

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CARACTERIZACION DE GERMOPLASMA
SOBRESALIENTE DE PAPA *Solanum tuberosum*
L. EN MEXICO MEDIANTE RAPD Y SSR**

POR:

M. EN C. FERMIN ORONA CASTRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO.
DICIEMBRE DE 2004**

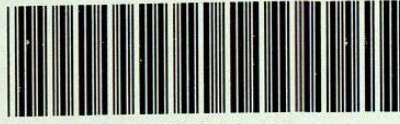
TD

Z532

FCB

2004

.07



1020150219

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CARACTERIZACION DE GERMOPLASMA
SOBRESALIENTE DE PAPA *Solanum tuberosum*
L. EN MEXICO MEDIANTE RAPD Y SSR**

POR:

M. EN C. FERMIN ORONA CASTRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO.
DICIEMBRE DE 2004**

m

988053

TD
Z5320
FCB
2004
.07



FONDO
TESIS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CARACTERIZACION DE GERMOPLASMA
SOBRESALIENTE DE PAPA *Solanum tuberosum* L. EN
MEXICO MEDIANTE RAPD Y SSR**

POR:

M. en C. FERMIN ORONA CASTRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGIA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CARACTERIZACION DE GERMOPLASMA SOBRESALIENTE DE PAPA
Solanum tuberosum L. EN MEXICO MEDIANTE RAPD Y SSR**

POR:

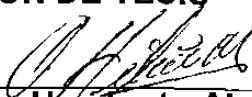
M. en C. FERMIN ORONA CASTRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**


COMISIÓN DE APROBACION DE TESIS




Dr. Mario Alberto Rocha Peña
Director de Tesis Interno




Dr. Isidro Humberto Almeyda León
Director de Tesis Externo



Dr. Víctor Pecina Quintero
Co-Director de Tesis Externo



Dr. Benito Pereyra Alférez
Asesor



Dr. Carlos E. Hernández Luna
Asesor

San Nicolás de los Garza, N.L., México

Diciembre de 2004

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CARACTERIZACION DE GERMOPLASMA SOBRESALIENTE DE
PAPA *Solanum tuberosum* L. EN MEXICO MEDIANTE RAPD Y
SSR**

POR:

M. en C. FERMIN ORONA CASTRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

COMISIÓN DE EXAMEN

Dr. MARIO ALBERTO ROCHA PEÑA
Presidente

DR. CARLOS E. HERNANDEZ LUNA
Secretario

DR. BENITO PEREYRA ALFEREZ
Vocal

DRA. MARIA JULIA VERDE STAR
Vocal

DR. ISIDRO H. ALMEYDA LEON
Vocal

San Nicolás de los Garza, N.L., México

Diciembre de 2004

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	viii
Lista de reactivos químicos utilizados	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
HIPOTESIS.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1.- Antecedentes.....	6
2.1.1.- Aspectos botánicos.....	6
2.1.2.- Valor alimenticio.....	7
2.1.3.- Ubicación Taxonómica del Cultivo.....	7
2.1.4.- Origen del Cultivo.....	8
2.2.- Marcadores Moleculares.....	9
2.2.1.- DNA Polimórfico Amplificado al Azar	
(RAPD).....	12
2.2.2.- Secuencias Simples Repetidas (SSR) o Microsatélites.....	16

2.2.2.1.- Aplicaciones de los microsátélites.....	21
2.2.2.1.1.- Genética Agrícola y Mejoramiento de Plantas.....	21
2.2.3.- Respuesta del germoplasma de papa al daño causado por fitoplasmas y su relación con los análisis moleculares.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	26
3.1.- Material genético.....	26
3.2.- Extracción del DNA.....	27
3.3.- Análisis RAPD.....	28
3.3.1.- Estandarización de la técnica de RAPD.....	28
3.4.- Análisis SSR.....	29
3.4.1.- Estandarización de la técnica de SSR o microsátélites.....	29
3.5.- Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.....	32
3.6.- Relación del análisis molecular del germoplasma de papa con la respuesta al daño causado por fitoplasmas.....	32
3.6.1.- Material genético y extracción de DNA.....	32
3.7.- Análisis de datos.....	33
RESULTADOS.....	35
4.1.- Estandarización de la técnica para la extracción del DNA genómico de papa.....	35
4.2. Estandarización de la concentración de DNA e iniciadores mediante la técnica RAPD.....	35

4.3.- Estandarización de la técnica RAPD.....	36
4.4.- Caracterización del germoplasma procedente de Coahuila mediante la técnica RAPD.....	39
4.5.- Caracterización del germoplasma procedente del Estado de México mediante la técnica RAPD.....	40
4.6.- Estandarización de la técnica de SSR o Microsatélites.....	43
4.7.- Caracterización del germoplasma procedente de Coahuila mediante la técnica SSR.....	46
4.8.- Caracterización del germoplasma procedente del Estado de México mediante la técnica de SSR o Microsatélites.....	48
4.9.- Comparación de la respuesta al daño causado por fitoplasmas en campo y su relación con los análisis moleculares.....	49
4.9.1.- Pardeamiento de tubérculos.....	49
4.10.- Relaciones genéticas entre los genotipos procedentes de Coahuila.....	50
4.11.- Relaciones genéticas entre los genotipos procedentes del Estado de México.....	52
4.12.- Comparación de la utilidad de los Marcadores en el germoplasma procedente de Coahuila.....	53
4.13.- Comparación de la utilidad de los Marcadores en el germoplasma procedente del Estado de México.....	54

4.14.- Comparación de la utilidad de los marcadores con el análisis de la respuesta al daño causado por fitoplasmas y su relación con los análisis moleculares.....	55
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS.....	65
LITERATURA CITADA.....	66

DEDICATORIA

A Dios:

Ser todopoderoso que me dio la oportunidad de estar de paso en esta vida para lograr algo importante

A mi Esposa:

Beatriz Eugenia Navarrete:

Que con su apoyo, amor y comprensión supo motivarme en los momentos difíciles y hoy ve realizada esta meta importante de nuestras vidas

A mis hijos:

María Magdalena, Sergio Fermín y Karla Beatriz

Tres luceros en la vida que dios me dio para motivarme a seguir adelante y superarme en la vida

A mis Padres:

Ramón Orona y Sanjuana Castro

Que con su esfuerzo, cariño y sacrificio hoy ven realizada una etapa más en mi formación profesional

A mis hermanos:

Rosa Elía, Víctor, Eugenio, Enedina, Ramón, Alejandro, Magdalena e Ignacio

Por su confianza, cariño y gran afecto

A mis sobrinos

Diana, Laura, Octavio, Roxana, Josefina, Víctor Hugo, Mayra, Eugenio, Ana María, María Luisa, Edgar, Julio, Guadalupe, Alejandra, Paulina, Berenice, Ramón, Jesús Alejandro, Gema, Giovanni, Guadalupe, y Daniel.

Por su amor y cariño

A la memoria de mis abuelas

María Ignacia y Magdalena

Quienes me brindaran un gran apoyo en mi formación profesional y con su apoyo y cariño me impulsaran a terminar una profesión.

A mis abuelos:

Pascual Ibarra y Gerardo Castro
Quienes depositaron su cariño, apoyo y confianza y hoy ven concluido el fruto de
sus enseñanzas.

A mis tíos:

Por su apoyo y cariño

A mi Alma Terra Mater

Universidad Autónoma de Nuevo León
Por brindarme la oportunidad de continuar mi formación Doctoral en su Facultad
Ciencias Biológicas

A quienes me brindaron su apoyo incondicional en todo momento:

A mis Compadres:

Isidro Humberto Almeyda y Manuela del Jesús Carvajal de León
Por su gran apoyo al inicio de mis estudios.

Especialmente a mi hermano y compadre:

Ramón Orona y Laura Melina
Por su gran apoyo en los momentos difíciles de mi estancia en el postgrado.

A mis compañeros, Maestros y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico y las facilidades que me brindaron para realizar mi formación de Doctorado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias que con su apoyo técnico y económico me impulsó a superarme en mi formación profesional.

A la División de Estudios de Postgraduados de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de capacitación.

Al Dr. Mario Alberto Rocha Peña, por aceptar dirigir mi trabajo de tesis y brindarme la oportunidad de ser miembro de su equipo de trabajo.

Al Dr. Isidro Humberto Almeyda León por aceptar Co-Dirigir mi trabajo de tesis, por el análisis y sugerencias realizadas durante el desarrollo del trabajo de investigación así como por aceptarme como colaborador en sus proyectos de investigación.

Al Dr. Víctor Pecina Quintero por las sugerencias realizadas durante el desarrollo de la investigación, por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados, la revisión del escrito y por aceptar ser miembro de mi comité de tesis.

Al Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna por la revisión del escrito de tesis y aceptar ser miembro de mi comité de tesis y examen.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez por la revisión del escrito y por aceptar ser miembro de mi comité de tesis y de examen.

Al Dr. Octavio Martínez de la Vega por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados de investigación.

A la Dra. María Julia Verde Star por aceptar ser miembro de mi comité de examen y del comité tutorial.

Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera por aceptar ser miembro de mi comité tutorial.

A la Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas por sus consejos, amistad y apoyo de laboratorio brindado.

Al M.C. Jaime Piña Razo por su gran amistad y apoyo brindado para que pudiera realizar mis estudios de Doctorado.

Al M.C. Fernando Patiño Valera por el apoyo brindado para realizar mis estudios de Doctorado.

Al M.C. Jorge Cantú Vega por su amistad vertida en el transcurso de la investigación.

A los M.C. Tomas Rangel Galán y José Luís por la gran amistad y confianza que mostraron hacia mi persona durante el transcurso de mi formación Doctoral.

Al Centro de Investigación Regional del Sureste del INIFAP, por su apoyo y gestión para la autorización de poder salir a estudiar mi Doctorado.

Al Centro de Investigación Regional del Noreste del INIFAP, por las facilidades prestadas para desarrollar mi trabajo de tesis en la Unidad de Investigación en Biología Molecular y Celular INIFAP – UANL.

A mis compañeros de Laboratorio, Miguel Ángel y Susana.

A mis amigas y compañeras: Bibiana Rosales, Mónica Lozano, Marisela García y Luisa Yolanda Solís, Alberto Aguilera y Juan José Gutiérrez por su amistad incondicional.

A mis maestros de quienes recibí la enseñanza y sobretodo pusieron su confianza para poder alcanzar el grado de Doctor.

A los Doctores Roberto Montes de Oca, Carlos Eduardo Hernández Luna, Benito Pereyra Alférez y Mario Morales Vallarta, maestros a quienes reconozco su gran capacidad didáctica y su motivación brindada para poder concluir satisfactoriamente en sus cursos.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron en la culminación del trabajo de tesis.

INDICE DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página No.
1	Extracción del DNA de diferentes cultivares de papa procedente de Coahuila.....	35
2	Estandarización de la concentración de DNA e iniciador en la PCR.....	36
3	Fragmentos Amplificados en las PCR en la técnica de RAPD usando 40 iniciadores de diferente concentración Guanina-Citosina y DNA de la línea avanzada 91-9-3.....	38
4	Fragmentos amplificados en las PCR para RAPD utilizando diferentes pares de iniciadores y DNA de la Variedad Montserrat.....	39
5	Amplificación mediante la técnica RAPD, utilizando el iniciador 2 y DNA de 15 genotipos de papa procedentes de Coahuila.....	40
6	Amplificación mediante la técnica RAPD, utilizando el iniciador 31 y DNA de 15 genotipos de papa procedentes de Coahuila.....	41
7	Amplificación mediante la técnica RAPD, utilizando el par de iniciadores 23/30 y DNA de 15 genotipos de papa procedentes de Coahuila.....	41
8	Amplificación mediante la técnica RAPD, utilizando el iniciador 2 y diferentes materiales de papa procedentes del Estado de México.....	42
9	Amplificación mediante la técnica de RAPD, utilizando el par de iniciadores 23/30 y diferentes materiales de papa procedentes del Estado de México.....	43
10	Fragmentos amplificados en la técnica SSR con la línea avanzada 91-9-3, utilizando el par de iniciadores M7F/M8R.....	44
11	Productos de amplificación de la PCR para microsatélites en 15 materiales de papa <i>Solanum tuberosum</i> L. procedentes de Coahuila, utilizando los iniciadores M7F/M8R.....	45
12	Productos de amplificación de la PCR para microsatélites en 15 materiales de papa <i>Solanum tuberosum</i> L., procedentes de Coahuila, utilizando los iniciadores M7F/M8R. Geles teñidos con Nitrato de Plata.....	45
13	Amplificación mediante la técnica de SSR utilizando el par de Iniciadores M1F/M2R y DNA de 15 genotipos de papa procedentes de Coahuila.....	46

14	Amplificación mediante la técnica de SSR utilizando el par de Iniciadores M1F/M2R y dos muestras de DNA de 14 genotipos de papa procedentes del Estado de México.	48
15	Amplificación mediante la técnica de SSR utilizando el par de Iniciadores M3F/M4R y DNA de 15 genotipos de papa procedentes del Estado de México.....	48
16	Comparación de las variedades cultivadas en las localidades de Coahuila y el Estado de México, utilizando el par de Iniciadores M1F/M2R.....	49
17	Relaciones genéticas entre 15 genotipos de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.), procedentes de Coahuila resultado del análisis RAPD y la similaridad genética de Nei y Li (1979).....	51
18	Relaciones genéticas entre 15 genotipos de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.), procedentes de Coahuila resultado del análisis SSR y la similaridad genética de Nei y Li (1979).....	52
19	Relaciones genéticas entre 16 genotipos de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.), procedentes del Estado de México resultado del análisis combinando datos RAPD y SSR y la similaridad genética de Nei y Li (1979).....	53
20	Relaciones genéticas entre 25 genotipos de <i>Solanum tuberosum</i> L., procedentes de Coahuila y del Estado de México resultado del análisis combinando los resultados RAPD y SSR y la similaridad genética de Nei y Li (1979)..	56
21	Dispersión de 25 genotipos de papa con base en el análisis de componentes principales de datos RAPD y SSR.....	57

INDICE DE CUADROS

Cuadro No	Título	Página No.
1	Origen geográfico y genealogía de las líneas y variedades de papa utilizadas.....	26
2	Oligonucleótidos utilizados en la caracterización molecular de 25 genotipos de papa, por medio de la técnica de RAPD.....	28
3	Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de 25 genotipos de papa, por medio de la técnica de SSR.....	29
4	Principales características de los iniciadores seleccionados para los microsatélites.....	31
5	Secuencias de los iniciadores RAPD y SSR utilizados en la evaluación de la respuesta al daño causado por fitoplasmas a 25 genotipos de papa.....	33
6	Número de productos obtenidos por sistema de marcador, número de productos polimórficos, Índice de Diversidad (ID), Proporción Múltiple Efectiva (EMR) e Índice de Marcador (IM) en promedio de todos los ensayos.....	54
7	Número de productos obtenidos por sistema de marcador, número de productos polimórficos, Índice de Diversidad (ID), Proporción Múltiple Efectiva (EMR) e Índice de Marcador (IM) en promedio de los ensayos realizados.....	55
8	Número de productos amplificados por sistema de marcador, número de productos polimórficos, Índice de Diversidad, Proporción Múltiple Efectiva e Índice de Marcador en promedio de todos los ensayos.....	55

Lista de reactivos químicos utilizados

Nombre

Aceite Mineral
Acetato de Amonio
Acido Acético Glacial
Acido Bórico
Acido Clorhídrico
Agua grado Mili Q (MQ)
Alcohol etílico
Alcohol Isoamílico
Acrilamida
Beta Mercapto etanol
Bisacrilamida
Carbonato de Sodio Anhidro
Cloroformo
Cloruro de Magnesio
Cloruro de Sodio
Cetil trimetilamonio bromide (CTAB)
Desoxiribonucleotidos trifosfatados
Etilendiamino tetracetato disódico (EDTA)
Formaldehído
Hidróxido de Potasio
Isopropanol
Nitrato de Plata
Nitrógeno líquido
Persulfato de Amonio
Polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq)
Polivinyl Pyrrolidona
Temed
TBE (Buffer tris borato - EDTA)
Buffer tris borato acetato
Trisma (Tris Base)

Lista de Abreviaturas

AFLP	Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados
Agua mq	Agua ultrapura
AL	Amarillamiento Letal
b	bases
CEVAMEX	Campo Experimental Valle de México
Cm	Centimorgan
cols.	Colaboradores
C-A	Nucleótidos Citosina – Adenina
CTAB	Cetiltrimetilamonio bromide
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfatados
EDTA	Etilendiaminotetraacetato disódico
EMR	Proporción Múltiple Efectiva
et al.,	y colaboradores
etc.	etcetera
G-C	Nucleótidos Guanina - Citosina
gr	gramos
G-T	Nucleótidos Guanina - Timina
ID	Indice de diversidad
IDIAP	Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
ISTR	Repeticiones Marcadas de Secuencia Inversa
Kb	Kilobase
Kg	Kilogramos
M	Molar
mg	miligramos
MI	Indice de marcador
min	Minutos

ml	militros
mM	Mili molar
MPM	Marcador de Peso Molecular
ng	Nanogramos
NIL	Líneas Isogénicas Cercanas
nm	nanómetros
No	número
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
PMP	Punta Morada de la Papa
Prod.	Productos
p/v	Peso/Volumen
QTL	Tratamientos Loci Cuantitativos
RAPD	Polimorfismo del DNA Amplificado al Azar
rDNA	Acido Desoxirribonucleico ribosomal
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Acido Ribonucleico ribosomal
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SCRI	Scottish Crop Research Institute
seg	Segundos
SEP	Secretaría de Educación Pública
SPT	Severidad de pardeamiento del tubérculo
SSR	Secuencias Simples Repetidas
TBE	Solución amortiguadora tris borato - EDTA
Tm	Temperatura óptima de alineamiento
ton/año	Toneladas por año
ton/ha	Toneladas por hectárea
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

UPGMA	Agrupamiento de Unidades de Distancias Mínimas y Promedios Aritméticos
USA	Estados Unidos de Norteamérica
vol	volumen
μ l	Microlitros
μ M	Micro molar
$^{\circ}$ C	Grados Celsius
%	Porcentaje

RESUMEN

Se analizaron 17 variedades comerciales y ocho líneas avanzadas de papa colectadas en los bancos de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicados en Emiliano Zapata, municipio de Saltillo, Coahuila y en Texcoco, Estado de México. La caracterización molecular del germoplasma se realizó utilizando las técnicas del DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) y la de Secuencias Simples Repetidas (SSR) también conocida como microsatélites. Los materiales procedentes de Coahuila, se evaluaron utilizando 40 iniciadores de manera individual y algunas combinaciones de estos con la técnica de RAPD. Los iniciadores que detectaron mayor polimorfismo fueron, 2, 6, 18, 20, 23, 31, 33, 35 y 37 y las mejores combinaciones fueron, 6/10, 21/28, 23/30, 31/33, 31/35 y 35/37. Los genotipos procedentes del Estado de México, fueron caracterizados molecularmente utilizando el iniciador 2 y la combinación 23/30 con la técnica de RAPD. En la técnica de microsatélites, se utilizaron los pares de iniciadores, M1F/M2R, M3F/M4R, M9F/M10R y M11R/M12F. Las 17 variedades comerciales y ocho líneas avanzadas, fueron analizadas estadísticamente mediante la técnica de componentes principales y se generaron dendogramas por medio del método Agrupamiento de Unidades de Distancias Mínimas y Promedios Aritméticos (UPGMA). Los genotipos Alpha, Nau 6 y Gigant que en un estudio previo habían presentado los menores porcentajes de daño por pardeamiento del tubérculo, el cual es un efecto de infección por fitoplasmas, formaron un grupo genéticamente similar junto con las líneas 91-9-3, 91-12-2 y 72-00-88. Los 19 genotipos restantes se agruparon en tres grupos distintos, destacando el grupo formado por los genotipos Granola, Lupita, Malinche, Marciana, Michoacán, Montserrat, Norteña, Sancal, Rosita y Zafiro, ya que fueron los materiales con los valores más altos de daño por pardeamiento del tubérculo. Con las dos técnicas utilizadas en este estudio (RAPD y SSR) se pudieron diferenciar todos los materiales evaluados, obteniéndose su huella genética.

ABSTRACT

Seventeen commercial varieties and eight advanced lines of potato were molecularly analyzed. The materials were collected of the germoplasm Block the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias located in Emiliano Zapata, Coahuila and Texcoco, State of Mexico. The molecular characterization of the materials was conducted by utilizing both random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequences repeat (SSR) (also known as microsatellites) techniques. The materials from Coahuila, were evaluated with 40 primers either individually or combined between each other the technique RAPD. The primers that detected a high polymorphism were, 2, 6, 18, 20, 23, 31, 33, 35 and 37 and the best combinations were 6/10, 21/28, 23/30, 31/33, 31/35 y 35/37. The genotypes from the State of Mexico, were characterized molecularly utilizing the primer 2 individually and the combination 23/30 with the technique RAPD. In the SSR technique the pair of primers used was M1F/M2R, M3F/M4R, M9F/M10R and M11F/M12R. The seventeen commercial varieties and eight advanced lines were statistically analyzed by the technique of principal components. The matrix of distances generated with the information of the genetic dissimilarity and bootstrap was utilized to produce one dendograms by using Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA). The genotypes Alpha, Nau 6 and Gigant that in a previous study had presented low level values of damage by tuber browning, which is effect of infection by phytoplasms, formed one group genetically similar along with lines 91-9-3, 91-12-2 y 72-00-88. The remaining 19 genotypes formed tree different groups; one of them formed by genotypes Granola, Lupita, Malinche, Marciana, Michoacán, Montserrat, Nortefña, Sancal, Rosita and Zafiro, wich were the materials with the highest values of tuber browning. With the two techniques utilized in this study (RAPD and SSR) it was possible to discriminate all the evaluated materials, and to obtain their genetic fingerprinting.

I.- INTRODUCCIÓN

La producción media de papa (*Solanum tuberosum* L.), a nivel mundial en el año 2002 fue de 15.7 ton/ha, los altos rendimientos fueron mostrados por los Países Bajos (principalmente Holanda), seguidos por Estados Unidos de Norte América (USA) con 45 y 40.5 ton/ha respectivamente, México se ubicó en la posición número 37 con 23.1 ton/ha. El mejor promedio de rendimiento de papa en el año 2002 en el Continente Americano lo obtuvo USA, seguido de Argentina y Canadá con 45.0, 27.3 y 24.3 ton/ha respectivamente. México ocupó el sexto lugar con 23.1 ton/ha y los países con bajos rendimientos fueron Paraguay y Bolivia con 6.1 y 7.0 ton/ha (FAO, 2002).

En México la papa es una de las hortalizas de mayor importancia por la superficie sembrada, la cantidad de insumos que genera y por la cantidad de empleos que genera, ocupa el cuarto lugar en la dieta del pueblo mexicano superado solo por el maíz, trigo y arroz, el consumo anual per capita es de 9.6 kg. Anualmente se siembran alrededor de 63,800 ha de papa en la República Mexicana (SAGARPA, 2002), con una producción de 1,483,000 ton/año. Los principales estados productores son: Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Zacatecas. En la región de Coahuila y Nuevo León, se cultiva el 7 % de la superficie nacional con un rendimiento promedio de 30-40 ton/ha (SAGARPA, 2002).

En México, uno de los principales factores que afectan la producción son las enfermedades, destacando el tizón tardío y la enfermedad comúnmente denominada por su sintomatología como Punta Morada de la Papa (PMP) o pardeamiento del tubérculo. Además de las pérdidas en rendimiento, las infecciones por ambas enfermedades ocasionan la producción de tubérculos de tamaño pequeño, lo que ocasiona la pérdida de valor en el mercado de semilla y en su calidad industrial (Cadena-Hinojosa, 1996). A pesar de que México no es

zona de origen de la papa, existe una gran diversidad de germoplasma de este cultivo.

Ferroni (1981), distingue tres grupos de variedades de papa en México:

- a) Genotipos de Holanda,
- b) Genotipos de USA, y
- c) Las variedades mejoradas, generadas por el INIFAP.

El primer grupo representa alrededor del 50 % del cultivo nacional (variedad Alpha), el segundo el 38 % y el último alrededor del 8 % (Ferroni, 1981).

Aunque en la actualidad existe un gran número de colecciones de germoplasma con genotipos de un alto valor agronómico, susceptibles de ser usados en los programas de mejoramiento genético, en muchas ocasiones se desconoce el grado de diversidad y la relación existente entre materiales lo que impide su utilización (Becerra y Paredes, 2000).

Por lo anterior y debido a que en México se desconoce las relaciones genéticas entre el germoplasma de papa existente y a que es necesario establecer criterios para su conservación y/o aprovechamiento, se planteó el presente trabajo, con el objetivo de hacer una caracterización molecular de las líneas élite y variedades comerciales de papa y determinar sus relaciones genéticas utilizando dos tipos de marcadores genéticos.

HIPÓTESIS

El uso de las técnicas moleculares para el análisis del DNA permitirá la caracterización molecular del germoplasma de papa y obtener su huella genética, así como identificar posibles marcadores moleculares asociados con la tolerancia a enfermedades.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente a los materiales sobresalientes de papa en México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Instrumentación y estandarización de técnicas moleculares para la obtención de la huella genética.

- b) Caracterización molecular y evaluación de la diversidad genética de genotipos elite de papa.

- c) Identificar posibles marcadores moleculares asociados a características de tolerancia a la enfermedad punta morada.

II.- REVISION DE LITERATURA

2.1.- Antecedentes

2.1.1.- Aspectos botánicos

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es una planta anual, herbácea, que alcanza una altura entre 40 y 80 cm (IDIAP, 1983). Además está constituida por las siguientes partes:

Raíces: Son de tipo adventicias, la mayor parte se encuentra en los primeros 40 centímetros del suelo.

Tallos: La papa produce un tallo normal de tipo herbáceo, erecto, con ramificaciones no muy desarrolladas.

Tubérculos: Además del tallo normal, produce bajo la tierra tallos modificados que se llaman estolones y se van engrosando en la punta hasta formar el tubérculo. Éste, al desarrollarse y ser cosechado, presenta yemas que, después de un período de reposo, brotan para producir nuevas plantas.

Hojas: Estas son del tipo compuestas, alternas, con varios folíolos opuestos y uno grande como terminal. Son un poco vellosas. En las axilas, que forman las hojas con el tallo, salen las yemas vegetativas (SEP, 1983).

Flor: La inflorescencia de la papa es de tipo cima, compuesta de terminal con pedúnculos largos. La flor es completa y los cinco pétalos se fusionan formando un tubo floral.

Frutos: Son redondos, suaves, con un diámetro de aproximadamente 2 cm. Las semillas del fruto son pequeñas y aplastadas, poseen la característica de ser

fértiles, lo que ha sido aprovechado por los genetistas para lograr híbridos de mayor resistencia a las enfermedades, así como variedades de alto rendimiento.

2.1.2.- Valor alimenticio

La papa contribuye a nuestra dieta con nutrientes como carbohidratos. También aporta vitamina C, vitaminas del Complejo B (riboflavina, tiamina y niacina), vitamina A y minerales como el potasio, hierro y magnesio, todas necesarias para el buen funcionamiento del organismo. Al comer una papa mediana, horneada, ésta tiene aproximadamente 100 calorías; 10 % de potasio, 8 % de hierro y 23 % de vitamina C (IDIAP, 1983).

Existe la creencia generalizada en otras partes del mundo, de que la papa es un alimento de reducido valor nutritivo y que favorece la presencia de carbohidratos en el organismo humano, pero lo cierto es que la papa es rica en vitaminas, aminoácidos y minerales, y tiene menos calorías que el arroz (IDIAP, 1983).

2.1.3.- Ubicación Taxonómica del Cultivo

Báez (1983), basándose en las características florales de la planta clasificó a la papa de la siguiente manera:

Reino: Plantae
Subreino: Embryobionta
División: Spermatophyta
Clase: Angiospermae
Subclase: Dicotiledoneae
Orden: Tubiflorales
Familia: Solanaceae
Género: *Solanum*
Especie: *tuberosum* L.

2.1.4.- Origen del Cultivo

La papa (*Solanum tuberosum* L), es originaria de Sudamérica, de la zona andina comprendida entre Ecuador, Perú y Bolivia. Su existencia data desde el año 2500 A.C. Este cultivo lo domesticaron los Incas o civilizaciones preincaicas muchos miles de años antes de la llegada de los españoles en 1537 (SEP, 1983).

En México, desde 1925 se registraron estadísticas de producción en este cultivo; pero fue hasta el año de 1946 con la llegada de John S. Neiderhauser de la fundación Rockefeller, en donde se le dio mayor impulso a la papa porque se encontraron buenas condiciones climáticas para este cultivo; principalmente, en los Valles Altos de la Meseta Central de este país. En las regiones de León, Guanajuato, Distrito Guerrero en el Estado de Chihuahua y en Navidad, Nuevo León fue en donde se empezó a sembrar este cultivo en forma extensiva. (Báez, 1983).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), reportó en el 2002 una superficie de 63,800 hectáreas sembradas con este cultivo; de la inversión total, aproximadamente el 40 % (cerca de 200 millones de dólares) se destinan a la adquisición de tubérculos que se utilizarán para semilla. Por tal motivo, cualquier problema que afecte directamente las semillas aumentan sensiblemente los costos de producción del cultivo (SAGARPA, 2002).

Los dos centros principales de diversidad y producción de papa en México son el Nevado de Toluca en el Estado de México y el Pico de Orizaba en Veracruz. Ambos picos volcánicos son fértiles con grandes extensiones de tierra, con una altura sobre el nivel del mar de 2,900 a 3,400 metros. Ambas regiones son centros de formación de 17 cultivares de *S. tuberosum*; sin embargo, solo seis de los genotipos clonales presentan amplia adaptación en México. El gran endemismo, así como la gran diversidad morfológica de esos cultivares en el

Nevado de Toluca y el Pico de Orizaba, sugieren que estas regiones son los primeros centros de variabilidad genética de papa en México (Ugent, 1968).

Aunque en la actualidad existe un gran número de colecciones de germoplasma con genotipos de un alto valor agronómico, susceptibles de ser usados en los programas de mejoramiento genético; en muchas ocasiones se desconoce el grado de diversidad y la relación existente entre materiales lo que impide su utilización, por lo cual el análisis de la diversidad genética y las relaciones entre especies o dentro de ellas siempre ha sido una preocupación de los investigadores (Becerra y Paredes, 2000).

2.2.- Marcadores Moleculares

Históricamente los estudios de diversidad genética han estado relacionados con datos como la anatomía comparativa, morfología, embriología y fisiología. Sin embargo, la influencia ambiental y el reducido número de genes involucrados en este proceso han limitado el uso de estos marcadores. Actualmente, los avances de la biología molecular ha permitido el uso de técnicas que permiten detectar cambios en el genotipo mediante el diagnóstico del DNA (González y Simpson, 1997).

Los marcadores moleculares son moléculas que pueden ser utilizadas para trazar un gen deseado en genotipos evaluados (Ovesná *et al.*, 2002). De hecho una pieza de DNA o una proteína pueden ser utilizadas como marcadores. En estudios donde se ha realizado selección en tratamientos específicos, las evaluaciones se han basado en caracteres morfológicos (Staub *et al.*, 1996), isozimas (Stuber y Khana, 1991), proteínas que codifican pequeños caracteres (Metakovski, 1991; Shariflou *et al.*, 2001; Vapa y Radovic, 1998). Sin embargo, los marcadores de DNA han mostrado ser los mejores candidatos para la evaluación y selección eficiente de materiales de plantas. Los marcadores de DNA segregan como simples genes y no son afectados por el ambiente. El DNA es fácilmente extraído de genotipos de plantas y su análisis puede tener bajo

costo y su labor es muy efectiva.

Antes de que los marcadores moleculares fueran utilizados, tenían que ser desarrollados tecnologías del DNA y algoritmos apropiadas para genotipos de plantas. La selección adecuada de poblaciones de plantas es tan importante como la selección de la técnica del DNA (Berloo, 2000). También menciona que existen dos categorías básicas de marcadores moleculares: a) Los marcadores segregantes que determinan la presencia de un simple gene dominante o recesivo y b) los marcadores asociados a los QTL (Tratamientos Loci Cuantitativos), estos marcadores son mucho mas fáciles y económicos de desarrollar para el tratamiento de un simple gen heredado como los QTL (Berloo, 2000).

Generalmente el desarrollo de marcadores de DNA consiste de varios pasos. Primero es importante analizar la naturaleza de los tratamientos estudiados. Después realizar un mapeo apropiado a la población a ser desarrollada. Se requiere una gran población (Juego de líneas Doble Híbridadas, poblaciones avanzadas por retrocruzamiento) para el mapeo de los QTL en comparación con el mapeo de un simple gen (Berloo, 2000). Los marcadores basados en DNA, presentan varias ventajas con respecto a los marcadores morfológicos y proteínicos, algunas de estas ventajas son:

- 1). Analizan directamente el genotipo del organismo por lo que las influencias ambientales no representan ningún problema.
- 2). Se puede elegir la región del DNA adecuada para el estudio (altamente variables para estudios de paternidad o identificación de cultivares o regiones con variabilidad limitada para investigaciones filogenéticas) en el caso del DNA polimórfico amplificado al azar y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados sirven para los dos tipos de análisis.
- 3). Existe un número ilimitado de polimorfismos que pueden ser detectados.
- 4). Se han desarrollado una gran variedad de técnicas, lo que permite tener el potencial de contar con marcadores adecuados para problemas particulares.

Kochieva (2000) menciona que el desarrollo de técnicas para análisis y cuantificación de polimorfismo del DNA ha generado una variedad de nuevas aplicaciones que pueden ser usadas para complementar las técnicas clásicas de mejoramiento de plantas. También señala que la fácil identificación de variedades y la obtención de nuevos marcadores moleculares de DNA en variedades y especies es extremadamente importante no solo para la protección de derechos de los mejoradores sino también para acelerar los programas de mejoramiento de plantas.

Se han descrito diversos tipos de marcadores de DNA, pero los mas importantes utilizados en los estudios son: el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) que son "huellas genéticas" basadas en hibridación; DNA Polimorfito Amplificado al Azar (RAPD) y Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) (Samuels y Seifert, 1995).

Rohde y Becker (1999) mencionan que en la actualidad se han desarrollado otras técnicas sobre marcadores moleculares como el análisis de Repeticiones Marcadas de Secuencia Inversa (ISTR) y Simple Secuencias Repetidas (SSR) también conocidas como microsatélites (Russel, 1999).

Michelmore y Hulbert (1987) citan que este tipo de marcadores moleculares han permitido conocer la estructura de las poblaciones en animales, plantas y microorganismos. Asimismo han sido muy útiles en estudios de taxonomía, migración, y filogenia de fitopatógenos. Además permiten estudiar el origen y la evolución de las razas dentro de una población facilitando la identificación de genes de interés y la construcción de mapas genéticos.

El desarrollo de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es muy utilizada en el análisis de genomas (Saiki *et al.*, 1988; Schutzbank *et al.*, 1993; White *et al.*, 1992). El concepto básico fue probado por primera vez con la enzima polimerasa Klenow (Mullis y Fallona, 1987), pero el verdadero

avance vino cuando una enzima polimerasa termoestable Taq polimerasa (Mullis y Fallona, 1987), fue aislada y purificada. La PCR fue originalmente concebida como una técnica para la detección de cambio de bases en el genoma, como una herramienta para el diagnóstico de enfermedades genéticas de DNA. En años recientes, varios ensayos han revelado el polimorfismo del DNA en loci multialélicos que han sido desarrollados en campo por PCR. Las ventajas considerables de los métodos basados en PCR son simplicidad, especificidad y rapidez (Mullis y Fallona, 1987).

En la actualidad se ha generado un gran número de marcadores moleculares entre los que destacan los basados en la PCR, que permiten amplificar secuencias específicas o al azar del DNA y requieren de pequeñas cantidades del mismo, entre estos se encuentran los Polimorfismos del DNA Amplificados al Azar (RAPD) y los Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR).

2.2.1.- DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)

Los RAPD, se basan en modificaciones a la técnica de PCR y consisten en la amplificación aleatoria de secuencias de DNA genómico. Esta técnica ha sido muy útil para evaluar la variación patogénica en microorganismos y estudios epidemiológicos y de genética de poblaciones, también para realizar mapas genéticos, lo que los convierte en una herramienta útil en programas de mejoramiento genético de plantas y animales (Rafalski *et al.*, 1996).

La técnica RAPD requiere la presencia de una simple selección aleatoria de oligonucleótidos. Los iniciadores individuales RAPD son capaces de hibridar en varios cientos de sitios dentro del DNA blanco; sin embargo no todas estas hibridaciones llevan a la producción de fragmentos por PCR. La habilidad de los RAPD para producir bandas múltiples usando un simple iniciador indica que un bajo número de iniciadores pueden ser usados para generar un gran número de fragmentos. Estos fragmentos son usualmente generados de diferentes regiones

del genoma y por lo tanto pueden ser examinados múltiples loci rápidamente (Edwards, 1998). El poder de los RAPD radica en ser una técnica rápida, fácil de realizar y comparativamente barata. Es inmediatamente aplicable en el análisis de la mayoría de los organismos por que los juegos universales de iniciadores son usados sin alguna necesidad de información de secuencias previas (Hallden *et al.*, 1996). Este sistema de marcadores fue utilizado en diferentes aplicaciones involucrando la detección de polimorfismos en las secuencias del DNA, mapeo de diferentes tipos de poblaciones (Carlson *et al.*, 1991; Reiter *et al.*, 1992), aislamiento de marcadores ligados a varios tratamientos o intervalos específicos blanco (Giovannoni *et al.*, 1991; Michelmore *et al.*, 1991) y en aplicaciones tales como identificación de variedades y en análisis de parentesco (Mailer *et al.*, 1994; Tinker *et al.*, 1993;). No obstante lo anterior, la tecnología de RAPD tiene algunas limitaciones, son en general dominantes, de este modo tienen un bajo contenido de información comparados con los marcadores codominantes (SSR) en análisis de ligamiento de poblaciones F₂ (Williams *et al.*, 1990).

Penner *et al.*, en 1993 reportaron dificultades en la obtención de modelos de bandas idénticas para el mismo juego de iniciadores y genotipos en diferentes laboratorios. En su estudio el tipo de termociclador usado en los análisis RAPD pareció ser la clave determinante de la reproducibilidad del patrón de bandas. Otro tipo de problema que ha sido reportado es la ocurrencia de bandas RAPD en el DNA de la progenie pero no en el de los progenitores, fenómeno explicado como la formación de heteroduplex (Ayliffe *et al.*, 1994; Hunt y Page, 1992; Riedy *et al.*, 1992). Se ha sugerido que los resultados de las reacciones RAPD están en parte determinados por una competencia por los sitios de iniciación en el genoma (Williams *et al.*, 1993).

En varios proyectos de mapeo genético, fue detectada herencia no Mendeliana en una fracción significativa de todas las bandas polimórficas, posiblemente debido a problemas con la reproducibilidad y competencia (Echt *et al.*, 1992; Giese *et al.*, 1994; Reiter *et al.*, 1992).

Por otra parte Obara-Okeyo y Kako (1998) reportaron que sus aplicaciones fueron generalmente reproducibles y son muy conocidos ejemplos de sus aplicaciones exitosas en el método.

Williams *et al.* (1990), menciona que la técnica de RAPD es una herramienta poderosa que sirve para obtener una gran cantidad de loci anónimos de secuencias codificantes y no codificantes; aunque comúnmente es considerado que la mayoría de los loci RAPD son secuencias no codificantes.

También han sido utilizados para determinar la variación intra e interespecifica en híbridos somáticos de papa y huella genética (Baird *et al.*, 1992; Carrasco *et al.*, 1998; Demek y Adams, 1994; Gorg *et al.*, 1992). El método RAPD es un sistema de marcadores que utiliza oligonucleótidos cortos, de secuencias arbitrarias y de baja astringencia que permiten amplificar fragmentos discretos de DNA (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Los análisis RAPD son rápidos, económicos y fáciles de realizar. Han sido extensivamente utilizados para estudios genéticos por ejemplo: en análisis de variación genética de bacterias, hongos y plantas (Bidochka *et al.*, 1994; Mailer *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1993; Waugh y Powell, 1992), y en la construcción de los primeros mapas de ligamiento para ciertas especies de plantas (Lodhi *et al.*, 1995; Yang y Quiros, 1995). El tamaño de los fragmentos obtenidos en la amplificación individual en RAPD representan un alelo por locus, en estudios de heredabilidad los productos amplificados son transmitidos como marcadores codominantes (Waugh y Powell, 1992).

Waugh y Powell (1992) mencionan que desde su desarrollo, la PCR, ha revolucionado varias técnicas de la biología molecular con modificación en los procedimientos originales diseñadas para responder a un amplio ámbito de necesidades. Los mismos autores citan que tal variación genera una clase específica de marcadores moleculares llamados (RAPD), este procedimiento tiene la ventaja de ser técnicamente sencillo, rápido de realizar, requiere de pequeñas

cantidades iniciales de DNA y no involucra radioactividad. Los RAPD son muy adecuados para usarse en sistemas a gran escala como mejoramiento de plantas, genética de poblaciones y estudios de biodiversidad. Asimismo, mencionan que tradicionalmente los recursos genéticos han sido caracterizados por la combinación de tratamientos morfológicos y agronómicos. La capacidad de estos planteamientos es limitada, y requiere información veraz como: a) la cantidad de diversidad presente y b) la distribución espacial de la diversidad con relación a factores ecogeográficos. Los RAPD proporcionan un sistema útil para monitorear los niveles de diversidad detectados entre y dentro de poblaciones.

Baird *et al.* (1992) describieron un método basado en RAPD que requiere una pequeña muestra de regenerante para determinar la hibridación. Fueron evaluados iniciadores de 10 mer para identificar aquellos que fuesen capaces de generar amplificación de productos polimórficos dominantes para cada fusión de progenitores. Para la identificación de híbridos somáticos en un estado temprano en su proceso de regeneración, los RAPD pueden hacer una contribución significativa a la eficiencia de programas de hibridación somática.

Kochieva (2000) utilizó la técnica RAPD para detectar, identificar y clonar especies de solanáceas y obtener marcadores específicos de variedades. Los iniciadores utilizados fueron capaces de detectar polimorfismo intra e interespecíficos de DNA de papa. Menciona que los fragmentos específicos RAPD pueden utilizarse para generar marcadores específicos y fragmentos específicos de *Lycopersicum* subgénero *Neolycopersicum* y *Eulycopersicum*. Asimismo, utilizó dos iniciadores para revelar polimorfismo inter cultivar con la técnica de RAPD; también realizó clonación en varios fragmentos RAPD de papa y los secuenció, estimó el número de copias en el genoma y su aplicabilidad para distinguir las especies y variedades de papa analizadas. Asimismo, evaluó 16 especies de Solanáceas y obtuvo 350 loci RAPD con 29 iniciadores aleatorios utilizados; Con la mayoría de los iniciadores obtuvo modelos polimórficos

específicos de especie, los fragmentos obtenidos estuvieron en el rango de 413 a 1300 pares de bases.

2.2.2.- Secuencias Simples Repetidas (SSR) o Microsatélites

Los microsatélites son secuencias cortas de DNA (de 2 a 6 nucleótidos) repetidas en pares (Litt y Luty, 1989); Estas repeticiones son altamente polimórficas, se observan en cultivares cercanamente emparentados, debido a mutaciones que causan diversidad en el número de unidades repetidas. Esta clase de polimorfismo en loci específicos es fácilmente detectado utilizando iniciadores específicos en las regiones flanqueantes de tales loci y su ampliación subsiguiente vía la PCR (Litt y Luty, 1989; Weber y May, 1989). El alto nivel de polimorfismo combinado con la alta tasa de intercalamiento hace de los SSR una fuente abundante de marcadores genéticos.

Los microsatélites son unidades repetidas en pares, de entre uno y 10 pares de bases de longitud, tales como $(TG)_n$ o $(AAT)_n$ (Bruford y Wayne, 1993). Están ampliamente distribuidos en los genomas eucariotes y son altamente polimórficos. Este tipo de marcadores son una de las herramientas moleculares elegidas para estudios de biodiversidad por su alto contenido de información genética (Morin y Woodruff, 1996).

Los protocolos para amplificación por PCR usados en microsatélites emplean pares de iniciadores no identificados o pares de iniciadores con uno de los iniciadores marcado radiactivamente o fluoromarcado. La electroforesis con productos de PCR no marcados pueden ser corridos en pequeños geles de poliacrilamida verticales o en geles de agarosa horizontales. Sin embargo, este enfoque no es suficientemente preciso (Francisco *et al.*, 1996). Hay disponibles también sistemas automatizados. La ventaja mayor de los sistemas automatizados es la disponibilidad del tñido con longitudes diferentes (ejemplo 6-FAM, HEX y TET, applied biosystems), por lo tanto es posible el uso de electroforesis capilarmente simultanea (usando ABI PRISM System, Applied

Biosystems) de varios loci con rangos de tamaños de alelos superpuestos (Polaková *et al.*, 2001; Ziegle *et al.*, 1992).

La evaluación de los microsatélites ya sea en geles o autoradiogramas es usualmente un proceso simple, por que los sistemas de electroforesis utilizados tienen una alta resolución (de un simple par de bases) y por que los alelos difieren de un modo muy predecible (unidades múltiples repetidas de los microsatélites, ejemplo dos pares de bases (Polaková *et al.*, 2001; Ziegle *et al.*, 1992).

Los sistemas automatizados utilizando productos de PCR fluoromarcados separados por electroforesis capilarmente (ejemplo ABI PRISM 310, Applied Biosystems) permiten analizar estos productos usando software tales como GenescanTM y Genotypen (Applied Biosystems/ABI). Estos programas para análisis proporcionan algoritmos que separan automáticamente alelos nativos de productos de slipage. Los microsatélites son marcadores codominantes y los datos generados son similares a los de alozimas, excepto que el número de alelos y la heterocigocidad revelada son casi siempre igual. Las poblaciones genéticas, el análisis de parentesco relacionado pueden ser obtenidas (Goldstein *et al.*, 1995; Slatkin, 1995), los microsatélites tienen la ventaja que permiten conocer el modo predominante de la evolución (ejemplo mutaciones) derivadas de la medición la subdivisión de poblaciones y del porcentaje de las distancias genéticas.

Los microsatélites son uno de los tipos de marcadores moleculares promisorios, capaces de diferenciar o identificar genotipos dentro de especies. Su herencia es codominante, su alto nivel de polimorfismo y su facilidad de manejo hacen que sean extremadamente útiles en muchas aplicaciones. Pueden proveer una abundante fuente de variabilidad cuantitativa basada en mutaciones que son frecuentes en sitios específicos y reversibles, mas aun raramente son deletéreos, (Kashi *et al.*, 1997; Kashi y Söller, 1999; King *et al.*, 1997; King y Söller, 1999). Pueden ser evolucionariamente significantes complementando genomas y genes

individuales, señalando ajustes para una eficiente adaptabilidad, (Kashi *et al.*, 1997; King y Söller, 1999).

La existencia de repeticiones dinucleótidas poli (C-A), poli (G-T) (por ejemplo secuencias alternadas de citosinas y adeninas, con o en la banda opuesta de la molécula de DNA alternando guaninas y timinas). Fue reportado por primera vez por Hamada *et al.*, en 1982.

Estudios posteriores de Tautz y Rentz en 1984, confirmaron la abundancia y ubicación de los microsatélites en eucariotes. Un estudio sistemático de la ocurrencia de las secuencias microsatélites en humanos en las bases de datos del Gene Bank por Weber y May en 1989, revelaron la variación en el número de repeticiones C-A en siete de los ocho loci examinados. Adicionalmente, estos autores desarrollaron un método general para detectar microsatélites polimórficos: El polimorfismo es revelado mediante amplificación del DNA genómico total por PCR utilizando dos iniciadores individuales, compuestos de segmentos cortos de nucleótidos, que flanquean y por lo tanto definen el locus del microsatélite. Los diferentes productos de amplificación obtenidos pueden observarse de forma individual en geles donde se revela este polimorfismo.

La naturaleza y valor único de los microsatélites gira sobre su naturaleza multialélica, son de transmisión codominante, de fácil detección por PCR, su relativa abundancia, cubre extensiones del genoma y requiere solo de una pequeña cantidad de DNA para su inicio. También este tipo de marcadores puede ser distribuido en laboratorios como secuencias de iniciadores, los cuales proporcionan un lenguaje común para investigadores colaboradores y actúan como reactantes de mapeo genético universal (Silver, 1992).

Conduit y Hubbel (1991) mencionan que el aislamiento y clonación de microsatélites fue realizado por primera vez en especies de árboles tropicales, las repeticiones dinucleótidos poli A-C y poli A-G que fueron detectados a frecuencias

de 5×10^3 a 3×10^5 por genoma, los "motifs" repetidos A-G son más frecuentes que A-C. Sin embargo, hay mucho menos información de SSR en plantas que en especies de animales, algunas tendencias importantes y las diferencias son ya aparentes (Morgante y Olivieri, 1993; Wang *et al.*, 1994). Existe una reducción de 10 veces en el número de dinucleótidos repetidos detectados en secuencias de plantas comparados con humanos, pero la información de secuencias disponible es mayor en humanos. Se ha estimado que un promedio de repeticiones de 20 pares de bases de longitud ocurre en 33 kilobases en genomas nucleares de plantas comparados con 6 kilobases en mamíferos (Wang *et al.*, 1994). En genomas de plantas predomina el motif repetido A-T mientras que en humanos las repeticiones A-C y/o A-T son más comunes. Este parece ser un factor general que distingue los genomas de todas las plantas y animales.

Los SSR o microsatélites también han sido utilizados para establecer las relaciones genéticas entre cultivares de papa (Ashkenazi *et al.*, 2000; Milbourne, *et al.*, 1997; Provan *et al.*, 1996 a y b) y otras especies como soya y cebada (Akkaya *et al.*, 1992; Saghai-Marooof *et al.*, 1994). Estos marcadores son segmentos repetidos en tandem de 1 a 5 nucleótidos cuyo número de repeticiones revela las diferencias genéticas entre individuos (Tautz y Renz, 1984). El DNA conteniendo tales secuencias pueden ser amplificadas usando la PCR con iniciadores que flanquean las secuencias repetidas y que pueden ser fácilmente visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. Además estudios genéticos y análisis de germoplasma en distintas especies Powell *et al.* (1996 a) y Russell *et al.* (1997), han demostrado que las correlaciones de las relaciones genéticas entre distintos ensayos polimórficos pueden variar ampliamente en y entre especies.

Los microsatélites, son un grupo de secuencias repetidas, motivos mono, di, tri, tetra o pentanucleótidos que ocurren abundantemente y aleatoriamente, representando una proporción significativa del genoma de muchos eucariotes. Se han realizado estudios entre especies con un mismo grupo de marcadores SSR

(Peakall, 1998, citado por Pereras *et al.*, 1999), lo cual demostró el potencial de transferencia de marcadores SSR entre taxas muy relacionadas, expandiendo el uso potencial de los SSR. De esta manera se ha estudiado la diversidad genética en trigo, cebada, yuca, melón, pastos y soya (Chavarriga *et al.*, 1998; Domini *et al.*, 1998; Katzir, *et al.*, 1996; Procaccini y Mazzella, 1998; White y Powell, 1997, citados por Pereras *et al.*, 1999).

Powell *et al.*, (1996 b) señalan que los microsatélites son un grupo de secuencias repetidas de DNA que representan una significativa porción del genoma de eucariotes superiores, que pueden servir como marcadores genéticos altamente informativos y junto con el uso de la tecnología reacción en cadena de la polimerasa permite la detección de la variación en longitud. Este medio nuevo para detectar polimorfismo en regiones blanco altamente variables del genoma ha revolucionado la investigación en humanos y mamíferos.

Kochieva (2000) evaluó varios iniciadores microsatélites para la caracterización de solanáceas (papa y tomate), y observó que todas las bandas amplificadas en solanáceas estuvieron ausentes en los perfiles de otras especies evaluadas, por lo tanto concluyó que esas bandas eran marcadores específicos de solanáceas.

Perazzo *et al.*, (2000) evaluaron 20 genotipos de papa para obtener su huella genética, usando 14 iniciadores SSR localizados en 10 de los 12 cromosomas de la papa. Evaluaron una gran porción del genoma para observar la variación genética. Obtuvieron 92 alelos, el número de alelos por locus varió de 4 a 16. Cinco de los 20 tratamientos mostraron diferencias en el patrón electroforético comparados con los clones originales. Asimismo encontraron diferencias en nueve de los 20 genotipos evaluados; de los nueve genotipos detectados cuatro los clasificaron como mal identificados y lo cinco restantes mostraron leves diferencias morfológicas los cuales fueron atribuidos a factores patológicos y ambientales. Asimismo citan que los SSR demostraron ser una

poderosa herramienta que complementó los resultados obtenidos por comparaciones morfológicas. Ambas técnicas estuvieron acordes en detectar tratamientos mal identificados

Bryan *et al.*, (1999) citan que actualmente se ha identificado y caracterizado en papa en el Scottish Crop Research Institute (SCRI) 150 loci microsatélites; que los progresos en el mapeo y caracterización de estos SSR fueron informados en los Reportes Anuales de 1997/98. Asimismo, mencionan que los microsatélites ofrecen la ventaja de tener un modo de herencia codominante lo que sugiere que varios alelos pueden ser identificados en cada locus dependiendo del grado de polimorfismo mostrado en el locus, y que esta propiedad es particularmente utilizada en tetraploides y permite la posibilidad de asignación de genotipos microsatélites (la combinación de alelos presentes en un juego de loci SSR) para alguna accesión dada, y que los marcadores SSR ha sido utilizados muy eficientemente.

Fahima *et al.*, (2002) evaluaron la diversidad de 20 loci microsatélites del trigo silvestre emmer, *Triticum dicoccoides* en 15 poblaciones (135 genotipos) representando un amplio rango de condiciones ecológicas de suelo, temperatura, y disponibilidad de agua en Israel y Turquía, con base en los resultados obtenidos, sugieren que los marcadores microsatélites son usados para la estimación de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Triticum dicoccoides* y para el etiquetamiento de tratamientos agronómicos importantes derivados del trigo silvestre emmer.

2.2.2.1.- Aplicaciones de los microsatélites

2.2.2.1.1.- Genética Agrícola y Mejoramiento de Plantas

Powell *et al.*, (1996 c) mencionan que la utilidad de los microsatélites gira alrededor de dos factores importantes: su alto contenido de información del cual es una característica del número y frecuencia de alelos detectados y fáciles de genotipar. La habilidad para distinguir entre individuos cercanamente

relacionados es particularmente importante para muchas especies de cultivos, lo cual tiende a tener una estrecha base genética. La evaluación de datos, de la cantidad de diversidad detectada con microsatélites ha revelado más polimorfismo comparado con otros ensayos realizados. Con excepción de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Broun y Tanksley, 1996). Donde solamente en dos de 10 microsatélites detectaron polimorfismo, los microsatélites proporcionaron alto nivel discriminatorio en *Lycopersicum*. Una mejor ilustración en los datos obtenidos en soya en el género *Glycine*, en donde los niveles de polimorfismo detectado con RFLP y SSR fue superior; el 80 %; de los microsatélites utilizados, fueron capaces de detectar tres o más alelos, mientras que menos del 15 % de las sondas utilizadas con RFLP mostraron ser efectivas (Powell *et al.* 1996 a).

Es importante enfatizar que la mayoría de los estudios de microsatélites basados en plantas fueron conducidos utilizando germoplasma seleccionado para maximizar los niveles de diversidad detectados. Las primeras aplicaciones de microsatélites en plantas fueron en la identificación de cultivares donde fueron usados en genotipos de *Vitis vinífera* (Thomas y Scout, 1993) y en soya (Rongwen *et al.*, 1995). La importancia de la necesidad de proteger la propiedad del germoplasma puede incrementarse en el futuro, y los microsatélites pueden jugar un papel importante en asegurar los derechos de las variedades de plantas. Una aplicación de los microsatélites está en la determinación de un híbrido. Para este propósito, la naturaleza codominante de los microsatélites es particularmente importante, y permite identificar la contribución alélica de cada progenitor que sea identificado en híbridos somáticos o sexuales.

Una de las aplicaciones de la técnica SSR es en hibridación de células somáticas en biología de plantas, ya que es un método que sirve para identificar claramente híbridos somáticos nucleares. Provan *et al.*, en (1996 a) señalan que se ha utilizado este método para caracterizar y determinar la hibridación en híbridos somáticos intraespecíficos de papa *S. tuberosum*. Actualmente el mayor reflejo del uso de los microsatélites esta en identificar heterocariones, este estudio

también demuestra la estabilidad somática de microsatélites en plantas de papa que han sido regeneradas de protoplastos de células simples.

Es también importante el alto poder discriminatorio de los microsatélites para analizar la variación en el "pool" de genes de los cultivos. La base genética de las plantas modernas cultivadas es información importante que necesita ser cuantificada en relación con sus progenitores. Un estudio reciente con arroz *Oryza sativa* estableció que el 28 % de la variabilidad alélica fue perdida durante el proceso de desarrollo de variedades (Yang y Quiros, 1995). Estudios posteriores con microsatélites mejoraron el entendimiento del proceso involucrado en la domesticación en la evolución de las plantas cultivadas. Los datos generados por este análisis también proporcionaron un criterio utilizado para el enriquecimiento del pool de genes de plantas cultivadas, y para determinar que tan eficientes han sido los fitomejoradores en acceder a las formas de variación preexistentes.

Una de las razones principales para el desarrollo de microsatélites es su potencial uso como marcador diagnóstico en tratamientos importantes de programas de mejoramiento genético de plantas.

El único mecanismo responsable para la generación de altos niveles de variabilidad en alelos microsatélites por replicación y corrección pueden reducir la utilización de los microsatélites para la evaluación de similitudes genéticas entre genotipos. Los microsatélites han sido usados para generar información en relación a subpoblaciones en humanos (Bowcock *et al.*, 1994), pero estudios de este tipo en plantas son mínimos.

La habilidad del uso de los mismos iniciadores SSR en diferentes especies de plantas puede depender de la extensión a la cual los sitios de los iniciadores flanquean los SSR, si son conservados entre taxas relacionadas y la estabilidad de los SSR sobre el tiempo evolucionario. Algunas investigaciones han considerado la amplificación de cruces entre especies con la conservación de

secuencia de iniciadores lo que ha sido demostrado en arroz por Wu y Tanksley (1993); en vid por Thomas y Scott (1993) y en cítricos (Kijas *et al.*, 1995). La amplificación de microsatélites en cruza entre especies incrementaría el valor de tales marcadores en la ciencia de las plantas.

2.2.3.- Respuesta del germoplasma de papa al daño causado por fitoplasmas

Actualmente, en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) se han reportado varias enfermedades producidas por fitoplasmas tales como el “enrollamiento púrpura del ápice”, “flavescencia marginal”, “escoba de bruja”, “filodia de la papa” y “marchites en la punta morada de la papa” (Kumar, *et al.*, 1988)

La Punta Morada de la Papa (PMP) origina brotes erectos y las hojas se enrollan hacia arriba con el progreso de la enfermedad. Se produce pigmentación púrpura en la base de los folíolos y los tallos se marchitan debido a la necrosis del floema de los tallos. Las plantas jóvenes afectadas producen tubérculos aéreos y engrosamiento de los nudos del tallo. Los tubérculos producidos por las plantas infectadas pueden ser flácidos y producen brotes ahilados cuando se rompe la dormancia y con ausencia de brotación en los mismos (Cadena-Hinojosa *et al.*, 2003; Kumar, *et al.*, 1988)

La punta morada de la papa, es una enfermedad asociada con la incidencia de fitoplasmas y *Paratrioza cockerelli* que causan un desorden en el metabolismo de la planta, se presentan en las principales zonas paperas de México (Cadena-Hinojosa, *et al.*, 2003). Los mismos autores señalan que ambos problemas fitosanitarios ocasionan un pardeamiento y brotación anormal de los tubérculos, lo que disminuye el rendimiento y la calidad del cultivo.

En México la PMP es considerada, después del tizón tardío (*Phytophthora infestans*), como la enfermedad más importante del cultivo de la papa. El nombre fue dado por la coloración morada que adquieren las hojas apicales con la

infección, la cual es más aparente en las variedades con pigmentación natural (Cadena-Hinojosa, *et al.*, 2003).

También se pueden desarrollar tubérculos aéreos en los nudos de los tallos. Los síntomas de la PMP se detectaron en México desde hace 50 años; sin embargo, su importancia se ha incrementado en los últimos cinco años. Actualmente, se estima que más del 70 % de la superficie sembrada con papa en México es afectada por la enfermedad. Las pérdidas varían según la severidad del problema, pudiendo reducir hasta 80 % el rendimiento. Además de las pérdidas en rendimiento, los tubérculos infectados pierden valor comercial por la necrosis interna y la baja calidad industrial (Salazar, 1998).

El primer ejemplo de un microsatélite ligado a un gen de resistencia a enfermedades de plantas fue publicado por Yu *et al.*, (1994). Una repetición AT₁₅ localizada dentro del gen de choque térmico de la proteína de soya Rsv y cuyo peso es de 0.5 centimorgan (Cm), es un gene que confiere resistencia al virus mosaico de la soya. Varios genes de resistencia, incluyendo los del virus moteado del cacahuate (Rpv) y *Phytophthora* (Rps 3) están agrupados en esa región del genoma de la soya. Este tipo de marcadores microsatélites ayudaría en la transferencia de los genes de resistencia a variedades élite de soya.

Martín *et al.*, (1991) utilizando la técnica RAPD, evaluaron dos Líneas Isogénicas Cercanas (NIL) que difiere por la presencia o ausencia del gene (pto) que confiere la resistencia a *Pseudomonas*, con 144 iniciadores aleatorios. En total siete productos polimórficos de amplificación fueron identificados entre las dos líneas. Cuatro de estos productos fueron investigados mas allá por análisis de segregación y tres fueron confirmados que estuvieron fuertemente ligados al gene pto. El procedimiento total tomó cuatro semanas comparados con el tiempo del proyecto de aproximadamente dos años usando RFLP.

III.- MATERIALES Y METODOS.

3.1.- Material genético

Se colectaron ocho variedades comerciales y siete líneas avanzadas de papa en Coahuila y 14 variedades y dos líneas avanzadas en el Estado de México, (Cuadro 1). Estos materiales pertenecen al banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Seis materiales se repiten en las dos localidades.

Cuadro 1. Origen geográfico y genealogía de las líneas y variedades de papa utilizadas.

Proced.	Coahuila		Estado de México	
# Orden	Genotipo	Genealogía	Genotipo	Genealogía
1	Alpha	Paul Kruger x Preferent	Alpha	Paul Kruger x Preferent
2	Atlantic	Waseon x B5141-6	Granola	3333 60 X 267 04
3	Atzimba	US-133-3 X 52-AT-1	Gigant	Elvira X AM – 66-42
4	Gigant	Elvira X AM – 66-42	Lady Rosetta	Cardinal x SVP VTn2 62 33 3
5	Fiana	4062-660 x AM66-42	Lupita	Desconocido
6	Malinche	58-ER-1 x Loman	Malinche	58-ER-1 x Loman
7	Montserrat	7-AM-9 x 57-DZ-23	Marciana	SACO X 57-DZ-23
8	Norteña	Atzimba x US-8	Michoacán	Amarillo Puebla X 62 – HM - 5
9	Zafiro	575042 x 575042	Montserrat	7-AM-9 x 57-DZ-23
10	575012	Desconocido	Nau 6	Desconocido
11	720088	Desconocido	Norteña	Atzimba x US-8
12	91-9-3	Atlantic x 750489	Rosita	57 – AO – 10 X 52 AT - 1
13	91-10-1	Murca x Nook sack	Sancal	750821 x 720054
14	91-12-2	Ileri x F.L.	Zafiro	575042 x 575042
15	91-25-4	Ileri x F.L.	4 - 11	Autofecundación P-14
16			67-60-08	Desconocido
			Roja	

3.2.- Extracción del DNA

La extracción del DNA genómico se realizó utilizando la metodología descrita por Almeyda-León *et al.* (2001). Se trituraron 250 mg de tejido fresco en presencia de nitrógeno líquido. La muestra macerada se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se le agregaron 750 μ l de la solución de extracción (2% p/v CTAB, 100 mM Tris – HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1% p/v polivinilpirrolidona) previamente calentada a 65 °C. La mezcla se homogenizó y se incubó durante 30 minutos a 65 °C, agitándose ocasionalmente. Después se agregó a la mezcla un volumen (p/v), de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) y se agitó suavemente por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente. Se colectó el sobrenadante (parte superior) y se agregó un volumen de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) se agitó suavemente y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se colectó la fase acuosa. El DNA fue precipitado adicionando 0.7 volumen de isopropanol, dejando reposar la muestra un mínimo de 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó con etanol al 70 % frío, al menos dos veces, se secó a temperatura ambiente y el DNA se resuspendió en 100 μ l de agua estéril, y se almacenó a 4 °C hasta su uso. El DNA fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm.

Antes de iniciar las reacciones de PCR se realizó una digestión con la enzima *Eco R5* para determinar si existían inhibidores en el DNA; las condiciones utilizadas fueron las siguientes: En un volumen final de 20 μ l se mezclaron 5 μ l de DNA, 2 μ l de solución amortiguadora específica para la endonucleasa *Eco R5*, 0.5 μ l de la enzima y 12.5 μ l de agua grado MQ estéril. La reacción se incubó por dos horas a 37 °C en un termociclador MJ Research.

3.3.- Análisis RAPD

3.3.1.- Estandarización de la técnica de RAPD

Se utilizaron 40 iniciadores RAPD decámeros con diferente concentración de G-C como bases selectivas (50, 60, 70 y 80 %) (Cuadro 2). En la estandarización de la técnica de RAPD, se utilizó un solo iniciador (CGAACATGAG) que corresponde a la concentración de 50% de GC y cuatro concentraciones de DNA (10, 20, 30 y 50 ng) de la línea 91-9-3. También se evaluó una muestra utilizando 50 nanogramos de DNA de la línea indicada anteriormente con dos iniciadores correspondientes a la concentración del 50% de G-C (TACTATCCCC y CGAACATGAG).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en la caracterización molecular de 25 genotipos de papa, por medio de la técnica de RAPD.

Porcentaje de Guanina – Citosina (G – C)			
50 %	60 %	70 %	80 %
Iniciador No.	Iniciador No.	Iniciador No.	Iniciador No.
1 TACTATCCCC	11 CGACCTGACA	21 TGCCACGTCG	31 CGACCCCCGT
2 CGAACATGAG	12 GTGCGATCTC	22 CGAGCCGAAC	32 TGGGCCCCGA
3 GATCTAGTGC	13 TTGGGGGCTT	23 GGCGATCACG	33 TCGCGCCCTG
4 GCACATAACG	14 GGTACTAGCG	24 GGACTCTGCG	34 TCGCGCCCTG
5 GTAAAGGGCT	15 TTAGGACGGG	25 GGCACCCAGA	35 GCTGGGGACC
6 GTCCCTGAAT	16 CTTGAGACCC	26 GTGGGACCCA	36 CCCGCAGGGA
7 CGAACGTGAT	17 GAGTAACGGC	27 GGCATTCCCG	37 CGACCGAGCC
8 GGAGTTCTCA	18 CTTGGGTTTCG	28 AGGGCGTTTCG	38 GGGGCCTTGC
9 CTCGTCCCTT	19 AGCCAAGACC	29 GGTTCCGGCGT	39 GGTCGCAGCC
10 CGAACGTGAT	20 TCCAGGCTCA	30 CTCCTGCGAC	40 AGCGCCCAGG
Pares de Oligonucleótidos			
6/7 GTCCCTGAAT/ CGAACGTGAT	16/18 CTTGAGACCC/ CTTGGGTTTCG	21/28 TGCCACGTCG/ AGGGCGTTTCG	31/33 CGACCCCCGT/ TCGCGCCCTG
6/10 GTCCCTGAAT/ TTACGTGCTC	17/19 GAGTAACGGC/ AGCCAAGACC	23/30 GGCGATCACG/ CTCCTGCGAC	31/35 CGACCCCCGT/ GCTGGGGACC 35/37 GCTGGGGACC/ CGACCGAGCC

Las reacciones de PCR en la técnica de RAPD se conformaron de acuerdo a lo reportado por Pecina-Quintero *et al.*, (2001). En un volumen final de 25 μ l se mezclaron 2.5 μ l (1X) de solución amortiguadora, 1.5 μ l (2mM) de $MgCl_2$, 2.0 μ l (200 μ M) de dNTPs, 2.0 μ l (0.5 μ M) del iniciador, 0.5 μ l (2.5 Unidades) de la enzima Taq polimerasa y 12.5 μ l de agua MQ estéril, en la muestra donde se utilizó la combinación de dos iniciadores se agregaron 2.0 μ l (0.5 μ M) por cada iniciador. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 2 minutos de alineación a 37 °C y 1 min de polimerización a 72 °C, y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por siete minutos. Una vez la estandarizada la técnica de RAPD se realizaron tres reacciones por muestra.

3.4.- Análisis SSR

3.4.1.- Estandarización de la técnica de SSR o microsatélites

Para los SSR o microsatélites se utilizaron los iniciadores M1F/M2R, M3F/M4R y M5F/M6R, reportados por Ashkenazi *et al.*, (2000) y M7F/M8R, M9F/M10R y M11F/M12R utilizados por Ghislain *et al.*, (2000) (Cuadro 3). Estos iniciadores fueron seleccionados con base en el número de genotipos que diferencian y al tamaño de fragmento que amplifican (Cuadro 4).

Cuadro 3. Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de 25 genotipos de papa, por medio de la técnica de SSR.

Par de Iniciadores	Iniciador Derecho	Iniciador Izquierdo
M1F/M2R	5'-AATTCATGTTTGCGGTACGTC-3'	5'-ATGCAGAAAGATGTCAAATTGA-3'
M3F/M4R	5'-GTGATTGGCAATCAGATTGAAA-3'	5'-GTGTGTGGACTGTGGAGTGG-3'
M5F/M6R	5'-AACATTACAACACATTAGCA-3'	5'-AACTTATCTGAACTCTCGT-3'
M7F/M8R	5'-AATAGGTGTACTGACTCTCAATG-3'	5'-TTGAAGTAAAGTCCTAGTATGTG-3'
M9F/M10R	5'-TTCGGAATTACCCTCTGCC-3'	5'-AAAAAAGAACGCGCACG-3'
M11F/M12R	5'-AGAGATCGATGTAAAACACGT-3'	5'-GTGGCATTGATGGATT-3'

En la técnica de microsatélites, también se realizaron pruebas para optimizar la concentración de DNA a utilizar.

Las condiciones utilizadas en las reacciones de PCR fueron las reportadas por Ghislain *et al.*, 2000; y Ashkenazi *et al.*, 2000, variando solamente en la temperatura de alineamiento para cada par de iniciadores en particular.

Con los iniciadores utilizados por Ghislain *et al.* (2000) (M7 al M12), las reacciones de PCR se conformaron en un volumen final de 25 μ l conteniendo 12.5 μ l de agua grado MQ estéril, 50 ng de DNA (2 μ l), solución amortiguadora 1X (2.5 μ l), 1.0 μ l de MgCl₂ (50mM), 200 μ M de dNTPs (2 μ l), 0.5 μ M de cada primer (2 μ l) y 2.5 U de la enzima Taq DNA polimerasa (0.5 μ l).

Las PCR se realizaron en un termociclador MJ Research 100 bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos; de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 2 min de alineamiento a 47 °C, 1.5 min de polimerización a 72 °C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C: Las condiciones descritas anteriormente se utilizaron con los iniciadores M7F/M8R; para los pares de iniciadores M9F/M10R y M11F/M12R, las temperaturas de alineamiento se modificaron a 55 y 53 °C respectivamente. Los productos de las reacciones de PCR se fraccionaron en geles de poliacrilamida al 6 % y se tiñeron con nitrato de plata y/o bromuro de etidio para ser fotografiados y su posterior análisis.

Cuadro 4. Principales características de los iniciadores seleccionados para los microsatélites.

Iniciadores	Tm	Tamaño de Fragmento Obtenido (pb)	No. de Genotipos que Discrimina	Repetición	Localización
M1F/M2R	58	250	66	(aag) ₇	Locus STACCAS3
M3F/M4R	59	200	58	(at) ₁₁	
M5F/M6R	47	204	50	(tg) ₁₀ (ag) ₁₀	
M7F/M8R	47	83-239	73	(at) ₇ (gt) ₁₀ (at) ₄ (gt) ₅ (gc) ₄ (gt) ₄	Cromosoma VI
M9F/M10R	55	146-172	73	(tcta) ₆	Cromosoma VII
M11F/M12R	53	122-188	73	(gt/gc) (gt) ₈	Cromosoma XII

Con los iniciadores reportados por Ashkenazi *et al.*, (2000) (M1 al M6), las reacciones de PCR se conformaron como sigue: en un volumen final de 25 µl, conteniendo 50 ng de DNA (2 µl), 0.15 µM de cada primer (2 µl), 50 mM de MgCl₂ (1 µl), 200 µM de dNTP's (2 µl), solución amortiguadora 1X (2.5 µl) y 2.5 U de la enzima Taq DNA Polimerasa (0.5 µl).

Las PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 1 min a 94 °C, 30 ciclos; desnaturalización 15 seg a 95 °C, alineación 25 seg a 58 °C, polimerización 15 seg a 72 °C, y una extensión final de 2 min a 72 °C. Las condiciones anteriormente indicadas se utilizaron con el par de iniciadores M1F/M2R, para los pares de iniciadores M3R/M4F y M5R/M6F, las temperaturas de alineación se modificaron a 59 y 47 °C respectivamente.

3.5.- Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Se realizó tomando como base el procedimiento reportado por Igloi (1983) que consiste en lo siguiente:

1. Se fija el gel en una solución de alcohol etílico – ácido acético glacial – agua en proporción de 50 – 10 – 40 durante 60 minutos o toda la noche.
2. Se sumerge el gel en una solución de alcohol etílico – ácido acético glacial – agua en proporción de 10 – 1 – 89 durante 60 minutos adicionales.
3. Se tiñe el gel con nitrato de plata 12 mM (0.2 %) durante 60 minutos.
4. Se enjuaga con agua bidestilada 2 o 3 veces.
5. Se revela con KOH 0.75 M (6.4 gr de KOH, 1.12 ml de formaldehído y 150 ml de agua) hasta que sean visibles los fragmentos.
6. Cuando es requerido la reacción de revelado se detiene con ácido acético al 5% o con Na_2CO_3 al 0.07 M.

3.6.- Relación del análisis molecular del germoplasma de papa con la respuesta al daño causado por fitoplasmas

3.6.1.- Material genético y extracción de DNA

Se evaluó la respuesta al daño causado por fitoplasmas a nivel molecular, bajo condiciones de campo la evaluación fue realizada en el estado de México por Cadena *et al.* (2003) y los resultados obtenidos se utilizaron para hacer correlaciones con los análisis moleculares de los 25 genotipos colectados (Cuadro 1). Se utilizaron tres plantas por variedad y se corrieron tres ensayos diferentes en forma simultánea para cada tipo de marcador, se usaron tres iniciadores en la técnica de RAPD y cuatro pares de iniciadores en SSR (Cuadro 5). La extracción de DNA genómico se realizó utilizando la metodología descrita por Almeyda-León *et al.* (2001).

Cuadro 5. Secuencias de los iniciadores RAPD y SSR utilizados en la evaluación de la respuesta al daño causado por fitoplasmas a 25 genotipos de papa.

Iniciador par de iniciadores	Iniciador hacia delante	Iniciador inverso
RAPD		
2	5'-CGAACATGAG-3'	
23/30	5'-GGCGATCACG-3'	5'-CTCCTGCGAC-3'
SSR		
M1F/M2R	5'-AATTCATGTTTGCGGTACGTC-3'	5'-ATGCAGAAAGATGTCAAAATTGA-3'
M3F/M4R	5'-GTGATTGGCAATCAGATTGAAA-3'	5'-GTGTGTGGACTGTGGAGTGG-3'
MF9F/M10R	5'-TTCGGAATTACCTCTGCC-3'	5'-AAAAAAGAACGCGCACG-3'
M11F/M12R	5'-AGAGATCGATGTAAAACACGT-3'	5'-GTGGCATTTTGATGGATT-3'

3.7.- Análisis de datos

Los geles se analizaron y las bandas monomórficas y polimórficas se contabilizaron. Se asumió que bandas del mismo peso molecular en diferentes individuos son similares. La presencia de una banda fue indicado por un uno (1) y la ausencia como cero (0). Las relaciones genéticas entre genotipos se calcularon por el método de similaridad genética propuesto por Nei y Li (1979), usando el paquete de software S-Plus Versión 4.0. La matriz de distancias generada se utilizó para producir un dendrograma por medio del método Agrupamiento de Unidades de Distancias Mínimas y Promedios Aritméticos (UPGMA). Se usó el método de Felsenstein (1985) para obtener el intervalo de confianza para los grupos formados en cada nodo del dendrograma, para lo cual se realizaron 1000 repeticiones de muestreo con reemplazo de los datos originales. Los intervalos de confianza Felsenstein se refieren al porcentaje de veces que cada nodo del dendrograma es repetido en las 1000 muestras de muestreo con reemplazo, lo que a su vez indica lo robusto de los grupos formados en cada nodo. Un porcentaje cercano a 100% sugiere que el grupo refleja la estructura de la población y que el error de muestreo es mínimo, mientras que bajos porcentajes

(30 % o menos) sugieren que puede existir variación entre los genotipos de algún nodo en particular, cada vez que realiza un análisis, por lo que es necesario aumentar el tamaño de muestra.

Para estimar la utilidad de los sistemas de marcadores en papa, se calcularon algunos parámetros propuestos por Powell *et al.*, (1996 a), como el índice de diversidad mediante la ecuación: $ID = 1 - p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del alelo i^o ; en este caso, cada alelo individual se considera *locus* único y a su vez un fragmento de amplificación. La Proporción Múltiple Efectiva (EMR), que es definida como producto de la fracción de *loci* polimórficos y el número total de *loci* polimórficos para un análisis por oligonucleótidos RAPD y SSR. El índice de marcador (MI), cuya estimación es usada para evaluar la utilidad total de cada sistema de marcadores y se define como el producto de los promedios del índice de diversidad para los fragmentos polimórficos y el EMR para cada análisis.

IV.- RESULTADOS

4.1.- Estandarización de la técnica para la extracción del DNA genómico de papa

Con la metodología utilizada se obtuvo cantidad y calidad de DNA aceptables para la amplificación del DNA en las dos técnicas utilizadas en el estudio (Fig. 1). Se obtuvieron aproximadamente 1,000 nanogramos (ng) de DNA a partir de 250 mg de tejido vegetal fresco de cada muestra, en la Figura 1 se presentan 15 materiales pero se obtuvo la misma cantidad de DNA para los 25 genotipos colectados.

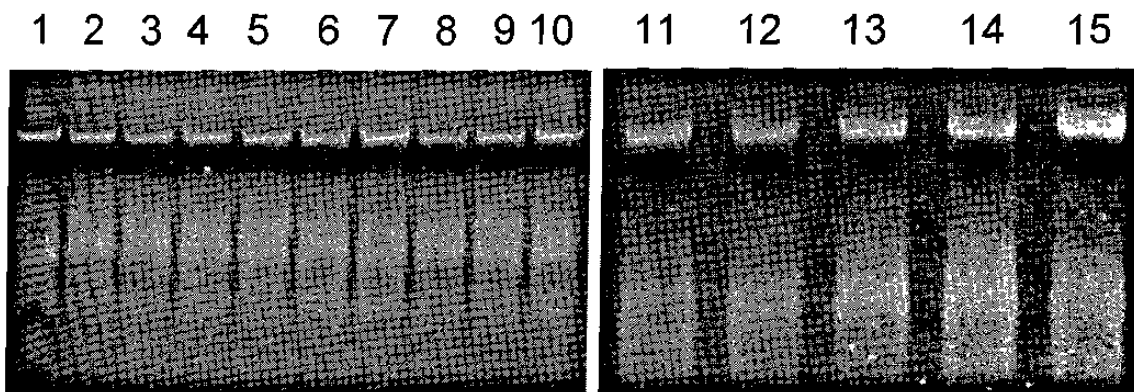


Fig. 1. Extracción del DNA de diferentes cultivares de papa procedente de Coahuila. Carril 1= 91-9-3, Carril 2= Gigant, Carril 3= Atlantic, Carril 4= 91-12-2, Carril 5= Alpha, Carril 6= 91-10-1, Carril 7= 91-25-1, Carril 8= 72-00-88, Carril 9= Montserrat, Carril 10= Fiana, Carril 11= Norteña, Carril 12= Zafiro, Carril 13= 57-50-12, Carril 14= 72-00-45 y Carril 15= Malinche.

4.2. Estandarización de la concentración de DNA e iniciadores mediante la técnica RAPD

En la digestión realizada con la enzima de restricción *Eco* R5 no se observaron evidencias de la existencia de inhibidores en el DNA por lo tanto se procedió a la estandarización de la concentración del DNA y de los iniciadores.

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de optimización utilizando tres concentraciones diferentes de iniciador y cinco concentraciones de DNA de papa de un genotipo 91-9-3 donde aparentemente no hubo diferenciación entre la utilización de 0.5 y 1.0 μM del iniciador. Con la concentración de 2 μl de DNA se observó buena amplificación.

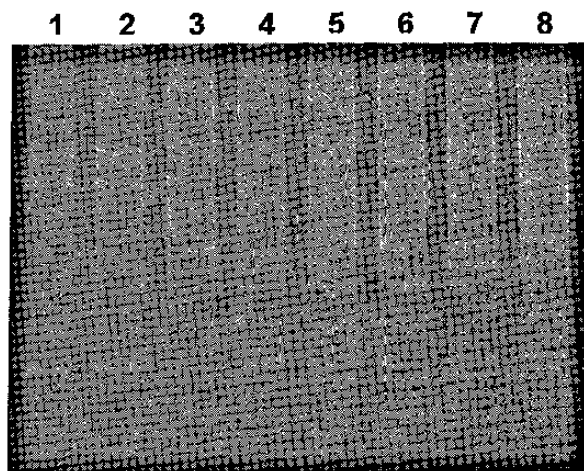


Fig. 2. Estandarización de la concentración de DNA e iniciador en la PCR: Carril 1.- 0.18 μM , Carril 2.- 0.5 μM , Carril 3.- 1 μM ; Carril 4.- 0.1 μl , Carril 5.- 0.5 μl , Carril 6.- 1 μl , Carril 7.- 2 μl y Carril 8.- 3 μl del iniciador y de DNA respectivamente, utilizando la línea avanzada de papa 91-9-3.

4.3.- Estandarización de la técnica RAPD

Se utilizaron 10 iniciadores de cada concentración sintetizaron, sintetizados por Alpha DNA, Montreal Québec, Canadá, dando un total de 40 iniciadores para las pruebas de RAPD. En las pruebas de optimización de la técnica, se utilizaron tres concentraciones de un iniciador que corresponde a la concentración de 50% de GC (0.18, 0.5 y 1.0 μM) con cinco concentraciones de DNA (0.10, 0.50, 1.0, 2.0 y 3.0 μl) de la línea 91-9-3. También se evaluó una muestra utilizando dos microlitros de DNA de la línea indicada anteriormente con un par de iniciadores correspondientes a la concentración del 50% de G-C (GC-1 y GC-2).

Las condiciones iniciales de la reacción en la técnica de RAPD fueron las reportadas por Pecina – Quintero *et al.*, (2001). Sin embargo, debido a que en la electroforesis los fragmentos amplificados se observaron muy tenues, se incremento el número de ciclos y la concentración del iniciador. Las condiciones finales fueron las siguientes: en un volumen final de 25 µl se mezclaron 2.5 µl de solución amortiguadora (1X), 1.5 µl de MgCl₂ (1mM), 2.0 µl de dNTPs (200 µM), 2.0 µl del iniciador (0.5 µM), 0.5 µl de la enzima Taq polimerasa (2.5 Unidades) y 12.5 µl de agua MQ estéril. En las muestras donde se utilizó la combinación de dos iniciadores se agregaron 2.0 µl (0.5 µM) por cada iniciador. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 2 minutos de alineación a 36 °C y 1 min de polimerización a 72 °C, y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por siete minutos.

Al fraccionar los productos de PCR en geles de poliacrilamida y ser teñidos con bromuro de etidio, solamente se observó amplificación en las PCR donde se utilizó la combinación de dos iniciadores. Las reacciones de PCR con un solo iniciador no presentaron polimorfismos visibles al observarse en el transiluminador de luz ultravioleta. Con base en lo anterior, se realizó una segunda prueba utilizando la combinación de dos iniciadores con diferentes concentraciones de DNA (10, 20, 30, 50 y 75 ng) de la línea 91-9-3. Las mejores amplificaciones se obtuvieron cuando se utilizaron 50 y 75 ng de DNA. Cuando se utilizaron 20 y 30 ng de DNA los fragmentos estaban poco visibles y en la muestra de 10 ng de DNA no se observó amplificación. Por lo tanto, se determinó que para una amplificación óptima en la técnica de RAPD se deben utilizar 50 ng de DNA en combinación con 0.5 mM de cada iniciador (Fig. 2).

Una vez estandarizadas las condiciones de PCR, se corrieron PCR con los 40 iniciadores utilizando la línea avanzada 91-9-3 y se seleccionaron aquellos que mostraron mayor número de fragmentos (Fig. 3). Las mejores amplificaciones se obtuvieron con los iniciadores siguientes: 2, 6, 7, 10, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 28, 30, 31, 33, 35 y 37; Asimismo, se evaluaron nueve combinaciones de iniciadores los

cuales fueron, 3/7, 2/10, 12/16, 12/20, 21/28, 23/27, 23/30, 31/33, 31/35 y 35/37 (Fig. 4). De esta evaluación se seleccionaron las últimas cuatro combinaciones y se formaron otras con base en el resultado del análisis individual y los que mostraron mayor número de amplificaciones, de tal manera que el resto fueron 6/7, 6/10, 16/18, 17/19, 21/28, evaluando nueve combinaciones de iniciadores al final.

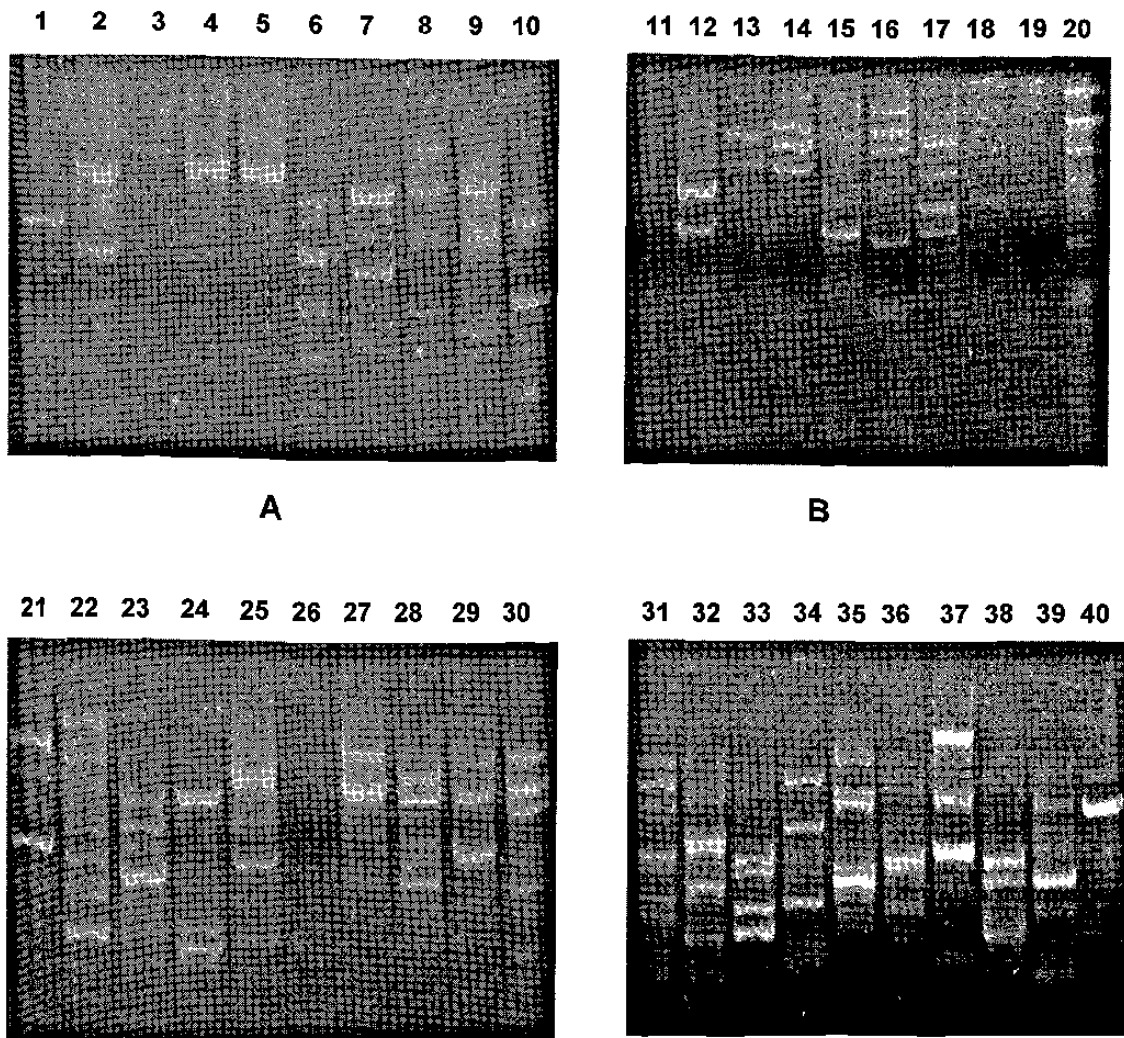


Fig. 3.- Fragmentos amplificados en las PCR en la técnica de RAPD usando 40 iniciadores de diferente concentración Guanina-Citosina y DNA de la línea avanzada 91-9-3. A = Concentración de 50 % G-C; B = 60 % de G-C; C = 70 % de G-C y D = 80 % de G-C.

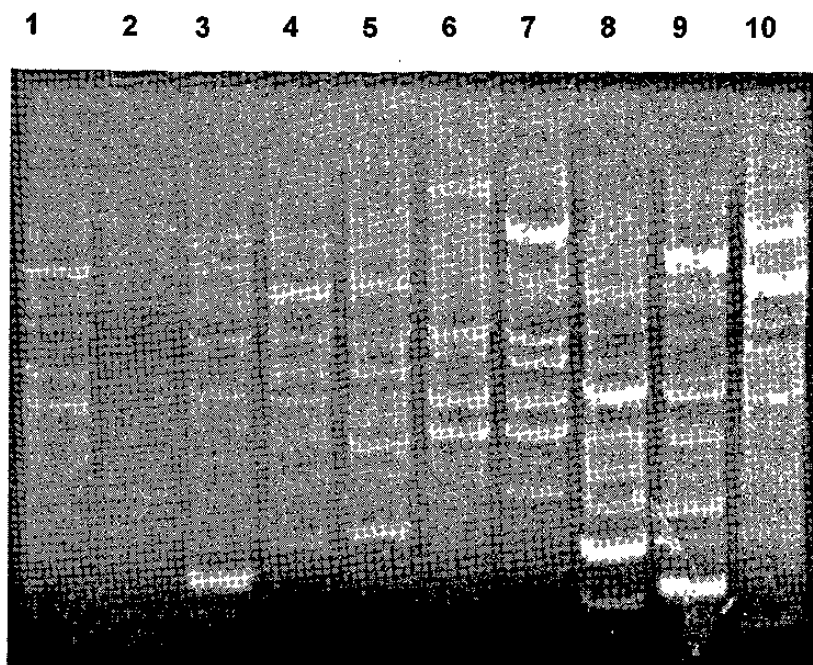


Fig. 4.- Fragmentos amplificados en las PCR para RAPD utilizando diferentes pares de iniciadores y DNA de la variedad Montserrat: Carril 1= 3/7, Carril 2= 2/10, Carril 3= 12/16, Carril 4= 12/20, Carril 5= 21/28, Carril 6= 23/27, Carril 7= 23/30, Carril 8= 31/33, Carril 9= 31/35, Carril 10=31/37.

4.4.- Caracterización del germoplasma procedente de Coahuila mediante la técnica RAPD

De los 40 iniciadores evaluados, se seleccionaron 16 con base en el número de fragmentos amplificados; de tal manera que al final se evaluaron los genotipos con 16 iniciadores individuales y 9 combinaciones con diferentes proporciones de guanina – citosina (G-C) como nucleótidos selectivos (Cuadro 2).

La técnica de RAPD permitió diferenciar los 15 materiales de papa procedentes de Coahuila. En general se observaron un total de 395 productos (en promedio 14.42 bandas por iniciador), de los cuales 296 (70.94 %) fueron polimórficos. El tamaño de los fragmentos analizados estuvo en un ámbito de 200

a 4000 pares de bases, aunque se observaron fragmentos de mayor y menor peso molecular (Fig. 5, 6 y 7). Además no se detectaron diferencias significativas en el número de bandas amplificadas entre iniciadores con diferente porcentaje de GC. Los iniciadores con mayor formación de fragmentos fueron 2, 6, 18, 20, 23, 31, 33, 35 y 37; el iniciador 31 formó un fragmento en la variedad Atlantic que la discriminó del resto del germoplasma evaluado.

4.5.- Caracterización del germoplasma procedente del Estado de México mediante la técnica RAPD

En relación al germoplasma procedente del Estado de México, esta técnica permitió diferenciar los 16 materiales de papa evaluados. Con estos materiales sólo se utilizó un iniciador individual (2) y una combinación de dos iniciadores (23/30). En general se observaron un total de 26 fragmentos (en promedio 9.0 fragmentos por iniciador), de los cuales 18 (69.23 %) fueron polimórficos. El tamaño de los fragmentos analizados fue de 200 a 4000 pares de bases, aunque se observaron fragmentos de mayor y menor peso molecular (Fig. 8 y 9). No se detectaron diferencias significativas en el número de fragmentos amplificados entre los iniciadores utilizados.

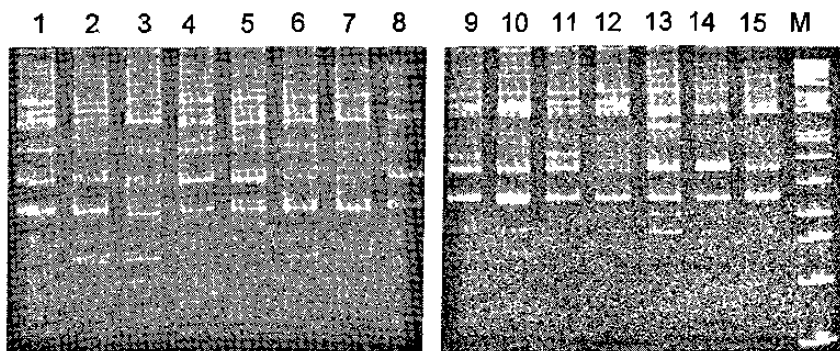


Fig. 5. Amplificación mediante la técnica RAPD, utilizando el iniciador 2 y DNA de 15 genotipos de papa procedentes de Coahuila. 1 = 91-9-3, 2 = Gigant, 3 = Atlantic, 4 = 91-12-2, 5 = Alfa, 6 = 91-10-1, 7 = 91-25-1, 8 = 72-00-88, 9= Montserrat, 10= Fiana, 11= Norteña, 12= Zafiro, 13= 57-50-12, 14= Atzimba, 15= Malinche y M= Marcador de peso molecular 1 Kb Plus.

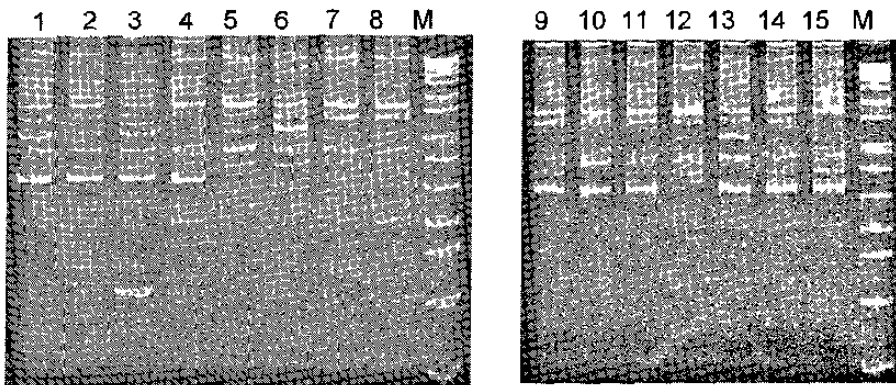


Fig: 6. Amplificación mediante la técnica RAPD, utilizando el iniciador 31 y DNA de 15 genotipos de papa procedentes de Coahuila. 1 = 91-9-3, 2 = Gigant, 3 = Atlantic, 4 = 91-12-2, 5 = Alpha, 6 = 91-10-1, 7 = 91-25-1, 8 = 72-00-88, 9= Montserrat, 10= Fiana, 11= Norteña, 12= Zafiro, 13= 57-50-12, 14= Atzimba, 15= Malinche y M= Marcador de peso molecular 1 Kb Plus.

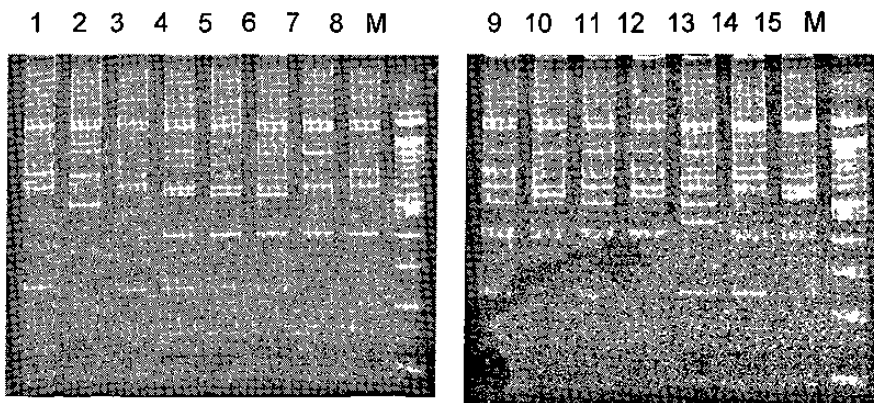


Fig. 7. Amplificación mediante la técnica RAPD, utilizando el par de iniciadores 23/30 y DNA de 15 genotipos de papa procedentes de Coahuila. 1 = 91-9-3, 2 = Gigant, 3 = Atlantic, 4 = 91-12-2, 5 = Alfa, 6 = 91-10-1, 7 = 91-25-1, 8 = 72-00-88, 9= Montserrat, 10= Fiana, 11= Norteña, 12= Zafiro, 13= 57-50-12, 14= Atzimba, 15= Malinche y M= Marcador de peso molecular 1 Kb

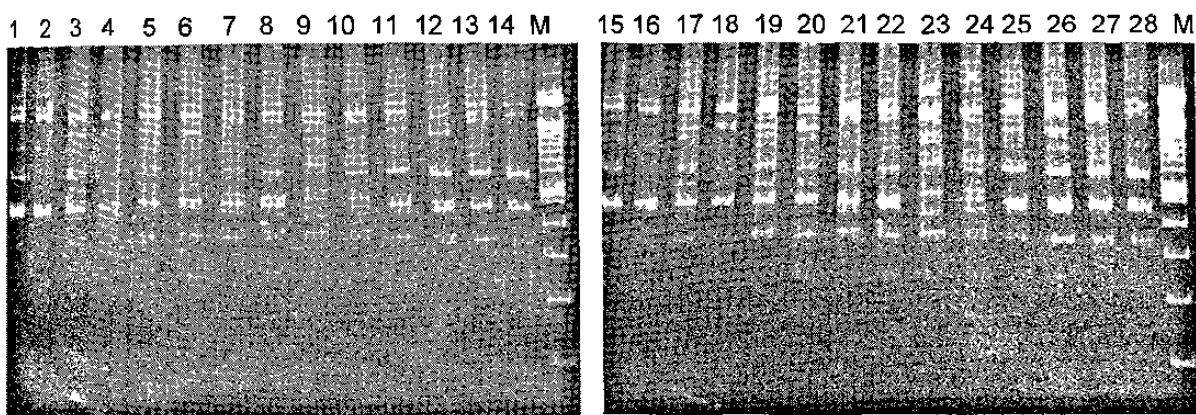


Fig. 8. Amplificación mediante la técnica RAPD, utilizando el iniciador 2 y diferentes materiales de papa procedentes del Estado de México. Carril 1-2= Marciana, Carril 3-4= Montserrat, Carril 5-6= Granola, Carril 7-8= Zafiro, Carril 9-10= Lady Rosetta, Carril 11-12= 4 – 11, Carril 13-14= Gigant, Carril 15-16= Malinche, Carril 17-18= Michoacán, Carril 19-20= Lupita, Carril 21-22= 67-60-08 Roja, Carril 23-24= Rosita, Carril 25-26= Alpha, Carril 27-28= Norteña, y M= Marcador de peso molecular Ladder 100.

Para tener la certeza de que no hubiese error tanto en el análisis molecular, electroforético y de los geles en ambos casos se corrieron en poliacrilamida al 6 % dos repeticiones de los productos de PCR realizados, observando exactamente el mismo patrón electroforético en los genotipos evaluados. Asimismo, los genotipos repetidos en ambas localidades se corrieron por separado obteniendo resultados similares.

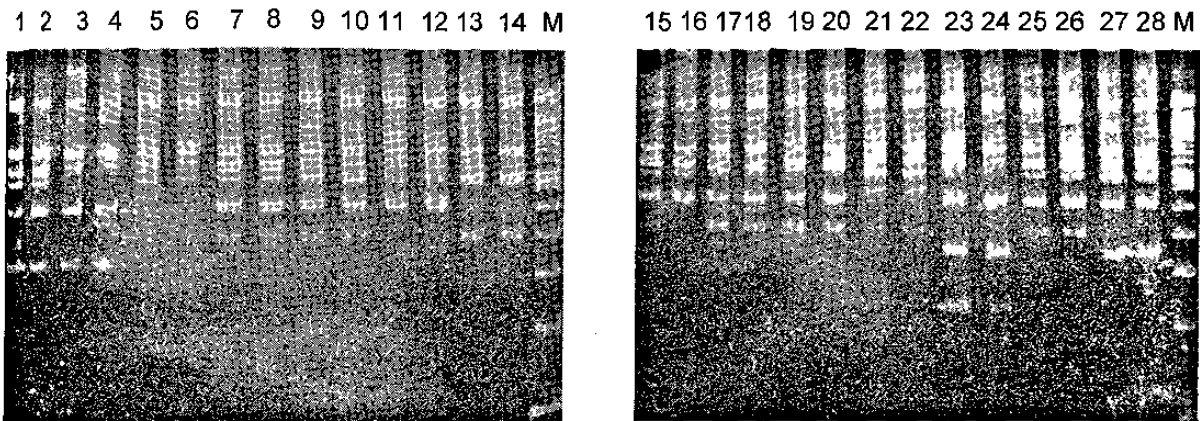


Fig. 9. Amplificación mediante la técnica de RAPD, utilizando el par de iniciadores 23/30 y diferentes materiales de papa procedentes del Estado de México. Carril 1-2= Marciana, Carril 3-4= Montserrat, Carril 5-6= Granola, Carril 7-8= Zafiro, Carril 9-10= Lady Rosetta, Carril 11-12= 4 – 11, Carril 13-14= Gigant, Carril 15-16= Malinche, Carril 17-18= Michoacán, Carril 19-20= Lupita, Carril 21-22= 67-60-08 Roja, Carril 23-24= Rosita, Carril 25-26= Alpha, Carril 27-28= Norteña y M= Marcador de peso molecular Ladder 100.

4.6.- Estandarización de la técnica de SSR o Microsatélites

Para los SSR o microsatélites se utilizaron los iniciadores M1 al M6, reportados por Ashkenazi, *et al.* (2000) y M7 al M12 utilizados por Ghislain *et al.* (2000) (Cuadro 3). Estos fueron seleccionados entre otras características por el número de genotipos que diferencian y al tamaño de fragmento que amplifican (Cuadro 4). Se corrieron tres reacciones de PCR para cada uno de los 15 genotipos evaluados.

En la prueba para estandarizar la concentración de DNA a utilizar en las reacciones de PCR se determinó que 50 ng de DNA es óptimo para llevar a cabo reacciones de PCR (Fig. 10). El par de iniciadores utilizados en las reacciones iniciales de PCR fueron M7F/M8R.

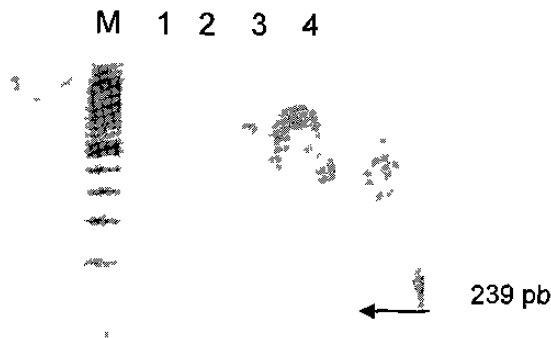


Fig. 10. Fragmentos amplificados en la técnica SSR con la línea avanzada 91-9-3, utilizando el par de iniciadores M7F/M8R.- Carril M= Marcador de Peso Molecular Ladder 100, Carril 1= 10 ng de DNA, Carril 2= 20 ng de DNA, Carril 3= 30 ng de DNA y Carril 4= 50 ng de DNA

En virtud de que con las condiciones reportadas por Ashkenazi *et al.* (2000), no se obtenían amplificaciones claras en las reacciones de PCR, se realizó una modificación incrementando de 30 a 35 el número de ciclos de la reacción.

Las primeras reacciones de PCR fueron fraccionadas en geles de poliacrilamida al 6 %, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta y finalmente fotografiadas para su análisis.

La sensibilidad de detección de los fragmentos amplificados en las PCR fue baja cuando los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (Fig. 11). Con la finalidad de reducir este problema, los geles fueron lavados para eliminar el bromuro de etidio y posteriormente se tiñeron con nitrato de plata al 0.2 %, incrementándose notablemente la sensibilidad de detección, lo que permitió diferenciar los materiales utilizados en el estudio (Fig. 12), aun así, fue necesario incrementar la molaridad de los iniciadores hasta 0.5 mM obteniendo finalmente amplificaciones mayores.

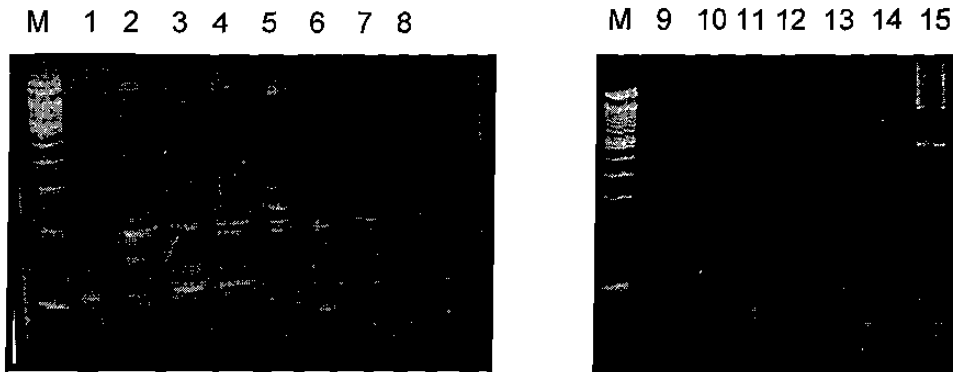


Fig. 11. Productos de amplificación de la PCR para microsatélites en 15 materiales de papa *Solanum tuberosum* L. procedentes de Coahuila, utilizando los iniciadores M7F/M8R. Gel teñido con bromuro de etidio. Carril M= Marcador de peso molecular Ladder 100, Carril 1= Línea 91-9-3, Carril 2= Gigant, Carril 3= Atlantic, Carril 4= Línea 91-12-2, Carril 5= Alpha, Carril 6= Línea 91-10-1, Carril 7= Línea 91-25-1, Carril 8= Línea 72-00-88, Carril 9= Montserrat, Carril 10= Fiana, Carril 11= Nortefia, Carril 12= Zafiro, Carril 13= Línea 57-50-12, Carril 14= Línea 72-00-45, Carril 15= Malinche.

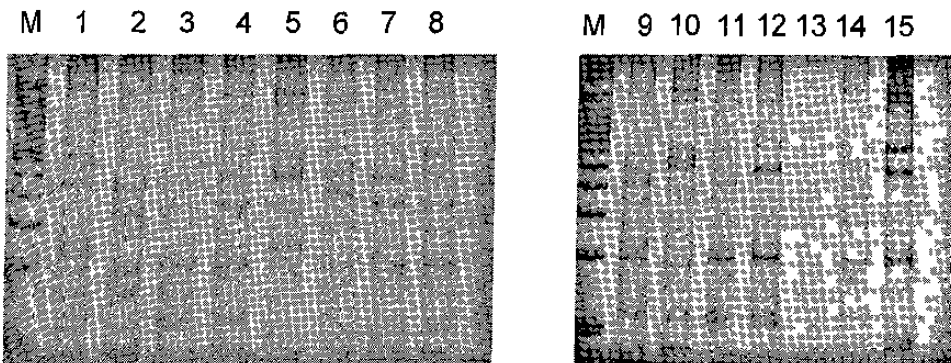


Fig 12. Productos de amplificación de la PCR para microsatélites en 15 materiales de papa *Solanum tuberosum* L., procedentes de Coahuila, utilizando los iniciadores M7F/M8R. Geles teñidos con Nitrato de Plata. Carril M= Marcador de peso molecular Ladder 100, Carril 1= Línea 91-9-3, Carril 2= Gigant, Carril 3= Atlantic, Carril 4= Línea 91-12-2, Carril 5= Alpha, Carril 6= Línea 91-10-1, Carril 7= Línea 91-25-1, Carril 8= Línea 72-00-88. Carril 9= Montserrat, Carril 10= Fiana, Carril 11= Nortefia, Carril 12= Zafiro, Carril 13= Línea 57-50-12, Carril 14= Línea 72-00-45, Carril 15= Malinche.

4.7.- Caracterización del germoplasma procedente de Coahuila mediante la técnica SSR

Con base en los resultados anteriores, las condiciones de reacción propuestas por Ashkenazi *et al.* (2000) fueron modificadas, evaluándose las condiciones propuestas por Ghislain *et al.* (2000).

Como se puede observar en la Figura 13, al utilizar en las PCR los iniciadores M1F/M2R y cambiar las condiciones de las reacciones, se pudieron obtener amplificaciones que permiten diferenciar los materiales evaluados

Después de finalizar la estandarización de la técnica de microsatélites se realizó el análisis de los materiales procedentes de Coahuila. Con el par de iniciadores M1F/M2R se diferenciaron claramente los genotipos evaluados (Fig. 13). Cuando se utilizó el par de iniciadores M3F/M4R los resultados fueron similares (Fig. 14).

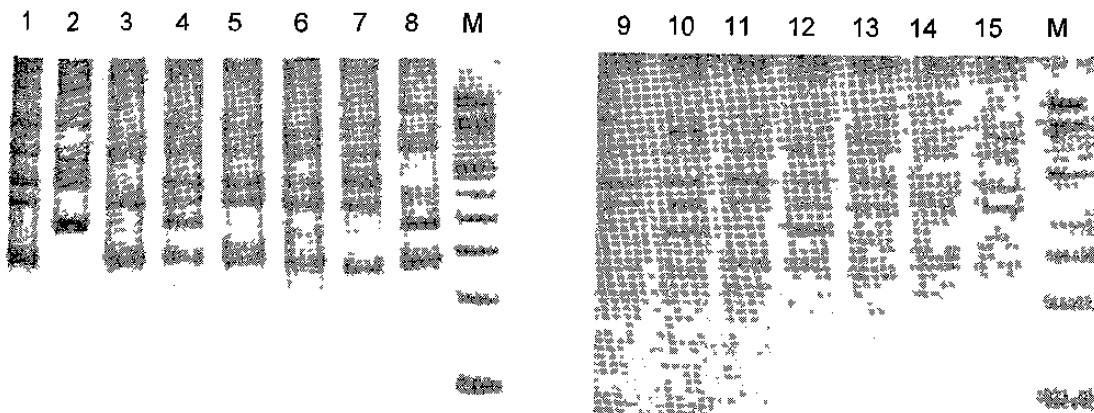


Fig. 13. Amplificación mediante la técnica de SSR utilizando el par de Iniciadores M1F/M2R y DNA de 15 genotipos de papa procedentes de Coahuila. Carril 1= 91-93, Carril 2= Gigant, Carril 3= Atlantic, Carril 4= 91-12-2, Carril 5= Alfa, Carril 6= 91-10-1, Carril 7= 91-25-1, Carril 8= 72-00-88, Carril 9= Montserrat, Carril 10= Fiana, Carril 11= Norteña, Carril 12= Zafiro, Carril 13= 57-50-12, Carril 14= Atzimba, Carril 15= Malinche y M= Marcador de peso molecular Ladder 100.

En general los resultados más consistentes se obtuvieron utilizando los pares de iniciadores M1F/M2R, M3F/M4R, M9F/M10R y M11F/M12R en la caracterización de los 15 genotipos procedentes de Coahuila mediante la técnica de SSR.

4.8.- Caracterización del germoplasma procedente del Estado de México mediante la técnica de SSR o Microsatélites

Con relación al germoplasma procedente del Estado de México, la técnica permitió diferenciar los 16 materiales de papa evaluados con los más eficientes pares de iniciadores utilizados en el germoplasma de Coahuila (M1F/M2R, M3F/M4R, M9F/10R y M11F/M12R). En general los ensayos SSR produjeron un total de 49 fragmentos (12.25 en promedio), donde se observó que 41 fragmentos (83.67 %) fueron polimórficos. El tamaño de los fragmentos amplificados fue de 150 a 850 pares de bases, aunque se observaron fragmentos de mayor y menor peso molecular (Fig. 14 y 15). Asimismo, en la estandarización y modificación del protocolo se pudieron diferenciar los productos de PCR para microsatélites tiñendo los geles con bromuro de etidio y nitrato de plata. En este caso en la electroforesis se adicionaron los productos de PCR de dos repeticiones con la finalidad de comparar los análisis del mismo genotipo y verificar su patrón de bandas. En la Figura 14 solo se incluye la comparación de 14 genotipos.

Los fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR utilizando los iniciadores M5F/M6R y M7F/M8R se observaron con menor intensidad por tal motivo se descartó este par de iniciadores en la caracterización del germoplasma. Con los iniciadores M9/M10 se obtuvieron fragmentos de alrededor de 300 pb y bandas más acentuadas, lo que hizo difícil su observación y separación entre fragmentos que tuvieron un peso molecular muy similar. Sin embargo, con algunas reducciones en la carga del producto de PCR se logró separar los fragmentos y se pudieron diferenciar correctamente.

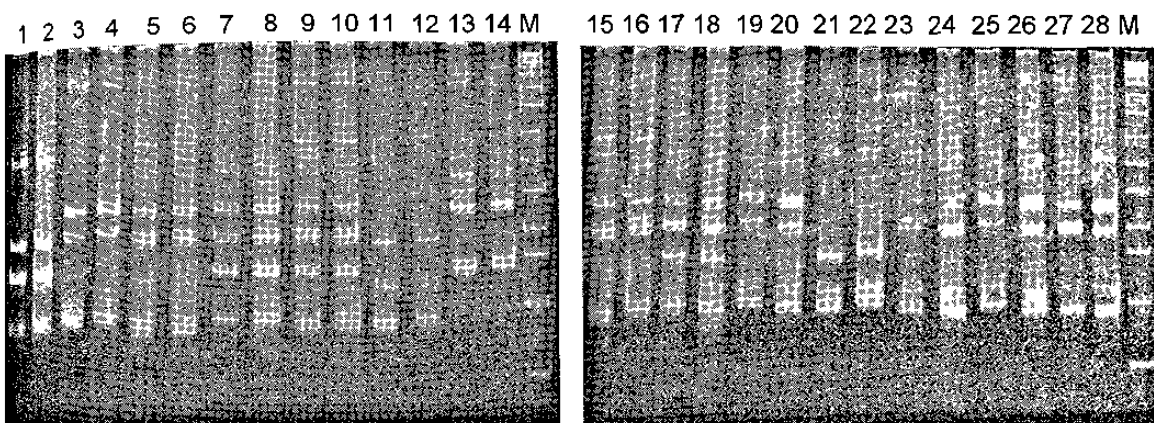


Fig. 14. Amplificación mediante la técnica de SSR utilizando el par de Iniciadores M1F/M2R y dos muestras de DNA de 14 genotipos de papa procedentes del Estado de México: Carril 1-2= Marciana, Carril 3-4= Montserrat, Carril 5-6= Granola, Carril 7-8= Zafiro, Carril 9-10= Lady Rosetta, Carril 11-12= 4 – 11, Carril 13-14= Gigant, Carril 15-16= Malinche, Carril 17-18= Michoacán, Carril 19-20= Lupita, Carril 21-22= 67-60-08 Roja, Carril 23-24= Rosita, Carril 25-26= Alpha, Carril 27-28= Norteña y M= Marcador de peso molecular Ladder 100.

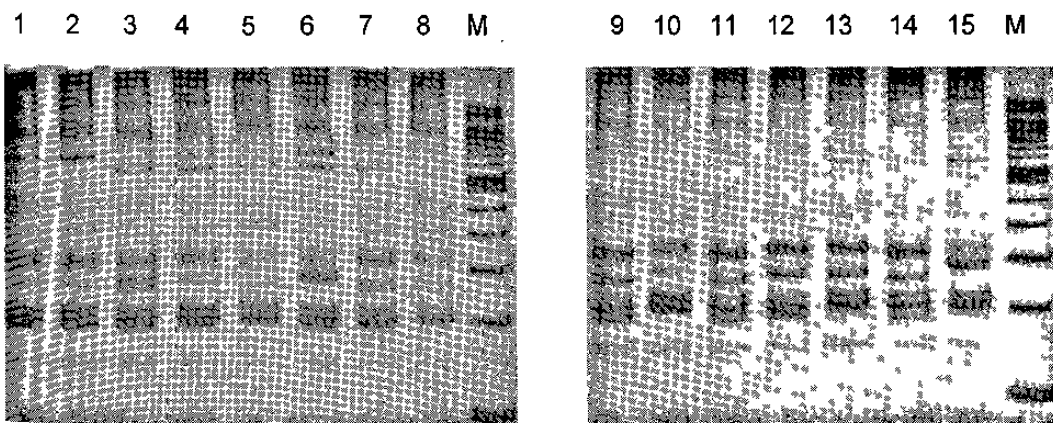


Fig. 15. Amplificación mediante la técnica de SSR utilizando el par de Iniciadores M3F/M4R y DNA de 15 genotipos de papa procedentes del Estado de México. Carril 1= Marciana, Carril 2= Montserrat, Carril 3= Granola, Carril 4= Zafiro, Carril 5= Lady Rosetta, Carril 6= 4 – 11, Carril 7= Gigant, Carril 8= Malinche, Carril 9= Michoacán, Carril 10= Lupita, Carril 11= 67-60-08 Roja, Carril 12= Rosita, Carril 13= Alpha, Carril 14= Norteña Carril 15= Nau 6 y M= Marcador de peso molecular Ladder 100. Gel de poliacrilamida al 6 % y teñido con Nitrato de plata.

En general se puede mencionar que los iniciadores seleccionados y utilizados en la técnica de microsatélites para diferenciar los 25 materiales evaluados funcionaron y pueden utilizarse para caracterizar molecularmente los diferentes genotipos de papa que se cultiven en el país así como las líneas avanzadas de los programas de mejoramiento del INIFAP.

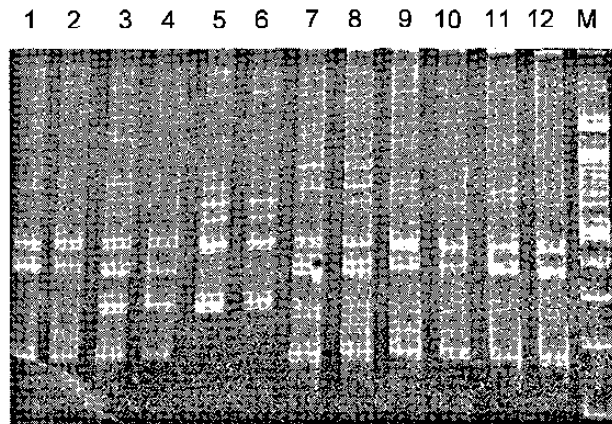


Fig. 16. Comparación de las variedades cultivadas en las localidades de Coahuila y el Estado de México, utilizando el par de Iniciadores M1F/M2R: Carril 1 y 2= Montserrat, Carril 3 y 4= Zafiro, Carril 5 y 6 = Gigant, Carril 7 y 8= Malinche, Carril 9 y 10= Alpha, Carril 11 y 12= Norteña, y M= Marcador de peso molecular Ladder 100.

Se compararon los materiales repetidos en ambas localidades, obteniéndose exactamente los mismos resultados por genotipo (Figura 16), situación que indica que las condiciones ambientales no tienen efecto sobre el componente genético de los genotipos.

4.9.- Comparación de la respuesta al daño causado por fitoplasmas en campo y su relación con los análisis moleculares

4.9.1.- Pardeamiento de tubérculos

Los valores de Severidad del Pardeamiento de Tubérculos (SPT) fueron obtenidos en el campo experimental Valle de México y fueron utilizados para comparar el comportamiento de los genotipos al daño causado por fitoplasmas en campo con los resultados del análisis molecular. De tal manera que se distinguieron tres

patrones de comportamiento de la SPT: a) las variedades Nau - 6, Alpha y Gigant presentaron una distribución de frecuencias ubicadas en el rango de leve a leve-moderado de la escala de severidad, con una SPT media de 3.15, 3.45, y 3.56, respectivamente; b) las variedades Granola, Michoacán, Rosita, Lupita, Malinche, Sancal y Zafiro presentaron una SPT media de 5.81, 5.89, 5.81, 5.96, 5.90, 5.90 y 5.96 respectivamente; c) las variedades Marciana, Montserrat y Norteña, presentaron una SPT media de 5.90, 5.91 y 6.09 respectivamente; este grupo se caracterizó por tener más del 90% de sus tubérculos con un nivel de pardeamiento de moderado-fuerte a fuerte (6 a 7 en la escala). Las diferencias en las distribuciones de frecuencias entre grupos fueron relativamente contrastantes, sólo el rango de valores y los extremos de severidad (mínimo y máximo) de los tubérculos del primer grupo (1 y 5, respectivamente) fueron claramente distintos a los otros dos grupos, cuya distribución fue más estrecha y con valores extremos (4 y 7) más altos y cercanos entre sí.

4.10.- Relaciones genéticas entre los genotipos procedentes de Coahuila

Las relaciones genéticas entre genotipos para cada sistema de marcador fueron calculadas utilizando la matriz de distancia propuestas por Nei y Li (1979). Los dendrogramas de cada sistema de marcadores muestran diferencias en la forma de agrupamiento de los diferentes genotipos (Fig. 17 y 18). En el primer caso, RAPD forma dos grupos diferenciales de genotipos; el primero es un grupo homogéneo donde se incluyen las variedades Atlantic, Gigant y Alpha, además de las líneas avanzadas 91-9-3, 91-10-1, 91-25-4 y 91-12-2. El otro grupo fue heterogéneo y se formó con las variedades Montserrat, Norteña, Fiana, Zafiro y las líneas 72-00-45 y 57-50-12; además a este grupo se adicionó la línea 72-00-88, siendo la variedad Malinche el genotipo más divergente.

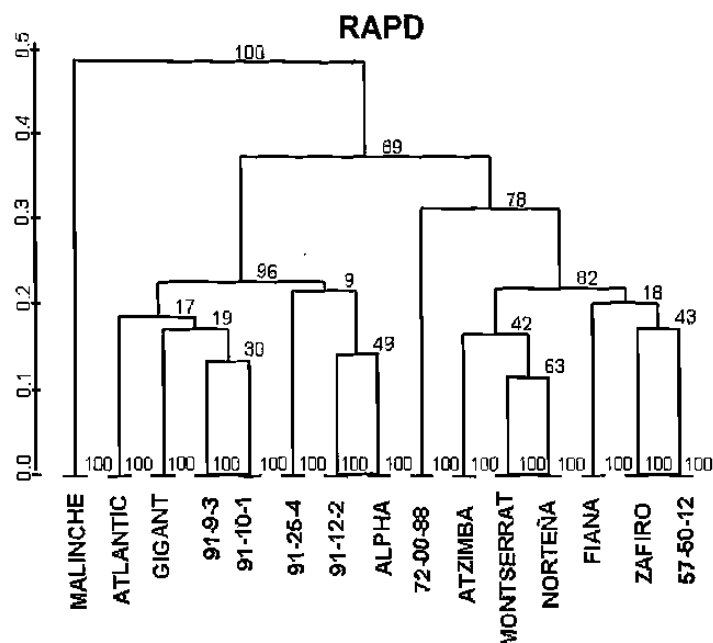


Fig. 17. Relaciones genéticas entre 15 genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.), procedentes de Coahuila. Resultado del análisis RAPD y la similaridad genética de Nei y Li (1979).

Por otra parte la técnica SSR formó seis grupos (Fig. 18), donde destaca la separación de la línea 72-00-88 que proviene de Argentina. También se observó que las variedades Norteña, Montserrat, y Fiana y los genotipos 72-00-88 y 57-50-12, permanecieron estrechamente relacionadas bajo los dos sistemas de marcadores, aún cuando no fue en el mismo orden.

Se observó una mayor divergencia entre genotipos en el dendrograma generado por los SSR debido probablemente a un menor número de ensayos, ya que no hubo diferencias estadísticas en el número de fragmentos amplificados. Lo anterior también se reflejó en los bajos intervalos de confianza Felsenstein para los SSR en comparación con RAPD.

tercer grupo es heterogéneo y se formó con dos subgrupos: en el primer subgrupo están Alpha, Michoacán y Lupita y en el otro se encuentran Malinche y Norteña. Con base en los grupos formados y en las genealogías de los genotipos evaluados, se determinó que los materiales con distancias genéticas muy cercanas son las variedades Montserrat y Marciana que tienen una distancia genética de 0.05 las cuales a su vez fueron los genotipos más divergentes del resto de los materiales evaluados (Fig. 19).

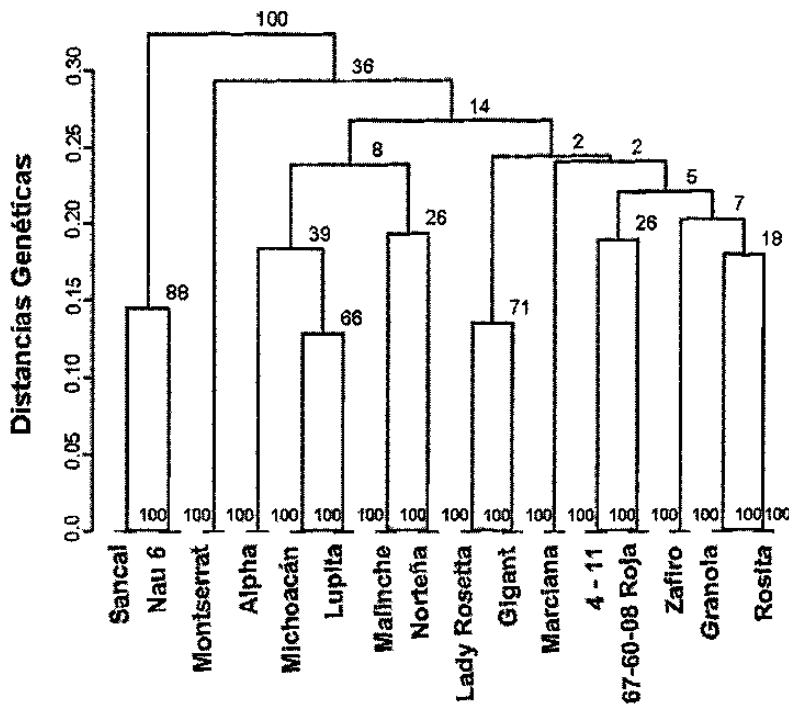


Fig. 19. Relaciones genéticas entre 16 genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.), procedentes del Estado de México. Resultado del análisis combinando datos RAPD y SSR y la similaridad genética de Nei y Li (1979).

4.12.- Comparación de la utilidad de los Marcadores en el germoplasma procedente de Coahuila

Con el fin de estimar la utilidad de cada sistema de marcadores, se calcularon algunos parámetros reportados por Powell *et al.* (1996 a), como el índice de diversidad (ID), la proporción múltiple efectiva (EMR) y el índice de marcador (IM), (Cuadro 6). Los altos o bajos niveles de polimorfismo determinan el nivel ID

genética presente en un grupo de individuos, en este caso se observó un buen nivel de diversidad en los genotipos evaluados tanto para RAPD como para SSR (46.7 y 42.9 % respectivamente). En el Cuadro 6 también se muestran las medias aritméticas para la EMR de cada sistema de marcadores. El promedio de EMR en RAPD fue de 9.47, mientras que para los SSR fue de 1, lo cual fue debido a que este sistema de marcador sólo revela un simple *locus*. En cuanto al índice de marcador fue de 4.49 y 0.85 para RAPD y SSR respectivamente.

Cuadro 6. Número de productos obtenidos por sistema de marcador, número de productos polimórficos, Índice de Diversidad (ID), Proporción Múltiple Efectiva (EMR) e Índice de Marcador (IM) en promedio de todos los ensayos.

Técnica	Total de análisis	# Total de Productos	Total de Prod. Polim.	Promedio de Prod. por Ensayo	% de Prod. Polimórficos	Media ID	EMR	IM
RAPD	25	395	296	14.42	70.94	46.7	9.47	4.49
SSR	6	79	70	13.17	88.61	42.9	1	0.85

4.13.- Comparación de la utilidad de los Marcadores en el germoplasma procedente del Estado de México

En este caso se observó un nivel de diversidad en los genotipos evaluados tanto para RAPD como para SSR (44.7 y 62.7 % respectivamente). En el Cuadro 8, se muestra un resumen de las medias aritméticas para la EMR de cada sistema de marcadores. El promedio de EMR en RAPD fue de 6.32, mientras que para los SSR fue de 1, lo cual fue debido a que este sistema de marcador sólo revela un simple *locus*. En cuanto al índice de marcador fue de 2.91 y 0.627 para RAPD y SSR, respectivamente.

4.14.- Comparación de la utilidad de los marcadores con el análisis de la respuesta al daño causado por fitoplasmas y su relación con los análisis moleculares

En este caso se observó un nivel de diversidad en los genotipos evaluados tanto para RAPD como para SSR del 79.2 %; se realizaron seis ensayos dos RAPD y cuatro SSR, se observó un 39 % de productos polimorfos en RAPD y 48 % en SSR; el índice de marcador fue superior en RAPD debido a que formó mayor número de fragmentos por ensayo datos que se resumen en el Cuadro 9.

Cuadro 7. Número de productos obtenidos por sistema de marcador, número de productos polimórficos, Índice de Diversidad (ID), Proporción Múltiple Efectiva (EMR) e Índice de Marcador (IM) en promedio de los ensayos realizados.

Técnica	Total de análisis	# Total de Productos	Total de Prod. Polim.	Promedio de Prod. por Ensayo	% de Prod. Polim.	Media ID	EMR	IM
RAPD	2	26	18	9.0	69.23	0.447	6.32	2.91
SSR	4	49	41	12.25	83.67	0.627	1	0.627

Cuadro 8. Número de productos amplificados por sistema de marcador, número de productos polimórficos, Índice de Diversidad, Proporción Múltiple Efectiva e Índice de Marcador en promedio de todos los ensayos.

Técnica	Total de ensayos	Productos Amplif.	Productos Polim.	Promedio de Prod. por Ensayo	Productos Polimórficos (%)	Media ID	EMR	IM
RAPD	2	40	39	20.0	97	.7918	19.02	15.05
SSR	4	49	48	16.3	98	.7918	1	0.82

ID = Índice de Diversidad
 EMR = Proporción Múltiple Efectiva
 IM = Índice de Marcador

Con la matriz de datos obtenidos de los 25 genotipos, se realizó un análisis de componentes principales (Fig. 20 y 21) para comparar el comportamiento de los materiales en campo al pardeamiento del tubérculo con el análisis molecular. Se formaron dos grupos diferentes, se observó claramente la dispersión de los genotipos evaluados, se logró diferenciar los genotipos por su origen (Fig. 20) y por la severidad de daño mostrado. Uno de los grupos se subdividió y en un subgrupo donde se encontraron los materiales que mostraron altos niveles de daño de pardeamiento del tubérculo mismos que fueron Montserrat, Norteña, Atzimba, Fiana, Zafiro y Malinche con las líneas 57-50-12, 91-10-1 y 91-25-4; en el otro lado los materiales que presentaron menor daño (Alpha, Atlantic, Gigant y las líneas avanzadas 91-12-2, 72-00-88 y 91-9-3). En el otro grupo las variedades Nau 6 y Sancal, se separaron del grupo de genotipos con alto nivel de daño, de los dos materiales indicados anteriormente Nau 6 fue la que presentó el más bajo nivel de daño por pardeamiento.

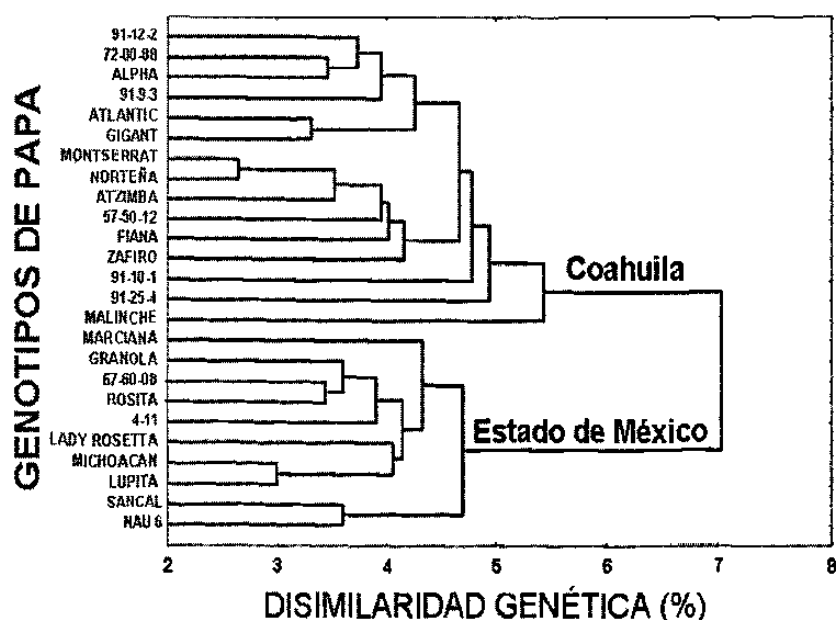


Fig. 20. Relaciones genéticas entre 25 genotipos de *Solanum tuberosum* L., procedentes de Coahuila y del Estado de México resultado del análisis combinando los resultados RAPD y SSR y la similaridad genética de Nei y Li (1979).

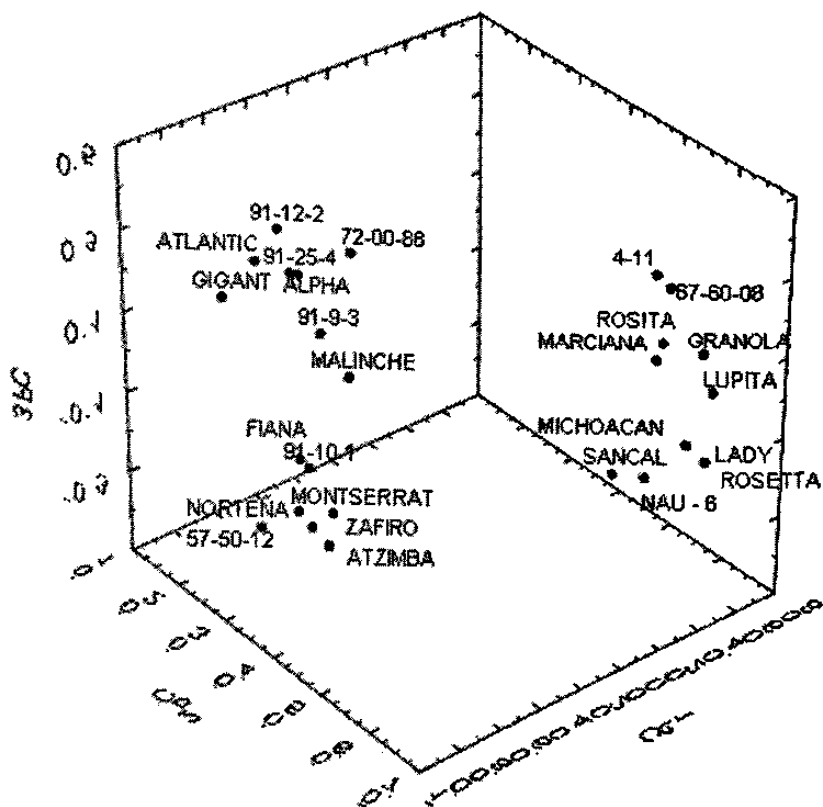


Fig. 20. Dispersión de 25 genotipos de papa con base en el análisis de componentes principales de datos RAPD y SSR.

V.- DISCUSIÓN

En años recientes, los esfuerzos en la investigación han sido enfocados a la caracterización del germoplasma y el establecimiento de las relaciones genéticas entre colectas, con el fin de hacer un uso y conservación más eficiente. El desarrollo de tecnologías basadas en el DNA ha permitido contar con un mayor número de marcadores como los RFLP y los basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Milbourne *et al.*, 1997). Aunque ha sido reportado que los marcadores RAPD tienen como desventaja no ser reproducibles entre laboratorios (Demeke *et al.*, 1993), en este trabajo se utilizaron tres plantas distintas por variedad y se corrieron tres ensayos diferentes en forma simultánea obteniendo resultados idénticos, lo que asegura una reproducción de los resultados y que el manejo de los genotipos fue el adecuado ya que no se detectó variación dentro de la misma variedad; estos resultados son similares a los reportados por Obara-Okeyo y Kako (1998) quienes mencionaron que sus aplicaciones fueron generalmente reproducibles y los ejemplos de sus aplicaciones exitosas en el método RAPD son muy conocidos. Asimismo se corrobora que los microsatélites tienen la ventaja de ser ampliamente reproducibles de fácil uso e implementación (Ghislain *et al.*, 2000; Kochieva, 2000; Provan 1996 a), ya que pueden detectar altos niveles de polimorfismo en *Solanum tuberosum*, por lo que pueden ser usados como una herramienta para detectar diferencias genéticas aun entre colectas relativamente cercanas (Ashkenazi *et al.*, 2000; Raker y Spooner 2002).

Con respecto a las relaciones genéticas observadas en los dendrogramas para cada sistema de marcador, la correlación fue baja ($r = 0.56$), ya que en ambas técnicas las variedades Nortefia, Montserrat, Fiana, 72-00-45 y 57-50-12, permanecieron estrechamente relacionadas bajo los dos sistemas de marcadores aún cuando no fue en el mismo orden, al igual que los genotipos 91-12-2, 91-10-1 y 91-25-4. En la técnica de SSR se logró una mejor discriminación entre genotipos ya que la línea 72-00-88 procedente de Argentina fue la más divergente;

situación que coincide con resultados obtenidos por varios investigadores (Ashkenazi, *et al.*, 2000; Milbourne *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1996 a y c; Raker y Spooner, 2002), quienes mencionan que esta técnica es muy eficiente en este tipo de investigaciones, debido a que es capaz de identificar variación en sitios determinados. Por otra parte, el hecho de que la variedad Malinche se desligue de los dos grupos generados en RAPD puede ser un indicador de que existe variabilidad genética que puede ser explotada en programas de cruzamiento donde se incluya esta variedad como progenitor. Las técnicas de SSR y polimorfismo del DNA amplificado al azar (RAPD) utilizadas en esta investigación diferenciaron los 25 genotipos evaluados y permitieron establecer las relaciones genéticas entre variedades (Cuadros 6, 7, y 8; Fig. 17, 18, 19 y 20). La similaridad genética estimada por la huella genética, es una herramienta útil en los programas de mejoramiento genético de papa ya que puede permitir la toma de decisiones en la selección de genotipos para ser usados en los programas de mejoramiento (Kochieva, 2000; Ghislain *et al.*, 2000; Milbourne *et al.*, 1997). También puede ser útil para proteger los derechos de propiedad del germoplasma liberado, así como en la producción y verificación de la pureza genética de semilla (Kochieva, 2000; Obara-Okeyo y Kako, 1998).

En este estudio el agrupamiento de unidades de distancias mínimas y promedios aritméticos propuesto por Nei y Li (1979), permitieron distinguir las diferencias genéticas existentes entre los 25 genotipos, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Miller y Spooner (1999) quienes encontraron altos niveles de polimorfismo utilizando la técnica de microsatélites en *Solanum tuberosum*; también mencionan que los microsatélites pueden ser una herramienta útil para detectar diferencias genéticas entre variedades cercanamente relacionadas. Por otra parte, con base en lo antes citado, el desarrollo de microsatélites en *Solanum tuberosum* analizada con el modelo propuesto por Nei y Li (1979), soportan las diferencias genéticas de la mayoría de los genotipos, como ha sucedido en otros estudios (Raker y Spooner 2002) quienes evaluando variedades cultivadas de

papa Chilenas y Andinas mediante microsatélites encontraron diferencias genéticas entre ellas, situación similar a lo encontrado en este estudio.

La diversidad genética evaluada a través de los análisis RAPD y SSR en papa mostraron un porcentaje muy similar (46 y 42%) en el germoplasma procedente de Coahuila, y (44.7 y 62.7%) en el germoplasma procedente del Estado de México (Cuadros 6 y 7), lo que puede ser un reflejo en la forma de variación observada por cada sistema de marcador, misma situación observada en soya por Powell *et al.*, (1996 a). Mientras que para la Proporción Múltiple Efectiva (EMR) los marcadores RAPD, presentaron valores mas altos que los SSR (9.4, 6.32 y 1, 1) para las dos localidades de origen, lo cual se considera normal debido a que se asume que SSR únicamente revela un solo locus, mientras que en el caso de los RAPD se asumió que cada banda pertenece a un locus distinto dada la naturaleza dominante de la técnica que al unirse en forma aleatoria al genoma ocupa un *locus* individual (Milbourne *et al.*, 1997). Por otra parte, si se considera que la papa es una especie tetraploide (Milbourne *et al.*, 1997; Miller y Spooner, 1999; Provan *et al.*, 1996), entonces se puede asumir que un *locus* o *alelo* podría existir en cuatro formas distintas, por lo tanto es contradictorio que en los análisis SSR se mencione que solo se esta amplificando un solo *locus*. Por lo tanto el valor de 1 asignado en EMR para SSR incide en bajos valores de índice de marcador (IM) para los SSR, aún cuando pueden ser usados algunas combinaciones de oligonucleótidos iniciadores que pueden revelar más de un *locus* (Milbourne *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1996 c).

Con respecto a la relación de la respuesta al daño causado por fitoplasmas en campo basados en la información generada en el campo experimental Valle de México y la matriz de datos generada con las técnicas moleculares y utilizando el análisis de disimilaridad genética propuesto por Nei y Li (1979), se generó un dendograma (Fig. 20), donde en primer lugar se diferenciaron los genotipos en base a su origen geográfico (Coahuila y Estado de México), resultados similares a los obtenidos por Raker y Spooner (2002) quienes diferenciaron germoplasma de

procedencia Chilena y Andina; también se discriminaron los genotipos que presentaron valores bajos de pardeamiento del tubérculo, como es el caso de las variedades Gigant, Atlantic, Alpha y las líneas avanzadas 91-9-3, 91-12-2 y 72-00-88, esta última procedente de Argentina. Las variedades Nau 6 y Sancal, formaron un grupo diferente del anterior y mostraron valores diferenciales, Nau 6 presentó el valor mas bajo de incidencia de pardeamiento. Sancal mostró un valor alto, lo cual se puede explicar por el hecho de que algún gen le confiere cierta tolerancia. Asimismo el análisis molecular agrupó los genotipos con valores altos de pardeamiento en dos grupos, esta característica también se observa en el gráfico tridimensional del análisis de componentes principales realizado, por una parte están los genotipos con valores bajos de pardeamiento y por otra parte aquellos genotipos con valores altos de pardeamiento (Fig. 21). Se observa que la variedad Malinche esta en un punto intermedio entre genotipos, lo cual es un indicador de que este material puede tener cierta tolerancia a este daño. Los resultados obtenidos pueden ser de gran ayuda en los programas de mejoramiento genético con énfasis en la búsqueda de genotipos tolerantes al daño por fitoplasmas, resultados similares a los reportados por Kochieva (2000) quien utilizando la técnica RAPD para la obtención de marcadores moleculares en papa y tomate logró obtener su huella genética y reporta que con este tipo de estudios se pueden complementar las técnicas tradicionales de mejoramiento genético de plantas y se pueden realizar programas de cruzamientos, proteger los derechos de autor y acelerar los programas de mejoramiento; por otra parte, corroboramos la consistencia de los resultados obtenidos en campo con los resultados de los análisis moleculares.

Con respecto al análisis de muestreo con reemplazo en el germoplasma procedente de Coahuila, los resultados obtenidos fueron consistentes debido al gran número de iniciadores utilizados y por ende al mayor número de análisis realizados, lo cual indica que aun y se haga uno o varios análisis los resultados serán el reflejo de la población y no un simple agrupamiento aleatorio, por lo tanto estos resultados soy altamente confiables (Felsenstein, 1985).

En el análisis de muestreo con reemplazo realizado para los genotipos procedentes del Estado de México solamente se observan cinco grupos con valores superiores al 30 % (Felsenstein, 1985), lo cual indica que de cada 1000 muestreos tomados al azar esos valores son altamente confiables, lo anterior se explica por el hecho de que fueron pocos análisis y en consecuencia poca información, por lo tanto es necesaria la realización de un mayor número de análisis o analizar los genotipos con mayor número de iniciadores o combinación de iniciadores, pues en ese caso solo se usaron cinco pares de iniciadores y uno individual (Ashkenazi, *et al.*, 2000; Baird *et al.*, 1992; Provan *et al.*, 1996).

Además de los datos antes citados, es importante considerar un amplio rango de caracteres para decidir que técnica se debe utilizar de acuerdo a las necesidades y propósitos de estudio. El costo económico de las diferentes técnicas juega un papel importante en la elección del sistema a utilizar. Para el caso de RAPD, se han reportado costos de 2310 dólares para la diferenciación de 100 genotipos, utilizando 100 iniciadores, lo cual es un costo aproximado de 23.1 dólares por genotipo identificado (Ragot y Hoisington, 1993). En el presente estudio fue alrededor de 28.5 dólares por genotipo identificado, comparando los costos es lógico que resultasen superiores pues desde su reporte a la fecha los costos en reactivos químicos y material de laboratorio se ha incrementado, situación que los hace superiores a lo reportado en la literatura. El costo estimado para los análisis SSR fue de 36 dólares por genotipo evaluado, en relación a lo anterior la literatura citada no involucró información referente a costos en SSR, por lo tanto se realizó la estimación y ésta se incrementa por el hecho que los iniciadores son más costosos, también los análisis SSR tienden a incrementarse cuando se desconoce la secuencia de los microsatélites y por lo tanto es necesario realizar clonación y secuenciación del DNA para poder identificar las secuencias microsatélites.

VI.- CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se corroboró la hipótesis planteada, lo cual nos permitió establecer las siguientes conclusiones:

1. Se optimizó el método de extracción del DNA a partir de muestras de papa.
2. Se realizó la optimización de la técnica de RAPD para la caracterización del germoplasma de papa.
3. Los iniciadores 2, 6, 18, 20, 23, 31, 33, 35 y 37 así como las combinaciones 6/10, 21/28, 23/30, 31/33, 31/35 y 35/37 utilizados en la técnica de RAPD permitieron diferenciar los 25 genotipos de papa evaluados.
4. Se realizó la optimización de la técnica de SSR o microsatélites para la caracterización del germoplasma de papa.
5. Los pares de iniciadores M1F/M2R, M3F/M4R, M9F/M10R y M11F/M12R utilizados en la técnica de SSR permitieron diferenciar a los 25 genotipos de papa evaluados.
6. Se obtuvo reproducibilidad de los resultados, lo que permite recomendar las condiciones descritas en este trabajo para estudios de caracterización molecular de un mayor número de material genético de papa con estas dos técnicas
7. Se corroboraron los resultados observados en campo con relación a la respuesta de los genotipos al pardeamiento del tubérculo utilizando los análisis moleculares.

8. Los genotipos Alpha, Gigant y Nau 6 mostraron índices bajos de daño por pardeamiento y Marciana, Montserrat, Norteña y Granola mostraron los mayores índices de daño.

9. Se identificaron marcadores moleculares RAPD y SSR posiblemente asociados con la tolerancia y susceptibilidad al daño causado por fitoplasmas

PERSPECTIVAS

Con base en las conclusiones obtenidas en este trabajo a futuro se pueden realizar purificación de DNA, clonación y secuenciación para la obtención de iniciadores específicos para identificar alguna variedad, como en el caso de Atlantic que con el iniciador 31 genera un fragmento único que a la vez puede estar asociado con la respuesta a alguna característica de interés en particular como lo puede ser mayor producción, calidad del tubérculo, precocidad, etc., y que puede ser aprovechado en programas de mejoramiento genético.

LITERATURA CITADA

- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., and Cregan, P.B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.
- Almeyda-León, I. H., Rocha, P.M.A., Piña, R.J., and Martínez, S.J.P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 1 – 9.
- Ashkenazi, V., Chani, E., Lavi, U., Levy, D., Hillel J., and Veilleux, R.E. 2000. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analysis. *Genome* 44:50-62.
- Ayliffe, A.M., Lawrence, G.J., Ellis, J.G., and Pryor, A.J. 1994. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic Acids Research* 22: 1632–1636.
- Báez, P.M. 1983. "La papa (*Solanum tuberosum* L.)". Monografía. UAAAN, Buenavista, Saltillo, México.
- Baird, E., Cooper-Bland, S., Waugh, R., De Maine, M., and Powell, W. 1992. Molecular characterization of inter-specific and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular General Genetics* 233: 469-475.
- Becerra, V.V., and Paredes, C.M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica (Chile)* 60 (3): 270-281.
- Berloo, R. 2000. Use of molecular markers in plant breeding. Landbouwniversiteit Wageningen, The Netherlands.
- Bidochka, M.J., McDonald, M.A., St Leger, R.J., and Roberts, D.W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 25: 107–113.

- Bowcock, A.M. Ruiz. L. A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J.R., and Cavalli, S. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites, *Nature* 368: 455-457.
- Broun, P., and Tanksley, S.D. 1996. Characterization and genetic mapping of simple repeats sequences in the tomato genome. *Molecular General Genetics* 250: 39-49.
- Bruford, M.W., and Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 3: 939–943.
- Bryan, G., De Jong, W., Provan, J., Milbourne, D., McNicoll, J., Davidson, J., Ramsay, G., and Waugh, R. 1999. Potato genomics: a general strategy for the molecular genetic characterization of *Solanum* germplasm. *Breeding and Genetics* pp 101-104.
- Cadena-Hinojosa, M.A., Guzmán, P. R., Díaz, V.M., Zavala, Q. T.E., Quintana, O., Magaña, T.S., Almeyda, L. I.H., López, D.H., Antonio Rivera, P.A., y Rubio, C.O. 2003. Distribución, Incidencia y Severidad del Pardeamiento y la Brotación Anormal en los Tubérculos de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en Valles Altos y Sierras de los Estados de México, Tlaxcala y el Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 248 – 259.
- Carlson, J.E., Tulsieram, L.K., Glubitz, J.C., Luk, V.W.K., Kuffeldt, C., and Tutledge, R. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 194–200.
- Carrasco, A., Ruiz de G. J. I., y Ritter, E. 1998. Caracterización morfológica, cariotípica y molecular de tres somaclones de *Solanum tuberosum* L. obtenidos mediante cultivo de protoplastos. *Invest. Agr. Prod. Prof. Veg.* Vol. 13 (3): 385-391.
- Conduit, R., and Hubbel, S.P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- Demek, T., and Adams, R.P. 1994. The use of PCR-RAPD analysis implant taxonomic and evolution. pp 179-214. In: *PCT Technology Current Innovations*. Ed. By Hugh G. Griffing and Annette M. Griffing, CRC Press.

- Demeke, T., Kawchuk, L.M. and Lynch, D.E. 1993. Identification of potato cultivars and clonal variants by random amplified polymorphic DNA analysis. *American Potato Journal* 70: 561 – 570.
- Echt, C.S., Erdahl, L.A., and McCoy, T.J. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35: 84–87.
- Edwards, K.J. 1998. Randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD). In: Karp, A., Isaac, P.G., and Ingram, D.S. (eds): *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, Cambridge, Vol. 1: 171–175.
- Fahima, T., Röder, M.S., Wendehake, V.M., Kirzhner, V.M., and Nevo, E. 2002. Microsatellite polymorphism in natural populations of wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theor Appl Genet* 104: 117-29.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
- Ferroni, M.A. 1981. El potencial de la papa como recurso alimenticio y como fuente de ingreso. México-INIA-PRECODEPA. Publicación Especial 30 p.
- Francisco, L.V., Langston, A.A., Mellersh, C.S., Neal, C.L., and Ostrander, E.A. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7: 359–362.
- Ghislain, M., Rodríguez, F., Villamón, F., Núñez, J., Waugh, R., and Bonierbale, M. 2000. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. CIP Program Report. 1999-2000. pp 167-174.
- Giese, H., Holm-Jensen, A.G., Mathiasen, H., Kjaer, B., Rasmussen, S.K., Bay H., and Jensen, J. 1994. Distribution of RAPD markers on linkage map of barley. *Hereditas* 120:267–273.
- Giovannoni, J.J., Wing, R.A., Ganai, M.W., and Tanksley, S. 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Research* 19: 6553–6558.

- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., and Feldamn, M.W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463–471.
- González Ch. M., y Simpson, J. 1997. Diversidad genética en hongos (origen y análisis). pp. 4-23. En: *Tópicos Selectos de Fitopatología: Genética Molecular*. Martínez S. J. P., y Martínez E. A .D. (ed.). CINVESTAV. Unidad Irapuato. Guanajuato, México.
- Gorg, R., Schachtschabel, U., Ritter, E., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1992. Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Science*. 32: 815-819.
- Hallden, C., Hasem, M., Nilsson, N. O., Herjdin, A., and Sall, T. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1185–1192.
- Hamada, H., Petrino, M.G., and Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6465-6469.
- Hunt, G.J., and Page, R.E. 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 15–20.
- Igloi, G.L. 1983. A silver stain for detection of a nanogram amounts of RNA following two-dimensional electrophoresis. *Annual Biochemistry*. 134: 184-188.
- IDIAP. 1983. *Investigaciones en papa*. Panamá.
- Kashi, Y., King, D., and Söller, M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genetics* 13:74-78
- Kashi, Y., and Söller, M. 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein, D.B., Schlotterer C. (eds) *Microsatellites: Evolution and application*. Oxford University Press. pp 10-23.
- Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S., and Thomas, M.R. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. *Genome* 38: 349-355.

- King, D. G., and Söller, M. 1999. Variation and fidelity: The evolution of simple sequence repeats as functional elements in adjustable genes. In: Wasser, S.P. (ed) Evolution theory and processes: modern perspectives. Paper in honor of Eviatar Nevo. Kluwer, The Netherlands. pp 65-82.
- King, D. G., Söller, M., and Kashi, Y. 1997. Evolutionary turning knobs. *Endeavor*. 21: 36-40.
- Kochieva, E.Z. 2000. Molecular markers of potato and tomato species and cultivars Genome. N.I. Vavilov. Institute of General Genetics. Moscow, Russia. pp 14 – 23.
- Khumar, S.M.P., Singh, R.A., and Kaley, D.M. 1988. Mycoplasma-associated potato diseases and their control in India. Pages 285-316 in *Mycoplasma Diseases of Crops: Basic and Applied Aspects*, K. Maramorosch and S.P. Raychaudhuri, eds. Springer-Verlag, NY. 456 pp.
- Litt, M., and Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetic* 44: 397-401.
- Lodhi, M.A., Daly, M.J., Ye, G.N., Weeden, N.F., and Reisch, B.I. 1995. A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome*. 38: 786–794.
- Mailer, R.J., Scarth, R., and Fristensky, B. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 697–704.
- Martin, G.B., Williams, J. G.K., and Tanksley, S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2336-2340.
- Metakovsky, E.V. 1991. Gliadin allele identification in common wheat II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *Journal Genetic Breeding* 45: 325–344.
- Michelmore R.W., and Hulbert S.H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology* 25: 383-404.

- Michelmore, R.W., Paran, I., and Kesseli, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9828–9832.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., and Waugh, R., 1997. Comparison of PCR-based markers systems for the analysis of genetics relationships in cultivated potato. *Molecular breeding*. 3: 127-136.
- Miller, L.T., and Spooner, D.M. 1999. Collapse of species boundaries in the wild potato *Solanum brevicaule* complex (Solanaceae, S. sect. Petota): Molecular data. *Plant Syst. Evol.* 214: 103-130.
- Morgante, M., and Olivieri, A.M. 1993. PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3: 175-182.
- Morin, P.A., and Woodruff, D.S. 1996. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. In: Wayne, R.K., and Smith, T.B. (eds): *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, Oxford University Press, New York: 298–313.
- Mullis, K.B., and Fallona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymologist* 155: 335–350.
- Nei, M. and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76: 5269-5273.
- Obara-Okeyo, P., and Kako, S. 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 99: 5–101.
- Ovesná, J., Polaková, K., and Leisová L. 2002. DNA Analyses and their Applications in Plant Breeding. *Czech Journal. Genetic. Plant Breeding* 38 (1): 29–40.

- Pecina-Quintero, V., Martínez, de la V. O., Alvarado, B. M. J., Vandemark, J. G., y Williams, A. H. 2001. Comparación de dos sistemas de marcadores moleculares en el análisis de las relaciones genéticas de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19 (2): 128–139.
- Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Stoles, G., Molnar, S.J., and Fedak, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *RCR Meth Appl* 2: 341-345.
- Perazzo, G., Panta, A., Rodríguez, F., Gómez, R., Toledo, J., Huamán, Z., Ghislain, M., Golmirzaie, A.M., and Roca, W. 2000. Clonal true-to-type verification of potato accessions retrieved from in vitro conservation and cryopreservation. *CIP Program Report* pp 175 – 183.
- Pereras, L., Bryan, G., and Russell, J. 1999. Identification and characterization of microsatellite loci in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut populations in Sri Lanka. *Molecular Ecology* 8:344-346.
- Polaková, K., Ovesná, J., and Leisová, L. 2001. Identification of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars using microsatellite analyses. *Czech Journal Genetic Plant Breeding* 46: 23–28.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanaffey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A. 1996 a. The comparisons of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Molecular Breeding*. 2: 225-238.
- Powell, W., Gordon, C. M. and Provan, J. 1996 b. Polimorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*. 1 (7): 215 – 222.
- Powell, W., Morgante, M., Doyle, J.J., McNicol, J.W., Tingey, S.V. and Rafalski, A.J. 1996 c. Genepool variation in genus *Glycine* subgenus *soja* revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. *Genetics* 144: 793-803.

- Provan, J., Kumar ,A., Shepherd, L., Powell, W., and Waugh, R. 1996 a. Analysis of intra specific somatic hybrids of potato (*Solanum tuberosum*) using simple sequence repeats. *Plant Cell Rep.* 16: 196-199.
- Provan, J., Powell, W., and Waugh, R. 1996 b. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 1078-1084.
- Rafalski, J.A., Vogel, J.M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C., and Tingey, S.V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: Birren, B., Lai E. (Eds) *Non mammalian Genomic Analysis: A practical guide*, Academic Press.
- Ragot, M., and Hoisington, D.A. 1993. Molecular markers for plant breeding: comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs. *Theoretical and Applied Genetic.* 86: 975-984.
- Raker, M.C., and Spooner, D.M. 2002. Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data. *Crop Science* 42: 1451-1458.
- Reiter, R.S., Williams, J.G.K., Feldmann, K.A., Rakalski, J.A., Tingey, S.V., and Scolnik, P.A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1477–1481.
- Riedy, M.F., Hamilton, W.J., and Aquadro, F.C. 1992. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Research* 20: 918.
- Rohde, W., and Becker, D. 1999. Analysis of coconut germoplasm by DNA marker technologies and sequence data. III. International Workshp and Laboratory Course on "The Application of Biotechnology to Plant Breeding and Crop Protection in Coconut". Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Rongwen, J., Akkaya, M.S., Bhagwat,A.A., and Cregan, P. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 43-48.

- Russell, R.J., Fuller, D.J., Macaulay, M., Hatz, B.G., Jahoo, A., Powell, W., And Waugh, R. 1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accessions detected by RFLP's, AFLP's, SSR and RAPD. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 714-722.
- Russel J. 1999. Assessing genetic diversity in coconut germoplasm using molecular markers. III. International Workshop and Laboratory Course on "The Application of Biotechnology to Plant Breeding and Crop Protection in Coconut". Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2002. Anuario estadístico de información agropecuaria. SIACON. México.
- Saghai – Maroof, M.A., Biyasher, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q., and Allard, R.W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and populations dynamics. *Proc. Natl. Academy Science USA*. 91: 5466-5470.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., and Stoffel, S. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Salazar, L.F. 1998. Fitoplasmas, un factor negativo para la producción de semilla de papa. In: Info Papa Foro de discusión sobre investigación en papa en América Latina. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.
- Samuels G.J., and Seifert K.F. 1995. The impact of molecular characters on syntematic of filamentous ascomycetes. *Annual Review Phytopathology* 33: 37-67.
- Schutzbank, T. E., and Stern, H.J. 1993. Principles and applications of the polymerase chain reaction. *JIFCC*. 5: 96–104.
- SEP. 1983. "Papas". Manuales para la educación agropecuaria. 1ra. Edición, Editorial Trillas, S.A. de C. V. México, D.F.

- Shariflou, M.R., Hassani, M.E., and Sharp, P. J. 2001. A PCR based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the *Wx-D1* gene of wheat. *Plant Breeding* 120: 121–124.
- Silver, L.M., 1992. Bouncing off microsatellites. *Nat. Genet.* 2: 8-9.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics* 139: 463–471.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., and Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Horticulture Science*, 31: 729–741.
- Stuber, C.W., and Khanna, K.R. 1991. Isozyme markers and their significance in crop improvement. *Biochemical aspects of crop improvement*. CRC Press. Boca Raton. USA. pp 59–77.
- Tautz, D., and Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 12:4127–4128.
- Thomas, M.R., and Scott, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence - tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 86: 985-990.
- Tinker, N.A., Fortin, M.G., and Mather, D.E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 976–984.
- Ugent D. 1968. The potato in México: Geography and primitive culture. *Economic Botany U.S.A.* 22: 108-123.
- Vapa, L., and Radovic, D. 1998. Genetics and molecular biology of barley hordeins. *Cereal Res. Comm.*, 26: 31–38.
- Wang, G., Whittam, T.S., Berg, C.M., and Berg, D.E. 1993. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Research* 21: 5930–5933.
- Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G., and Tanksley, S.D. 1994. Survey of plant Short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6.

- Waugh, R., and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Cell and Molecular Genetics*. Scottis Crop Research Institute. Focus. 10:186-191.
- Weber, J.L., and May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal Human Genetic* 44: 388-396.
- Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213–7218.
- White, T.J., Madej, T., and Persing, D.H. 1992. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. Clin. Chem.*, 29: 161–196.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymology* 218: 705–740.
- Wu, K.S., and Tanksley, S.D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular General Genetics* 241: 225-235.
- Yang, X., and Quiros, C.F. 1995. Construction of a genetic linkage map in celery using DNA based markers. *Genome* 38: 36–44.
- Yu Y.G., Saghai-Maroo, M.A., Buss, G.R., Maughan, P.J., and Tolin, S.A. 1994. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology* 84: 60-64.
- Ziegle, J.S., Su, Y., Corocran, K.P., Nie, L., Mayrand, E., Hoff, L.B., McBride, L.J., Kronick, M.N., and Diehl, S.R. 1992. Application of automated sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14: 1026–1031.

