	0
Moderadamente resistente (MR)	37	12
Susceptible (S)	15	88
Altamente susceptible (HS)	0	7
Total de genotipos	52	107

ellos, 131 dieron bandas polimórficas. Estos cebadores fueron utilizados en los primeros diez genotipos (8.3% de la población total) para localizar polimorfismos segregantes. Se obtuvieron 77 cebadores con polimorfismo entre parentales y segregación de bandas en el grupo muestral. Estos cebadores fueron probados para toda la población (120 genotipos), repitiéndose una o más veces en aquellos casos en los que no se había logrado una resolución clara de bandas (figura 1). Gracias a estos experimentos se pudieron localizar 173 marcadores: 58 para las cromátides provenientes de *S. phureja* y 115 para las cromátides provenientes *S. sparsipilum*.

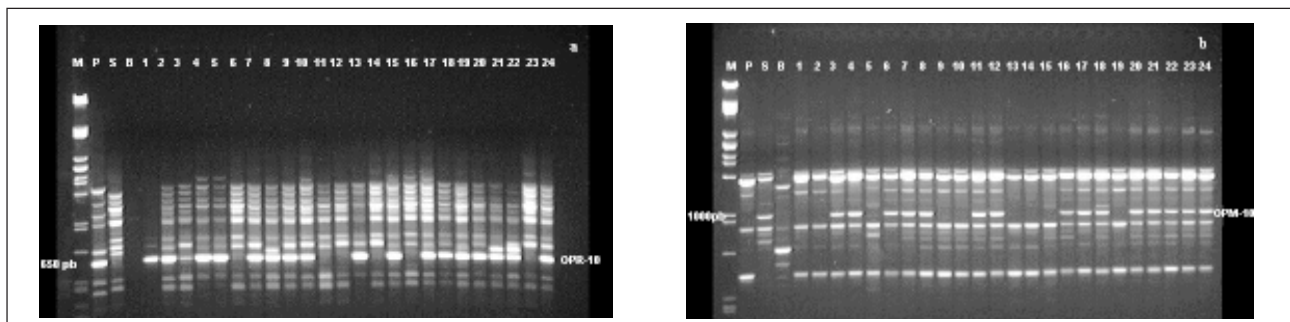
Los experimentos permitieron evidenciar además una marcada diferencia entre los índices de heterocigocidad de los dos parentales: el índice medio de heterocigocidad en las cromátides provenientes de *S. phureja* fue de 0.4005, mientras que en las cromátides provenientes de *S. sparsipilum* fue de 0.948.

La simplicidad y el bajo costo de la metodología del sistema de RAPD frente a otros procedimientos más laboriosos y caros la situó como el método más adecuado en la construcción de los mapas de ligamiento genético. Sin embargo, el carácter dominante de los marcadores RAPD trae una desventaja significativa, pues no permiten distinguir si el carácter segregante corresponde a un locus parental homocigote o heterocigote (Staub y Serquen, 1996). El polimorfismo en los marcadores RAPD se genera por el cambio de bases de los

nucleótidos en el sitio de unión al cebador, lo que puede ser visualizado por la presencia o ausencia del producto de amplificación (segregación de bandas). Así, individuos con la misma copia en los dos alelos no pueden ser diferenciados cuantitativamente de aquellos que contienen dicha copia en uno de sus alelos. Por esta razón fue necesario hacer un mapa de ligamiento independiente para cada fuente de cromátides.

**Mapas de ligamiento genético.** La prueba  $c^2$  permitió separar 44 marcadores de los 173 encontrados por RAPD. Dichos marcadores presentaron algún tipo de distorsión en su segregación para toda la población. Esta distorsión pudo ser generada por desbalance de apareamiento entre las cromátides de los progenitores, desequilibrio en la proporción de ADN, presencia de contaminantes o secuencia poco estable del cebador (Hall-eden *et al.*, 1996; Kwok y Higushi, 1989; Williams *et al.*, 1992).

Los restantes 129 marcadores sí se ajustaron al rango de confianza establecido, estando distribuidos del siguiente modo: 39 para las cromátides provenientes de la madre y 90 para las cromátides provenientes del padre. De éstos, 100 fueron ubicados en 17 grupos de ligamiento (cuatro para cromátides de *S. phureja* y trece para *S. sparsipilum*), mientras que 29 marcadores no pudieron ser agrupados por estar muy alejados en el genoma con respecto a los demás grupos de ligamiento (tabla 2); agruparlos hubiese significado perder al mismo tiempo el nivel de confianza óptimo



**Figura 1.** Amplificación RAPD para los primeros veinticuatro genotipos de la población  $F_1$  usando los cebadores OPR-10 (a) y OPM-10 (b). La primera línea corresponde al marcador de corrida (bacteriófago  $\lambda$ -Pst1), la segunda y la tercera a los parentales *S. phureja* y *S. sparsipilum* respectivamente; la cuarta es un control negativo

**Tabla 2.** Marcadores RAPD con segregación dependiente a los grupos fenotípicamente resistentes a PTP en la población híbrida (F<sub>1</sub>)

Mapa genético	Marcador RAPD	Secuencia del cebador	Tamaño (pb*)	Grupo de ligamiento	Clase fenotípica a la que está asociado
<i>S. phureja</i>	S15.800	CAGTTCACGG	800	1	Antixenosis: almacén
	B15.500	GGAGGGTGT	500	3	Antibiosis: laboratorio
	R5.1500	GGACAACGAG	1.500	3	
	Z3.800	CAGCACCGCA	800		
	Z10.550	CCGACAAACC	550		
	Y7.450	AGAGCCGTCA	450		
	S6.950	GATACCTCGG	950		
	R7.850	ACTGGCCTGA	850	Ninguno	
	R5.650	GACCTAGTGG	650		
	R5.650	GACCTAGTGG	650		
	M8.600	TCTGTTCCCC	600		
	M18.750	CACCATCCGT	750		
	G6.950	GTGCCTAACC	950		
	G13.300	CTCTCCGCCA	300		
<i>S. sparsipilum</i>	B5.650	TGCGCCCTTC	650	7	Antixenosis: almacén
	B8.500	GTCCACACGG	500	3	Antibiosis: laboratorio
	F10.800	GGAAGCTTGG	800	3	
	F10.950	GGAAGCTTGG	950	3	
	H12.700	ACGCGCATGT	700	7	
	D20.500	ACCCGGTCAC	500	7	
	Y18.500	GTGGAGTCAG	500	7	
	K19.400	CACAGGCGGA	400	7	
	B5.650	TGCGCCCTTC	650	7	
	L12.1050	GGGCGGTACT	1.050	9	
	F10.800	GGAAGCTTGG	800	9	
	I18.450	TGCCAGCCT	450	12	
	Z11.800	CTCAGTCGCA	800		
	Y5.1200	GGCTGCGACA	1.200		
	S8.550	TTCAGGGTGG	550		
	S18.600	CTGGCGAACT	600		
	S18.650	CTGGCGAACT	650		
	S15.700	CAGTTCACGG	700		
	R17.1200	CCGTACGTAG	1.200		
	M18.500	CACCATCCGT	500	Ninguno	
	M18.500	CACCATCCGT	500		
	M14.800	AGGGTCGTTC	800		
	I12.550	AGAGGGCACA	550		
	G5.1050	CTGAGACGGA	1.050		
	D20.1200	ACCCGGTCAC	1.200		
	B6.800	TGCTTGCCC	800		
	B19.750	ACCCCGAAG	750		
	B16.800	TTGCCCCGGA	800		
	B8.1100	GTCCACACGG	1.100		

\*pb = pares de bases.

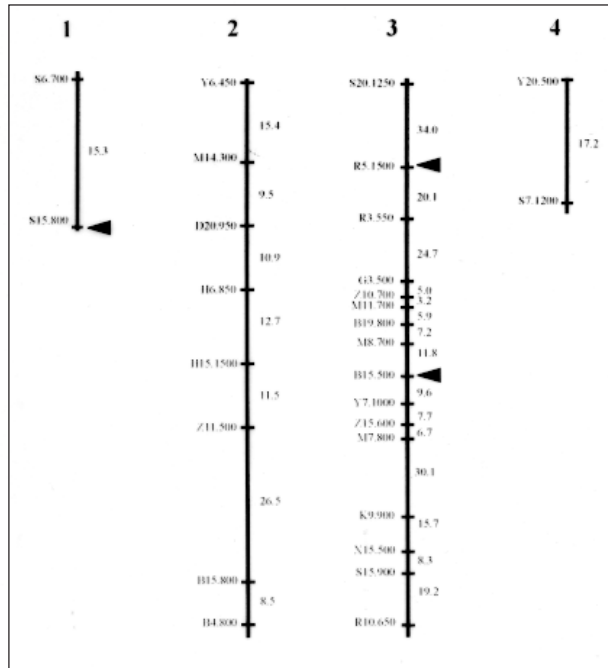


Figura 2. Mapa de ligamiento genético para las cromátides provenientes de *S. phureja*. Las flechas indican los marcadores que presentaron asociación con un tipo de resistencia fenotípica (antixenosis o antibiosis)

dato por el valor LOD. Con estos marcadores se construyeron dos mapas de ligamiento genético con una cobertura media de 336.7 cM para las cromátides maternas (figura 2) y 621.7 cM para las cromátides paternas (figura 3). En comparación con otros mapas de papa (Tanksley *et al.*, 1992; Jacobs *et al.*, 1995), esta cobertura correspondería al 25% del total del genoma para las cromátides maternas y 50% para las cromátides paternas. Sin embargo, dado que se trabajó con una población diploide, lo más importante era encontrar marcadores asociados con la resistencia a PTP antes que la construcción de un mapa completo de papa. Para alcanzar este objetivo se hizo una evaluación a otro nivel.

**Asociación entre marcadores RAPD y resistencia fenotípica observada a PTP.** Las dos pruebas de independencia permitieron localizar marcadores que a pesar de manifestar una segregación 1:1 en la población completa presentaban una distorsión significativa en la segregación genética para los grupos fenotípicos con resistencia

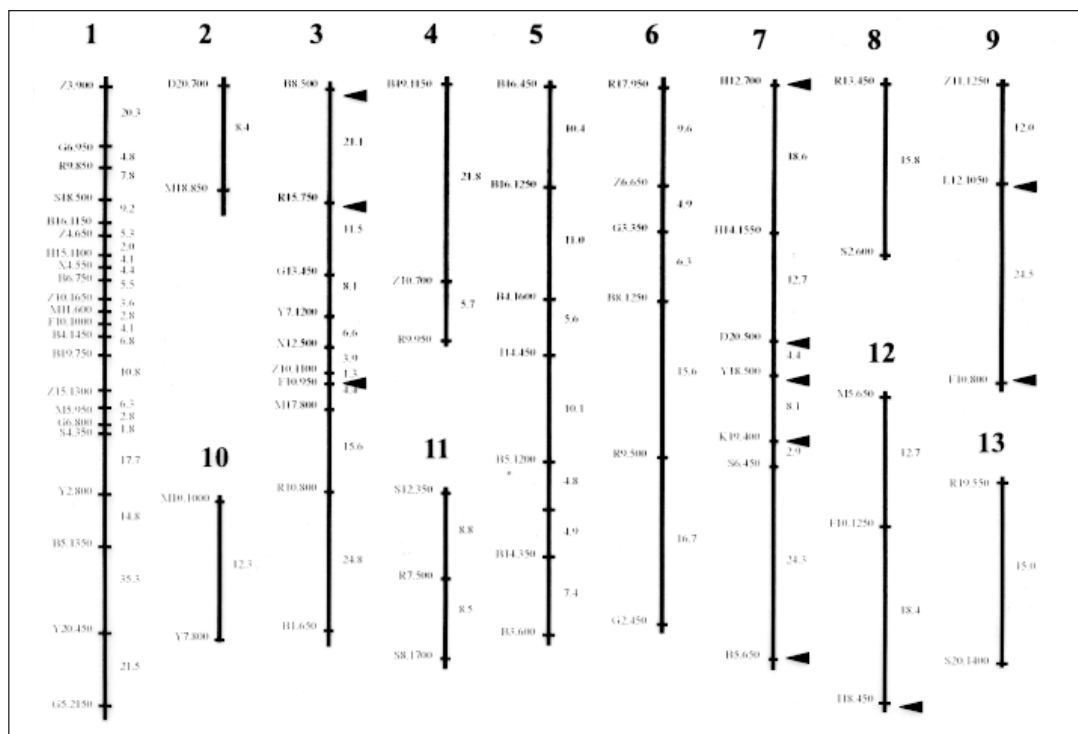


Figura 3. Mapa de ligamiento genético para las cromátides provenientes de *S. sparsipilum*. Las flechas indican los marcadores que presentaron asociación con un tipo de resistencia fenotípica (antixenosis o antibiosis)

a PTP en tubérculo. Quince marcadores de este tipo fueron asociados a alguno de los dos tipos de resistencia fenotípica observada: dos a antixenosis y trece a antibiosis. Estos resultados sugieren que la antibiosis pudiera ser el mayor mecanismo de resistencia a PTP en tubérculo, ratificando los resultados encontrados en un estudio previo para *S. sparsipilum* (Iwanaga *et al.*, 1990).

Los gráficos de los mapas de ligamiento muestran la posición y la resistencia a la que están asociados estos marcadores. De todos ellos uno se destaca en importancia al estar asociado a los dos tipos de resistencia (marcador RAPD: B5.650). Por otro lado, no todos los marcadores asociados a la resistencia fenotípica han podido ser localizados en los grupos de ligamiento como se puede ver en los gráficos (tabla 2).

## CONCLUSIONES

Los híbridos diploides evaluados de la población F<sub>1</sub> no mostraron, a nivel fenotípico, un grado de resistencia similar a *S. sparsipilum* (clon PI 1230502). A nivel genotípico, los dos mapas genéticos parciales del genoma de papa –construidos sobre un total de 100 marcadores RAPD y con una cobertura genómica del 25% para la cromátide materna y 50% para la cromátide paterna– permitieron localizar marcadores moleculares asociados a la resistencia a PTP provenientes tanto del padre como de la madre, sugiriendo la presencia de alelos de *S. phureja* que contribuyen a

la resistencia a PTP en combinación con los de *S. sparsipilum*. Finalmente, la existencia de caracteres asociados a una resistencia poligénica a PTP en especies de valor comercial, pero fenotípicamente susceptibles, abre nuevas posibilidades en futuros programas de fitomejoramiento.

## Sugerencias

Con base en los resultados obtenidos, se recomienda una evaluación de la resistencia a PTP para una población más amplia, la búsqueda de más marcadores moleculares, la ubicación de nuevos grupos de ligamiento en el mapa genético de la papa y un mapeo completo del genoma de papa. Estos datos permitirían confirmar la asociación de estos marcadores con la resistencia en otros cruzamientos. Ante la posible existencia de componentes recesivos asociados con la resistencia observada según los resultados obtenidos, se sugiere además hacer un retrocruce con *S. sparsipilum*, en el que estos alelos puedan obtenerse en una población F<sub>2</sub>.

## AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial al doctor Marc Ghislain, a Ana Hurtado y a Luis Ñopo, por su permanente apoyo y dedicación. Al Centro Internacional de la Papa (CIP) por el financiamiento y desarrollo del presente trabajo, de manera particular al Departamento de Recursos Genéticos. A los doctores Alí Golmirzaie, Meredith Bonierbale y Dapeng Zhang. Que Dios los bendiga a cada uno de ustedes. Gracias.

## REFERENCIAS

- Attia R.** 1939. Some notes on the PTM *Phthorimaea operculella* (Zeller). Egypt Ministry of agriculture-Technical and Scientific Service Bulletin 216:136.
- Ben Azoun A.** 1989. Evaluation des dégats de la teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* Zell dans la région du Souss. Centre Technique de Cooperation Agricole et Rurale, Bruxelles.
- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertson MC, Stuber CW.** 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize *Genetics* 118:519-526.
- Cantrell R, Ulloa M, Percy G, Zeiger E, Lu Z.** 2000. QTL analysis of stomatal conductance and relationship to limit yield in an interspecific cotton. *J Cott Sci* 4:10-18.
- Cisneros F, Alcázar J, Palacios M, Ortiz O.** 1995. A strategy for developing and implementing integrated pest management. *CIP Circular* 21(3):2-7.
- Chávez R.** 1984. The use of wide crosses in potato breeding. University of Birmingham, England, thesis for the degree of Doctor of Philosophy.
- Das GP.** 1989. Development of an integrated pest management strategy for the control of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) in storage. University of the Philippines, Los Banos, thesis for the degree of Doctor of Philosophy.
- De Cristofaro A, Fonzo F, Anfora G, Arnone S, Cristofaro M.** 1999. Electrophysiological and olfactometric responses of



- Phthorimaea operculella* (Zeller) adults to volatile potato semichemicals. In: EAPR (eds.). *Proceedings of 14<sup>th</sup> Triennial Conference of the European Association for Potato Research*, EAPR'99, Sorrento, pp.217-218.
- Estrada RN, Valencia L.** 1988. Desarrollo de cultivares de papa resistentes a la palomilla *Phthorimaea operculella* (Zeller) en Colombia. *Rev Latinoam Papa* 1(1):64-73.
- FAO.** 1995. *Anuario 1995: producción mundial*. Dirección de Información de la FAO, Roma.
- FAO.** 2002. *Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030*. Dirección de Información de la FAO, Roma.
- Gade DW.** 1975. Plants, man and the land in the Vilcanota valley of Peru. *The Hague, Junk*.
- Gaiotto FA, Bramucci M, Grattapaglia D.** 1997. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 95(5/6):842-849.
- Ghislain M, Dapeng Z, Herrera MR.** 1997. *Protocolos de laboratorio de biología molecular. Tipificación genética*. Departamento de Recursos Genéticos, Manual de Capacitación CIP, Lima.
- Grandillo S, Tanksley SD.** 1996. Genetic analysis of RFLP, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92(8):957-965.
- Hallden C, Hansen M, Nilsson NO, Hjerdin A, Säll T.** 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 93(8):1.185-1.192.
- Hernández P, De la Rosa R, Rallo L, Dorado G, Martín A.** 2001. Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theor Appl Genet* 103(5):788-791.
- Islam MN, Karim MA, Nessa Z.** 1990. Control of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) in the storehouses for seed and ware potatoes in Bangladesh. *Bangladesh J Zool* 18(1):41-52.
- Iwanaga M, Ortiz R, Raman KV, Palacios M.** 1990. Breeding for resistance to PTM, *Phthorimaea operculella* (Zeller) in diploid potatoes. *Euphytica* 50:119-125.
- Jacobs JME, Eck HJ, Van Arens P, Verkerk-Bakker B, Lintel Hekkert B, Te Bastiaanssen HJM, El-Kharbotly A, Pereira A, Jacobsen E, Stiekema WJ.** 1995. A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theor Appl Genet* 91(2):289-300.
- Kwok S, Higuchi R.** 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339(5):237-238.
- Lal L.** 1988. Potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), in North-Eastern Hills region and a simple method for its control. *Indian J Agricult Sci* 58(2):130-132.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L.** 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Maxwell FG, Jennings PR.** 1984. *Mejoramiento de plantas resistentes a insectos*. Limusa, México.
- Mazur JB, Tingey S.** 1995. Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. *Curr Opinion Biotechnol* 6:175-182.
- Mohan M, Sathyanarayanan PV, Kumar A, Srivastava, Nair S.** 1997. Molecular mapping of a resistance-specific PCR-based marker linked to a gall midge resistance gene (*Gm4t*) in rice. *Theor Appl Genet* 95(5/6):777-782.
- Murray M, Thompson WF.** 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc Acids Res* 8:4.321-4.325.
- Nabi MN.** 1978. Some aspects of the reproductive biology and chemosterilisation of the potato tuber moth. University of Canterbury, Canterbury, thesis for degree of Doctor of Philosophy.
- Paran I, Kesseli R, Michelmore RW.** 1991. Identification of restriction-fragment-length-polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome* 34:1.021-1.027.
- Parker BL, Hunt GLT.** 1989. *Phthorimaea operculella* (Zeller), the potato tuber moth: New locality records for East Africa. *Am Potato J* 66(9):583-586.
- Raman KV.** 1988. Control of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* with sex pheromones in Peru. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 21:85-99.
- Rocha R, Byerly KF, Bujanos R, Villareal M.** 1990. *Manejo integrado de la palomilla de la papa Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el Bajío, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Guanajuato.
- Smith CM.** 1989. *Plant resistance to insects*. John Wilwy & Sons, 286 p.
- Staub JE, Serquen F.** 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort Sci* 31(5):729-741.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W, Young ND.** 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1.141-1.160.
- Tartarini S.** 1996. RAPD markers linked to the *Vf* gene for scab resistance in apple. *Theor Appl Genet* 92(7):803-810.
- Tenkouano A, Crouch JH, Crouch HK, Vuylsteke D, Ortiz R.** 1999. Comparison of DNA marker and pedigree-based methods of genetic analysis of plantain and banana (*Musa* spp.) clones. I. Estimation of genetic relationships. *Theor Appl Genet* 98(1):62-68.
- Uceda E.** 1996. *Principales plagas y enfermedades de la papa en la sierra del Perú*. SENASA, Lima.
- Valencia L.** 1986. Las palomillas de la papa (Lepidoptera-Gelechiidae): identificación, distribución y control. *Memorias del Curso sobre MIP*, Bogotá.
- Weeden NF.** 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: Crop Science Society of América, American Society for Horticultural Science, American Genetic Association (eds.). *Applications of RAPD technology to plant breeding: proceedings of the symposium*. Minneapolis, CPSA-ASHS-AGA, pp.12-17.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc Acids Res* 18(22):6.531-6.535.
- Williams JGK, Rafalski JA, Tingey SV.** 1992. Genetic analysis using RAPD markers. In: Wu R (ed.). *Methods in enzymology*, Orlando, Academic Press, vol. 218, pp. 704-740.

