



Agronomía Costarricense
ISSN: 0377-9424
rac.cia@ucr.ac.cr
Universidad de Costa Rica
Costa Rica

Valverde, Roberto
Mapeo genético y detección de QTLs en especies de Solanum
Agronomía Costarricense, vol. 31, núm. 2, julio - diciembre, 2007, pp. 31-47
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43631207>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

MAPEO GENÉTICO Y DETECCIÓN DE QTLs EN ESPECIES DE *Solanum*

Roberto Valverde*

Palabras clave: QTL, *Solanum*, resistencia al frío, aclimatación, mapeo genético.

Keywords: QTL, *Solanum*, frost hardiness, acclimation, genetic mapping.

Recibido: 05/03/2007

Aceptado: 17/08/2007

RESUMEN

Con el objetivo de mostrar las técnicas de mapeo genético y QTL, así como el potencial de una de las especies silvestres de *Solanum*, se investigó las bases moleculares de la resistencia al frío en 2 especies silvestres. Inicialmente, se procedió con la construcción de un mapa genético y posteriormente con el análisis de QTL (Quantitative trait locus) tanto para la resistencia como para la aclimatación al frío. Se utilizó una población F_1 de 73 individuos, proveniente de un cruce recíproco entre *S. commersonii* y *S. cardiophyllum*. En el estudio 420 RAPDs (random amplified polymorphic DNA) y 64 AFLP (amplified fragment length polymorphism) correspondientes a combinaciones de *EcoRI*/*MseI* fueron evaluados en ambas especies parentales. Se obtuvo 953 polimorfismos, donde 177 fueron específicos de *S. commersonii* y mostraron una segregación 1:1 en la población F_1 . El análisis de ligamiento dio como resultado 95 marcadores ubicados en 12 grupos de ligamiento, que corresponden al número haploide de esta especie. El tamaño acumulado de este mapa, específico de *S. commersonii*, fue de 194,5 cM, con un promedio de 2,05 cM entre loci. El análisis de QTL reveló la presencia de un sólo QTL para la aclimatación al frío. Y el análisis de regresión múltiple identificó 2 marcadores que explican el 22,3% de la variación en la resistencia al frío y 5 marcadores que explican el 43,8% de la variación relacionada con la aclimatación al frío.

ABSTRACT

Genetic mapping and detection of QTLs in *Solanum* species. With the objective of showing the genetic mapping and QTL analysis techniques, as well as the potential of one of the wild *Solanum* species, the molecular basis of frost hardiness traits in this species was investigated. As a first step, a genetic map construction was initiated and quantitative trait locus (QTL) analysis of frost hardiness and cold acclimation performed. A pseudo-testcross F_1 population consisting of 73 individuals, segregating for both frost hardiness and cold acclimation, was derived from a cross between *Solanum commersonii* and *S. cardiophyllum*. A total of 420 RAPD (random amplified polymorphic DNA) primers and 64 AFLP (amplified fragment length polymorphism) *EcoRI*/*MseI* primer combinations were screened on both parents to generate a total of 953 polymorphisms; of them, 177 markers were *S. commersonii* specific and showed 1:1 segregation in the F_1 population. The linkage analysis resulted in a 95-marker-map with 12 linkage groups, corresponding to the haploid number of this species. The cumulative length of this *S. commersonii*-specific map is 194.5 cM, with an average of 2.05 cM between contiguous loci. QTL analysis using simple interval and simple composite interval mapping revealed only 1 significant QTL for cold acclimation. Multiple regression analysis identified 2 markers that accounts for 22.3% of the variation in frost hardiness and 5 markers that jointly accounted for 43.8% of the variance in cold acclimation potential.

* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Correo electrónico robertov@cariari.ucr.ac.cr

INTRODUCCIÓN

La papa es cultivada principalmente en la zona temperada y en las partes altas de los Andes en América del Sur, donde las heladas con frecuencia reducen la producción así como la calidad del cultivo (Barrientos *et al.* 1994, Estrada *et al.* 1993, Vega y Bamberg 1995). La papa cultivada, *Solanum tuberosum*, tiene muy poca resistencia al frío, mientras que muchas de las especies silvestres, que no producen tubérculos o estos son pequeños, son mucho más resistentes (Chen y Li 1980). Como las especies silvestres son fuente potencial de genes de resistencia al frío, muchos genotipos han sido evaluados para esta característica (Chen y Li 1980, Hanneman y Bamberg 1986, Li 1977, Palta y Li 1979, Vega y Bamberg 1995).

En los estudios con especies silvestres también se encontró que algunas especies como *S. acaule* y *S. commersonii* son capaces de aclimatarse al frío, pero otras como *S. cardiophyllum* y *S. tuberosum* no tienen esta capacidad (Chen y Li 1980). De acuerdo con esta información sería deseable combinar el gran potencial de producción de *S. tuberosum* con la resistencia al frío de parientes silvestres como *Solanum commersonii*, que ha sido la mayor fuente de resistencia al frío. Esto puede ser posible transfiriendo los genes de resistencia al frío de las especies silvestres de *Solanum* a las especies cultivadas mediante mejoramiento convencional (Estrada 1987), o por hibridación somática (Cardi *et al.* 1993a,b, Nyman y Waara 1997); sin embargo, estos procesos toman tiempo, y la información que hay acerca de la herencia de la resistencia al frío en especies de *Solanum* es escasa.

La base genética de la resistencia al frío en muchos cultivos ha sido considerada como una herencia poligénica (Limin y Fowler 1983, Thomashow 1990). Esta característica de la herencia de resistencia al frío ha sido estudiada a través de técnicas de análisis cuantitativos (Eunnus *et al.* 1962). En las especies de *Solanum* el modo en que se heredan la resistencia y la aclimatación al frío ha sido estudiado en poblaciones

F₁ y retrocruces de *Solanum commersonii* y *S. cardiophyllum* (Stone *et al.* 1993). Estas 2 especies tienen una capacidad contrastante para la resistencia y la aclimatación al frío. *S. commersonii* es una especie resistente, que además tiene la capacidad de aclimatarse al frío, mientras que *S. cardiophyllum* es sensible al frío y no se aclimata. Los autores encontraron además, que ambas características tienen un control genético diferente. Más aún, los análisis de medias indicaron que la varianza para ambas características puede ser explicada mediante un modelo de dominancia aditiva donde ambas características se comportan como parcialmente recesivas. El hecho de que ellos pudieran recuperar los genotipos parentales en poblaciones pequeñas, provenientes de los retrocruces, sugiere que ambas características están controladas por relativamente pocos genes.

Por lo anterior y con el objetivo de dilucidar las bases moleculares de la resistencia y la aclimatación al frío en especies de *Solanum*, se siguió la metodología descrita por Stone *et al.* (1993) para producir progenies F₁ y de retrocruces provenientes del cruce entre *S. commersonii* y *S. cardiophyllum*.

Con el uso de marcadores moleculares se construyó un mapa genético, el cual representa el genotipo de *S. commersonii*. A los individuos de la población se les realizó un estudio sobre la expresión de la resistencia al frío *per se*, así como de la capacidad de aclimatación; esto fue posible mediante la medición de los iones liberados por secciones de hojas sometidas a diferentes temperaturas, la técnica ha sido utilizada ampliamente (Chen *et al.* 1999a,b, Carputo *et al.* 2003, Iovene *et al.* 2004). Esta información representa el fenotipo del individuo. Al unir la información referente al genotipo y al fenotipo del individuo se puede realizar el análisis de QTLs (Tinker y Mather 1995).

El QTL es una herramienta muy útil en la disección de características genéticas complejas, como la resistencia al frío, por ejemplo. QTLs relacionados con la resistencia al frío han sido detectados en cebada (Hayes *et al.* 1993, Pan *et al.* 1994), trigo (Galiba *et al.* 1995), una Brásica

oleaginosa (Teutonico *et al.* 1995), y eucalipto (Byrne *et al.* 1997). También en cebada se ha hecho análisis de QTL relacionados con la resistencia a enfermedades (Sato *et al.* 2001).

En papa, han sido construidos una serie de mapas de ligamiento (Bradshaw *et al.* 1998, Freyre *et al.* 1994, Gebhardt *et al.* 1991, Jacobs *et al.* 1995, Meyer *et al.* 1998, Melbourne *et al.* 1998, Rouppe van der Voort *et al.* 1997, 1998a,b, Tanksley *et al.* 1992, van der Berg *et al.* 1996a,b, Yenke *et al.* 1998, Tommiska *et al.* 1998). Estos mapas han sido utilizados con mucho éxito para localizar QTLs asociados con la resistencia a diferentes especies de nematodos formadores de quistes (Bradshaw *et al.* 1998, Rouppe van der Voort *et al.* 1998b), dormancia de tubérculos (Freyre *et al.* 1994, van der Berg *et al.* 1996b), tuberización (van der Berg *et al.* 1996a), resistencia al tizón tardío (Meyer *et al.* 1998), y contenido de ácido abscísico relacionado con la dormancia (Simko *et al.* 1997).

Los objetivos del presente estudio fueron: 1- iniciar la construcción de un mapa de ligamiento basado en los marcadores moleculares RAPD y AFLP; y realizar un análisis de QTL para determinar las asociaciones entre los marcadores moleculares y la resistencia y aclimatación al frío en *S. commersonii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Dos especies silvestres diploides del género *Solanum*, fueron utilizadas para este estudio. *Solanum commersonii* Dun (**cmm**), resistente al frío y que además tiene la capacidad de aclimatarse; y *Solanum cardiophyllum* Lindl. (**cph**), que es sensible al frío y que no tiene la capacidad de aclimatarse (Chen y Li 1980). Las semillas de ambas especies fueron obtenidas de la Estación Inter-Regional de Introducciones de Papa, localizada en Sturgeon Bay, Wisconsin, EE.UU. La identificación de las semillas para cmm es PI 243503 y para cph PI 184762.

La germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas se realizó en una mezcla de suelo que contenía piedra pómez:peat moss:suelo limo arcilloso en proporción 2:1:1, las plantas fueron mantenidas durante todo el experimento en el invernadero.

Con la madurez de las plantas se realizó la polinización de las mismas para obtener finalmente 73 plantas F_1 resultantes del cruce cmm x cph. Donde cmm fue utilizada como madre y cph como padre. Cada individuo de la F_1 fue propagado clonalmente, mediante estacas, las cuales fueron enraizadas en perlita en condiciones de alta humedad. Las condiciones de crecimiento fueron $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, un fotoperiodo de 14 horas y una intensidad lumínica de $180 \mu\text{ES}^{-1}\text{m}^{-2}$. Todas las plantas fueron fertilizadas cada 2 meses con Nutricot-100, un fertilizante de lenta liberación.

Extracción del ADN

El ADN genómico fue extraído de hojas jóvenes de cada individuo, la metodología utilizada fue la descrita por Dellaporta *et al.* (1983) con pequeñas modificaciones. Brevemente, 150 μg de tejido foliar fue macerado en un tubo de microcentrífuga Eppendorf y homogeneizado en 0,5 ml de buffer de extracción (EDTA 10 mM pH 8, NaCl 0,35 M, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 8, urea 7 M, y agua). Las muestras fueron mantenidas en hielo todo el tiempo y se le adicionó 0,5 ml de fenol:cloroformo (1:1). Acto seguido, los tubos fueron invertidos suavemente durante 5 min y posteriormente centrifugados a 14000 rpm a 4°C por 3 min. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se le adicionó 5 ml de cloroformo y el proceso de inversión y centrifugación fue realizado de igual forma al descrito anteriormente. Luego, la fase acuosa fue transferida una vez más a un tubo nuevo donde se le agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN. El tubo fue centrifugado a 14000 rpm por 1 min. El pellet fue resuspendido en 50 μl de

buffer TE pH 8, se le agregó 1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de ARNasa y fue incubado a 65°C por 30 min.

A las muestras se les realizó una nueva extracción con fenol:cloroformo, tal y como fue descrito anteriormente. El pellet fue lavado con etanol al 70% y resuspendido en 50 μl de buffer TE. La cantidad de ADN obtenida fue determinada mediante espectrofotometría. Este método produjo, en promedio, 25 μg de ADN con una relación 260:280 de $1,8 \pm 0,1$.

Amplificación del ADN con RAPDs

El ADN genómico fue amplificado mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se preparó muestras de 25 μl que contenían 50 mM de KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,9 mM MgCl_2 ; dATP, dCTP, dGTP y dTTP (100 μM de cada uno); 0,75 U de *Taq* polimerasa; 0,2 μM de cada imprimador -RAPD- [Operon Technologies; Alameda, California y University of British Columbia (UBC)]; y 20 ng de ADN.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer modelo 9600; el cual fue programado con 45 ciclos a 94 °C por 50 s, 37 °C por 1 min, 54 °C por 20 s y 72 °C por 1 min con 45 s. Todo esto seguido por 1 ciclo a 72 °C de 14 min con 45 s para la extensión final.

Los productos del PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta. Las fotografías de los geles fueron tomadas con película Polaroid 667.

Evaluación de los RAPDs

Para el análisis de los padres, fueron evaluados de la serie Operón, los imprimadores de los grupos A-G, y de los UBC los grupos 100, 300 y 400, para un total de 120 imprimadores. Los loci fueron categorizados como “-” para la ausencia y como “+” para la presencia de la banda. Como los imprimadores de la serie G, de Operón, y de la serie 400 de UBC no mostraron polimorfismos en los padres, fueron excluidos

del análisis de la progenie. Los pesos moleculares de los fragmentos fueron determinados por comparación con un estándar de 1 Kb (Gibco BRL). Para la identificación de los marcadores se utilizó el nombre seguido del tamaño (pb) del fragmento.

En un cruce recíproco, para marcadores dominantes como los RAPDs, se espera que la población F_1 muestre una relación 1:1, lo que indica que solo la banda de uno de los padres está presente y que este padre es heterocigoto. Sin embargo, en cultivos donde no hay autopolinización debido a alguna autoincompatibilidad, ambos padres son considerados heterocigotos y se puede obtener segregaciones 3:1. Los marcadores obtenidos en la F_1 fueron categorizados de acuerdo a su origen parental y tipo de segregación. El tipo de segregación fue determinado mediante una prueba de Chi-cuadrado ($p \leq 0,05$). Los marcadores que mostraran una segregación 1:1 ó 3:1 serían considerados informativos. Las amplificaciones fueron realizadas 3 veces para verificar la reproducibilidad de los datos.

Amplificación del ADN con AFLPs

Fueron utilizados los “kits” de la compañía Perkin Elmer, excepto por las enzimas *MseI*, *EcoRI* y ligasa T4, y la albúmina de suero bovino (BSA), reactivos que fueron adquiridos en Gibco BRL. Para el análisis y mapeo con los AFLP™ se siguió los protocolos del suplidor (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). En breve, 0,5 μg de ADN genómico fueron digeridos con las enzimas *MseI* y *EcoRI*, los adaptadores fueron ligados a los fragmentos de restricción. Luego se realizó una amplificación pre-selectiva de las secuencias del producto restricción-ligación. Una vez que la amplificación ocurrió, se realizó una amplificación selectiva usando imprimadores específicos para *MseI* y *EcoRI*. Los imprimadores para *EcoRI* fueron marcados con fluorescencia.

La identificación individual de los imprimadores es la siguiente: A-*EcoRI*-ACT; B-*EcoRI*-AAC; C-*EcoRI*-AAG; D-*EcoRI*-ACC; E-*EcoRI*-ACA; F-*EcoRI*-AGG; G-*EcoRI*-AGC;

H-*EcoRI*-ACG; 1-*MseI*-CAA; 2-*MseI*-CAC; 3-*MseI*-CAG; 4-*MseI*-CAT; 5-*MseI*-CTA; 6-*MseI*-CTC; 7-*MseI*-CTG; 8-*MseI*-CTT.

Los productos de la amplificación selectiva fueron evaluados por electroforesis en geles de acrilamida, usando un secuenciador de ADN ABI Prism 377. Posteriormente, con la ayuda del software del mismo secuenciador y el GeneScan-500®, fue posible visualizar cada fragmento en forma individual y obtener los electroferogramas específicos, estos últimos fueron analizados con el DNA fragment Genotyper® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y así obtener el tipo de segregación de cada polimorfismo.

Evaluación de los AFLPs

Para la evaluación de los genotipos parentales (cmm y cph) fueron evaluadas 64 combinaciones de AFLPs (A-H y 1-8, mencionado arriba). Cada banda fue visualizada con el GeneScan y luego evaluada con el Genotyper®, usando para ello la altura del pico y el tamaño de la banda (pb). Cada banda fue tratada como un locus, donde “0” indicó la ausencia de la banda y “1” la presencia de la banda. Al igual que con los RAPDs, los marcadores obtenidos en la F₁ fueron categorizados de acuerdo a su origen parental y tipo de segregación. El tipo de segregación fue determinado mediante una prueba de Chi-cuadrado ($p \leq 0,05$). Los marcadores que mostraran una segregación 1:1 ó 3:1 serían considerados informativos. Las amplificaciones fueron realizadas 3 veces para verificar la reproducibilidad de los datos.

Construcción del mapa de ligamiento

Tanto los RAPDs como los AFLPs fueron analizados con el uso del programa Mapmaker Versión 2.0 (Lander *et al.* 1987). Para asignar los grupos de ligamiento fueron evaluados logaritmos del cociente de verosimilitud del ligamiento (LOD, Wyszynski 1998) de 3 a 8 y frecuencias de recombinación de 0,2 a 0,4. LODs menores o mayores a 7,0 produjeron un número de grupos de

ligamiento alejado de los 12 que corresponden al número haploide de cmm. Por tal motivo, los grupos fueron generados utilizando un LOD mínimo de 7,0 y una frecuencia de recombinación máxima de 0,35. En todos los grupos de ligamiento los valores de recombinación fueron convertidos a centiMorgans (cM) usando la función Kosambi. La estimación del tamaño del mapa se hizo utilizando una función de mapeo de 2 puntos.

Análisis de los QTLs

El análisis de los QTLs en el mapa fue realizado mediante la función de mapeo de intervalos, con que cuenta el programa MQTL (Tinker y Mather 1995). El análisis *per se* de los QTLs asociados a las características de resistencia y aclimatación al frío, fue posible utilizando los datos de fenotipo de cada individuo de la F₁ (Sukumaran y Weiser 1972). Por tratarse de un cruce recíproco, los análisis genéticos fueron realizados con un modelo de retrocruces (Grattapaglia *et al.* 1995). También se realizó una prueba de permutas con 1000 repeticiones junto con una prueba de falsos positivos al 5% para cada cromosoma, para así determinar la significancia de cada QTL. Para terminar se realizó regresiones múltiples entre los marcadores moleculares y las 2 características en estudio, usando los modelos del programa SAS (SAS Inst. 1994).

RESULTADOS

Marcadores moleculares

En total 420 imprimadores, del grupo de los RAPDs, fueron evaluados en los genotipos parentales (Cuadro 1), estos generaron 845 bandas polimórficas, de las cuales 434 fueron específicas para cmm y 411 específicas para cph. De los imprimadores que produjeron la mayor cantidad de bandas en ambos padres fueron seleccionados 200 para ser evaluados en la F₁. Se encontró que de esos 200 solo 66 produjeron bandas que fueron

Cuadro 1. Evaluación de los RAPDs y los AFLPs en los genotipos parentales (*S. commersonii* y *S. cardiophyllum*) y la F_1 .

	Imprimadores			Fragmentos ^a			
	Evaluados cmm y cph	Seleccionados cmm y cph	Evaluados F_1	Total	Seleccionados	Segregación 1:1	
						cmm	cph
RAPD	420	66	66	384	145 ^b	65	80
AFLP	64	10	10 ^c	569	262 ^d	112	56

^a Con base en la F_1 ^b Segregación 1:1^c Combinación de imprimadores^d Segregación 1:1 y 3:1.

reproducibles en forma consistente en la F_1 , y generaron 384 marcadores. De los 384 marcadores, 145 (37,8%) presentaron una segregación 1:1, mientras que los restantes 239 (62,2%) presentaron segregaciones distorsionadas ($p \leq 0,05$). Ninguno de los RAPDs mostró segregación 3:1. Entre los 145 marcadores cuya segregación fue 1:1, se encontró que 65 fueron específicos para cmm y 80 específicos para cph (Cuadro 1).

Con los AFLPs, 64 combinaciones de *EcoRI/MseI* fueron evaluadas en ambos genotipos parentales (Cuadro 1), de dichas combinaciones,

10 produjeron la mayor cantidad de bandas polimórficas y por lo tanto fueron seleccionadas para evaluar la población F_1 . En esta parte del estudio se obtuvo 569 polimorfismos, producto del análisis de la altura del pico de la banda, examinada con un límite de confianza máximo de 10, según el diseño del software del GeneScan®. De acuerdo con la prueba de Chi-cuadrado, 262 de los 569 marcadores mostraron una segregación 1:1, donde 112 (43%) fueron específicos para cmm; cuando la segregación fue 3:1 solo 56 (21,4%) fueron específicos para cmm (Cuadro 2).

Cuadro 2. Evaluación de los AFLPs en una población F_1 proveniente del cruce *S. commersonii* x *S. cardiophyllum*.

Combinación de imprimadores	Específicos de cmm			Específicos de cph		
	Total	1:1 ^a	3:1 ^a	Total	1:1 ^a	3:1 ^a
AAG/CTG(C7)	36	23	6	24	6	6
ACC/CTA(D5)	28	8	9	22	8	4
ACC/CTC(D6)	17	10	5	14	3	2
ACA/CAC(E2)	15	2	2	10	3	2
ACA/CAG(E3)	35	7	5	23	4	4
ACA/CTA(E5)	24	8	3	31	8	5
ACA/CTG(E7)	54	19	7	29	7	5
ACA/CTT(E8)	40	22	12	31	5	6
ACG/CAC(H2)	43	7	4	35	7	2
ACG/CTG(H7)	35	6	3	23	5	2
Total	327	112	56	242	56	38

^a Tipo de segregación

Construcción del mapa de ligamiento

Los marcadores moleculares que mostraron una segregación 1:1 fueron considerados informativos y por lo tanto utilizados para la construcción del mapa de ligamiento. El mapa constó de 95 marcadores moleculares, ubicados en 12 grupos de ligamiento, que es precisamente el número haploide de cromosomas de estas especies de *Solanum*. A cada grupo de ligamiento se le asignó un número de 1 a 12 para efectos de identificación (Figura 1). Solo 5 (7,7%) de los RAPDs y 89 (79,5%) de los AFLPs fueron incluidos en el mapa.

El tamaño del mapa fue de 194,5 cM con un promedio de 2,05 cM entre loci contiguos. La lista e identificación de los marcadores incluidos en el mapa se presentan en el cuadro 3.

Análisis de los QTLs

El análisis de QTL detectó solo 1 pico significativo para la aclimatación al frío, en el intervalo entre los marcadores C712 y C733, ubicados en el grupo de ligamiento 7 (Figura 2). El pico presenta una significancia estadística de 12,3, la cual es superior al 11,9 fijado como límite mínimo.

Mediante una regresión simple, usando todos los marcadores (ligados y no ligados), se encontró que los marcadores D528 y C736, con $R^2=12,9$ y $11,33$, respectivamente; están asociados con la resistencia al frío (Cuadro 4). Si estos valores de R^2 son analizados mediante una prueba multilocus ($p \leq 0,05$) se nota que el R^2 explica un 22,3% de la variabilidad en la resistencia al frío. El marcador C736 se encuentra localizado en el grupo de ligamiento 7, entre los marcadores C732/C729/C733 y C734 (Figuras 1 y 2). Estos resultados concuerdan con el análisis por pasos que se realizó en forma simultánea (Cuadro 4). Cuando la aclimatación fue analizada mediante una regresión simple, se encontró que 6 marcadores están relacionados con esta característica ($p \leq 0,09$) (Cuadro 5); por lo que fue realizada una regresión múltiple a los 6 marcadores. Se encon-

tró que 5 de ellos presentan una relación cercana a la aclimatación al frío y juntos explican un 43,8% de esta variación fenotípica; dato que fue corroborado por el análisis por pasos realizado simultáneamente. El marcador C712 está localizado en el grupo de ligamiento 7 mientras que el E311 se encuentra en el grupo de ligamiento 9 (Figura 1), los otros 3 marcadores no están ligados.

DISCUSIÓN

En este estudio, solo los RAPDs y los AFLPs que segregaron en relación 1:1 en la población F_1 (cmm x cph), fueron utilizados para construir un mapa de ligamiento específico para cmm. De los RAPDs evaluados, 60% mostró segregaciones distorsionadas (Cuadro 1). Esta es una característica de los RAPDs, Cai *et al.* (1994) han reportado segregaciones distorsionadas del 40% con estos marcadores. En forestales Krutovskii *et al.* (1998) encontraron segregaciones distorsionadas de 10-18% cuando utilizaron RAPDs. También Gebhardt *et al.* (1991) reportaron 27% de distorsión en la segregación de los RAPDs en su trabajo con genotipos diploides de papa. Una de las posibles razones acerca de por qué los RAPDs se desvían de las proporciones Mendelianas esperadas, es la falta de especificidad entre el imprimador y el ADN genómico durante el PCR, lo cual puede producir falsos positivos (Nozaki *et al.* 1997). También ha sido mencionado el efecto dominante de los genes de sensibilidad al frío así como el tamaño de la población en estudio, donde entre más pequeña es esta, mayores son las posibilidades de tener segregaciones distorsionadas (Chen *et al.* 1999a). Otros autores indican como posibles causas de segregaciones distorsionadas los niveles de ploidía, particularmente en el caso de plantas tetraploides, y la naturaleza poligénica de la resistencia a las heladas (Richardson y Weiser 1972, Stone *et al.* 1993); irregularidades durante la meiosis (Masueli *et al.* 1995); selección gamética o zigótica (Giovannini *et al.* 1993, Kreike y Stiekema 1997); y, apareamiento preferencial

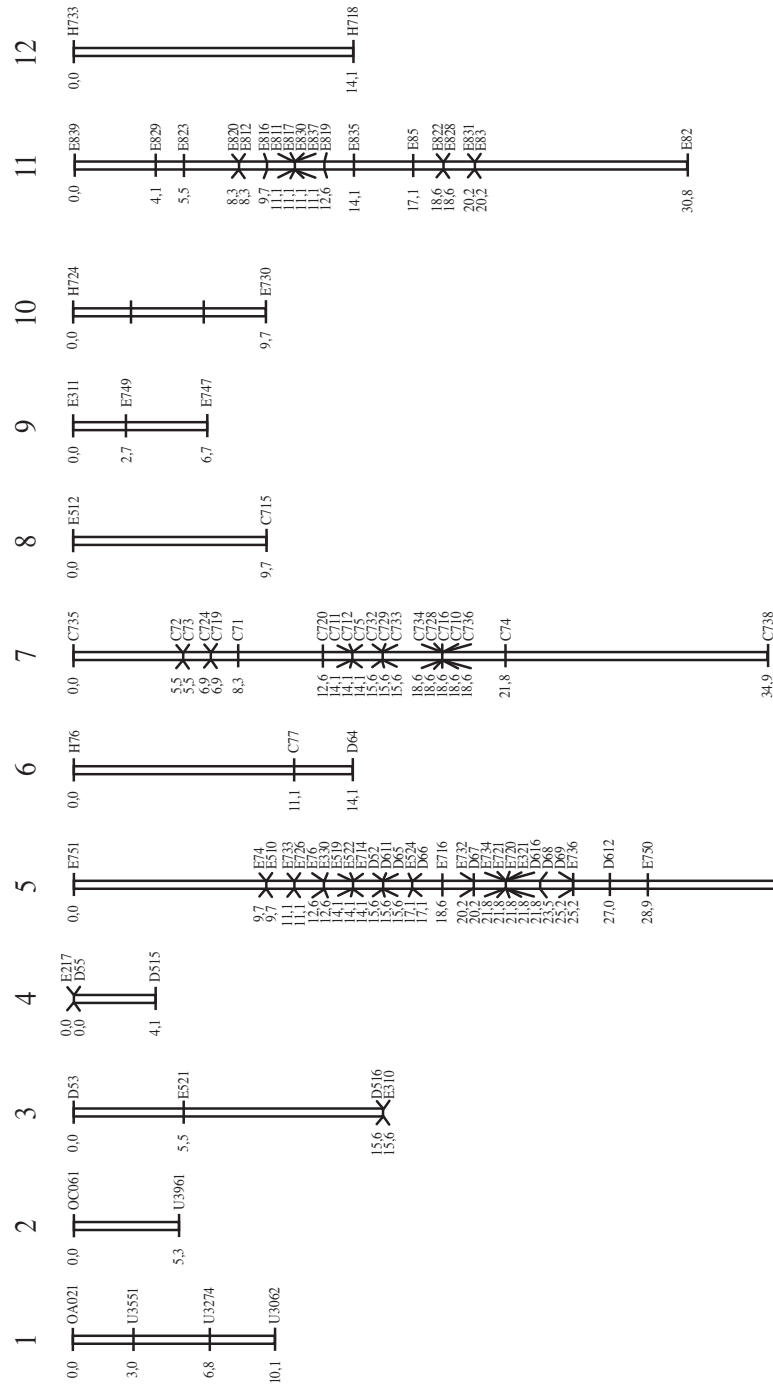


Fig. 1. Mapa de ligamiento genético de *Solanum commersonii*.

Cuadro 3. Identificación y tamaño de los marcadores moleculares del mapa de ligamiento.

RAPDs	Tamaño pb	AFLPs	Tamaño pb	AFLPs	Tamaño pb
U3551	1840,00	D516	122,71	E733	249,83
U3274	560,00	D64	98,30	E734	250,97
U3961	400,00	D65	126,75	E736	261,58
OA021	800,00	D66	128,00	E745	318,89
OC061	1100,00	D67	131,30	E747	350,16
AFLPs	Tamaño pb	D68	132,75	E749	382,08
C71	53,00	D69	149,13	E750	384,70
C72	65,00	D611	184,90	E751	388,99
C73	70,65	D612	191,55	E82	64,85
C74	72,46	D616	370,60	E83	68,86
C75	74,58	E217	273,00	E85	88,50
C77	79,34	E310	124,11	E811	123,20
C710	92,52	E311	138,27	E812	124,20
C711	115,22	E321	241,66	E816	155,10
C712	118,49	E330	422,16	E817	156,89
C715	127,54	E334	461,47	E819	160,17
C716	135,43	E510	148,20	E820	170,32
C719	164,16	E512	164,30	E822	182,82
C720	172,10	E519	188,91	E823	191,14
C724	237,86	E521	192,49	E828	199,14
C728	263,84	E522	196,98	E829	213,00
C729	268,70	E524	231,00	E830	216,12
C732	285,51	E527	279,17	E831	224,24
C733	317,29	E74	74,60	E834	265,00
C734	325,23	E76	96,26	E835	268,83
C735	353,30	E714	132,25	E837	282,12
C736	370,19	E716	141,65	E839	335,57
C738	410,77	E720	167,56	H718	176,59
D52	51,83	E721	171,72	H724	235,31
D53	64,75	E726	191,03	H733	432,51
D55	91,50	E730	230,79		
D515	120,26	E732	239,67		

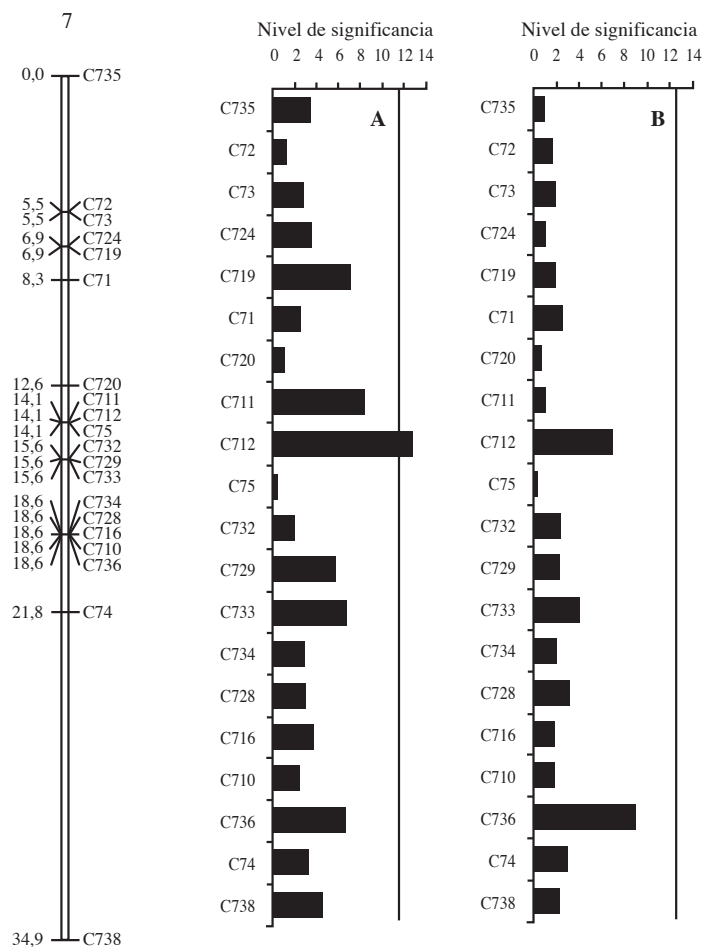


Fig. 2. Actividad de los grupos de ligamiento para la resistencia al frío (A) y la aclimatación al frío (B). El mapa para el grupo de ligamiento 7 se basa en la segregación de los alelos provenientes de la población F_1 .

Cuadro 4. Relación de los marcadores moleculares con los QTLs asociados a la resistencia al frío.

Marcador	R ² simple	R ² múltiple ^b	Por pasos simple	Por pasos múltiple	Signo ^c	Grupo de ligamiento
D528	12,91	22,30	12,91	22,31	+	?
C736	11,33		9,40			

^a Regresión simple

^b Regresión múltiple

^c + = Alelo positivo de cph - = Alelo positivo de cmm

Cuadro 5. Relación de los marcadores moleculares con los QTLs asociados a la aclimatación al frío.

Marcador	R ² simple ^a	R ² múltiple ^b	Por pasos simple	Por pasos múltiple	Signo ^c	Grupo de ligamiento
C712	15,87	43,80	15,87	43,81	-	7
U3012	11,68		10,18		-	?
U1452	10,15		6,70		+	?
E731	13,13		5,40		-	?
E311	6,45		5,70		-	9

^a Regresión simple^b Regresión múltiple^c + = alelo positive de cph - = alelo positive de cmm

entre homólogos provenientes de las mismas especies (Williams *et al.* 1993).

Considerando el número de imprimadores evaluado, el número de polimorfismos detectado por los AFLPs fue mucho mayor que el detectado por los RAPDs. De la misma manera, el número de marcadores informativos también fue más alto. En un trabajo con RAPDs, Grattapaglia y Sederoff (1994), reportaron la presencia de menos de un 2% de marcadores segregando 3:1; lo cual concuerda con los trabajos de Krutovskii *et al.* (1998). En el presente estudio, no se encontró RAPDs segregando en proporción 3:1. Sin embargo, tal y como se muestra en el cuadro 3, una tercera parte de los AFLPs considerados informativos mostraron una segregación 3:1. Un estudio realizado por Bradshaw *et al.* (1998) en *Solanum tuberosum* Subs. *tuberosum*, una especie de papa tetraploide, mostró proporciones de segregación 1:1, 3:1 así como distorsiones similares a las encontradas en este estudio con especies de diploides *Solanum*.

La segregación que mostraron los AFLPs fue de 3 tipos: 1:1, 3:1, y distorsionada. La poca cantidad de AFLPs segregando en proporción 1:1, en este estudio, no es lo óptimo. No se sabe si estos resultados se deben a la naturaleza del tipo de cruce utilizado o al tipo de análisis de los datos con el sistema semi-automático que realizan el GeneScan y el Genotyper. Lo cual es confuso pues este software puede detectar diferencias en

las bandas hasta de 0,5 pb. Bradshaw *et al.* (1998) y Marques *et al.* (1998), cuando utilizaron autoradiografías convencionales obtuvieron marcadores segregando en proporción 3:1 y mostrando una segregación distorsionada en una proporción mucho más baja que la obtenida en este estudio.

Con los 95 marcadores obtenidos de los 73 individuos de la F₁, fue posible construir un mapa de ligamiento para la especie *Solanum commersonii*, que es pequeño en comparación con el de *S. tuberosum* reportado por Jacobs *et al.* (1995), pero que se puede hacer crecer con más marcadores moleculares producto de otros estudios. Este mapa tiene una región más densa pero también presenta espacios con muy pocos marcadores. Esto podría deberse a la variación en los niveles o posición de los polimorfismos, las tasas de recombinación, e inclusive a desviaciones en el número de copias de secuencias específicas del genoma (Roupe van der Voort *et al.* 1997, Van Eck *et al.* 1995). Evidentemente, el número bajo de marcadores asignado a los grupos de ligamiento, el tamaño de la población utilizada, y el uso de marcadores moleculares dominantes, pueden ser también responsables de los espacios con menos marcadores (Grattapaglia *et al.* 1995, Krutovskii *et al.* 1998, Marques *et al.* 1998, Meyer *et al.* 1998, Van Eck *et al.* 1995, Wang *et al.* 1997).

Por otro lado, la mayoría de los marcadores en las áreas más densas fueron AFLPs, con

el mayor número en los grupos de ligamiento 5, 7, y 11. Este agrupamiento de marcadores específicos, aunque haya otros tipos de marcador en el mapa, ha sido documentado para AFLPs en papa (Roupe van der Voort *et al.* 1998), RAPDs en Douglas-Fir (Krutovskii *et al.* 1998), RFLPs en tomate Tanksley *et al.* 1992), RFLPs en frijol (Vallejos *et al.* 1992), RAPDs en eucalipto (Grattapaglia y Sederof 1994), RAPDs y microsatélites (GATA) en *Lycopersicum* (Grandillo y Tanksley 1996b), y RAPDs en manzana (Hemmat *et al.* 1994). Esta clase de agrupamientos, desde el punto de vista biológico, puede ser el resultado de una supresión de la recombinación genética en la heterocromatina alrededor de los centrómeros o en las regiones teloméricas (Grattapaglia y Sederof 1994, Roupe van der Voort *et al.* 1997, Tanksley *et al.* 1992).

A pesar de las variaciones que puedan presentar los AFLPs en lo que respecta al tipo de segregación obtenido, este tipo de marcador se ha consolidado como uno de los de mayor uso en estudios de mapeo genético y análisis de QTL (Xiu-Qing *et al.* 2005, Velasquez *et al.* 2007, Iovene *et al.* 2004, Bradshaw *et al.* 2006, Barone *et al.* 2001, Bryan *et al.* 2002).

Con los datos de la segregación obtenida a partir de los RAPDs y los AFLPs en la F_1 , se realizó un análisis de QTL con base en la técnica conocida como intervalo de mapeo, y con el apoyo de regresiones simples y múltiples (Villalta *et al.* 2007, McCallum *et al.* 2007, Bradshaw *et al.* 2006, Costanzo *et al.* 2005). Los resultados mostraron varios QTLs pero sólo 1 estuvo sobre el nivel de significancia estadística establecido. También es posible que otros QTLs no fueran detectados debido al tamaño del mapa o a que esos QTLs están gobernados por varios genes con efectos pequeños (Valverde y Chen 1999, Bradshaw *et al.* 1998, Grattapaglia *et al.* 1995, Meyer *et al.* 1998, Schäfer-Pregl *et al.* 1996, Teutónico *et al.* 1995, Van Eck *et al.* 1995b).

El QTL seleccionado se encontró asociado en forma significativa con la aclimatación al frío (Figura 2). El mismo marcador también fue el que mostró el R^2 más alto y valores significativos

tanto en el análisis simple como en el multilocus. Tres de los 5 marcadores en el cuadro 5, también mostraron valores significativos en otros análisis realizados (Datos no mostrados). La fortaleza de los datos en el cuadro 5, fue corroborada con las tendencias observadas en el análisis por intervalo de mapeo (Figura 3). Para el grupo de ligamiento 9 la tendencia esta relacionada con el marcador E311 y para el grupo 10 con el marcador H724, este último mostró resultados significativos en los análisis (datos no mostrados). También fue encontrada una asociación entre los marcadores D528 y C736 para la resistencia al frío. La tendencia que muestra el marcador C736 en la figura 2 concuerda con lo observado en el cuadro 4.

Los datos obtenidos indican que los modelos utilizados en este estudio generan QTLs relacionados con la resistencia y la aclimatación al frío. La proporción de la variación fenotípica que es explicada por marcadores moleculares independientes varía de 6,45-15,87% para ambas características. El análisis por multilocus explica el 43,8% de la variación en la aclimatación al frío y un 22,3% en la resistencia al frío. Esto sugiere que ambas características están bajo el dominio de diferentes QTLs. La utilidad de los QTLs ha sido demostrada en otros estudios con la especie *Solanum* (Villalta *et al.* 2007, Costanzo *et al.* 2005, Bradshaw *et al.* 2006, Bryan *et al.* 2002, Finkers *et al.* 2007), cebolla (McCallum *et al.* 2007).

Como apoyo a futuros trabajos, cabe indicar que aun cuando el mapeo aumenta la precisión del análisis de QTL, también hay informes de trabajos que indican que en la práctica, una prueba de t , un Andeva o un análisis de regresión a menudo son suficientes para determinar la significancia estadística de un QTL (Bradshaw *et al.* 1998, Byrne *et al.* 1997, Charcoset y Gallis 1996, Churchil y Doerge 1998, Freyre *et al.* 1994, Grandillo y Tanksley 1996a, Meyer *et al.* 1998, Pan *et al.* 1994, Whittaker *et al.* 1996, Wu 1998, Villalta 2007).

En conclusión, fue posible construir un mapa parcial de *Solanum commersonii*. El análisis de regresión mostró 2 marcadores moleculares asociados con la resistencia al frío y 5 asociados

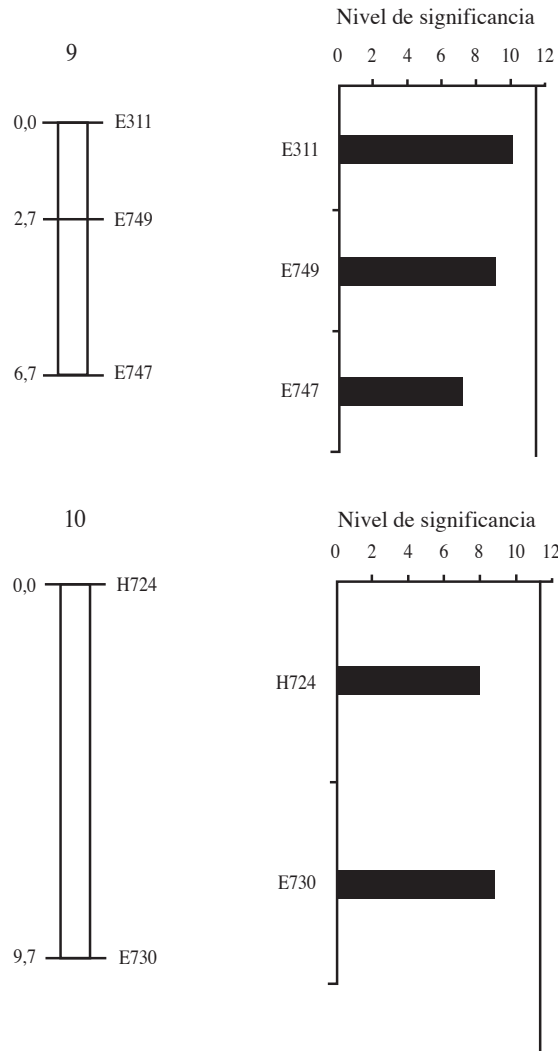


Fig. 3. Actividad de los grupos de ligamiento para la aclimatación al frío. El mapa para los grupos de ligamiento 9 y 10 se basa en la segregación de los alelos provenientes de la población F_1 .

con la aclimatación al frío. Solo se encontró 1 QTL con el intervalo de mapeo. Esta información es básica para futuros estudios genéticos con la especie *Solanum commersonii*, tanto acerca de las características evaluadas en este estudio como de otras características.

LITERATURA CITADA

- BARONE A., SEBASTIANO A., CARPUTO D., DELLA ROCCA F., FRUSCIANTE L. 2001. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. Theor. Appl. Genet. 102:900-907.

- BARRIENTOS M., MOL E., PERUZZO A., CONTRERAS A., ALBERDI M. 1994. Responses to cold of Chilean wild *Solanum* species. *Env. Exp. Bot.* 34:47-54.
- BRADSHAW J.E., HACKETT C., LOWE R., MCLEAN K., STEWART H.E., TIERNEY I., VILARO M.D.R., BRYAN G. 2006. Detection of a quantitative trait locus for both foliage and tuber resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) on chromosome 4 of a diploid potato clone (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 113:943-951.
- BRADSHAW J.E., HACKETT C.A., MEYER R.C., MILBOURNE D., MCNICOL J.W., PHILLIPS M.S., WAUGH R. 1998. Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 97:202-210.
- BRYAN G.J., MCLEAN K., BRADSHAW J., DE JONG W.S., PHILLIPS M., CASTELLI L., WAUGH R. 2002. Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato *Solanum vernei*. *Theor. Appl. Genet.* 105:68-77.
- BYRNE M., MURRELL J.C., OWEN J.V. 1997. Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. *Theor. Appl. Genet.* 95:975-979.
- CAI Q., GUY C.L., MOORE G.A. 1994. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor. Appl. Genet.* 89:606-614.
- CARDI T., PUIE K.J., RAMULU K.S., D'AMBROSIO F.D., FRUSCIANTE L. 1993a. Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: protoplast fusion, regeneration and isozyme analysis. *Am. Potato J.* 70:753-764.
- CARDI T., D'AMBROSIO F.D., CONSOLI F., PUIE K.J., RAMULU K.S. 1993b. Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. *Theor. Appl. Genet.* 87:193-200.
- CARPUTO D., TERRA A., BARONE A., ESPOSITO F., FOGLIANO V., MONTI L., FRUSCIANTE L. 2003. Glycoalkaloids and acclimation capacity of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent hardy species *Solanum commersonii*. *Theor. Appl. Genet.* 107:1187-1194.
- CHARCOSSET A., GALLIS A. 1996. Estimation of the contribution of quantitative trait loci (QTL) to the variance of a quantitative trait by means of genetic markers. *Theor. Appl. Genet.* 93:1193-1201.
- CHEN H.H., LI P.H. 1980. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiol.* 65:1146-1148.
- CHEN Y-K.H., PALTA J.P., BAMBERG J.B., KIM H., HABERLACH G.T., HELGESON J.P. 1999a. Expression of nonacclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity in somatic hybrids between hardy wild *Solanum* species and cultivated potatoes. *Euphytica* 107:1-8.
- CHEN Y-K H., PALTA J.P., BAMBERG J.B. 1999. Freezing tolerance and tuber production in selfed and back-cross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. *Theor. Appl. Genet.* 99:100-107.
- CHURCHILL G.A., DOERGE R.W. 1998. Mapping quantitative trait loci in experimental populations. *In: Molecular dissection of complex traits.* A.H. Paterson (ed). p. 31-41. New York: CRC.
- COSTANZO S., SIMKO I., CHRIST B.J., HAYNES K.G. 2005. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phureja* x *S. stenotomon*. *Theor. Appl. Genet.* 111:609-617.
- DELLAPORTA S.L., WOOD J., HICKS J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- ESTRADA R.N. 1987. Utilization of wild and cultivated diploid potato species to transfer frost resistance into the tetraploid common potato, *Solanum tuberosum* L. *In: Plant cold hardiness.* P.H. Li (ed). p. 339-353. New York: Alan R. Liss.
- ESTRADAN., GARCIA W., CARRASCO J.G., CARRASCO E. 1993. Breeding potatoes for tolerance to frost and resistance to late blight. *Am. Potato J.* 70:809-810.
- EUNUS A.M., JOHNSON L.P.V., ASKEL R. 1962. Inheritance of winter hardiness in an eighteen-parent diallel cross of barley. *Can. J. Genet. Cytol.* 4:356-376.
- FINKERS R., VAN HEUSDEN A.W., MEIJER-DEKENS F., VAN KAN J.A.L., MARIS P., LINDHOUT P. 2007. The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification

- of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. Theor. Appl. Genet. 114:1071-1080.
- FREYRE R., WARNKE S., SOSINSKI B., DOUCHES D.S. 1994. Quantitative trait locus analysis of tuber dormancy in diploid potato (*Solanum* spp). Theor. Appl. Genet. 89:474-480.
- GALIBA G., QUARRIE S.A., SUTKA J., MORGOUNOV A. 1995. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Frl*) genes on chromosome 5A of wheat. Theor. Appl. Genet. 90:1174-1179.
- GEBHARDT C., RITTER E., BARONE A., DEBENER T., WALKEMEIR B., SCHACHTSCHABEL U., KAUFMAN H., THOMPSON R.D., BONIERBALE M.W., GANAL M.W., TANKSLEY S.D., SALAMINI F. 1991. RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. Theor. Appl. Genet. 83:49-57.
- GIOVANNINI T., ALICCHIO R., CONCILIO L. 1993. Genetic analysis of isozyme and restriction fragment patterns in the genus *Solanum*. J. Genet. Breed. 47:237-243.
- GRANDILLO S., TANKSLEY S.D. 1996a. QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. Theor. Appl. Genet. 90:935-951.
- GRANDILLO S., TANKSLEY S.D. 1996b. Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. Theor. Appl. Genet. 92:957-965.
- GRATTAPAGLIA D., SEDEROF R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. Genetics 137:1121-1137.
- GRATTAPAGLIA D., BERTOLUCCI F.L., SEDEROF R. 1995. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 90:933-947.
- HANNEMAN R.E., BAMBERG J.B. 1986. Inventory of tuber-bearing *Solanum* species. Wis. Agric. Exp. Stn. Bull. p. 533.
- HAYES P.M., CHEN T.H.H., BLAKE T.K. 1993. Marker-assisted genetic analysis of cold tolerance in winter barley. In: Advances in plant cold hardiness. P.H. Li, and L. Christensen (eds). p. 273-283. Boca Raton: CRC.
- HEMMAT M., WEEDEN N.F., MANGANARIS A.G., LAWSON D.M. 1994. Molecular marker linkage map for apple. J. Hered. 85:4-11.
- IOVENE M., BARONE A., FRUSCIANTE L. MONTI L. CARPUTO D. 2004. Selection for aneuploid potato hybrids combining a low wild genome content and resistance traits from *Solanum commersonii*. Theor. Appl. Genet. 109:1139-1146.
- JACOBS J.M.E., VAN ECK H.J., ARENS P., VERKEK-BAKKER B., TE LINTEL HEKKERT B., BASTIAANSEN H.J.M., EL-KHABOTLY A., PEREIRA A., JACOBSEN E., STIEKEMA W.J. 1995. A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. Theor. Appl. Genet. 91:289-300.
- KREIKE C.M., STIEKEMAW J. 1997. Reduced recombination and distorted segregation in *Solanum tuberosum* (2x) X *S. spegazzinii* (2x) hybrid. Genome 40:180-187.
- KRUSTOVSKII K.V., VOLLMER S.S., SORESENSEN F.C., ADAMS W.T., KNAPP S.J., STRAUSS S.H. 1998. RAPD genome maps of Douglas-Fir. J. Hered. 89:197-205.
- LANDER E.S., GREEN P., ABRAHAMSON J., BARLOW A., DALY M.J., LINCOLN S.E., NEWBURG L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174-181.
- LI P. 1977. Frost killing temperatures of 60 tuber-bearing *Solanum* species. Am. Potato J. 54:452-456.
- LIMIN A.E., FOWLER D.B. 1983. Genetics of cold hardiness. In: New frontiers in winter wheat production. D.B. Fowler, L.V. Gusta, A. Slinkard, and B.A. Hobins (eds). p. 139-207. Canada: Univ. Saskatchewan.
- MARQUES C.M., ARAUJO J.A., FERREIRA J.G., WHETTEN R., O'MALLEY D.M., LIU B.H., SEDEROF R. 1998. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. Theor. Appl. Genet. 96:727-737.
- MASUELLI R.W., TANIMOTO E.Y., BROWN C.R., COMAI L. 1995. Irregular meiosis in a somatic

- hybrid between *S. bulbocastanum* and *S. tuberosum* detected by species-specific PCR markers and cytological analysis. *Theor. Appl. Genet.* 91:401-408.
- MCCALLUM J., PITHER-JOYCE M., SHAW M., KENEL F., DAVIS S., BUTLER R., SCHEFFER J., JAKSE J., HAVEY M.J. 2007. Genetic mapping of sulphur assimilation genes reveals a QTL for onion bulb pungency. *Theor. Appl. Genet.* 114:815-822.
- MEYER R.C., MILBOURNE D., HACKET C.A., BRADSHAW J.E., MCNICHOL J.W., WAUGH R. 1998. Linkage analysis in tetraploid potato and association of markers with quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*). *Mol. Gen. Genet.* 259:150-160.
- MILBOURNE D., MEYER R.C., COLLINS A.J., RAMSEY L.D., GEBHARDT C., WAUGH R. 1998. Isolation, characterization, and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* 259: 233-245.
- NOZAKI T., KUMAZAKI A., KOBAYASHI T., ISHIKAWA K., IKEHASHI H. 1997. Linkage analysis among loci for RAPDs, isozymes and some agronomic traits in *Brassica campestris* L. *Euphytica* 95:115-123.
- NYMAN M., WAARA S. 1997. Characterization of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and its frost-tolerant relative *Solanum commersonii*. *Theor. Appl. Genet.* 95:1127-1132.
- PALTA J.P., LI P.H. 1979. Frost-hardiness in relation to leaf anatomy and natural distribution of several *Solanum* species. *Crop Science* 19:665-671.
- PAN A., HAYES P.M., CHEN F.Q., BLAKE T., CHEN T.H.H., WRIGHT T.T.S., KARSAI I., BEDO Z. 1994. Genetic analysis of the components of winter hardiness in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 89:900-910.
- RICHARDSON D.G., WEISER C.J. 1972. Foliage frost resistance in tuber-bearing Solanums. *HortScience* 7:19-22.
- ROUPPE VAN DER VOORT J.N.A.M., VAN ZANDVOORT P., VAN ECK H.J., R.T. FOLKERTSMA H.J., HUTTEN R.C.B., DRAAISTRA J., GOMMERS F.J., JACOBSEN E., HELDER J., BAKKER J. 1997. Use of allele specificity of co-migrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* 255:438-447.
- ROUPPE VAN DER VOORT J.N.A.M., VAN ECK H.J., DRAAISTRA J., VAN ZANDVOORT P., JACOBSEN E., BAKKER J. 1998a. An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Molecular Breeding* 4:73-77.
- ROUPPE VAN DER VOORT J.N.A.M., LINDEMAN W., FOLKERSMA R., HUTTEN R.C.B., OVERMARS H., VAN DER VOSSSEN E., JACOBSEN E., BAKKER J. 1998b. A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor. Appl. Genet.* 96:654-661.
- SAS INSTITUT INC. 1994. SAS/STAT user's guide Vol. 2, GLM-VARCOMP. 4th ed. SAS Institut Inc., Cary, NC.
- SATO K., INUKAI T., HAYES P.M. 2001. QTL analysis of resistance to rice blast pathogen in barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* 102:916-920.
- SCHÄFER-PREGL R., SALAMINI F., GEBHARDT C. 1996. Models for mapping quantitative trait loci (QTL) in progeny of non-inbred parents and their behavior in presence of distorted segregation ratios. *Genet. Res.* 67:43-54.
- SIMKO I., MCMURRY S., YANG H.-M., MANSCHOT A., DAVIES P.J., EWING E. 1997. Evidence from polygene mapping for a causal relationship between potato tuber dormancy and abscisic acid content. *Plant Physiol.* 115:1453-1459.
- STONE J.M., PALTA J.P., BAMBERG J.B., WEISS L.S., HARBAGE J.F. 1993. Inheritance of freezing resistance in tuber-bearing *Solanum* species: evidence for independent genetic control of non-acclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:7869-7873.
- SUKUMARAN N.P., WEISER C.J. 1972. An excised leaflet test for evaluating potato frost tolerance. *HortScience* 7:467-468.
- TANKSLEY S.D., GANAL M.W., PRINCE J.P., DE VICENTE M.C., BONIERBALE M.W., BROWN P., FULTON T.M., GIOVANNONI J.J., GRANDILLO S., MARTIN G.B., MESSEGUER R., MILLER J.C., MILLER L., PATERSON A.H., PINEDA O., RÖDER M.S., WING R.A., WU W., YOUNG N.D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-116.

- TEUTONICO R.A., YANDELL B., SATAGOPAN J.M., FERREIRA M.F., PALTA J.P., OSBORN T.C. 1995. Genetic analysis and mapping of genes controlling freezing tolerance in oilseed *Brassica*. *Molecular Breeding* 1:329-339.
- THOMAS M.F. 1990. Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv. Genet.* 28:99-131.
- TINKER N.A., MATHER D.E. 1995. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *JQTL*. <http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/2>.
- TOMMISKA T.J., HAMALAINEN J.H., WATANABE K.N., VALKONEN J.P.T. 1998. Mapping of the gene *Nx_{phu}* that controls hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum phureja* lvP35. *Theor. Appl. Genet.* 96:840-843.
- VALLEJOS C.E., SAKIYAMA N.S., CHASE C.D. 1992. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 131:733-740.
- VALVERDE R., CHEN T.H.H. 1999. Genetic analysis of frost hardiness traits in tuber-bearing *Solanum* species. *Journal of Plant Biology* 42(2): 174-180.
- VAN DEN BERG J.H., EWING E.E., PLAISTED R.L., MCMURRAY S., BONIERBALE M.W. 1996a. QTL analysis of potato tuberization. *Theor. Appl. Genet.* 93:307-316.
- VAN DEN BERG J.H., EWING E.E., PLAISTED R.L., MCMURRAY S., BONIERBALE M.W. 1996b. QTL analysis of potato tuber dormancy. *Theor. Appl. Genet.* 93:317-324.
- VAN ECK H.J., ROUPPE VAN DER VOORT J.N.A.M., DRAAISTRA J., VAN ZANDVOORT P., VAN ENCKVORT E., SEGERS B., PELEMAN J., JACOBSEN E., HELDER J., BAKKER J. 1995. The inheritance of chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding* 1:397-410.
- VEGA S.E., BAMBERG J.B. 1995. Screening the U.S. potato collection for frost hardiness. *Am. Potato J.* 72:13-21.
- VELASQUEZ A.C., MIHOVLOVICH E., BONIERBALE M. 2007. Genetic characterization and mapping of major gene resistance to potato leafroll virus in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Theor. Appl. Genet.* 114:1051-1058.
- VILLATA I., BERNET G.P., CARBONEL E.A., ASINS M.J. 2007. Comparative QTL analysis of salinity tolerance in terms of fruit yield using two *Solanum* populations of F₇ lines. *Theor. Appl. Genet.* 114:1001-1017.
- WANG Y.H., THOMAS C.E., DEAN R.A. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:791-798.
- WHITTAKER J.C., THOMPSON R., VISSCHER P.M. 1996. On the mapping of QTL by regression of phenotype on marker-type. *Heredity* 77:23-32.
- WU R.L. 1998. Genetic mapping of QTLs affecting tree growth and architecture in *Populus*: implication for ideotype breeding. *Theor. Appl. Genet.* 96:447-457.
- WYSZYNSKI D.F. 1998. La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Revista Panamericana de Salud Pública* 3(1):26-34.
- XIU-QING L., DE JONG H., DE JONG D.M., DE JONG W.S. 2005. Inheritance and genetic mapping of tuber eye depth in cultivated diploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 110:1068-1073.
- YENKO G.C., KOWALSKI S.P., KOBAYASHI R.S., SINDEN S.L., BONIERBALE M.W., DEAHL K.L. 1998. QTL mapping of foliar glycoalkaloids in *Solanum tuberosum* x *S. berthaultii* potato progenies: quantitative variation and plant secondary metabolism. *Theor. Appl. Genet.* 97:563-574.