

Tesis Doctoral

Marcadores funcionales relacionados con la síntesis de pigmentos y su localización en un mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas* L. Lam

Arizio, Carla Marcela

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Arizio, Carla Marcela. (2011). Marcadores funcionales relacionados con la síntesis de pigmentos y su localización en un mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas* L. Lam. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Arizio, Carla Marcela. "Marcadores funcionales relacionados con la síntesis de pigmentos y su localización en un mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas* L. Lam". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biología Molecular y Celular

Marcadores funcionales relacionados con la síntesis de pigmentos y su localización en un mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas* L. Lam

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Carla Marcela Arizio

Director de tesis: Dra. María Marcela Manifesto

Director Asistente: Dr. Hector Martí

Consejero de Estudios: Dr. Muschietti Jorge

Instituto de Recursos Biológicos, CNIA, INTA Castelar

Buenos Aires, Marzo 2011

Marcadores funcionales relacionados con la síntesis de pigmentos y su localización en un mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas* L. Lam

Resumen

Ipomoea batatas L. Lam, es una especie de importancia agrícola, que se cultiva en más de 100 países con una producción anual de 120 millones de toneladas. Esta especie presenta una raíz engrosada denominada batata que constituye un alimento básico en muchos países subdesarrollados. En la piel y en la pulpa de la raíz engrosada puede observarse una amplia variedad de colores. Estos colores se deben a la presencia de dos clases de pigmentos: las antocianinas (flavonoides) y los carotenoides. Estos pigmentos además de jugar un rol central en la elección por parte del consumidor, presentan importantes beneficios para la salud, principalmente por actuar como antioxidantes. Muchos de ellos han sido caracterizados por sus propiedades antimutagénicos y anticancerígenos

El desarrollo de marcadores moleculares asociados a estos genes de interés puede aportar una herramienta eficaz a los programas de mejoramiento, en particular hacia aquellos que están focalizados en la obtención de clones con propiedades funcionales, como el alto contenido de pigmentos.

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue desarrollar marcadores de Genes Candidatos relacionados con las síntesis de pigmentos para su localización en un mapa de ligamiento estructurado con marcadores neutros: SSR y AFLP

Este trabajo contribuye al conocimiento de la estructura y secuencia de los genes de interés, la herencia del genoma y la búsqueda de regiones genómicas relacionadas con la síntesis de pigmentos. El mismo implicó el desarrollo de una población de mapeo a partir de padres segregantes para el carácter de interés, la determinación de la herencia, la localización de los marcadores neutros, el diseño de marcadores de genes candidatos de las rutas de síntesis de los principales pigmentos, el desarrollo de un mapa de ligamiento, la caracterización fenotípica de la población y la búsqueda de regiones genómicas asociadas a dicha variación.

Palabras Claves: Mapa Ligamiento, *Ipomoea batatas*, genes antocianinas, genes carotenos, SSR, AFLP, hexaploide.

Functional markers related with pigment synthesis and their localization in a linkage map in *Ipomoea batatas* L. Lam

Abstract

Ipomoea batatas L. Lam, an specie of agricultural importance, is grown in more than 100 countries, with an annual yield of 120 million tons. This specie presents a thickened root, which constitute a staple food in several underdevelopment countries. In its flesh and skin an assorted range of colors can be observed. These colours are due to the presence of two kinds of pigments: anthocyanins (flavonoids) and carotenoids. They play an important role in consumers' choice and they present several benefits for health, principally acting as antioxidant as well. Many of them were reported because of their anti mutagenic and anti carcinogenic properties. The development of molecular markers associated with genes of the biosynthetic pathways of these compounds can contributed as an efficient tool to breeding programs, particularly to that which are focus in the obtaining of clones with functional properties like high content of pigments. The main object of this work was the development of markers for Candidate Genes related with pigment synthesis and their localization in a linkage map structured with neutral markers: SSR and AFLP. This work contributes to the knowledge of structure and sequence of genes of interest, genome heredity and the localization of genomic regions related to pigments. This implies a mapping population development from segregant parents for the character in study, marker design for candidate genes, heredity determination, marker localization, linkage map development, phenotypic characterization and the search of genomic regions associated with the variation observed.

Key words: linkage map, *Ipomoea batatas*, anthocyanins genes, carotens genes, SSR, AFLP, hexaploid.

Agradecimientos

Redactar esta sección resultó más difícil de lo que pensé. Principalmente porque había una considerable cantidad de personas a quienes quería agradecer y pretendía no olvidarme de nadie.

Estos años de elaboración de la tesis han sido de un gran crecimiento personal además de profesional. Fui madre por segunda vez con la llegada de Ludmila, y obtuve el título de tía con Lola, Agustín y Faustino. Sumé dos excelentes amigas, Cintia y Sabrina. Pude sobrevivir a la escritura de esta tesis en el mismo momento que mi compañero también escribía, entregaba y defendía su tesis doctoral (de paso...¡felicitaciones Dr. Antón!). No puedo dejar de mencionar a mi hija Candela, quien me ha tenido una paciencia infinita y ha sabido comprender el cansancio con que a veces llegaba a casa.

Quiero agradecer a mi familia que ha estado presente siempre, acompañándome en este importante proyecto, cada uno desde su lugar.

A Martita le tengo que agradecer particularmente, para las madres, contar con alguien de confianza que cuide a nuestros hijos cuando están enfermos o no hay clases, es de gran valor. En este sentido, contar con un Jardín en nuestro lugar de trabajo es una posibilidad extraordinaria.

En el aspecto profesional, ha sido sumamente gratificante conocer a muchísimos investigadores, becarios y auxiliares que han compartido sus conocimientos, experiencias y tiempo de forma desinteresada, renovando mi esperanza en el ambiente científico. A riesgo de olvidarme de alguien, voy a nombrar a algunos en particular:

- A las Autoridades del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y de la Agencia Nacional de Ciencia y Técnica (ANCyP) por financiar mi capacitación y el desarrollo de esta Tesis.
- A la Dra. Graciela Corbino de INTA San Pedro, Dr. Daniel Reynoso del Centro Internacional de la Papa (Perú), la Dra. Adriana Descalzo y la Lic. Luciana Rossetti del ITA de Castelar por compartir sus conocimientos técnicos.
- Al Dr. Juan Pablo Ortiz de la UNR, quien compartió el “know how” del mapeo con poliploides.
- A la Dra. Gabriela Tranquili, siempre dispuesta a responder mis raras preguntas.
- A la Sra. Stella Cristos, ¡ella sabe donde esta todo y como funciona!
- A las chicas de la oficina (Virginia, Sabri y Marce), con quienes hacemos la imprescindible terapia mañanera.
- A Santos, Fernando y Ricardo, que nos ayudaron con las tareas de campo e invernáculo.

- Al personal de Becas de INTA, Leandro, Eduardo y Susana que siempre me han respondido con mucha amabilidad. También porque he encontrados en ellos interlocutores válidos para plantear mejoras en la situación de los becarios.
- A mi amigo Beto que con sus conocimientos de computación resolvió en minutos lo que yo habría tardado semanas. Y a Laura K., que me ayudó con las derivadas y su resolución.
- A mi director Asistente Dr. Héctor Martí, por su apreciable dedicación y el aporte de sus conocimientos.
- Una mención especial es para la Dra. Marcela Manifesto, la directora de esta tesis. Su optimismo y perseverancia ayudaron a contener mis ansiedades y confiar en la labor cotidiana. Ha trabajado conmigo codo a codo, no solo en la etapa de redacción, sino también en el trabajo de mesada y a campo. Por guiarme en esta etapa en donde ambas hemos aprendido mucho y por la confianza depositada en mi capacidad para poder lograr los objetivos.
- ¡Gracias Totales!

Como pueden ver, esto ha sido una (divertida) tarea colectiva, como toda generación de conocimiento.

A mis bichitas de luz, Candela y Ludmila.

A mi compañero Gustavo.

Índice

1. Introducción General	11
Introducción	12
1. El cultivo.....	12
1.1 Importancia del cultivo.....	13
1.2 Características alimenticias.....	13
1.3 Producción de batata en la Argentina.....	14
2. Mapas genéticos.....	15
3. Objetivos específicos.....	16
4. Diseño de investigación.....	17
Bibliografía	18
2. Desarrollo de una población de mapeo en Ipomoea batatas L. Lam	19
Resumen	20
Introducción	21
1. Estrategia de obtención de la población de mapeo.....	21
Materiales y métodos	25
1. Selección de parentales contrastantes para el color de piel y pulpa.....	25
1.1 Inducción de la floración.....	25
1.2 Evaluación de la compatibilidad y autocompatibilidad.....	26
1.3 Selección de los parentales para la generación de la población de mapeo.....	27
2. Desarrollo de una población segregante para la coloración de piel y pulpa.....	27
2.1 Obtención de plantines y batatas de la población.....	27
Resultados y Discusión	28
1. Selección de Parentales.....	28
2. Obtención de la población segregante.....	33
3. Obtención de Raíces Engrosadas.....	33
Conclusiones	36
Bibliografía	37
3. Desarrollo de marcadores a partir de genes candidatos de las rutas de síntesis de antocianinas y carotenos.	39
Resumen	41
Introducción	43
1. Genes Candidatos.....	43
2. Desarrollo de Marcadores.....	46
3. Flavonoides/Antocianinas.....	46
3.1 Caracterización Molecular de los genes de la Biosíntesis de Antocianinas.....	48
4. Carotenoides.....	52
4.1 Caracterización Molecular de los genes de la Biosíntesis de Carotenos.....	53

5. Análisis bio-informático para la identificación de EST relacionadas con la síntesis de Antocianinas y Carotenos.....	58
6. Hipótesis.....	58
7. Objetivo.....	58
8. Objetivos Específicos.....	59
Materiales y métodos.....	60
1. Material vegetal.....	60
2. Cuantificación de ADN.....	60
3. Selección de genes candidatos.....	60
Resultados y Discusión.....	63
1. Detección de ESTs.....	63
2. Desarrollo de Marcadores de genes candidatos.....	64
3. Antocianinas.....	67
3.1 Chalcona Sintetasa (CHS).....	67
3.2 Chalcona Isomerasa (CHI).....	67
3.3 Flavanone-3-hidroxilasa (F3H).....	72
3.4 Dihidroflavonol 4 Reductasa (DFR).....	78
3.5 Antocianidin Sintasa (ANS).....	86
3.6 UDP glucosa: flavonoid 3-O-glucosyltransferasa (UF3TG).....	92
4. Carotenos.....	95
4.1 Isopentenil Difosfato Isomerasa (IPI-IPP).....	95
4.2 Geranil-geranil Pirofosfato Sintasa (GGPS).....	100
4.3 Fitoeno Sintasa (PSY).....	101
4.4 Licopeno β -ciclaza (LYC- β).....	105
4.5 Anillo β -hidroxilasa o beta caroteno hidroxilasa (CHY- β).....	110
4.6 Zeaxanthin epoxidasa (ZEP).....	117
5. Evaluación de Genes Candidatos en una colección núcleo de <i>Ipomoea batatas</i> : Análisis de diversidad y evaluación de su uso potencial para mapeo por asociación.....	123
Conclusiones.....	127
Bibliografía.....	128
4. Caracterización Morfológica y Bioquímica de una población de mapeo. 137	137
Resumen.....	138
Introducción.....	139
1. Carotenos.....	139
1.2 Ruta metabólica de los carotenoides.....	143
2. Antocianinas.....	148
2.1 Ruta metabólica de las antocianinas.....	150
3. Capacidad Antioxidante.....	153
4. Hipótesis.....	154
5. Objetivo general.....	155
6. Objetivos específicos.....	155

Materiales y métodos	156
1. Material vegetal.....	156
2. Diseño Experimental y Evaluación Fenotípica.....	156
2.1 Evaluación del Color visual.....	156
2.2 Evaluación Color Objetivo.....	157
2.3 Cuantificación de carotenos totales mediante espectrofotometría.....	158
2.4 Cuantificación de β -carotenos mediante HPLC.....	158
3. Análisis estadístico.....	159
Resultados y Discusión	161
1. Evaluación fenotípica de los parentales.....	161
2. Evaluación del Color visual en la progenie.....	164
3. Evaluación del color objetivo en la progenie.....	169
4. Evaluación del Contenido de Caroteno.....	174
4.1 Contenido de carotenos totales mediante espectrofotometría.....	175
4.2 Contenido de carotenos totales mediante HPLC.....	177
5. Contenido de Antocianinas.....	179
Conclusiones	180
Bibliografía	181
5. Desarrollo de un mapa de ligamiento y localización de marcadores funcionales	187
Resumen	189
Introducción	190
1. Marcadores Genéticos.....	190
1.1 Marcadores moleculares.....	191
1.2 Marcadores moleculares disponibles en <i>Ipomoea</i>	193
2. Desarrollo de Mapas genético en plantas.....	194
2.1 Mapeo en genomas poliploides.....	196
2.2 Genética y mapeo en <i>Ipomoea batatas</i>	200
2.3 Mapeo comparativo y genes candidatos.....	201
2.4 Mapeo de QTL.....	203
3. Problemática abordada.....	205
4. Hipótesis.....	205
5. Objetivo general.....	206
6. Objetivos específicos.....	206
Materiales y métodos	207
1. Material Vegetal.....	207
2. Evaluación Molecular.....	207
2.1 Extracción de DNA y Cuantificación.....	207
2.2 Evaluación y Amplificación de Marcadores SSR y GC.....	207
2.3 Evaluación y Amplificación de Marcadores AFLP.....	207
2.4 Evaluación de los marcadores.....	209
3. Segregación de marcadores.....	210

4. Análisis de Ligamiento.....	211
5. Determinación de ligamientos en repulsión y acoplamiento.....	215
6. Estimación del tipo de ploidía.....	216
7. Mapeo de caracteres fenotípicos.....	216
7.1 Caracterización fenotípica.....	216
7.2 Análisis de QTLs.....	216
Resultados y Discusión.....	217
1. Análisis genético de los marcadores moleculares.....	217
1.1 Selección de marcadores.....	217
1.2 Segregación de los marcadores.....	219
1.3 Segregación de los alelos según tipo de marcador molecular.....	223
1.4 Tipo de ploidía.....	225
1.5 Distorsión de la segregación.....	229
2. Mapa de ligamiento en <i>Ipomoea batatas</i>	231
2.1 Mapa del parental 30BG.....	234
2.2 Mapa del parental 45BG.....	238
2.3 Definición de los alelos SSR.....	241
2.4 Mapeo de Genes Candidatos.....	241
2.5 Comparación entre los mapas parentales.....	242
3. Mapeo de QTL.....	248
Conclusiones.....	252
Bibliografía.....	253
Conclusiones Generales y Perspectivas.....	266

1

Introducción General

Carla Marcela Arizio

Introducción

1. El cultivo

La batata comprende una sola especie: *Ipomoea batata* L. Lam. Es conocida en el mundo con diferentes nombre comunes: batata, boniato, camote, patata doce y sweetpotato entre otros. Linneaus la describió por primera vez a la batata cultivada en 1753 como *Convolvulus batatas*. En 1791, Lamarck la describe como *Ipomoea batatas*, denominación aceptada actualmente. *Ipomoea batatas* es una especie derivada de un ancestral diploide: *Ipomoea trifida* (Nishiyama, Miyazaki & Sakamoto, 1975). La batata y sus especies silvestres relacionadas se encuentran clasificadas dentro de la familia de las Convolvuláceas, genero *Ipomoea*, subgénero *Eriospermum*, sección *Eriospermum* y series *batatas* (Austin & Huamán, 1997). El género *Ipomoea* comprende entre 600 y 700 especies. Más de la mitad concentradas en América, donde se encuentran más de 400 taxas, clasificados dentro de tres subgéneros: *Eriospermum*, *Quamoclit* e *Ipomoea*. Aunque el sitio exacto del origen y domesticación de la batata no ha sido bien definido, Austin (1988), basado en el análisis de caracteres morfológicos de las especies silvestres del género *Ipomoea*, postuló que el origen de *Ipomoea batatas* L. esta comprendido entre la península de Yucatán en México y la desembocadura del río Orinoco en Venezuela. Estudios de diversidad genética en variedades de batata de diferentes regiones de América Latina, utilizando marcadores moleculares AFLP, encontraron la mayor diversidad molecular en América Central; estos datos en conjunto con la riqueza de especies silvestres de *Ipomoea* que se encuentran en la región, proveen fuerte evidencia de que América Central puede ser el centro de origen de la especie. La batata cuenta además con tres centros de origen secundario de diversidad genética, donde el cultivo evolucionó separadamente de sus ancestros. El centro primario de diversidad de la batata está ubicado en el noroeste de América del Sur (Colombia, Ecuador y Perú) (Zhang *et al.* 1998) y parte de América Central (como Guatemala), donde existe una gran diversidad de batatas nativas. El centro secundario de diversidad fuera de América está en Nueva Guinea, Indonesia y Filipinas (Jarret & Austin 1994). Este cultivo abarca la zona de los trópicos, subtrópicos y zonas de temperatura templada entre la latitud 40°N y 40°S desde el nivel del mar hasta los 2000 metros de altura.

Los diferentes clones de batatas varían ampliamente en gusto, tamaño, forma, peso, y textura. La variedad en la coloración de piel y pulpa es una característica sobresaliente, pueden tener pulpa blanca, amarilla, naranja, morada, rojo, rosa y violeta mientras que la piel presenta una gama de amarillos, rojo, naranja, marrones y morados.

1.1 Importancia del cultivo

La batata (*Ipomoea batatas* L (Lam.) es uno de los más importantes, versátiles e inexplorados cultivos para alimentos en el mundo. Se cultiva en más de 100 países. Con unas 107-120 millones de toneladas producidas anualmente en el mundo en los últimos 10 años, en un área promedio de 9 millones de hectáreas (FAOSTAT 2006). Ocupa el 7º lugar en producción en países en desarrollo después del arroz, caña de azúcar, trigo, maíz y papa y el tercero de los cultivos de raíces/tubérculos en importancia económica después de la papa y la mandioca (FAOSTAT 2001). Pese a ser un cultivo de origen americano, más del 90% de la producción está en Asia. China es el principal productor mundial, con un 52% del área cultivada. Los únicos países industrializados que producen cantidades apreciables de batata son Japón (1,15 millones t) y Estados Unidos (604.000 t). América Latina produce solo 1,36 millones de toneladas que equivale al 1.5% de producción total (FAOSTAT 2007). A nivel mundial es un cultivo que está en retroceso, salvo casos excepcionales como China y Nueva Zelanda, en donde la producción ha crecido. Esta tendencia parece estar revirtiéndose en los EEUU, donde el consumo creció un 13% entre 2005 y 2008 (Smith & LaBonte, 2009). Mientras que la población mundial se ha casi duplicado en los últimos 40 años, la producción de batata prácticamente no ha variado (Kays, 2006).

En las últimas cuatro décadas, los usos que se han dado a la batata en estos países se han diversificado considerablemente, a pesar de que comúnmente se le considera en la categoría de cultivo de subsistencia, seguridad alimentaria o como alimento utilizado en época de carestía. La producción y utilización es a menudo considerado como un medio para mejorar los ingresos y la seguridad alimentaria en los segmentos más pobres de la población rural. Actualmente es utilizado tanto para consumo fresco de sus raíces para la alimentación humana, así como el follaje para consumo animal. El procesamiento de batata es una utilización secundaria para alimentos típicos como el dulce de batata y batatas en almíbar. Recientemente, el desarrollo de variedades con pulpa totalmente moradas, permitió el uso industrial para la obtención de colorante en Japón. Además, la producción de almidón es uno de los principales usos en países como China y Japón.

1.2 Características alimenticias

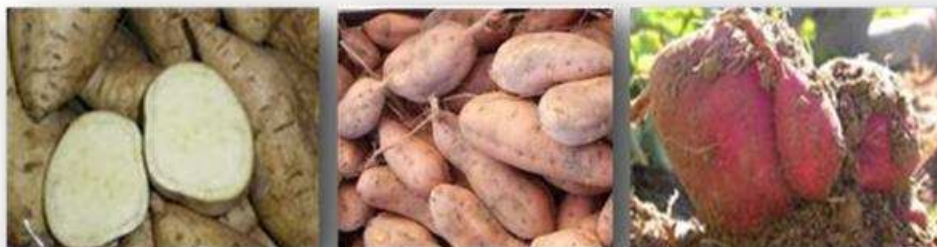
La batata posee un 30 % de materia seca, variando entre 15% y 40% dependiendo del cultivar, clima, tipo de suelo e incidencia de plagas y enfermedades. La mayor parte de la materia seca la constituyen los hidratos de carbono, principalmente el almidón (70% en promedio). Los principales azúcares hallados en la batata cruda son sacarosa, glucosa, fructuosa y también maltosa. Tiene bajo contenido en grasas (1%), con valores máximos de 2,5 %. Los minerales constituyen entre el 3 y 4 % de la

materia seca, siendo el potasio el que se halla en mayores cantidades (1,7 % de la materia seca). Otros grupos de constituyentes (menos del 1 % de la materia seca) son las vitaminas y los pigmentos, en particular puede contener altas cantidades de beta caroteno (precursor de la vitamina A) y antocianinas. También es una fuente importante de vitamina C, y contiene moderadas cantidades de vitaminas del grupo B (Martí 2008).

1.3 Producción de batata en la Argentina

En Argentina al igual que en el resto del mundo, se observa una tendencia a la baja de la producción. En nuestro país la superficie plantada se redujo en un 40% en 2002 con respecto a 1988 (INDEC 2002), estimándose que en 2007 se plantaron unas 10.000ha. La producción alcanza unas 120.000 t, y el consumo per cápita es de 3kg. Esto contrasta con los 20 kg/habitante que se consumían al inicio de los años 70' y los 10 kg/habitante al inicio de los 90' (Maggi, 1990). La región pampeana (Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe) y el NEA tienen el 83% de la superficie plantada, con 43% para la primera y 40% para la segunda. El NOA posee el 15%, y el restante 2% corresponde a Cuyo (SAGPyA, 2008). En la zona pampeana y en Cuyo se plantan cultivares de piel morada y pulpa amarilla, como Morada INTA y Arapey mientras que en el NEA predominan materiales de piel y pulpa blanca, como Okinawa 100 en Corrientes, o pulpa anaranjada, como Gem en Entre Ríos. La producción del NEA, salvo la de Formosa, es en su mayoría para mercados regionales y autoconsumo. En el NOA coexisten cultivares locales de pulpa blanca con materiales de piel morada y pulpa amarilla (Figura 1).

Figura 1. Variedades de batatas cultivadas en Argentina.



El Mercado Central de Buenos Aires comercializa aproximadamente 18.000t de batata al año, casi 10.000t menos que lo registrado en el año 1999 (Dirección De Mercados Agroalimentarios-Sagpya Sobre Mercado Central, 2008).

2. Mapas genéticos

La aplicación de los marcadores moleculares se ha convertido en una extraordinaria herramienta para el análisis genético. En el marco del mejoramiento vegetal los mapas genéticos posibilitan la cobertura y análisis de genomas completos, descomposición de caracteres genéticos complejos (QTLs) en componentes mendelianos, localización de regiones cromosómicas que controlan caracteres de importancia agronómica, cuantificación de los efectos de dichas regiones en la característica estudiada, identificación de genotipos únicos en poblaciones segregantes a través de la selección asistida por marcadores e incorporación de genes de interés en un fondo genético o piramidización de genes. Desde otra perspectiva, los mapas genéticos generan la información básica sobre la estructura y organización de un genoma, como pueden ser, reordenamientos cromosómicos (inversiones, traslocaciones, duplicaciones) o identificar regiones de alta concentración de genes. Son además el punto de partida para el clonado posicional de genes: utilización de información genética (disposición espacial de los genes), molecular (secuencia nucleotídica) y funcional (expresión de genes) de un genoma para identificar el gen responsable de un carácter particular (Paterson 1996) (Ferreira & Grattapaglia 1998) (Carrera *et al.* 2004). Un mapa de ligamiento es una poderosa herramienta para la localización de genes, y es la base para la selección asistida por marcadores, además de aportar información para entender la base biológica de caracteres complejos y la poliploidía.

En *Ipomoea batatas* el uso de herramientas moleculares en los programas de mejoramientos se encuentran demorada, debido a dos factores: poca disponibilidad de dichas herramientas y la complejidad y desconocimiento del genoma de la especie. El diseño de nuevos marcadores moleculares neutros o asociados a caracteres de interés así como el desarrollo de mapas de ligamiento está en progreso. Actualmente los SSR desarrollados no han sido localizados en un mapa para esta especie ni se conoce la localización de genes relacionados con la síntesis de pigmentos. La estructura genética hexaploide de la batata limita el desarrollo de nuevas variedades y la aplicación de MAS a los programas de mejoramiento. Esta característica sumada a su comportamiento reproductivo, hace que el “método de selección masal” sea el más utilizado para la obtención de nuevos clones dejando de lado los clásicos cruzamientos controlados. Avanzar en el conocimiento del genoma de esta especie, el desarrollo de marcadores moleculares asociados a caracteres bióticos y abióticos de interés y adoptar los cruzamientos controlados son todas acciones que deben avanzar de manera conjunta.

Los últimos avances en la biología molecular y biotecnología en plantas ofrecen nuevas tecnologías que ayudarían a reducir los costos en el mejoramiento y el tiempo necesario para el desarrollo de

nuevas variedades. Estas técnicas pueden proveer a los mejoradores de batata una metodología de evaluación adecuada y práctica y han probado ser más precisas y fáciles para ser usadas en la búsqueda de genes específicos o para introducir nuevos caracteres en cultivares comerciales.

La **hipótesis general** de este trabajo asume que el desarrollo de marcadores de genes candidatos diseñados para amplificar los intrones permitirá la detección de polimorfismo y su localización en un mapa de ligamiento. Se espera aportar nuevos conocimientos acerca de la estructura y secuencia de los genes relacionados con la síntesis de pigmentos. Así como caracterizar fenotípicamente la población de mapeo para identificar regiones genómicas asociadas a los caracteres de interés.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar en bancos de datos de dominio público la disponibilidad de secuencias genómicas y cDNA de genes relacionados con la síntesis de los principales pigmentos reportados en *Ipomoea batata*.
2. Desarrollar marcadores moleculares funcionales a partir de las secuencias encontradas.
3. Corroborar la identidad de los marcadores desarrollados por homología con las secuencias depositadas en el NCBI mediante el algoritmo BlastX.
4. Desarrollar una población de mapeo a partir de padres contrastantes para la coloración de piel y pulpa de la raíz engrosada de *Ipomoea batatas*.
5. Evaluar la población de mapeo con marcadores neutros tipos SSR y AFLP.
6. Evaluar la población de mapeo con los marcadores de GC.
7. Desarrollar un mapa de ligamiento localizando los marcadores SSR, AFLP y de GC.
8. Caracterizar fenotípicamente la población de mapeo.
9. Mapeo de las características relacionadas con color de piel y pulpa.

“La estrategia de genes candidatos intenta vincular a través de análisis de mapeo, secuencias que tienen un rol funcional conocido con loci de características cuantitativas (QTL) que son responsables de la variación observada”.

4. Diseño de Investigación



Bibliografía

- Austin, D. F. & Huamán Z. 1997. Convolvulaceae (Morning Glory Family).
- Austin, D. F. 1988. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In P. Gregory (ed.) Exploration, Maintenance and Utilization of Sweet Potato Genetic Resources. CIP, Lima, Peru, pp. 27–60.
- Carrera, A.; Tranquilli, G.; Helguera, M. 2004. Aplicaciones de los marcadores moleculares. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, Ediciones INTA, Argentina, ISBN Nro 987-521-138-9. V.
- Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski (Eds.). Parte IV, Cap. 2:149-160.
- FAOSTAT 2001, 2005, 2007 <http://faostat.fao.org/>
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Ed. EMBRAPA. 220 p.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. 2002. Censo Nacional Agropecuario.
- Jarret R. L. & Austin D. F. 1994. Genetic diversity and systematic relationships in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. and related species as revealed by RAPD analysis. Genetic Resources and Crop Evolution 41:165-173
- Kays, S. 2006. Flavor, the key to sweetpotato consumption. Acta Horticulturae 703:97-105.
- Maggi, C. 1990. La comercialización de batata en la Argentina: un estudio basado en la información del mercado Central de Buenos Aires. INTA, Instituto de Economía y Sociología Rural. Buenos Aires.
- Martí H. 2008. La batata: oportunidades para una hortaliza subutilizada. Boletín Hortícola n. 39
- Nishiyama Ichizo I, Tsukasa Miyazaki & Satoshi Sakamoto. 1975. Evolutionary autopoloidy in the sweet potato (*ipomoea batatas* (L.) Lam.) And its progenitors. Euphytica 24 197-208
- Paterson, A.H., 1996. Mapping genes responsible for differences in phenotype, In: A.H. Paterson (Ed.), Genome Mapping in Plants, pp. 41–54. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press; Austin, Texas.
- SAGPyA 2008. Información de Producción Hortícola. Dirección de Mercados Agroalimentarios. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/dma/hortalizas/hortalizas.php>
- Smith, T. P., & LaBonte, D. 2009. The Sky's the Limit: Change in the Sweet Potato Industry. Louisiana Agriculture Magazine 52(2):6-7
- Zhang, D. P., Ghislain, M., Huaman, Z., Golmirzaie, A. & Hijmans, R. 1998. RAPD variation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars from South America and Papua New Guinea. Genet. Resour. Crop Evol. 45:271–277.

2

**Desarrollo de una
población de mapeo en
Ipomoea batatas L. Lam**

Carla Marcela Arizio

Resumen

Se desarrollo una población de mapeo de 113 individuos a partir del cruzamiento de dos clones heterocigotas de *Ipomoea batatas* segregantes para la coloración de piel y pulpa. Para la elección de los parentales, previamente fueron evaluados diferentes clones conservados en el Banco in vitro del INTA Castelar a fin de detectar aquellos cruzamientos que fueran compatibles. Los clones que no florecen en las condiciones de la provincia de Buenos Aires, fueron injertados y puestos en condiciones de inducción de floración. Para algunos genotipos no se logró establecer el injerto. Aquellos en los que el injerto prosperó, se evaluó la autocompatibilidad así como la compatibilidad con los otros clones. Todos los clones ensayados son compatibles entre si. Se detectó un genotipo autocompatible (30BG). Se seleccionaron dos genotipos compatibles, con hábito de floración abundante, de coloración contrastante de piel y pulpa y con la mayor distancia genética posible, 30BG y 45BG. A partir del cruzamiento recíproco y manual entre ellos, se obtuvieron 113 progenies que fueron mantenidas en invernáculo y multiplicadas mediante esquejes. La población de mapeo y parentales fue sembrada a campo.

Introducción

1. Estrategia de obtención de la población de mapeo

La estrategia para la obtención de una adecuada población de mapeo, es un paso central del proceso de construcción de un mapa de ligamiento. La elección de parentales que difieran significativamente en las características a estudiar es un pre-requisito central. Es importante seleccionar a partir de un panel de fenotipos, aquellos que se ubiquen en los extremos de la distribución fenotípica del carácter de interés. Adicionalmente, conocer la heredabilidad del rasgo es también un dato relevante. Una segunda característica de interés que debe ser considerada es el modo de reproducción de la especie. Existen dos tipos básicos de estrategia reproductiva, la que se autocruzan (naturalmente o artificialmente) como *Arabidopsis thaliana*, soja (*Glycine max*), remolacha (*Beta vulgaris*) y maíz (*Zea mays*) o las autoincompatibles como la papa (*Solanum tuberosum*). Las plantas autoincompatibles presentan alta heterocigosidad y no es posible obtener líneas homocigotas.

Para el caso de las especies que permiten la autofecundación, la obtención de poblaciones de mapeo puede ser a partir de diferentes estrategias: derivadas de cruzamientos entre líneas altamente homocigotas (inbred lines) y posterior generación de la filial F2 o sucesivas (F3, F4, F5, etc), líneas recombinantes homocigotas (RIL), poblaciones backcross (BC) y líneas Dobles haploides (DH). La población de mapeo más simple es la filial 2 (F2): dos líneas puras resultantes de autocruzamientos natural o artificial son seleccionadas como padres. La progenie de estos parentales es denominada generación F1, y presentan todos fenotipos similares. Una planta F1 individual es autocruzada generando la población F2, que segrega para las características diferentes de los parentales.

Las RILs provienen de individuos de F2 que alcanzaron homocigosis por autocruzamiento. El grado de recombinación es mayor comparado con las poblaciones F2, por lo que se pueden obtener mapas más saturados y con marcadores fuertemente ligados.

Las poblaciones de Backcross (BC) permiten el análisis de fragmentos particulares de ADN provenientes de un parental en el fondo genético de otro. Se obtienen por medio de sucesivos cruzamientos con uno de los parentales, denominado padre recurrente.

Finalmente, las líneas Doble haploide contienen dos set idénticos de cromosomas en cada célula. Son completamente homocigotas y constituyen una fuente permanente para el mapeo porque no presentan heterocigosidad residual.

Sin embargo, en aquellas especies donde la autocompatibilidad no es posible o el ciclo de vida es muy largo (forestales), otra estrategia debe ser utilizada: para estos casos, la población de mapeo apropiada es una F1 a partir de padres heterocigotas.

En *Ipomoea batatas* L. Lam, el principal impedimento es la auto-incompatibilidad esporofítica, lo que imposibilita contar con clones homocigotas. Por las características de su genoma hexaploide, su auto-incompatibilidad, su compatibilidad limitada entre clones y su reproducción vegetativa, es considerada una especie altamente heterocigota, acorde a una especie de reproducción cruzada (Schneider, 2005). La estrategia a utilizar implica obtener una población F1 segregante a partir de clones parentales heterocigotos, denominada pseudo-test cross (Kriegner *et al.* 2003, Cervantes-Flores *et al.* 2007 y Gratapaglia & Sederoff 1994).

Tres factores prácticos inciden en la obtención de una población F1 en batata: la capacidad de floración, la incompatibilidad cruzada y la fertilidad. Previo a la elección de los clones parentales, es necesaria la determinación de su capacidad de floración y su comportamiento reproductivo, en particular la compatibilidad entre ellos. En cuanto a la incompatibilidad de la especie, Venkateswarlu (1980) llevó adelante un estudio de la morfología floral y su relación con la incompatibilidad. Observó que si bien existen diferencias de tamaño en los órganos esenciales, las flores pueden ser consideradas homomórficas y descartar así que la incompatibilidad observada sea debido a la heterostilia.

Dentro de la colección de batatas conservadas en el banco *in Vitro* del INTA Castelar, existe una gran variación en el hábito de floración entre las diferentes entradas. Bajo las condiciones de la provincia de Buenos Aires, algunos cultivares no florecen, mientras que otros presentan un amplio rango en la cantidad de flores (Hompanera *et al.* 2007). Varias técnicas han sido desarrolladas para promover la floración, fructificación y producción de semillas: fotoperíodo corto, temperatura moderada, limitación en la provisión de agua, injerto, espalderas, etc. En la práctica es necesaria muchas veces una combinación de estas técnicas. En los numerosos trabajos realizados con el objeto de determinar la interacción de los factores climáticos y su correlación con las características varietales, que afectan la producción de flores, frutos y semillas, en general puede observarse que sumado al injerto, la floración es inducida o magnificada utilizando un fotoperíodo de 8 – 11 horas de luz intensa. Mientras que la fructificación es mayor con un fotoperíodo entre 11 y 12 horas (Miller, 1937). La floración y fructificación son mayores con temperaturas entre 20°C y 25°C, con una humedad relativa alta, mayor del 70% (Reynoso *etal.* 1998).

En el programa de mejoramiento de batata en argentina, se utiliza con éxito el injerto sobre una *Ipomoea silvestre*: *Ipomoea nil* vs Kidachi combinado con acortamiento del fotoperíodo.

El injerto en especies que no desarrollan raíces engrosadas, favorecen la acumulación de carbohidratos en la parte aérea de la planta, lo que induce la floración y fructificación (Folquer 1974). La **auto-incompatibilidad** observada en batata es del tipo homomórfica esporofítica que resulta en una falla completa de la germinación del polen en el estigma globoso seco cuando determinados componentes de la cubierta del polen son reconocidos por componentes del estigma, activando un sistema de transducción de señales que impide que el estigma se humedezca y permita la germinación del tubo polínico a través del estilo. El sistema de incompatibilidad (SI) presente en *Ipomoea* parece ser fenotípicamente similar al presente en *Brassica* (Kowiyama *et al.* 1980, 2000) sin embargo no se han encontrado homólogos de los componentes (Glicoproteína y el receptor kinasa) del sistema descritos para *Brassica* en *Ipomoea*, por lo que se propone que dentro del género *Ipomoea*, existiría un nuevo sistema (Kowiyama *et al.* 1996 y Tomita *et al.* 2004). Este mecanismo es el responsable de que la mayoría de los clones resulten auto-incompatibles y que algunos cruzamientos entre clones sean compatibles y otros no.

Otro fenómeno observado es la **compatibilidad unilateral** donde solo es posible la obtención de semillas cuando el cruzamiento es realizado en una determinada dirección (Vimala 1989). Martin&Cabanillas (1968) han encontrado entre 33 clones que la mayoría de las combinaciones son recíprocamente fértiles, pero algunas solo eran fértiles en una dirección. Hasta el momento, ningún trabajo explica la naturaleza de este fenómeno.

La habilidad de cruzamiento observada **entre clones** de batata es de amplio rango, entre un 0 a un 100%. En Japón han desarrollado un sistema de clasificación en diferentes **grupos de incompatibilidad**, en la actualidad llegan a 18 grupos (Nakanishi & Kobayashi, 1979). Los clones dentro de cada grupo resultan incompatibles mientras que los de diferentes grupos son compatibles. Clones representantes (“Testers”) de cada grupo han sido seleccionados y son utilizados cuando es necesario determinar el comportamiento reproductivo de un nuevo clon (Reynoso *et al.* 1998). De cualquier manera, la incompatibilidad entre clones es poco frecuente entre el germoplasma americano. No es el caso de los clones asiáticos, africanos, o de los programas con una estrecha base genética. Lo que es más frecuente es una incompatibilidad y/o esterilidad parcial, que limita significativamente la productividad de semillas. Así, en vez de obtener 4 semillas/cruzamiento se obtiene de 1.2 a 1.5, en promedio, con una distribución de Poisson. (Reynoso, comunicación personal).

La incompatibilidad y fertilidad limitada constituyen una seria barrera para el mejoramiento genético y la conservación de esta especie. La existencia de fertilidades parciales o intermedias entre diferentes clones y la observación de que encontrar la totalidad de semillas esperadas (4) es

un raro fenómeno, sugiere según Martin & Cabanillas (1966) que algún otro mecanismo aparte de la incompatibilidad esporofítica está operando. Diferentes autores han propuesto variadas explicaciones. Ting & Kehs (1953) proponen anomalías cromosomales como posible causa, mientras que Jones (1964) lo explica por ataques de patógenos (*Fusarium*) que destruyen a las células madres del polen y las tétradas. Martin & Cabanillas (1966) postulan la existencia de alguna barrera entre la penetración del tubo polínico al estilo y el desarrollo de semillas maduras. Esta propuesta se debe a la observación de granos de polen que germinan sin dificultad y penetran el tubo polínico en el estilo, pero son retrasados y finalmente pocos alcanzan a fecundar el óvulo.

Para la obtención de semillas viables, varias barreras deben ser superadas, a) Incompatibilidad esporofítica (no se observa germinación del tubo polínico en el estigma), b) Crecimiento y posterior retraso del tubo polínico en el estilo, y c) Aborto de los óvulos fecundados.

Martin & Cabanillas (1968) en un trabajo posterior concluyen que la pobre fructificación observada en batata es debido principalmente a barreras de esterilidad que actúan a diferentes tiempos y en diferentes sitios en el proceso de polinización y fertilización.

Por lo que la producción de semillas sexuales en batata se encuentra muy limitada, siendo diferentes factores genéticos y ambientales los responsables.

Dadas las características propias de la especie, la población de mapeo fue una F1 segregante. Como requisitos indispensables los padres a utilizar debían presentar alta heterocigosidad, hábito de floración abundante en las condiciones agroecológicas de la provincia de Buenos Aires y pertenecer a diferentes grupos de incompatibilidad.

Materiales y métodos

1. Selección de parentales contrastantes para el color de piel y pulpa

Se cuenta con clones conservados en el Banco de Germoplasma *in Vitro* del IRB INTA Castelar caracterizados morfológicamente (<http://servicios.inta.gov.ar/bancos>) y molecularmente con Marcadores Microsatélites (SSR) (Arizio *et al.* 2008). Se seleccionaron varios posibles parentales con diferente coloración de piel y pulpa (Tabla 1). Se tuvo en cuenta también su capacidad de floración en las condiciones de temperatura y luz de la región. En aquellos genotipos que no florecen en condiciones de la provincia de Buenos Aires, se llevaron a cabo las metodologías necesarias para inducción de floración. Los clones utilizados fueron cedidos por el Banco de Germoplasma *in vitro* del IRB-INTA Castelar. Inicialmente las vitroplantas fueron rustificadas: los plantines fueron colocados en macetas de ½ litro con tierra esterilizada en una bandeja con abundante agua y tapadas con un plástico transparente para obtener una atmósfera con alta humedad durante una semana. En la semana siguiente, se fue disminuyendo paulatinamente la humedad ambiental y una semana más tarde fueron pasadas a invernáculo con temperatura controlada.

1.1 Inducción de la floración

Como pie de injerto fue utilizada *Ipomoea nil* cv. "Kidachi Asagao". Las semillas fueron tratadas con ácido sulfúrico por 30 minutos. Después de la escarificación, las semillas fueron lavadas en agua corriente y sembradas en macetas de 1 litro en invernáculo. Alrededor de los 40 días de la siembra, las plantas de *Ipomoea nil* que representaron un porte de más de 20 cm, fueron utilizadas como pie de injerto. El tallo de *Ipomoea nil* fue cortado a unos 10 cm del suelo y se realizó un corte longitudinal de 1 cm. con un bisturí. Por otro lado, las plantas de *Ipomoea batatas* fueron crecidas en invernáculo, se procedió a cortar el tallo apical para potenciar las yemas axilares. Los clones fueron cultivados durante un mes en fotoperíodo corto. Se realizó el corte de los tallos de 10 cm. de longitud, se removieron las hojas inferiores, dejando solamente las cercanas al meristema apical. Se realizó un corte longitudinal de 1 cm en forma sesgada conocida como "pico de pato" para injertar en el pie. El injerto fue sujetado con un gancho plástico en la zona de la nueva unión (Figura 1). Las plantas injertadas fueron tapadas con bolsas de polietileno transparentes y puestas en condiciones de sombra por 15 días, para permitir el establecimiento del injerto. Para el éxito del injerto es importante que la diferencia de diámetro entre el pie y la púa sea lo menor posible.

Figura 1: a) Planta de *Ipomoea nil* vc “Kidachi asagao” lista para pie de injerto. b) Injerto recién armado con el gancho plástico. C) Callo en un injerto bien establecido.



Las plantas que mostraron buena respuesta al injerto fueron colocadas en condiciones de fotoperíodo corto (8hs luz) durante un mes para favorecer la floración.

1.2 Evaluación de la compatibilidad y autocompatibilidad

Para la evaluación del comportamiento reproductivo de los clones elegidos, se realizaron cruzamientos recíprocos y auto cruzamientos. Si bien esta especie está clasificada como auto-incompatible se encontraron reportes de posibles genotipos auto-compatibles por lo que fue necesario analizar esta posibilidad en los clones seleccionados. En aquellas flores que fueron seleccionadas para actuar como hembras se procedió a la remoción del androceo previo a la antesis y cada flor fue cubierta con una bolsa de papel parafinado (Figura 2). Por la mañana siguiente se realizaron los cruzamientos frotando las anteras de las flores elegidas como donantes masculinas sobre el estigma. Cada cruzamiento fue registrado colocando una etiqueta atada al tallo de la flor indicando fecha de la polinización, clon madre y clon padre. Las flores fueron nuevamente tapadas.

Figura 2. Emasculación y polinización manual de flores de *Ipomoea batatas*



Para evaluar la autocompatibilidad, las anteras fueron frotadas sobre el estigma de la propia flor y se procedió a taparlas. Se evaluó la fructificación (desarrollo de la cápsula) como medida de cruzamiento positivo. Entre los 40-50 días post-polinización, las cápsulas se encontraban maduras

para su remoción. Las cápsulas maduras se tornan totalmente marrones y el pedúnculo se seca. La cápsula debe ser removida de la planta cuando se encuentran maduras, ya que son cápsulas dehiscentes y podemos perder la identidad de las semillas. Se evaluaron entre que clones existía compatibilidad sexual y cuáles resultaron autocompatibles.

1.3 Selección de los parentales para la generación de la población de mapeo

Para la selección de los parentales fue tomada en cuenta la capacidad de floración, el índice de similitud con marcadores moleculares, la pertenencia a diferentes grupos de compatibilidad y una coloración de piel y pulpa diferencial.

2. Desarrollo de una población segregante para la coloración de piel y pulpa.

Para el desarrollo de la población se realizó el cruzamiento manual de los genotipos seleccionados de manera recíproca, lo que permite evaluar si existe efecto del cruzamiento para las características analizadas. Los cruzamientos fueron realizados durante la mañana (entres 9 y 10.30 horas), horario en el que se espera un mayor porcentaje de cruzamientos viables entre genotipos compatibles (Folquer 1974). Si bien varios autores sugieren como óptima un horario más temprano, es necesaria la presencia de luz para la dehiscencia del polen. Dado que uno de los parentales seleccionados presenta auto-compatibilidad, fue necesaria la emasculación previa a la antesis para ser usado como madre. Entre los 40 y 50 días post-fecundación se cosecharon las cápsulas y las semillas fueron escarificadas en ácido sulfúrico por 20 minutos y se lavaron con abundante agua. Las semillas se sembraron en macetas en invernáculo con temperatura y luz controlada. Cuando el porte de las plantas lo permitió, fueron cortados esquejes para la multiplicación de cada progenie.

2.1 Obtención de plantines y batatas de la población

Dos días previo a la siembra en campo, esquejes de 10- 15 cm. de los genotipos parentales y de los individuos de la población fueron cortados de las plantas madres y colocados en agua para favorecer el enraizamiento, posteriormente fueron trasplantados a campo. Se utilizó un diseño de dos bloques al azar. La plantación a campo se realizó con una distancia entre plantas de 30 cm. y entre surcos de 80 cm sobre camellones, la misma se realizó a mediados de noviembre de 2006. Las raíces fueron cosechadas a los 120 días. El material fue lavado y almacenado en cámara a 15º C de temperatura y 80% de humedad relativa.

Resultados y Discusión

1. Selección de Parentales

Para el desarrollo de la población de mapeo se ajustó la inducción de la floración que involucró las técnicas de injerto y control del fotoperiodo. La selección de los genotipos parentales implicó la determinación de las relaciones de autocompatibilidad/incompatibilidad, los grupos de compatibilidad al que pertenecen los materiales y la evaluación de la existencia o no de comportamiento diferencial en los cruzamientos recíprocos. Fueron seleccionados 12 clones del Banco in Vitro para ser evaluados como posibles parentales, teniendo en cuenta principalmente el coeficiente de similitud genético mediante marcadores moleculares y la coloración de piel y pulpa (Tabla 1). Cinco replicas de cada clon fueron rustificados y llevados a invernáculo bajo condiciones controladas. Todos los clones de los genotipos 133 y 327 murieron. Los 7 clones que presentaban como hábito de floración ralo o ninguno fue tratado con fotoperiodo corto por un mes, posteriormente fueron injertadas en un pie de *Ipomoea nil* y puestas nuevamente bajo fotoperiodo corto, los tres clones restantes que presentaban hábito profuso o moderado fueron crecidos sin ningún tratamiento.

Tabla 1. Entradas seleccionadas para los estudios de compatibilidad. Procedencia, coloración de piel y pulpa y hábito de floración.

Nº entrada	ID_recolector	Nombre Local/Cultivar	Procedencia	Color Piel/Pulpa	Hábito de Floración
5	CIP-20	Famailla 6	Tucumán	Crema/Amarillo	Ninguno
28	s/d	Southern Delite	USA	Naranja/Naranja	Profuso
29	CIP-19	Colorada Común	Buenos Aires	Morado/Crema	Ninguno
30	CIP-17	s/d	Buenos Aires	Crema/Crema	Profuso
35	s/d	Jewel	USA	Naranja/naranja	Ninguno
45	s/d	s/d	s/d	Morado/ Amarillo con naranja	Moderado
93	DLP4025	s/d	Corrientes	Rojo Morado/Pigmentado con antocianinas	Ralo
133	DLP4090	s/d	Misiones	Rojo Morado/Pigmentado con antocianinas	Moderado
171	s/d	s/d	Formosa	Rojo Morado/Crema	s/d
292	DLP4781	Pata de gallina	Corrientes	Rojo Morado/Blanco	Ralo
327	s/d	Sweet Red	USA	Naranja/Naranja	Ralo
358	s/d	Morada INTA	Buenos Aires	Morada/Amarillo	Ninguno

Después de los tratamientos solo se obtuvieron flores en los clones 93 y 358 pero en cantidad limitada. Para el clon 35 no se logró el establecimiento de ningún injerto, por lo que podría tratarse de algún tipo de incompatibilidad con el pie de injerto. Este fenómeno ya fue reportado previamente por Folquer (1974) en sus ensayos, donde observa la dependencia del éxito del injerto al genotipo. Se determinó el momento de la anthesis. La tarde anterior a la misma se realizó la emasculación, haciendo un corte longitudinal en la corola cerrada y se procedió a la extracción de los estambres. En este estadio, los estambres aún no se han elongado y el polen no se encuentra dehiscente. El análisis de las relaciones de compatibilidad se realizó sobre los 5 genotipos que florecieron, lo que implicó realizar 389 cruzamientos controlados y recíprocos entre todos ellos y autopolinizaciones en invernáculo. Se obtuvieron un total de 198 cruzamientos positivos (Tabla 2). Se registraron el número de cruzamientos realizados y las progenies obtenidas. Se utilizaron las pruebas de independencia de “*Chi cuadrado*” y “*Fisher exact test*” para determinar si el resultado dependía del orden de los padres. Se determinó la existencia de 5 grupos de incompatibilidad. De los genotipos analizados, solo uno presenta autocompatibilidad (30BG) con un 45% de cruzamientos positivos (Tabla 3), característica sumamente interesante que fue reportada previamente por otros autores para *Ipomoea batatas* y otras especies. Hernández & Miller (1963) encuentran entre 19 clones de trabajo 3 auto-compatibles (16%) y Venkateswarlu (1980) solo encuentra un genotipo parcialmente auto-compatibles entre 18 analizados. En *Ipomoea trifida*, no se han encontrado plantas autocompatibles cuando se analizaron 6 poblaciones naturales (224 plantas) (Kowyama *et al.* 1994), mientras que en *Brassica*, especie modelo para estudiar la incompatibilidad esporofítica han sido localizadas entre un 8% y un 13% de plantas autocompatibles. La detección de un clon con esta característica abre un panorama a futuro sumamente interesante, ya que permitiría generar por autocruzamiento sucesivos clones altamente homocigotas. Es importante destacar que la población generada es segregante también para esta característica, ya que el otro parental es autoincompatible, lo que permitirá realizar estudios genéticos-moleculares relacionados con el locus de incompatibilidad.

No existen trabajos que expliquen la reversión de la auto-incompatibilidad, podría deberse a una mutación o falla en el complejo de reconocimiento entre los componentes del estigma y del polen que permite que no sea reconocido el polen como propio y permita la germinación del tubo polínico. Martin & Cabanillas (1966) concluyen que hay una serie de barreras de esterilidad que actúan en diferentes momentos y lugares, las cuales son más importante que la auto-incompatibilidad *per se*, como responsables de la baja producción de semillas en *Ipomoea batatas*, si bien esta última las refuerzan. Según los estudios hechos en *Ipomoea trifida*, el locus S parece

tener dos genes altamente polimórficos. Un mapeo fino cercano a esta región llevada adelante por Tomita (2004) demuestra que la zona correspondiente al locus S, tiene una fuerte represión de la recombinación. La recombinación entre los componentes del locus S, genera la anulación de la auto-incompatibilidad, por lo que la supresión de la recombinación en esa región asegura una herencia en bloque y el mantenimiento de esta característica (Rahman *et al.* 2007).

En relación a la producción de semillas, a diferencia de Wang (1968) que encuentra un promedio de 2.1 semillas por cápsula para un clon auto-compatible (promedio superior a los cruzamientos cruzados) y casi un 80% de fructificación, en este caso el clon 30BG presentó un promedio similar al resto de los genotipos de fructificación y número de semillas.

En dos cruzamientos se observó que el orden de los clones influye en el resultado del cruzamiento, entre los clones 30x45 y 30x93. El resto de los cruzamientos presentó independencia entre estos factores.

Tabla 2. Compatibilidad/incompatibilidad en cruzamientos recíprocos entre los clones seleccionados.

Cruzamiento				Cruzamiento Recíproco			
Combinación	Nº de flores polinizadas	% de Capsulas	Nº de semillas	Combinación	Nº de flores polinizadas	% de Capsulas	Nº de semillas
28x30	192	(98) 51%	121	30x28	51	(28) 55%	37
28x45	4	(3) 75%	7	45x28	9	(6) 67%	9
28x358	10	(6) 60%	6	358x28	7	(5) 71%	7
30x45	17	(12) 71%	14	45x30	10	(3) 30%	4
^a 30x93	3	0	0	93x30	5	(3) 60%	3
30x358	15	(11) 73%	15	358x30	7	(5) 71%	8
^a 45x93	1	(1) 100%	1	93x30	-	-	-
^a 45x358	2	(1) 50%	1	^a 358x45	2	(1) 50%	1

a: Cantidad limitada de cruzamientos, indicativa de cruzamiento positivo, no indicativa del negativo.
b: valores de número de cápsulas indicado entre paréntesis

El porcentaje de cápsulas obtenidas sobre flores polinizadas oscila entre el 30% y el 75% dependiendo de los clones utilizados. Folquer (1974) realiza una revisión del estado del tema, diferentes autores coinciden que oscila normalmente entre un 13.1 y 97.8% (Fujise *et al.* 1955), Hernández y Miller (1963) encuentra entre un 20 y 50% con un promedio de 35%. Nunca se observó un 100% de cruzamientos positivos (excepto para un cruzamiento con muy bajo número de prueba), este fenómeno es denominado “pseudo-compatibilidad” y es explicado por diferentes motivos:

fertilidad del polen, fertilidad del óvulo y condiciones ambientales en el momento del cruzamiento, entre otros. La fertilidad en batata frecuentemente ronda entre el 20 y el 50%, inclusive la esterilidad total no es rara. Esta limitada fertilidad gamética es explicada también por anomalías observadas durante la meiosis, asociada a la naturaleza hexaploide del genoma de batata (Reynoso *et al.* 1998).

Se observa un promedio general de 1.2 semillas por cápsula. En algunos casos se observó que depende también de la dirección del cruzamiento (Figura 2). Nunca se alcanza el potencial de 4 por cápsula, aunque en las flores en las que se realizó un conteo de cantidad de óvulos, el número era el esperado (datos no publicados), sin embargo Wang (1968) determinó que el 68% de los ovarios tienen solo dos óvulos en dos clones analizados. También fue observado de manera recurrente, el aborto de cápsulas en medio del proceso de formación, las altas temperaturas es una de las variables que genera ese efecto en el desarrollo de la semilla.

Figura 2: Relaciones del comportamiento reproductivos entre los clones ensayados.

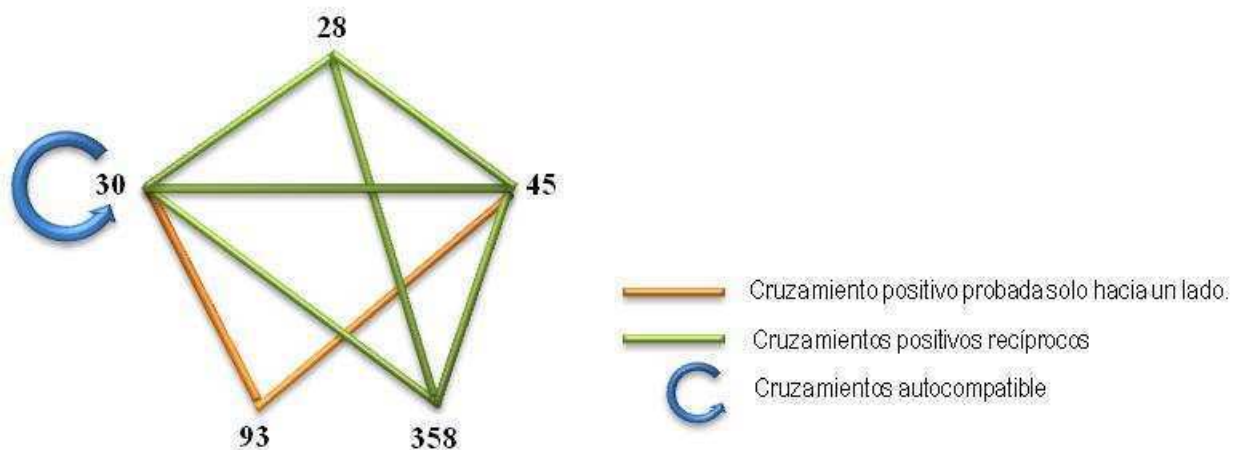


Tabla 3. Autocompatibilidad de los clones seleccionados de batata.

Auto-Cruzamiento			
Combinación	Nº de flores polinizadas	% de Capsulas	Nº de semillas
28x28	9	0	0
30x30	33	(15) 45%	18
45x45	9	0	0
358x358	3	0	0

De los 5 genotipos analizados, fueron seleccionados como parentales los genotipos 30BG (piel y pulpa crema) y 45BG (piel morada y pulpa amarilla con manchas naranjas), por presentar ambos abundante floración sin necesidad de injerto, ser compatibles, presentar coloración de piel y pulpa contrastante y baja similitud genética. El genotipo 45BG resultó auto-incompatible, mientras que el genotipo 30BG es auto-compatible. Para este último genotipo fue necesario realizar emasculación previa a la antesis para evitar posibles autofecundaciones durante los cruzamientos. El índice de similitud obtenido mediante microsatélites entre los dos clones seleccionados fue bajo (0.32), asegurando parentales de una amplia base genética (Figura 3 y 4).

Figura 3: Índice de similitud obtenido con SSR entre los parentales seleccionados.

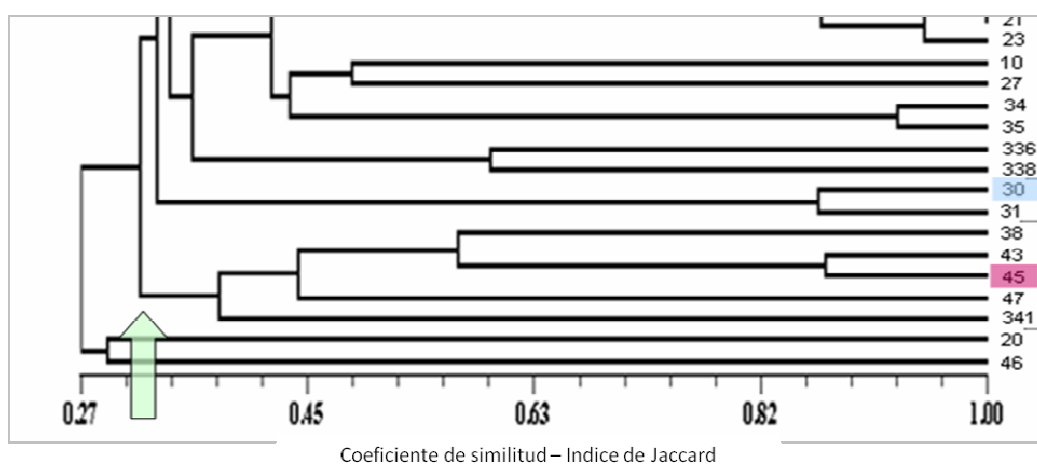
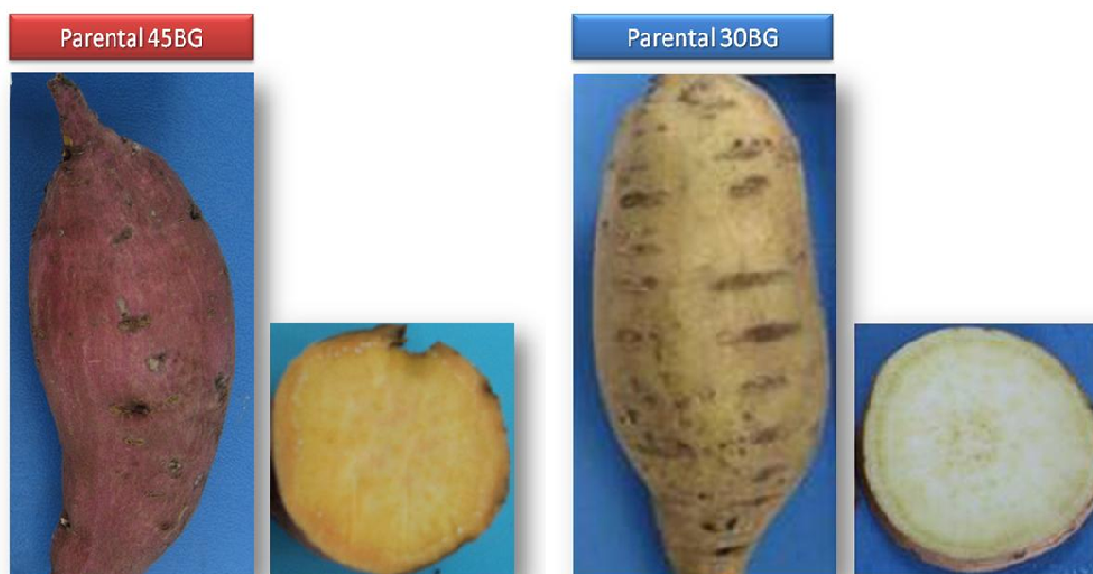


Figura 4. Parentales seleccionados para la generación de la población de mapeo.



2. Obtención de la población segregante

A partir de los genotipos 30BG y 45BG se desarrollaron las poblaciones de mapeo. Se realizaron 290 cruzamientos manuales recíprocos (121 hacia un lado y 169 hacia el otro) de los cuales 107 resultaron positivos, obteniéndose 140 semillas. Finalmente resultaron en 113 progenies. (Tabla 4).

Tabla 4. Desarrollo de la población segregante con los parentales seleccionados. Cruzamientos recíprocos-controlados.

Cruzamiento				Cruzamiento Recíproco			
Combinación	Nº de flores polinizadas	% de Capsulas	Nº de semillas	Combinación	Nº de flores polinizadas	% de Capsulas	Nº de semillas
30x45	169	44%	98	45x30	121	27%	42

El promedio de semillas obtenidas (1.3) es coincidente con la bibliografía (Folquer 1974 y Hernández & Millar 1963) y no se observan diferencias significativas para esta característica entre ambas direcciones de cruzamiento. Se observa un porcentaje diferencial de positivos entre los cruzamientos recíprocos, obteniéndose más cápsulas cuando el cruzamiento se realiza utilizando al clon 30BG como hembra. Se confirmó el comportamiento en relación a la autocompatibilidad de ambos parentales, aumentando el número de cruzamientos (Tabla 5). En el parental 45BG ningún auto-cruzamiento generó cápsulas, mientras que en el parental 30BG, el 40% de los cruzamientos resultó positivo.

Tabla 5. Auto-cruzamiento de los clones seleccionados.

Cruzamiento			
Combinación	Nº de flores polinizadas	% de Capsulas	Nº de semillas
30x30	50	(20) 40%	24
45x45	14	0	0

3. Obtención de Raíces Engrosadas

El porcentaje de germinación obtenido para las progenies descendientes del cruzamiento de los clones 30BG y 45BG fue del 80.7% (140 semillas obtenidas, 113 germinaron). Las plantas madres se mantuvieron en invernáculo (Figura 5) y fueron replicadas cada 6 meses.

Figura 5: Población mantenida en invernáculo y ensayo a campo



En el año 2006 fueron llevados a campo solo 40 genotipos a fin de poner a punto el manejo del material a campo, la cosecha y almacenamiento, así como la evaluación agronómica y bioquímica. Teniendo en cuenta el porcentaje de mortalidad (40%) de los clones, se ajustó la metodología para el ensayo del año siguiente. Se puso en práctica el enraizamiento de los esquejes en invernáculo dos días previos a la siembra. La mortalidad a campo del año 2007 fue significativamente menor (solo 7%) que la observada en el año 2006.

En noviembre de 2007 fueron llevadas a campo toda la progenie y parentales por duplicado. Se realizaron trabajos de labranza para disminuir las malezas. A mediados de marzo fueron cosechadas raíces pertenecientes a 210 plantas. Cada replica fue embolsada e identificada con el código correspondiente (Figura 6). Algunas raíces se encontraban poco desarrolladas, lo que podría indicar que eran de ciclo más largo.

Figura 6. Material cosechado. Cada replica y genotipo de la población fue almacenado en bolsas de red con el número de identificación.



El éxito en la obtención de cápsulas y semillas depende esencialmente de la apropiada selección de los padres. Los ensayos previos de comportamiento sexual entre los potenciales parentales nos permitieron elegir aquellos que nos aseguraran una adecuada cantidad de semillas para un estudio de mapeo. La evaluación de diversidad con marcadores moleculares permitió acotar la búsqueda a genotipos genéticamente distantes o pocos relacionados, aumentando la posibilidad de obtener cruzamientos positivos.

Conclusiones

Se determinaron las relaciones de autocompatibilidad/incompatibilidad entre los clones ensayados.

Se detectó un clon auto-compatibile (30BG), con 45% de cruzamientos positivos.

Los cruzamientos entre todos los clones resultaron positivos, (excepto el cruzamiento en una sola dirección de los genotipos 30-93), indicando que cada uno de los genotipos seleccionados, pertenecen a diferentes grupos de compatibilidad.

Se observaron diferencias en el número de cruzamientos positivos entre cruzamientos recíprocos.

La limitada cantidad de flores obtenidas en los clones injertados no permitió alcanzar un gran número de cruzamientos.

Se observó "pseudo-compatibilidad" en la mayoría de los cruzamientos.

El promedio de semillas (1.3) estuvo acorde a la bibliografía existente.

Algunas de los clones ensayados presentaron incompatibilidad con el pie de injerto, mostrando la dependencia de éxito del injerto al genotipo utilizado.

Se seleccionaron dos parentales segregantes en la coloración de piel y pulpa, con abundante floración, compatibles entre si y con baja similitud genética.

Los parentales elegidos permitieron desarrollar una población de mapeo con 113 progenies.

Bibliografía

- Arizio C.M., Hompanera N., Suarez E. Y. & Manifesto M.M. 2009. Genotypic identification and diversity evaluation of a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) collection using microsatellites. *Plant Genetic Resources*, 7(2):135-138. doi: 10.1017/S147926210809847X, Published online by Cambridge University Press 10 Oct 2008
- Cervantes-Flores J.C., Yencho G.C., Kriegner A., Pecota K., Faulk M.A., Mwanga O.M & Sosinski B. 2008. Development of a genetic linkage map and identification of homologous linkage group in sweetpotato using multiple-dose AFLP markers. *Molecular Breeding* 21:511-532
- Folquer F. 1961. Inducción de floración y fructificación en batatas mediante injerto sobre *Ipomoea fistulosa*. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Agronomía y Zootecnia Miscelanea 11:5-23.
- Folquer F. 1974. Eficiencia varietal en la producción primaveral de semillas de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Revista de Agronomía del Noroeste Argentino*. Vol. XI: 193-225.
- Fujise K, Yunque T. & Chisiki T, 1955. Studies in the habits of flowering and seed setting in the varieties of sweet potato. *Kyushu Agricultural Experimental Station*. Vol. III: 109-142.
- Grattapaglia D. & Sederoff Ronald. 1994. Genetic Linkage Maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a Pseudos-testcross: Mapping strategy and RAPD Markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
- Hernandez T. P. & Miller J.C. 1963. Self and cross-incompatibilities in the sweetpotato. *American Society for Horticultural Science*. 81: 428-433
- Hompanera, N.R., Arizio C.M., Manifesto M., Tillería J. & Martí H. 2005. Catalogo de la colección *in vitro* de batatas (*Ipomoea batatas*, (L.) Lam). V SIRGEALC.
- Jones A. 1964. A disease of pollen mother cells of sweetpotato associated with *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 54:1494-1945.
- Koyama Y, Kakeda K, Kondo K, Imada T. & Hattori T. 1996. A putative receptor kinase gene in *Ipomoea trifida*. *Plant Cell Physiol* 37(5):681–685.
- Koyama Y, Shimano N, & Kawase T. 1980. Genetic analysis of incompatibility in the diploid *Ipomoea* species closely related to the sweet potato. *Theor Appl Genet* 58:149-155.
- Koyama Y, Tsuchiya T. & Kakeda K. 2000. Sporophytic self-incompatibility in *Ipomoea trifida*, a close relative of sweet potato. *Ann Bot* 85(Suppl):191–196.
- Kriegner A., Cervantes J.C., Burg K., Mwanga R.O.M. & Zhang D. 2003. A genetic linkage map of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) based on AFLP markers. *Molecular Breeding* 11:169-185.
- Martín F. & Cabanillas E. 1966. Post-pollen germination barriers to seed set in sweetpotato. *Euphytica* 15(3): 404-411.

- Martín F. & Cabanillas E. 1968. Classification of sweetpotato varieties for compatibility and sterility. *American Society for Horticultural Science* 93:502-511.
- Miller J.C. 1937. Inducing the sweetpotato to bloom and set seed. *Journal Heredity* 30:485-492.
- Nakanishi T. & Kobayashi M. 1979. Geographic distribution of cross incompatibility grupo in sweet potato. *Incompatibility Newsletter* 11:72-75.
- Rahman M.H., Tsuchiya T., Suwabe K., Kohori J., Tomita R.N., Kagaya Y., Kobayashi I., Kakeda K. & Kowyama Y. 2007. Physical size of the S locus regions defined by genetic recombinations and genome sequencing in *Ipomoea trifida*, Convolvulaceae. *Sexual Plant Reproduction* 20(2):63-72
- Reynoso D., Huaman Z. & Aguilar C. 1998. Methods to determine the fertility and compatibility of sweetpotato. In sweetpotato Germplasm Management. Training Manual. International Potato Center (CIP). Lima, Peru.
- Schneider K. 2005. Mapping Populations and Principles of Genetic Mapping. Editado por: Khalid Meksem & Gunter Kahl. *The Handbook of Plant Genome Mapping*. WILEY-VCH pp.3-19
- Ting Y.C. & Kehr A.E. 1953. Miotic studies in the sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam). *The Journal of Heredity* 44:207-211.
- Tomita RN, Fukami K, Takayama S. & Kowyama Y. 2004. Genetic mapping of AFLP/AMF-derived DNA markers in the vicinity of the self incompatibility locus in *Ipomoea trifida*. *Sex Plant Reprod* 16:265-272
- Venkateswarlu T. 1980. Floral morphology and self incompatibility in sweet potato. *Indian J. Bot.* 3: 143-148.
- Vimala B. 1989. Fertility and incompatibility in swet potato (*Ipomoea batatas* L.) *Ann. Agric. Res.* 10: 109-114.
- Wang H. 1968. A Study of fruit and seed setting ability and female sterility in the sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) *Bot. Bull. Acad. Sinica* 9(2):139-153.

3

Desarrollo de marcadores moleculares a partir de genes candidatos de las rutas de síntesis de antocianinas y carotenos

Carla Marcela Arizio

“Es claro que la pigmentación de las flores atrae no solo a los polinizadores sino también a muchos biólogos de plantas incluidos genetistas, debido a que las mutaciones en los genes relacionados con la pigmentación de flavonoides son no-letales y confieren fenotipos de color fácilmente evaluables en tallos, flores y semillas. Varios pigmentos flavonoides, incluidas las antocianinas, pro-antocianinas y flobafones descritos aquí, han servido como importantes características para dilucidar fenómenos genéticos y epigenéticos. Indudablemente, estos metabolitos secundarios pueden mantenerse como importantes y significativas herramientas para los estudios de genética molecular en el futuro”

Chopra et al. 2006

Resumen

El mejoramiento dirigido a incrementar los niveles de β -caroteno y antocianinas en los alimentos, que puede denominarse biofortificación de provitamina A y desarrollo de alimentos funcionales, es un acercamiento económico para atacar la deficiencia de vitamina A en la dieta y mejorar el perfil nutricional de los alimentos. El desarrollo de marcadores moleculares asociados a estos caracteres es una estrategia de suma importancia, constituyendo un gran aporte para optimizar los programas de mejoramiento.

Los genes candidatos son secuencias de genes de función biológica conocida involucrada en el desarrollo o fisiología de algún carácter de interés. Treinta y dos (32) marcadores de doce (12) genes candidatos fueron diseñados luego de una exhaustiva búsqueda en bases públicas y literatura relacionada con genes asociados con la síntesis de los principales pigmentos descritos en *Ipomoea batatas*: antocianinas y carotenos. Se utilizaron las secuencias genómicas, mRNA o bases de ESTs de *Ipomoea batatas*, otras ipomoeas y también de especies no relacionadas. Los marcadores diseñados permitieron amplificar 5 genes estructurales: Flavonol 3-hidroxilasa (F3H), Dihydroflavonol 4-reductasa (DFR), Chalcona isomerasa (CHI), Antocianidin Sintasa (ANS) y UDP glucosa: Flavonoid 3-O-glucosyltransferasa (UF3TG) de la ruta de síntesis de antocianinas y 5 genes principales de la ruta de carotenos: Fitoeno sintasa (PSY), Isopentenil pirofosfato sintasa (IPP), Lycopeno β -ciclase (LCY-b), Zeaxanthin epoxidasa (ZEP) y β -Caroteno Hidroxilasa (CHY β). Se diseñaron varios marcadores por gen con el fin de detectar polimorfismo de tamaño para un posterior mapeo de los genes. Para esto se buscó la amplificación de la región del intrón, dado que la región de los exones presenta secuencias y longitudes altamente conservadas. La amplificación de los marcadores fue realizado en los genotipos parentales y 6 progenies a fin de evaluar su polimorfismo. Treinta (30) marcadores generaron productos de amplificación. Diecinueve (19) resultaron en alelos polimórficos, con diferentes tasas de segregación y dosis alélicas. Once (11) marcadores resultaron monomórficos entre los genotipos elegidos para la evaluación. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados para confirmar su identidad utilizando la comparación de secuencias con el banco de datos del NCBI. Veintinueve (29) marcadores presentan homología con las secuencias esperadas. Estos marcadores relacionados con genes de interés, por su ubicación genómica, tienen importancia en el análisis genético por proveer una estimación directa de la diversidad funcional y dada su alta conservación, presentar mayor transferibilidad entre especies relacionadas favoreciendo estudios evolutivos y mapeo comparativo. La estrategia utilizada permitió obtener marcadores polimórficos de los genes de interés, así como aportar información de secuencia y estructura de los mismos. Se

detectaron numerosos elementos móviles descritos para el género en los intrones analizados, algunos de ellos con deleciones.

Con la finalidad de ensayar la potencialidad de los nuevos marcadores para la *caracterización funcional* del Banco de Germoplasma de la especie, algunos marcadores desarrollados fueron analizados en una “core collection” de 40 genotipos de batata resguardada en el Banco de Germoplasma “*in vitro*” del INTA Castelar. Nueve marcadores presentaron 23 nuevos alelos. Se observó una alta tasa de transferibilidad (72%) en *Ipomoeas* silvestres. Estos análisis sientan las bases para el mapeo de asociación de la colección conservada en el INTA.

Los marcadores desarrollados permitieron amplificar los genes relacionados con la ruta biosintética de las antocianinas y carotenoides. La presencia de polimorfismo en el tamaño y el análisis de la tasa de segregación los posiciona como aptos para mapeo. Además este estudio aporta información novel sobre la secuencia y estructura de genes para *Ipomoea batatas*.

Introducción

1. Genes Candidatos

Uno de los principales objetivos de la genética molecular es identificar y aislar genes que gobiernan importantes características. Existen tres principales aproximaciones para el clonado de genes de interés. Dos métodos clásicos como el clonado posicional o mutagénesis por inserción han sido ampliamente usados para identificar con éxito genes mayores (Stein *et al.* 2000, Yan *et al.* 2003, Vandebussche *et al.* 2003). Una tercer estrategia alternativa es la de genes candidatos (GC). Si bien existen diferentes definiciones según la disciplina acerca de qué es un GC, específicamente para la genética de plantas, un GC fue definido como cualquier gen (alelo) con polimorfismo molecular genéticamente ligado a un loci mayor o QTL o genes con polimorfismo molecular asociados estadísticamente con la variación del carácter estudiado (Pflieger *et al.* 2001).

En la estrategia de GC, el genotipado está dirigido a genes candidatos funcionales o posicionales (Pflieger *et al.* 2001). Los Candidatos Funcionales son genes que se conoce o se presume su rol funcional en la determinación del fenotipo de interés, por ejemplo la resistencia cuantitativa a un patógeno o el contenido de pigmentos. Las variantes alélicas de dichos genes pueden ser las causas de la variación natural observada en dicho carácter. En este caso, el polimorfismo de ADN localizado en el gen candidato o físicamente cerca puede ser asociado con la variación del carácter.

Los GC pueden ser genes estructurales o regulatorios de una ruta metabólica dada. La hipótesis de trabajo relacionada con esta estrategia asume que el polimorfismo molecular dentro de los genes candidatos está relacionado con la variación fenotípica. Esta aproximación a los genes ha sido utilizada con éxito en genética animal y humana (Rothschild & Soller, 1997) y a partir de los años 90 se hizo extensiva a las plantas.

El uso de esta estrategia consiste básicamente en tres pasos fundamentales (Pflieger *et al.* 2001), en primer instancia, los genes candidatos son elegidos basados en estudios moleculares y fisiológicos o en datos de ligamiento de un locus que ha sido caracterizado previamente (todos los genes ligados estrechamente a un carácter pueden ser genes candidatos). Segundo desarrollar un mapa de ligamiento, para lo cual debe existir polimorfismo molecular de ese marcador. Esto podría permitir evaluar si existe co-segregación entre el marcador del GC y el *locus* caracterizado. Otra alternativa es realizar asociaciones estadísticas entre el polimorfismo y la variación fenotípica utilizando individuos genealógicamente no relacionados, estrategia conocida comúnmente como “mapeo por asociación”. Por último, si se logra obtener una co-segregación o asociación estadística, es necesario

realizar experimentos para confirmar que el GC está efectivamente involucrado en la variación del carácter, etapa que se conoce como **validación**.

Cuando la ruta metabólica o fisiológica relacionada con el carácter de interés se encuentra bien conocida, los GC pueden ser elegidos entre los genes clonados involucrados en dicha ruta (Pflieger *et al.* 2001); la limitante sería en este caso las secuencias de genes disponibles en los bancos de datos. En el caso que no exista para la especie de interés secuencias genómicas o de mensajeros disponibles, secuencias de especies relacionadas pueden ser usadas para el diseño de marcadores. La conservación de secuencias de los genes, su orden y distribución entre especies facilita la elección de los GC. En los últimos años, la secuenciación genómica a gran escala de especies modelos como *Arabidopsis thaliana* (Seki *et al.* 2002), Arroz (*Oryza sativa*) (Ohyanagi *et al.* 2006), Maíz (*Zea Mays*) y Trigo (*Triticum aestivum*) entre muchas otras, permite contar con numerosas secuencias en las bases de datos públicas, así como la secuenciación sistemática de clones de cDNA, ponen a disposición una nutrida base de datos de ESTs (Expressed Sequence Tags). Toda esta información posibilita los análisis de mapeo comparativo, colinealidad y microsintenia. Los estudios comparativos permiten la aplicación de datos obtenidos de una especie para realizar investigaciones aún en especies taxonómicamente distantes: el uso de *Escherichia coli*, humanos, *Arabidopsis* y arroz permite por ejemplo entender el genoma de trigo. Los proyectos genómicos de secuenciación se basan en la premisa de que el conocimiento del genoma de una especie modelo como *Arabidopsis* puede ayudar para aislar genes de importancia agronómica de otras especies por homología de los genes (Heslop-Harrison, 2000).

Conjuntamente con el avance en las técnicas de secuenciación a gran escala de secuencias genómicas y de cDNAs, se va expandiendo el desarrollo del área de bioinformática, que permite el análisis computacional de la gran masa de datos surgida de las nuevas tecnologías disponibles. Una herramienta sumamente interesante es la aplicación Blast2GO, que permite la anotación, visualización y análisis de secuencias. Uno de los aspectos más importante cuando se realizan búsquedas (“data mining”) en bases de datos genómicos es asociar secuencias individuales y la información sobre su expresión con la función biológica. El programa Blast2Go (Conesa *et al.* 2005 <http://www.blast2go.de>), describe los productos de los genes, en términos de proceso biológico asociado (P), componente celular (C) y función molecular (F). Esta herramienta se perfila de gran utilidad para la búsqueda de homologías entre las secuencias EST anotadas en el NCBI que no se encuentran analizadas en cuanto a su posible identidad.

Durante la última década han sido publicados numerosos trabajos relacionados con el estudio de los genes involucrados en la síntesis de pigmentos en diversas especies (Lu *et al.* 2006; Alquézar *et al.*

2009; Li *et al.* 2008, De Jong *et al.* 2004). Si bien las plantas producen más de 200.000 diferentes tipos de compuestos muchos de los cuales son coloreados, el foco ha sido puesto principalmente en dos clases de pigmentos asociados a la coloración de diferentes tejidos de plantas: flavonoides/antocianinas y los carotenoides, principalmente por sus propiedades funcionales relacionadas con la salud humana. Particularmente algunos pigmentos carotenoides (α -caroteno, β -caroteno) resultan importantes para nuestra salud y juegan un rol central en la nutrición (Mares-Perlman *et al.* 2002; Giovannucci 2002) por su conversión a vitamina A por clivaje molecular y subsecuente reducción. Las batatas de pulpa anaranjadas aparecen como una de las más promisorias fuentes naturales disponibles y efectivas de β -caroteno (Hagenimana & Low 2000; Kosambo *et al.* 1998). Cien gramos de batatas cocidas pueden suplir hasta el 50% de la cantidad de vitamina A requerida por un niño.

En *Ipomoea batatas* han sido descritos como los principales pigmentos las antocianinas y carotenos, responsables de la coloración rojo-morado y naranja/amarilla respectivamente de la piel y pulpa de la raíz engrosada.

El conocimiento sobre la estructura y secuencia de los genes involucrados en ambas rutas es desigual. La información disponible acerca de los genes estructurales de la ruta de las antocianinas en el género *Ipomoea* es mucho más amplia que la de carotenos, debido principalmente al interés que despiertan las *Ipomoea* ornamentales.

La estrategia de genes candidatos puede ser utilizada también para los genes regulatorios de estas rutas. Algunos autores proponen como hipótesis que las variaciones en los caracteres complejos están más influenciados por variaciones en los genes regulatorios que en los estructurales (Wallace 1968, Turner *et al.* 1979, Cunningham & Gantt 1998). Sin embargo, hasta el presente pocas secuencias de genes regulatorios han sido aisladas en plantas. Para la ruta de antocianinas, se conocen algunos de los factores de transcripción asociados a la expresión espacial y temporal de los genes estructurales. Según Tanaka *et al.* (2008) la expresión está determinada por la combinación de los factores de transcripción tipo R2R3 Myb, bHLH (Basic helix-loop-helix) y Wd40 y su interacción. Por otro lado, la regulación de la biosíntesis de carotenos a nivel génico o de síntesis de proteína, está pobremente comprendido. Hasta el momento, no han sido aislado genes regulatorios involucrados en la formación de carotenoides. El rol central de los carotenoides en el desarrollo de la planta o su adaptación sugiere que su síntesis está coordinada con otros procesos de desarrollo como son la formación de plástidos y el desarrollo de flores y frutas (Fraser & Bramley 2004) (Lu & Li 2008).

2. Desarrollo de Marcadores

El desarrollo de los marcadores tiene como principal objetivo la detección de polimorfismo que permita su utilización posterior en un mapa de ligamiento. La caracterización de los marcadores desarrollados permitirá además generar conocimiento acerca de la estructura y secuencia de los genes amplificados. La búsqueda de variabilidad fue centrada en los intrones. Esto tiene un sustento empírico y teórico. En diferentes especies se ha observado que las sustituciones nucleotídicas así como las inserciones/delecciones se presentan en una frecuencia mayor en las regiones no codificantes. La variación o polimorfismo en la secuencia o longitud de los intrones puede ser explotada como marcador molecular, resultando de suma importancia en las investigaciones genéticas como en la construcción de mapas de ligamiento, o mapeo de genes cuantitativos, así como en los programas de mejoramiento genético. El polimorfismo en la longitud de los intrones o ILP es un tipo de polimorfismo fácilmente reconocible mediante amplificación por PCR. Para su amplificación, los primers son diseñados sobre los exones flanqueantes. Esta aproximación fue denominada EPIC-PCR o “exón-primed intron-crossing”. La ventaja de este tipo de marcadores es que las secuencias exónicas están relativamente más conservadas y podrían ser aplicadas o transferidas a diferentes especies. También se detectan polimorfismo de secuencia (ISNP), SNP en intrones,

3. Flavonoides/Antocianinas

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios pertenecientes a la clase de los fenilpropanoides, presentan compuestos sin color y con un amplio rango de colores, desde amarillo pálido hasta azul. Un tipo particular de flavonoides son las antocianinas, pigmentos solubles en agua, que se acumulan en vacuolas, intensamente coloreados y son los responsables de las coloraciones rosas, rojo, violeta y azul. Las funciones de los flavonoides/antocianinas han sido ampliamente estudiadas. Su principal implicancia esta relacionada con la reproducción sexual en las flores, pero varias ramas de esta ruta producen compuestos muy importantes involucrados en la defensa de enfermedades en plantas, viabilidad del polen, interacción microbiana, protección UV y más recientemente se las relaciona con diferentes beneficios para la salud humana. Una descripción más completa de funciones y ruta metabólica se puede ver en el capítulo 2.

Los genes de la biosíntesis de antocianinas han sido clasificados como genes estructurales que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de antocianinas y genes regulatorios que codifican factores que controlan la expresión de los genes estructurales. Las bases moleculares y bioquímicas de la biosíntesis de los flavonoides, responsables de la síntesis de los pigmentos antociánicos se

encuentra ampliamente estudiada. En particular, la biosíntesis de antocianinas en flores ha sido caracterizada, y muchos de los genes estructurales y regulatorios responsables de esta ruta han sido aislados a partir de petunia (*Petunia hybrida*) "Conejito" (*Antirrhinum majus*) y maíz (*Zea mays*) (Holton & Cornish 1995).

Petunia ha sido el género más elegido para estudiar tanto los genes estructurales como los regulatorios de esta ruta. Holton & Cornish (1995) presentan una comparación entre las tres especies mencionadas anteriormente, donde observa que la mayoría de las reacciones son comunes a los tres, pero que igual existen diferencias en el tipo de antocianinas producidas en cada especie. Petunia, por ejemplo no produce normalmente el pigmento pelargonidina, mientras que "conejito" y maíz son incapaces de producir delphinidina.

Los genes estructurales de la ruta involucrados en la pigmentación de flores han sido clasificado en genes tempranos, que codifican para la biosíntesis de flavonas o flavonoles (CHS, CHI y F3H) y genes tardíos, para síntesis de antocianinas (DFR, ANS, UF3GT) (Durbin *et al.* 2003). Esta clasificación se encuentra relacionada principalmente con el tipo de regulación a la que están sujetas estos genes. (Figura 1)

Una revisión bibliográfica exhaustiva permitió visualizar que la estrategia de genes candidatos ha sido ampliamente utilizada y en particular algunos trabajos se relacionan específicamente con los pigmentos:

- En Solanaceae con los loci relacionados con la pigmentación con antocianinas: identifican los genes que corresponden a loci que controlan variación de color de la piel en papa, mediante un mapa genético que ya tenía localizado los loci fenotípicos (De Jong *et al.* 2004). Para la identificación de los genes en papa se utilizaron secuencias disponibles de tomate y petunia.
- En Soja, Matsumura *et al.* (2005) observó que el locus *I* (que suprime la coloración en la cubierta de la semilla) se localiza en el mismo lugar que la familia génica de la Chalcona sintasa (CHS).
- El locus *R* que co-segrega con el gen DFR es requerido para la producción de antocianinas rojas (De Jong *et al.* 2003) en papas, mientras que el gen *P* que codifica para la F3'5'H es necesario para la producción del pigmento morado (Jung *et al.* 2005).
- Toda *et al.* (2002) propone que el fenotipo color gris en la pubescencia en soja es conferido por el locus recesivo *t* como consecuencia de una actividad deficiente de la Flavonol 3'-hidroxilasa. Esta suposición es apoyada por el descubrimiento de una mutación en el marco de lectura dentro de la región codificante que co-segrega con el fenotipo. De manera similar, se propuso que el color magenta en las flores de soja se debe a que posee el alelo recesivo

w^m (versus el color púrpura mediado por *W^m*) que pudo ser explicado por una mutación en el gen Flavonol Sintasa (Takahashi et al. 2007).

- El carácter color rosa en cebolla caracterizado como locus *Pink* (P) fue asociado a una importante disminución de la expresión del gen ANS (Antocianidin Sintasa). Una inserción de 390pb fue identificada en la región del promotor en el alelo P que lo diferencia del promotor del alelo “rojo” (Kim et al. 2005)

3.1 Caracterización Molecular de los genes de la Biosíntesis de Antocianinas en *Ipomoea*

Debido al interés ornamental que despiertan las *Ipomoeas*, todos los genes estructurales han sido caracterizados principalmente en *Ipomoea purpúrea* y muchos de ellos fueron asociados con locus relacionados con el color de la flor.

Posteriormente han surgido varios trabajos en *Ipomoea batatas* o su antecesor *Ipomoea trifida*, para los loci que codifican para los siguientes genes:

- F3'H (Flavonoid 3'-hydroxylase): una inserción en el tercer exón produce una enzima no funcional resultando en flores rosadas en vez de moradas (Zuffal & Rausher, 2003)
- DFR (Dihydroflavonol 4-reductasa): se estableció la organización genómica y la estructura génica en *Ipomoea nil* e *Ipomoea purpurea* (Inagaki et al. 1999). Una delección en la región intergénica fue observada en cultivares de alto contenido de antocianinas en la raíz engrosada en batata (Tanaka et al. 2004).
- CHS (Chalcona sintetasa): mutaciones en esta enzima resulta en cambios fenotípicos en muchas especies (*Lycopersicum esculentum*, *Antirrhinum majus*, *Zea mays*). En *Ipomoea purpúrea*, la inserción de elementos transponibles en el intrón de CHS-D está relacionado con flores albinas, mientras que su escisión, reestablece el transcripto de longitud normal y la pigmentación en el limbo floral (Durbin et al. 2001).
- El locus A es uno de los varios loci duplicados que codifica para la enzima Chalcona sintasa (CHS). El alelo “a” (flores blancas) difiere de alelo “A” (flores pigmentadas) en la inserción de un transposón tipo Ac/Ds en el gen CHS-D, previniendo la transcripción de una copia funcional del gen (Johzuka-Hisatomi et al. 1999).

De los 6 genes estructurales de la ruta de biosíntesis de antocianinas, dos de ellos, relacionados con la expresión de la Chalcona Sintetasa (CHS) y Dihydroflavonol reductasa (DFR) resultan esenciales para la producción de antocianinas en el género *Ipomoea*. Estas enzimas se encuentran altamente

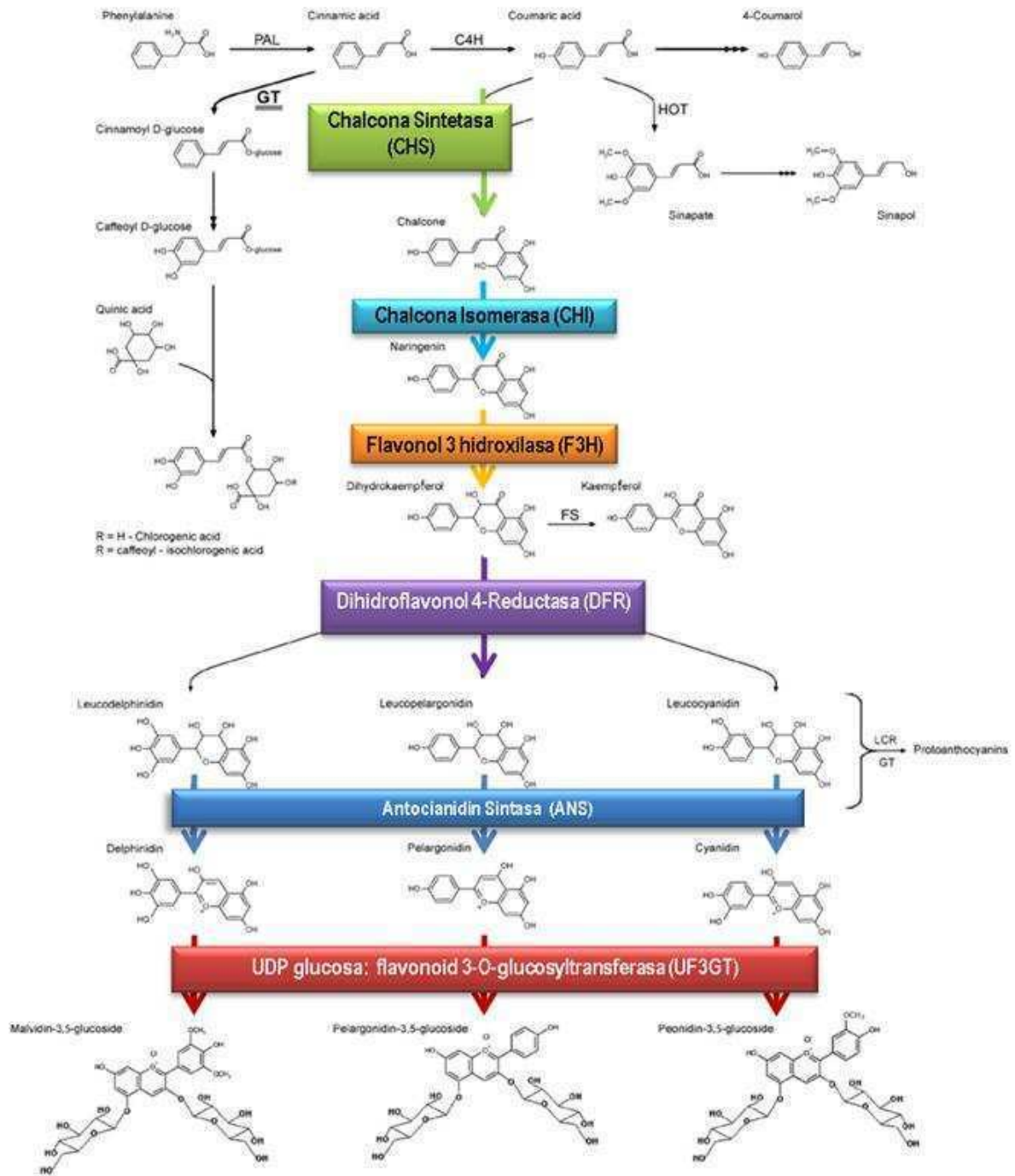
conservadas en diversas especies y en particular dentro del género *Ipomoea* fue observado un alto grado de similitud para distintas enzimas de la ruta (Durbin *et al.* 2003).

La **Chalcona Sintetasa (CHS)** (EC 2.3.1.74) es la primera enzima de la ruta y su estructura genética se encuentra descrita para *Ipomoea purpúrea* e *Ipomoea nil* (Durbin *et al.* 2001, Durbin *et al.* 1995). Esta enzima cataliza la formación de naringenin chalcona a partir de tres moléculas de malonil-CoA y una de p-coumaronil-CoA. En el genoma de petunia (*Petunia hybrida*) se han encontrado 8 genes completos y cuatro incompleto de CHS. En base a la secuencia han sido clasificadas en dos familias. El tamaño de los intrones varía desde 700pb hasta 4000pb. De los 8 genes completos, solo cuatro de ellos (chsA, chsB, chsG, and chsJ) se sabe que son expresados y de manera diferencial espacialmente. El gen CHS-B de Petunia, es algo diferente al resto de las secuencias presentes en la especie, formando un cluster con los genes CHS-B, C y PS de *Ipomoea* (Durbin *et al.* 2000). Existen al menos 5 genes tipo CHS en el genoma de *Ipomoea*, y un pseudogen (PS) y las evidencias sugieren que solo dos de ellos (CHS-D y CHS-E) codifican para la enzima funcional en flores. Los otros genes CHS (A, B y C) parecen también codificar enzimas que utilizan otros sustratos y generan productos cuya función en la planta se desconoce aún (Durbin *et al.* 2003). Durbin (2000) postula que el CHS-D es el principal *locus* expresado en la mayoría de los tejidos de plantas: aquellas plantas que presentan en homocigosis el alelo mutado, no sintetizan pigmentos no sólo en las flores, sino en la mayoría de los tejidos vegetativos (Epperson & Clegg 1987). Esto podría implicar que en las raíces engrosadas, también CHS-D sea el gen principal que se expresa. La estructura del gen CHS se encuentra conservada en las plantas con flores. Todas las secuencias del gen CHS estudiados contienen un intrón en un sitio conservado, con la excepción de *Antirrhinum majus* que presenta un segundo intrón (Sommer & Seadler, 1986). En *Ipomoea*, el alineamiento entre secuencias correspondientes a los mensajeros y secuencias genómicas disponibles, revela una estructura génica sencilla: dos exones y un intrón. En particular *Ipomoea trifida* presenta dos exones de 200pb y 900pb y un intrón de 100pb aproximadamente.

La siguiente enzima de la ruta es la **Chalcona Isomerasa (CHI)** (EC 5.5.1.6) que cataliza la isomerización del producto amarillo chalcona naringenin a una flavonona sin color. En ausencia de CHI funcional, la isomerización espontánea podría ocurrir *in vivo* dado los resultados observados *in vitro*. Se encuentra presente en una copia única en *Ipomoea purpúrea* (Clegg & Durbin 2000). En maíz, arroz y petunia, presenta 4 exones con intrones de tamaño pequeño (entre 70pb y 160pb), mientras que en Cebada (*Hordeum vulgare* L.) se observa la ausencia del intrón 3 y la fusión de los exones 3 y 4. En *Petunia hybrida* fueron descritos dos genes CHI que muestran patrones de expresión diferencial (*chiA* y *chiB*). En “conejito” y maíz estos genes han sido aislados por homología

con los genes previamente clonados en Petunia. Los datos con RFLP indican que en maíz, existen tres loci con homología con la secuencia del gen CHI.

Figura 1: Esquema de la ruta metabólica de las antocianinas. Se muestran en color las principales enzimas involucradas en la síntesis de antocianinas y que fueron objeto de estudio en esta tesis. Extraído de Aksamit-Stachurska *et al.* 2008. Modificado



El gen que sintetiza la **Flavonol-3-hidroxilasa (F3H)** (EC 1.14.11.9) se secuenció a partir de *Ipomoea purpúrea*, y cambios en su secuencia fueron relacionados con variaciones en la coloración de flores de esta especie (Zufall & Rausher 2003). Presenta al menos dos copias y ambas son expresadas en el limbo floral. Por otro lado, en *Ipomoea nil* se ha encontrado una copia funcional de F3H y un pseudogen (Clegg & Durbin 2000). En las especies en las que se conoce la secuencia completa (*Anthirinum andracea*, *Gingko biloba*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa* y *Petunia hybrida*) se pudieron observar 3 exones, con tamaño variable de sus intrones. Otras hidroxilasas que también actuarían en la ruta son: la **F3'H**, que hidroxila la posición 3' del dihidroflavonol producido por la F3H y resulta en la producción eventual del cianidin rojo/magenta y la hidroxilasa **F3'5'H**, que adiciona tanto en la posición 3' como en la 5' generando delfidin de color azul/morado. Esta aún no ha sido caracterizada en *Ipomoea* mientras que el F3'H ha sido caracterizada en *Ipomoea purpúrea* e *Ipomoea nil* (Clegg & Durbin 2000).

El gen de la enzima **Dihydroflavonol 4-Reductasa (DFR)** (EC 1.1.1.219) se encuentra caracterizado estructuralmente en *Ipomoea batatas* y en otras *Ipomoeas*. Comprende una familia de 3 genes en tandem (DFR-A, B y C) (Tabla 1) al igual que en *Petunia* (Holton & Cornish 1995). El DFR-B ha sido identificado como el responsable de la producción de antocianinas en las flores de *Ipomoea* (Inagaki *et al.* 1999). Cambios en su secuencia fueron relacionados con cultivares de alto contenido de antocianinas en las raíces (Tanaka *et al.* 2004). Se cuenta con la secuencia completa del gen en *Ipomoea batatas* (gi: 40056989), el cual presenta 6 exones y una región 5'UTR de 2800 pares de bases.

Tabla 1. Número de copias estimadas de los genes flavonoides en el genoma de *Ipomoea purpúrea* (Clegg & Durbin 2000).

Genes	Número de miembros de la familia
CHS	6
CHI	1
F3H	2
F3'H	1
F3'5'H	?
DFR	3
ANS	1
UF3GT	1

La secuencia de la **Antocianidin Sintasa (ANS)** (EC1.14.11.19) fue secuenciada a partir de *Ipomoea nil* e *Ipomoea trifida*. Presenta dos exones de unos 500pb cada uno y un intrón de 900 pares de bases. ANS presenta una gran homología con los genes F3H y FLS, todos pertenecientes a la gran familia de OGD (Martin *et al.* 1991; Tanaka *et al.* 2008). Secuencias genómicas o de ADN copia que codifican para ANS han sido obtenidas de varias especies de plantas incluidas *Arabidopsis*, *Antirrhinum*, *Petunia*, *Vitis vinifera* y *Zea mays*. Mutantes de ANS así como mutaciones de los genes regulatorios que afectan la expresión génica de ANS han sido estudiados en esas plantas (Martin *et al.*, 1991; Bradley *et al.*, 1998).

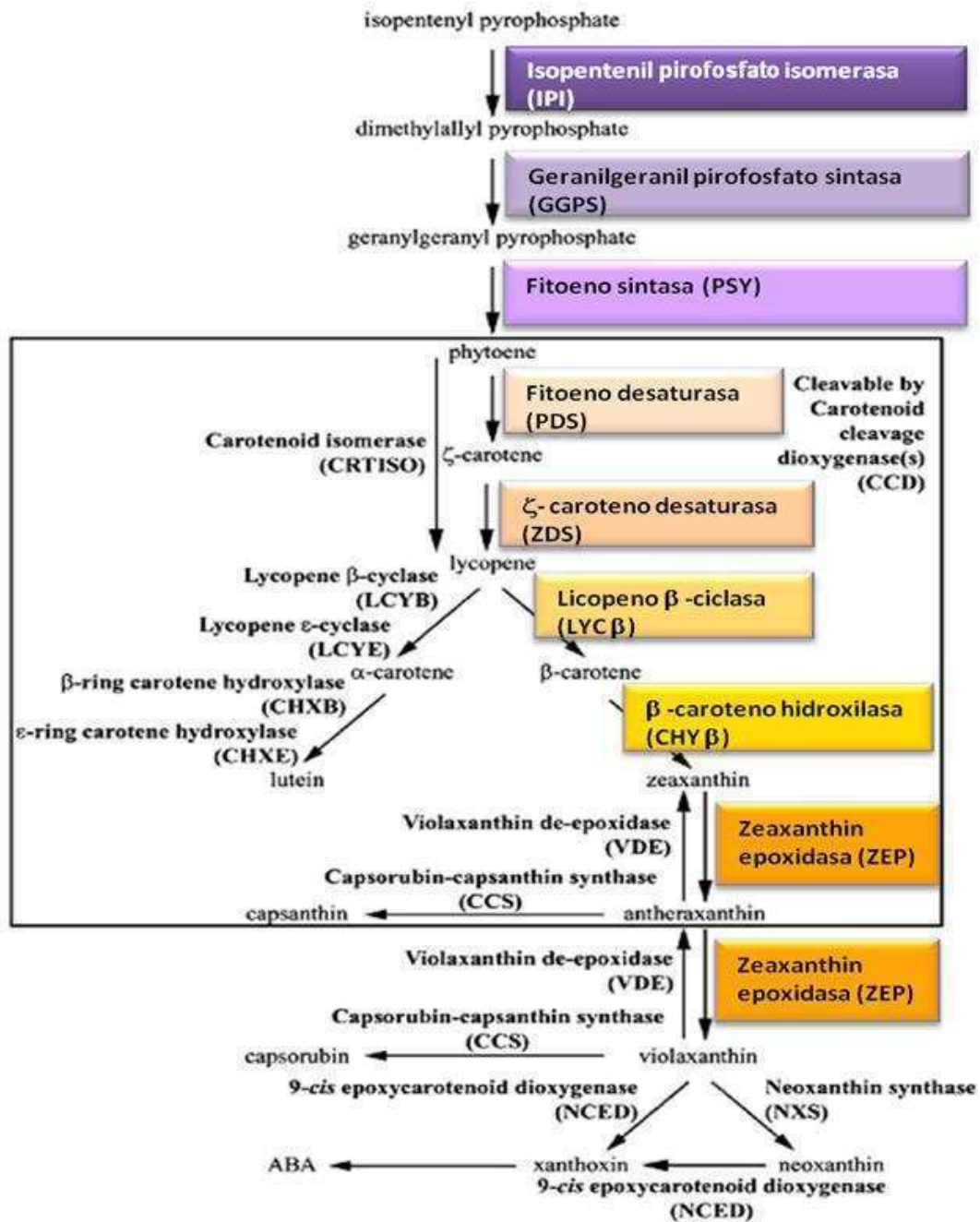
En cuanto a la **UDP glucosa: flavonoid 3-O-glucosyltransferasa (UF3TG)**, las secuencias de DNA correspondientes a los exones 1 y 2 se encuentran disponibles en la base de datos ADN (NCBI) para *Ipomoea purpúrea*, *Ipomoea nil* e *Ipomoea trifida*, mientras que para *Ipomoea batatas* se cuenta sólo con la secuencia correspondiente al mRNA. El alineamiento entre la secuencia genómica de *Ipomoea trifida* (gi: 32441910) y la de mRNA de *Ipomoea batatas* (AB038248.1) muestra una identidad del 98%. Este gen presenta una estructura con dos exones de 232 pb y 850 pb y con un intrón con un rango de 400-600 pb para diferentes *Ipomoeas* analizadas (datos surgidos del NCBI por comparación de las secuencias).

4. Carotenoides

Los genes y enzimas involucradas en la biosíntesis de los pigmentos carotenoides han sido largamente estudiados (Bartley & Scolnik 1995; Cunningham & Gantt 1998; Fraser & Bramley 2004; Li *et al.* 2001) y una revisión general indica que esta ruta se encuentra ampliamente conservada en plantas. Los genes y ADN copia de la mayoría de las enzimas requeridas han sido identificadas y secuenciadas y sus productos caracterizados (Cunningham & Gantt 1998).

La ruta simplificada de la síntesis de carotenoides, involucra 11 genes estructurales: (Cunningham & Gantt, 1998) Isopentenyl diphosphato isomerasa (IPI), Geranil-geranil pirofosfato sintasa (GGPPs), Fitoeno sintasa (PSY), Fitoeno desaturasa (PDS), ζ -Caroteno desaturasa (ZDS), Licopeno β -ciclase (LYC- β), Licopeno ϵ -ciclase, Licopeno α -ciclase, Licopeno δ -ciclase, Hidroxilasa anillo β (CHYb), Hidroxilasa anillo ϵ (CHYe) y Zeaxanthin epoxidasa (ZEP), partiendo desde la molécula de GGPP hasta la obtención de Violaxanthin y Luteína. En algunas especies, la ruta continúa hasta la obtención de Capsantin y Capsorubin mediante la enzima Capsantin-capsorubin sintasa (CCS) (Ya-Qin *et al.* 2004), pero esta parte de la ruta no ha sido descrita en batata. (Figura 2).

Figura 2: Ruta de Biosíntesis de Carotenoides. Just *et al.* 2007. Modificado



4.1 Caracterización Molecular de los genes de la Biosíntesis de Carotenos en Ipomoea

Isopentenil difosfato isomerasa (IDI) o (IPI) (EC 5.3.3.2) cataliza la conversión reversible de IPP en DMAPP (dimetilalil difosfato). Liao *et al.* (2008) clonaron, expresaron y caracterizaron un ADN copia correspondiente al gen IDI (IbIDI) a partir de cultivares de batata rica en carotenoides. El cDNA completo presenta una longitud de 1155 pares de bases y su secuencia fue comparada con otras proteínas en la base de datos utilizando BLASTp (Altschul *et al.* 1990) resultando en un alto grado de

similitud de secuencia con otras IDI de diferentes especies de plantas *Nicotiana tabacum* (86% identidad, 92% positivos) (Nakamura *et al.* 2001), *Camptotheca acuminata* (85% identidad, 93% positivos) y *Adonis palaestina* (87% identidad, 94% positivos) (Cunningham & Gantt 2000). Estudios de complementación en *E. coli* muestran que la lIbIDI clonada en batata codifica una enzima funcional (Liao *et al.* 2008). Los análisis de expresión muestran que lIbIDI es expresada en raíces engrosadas, hojas maduras y jóvenes, aunque fue mayor en estas dos últimas.

En *Arabidopsis thaliana*, se detectaron 2 secuencias que codifican el gen completo de **Isopentenil difosfato isomerasa**, estos fueron construidos a partir de los diferentes cDNA, presenta 6 exones y cinco intrones y una longitud de 2000 pb aproximadamente. Codifican para proteínas de 291 y 284 aminoácidos y contiene una extensión N-terminal de 75 y 68 residuos comparados con la secuencia de IDI de *E. coli*. Esta extensión parece estar presente en la mayoría de las secuencias de plantas (Cunningham & Gantt 2000) y resulta en diferentes localizaciones subcelulares (citosol y otra en plástidos) cumpliendo diferentes roles metabólicos. Los dos genes detectados en *Arabidopsis thaliana*, presentan un 92% de identidad cuando la región N-terminal es excluida de la comparación y presenta entre un 84 y 90% de identidad con otras secuencia de IDI (IPI) en plantas (Phillips *et al.* 2008)

La **Geranilgeranil difosfato sintasa (GGPPs)** (EC 2.5.1.29) es la primera enzima de la ruta y utiliza el Geranilgeranil difosfato C₂₀ (GGPP) como precursor para la biosíntesis de giberelinas, clorofilas, proteínas geranilgeraniladas y carotenoides. El mensajero RNA del gen que codifica para esta enzima ha sido identificada por primera vez en ají morrón (*Capsicum annuum*) (Badillo *et al.* 1995). Posteriormente, Okada *et al.* (2000) la identifica en *Arabidopsis thaliana* una pequeña familia génica que codifican para 5 isoenzimas (*Ggps1*, *Ggps2*, *Ggps3*, *Ggps4* y *Ggps5*) (Scolnik & Bartley, 1994, 1995, 1996) todas ellas con señales de localización para ser traslocadas a diferentes compartimentos subcelulares. GGPS1 se expresa de manera general, mientras que GGPS2, GGPS3 y GGPS4 lo hacen específicamente en flores, raíz y flores respectivamente, sugiriendo que cada GGPP sintasa es expresada en diferentes tejidos. En cuanto a la estructura, algunos genes de GGPPs presentan un intrón (GGPS3) (Okada *et al.* 2000; Hua *et al.* sin publicar Gi:21543387) o ninguno (GGPS1). Se encuentra disponible la secuencia completa del gen en *Salvia miltiorrhiza* (gi21543387), la cual presenta dos exones y un intrón. Por otro lado en *Capsicum annuum*, una sola copia del gen fue descrito (Thorup *et al.* 2000). Recientemente (Marzo 2010) se identificó apareció una secuencia correspondiente al mRNA para una especie del genero Ipomoea: Ipomoea sp. Kenyan.

La segunda enzima de la ruta, es la **Fitoeno Sintasa (PSY)** (EC 2.5.1.32), la reacción que cataliza esta enzima es la primera propiamente de la biosíntesis de carotenos y permite la formación del

producto Fitoeno, una cadena simétrica de 40 carbonos. Es considerada el punto clave de regulación de esta ruta (Tadmor *et al.* 2005).

En tomate y ají morrón, fueron detectados dos Psy homólogos (Thorup *et al.* 2000). Huh *et al.* (2001) detectó co-segregación entre la Fitoeno Sintasa y el color de la fruta en una población F2 entre *Capsicum annuum* x *Capsicum chinense*. Los análisis de QTL del contenido de pigmento en la población indican que PSY es el locus responsable del desarrollo del color del fruto. En tomate (*Solanum lycopersicum* L.) fueron detectados dos genes homólogos (*Psy1* y *Psy2*) que presentan una estructura altamente conservada, con 7 exones en los que se observa alto porcentaje de identidad y 6 intrones mucho más variables en secuencia y longitud. Las regiones secuenciadas de *Psy1* y *Psy2*, fueron de 4527pb y 3542pb de longitud, respectivamente. Los exones 2 y 7 presentan diferencias en su longitud entre los dos genes y corresponden a las regiones en que difieren ambas proteínas. La región central de estas dos proteínas son casi idénticas, mientras que las mayores diferencias se presentan en la región N-terminal y C-terminal (Giorio *et al.* 2008).

Psy-1 codifica para una isoforma específica de flores y frutos responsable de la carotenogénesis en cromoplastos. En los tejidos verdes, *Psy2* se expresa de manera predominante y contribuye en una mayor proporción a la carotenogénesis en cloroplastos (Tanaka *et al.* 2008). Análisis de PCR en tiempo real muestran que los transcritos de *Psy2* están presentes en todos los tejidos analizados mientras que *Psy1* no pudo ser detectado en los tejidos que contienen cromoplastos (Giorio *et al.* 2008).

Los genes PSY1 y PSY2 en maíz y arroz, presentan 6 exones y 5 intrones. Mientras que el tamaño de los exones se encuentra conservado no solo entre los dos tipos de PSY y en ambas especies, el tamaño de los intrones varía entre PSY1 y PSY2, aunque es similar entre las especies estudiadas. Para PSY1 los intrones 2 y 3 presentan un tamaño aproximado de 600pb y un primer intrón muy pequeño (100pb) mientras que PSY2 el primer intrón es el más grande de más de 900pb mientras que el 2 y 3 son más pequeños (Fraser & Bramley 2004).

Fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -Caroteno desaturasa (ZDS). El Fitoeno (producto sin color) puede ser convertido a Licopeno por la adición de dobles enlaces conjugados mediante la acción de dos enzimas de manera secuencial: Fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -Caroteno desaturasa (ZDS). Al momento de hacer los análisis no existían datos de secuencias del género *Ipomoea*, sin embargo recientemente fueron publicadas las secuencias de mRNA del gen PDS para *Ipomoea* sp, Kenyan (AB499051.1) con una longitud de 2036pb (Yamamizo *et al.* 2010). Este mensajero presenta alta similitud con mensajeros de diferentes especies con un *e* value de 0.0 (*Capsicum annuum*, *Nicotiana*

tabacum, *Lycopersicum esculentum* y *Solanum lycopersicum* entre otras). Para las especies *Populus trichocarpa* (NC_008480.1) y *Lycopersicum esculentum* (X78271.1) se cuenta con la secuencia completa del gen. Presentan en ambos casos 14 exones y 13 intrones y un 92% de identidad con un *e*-value de $2e^{-67}$. Para ZDS los mismos autores también publicaron la secuencia de mRNA (AB499052) y al igual que para el gen anterior, éste presenta alta similitud con *e* value de 0. El gen completo en *Arabidopsis thaliana* consta de 13 exones, el cual presenta 84% de identidad y un *e*-value de $3e^{-51}$ con *Ipomoea* sp.

Licopeno β -ciclaza (LCY-b): es la enzima de la ruta que cataliza la reacción de formación de dos anillos β en los extremos del licopeno lineal para la obtención de β -caroteno. El licopeno además es sustrato de la enzima Licopeno ϵ -ciclaza, generando la vía de los δ y α -carotenos y finalmente Luteína. Existen además la Licopeno α -ciclaza y Licopeno δ -ciclaza. Los genes que codifican para estas tres enzimas se encuentran altamente conservados en diferentes especies (*Capsicum annun*, *Lycopersicum esculentum*, *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*) y son de copia única (Cunningham *et al.* 1996). Hasta el momento no hay información de los mismos en *Ipomoea batatas*. La enzima Licopeno- ϵ -ciclaza de *Arabidopsis* es homóloga a Licopeno- β -ciclaza, ambas son codificadas por genes de copia única y de secuencia relacionada. Entre ellas existe un 30% de identidad a nivel aminoacídico. Ambos poseen un motivo característico de unión al FAD/NADP en la región amino terminal.

β -Caroteno Hidroxilasa (CHY β). Los β -carotenos y α -carotenos son modificados posteriormente por hidroxilación o epoxidación, proporcionando una variedad de características estructurales. La hidroxilación es catalizada por la enzima β -hidroxilasa (CHY β) en el anillo beta y ϵ -hidroxilasa (CHY ϵ) en el anillo epsilon, respectivamente. Mientras que CHY β es una no-hemo di-iron mono-oxygenasa, CHY ϵ pertenece a la familia de las P450 (Tian *et al.* 2004). CHY β es una enzima que ha sido ampliamente estudiada, clonada y caracterizada en varios organismos, se sabe que a partir de β -caroteno genera el producto Zeaxanthin, mientras que CHY ϵ ha sido identificada hasta ahora solo en *Arabidopsis* y produce Luteína a partir de α -caroteno. Recientemente una CHY β (CrtR-b2) fue identificada en tomate (Galpaz *et al.*, 2006). En *Arabidopsis* y tomate se han descrito dos miembros y en monocotiledóneas 3 miembros en arroz y hasta 6 en maíz. Se cuenta con el gen completo de *Arabidopsis thaliana* que presenta una longitud de 3248 pares de bases (AF125577.1) y de *Lycopersicum esculentum* (DQ650804.1) de 2541pb, ambos presentan 7 exones y un 84% de identidad (*e*-value = $4e^{-37}$). Dentro del género *Ipomoea* se cuenta con el mRNA de *Ipomoea nil* (AB499058.1) con 943 pb, similar al mRNA de *Arabidopsis thaliana* con 933pb y *Lycopersicum*

esculentum con 945pb. Entre los mRNA de *Ipomoea nil* y *Arabidopsis thaliana* la similitud alcanza el 84% de identidad ($e\text{-value} = 3e^{-34}$), mientras que con *Lycopersicon esculentum* es mayor, llegando al 90% de identidad con $8e^{-40}$ de $e\text{-value}$.

Zeaxanthin epoxidase (ZEP). El producto Zeaxanthin es modificado por esta enzima produciendo Violaxanthin por el agregado de grupos epoxi en los anillos beta. El gen *Zep1* fue clonado en *Nicotiana plumbaginifolia* y *Capsicum annuum* (Hirschberg 2001). Presenta 16 exones y 15 intrones en las especies en la que hay disponible datos del gen completo: *Arabidopsis thaliana* (283761.1), *Vitis vinifera* (NC_012013.2), *Citrus sinensis* (AB548573) y *Solanum tuberosum* (HM013965.1). El análisis de similitud mediante Megablast, muestra en promedio un 85% de identidad entre ellas con valores superiores a $1e^{-57}$. No hay disponibles secuencias del genero *Ipomoea* para este gen ni para su mensajero.

Aunque la ruta de biosíntesis se encuentra bien documentada, la compleja regulación y herencia en plantas permanece aún sin ser entendida en su totalidad (Romer & Fraser 2005). Recientemente marcadores RAPD y AFLP fueron utilizados para localizar cromosómica de dos genes involucrados en la acumulación de β -caroteno en tomate (Zhang & Stommel 2000). Además, varios QTLs que explican entre el 10% y el 20% de la variación total de carotenoides fueron localizados en zanahoria utilizando marcadores AFLP (Santos & Simon 2002). Thorup *et al.* 2000, realiza análisis comparativos utilizando genes candidatos para ligar determinados fenotipos metabólicos con loci que afectan esos fenotipos dentro de especies relacionadas en Solanaceas. La localización de 10 genes de la ruta de carotenos en *Capsicum* (ajíes) ha sido comparada con *Lycopersicon* y con *loci* de ajíes, papa y tomate que afectan los niveles de carotenoides en diferentes tejidos. El loci C2 que fue definido como determinante del color en ajíes, co-segrega con el gen Fitoeno Sintasa. El locus *Ccs* (Capsantin-Capsorubin Sintasa) co-segrega con otro locus también asociado al color en ajíes. En referencia a genes estructurales que afectan la producción de carotenoides en particular, el gen *Ccs* en ajíes y el locus B de hiperacumulación de β -caroteno en tomate se localiza en regiones homeólogas; además la posición del gen Licopeno β -ciclase en *Capsicum* puede corresponder al locus "lutescent-2 mutation" en tomate mientras que el gen Licopeno ϵ -ciclase en *Capsicum* se corresponde con el locus Licopeno ϵ -ciclase y la mutación "Del" para la hiperacumulación de δ -caroteno en tomate.

Si bien la biosíntesis de carotenos involucra numerosas enzimas y varios productos finales, es una ruta ampliamente estudiada y ha sido modificada genéticamente para la obtención de distintos niveles de β -carotenos (Botella *et al.* 2006). Uno de los principales precursores de esta vía

metabólica, el Geranyl-Geranyl-PP, es compartido con la ruta metabólica de los tocoferoles, compuestos conocidos comúnmente bajo la denominación de vitamina E (también liposolubles y antioxidantes). Algunos trabajos reportan competencia entre ambas vías, observándose una relación inversa entre β -carotenos y tocoferoles.

5. Análisis bio-informático para la identificación de etiquetas de secuencias expresadas (EST) relacionadas con la síntesis de Antocianinas y Carotenos

Los ESTs (Expressed Sequence Tags o Etiquetas de Secuencias Expresadas) son una poderosa herramienta que ha surgido a partir de las investigaciones en genómica. Las colecciones de EST permiten revelar el patrón de expresión, la regulación génica y la diversidad de secuencia. Actualmente, las genotecas enriquecidas y la secuenciación a gran escala se encuentran disponibles, haciendo que los ESTs se proyecten como una manera efectiva de descubrir nuevos genes y de completar el conocimiento de diferentes rutas metabólicas (Sterky *et al.* 1998; Ohlrogge & Benning, 2000). Este concepto primero fue aplicado para el aislamiento del gen que sintetiza para la Oleato hydroxylasa del castor (Van der Loo *et al.* 1995). Posteriormente, los ESTs han sido utilizados para encontrar 3 nuevos genes de la ruta de biosíntesis de los isoprenoides en menta (*Mentha × piperita*) (Lange & Croteau, 1999; Lange *et al.* 1998, 1999). Más recientemente, el perfil de EST han sido usado para describir la biosíntesis de ácidos grasos en semillas de *Arabidopsis* y el metabolismo de fenilpropano en albahaca (*Ocimum basilicum*) (White *et al.* 2000; Gang *et al.* 2001). Las nuevas herramientas bioinformáticas permiten describir los diferentes ESTs, ubicándolos espacialmente dentro de la célula, en el proceso metabólico o estructural involucrado y finalmente dándole una potencial identidad.

6. Hipótesis

El conocimiento existente sobre las rutas metabólicas así como sobre la estructura, función y secuencia de los genes involucrados en la síntesis de carotenos y antocianinas posibilitará el desarrollo de marcadores moleculares génicos que permitan la detección de polimorfismo y su uso para la localización en un mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas*.

7. Objetivo

Desarrollar marcadores moleculares que permiten evaluar el polimorfismo en los genes involucrados en la síntesis de los principales pigmentos descritos en *Ipomoea batatas*.

8. Objetivos Específicos

Desarrollar marcadores moleculares específicos de los genes de interés.

Evaluar polimorfismo en los loci amplificados.

Aportar al conocimiento de la estructura genómica de los genes candidatos analizados.

Asignar funciones por homología de secuencia de ESTs de la base de datos del NCBI.

Ensayar la potencialidad de los marcadores desarrollados para la caracterización funcional del Banco de Germoplasma de la especie.

Materiales y métodos

1. Material vegetal

El ADN de dos genotipos parentales y del total de la población de mapeo fue obtenido según el protocolo de CTAB modificado (Doyle & Doyle 1999).

Para la evaluación en la colección núcleo, se extrajo ADN de 40 genotipos pertenecientes al Banco *in vitro* de germoplasma del IRB, representativos de la diversidad conservada.

2. Cuantificación de ADN

La concentración e integridad del ADN se determinó por medio de la visualización con luz U.V. luego de la electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (TAE 1x -0,04 M Tris-acetato, 0,001M EDTA) teñidos con bromuro de etidio. Todas las lecturas se refirieron a un patrón de concentración de ADN conocido y se ajustaron a 100 ng/μl en TE 1x. Las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas hasta su posterior utilización a una temperatura de 4°C.

3. Selección de genes candidatos

La selección de las secuencias funcionales relacionadas con la síntesis de Antocianinas y Carotenos analizada en este estudio se realizó a partir de dos estrategias. La primer estrategia consistió en la búsqueda de secuencias homólogas de los genes candidatos en el banco de genes de acceso público GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) preferentemente pertenecientes a *Ipomoea batatas*, como segunda opción especies del género *Ipomoea* y finalmente de otras especies vegetales disponibles.

Para el diseño de primers fueron utilizadas las secuencias de ADN genómico o RNA mensajero disponibles de las siguientes enzimas de la ruta de carotenos: IPI, GGPS, PSY, LYC, CHY y ZEP; y de la ruta de antocianinas: CHS, CHI, DFR, F3H, ANS, UF3GT. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron 12 genes candidatos involucrados en la síntesis de pigmentos. Se diseñaron primers utilizando el programa on-line Primer 3 (v.0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen & Skaletsky 2000). La amplificación fue realizada en un termociclador BIORAD (Termal cycler). Se ajustaron las condiciones de amplificación hasta encontrar las óptimas. La condiciones de ciclado fueron: 94°C durante 4 minutos, 35 ciclos de 94°C 30'', 52°C 30'' y 72°C 45'', y una elongación final de 72°C por 10 minutos, variando las temperaturas de annealing entre 52°C y 60°C

Se realizó una evaluación de los marcadores diseñados en ambos padres y 6 progenies. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio y

en poliacrilamida al 6%. Las variantes alélicas fueron indicadas según sus patrones de movilidad. Las bandas reproducibles y con un patrón claro fueron aisladas y purificadas utilizando el sistema ADN PuriPrep-GP Kit (Highway, Inbio Argentina) y secuenciadas (Secuenciador automático de capilares modelo ABI3130XL, Applied Biosystems). Se evaluó su identidad y homología con otras especies utilizando la herramienta de Búsqueda de Alineamiento Básico Local del NCBI (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Las secuencias de cada banda fueron analizadas para realizar una descripción estructural y funcional. Se realizó una comparación entre ellas mediante el programa de alineamiento Clustal W, búsqueda de ORF con la herramienta "ORF Finder" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>), localización de sitios de splicing mediante el programa Splice Site Prediction by Neural Network de Berkeley http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html (Resee *et al.* 1997).

Los marcadores que producen bandas polimórficas (presentan diferente tamaño) de buena calidad en el subset de hijos y entre parentales y cuya identidad fue confirmada, fueron seleccionadas para la evaluación del total de genotipos de la población de mapeo. Los marcadores desarrollados que presentan homología con los genes de interés fueron evaluados en la "colección núcleo" de batata conservadas en el Banco "in Vitro" de Germoplasma del IRB, INTA Castelar.

La segunda estrategia implicó el análisis bioinformático en las colecciones de ESTs de *Ipomoea batatas* publicadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (actualizadas a Octubre de 2008), provenientes de 14 genotecas elaboradas a partir de:

- Raíces engrosadas maduras de coloración de pulpa crema y pulpa morada. Sweet potato tuberous root EST (Desarrollado por Mano H. 2008). EST from sweet potato (*Ipomoea batatas*) storage root. (Desarrollado por He 2004)
- Raíces de tamaño medio a grande de coloración morada, naranja y blanca. Identification of genes involved in storage root formation in Sweetpotato (*Ipomea batatas*). (Desarrollado por Desai D. 2006.)
- Raíces en diferentes estadios de desarrollo (desde fibrosas a engrosadas). Isolation of expressed genes in cold-stressed and non-stressed fibrous roots of sweetpotato (Desarrollado por Tabata K. 2005). Sweet potato ESTs (Li, X-Q. 2003). Identification of genes possibly related to storage root induction in sweetpotato. FEBS 536 (1-3): 101-105 (You, M.K, *et al.* 2003.)
- Hoja. Identification of adaptation specific differences in the mRNA expression profile of drought tolerant and sensitive sweetpotato. (Desarrollado por Jankowicz J. *et al.* 2004).
- Plántula in vitro completa. Sweetpotato ESTs. (Desarrollado por Jarret, R.L *et al.* 2002).

Detección de unigenes

La redundancia de secuencias de ESTs de la base de datos se analizó, mediante el programa EGassembler (Masoudi-Nejad *et al.* 2006, <http://egassembler.hgc.jp/>). Las secuencias que mostraron más del 85% de identidad, en tramos de 30 nucleótidos, fueron consideradas idénticas y se asignaron a un grupo específico (“contig”), el resto fueron consideradas secuencias únicas (“singletons”).

Determinación de funciones de los unigenes de ESTs

Para la determinación de la funcionalidad potencial se utilizó el programa Blast2GO (Conesa *et al.* 2005, <http://www.blast2go.de/>), el cual describe los productos de los genes, en términos de: proceso biológico asociado (P), componente celular (C) y función molecular (F). Las anotaciones Gene Ontology (GO) se generan en un proceso de 3 pasos:

- 1) SIMILITUD BLAST: busca similitud de secuencias mediante algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), utilizando la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)
- 2) MAPEO: utiliza los resultados del análisis de similitud BLAST para obtener los términos *Gene Ontology* (GO) (<http://www.geneontology.org/>) empleando archivos de anotación provistos por el Consorcio GO que se incorporan a la base de datos del servidor Blast2GO.
- 3) ANOTACIÓN: las secuencias son anotadas usando parámetros provistos por el usuario. La anotación GO puede ser modulada por edición manual o a través de los servicios web Annex y GOSlim, los cuales permiten aumentar o disminuir el grado de anotación, respectivamente.

Los términos de InterPro se obtienen del servidor InterProScan (análisis funcional de proteínas) del EBI (European Bioinformatics Institute), los cuales pueden ser convertidos y combinados con los términos GO.

Además se asignaron los genes a una ruta metabólica individual utilizando las anotaciones con el *Evidence Code* (EC) y de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG [<http://www.genome.jp/>]) (Ogata *et al.* 1999). Las secuencias ESTs que fueron anotadas como genes de interés, fueron utilizadas para el diseño de primers, siguiendo el mismo protocolo detallado en la estrategia anterior.

Resultados y Discusión

1. Detección de ESTs

A octubre de 2008, la base de datos de ESTs contaba con 19468 secuencias. Esta base es una excelente fuente para la búsqueda de genes candidatos. El total de secuencias fue analizado mediante el programa *Aeassembler* para la detección de secuencias duplicadas (o redundantes). Se detectaron 6924 secuencias únicas de las cuales 2800 fueron contigs y 4121 secuencias simples. Estas secuencias únicas fueron analizadas para conocer su identidad. Novecientos ochenta y dos (982) secuencias pudieron ser anotadas por su homología, muchas de las cuales fueron asignadas para los mismos genes. Depurando la base de datos, quedaron finalmente registradas 676 genes, de los cuales 7 corresponden a los genes estructurales (Tabla 2) de la ruta de biosíntesis de carotenos y antocianinas. Se detallan en la Tabla 2 los EST anotados como genes de la ruta de síntesis de caroteno, en algunos casos fue posible la conformación de contigs.

Tabla 2. Genes de las rutas de síntesis de carotenos detectados a partir de la base de ESTs.

Nombre de la enzima	Codificación	Numero de NCBI
zeaxanthin epoxidase	[EC:1.14.13.90]	gi:114782715
phytoene synthase	[EC:2.5.1.32]	gi:28879420 gi:114782885 gi:114782154
lycopene beta cyclase	[EC:1.14.-.-]	gi: 28437764
beta-carotene hydroxylase	[EC:1.14.13.-]	gi:114776235 gi:114777325 gi:114776212 gi:114776202 gi:76296810
beta-carotene ketolase (CrtO type)		gi:76295779 gi:76296367 gi:76295066 gi:76296151 gi:76297510

Para antocianinas fueron detectadas dos secuencias de interés:

- chalcone synthase [EC:2.3.1.74]
- dihydroflavonol-4-reductase [EC:1.1.1.219]

Las secuencias simples o contigs anotadas como genes de interés fueron utilizados para el diseño de primers.

2. Desarrollo de Marcadores de genes candidatos

Fueron desarrollados 32 marcadores para evaluar doce (12) genes estructurales involucrados en la síntesis de antocianinas y carotenos. Dos marcadores de dos genes (CHS y GGPPS) no amplificaron. Los 30 marcadores restantes generaron productos de amplificación reproducibles y permitieron amplificar los intrones de 5 genes estructurales: Flavonol 3-hidroxilasa (F3H), Dihydroflavonol 4-reductasa (DFR), Chalcona isomerasa (CHI), Antocianidin Sintasa (ANS) y UDP glucosa: Flavonoid 3-O-glucosyltransferasa (UF3TG) de la ruta de síntesis de antocianinas y 5 genes principales de la ruta de carotenos: Fitoeno sintasa (PSY), Isopentenil pirofosfato sintasa (IPP), Lycopeno β -ciclaza (LCY-b), Zeaxanthin epoxidasa (ZEP) y β -Caroteno Hidroxilasa (CHY β). Para veintidós (22) marcadores fue posible confirmar su identidad, diecinueve (19) de los cuales generaron alelos polimórficos mientras que once (11) fueron monomórficos entre los parentales y seis progenies elegidos para la evaluación. Veintinueve (29) marcadores presentan homología con las secuencias esperadas. El análisis de las secuencias evaluadas permite concluir que dentro de los genes analizados se observaron posición y número de intrones conservados. La variación observada se debe a cambios en la longitud y secuencia nucleotídica detectada mayoritariamente en los intrones. Vallabhaneni *et al.* (2009), encuentran que el 78% de los genes estudiados entre *Arabidopsis* y tomate presentan el mismo número de intrones. Aunque en el 13.9% de los genes de *Arabidopsis* se observan mas intrones que en tomate. La longitud de los intrones en tomate resultó mayor que en *Arabidopsis*, teniendo en tomate un promedio de 466pb, mientras que en *Arabidopsis* promedian los 147pb. Solo el 2.6% de los intrones presentó el mismo tamaño entre ambas especies. Nuestros resultados se ajustan a lo observado por Vallabhaneni *et al.* (2009), si bien la cantidad y localización de los intrones esta conservada, el polimorfismo se detecta principalmente en tamaño y secuencia de los intrones. Estos mismos investigadores detectan además polimorfismo en las regiones de los exones, aunque con una frecuencia mucho menor que en los intrones. De 62 genes que analizan, solo 5 presentan polimorfismo en exones, mientras que 22 lo presentan tanto en regiones codificantes como no codificantes. En tomate la frecuencia de polimorfismo es mayor en las regiones intrónicas que exónicas. La frecuencia esperada de polimorfismo en las regiones codificantes es un SNP por cada 7-8.5 kb (Nesbitt & Tanksley 2002; Yang *et al.* 2004). Los SNP aparecen entre 1.6 y 5.2 mas veces en las regiones no codificantes que en las codificantes (Yang *et al.* 2005; Van Deynze *et al.* 2007; Jimenez-Gomez & Maloof 2009). Similarmente, la frecuencia es 2.6-8.7 veces más alta para indels en la regiones no traducidas que en las secuencias codificantes (Jimenez-Gomez & Maloof 2009). Similarmente en maíz, Ching *et al.* (2002) detectan que la frecuencia de sustituciones nucleotídicas es al menos tres veces mayor en las regiones no codificantes que en la secuencias

codificantes. La mayoría de los cambios en las regiones codificantes son además silenciosas (solo 5 de 18 cambios resultan en sustituciones aminoacídicas). En relación a la diferencia en la distribución de los indels, esta es aún más notoria, solo 1 indel de 3pb fue detectado en 2.35 kb de secuencias codificantes, mientras que los indels ocurren con un promedio de 85 pb en las regiones no codificantes.

En comparación con los exones, los intrones presentan más variabilidad, la menor presión de selección de estas regiones del genoma explica esta observación. La variación en los intrones puede estar dada a nivel de secuencia originado por SNPs, o en la longitud de la secuencia debido a inserciones/delecciones. En arroz se observó que en algunos casos la variación en la longitud de los intrones era debido a la presencia de SSR (3.9%), aunque principalmente se debía a la presencia de InDels (Wang *et al.* 2005). En las secuencias obtenidas en este trabajo no fueron detectados SSR en los intrones.

En relación a los SNPs, Feltus *et al.* 2006 detecta un número promedio de un SNP por cada 1000pb en los intrones (12.1), tres veces mayor que la observada en los exones (3.6) en un trabajo con arroz (*Oryza sativa*). Sin embargo, la detección de SNPs requiere la secuenciación de los alelos, lo que encarece el trabajo si debe hacerse en un número amplio de genotipos, al menos que sean convertidos en CAPs.

La otra forma de variación observada es en la longitud de los intrones (intron length polymorphism o ILPs). Los ILPs han sido utilizados como marcadores moleculares y presentan características deseables, como ser su especificidad, codominancia, neutralidad y reproducibilidad. Hasta el momento, estos marcadores han sido utilizados en pocas especies (Choi *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005; Wei *et al.* 2005), y se detectan mediante PCR con primers específicos diseñados en los exones flanqueantes a los intrones de interés. La secuencia de ADN genómico de genes conservados en Arabidopsis o arroz han sido utilizados para predecir la posición de los intrones en otras especies (Yang *et al.* 2007). Yang *et al.* (2005) y Van Deynze *et al.* (2007) también utilizan esta estrategia para predecir la posición de los intrones en tomate.

Obviamente, el punto clave para el desarrollo de estos marcadores es poder identificar los intrones. Un método general para su identificación es comparar la secuencia de los cDNA/EST con las secuencias genómicas. Por lo tanto, es sencilla la identificación de intrones en organismos modelos en los cuales se cuenta con una extensa base de datos. Sin embargo, la aplicación de esta metodología encuentra algunas dificultades cuando trabajamos con otras especies en las que solo hay disponibles secuencias de cDNA/EST, como es el caso de *Ipomoea batatas*. Afortunadamente, diversos estudios han indicado que la estructura exón-intrón está ampliamente conservada entre

genes homólogos de diferentes especies (Batzoglou *et al.* 2000). Por lo tanto, las uniones entre exones adyacentes después del “splicing” en un cDNA/EST en un organismo pueden ser deducidas de acuerdo a un gen homólogo de un organismo relacionado. Esta estrategia para el desarrollo de marcadores de intrones fue la utilizada con éxito en este trabajo, debido principalmente al gran número de secuencias de cDNA/EST disponibles en las bases de datos públicas y el conocimiento existente de los genes de las rutas metabólicas estudiadas. Si bien nos centramos en la búsqueda de polimorfismo en la longitud de los intrones, la secuenciación de los alelos amplificados para su identificación, permitió evaluar de manera exploratoria la presencia de marcadores tipo SNPs.

Una amplificación y secuenciación exitosa de los intrones del ADN genómicos resulta crítica para la detección del polimorfismo de las regiones no codificantes, en particular en aquellas especies donde no hay información completa del ADN genómico. Obviamente, una exacta predicción de la posición de los intrones no garantiza una amplificación exitosa, menos aún si el diseño de marcadores fue hecho en una especie taxonómicamente lejana. La presencia de intrones de gran tamaño puede también llevar al fracaso en la amplificación. En varios trabajos sin embargo fue alto el porcentaje de éxito, cerca del 60% de los pares de primers diseñados utilizando ESTs amplificaron de manera exitosa (Temesgen *et al.* 2001; Wei *et al.* 2005; Van Deynze *et al.* 2007). En nuestro caso, el 73% de los marcadores diseñados generaron productos de amplificación reproducibles y con identidad confirmada. En relación a la diversidad alélica, de los 22 pares de marcadores positivos (con identidad confirmada), 10 presentaron polimorfismo en la longitud de secuencia, cerca de un 45%. El análisis de las secuencias permitió verificar que el polimorfismo de longitud se debía principalmente a InDels o presencia de transposones en los intrones. También fueron observados numerosos cambios de nucleótidos simple o SNP. La mayoría de los SNPs detectados ocurren entre la secuencia obtenida de la base de datos en relación con los parentales secuenciados, aunque también fueron detectados variaciones entre los padres.

Dado que las bandas no fueron re-secuenciadas a fin de confirmar los SNP detectados, para una descripción solo tendremos en cuenta aquellos que ocurren entre nuestras secuencias y las bajadas del NCBI. Feltus *et al.* 2004, provee un dato interesante acerca de la veracidad de los SNP detectados in silico: cuando realizan una secuenciación directa, confirman que el $79.8\% \pm 7.5\%$ de los SNP in silico son reales.

El alineamiento de un total de 5111 pb, teniendo en cuenta las secuencias comparadas de los genes candidatos, mostró 201 SNPs y 36 InDels, mostrando un promedio de 1 SNP cada 25pb y un InDels cada 141,9pb. Estos valores incluyen regiones codificantes y no codificantes. Cuando nos referimos a los intrones exclusivamente, los ISNP aparecen en promedio cada 31pb, mientras que los ILP cada

105pb. La mayor diferencia se observa entre la presencia de InDels en los intrones y exones, ya que aparecen en estos últimos cada 225pb, el doble que en los intrones. De los 5111pb analizados, 2637 corresponden a regiones intrónicas mientras que 2474pb a regiones codificantes: se observaron mayor cantidad (58%) de SNPs en los exones que en los intrones, mientras que los transposones o grandes deleciones/inserciones, solo fueron detectadas únicamente en los intrones.

Del total de polimorfismo observado en los intrones, los InDels (ILP), alcanzaron el 23% mientras que los ISNP representan el 77%. Estos valores se acercan a los reportados por Yang *et al.* 2007: el porcentaje de ILP y ISNP fue de 17.98% y 51.22% respectivamente entre dos cultivares de arroz, mientras que en *Arabidopsis* fue de 18.61% y 53.18%. En ambas especies el porcentaje de ILP e ISNP fue muy similar.

Si bien en tomate fueron descriptos 1 SNP cada 1000pb, este valor se encuentra muy lejano al observado por nosotros. Sin embargo, nuestros datos coinciden perfectamente con los observados por Clotault *et al.* 2010, donde realizan un análisis de diversidad nucleotídica de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides: detectan una alta frecuencia de SNPs dentro de los genes, uno cada 22bp. Teniendo en cuenta la presencia de elementos móviles, la cantidad acumulada de inserciones y deleciones tienen un rango de 0pb (LYCb) a 511pb (IPI), aunque este último presenta un elemento tipo MITE en el intrón 4 de 468pb.

3. Antocianinas

3.1 Chalcona Sintetasa

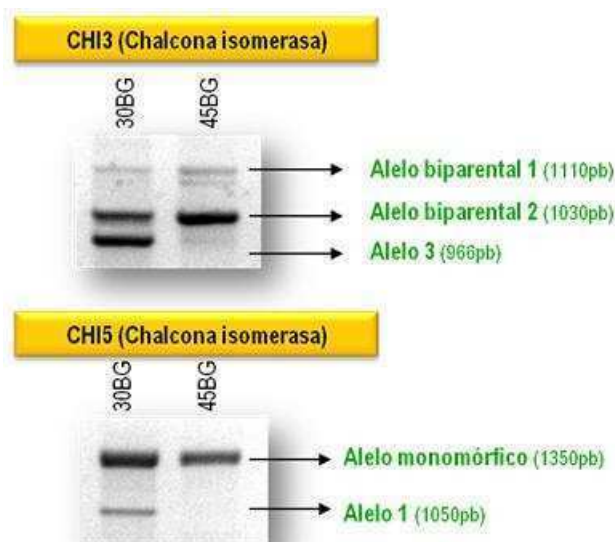
Para el análisis de este gen fueron diseñados varios juegos de marcadores. En todos los casos la amplificación fue de un alto número de bandas y muy variables, aún realizando la amplificación con pequeños cambios de temperatura. No fue posible obtener un marcador que permita el análisis de este gen. A pesar de ser uno de los genes mejor caracterizados de la ruta, creemos que la existencia de más de 4 miembros dentro de la familia génica de CHS puede explicar el fracaso en el desarrollo de marcadores para este gen.

3.2 Chalcona Isomerasa (CHI)

Basada en la estructura y secuencia del gen completo de *Petunia hybrida* (X14590.1) y *Arabidopsis thaliana* (M86358.1) se estimaron las zonas correspondientes a los exones en el mRNA de batata. Los primers fueron diseñados a partir de la secuencia del mRNA de *Ipomoea batatas* (AB080768.1)

para amplificar los tres intrones (CHI1, CHI3 y CHI5). El primer CHI1 no generó producto de amplificación. Los primers CHI3 y CHI5 amplificaron varios alelos (Figura 3) de alto peso molecular.

Figura 3. Alelos amplificados con los primers CHI3 y CHI5. Se indican ambos parentales y los alelos monomórficos, biparentales o polimórficos con sus pesos moleculares (pb).



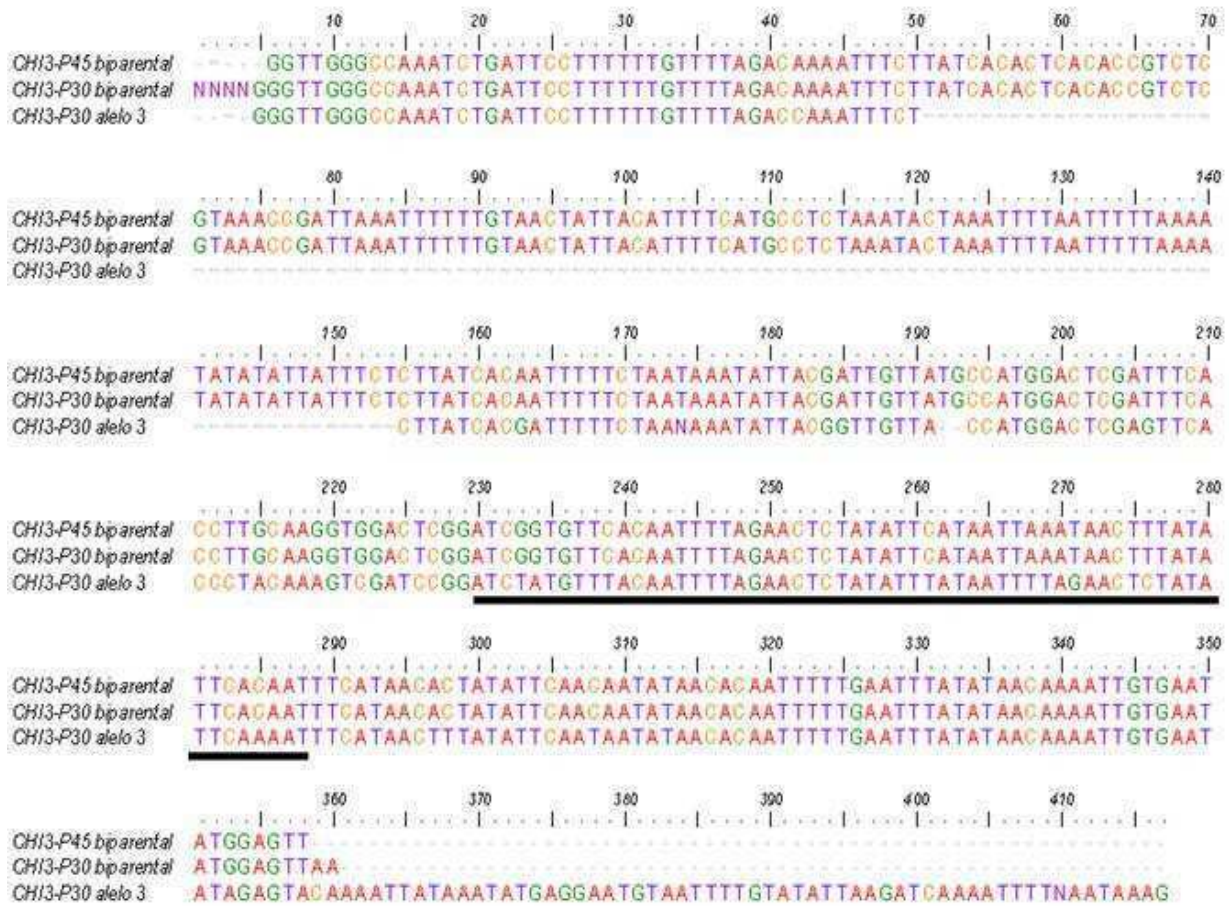
Evaluación del marcador CHI3

El primer CHI3 amplifica 3 bandas, dos biparentales y un alelo polimórfico. Se observó una alta tasa de genotipos nulos cuando se analizó en el conjunto de la población. El alelo polimórfico (3), segrega a una tasa 1:1 (Capítulo 4), lo que nos permite inferir que se trata de un alelo que se presenta en dosis simple en el progenitor 30BG (Aaaaaa) y ausente en el 45BG (aaaaaa). El alelo biparental de 1030pb se presenta en más de una dosis en uno o ambos parentales, ya que no se ajusta a la dosis doble-simple (3:1). Finalmente, el otro alelo biparental amplificado presenta una distorsión de la segregación 1,45:1, con mayor número de ausencias que presencias.

Para el locus CHI3, fueron secuenciados el alelo 3 polimórfico y el alelo biparental 2 para ambos padres. Se obtuvieron secuencias de 300pb aproximadamente. Las tres bandas presentan homología con varios contigs, correspondientes el *locus S* de incompatibilidad de *Ipomoea trifida* y con transposones de la familia Tpn de *Ipomoea nil* (Tpn111, Tpn 8, Tpn120, Tpn 107, etc.) relacionados con elementos transponibles tipo En/Spm (Enhancer/Suppressor-mutator). Estos elementos llevan una región terminal repetida e invertida de 28bp (TIRs), regiones subterminales altamente repetitivas y una región central no repetitiva. La denominación Tpn1 se debe a que

fueron caracterizados originalmente en *Pharbitis nil* por Lida *et al.* 1999, o como se la conoce actualmente *Ipomoea morning glory* o *Ipomoea nil*. La secuencia interna de estos transposones deriva de los genes hospedadores. Todos estos elementos son no-autónomos y movilizados por elementos autónomos aún no identificados. Han sido descritos en varios genes de antocianinas en el género *Ipomoea* y se estima que en *Ipomoea nil* existen entre 500 y 1000 copias por genoma haploide. Nitasaka & Eiji (2003), detectan un alelo de un gen homeótico floral donde se observa la presencia de la región 3' subterminal y la región no repetitiva de un transposón de la familia Tnp1. La escisión de este elemento no solo implicó la pérdida de parte sustancial del transposón sino que también se llevo parte del intrón 2 del gen donde estaba contenido. Hoshino *et al.* 2009, también detecta dos transposones Tpn3 y Tpn6 en el gen DFR de *Ipomoea nil*. En la zona central presentaba parte de la región codificante de una proteína relacionada con la miosina, un posible exón de una proteína desconocida y además, dos exones del gen correspondiente a la Citrato Sintasa homóloga a la presente en *Arabidopsis*. La presencia de estos elementos generaba flores blancas y se observaba reversión del carácter en algunas zonas de la corola, originando flores variegadas. Los alelos amplificados por este marcador no pudieron ser confirmados que correspondieran al gen CHI. De los 300 pb secuenciados, entre 50pb y 120pb son los que presentan homología con los diferentes transposones, el resto de la secuencia amplificada no presentó homología con el gen CHI. A nivel de estructura, el alelo 3 presenta una delección de 105 pb con respecto a la banda biparental 2 y varios cambios de nucleótidos simples. Tomando en consideración la longitud de secuencia de intrones y exones en las especies con la que se cuenta con la estructura genómica completa de este gen, sería esperado amplificar alelos no mayores a 500 pb. En este caso, amplificamos más del doble, por lo que podría tratarse de un intrón en *Ipomoea batatas* con tamaño muy superior a lo observado en otras especies o bien a la presencia de inserciones. Sería necesario volver a amplificar las bandas para corroborar si la región amplificada es la región del gen CHI que contiene el transposón o bien corresponde a otra región del genoma.

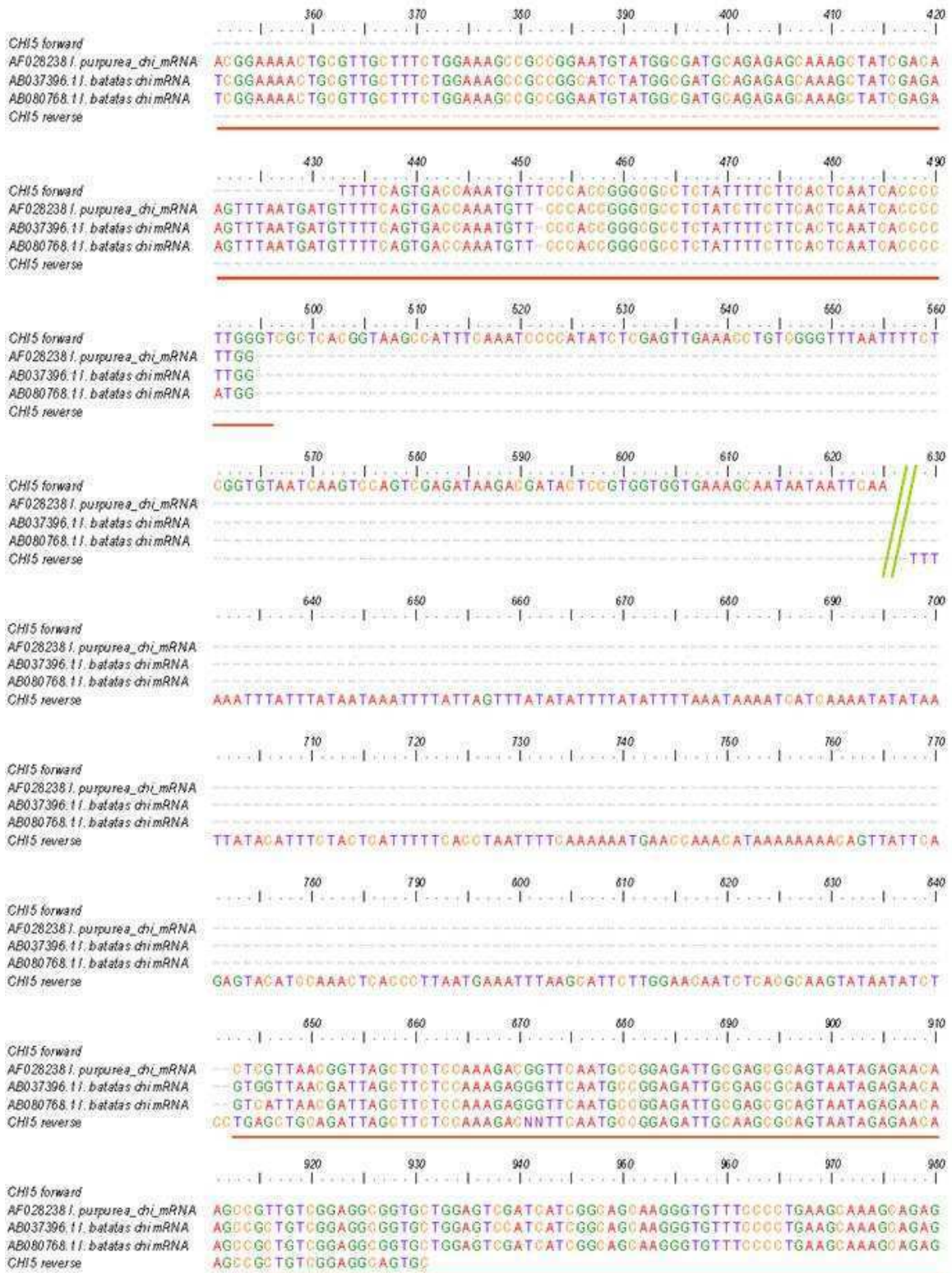
Figura 6. Alineamiento de las bandas secuenciadas del primer CHI3. En negro: región de homología con transposones tipo Tpn.



Evaluación del marcador CHI5

El marcador CHI5 presenta un alelo polimórfico presente en el parental 30BG que segrega 1:1. El otro alelo no mostró segregación en la población evaluada, por lo que se estima que presenta alta dosis en uno o ambos parentales. El alelo 1 amplificado por CHI5 fue secuenciado en ambos sentidos y se obtuvo una secuencia de 200pb desde el 5' y 310pb desde el 3'. Tal como se esperaba el fragmento 5' presenta homología con la región 3' del exón 3, mientras que el 3' es con la región 5' del exón 4 del gen Chalcona Isomerasa. La región 5' de esta última presenta homología con varios contigs que contienen el *locus S* de incompatibilidad de *Ipomoea trifida*. Estos contigs se encuentran caracterizados parcialmente. Sin embargo los datos disponibles hasta el momento detectaron varios potenciales ORF, algunos correspondientes a proteínas ya descritas y otros a potenciales proteínas. Además, se han detectado numerosas secuencias repetitivas y transposones (Tomita *et al.* 2004). Esta región podría corresponder al intrón 3, y tiene una longitud aproximada de 340pb (Figura 4).

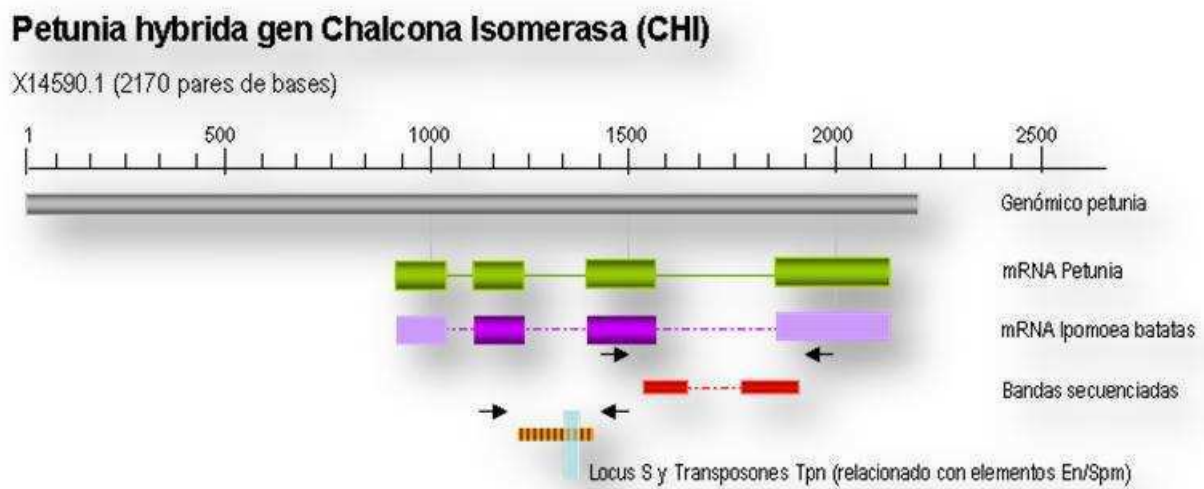
Figura 4. Alineamiento de las bandas secuenciadas del primer CHI5. En rojo exones 3 y 4. Doble raya verde indica una zona de longitud y secuencia desconocida.



En *Petunia*, el intrón 3 presenta un tamaño de 169pb, mientras que en maíz y arroz es de solo 93pb y 79pb respectivamente. Esta variación en la longitud y secuencia de los intrones fue observada

también entre las cuatro variantes del gen CHI detectadas en *Lotus japonicus*, la secuencia y tamaño de los intrones es muy variable, aunque todas son copias derivadas de alguna de ellas y se encuentran ubicadas en tandem (Shimada *et al.* 2003). Se observan algunos SNP en los exones y un InDel entre nuestra secuencia y las disponibles en las bases de datos.

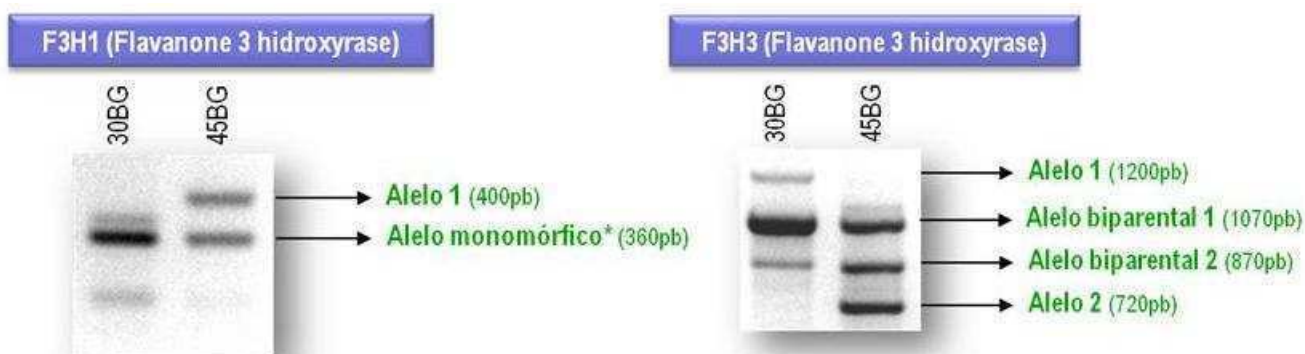
Figura 5. Esquema de la estructura del gen CHI en *Petunia hybrida*. Mensajeros de *Petunia hybrida* e *Ipomoea batatas* y localización de las bandas secuenciadas. Las flechas corresponden los primers utilizados. La banda rayada indica al alelo sin homología con el gen pero con homología parcial con transposones.



3.3 Flavanone-3-hidroxilasa (F3H)

Para la definición de los exones en la secuencia disponible del mRNA (1223pb) de *Ipomoea batatas* (EF108572.1) para este gen, se alinearon con las secuencias genómicas de *Petunia hybrida* (AF022142.1) y *Arabidopsis thaliana* (AF064064.1). Estos genes presentan una longitud de 2320pb y 2240pb respectivamente, mientras que los mRNA 1262pb y 1115pb. El gen F3H estructuralmente presenta 3 exones altamente conservados y dos intrones que difieren en secuencia y longitud en las diferentes especies analizadas. En *Ipomoea batatas* e *Ipomoea purpúrea* se encuentran disponibles secuencias de tres alelos de este gen mientras que para *Ipomoea nil* se describen dos. Los primers fueron diseñados para evaluar el intrón uno y dos. El tamaño esperado para el primer locus es de por lo menos 230pb y para el segundo de 203pb a lo que hay que sumarle los intrones.

Figura 7. Alelos amplificados con los primers F3H1 y F3H3. Se indican ambos parentales y los alelos monomórficos, biparentales o polimórficos con sus pesos moleculares (pb).



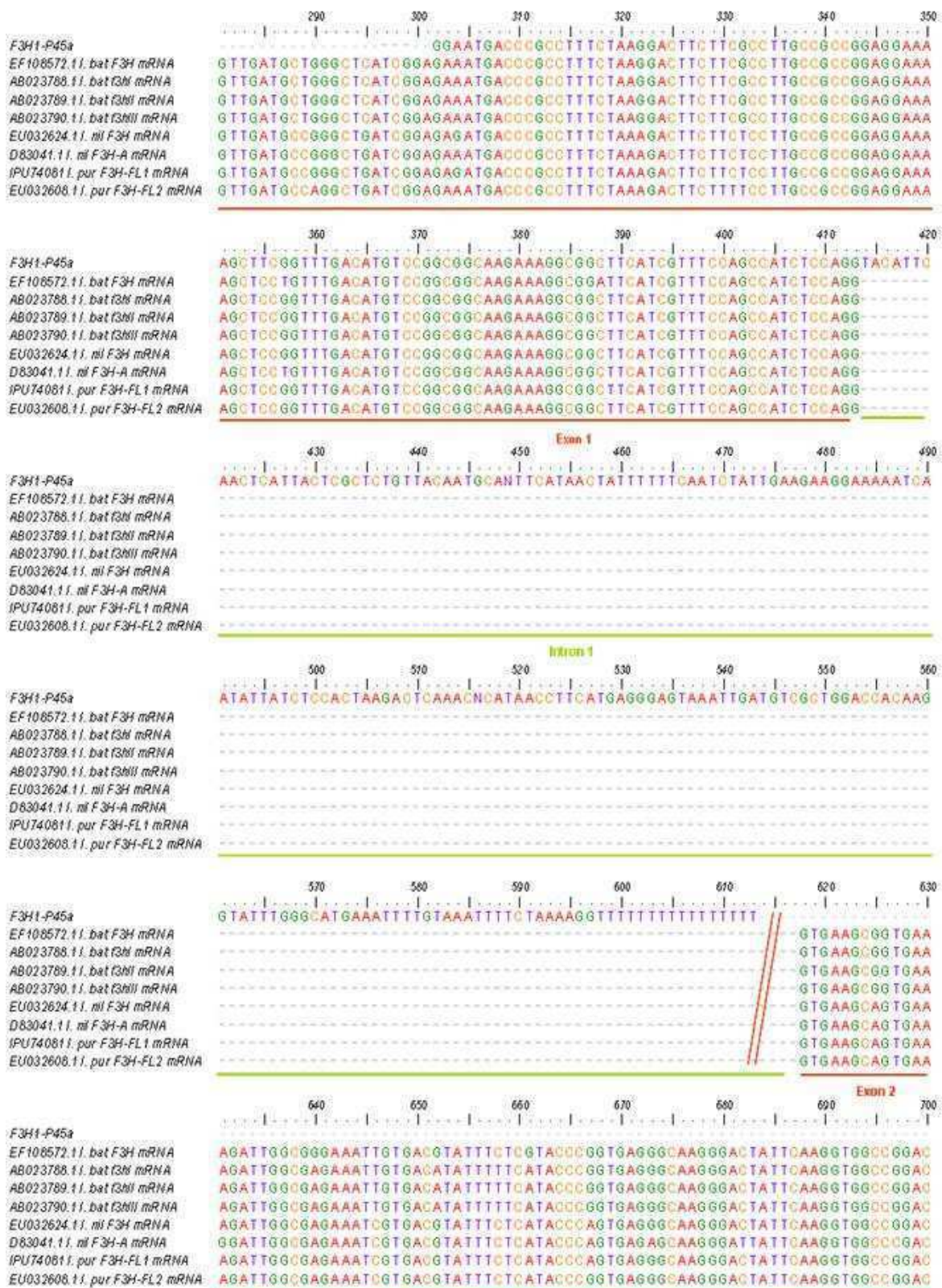
Evaluación del marcador F3H1

El marcador que evalúa el primer intrón amplificó dos alelos reproducibles: un alelo de 400pb polimórfico, presente en el parental 45BG y un alelo biparental de 360pb ausente en un solo un genotipo de la progenie (Figura 7). El alelo polimórfico presenta una segregación 1:1 con dosis simple, mientras que el otro está presente en múltiple dosis. Para poder detectar un recombinante cada 100 individuos, la configuración genética de los parentales para ese alelo sería AAAaaa x AAaaaa.

El alelo 1, fue secuenciado. Se obtuvo una secuencia de 310pb de longitud. La región amplificada presenta alta homología con la región 3' del exón 1 del F3H con e-value entre $1e^{-42}$ hasta $1e^{-47}$ a lo largo de diferentes *Ipomoeas* y entre un 96% y 99% de identidad. El resto de la secuencia corresponde al intrón 1 y presenta 2 regiones de homología con el banco de secuencias, con el intrón 1 de una potencial proteína detectada en el contig S1 y SR6 del *locus S* de *Ipomoea trifida*. La otra secuencia homóloga también se corresponde con el intrón 1 de otra proteína: beta-amilasa de *Ipomoea trifida* (Figura 8). Esta región que definimos como el posible intrón 1 del gen F3H presenta al menos 200pb. El tamaño de los intrones es altamente variable: 91pb, 349pb, 616pb y 700pb para el intrón 1 de *Arabidopsis thaliana* (U33932.1), *Brassica napus* (DG288238.1), *Glycine max* (EU391459.1) y *Petunia hybrida* respectivamente.

A nivel de secuencia, se observa un solo cambio de base en el nucleótido 355 (T/C). Sin embargo esto no genera ningún cambio en la secuencia nucleotídica.

Figura 8. Alineamiento de las bandas secuenciadas del primer F3H1. En rojo corresponde a la región de homología con el exón 1 y 2. En verde se observa el intrón1. Doble línea roja indica una zona de secuencia y tamaño desconocido.



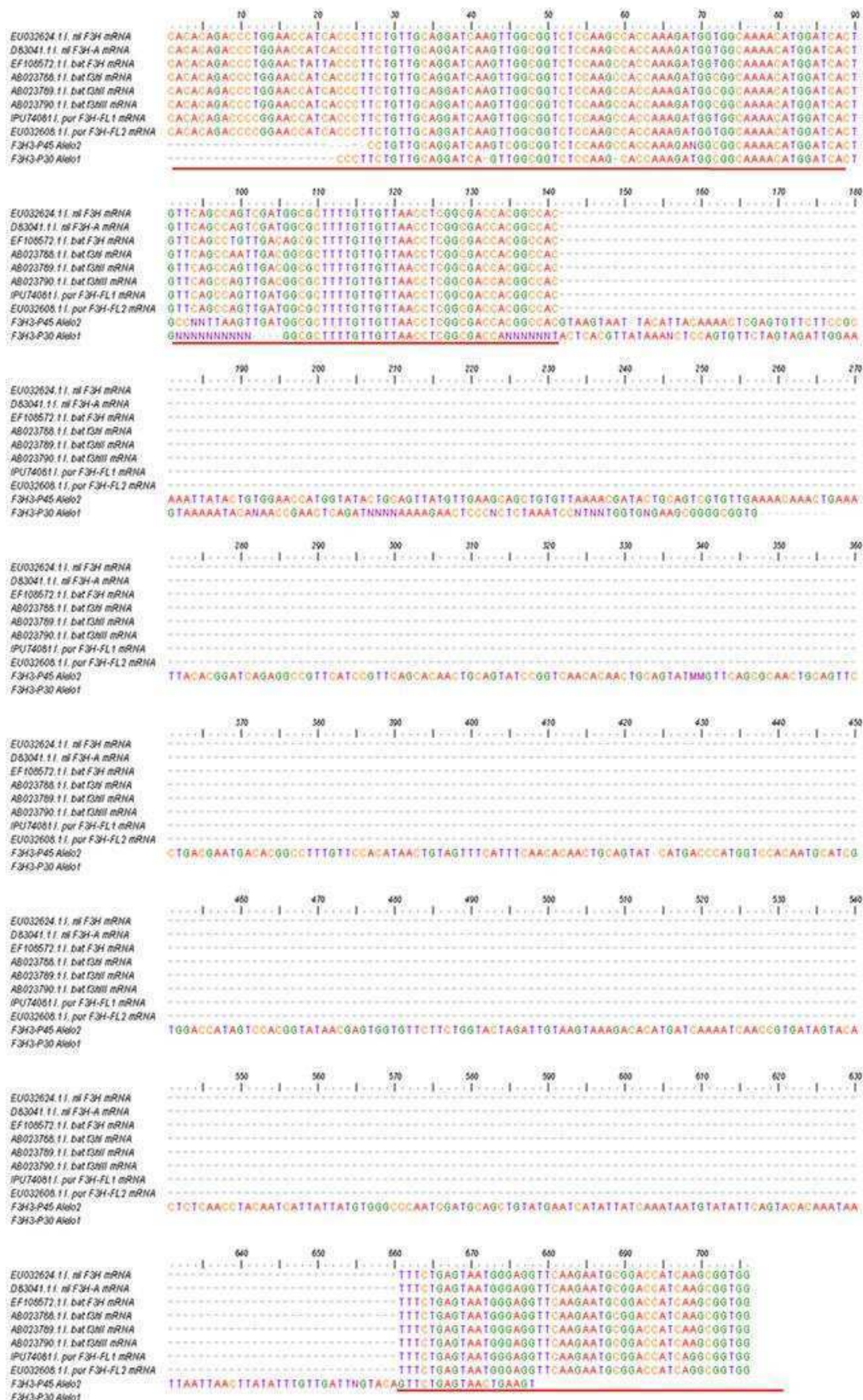
Evaluación del marcador F3H3

Este marcador fue diseñado para amplificar el intrón 2. Dos alelos polimórficos, uno aportado por cada parental y dos alelos biparentales fueron amplificados. Los tamaños fueron entre 720pb y 1200pb. El alelo 1 (polimórfico presente en el parental 30BG) presenta homología con los últimos 100 nucleótidos del exón 2 del gen F3H, el resto estimado corresponde al intrón 2. Por otro lado, para el alelo 2 fue posible obtener la secuencia completa y corresponde al intrón 2 completo y parte de los exones flanqueantes. Se estima que el intrón 2 presenta 517pb, este se encuentra dentro de los tamaños observados en otras especies analizadas: *Arabidopsis thaliana* (AF064064.1) y *Brassica napus* (DQ513328.1) presentan los menores tamaños con 84pb y 90pb respectivamente, mientras que en *Glycine soja* (EU391458.1) y *Medicago sativa* (X81812.1) presentan un intrón 2 que exceden el tamaño detectado en batata, con 664pb y 816pb. Los intrones de ambos alelos (1 y 2) no presentan ninguna similitud de secuencia entre ellos (Figura 9) ni homología con intrones del gen F3H de otras especies.

La calidad de secuencia del resto de las bandas purificadas no fue la óptima para realizar un análisis comparativo entre ellas debido al gran número de bases indefinidas, no obstante la región 5' de las secuencias presentan homología con el exón 2 del gen F3H.

El análisis de secuencia de la región correspondiente al intrón 2, al igual que el gen anteriormente analizado, presenta homología con un gran contig de 300Kb (EU032608.1) donde fue localizado el Locus S de *Ipomoea trifida*, relacionado con la incompatibilidad. La región homóloga presenta una longitud de 174pb (entre los 235 y 409pb) y corresponde a una región entre dos ORF de posibles proteínas que fueron identificados en este contig (Tomita *et al.* 2004). Además, una región ubicada río abajo entre los 520pb y los 614pb y río arriba (112pb a 234pb) resulta homóloga a diferentes genes de *Ipomoea*. Estas zonas del intrón 2 presentan similitud con regiones no codificantes de diversos genes, ya sea secuencias anteriores al 5'UTR como a intrones. Es interesante notar que las secuencias que presentan algún grado de homología guardan esta relación de manera específica con genes de *Ipomoea* relacionados con la ruta de síntesis de antocianinas: el gen UF3GT, el DFR-B y el gen InNhx (Transportador de Na⁺, relacionado con el pH vacuolar que afecta la coloración en la corola de *Ipomoea nil*- Yamaguchi *et al.* 2001). Es importante destacar además, que esas regiones también presentan similitud con pequeñas porciones de transposones tipo Tpn, ya citados anteriormente.

Figura 9. Alineamiento de las bandas polimórficas secuenciadas del primer F3H3 con las secuencias disponible de *Ipomoea batatas*, *Ipomoea nil* e *Ipomoea purpúrea*. En rojo corresponde a la región de homología con el exón 2 y 3.

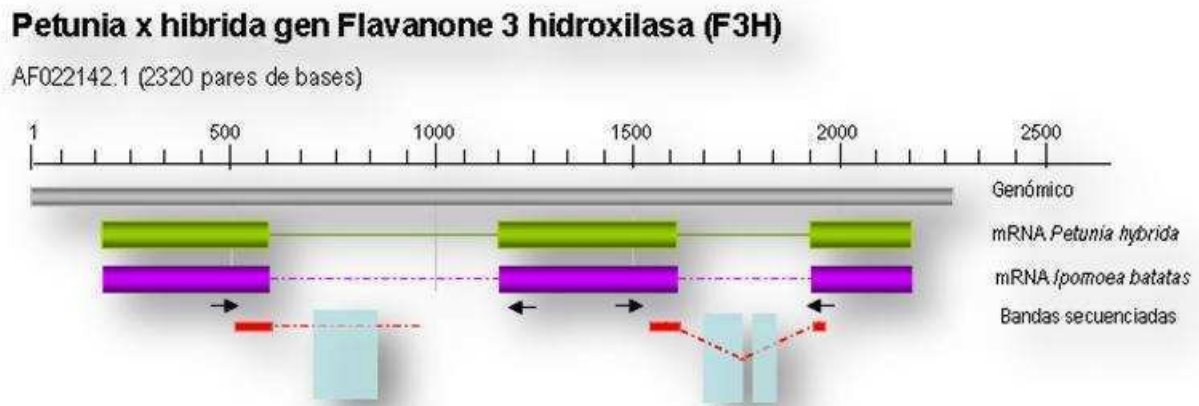


Resabios de transposones o secuencias tipo transposones (like-transposons) es común detectar en diferentes regiones de los genes, particularmente en las regiones no codificantes, como los 5'UTR, 3'UTR e intrones (Hoshino *et al.* 2009) (Nitasaka 2003) (Choi *et al.* 2007) en este género.

Surge de inmediato preguntarnos: ¿Por qué estos transposones se localizan mayoritariamente en los genes relacionados con antocianinas? ¿O por lo menos porqué hasta el momento han sido identificados principalmente allí? ¿Podría deberse a que estos genes han sido los más estudiados dentro del género, y por lo tanto estamos ante una visión parcial de la distribución de estos elementos móviles? ¿O a que la presencia de transposones en genes relacionados con el color generan fenotipos evidenciables y en general sin efectos deletéreo? En este sentido, Chopra *et al.* 2006 aporta un poco de luz a estas preguntas en una interesante revisión denominada "FLAVONOID PIGMENTS AS TOOLS IN MOLECULAR GENETICS", donde expone la historia del estudio de los genes relacionados con flavonoides, principalmente las antocianinas y su estrecha relación con la detección de elementos móviles. Los principales cultivos que fueron utilizados a lo largo de la historia fueron el maíz, el "conejito", petunia e *Ipomoea morning glory* para estudios de genética clásica y mejoramiento. La pigmentación de las flores es una de las características más importantes en el mejoramiento de plantas ornamentales. Originalmente los mejoradores utilizaban las mutaciones espontáneas como fuente de nuevas características y un número importante de ellas estaban causados por la inserción de transposones endógenos. Estos alelos mutados confieren fenotipos variegados que han fascinado a los genetistas. De hecho, muchos de los alelos mutados en maíz, conejito, petunia e *Ipomoea* fueron descritos y caracterizados, y la mayoría de ellos son consecuencia de la escisión de transposones integrados a los loci mutados. Además, algunas mutaciones detectadas en *Ipomoea* se cree que están generadas por "huellas" dejadas por la escisión de elementos móviles (Morita *et al.* 2005). En la actualidad, la mayoría de las mutaciones detectadas pueden ser identificadas mediante otras estrategias. En *Arabidopsis thaliana* por ejemplo, contar con la secuenciación completa posibilita la búsqueda de los diferentes elementos móviles directamente en las secuencias (Le *et al.* 2000). Podríamos manifestar entonces que la detección de elementos móviles se encuentra estrechamente relacionada con la investigación en los genes relacionados con los pigmentos antociánicos, en particular dentro del género estudiado.

Para terminar, presentamos la estructura del gen F3H (Figura 10) en *Ipomoea batatas* con los datos obtenidos. Se observan las regiones de homología entre las bandas secuenciadas con los datos disponibles de *Ipomoea* y *Petunia*. El tamaño del intrón 2 observado en batata es mayor que el de *Petunia*, mientras que no fue posible determinar el tamaño del intrón 1.

Figura 10. Estructura del gen F3H y su mensajero RNA. *Petunia hybrida* (en verde), *Ipomoea batatas* (violeta). Las bandas secuenciadas se muestran en rojo. Líneas puntadas indican posibles intrones. Regiones celestes indican regiones homólogas a resabios de elementos móviles.

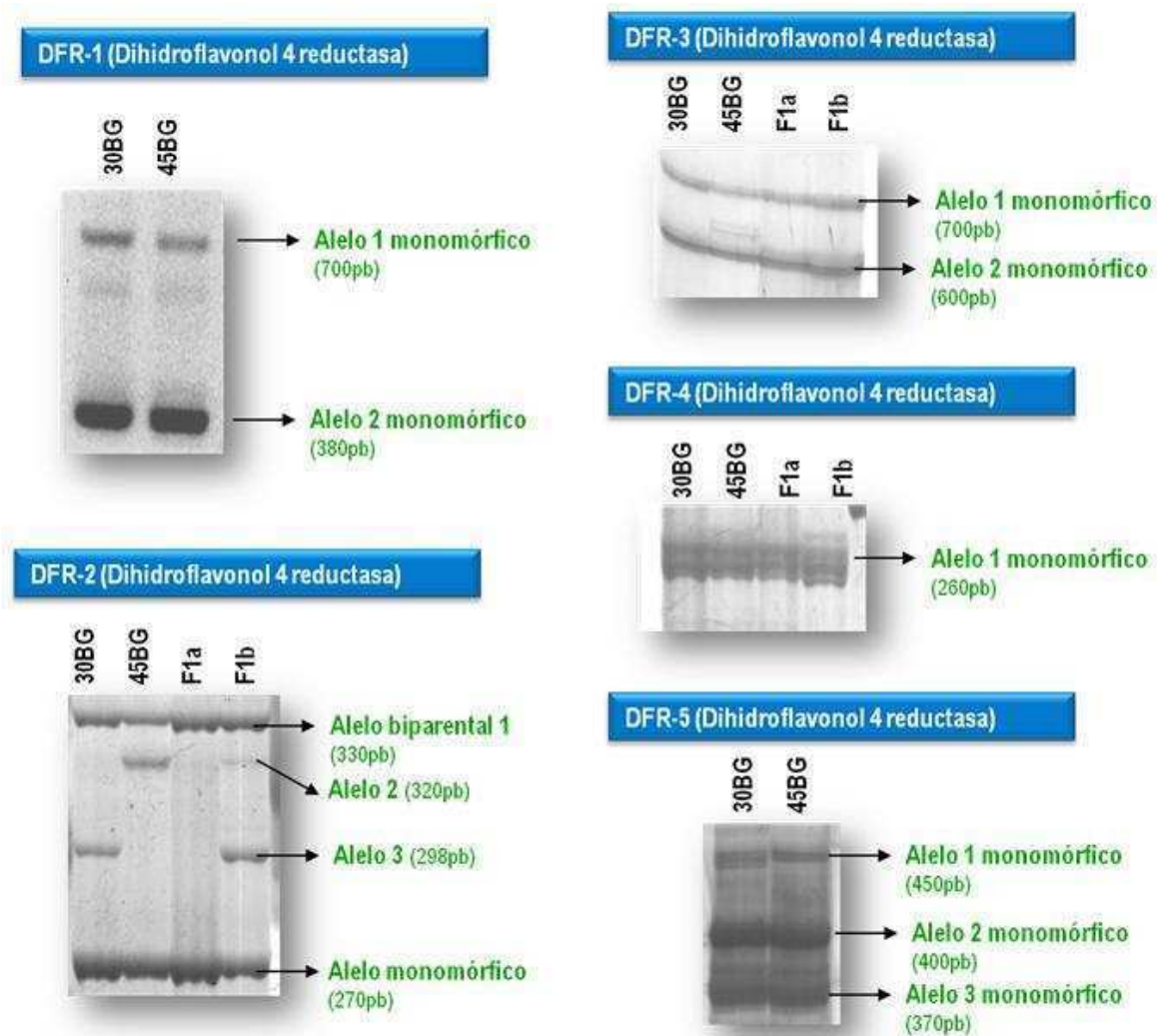


3.4 Dihydroflavonol 4 Reductasa (DFR)

Se cuenta con la secuencia completa del gen en *Ipomoea batatas* (gi:40056989), presenta 6 exones y una región 5'UTR de 2800 pares de bases. Fueron diseñados 5 pares de primers para evaluar los 5 intrones del gen. El tamaño de los intrones varía en un rango de 90pb a 560pb. En la figura 11 pueden verse los productos de amplificación generados. Si bien todos los marcadores generaron productos de amplificación dentro de los tamaños esperados, sólo se evidenció polimorfismo con el marcador del intrón 2. Diferentes bandas de cada marcador fueron secuenciadas a fin de constatar la identidad.

El análisis de secuencia de las bandas seleccionadas (de acuerdo a su reproducibilidad y factibilidad para su purificación), permitió confirmar la identidad de las mismas. A modo de resumen, podemos decir que cada marcador permitió amplificar los intrones y parte de los exones flanqueantes del gen Dihydroflavonol 4-reductasa. Se evidenció en algunos casos la presencia de elementos móviles ya descritos en *Ipomoea batatas* o en otras especies del género. Algunos de los elementos móviles se presentaron completos y localizados en el mismo lugar que informa la bibliografía como es el caso del MELS1 en el intrón2. Otros elementos presentan deleciones y posiblemente estén inactivos, como el MELS5 ubicado en el intrón 5. Algunos alelos presentan inserciones o deleciones importantes respecto a la secuencia de DFR-B de *Ipomoea batatas* y presentan mayor similitud con regiones del DFR-B de *Ipomoea nil*.

Figura 11. Alelos amplificados con los primers DFR1, DFR2, DFR3, DFR4 y DFR5. Se indican ambos parentales y en algunos casos progenies. Se señalan los alelos con sus pesos moleculares.

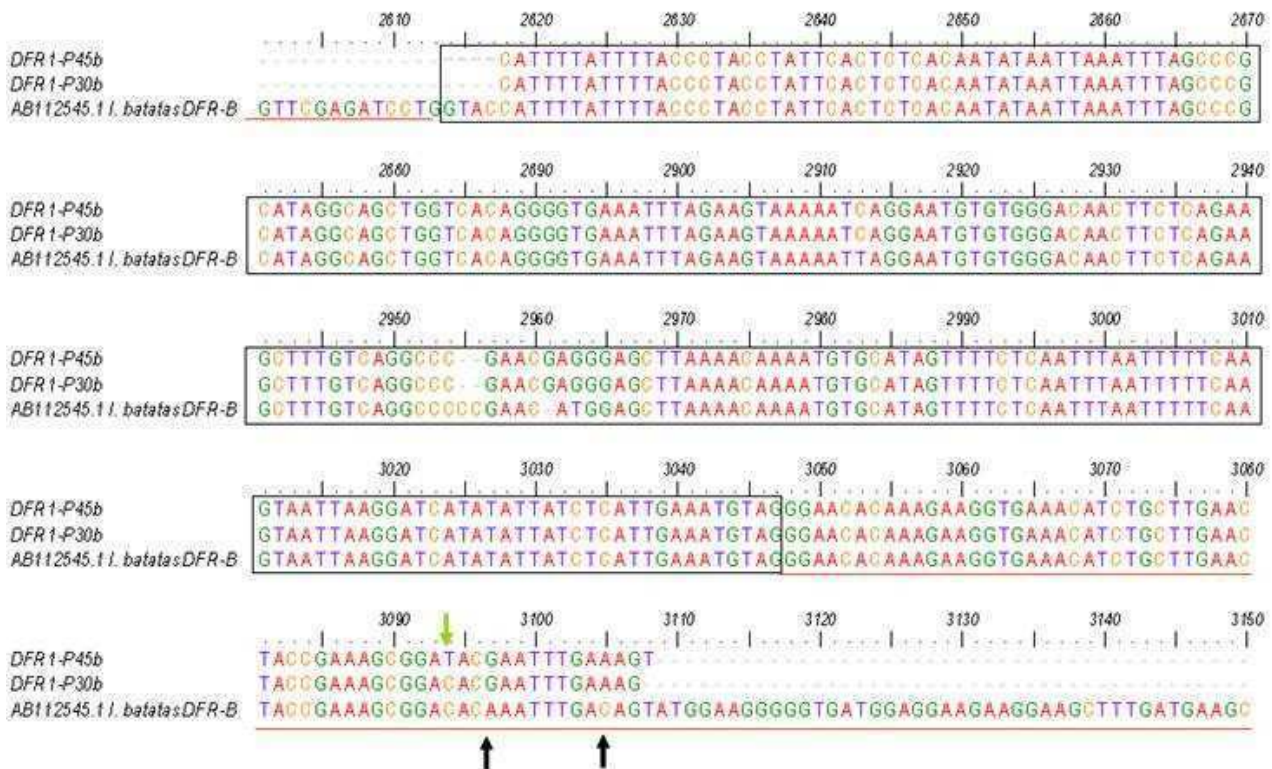


Evaluación del marcador DFR-1

Con este marcador se logró amplificar dos alelos monomórficos de 700pb y 380pb (ver figura 11). El tamaño esperado era de 382 pb. Ambos alelos fueron secuenciados para ambos parentales. Para el alelo 1 (700pb) fue posible secuenciar 179pb y 241pb para el padre 30BG y 45BG respectivamente. Los primeros 50 nucleótidos presentan homología con el intrón 1, el resto presenta similitud con el primer intrón de diferentes genes como el UF3GT (AY257207.1) (4e-31), el InNhx (AB055063.1) (4e-31) y una posible Glicosiltransferasa localizada en el contig S10 (3e-20) del locus S. Esta región presenta también similitud, al igual que otros genes analizados, con el elemento móvil Tpn101 (AB072271.1) (4e-05) descrito en *Ipomoea purpúrea*, *I. nil* e *Ipomoea tricolor*. Hasta el momento no ha sido descrito en *Ipomoea batatas*, Tanaka *et al.* 2004, no encuentra elementos móviles en el

intrón 1. Para el alelo 2 fue posible secuenciar 292pb y 281pb correspondiente al parental 30BG y 45BG respectivamente, accediendo al 77% de la secuencia. En ambos casos, el 100% de la secuencia presenta homología con el gen DFR-B de *Ipomoea batatas* (AB112545.1), con una identidad del 96% y e-value de $2e^{-134}$. La secuencia corresponde al intrón 1 completo y 60 pb de la región 5' del exón 2. En el alineamiento (Figura 12) con la secuencia disponible del gen DFR-B de *Ipomoea batatas*, fue posible detectar dos indels en la región del intrón: Dos deleciones de citocina en los nucleótidos 1955-1956 y una inserción de una guanósina.

Figura 12. Alineamiento de las bandas secuenciadas del primer DFR de ambos parentales con la secuencia disponible de *Ipomoea batatas*. En rojo corresponde a la región de homología con el exón 1 y 2. Recuadro corresponde al intrón 1. Flecha negra indican InDels. Flecha verde posible SNP.



Debido a que no se detectó polimorfismo en la longitud de secuencia, estos marcadores no serán utilizados en los análisis de mapeo. Sin embargo se detectó un cambio en la secuencia entre ambos parentales en la región codificante del exón 2 (flecha verde). Ese cambio de secuencia entre ambos parentales genera un nuevo sitio de restricción en el parental 45BG (BciVI) que puede ser utilizado para generar un nuevo marcador CAP para generar un sitio polimórfico que permita su inclusión en un mapa de ligamiento.

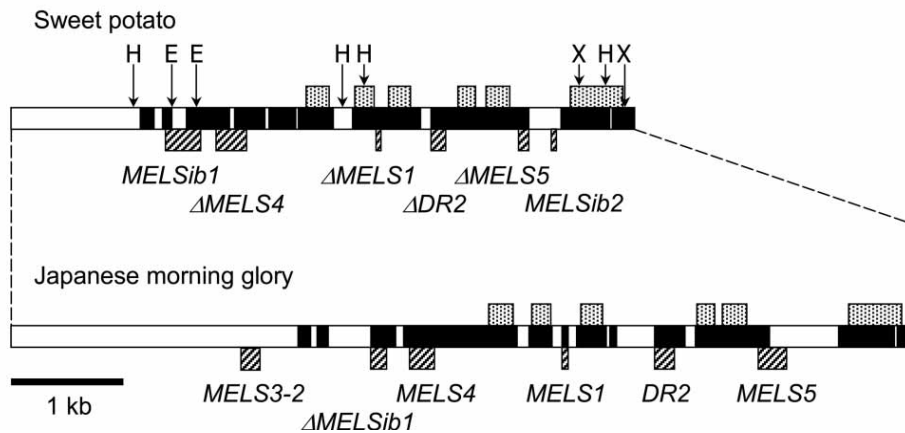
En genes que presentan familias génicas, la localización de cada alelo amplificado resulta central para definir con exactitud si los alelos pertenecen al mismo locus o estamos amplificando alelos que pertenecen a diferentes genes de la familia.

Evaluación del marcador DFR-2

Este marcador amplificó 4 alelos, dos polimórficos, uno biparental y uno monomórfico. De los dos alelos polimórficos sólo el proveniente del parental 30BG pudo ser secuenciado junto al resto de las bandas. El alelo 3 de 298 pares de bases, presenta una segregación 1:1 y fue posible secuenciarlo casi en su totalidad: 261pb. Abarca el intrón 2 completo y 59 pb del exón 3 (30%). En *Ipomoea batatas*, el intrón 2 presenta 180pb. La secuencia presenta alta homología con el gen DFR-B de diferentes *Ipomoeas* (*I. batatas*, *I. nil*, *I. tricolor*, *I. purpúrea*). Se observa en la región correspondiente el intrón 2 la presencia del elemento MELS1 descrito en *Ipomoea nil* e *Ipomoea batatas*. Es interesante notar que el elemento se presenta completo, tal como fue descrito en *Ipomoea nil* con 55pb y no con deleciones como fue observado en las batatas analizadas por Tanaka *et al.* 2004. Además identifica las características estructurales de los intrones y regiones intergénicas del gen DFR en *Ipomoea batatas* comparándolo con *Ipomoea nil*. Detecta principalmente elementos móviles con una repetición invertida miniatura (MITEs). Los MITEs son pequeños transposones ADN no autónomos de unos 500pb que presentan pequeñas repeticiones terminales invertidas (TIRS) y duplicaciones en el sitio target (TSDs) de 2 o 3 pb. En el gen DFR-B de Japanese morning glory se detectaron 4 secuencias tipo MITEs, denominadas MELS1, MELS3, MELS4 y MELS5, así como una repetición directa (DR) en los intrones y regiones intergénicas. Las características estructurales de los MELS son similares a los MITEs. En la Figura 13, se observan elementos móviles en *Ipomoea batatas* encontrados en posiciones idénticas que en *Ipomoea nil*.

Esta observación indica que estos elementos se han transpuesto dentro del gen DFR-B antes de la divergencia de ambas especies. Sin embargo en batata, todos los elementos presentan deleciones y sustituciones de bases, sugiriendo que se encuentran inactivados.

Figura 13. Análisis estructural del gen DFR-B en *Ipomoea batatas* e *Ipomoea nil* con énfasis en la localización de elementos móviles Los delta (Δ) indican elementos con deleciones. Tanaka *et al.* 2004.



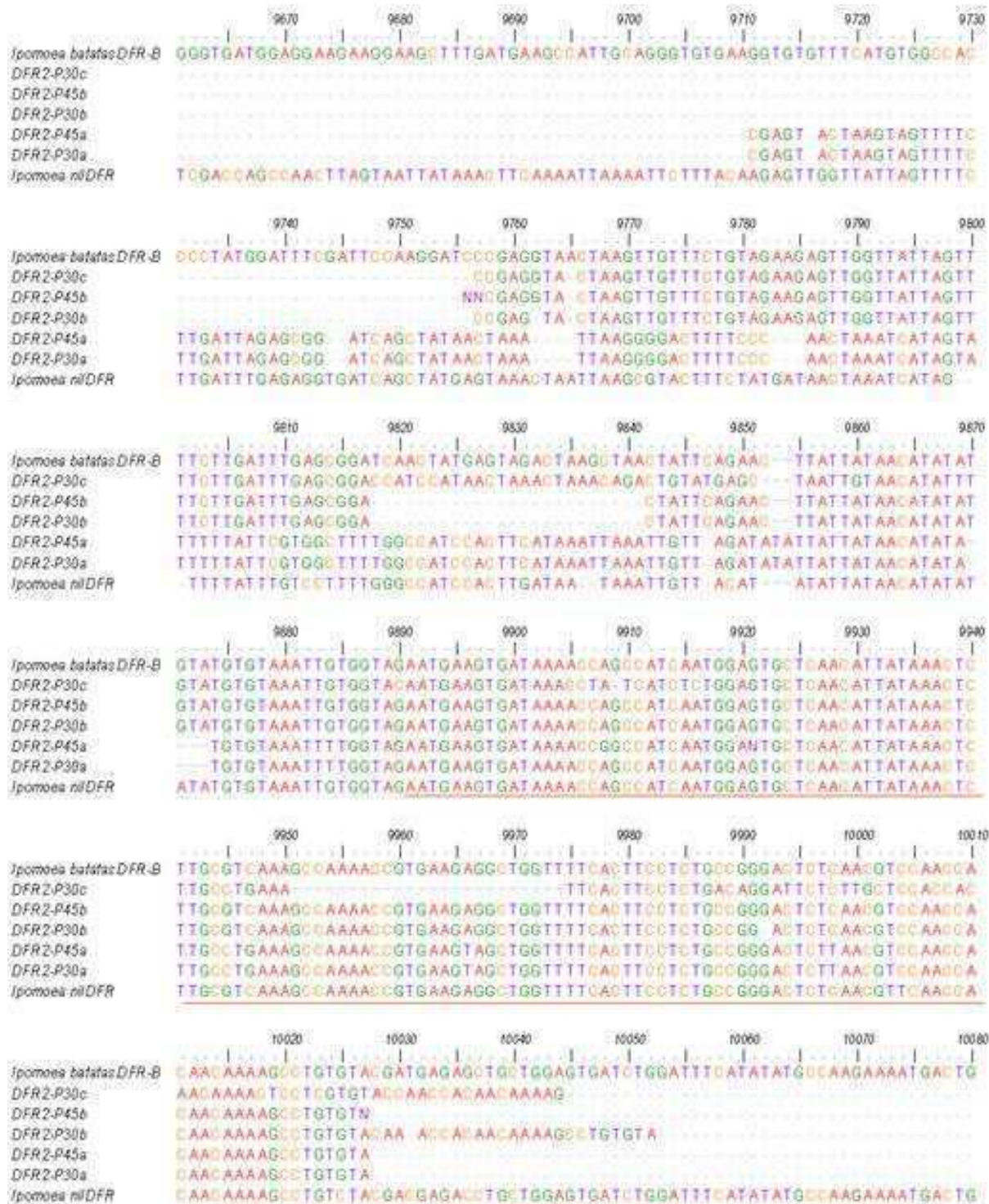
El alelo 1 (a) por otra parte, también presenta homología con la región del intrón 2 y parte del exón 3, pero presenta una inserción de 60pb con respecto al DFR-B de *Ipomoea batatas*. Cuando se analizan los genes DFR-B de *Ipomoea batatas* e *Ipomoea nil*, también se observa una inserción similar en *Ipomoea nil*. El alelo analizado presenta mayor nivel de similitud con la secuencia de esta última (89% e-value de $8e^{-91}$) que con *Ipomoea batatas* ($2e^{-72}$). En la figura 14 puede observarse en el alineamiento de secuencia la alta similitud correspondiente al exón 3 y la gran variabilidad en la región del intrón.

Es interesante notar que en todas las secuencias analizadas la homología es con el gen DFR-B y no con los otros dos genes de la familia como el DFR-A y DFR-C que se encuentran en un arreglo en tandem. En otras especies, solo fue descrita una copia del gen DFR, como en Arabidopsis, avena, arroz y tomate y copias múltiples en otras especies como Gerbera y Rosa (Inagaki *et al.* 1999). Si bien en *Ipomoea* se describieron como localizadas en tandem, en algunas líneas de maíz las dos copias no se encuentran ligadas, al igual que en petunia donde las tres copias no se encuentran en un arreglo en tandem.

Los tres genes DFR descritos en *Ipomoea nil* presentan seis exones con idéntica posición de los intrones. En las otras especies analizadas como Arabidopsis, petunia y conejito, también se observa una posición idéntica de los intrones y seis exones.

El alelo 3 (c) presenta alta identidad ($9e^{-103}$) con el DFR-B de *Ipomoea batatas*, pero presenta una deleción de 24pb en el intrón a los 9950 pares de bases.

Figura 14. Alineamiento de las bandas secuenciadas con el segundo intrón del gen DFR de *Ipomoea batatas*. Se observan las inserciones y deleciones. En rojo el exón3.

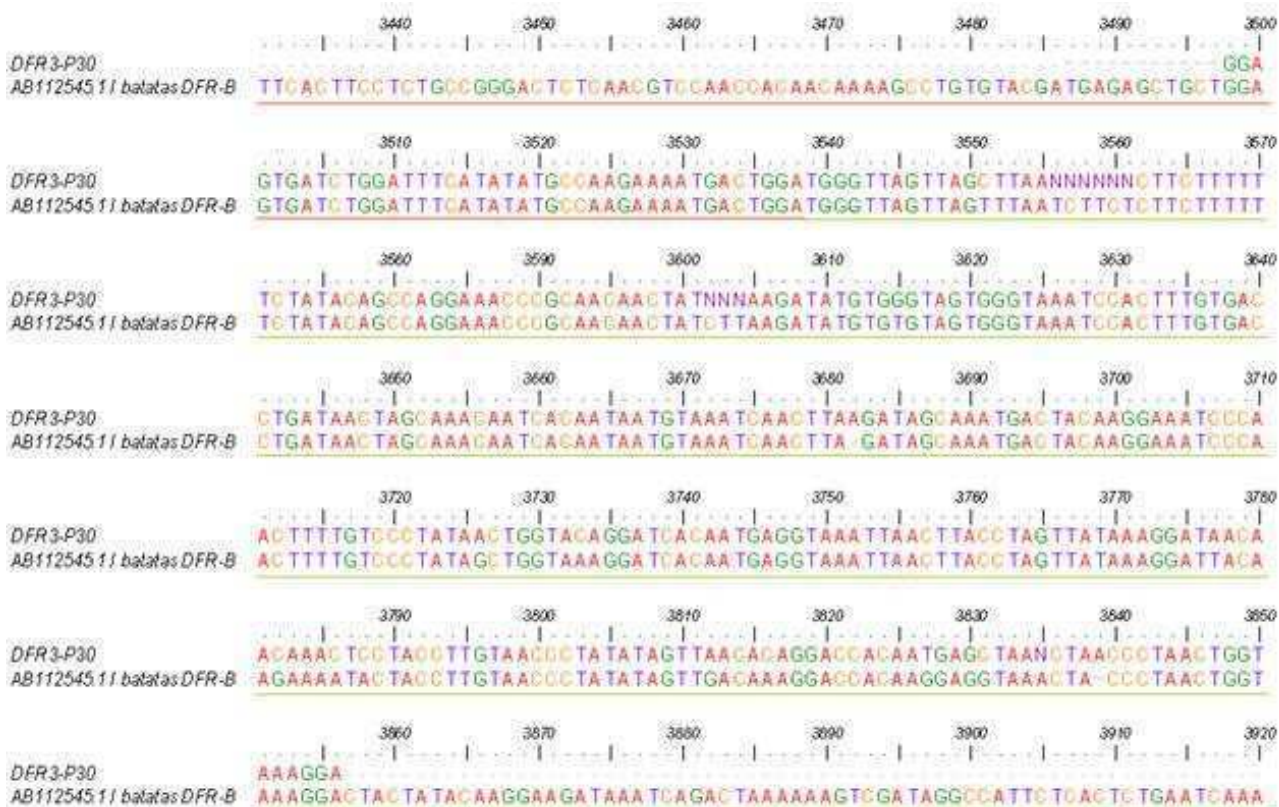


Evaluación del marcador DFR-3

Se evaluó sólo el alelo del parental 30, ya que el otro presentaba muy mala calidad. El alelo del parental 30BG fue analizado y fue confirmada su identidad; presenta alta homología con el gen DFR-

B de *Ipomoea batatas* ($2e^{-99}$). La secuencia abarca 43pb del exón 3 y 333pb del intrón. El intrón 3 en *Ipomoea batatas* no presenta elementos móviles descritos hasta el momento y tiene 420pb. Varios cambios de secuencia (8) y dos InDels fueron detectados entre ambas secuencias en el intrón.

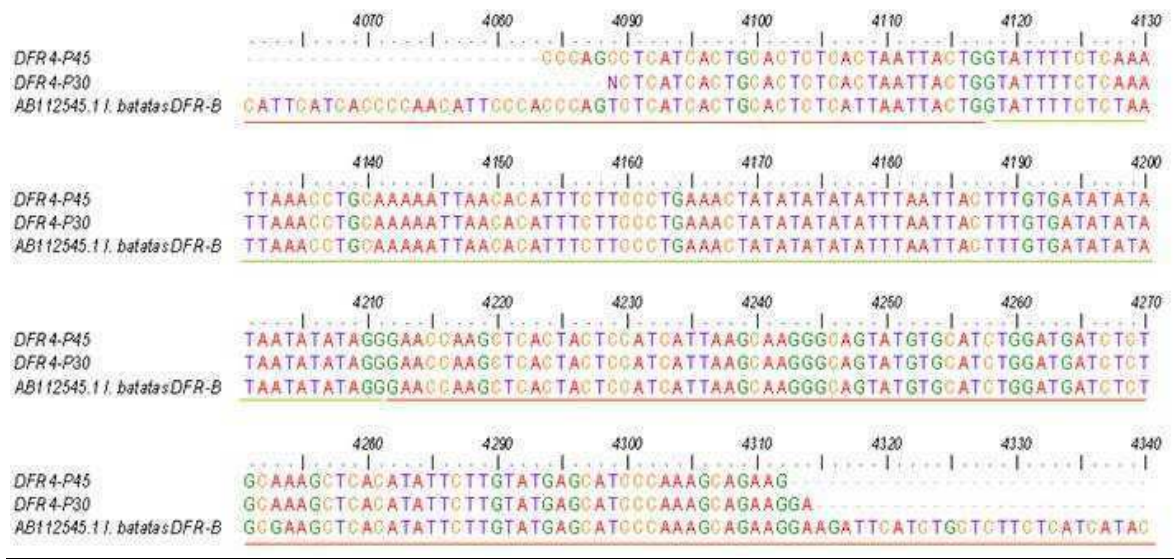
Figura 15. Alineamiento del alelo polimórfico del parental 30BG con el tercer intrón del gen DFR de *Ipomoea batatas*. Se observan las inserciones y deleciones. En rojo: exón 3 y en verde intrón 3.



Evaluación del marcador DFR-4

El marcador DFR-4 amplificó un alelo monomórfico de 260pb. Se secuenció y confirmó la identidad para ambos parentales. La misma corresponde al intrón 4 completo y parte de los exones flanqueantes con alta homología con el gen DFR-B de *Ipomoea batatas* ($1e^{-102}$ y 96% de identidad). No se observó ningún elemento estructural. No se observaron cambios de secuencia entre los genotipos parentales.

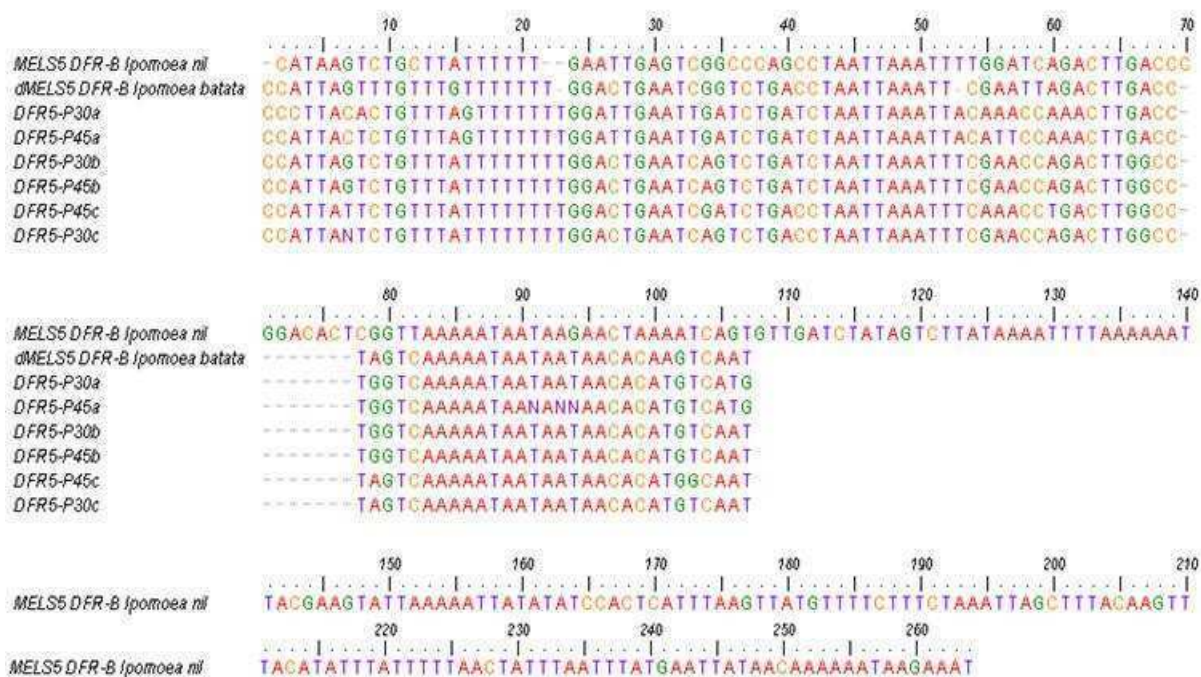
Figura 16. Alineamiento de las bandas secuenciadas del cuarto intrón del gen DFR de *Ipomoea batatas*. Se observan en rojo los exones 4 y 5. En verde se indica el intrón.



Evaluación del marcador DFR-5

Este marcador tampoco presenta polimorfismo entre los parentales analizados. Fueron amplificados 3 alelos de 450pb, 400pb y 370pb. La secuenciación indica que los alelos amplificados corresponden a la región 3' del exón 5 y parte del intrón 5. Todos los alelos presentan un elemento móvil denominado MELS5 de la familia de los MITEs que fue descrito por primera vez en el intrón 5 del gen DFR-B en *Ipomoea nil* (Inagaki *et al.* 1999). MELS5 presenta una longitud de 251pb flanqueado por una duplicación de 3pb en el sitio de inserción. Este elemento fue hallado posteriormente por Tanaka *et al.* 2004 en *Ipomoea batatas* pero con una importante delección de la región 3' y una pequeña delección de 8pb localizada a 70pb río abajo del inicio del elemento móvil con una longitud total de 91 pb. El alineamiento múltiple con los elementos MELS5 de *Ipomoea batatas* e *Ipomoea nil* permite visualizar que los alelos secuenciados también presentan ambas delecciones. También se observan algunos cambios de base. La inserción de este elemento móvil fue anterior a la especiación entre estas dos *Ipomoeas*. Los alelos "c" presentan la mayor similitud con la secuencia de *Ipomoea batatas*, mientras que los otros muestran mayor variabilidad.

Figura 17. Alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a MELS5 en *Ipomoea nil* (AB006793), *Ipomoea batatas* (AB112545) y alelos secuenciados.



El análisis estructural de los alelos se muestra en la figura 18. El alelo “c” (370pb) presenta además una inserción de 5pb localizada previa al elemento móvil MELS5 y una delección de 27pb río abajo. Se observan numerosos cambios de bases.

Figura 18. Estructura del DFR-B intrón 5. En verde *Ipomoea batatas*. En violeta se presentan las tres alelos secuenciados y el bloque naranja representa la localización del elemento móvil MELS5 delecionado presenta en todos los casos.

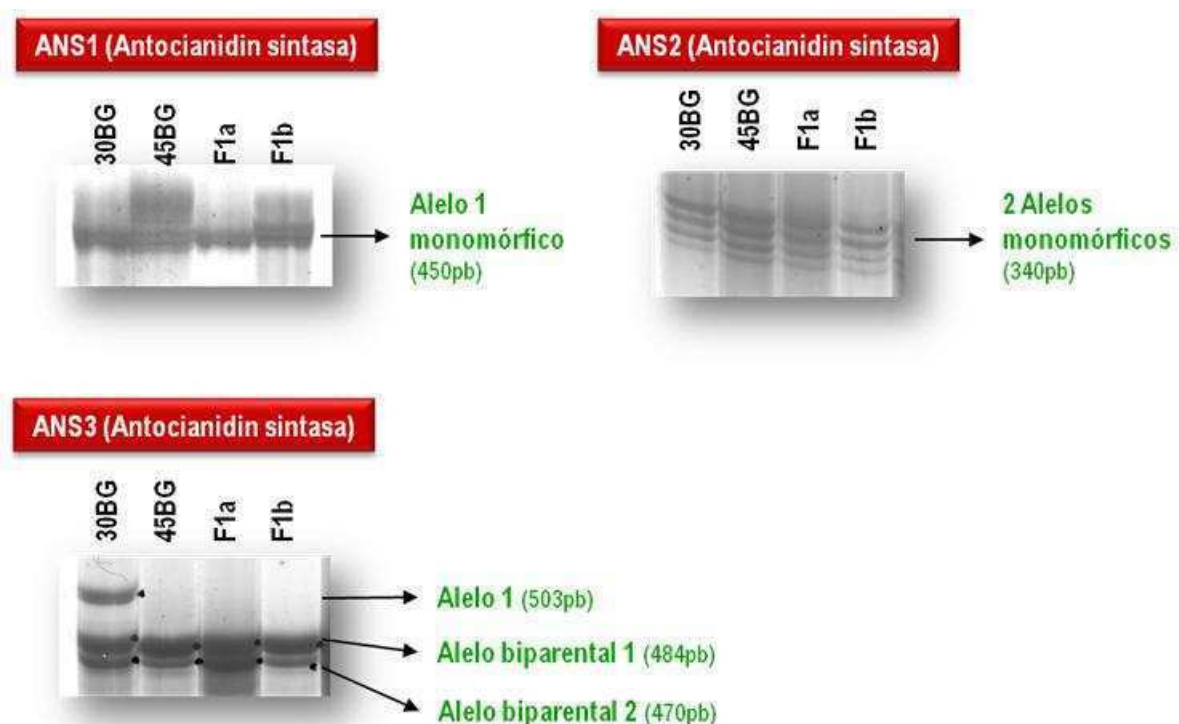


3.5 Antocianidin Sintasa (ANS)

La secuencia completa del gen **Antocianidin Sintasa (ANS)** (EC:1.14.11.19) se encuentra disponible para *Ipomoea nil* e *Ipomoea trifida*, mientras que para *Ipomoea batatas*, la secuencia corresponde al mRNA (AB023787.1). Este gen presenta dos exones de 500pb cada uno y un intrón de 900 pares de

bases. El alineamiento entre *Ipomoea nil*, *I. trifida* y *I. batatas* muestra alta homología de secuencia y permitió definir los posibles exones en *Ipomoea batatas*. Si bien es un único intrón, para poder generar alelos de tamaños pequeños, fueron diseñados tres marcadores para abarcar el intrón completo. En la siguiente figura (19) pueden observarse que todos los marcadores generaron productos de amplificación. Exceptuando el marcador ANS1 que presentó un tamaño mayor al esperado, los otros dos marcadores generaron alelos acorde a lo registrado. ANS2 generó dos alelos muy cercanos monomórficos de 340pb. Sólo el marcador ANS3 resultó polimórfico: un alelo presente solamente en el parental 30BG y dos alelos biparentales.

Figura 19. Alelos amplificados con los primers ANS1, ANS2 y ANS3. Se señalan los alelos con sus pesos moleculares.



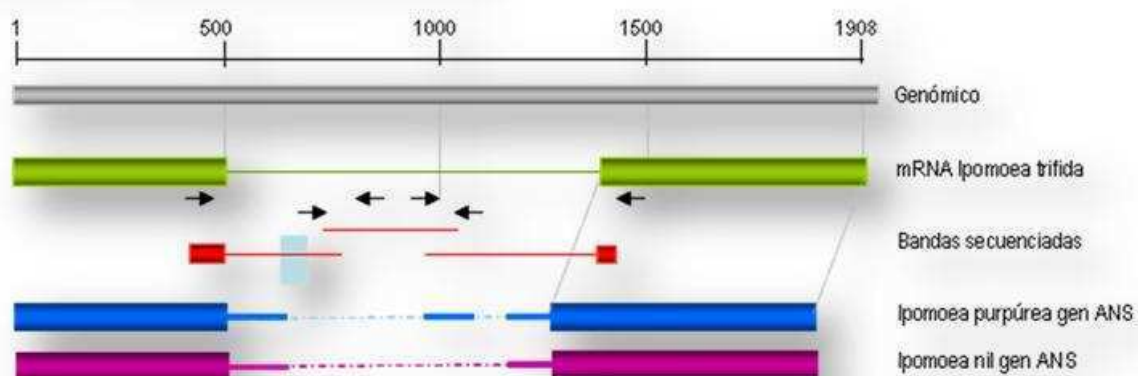
Fueron analizadas los dos alelos monomórficos del ANS1 y ANS2 así como los tres alelos del ANS3. Todos los alelos analizadas presentan alta homología (e-value entre 0 y $9e^{-114}$) con el gen ANS de *Ipomoea trifida* así como con los mRNA de *Ipomoea batatas*. Superponiendo las secuencias amplificadas con los tres marcadores fue posible obtener las regiones flanqueantes al intrón y la secuencia completa del mismo. El intrón presenta 870pb, la misma longitud observada en *Ipomoea trifida* (Figura 20bis). También muestra la misma secuencia a excepción del alelo polimórfico aportado por el marcador 3, que presenta una inserción de 35 pb. Esta inserción no exhibe similitud

con ninguna secuencia del banco de datos. El alto nivel de homología observado es esperable, dado que *Ipomoea trifida* es considerada uno de los progenitores de *Ipomoea batatas* (Srisuwan *et al.* 2006; Huang & Sun 2000; Rajapakse *et al.* 2004). En el intrón fue posible detectar resabios de elementos móviles: en la región 5' del intrón se detectó 171pb que corresponden a un fragmento del elemento móvil denominado MELS6-4 descrito anteriormente en el intrón del gen CHS-E de *Ipomoea purpurea* (Johzuka-Hisatomi *et al.* 1999) con 307pb ($4e^{-29}$), además 79pb de esa misma región fueron descritas como un elemento móvil delecionado (δ MELS6-8) de 214pb localizado en un intrón del gen F3'H de *Ipomoea tricolor*.

Figura 20. Estructura del gen ANS para *Ipomoea trifida*, *I. nil* e *I. purpurea*. Alineamiento y zonas de homología. Se describen con flecha negra la localización de los primers desarrollados y las líneas rojas corresponden a las secuencias obtenidas.

Ipomoea trifida gen parcial Antocianidin sintasa (ANS)

AY257212.1 gi32441920 (1908 pares de bases)



Un análisis comparativo de la estructura y secuencia del intrón de *Ipomoea trifida* permite evidenciar que únicamente la región 5' y 3' del intrón muestra similitud con otras ipomoeas como *I. purpurea* (AY257211.1), *I. nil* (AB073924.1) e *I. heredacea* (AY257210.1). En el caso de *I. purpurea* también presenta similitud con una región de 189pb ubicado entre los 599pb y 788pb (línea continua azul en la figura 20). El intrón de estas especies son de 742pb para *I. purpurea* y 794pb para las dos últimas, algo menor que la observada en *I. trifida* (870pb).

Figura 20bis-a Alineamiento múltiple marcador ANS1. mRNA de *Ipomoea batatas*, gen completo de *Ipomoea trifida* y secuencia correspondiente al marcador ANS1. En rojo corresponde al exón 1 y en verde el intrón 1.

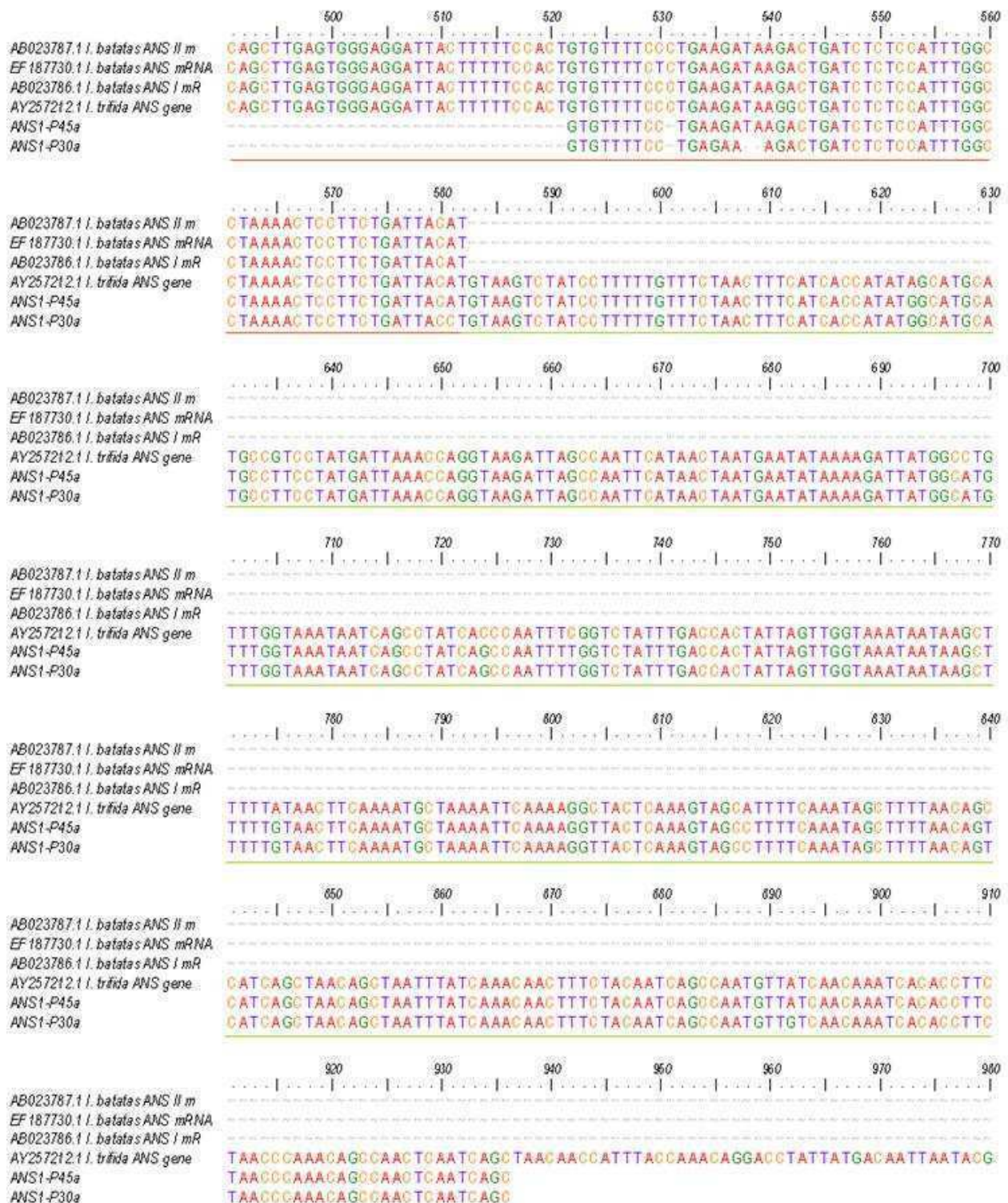


Figura 20bis-b Alineamiento múltiple marcador ANS1. mRNA de *Ipomoea batatas*, gen completo de *Ipomoea trifida* y secuencia correspondiente al marcador ANS1. En rojo corresponde al exón 1 y en verde el intrón 1.

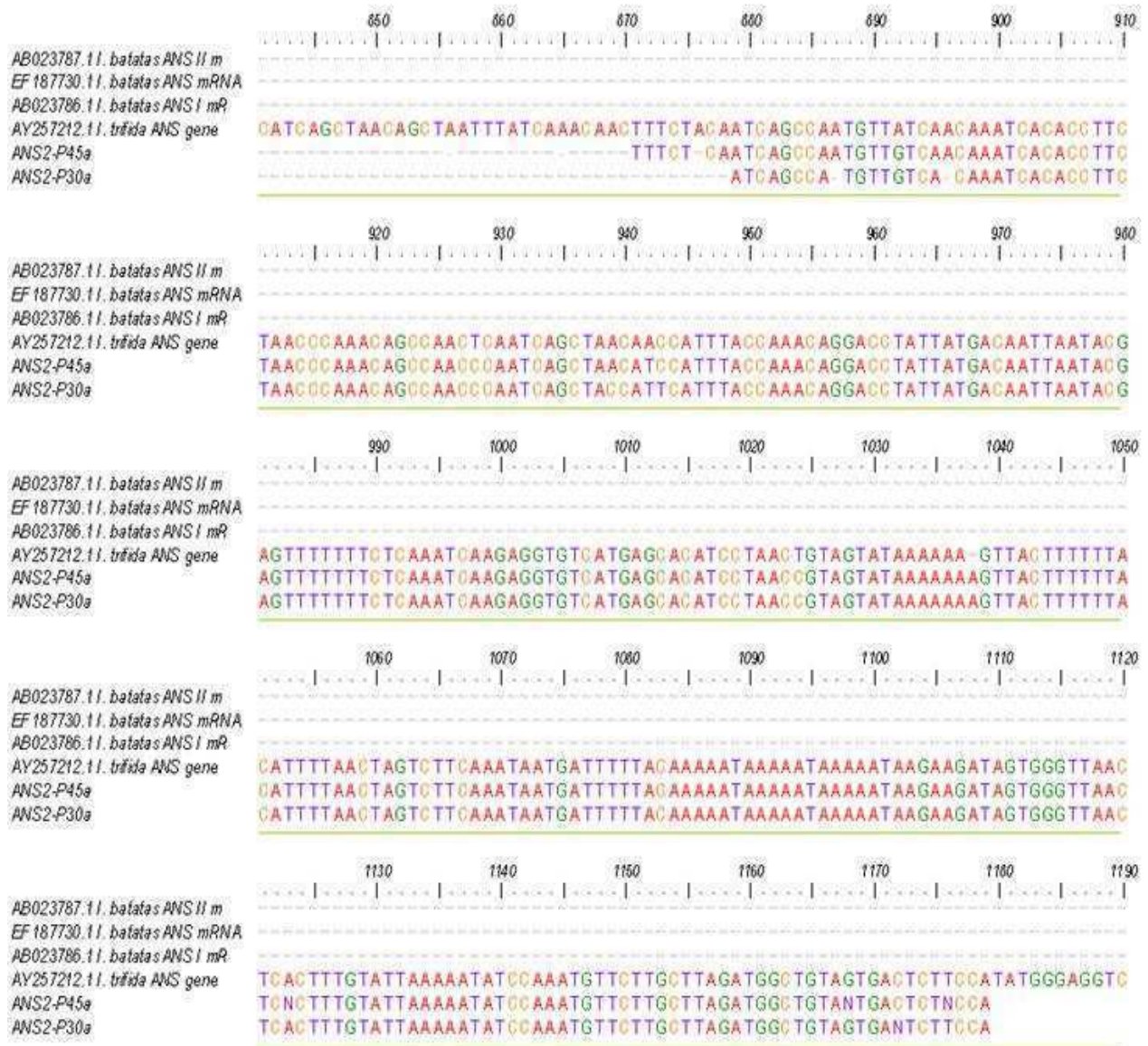
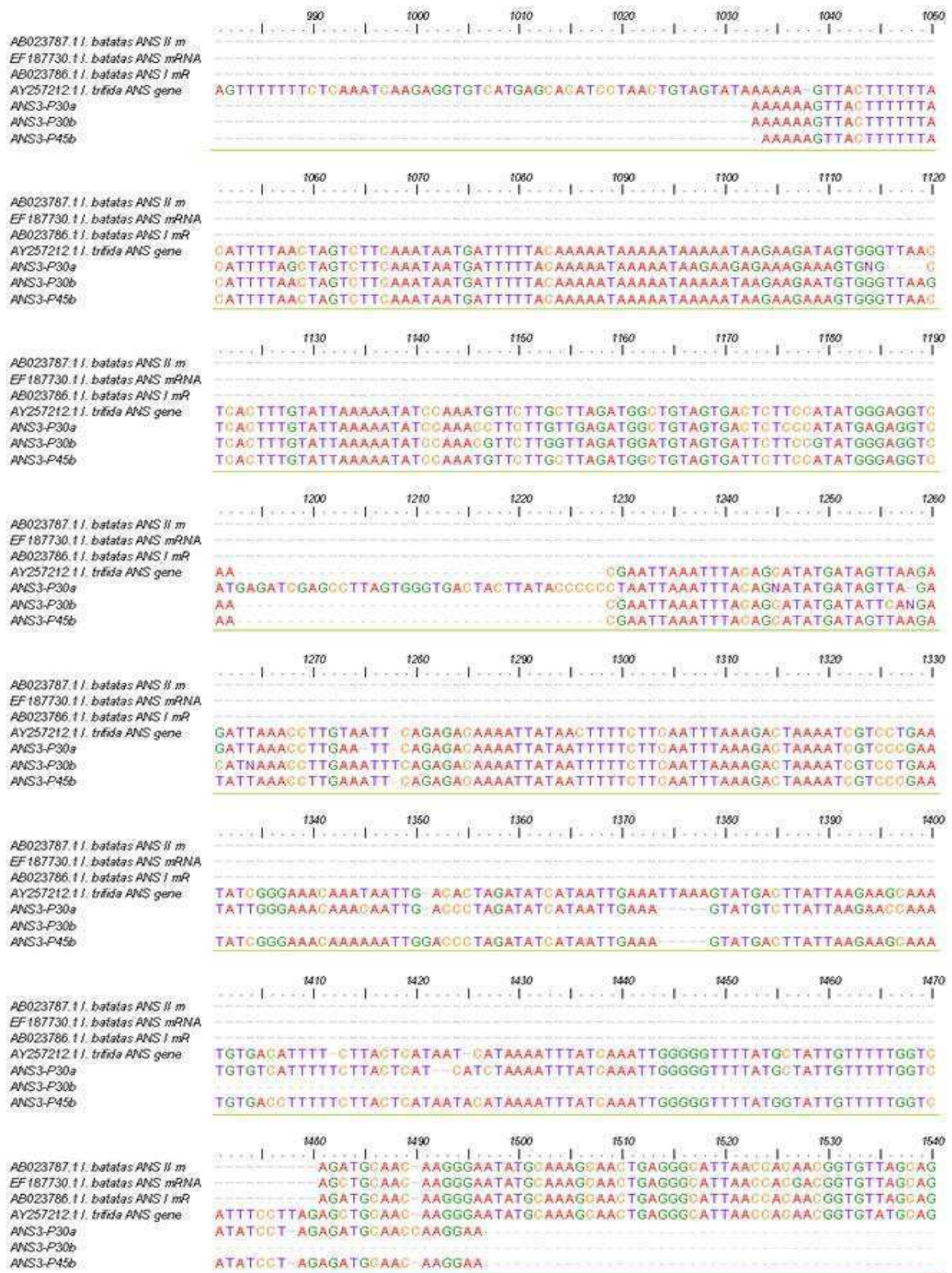


Figura 20bis-c Alineamiento múltiple marcador ANS1. mRNA de *Ipomoea batatas*, gen completo de *Ipomoea trifida* y secuencia correspondiente al marcador ANS1. En rojo corresponde al exón 1 y en verde el intrón 1.

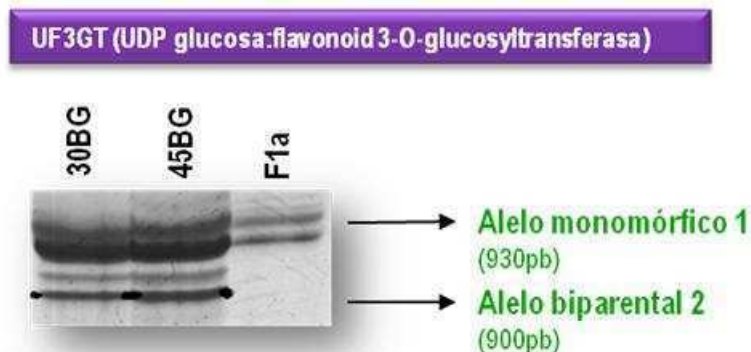


Los marcadores diseñados permitieron obtener la secuencia completa del intrón del gen ANS para *I. batatas*, donde se evidencia alta homología con su progenitor *I. trifida* y la presencia de residuos de elementos móviles ya descritos dentro del género. Además, se obtuvo un alelo con polimorfismo, con una tasa de segregación 1:1, que permite su uso en mapeo.

3.6 UDP glucosa: flavonoid 3-O-glucosyltransferasa (UF3TG)

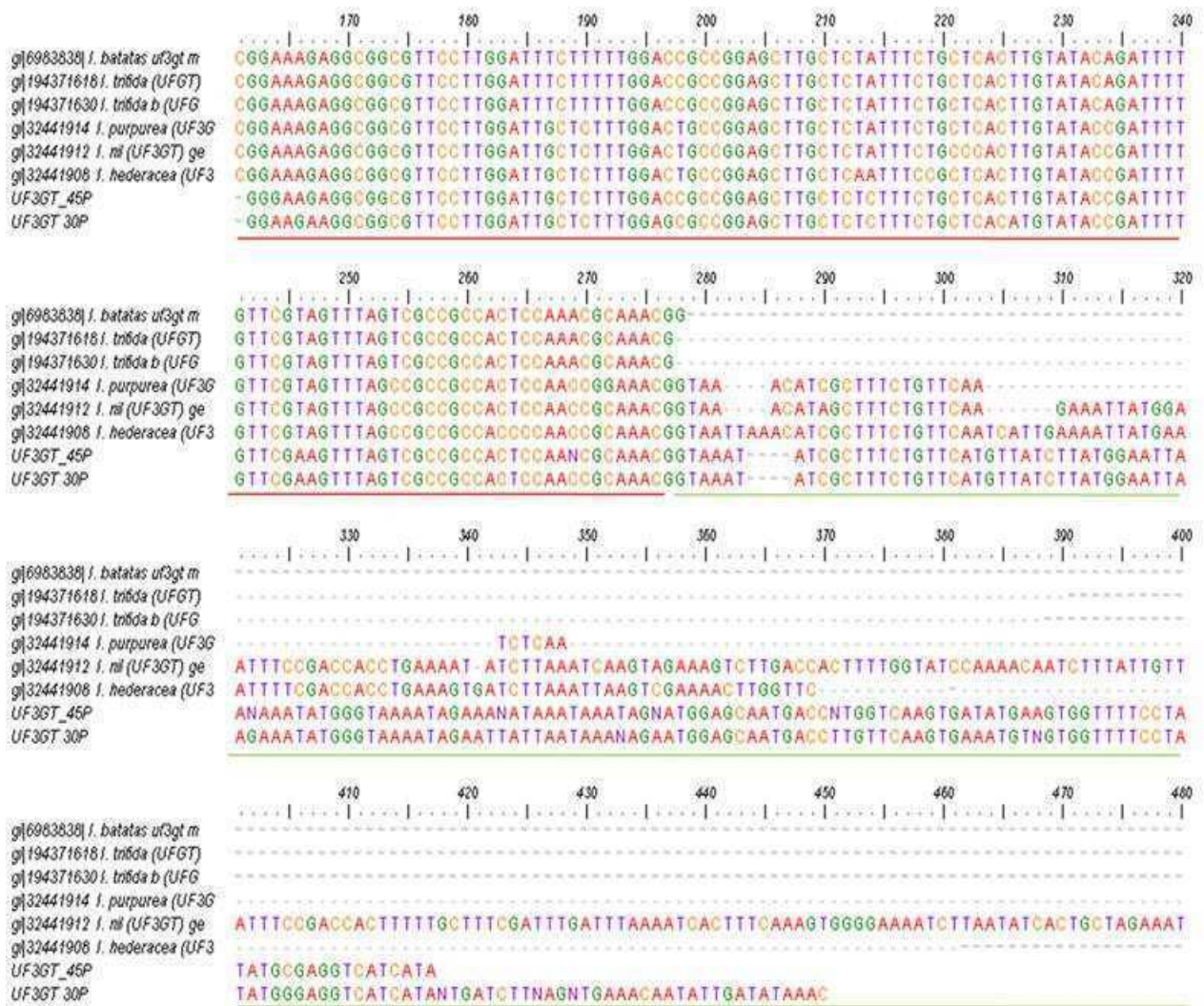
El alineamiento de secuencia entre el mRNA de *Ipomoea batatas* (AB038248.1) e *Ipomoea trifida* (AY257207.1) permitió definir los posibles exones y el diseño de marcadores que permitan la amplificación del intrón. El tamaño de banda esperada era de 181pb más la región correspondiente al intrón. Tomando como referencia el intrón de *Ipomoea trifida*, la banda esperada rondaría los 930pb.

Figura 21. Alelos amplificados con el marcador UF3GT. Se señalan los alelos con sus pesos moleculares. Parentales y una progenie.



Se observaron dos alelos del tamaño esperado, uno monomórfico de 930pb y un alelo biparental (900pb). De la secuenciación del alelo biparental se obtuvieron secuencias de 290pb y 260pb. El análisis de identidad confirma que el fragmento corresponde al gen UF3GT. La secuencia abarca el exón 1 y parte del intrón. La región correspondiente al exón presenta 90% de identidad con la secuencia de *Ipomoea trifida* y muy alta identidad con *Ipomoea batatas*, *I. purpúrea*, *I. nil* e *I. heredácea*. Sin embargo, en el intrón exceptuando los primeros 60 nucleótidos que presentan alta homología, el resto de la secuencia es completamente diferente. En *Ipomoea batatas*, el intrón del gen F3H presenta por lo menos 180pb.

Figura 21b. Alineamiento de secuencia de genes y mRNAs UF3GT.

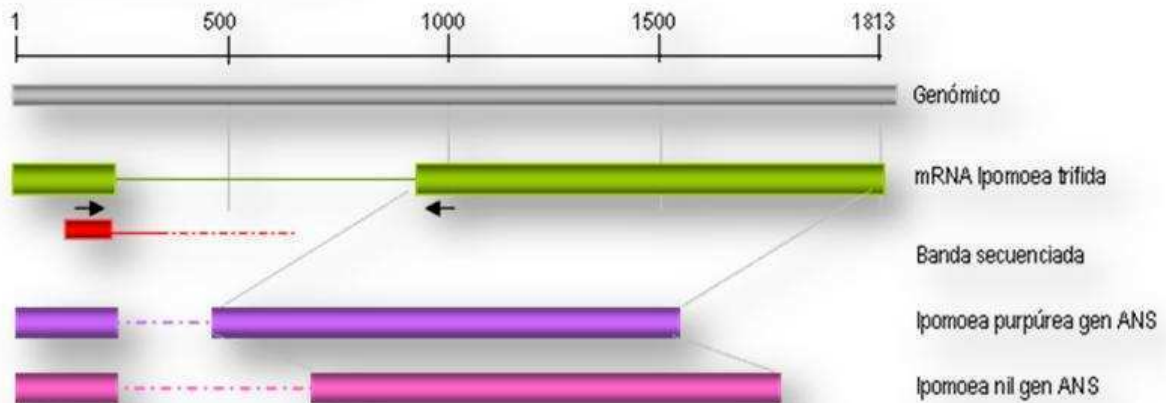


Es interesante notar que en el caso del gen analizado anteriormente la homología entre *Ipomoea batatas* e *I. trifida* se mantenía a lo largo de todo el gen, incluido el intrón completo. En este caso, no hay similitud con ninguna región del intrón de *Ipomoea trifida*, pero sí con *I. purpurea*, *I. nil* e *I. hederacea*, aunque solo en la región 5'. El análisis de secuencia y longitud del intrón entre las *ipomoeas* disponibles, muestra una gran variación intra género: mientras que *Ipomoea trifida* presenta un intrón con 746pb, *Ipomoea nil* tiene 408pb, *Ipomoea purpurea* solo 77pb y finalmente *Ipomoea hederacea* con 264pb.

Figura 22. Estructura del gen UF3GT para *Ipomoea trifida*, *I. nil* e *I. purpúrea*. Alineamiento y zonas de homología. Se describen con flecha negra la localización de los primers desarrollados y las líneas rojas corresponden a las secuencias obtenidas.

***Ipomoea trifida* UDP glucosa:flavonoid 3-O-glucosiltransferase (UF3GT)**

AY257207.1 (1813 pares de bases)



También se observan algunos cambios de secuencia que generan modificaciones aminoacídicas. Este gen es el último de los genes estructurales en la ruta de síntesis de las antocianinas. Rausher (2006) detecta el mayor nivel de sustituciones en este gen que en los ubicados al inicio de la ruta. Esta observación es válida para otras rutas, en donde los primeros genes de las rutas presentan mayor presión de selección, principalmente debido a que aportan productos a diferentes ramas, mientras que los últimos genes están involucrados en la síntesis de productos más específicos. Es interesante destacar que se ha observado en algunas especies que el bloqueo funcional de algunas enzimas por mutaciones no afecta el fenotipo, ya que esa reacción es reemplazada por otra enzima. El alelo biparental presenta una segregación 3:1, que permitirá utilizarlo para mapeo.

Para finalizar se presenta la tabla 2, donde se detallan los marcadores diseñados para cada gen de la ruta de síntesis de antocianina, el número de acceso del NCBI que fue utilizado para el diseño de los mismos y finalmente la secuencia de los 15 pares de primers.

Tabla 2. Marcadores desarrollados de los genes de síntesis de antocianinas

Gen	Numero acceso NCBI	Secuencia Primers (5'-3')	
UF3GT	AB038248.1	F_UF3GT1	GACGGATTCGTTTCTGTGGT
		R_UF3GT2	TTTCAGCTTCTGGTCCAACC
CHS (Chalcona Sintetasa)	gi:4512594	F_CHS-D2	AACTGCGTCAACCAAAGCACCT
		R_CHS-D3	AAGCTTCGGCACCTCCACCA
CHI (Chalcona Isomerasa)	gi:19223827	F_CHI1	CCGAAGTCAAAGTGGAGAGC
		R_CHI2	TTTTCCCGTTCCACTTAACG
		F_CHI3	GGATTCCGTCCAATTTTTCA
		R_CHI4	GGTGGGAACATTTGGTCACT
		F_CHI5	CGATGCAGAGAGCAAAGCTA
		R_CHI6	CTTTGCTTCAGGGGAAACAC
F3H (Flavonona 3 hidroxirasa)	gi:119394508	F_F3H1	GGGATCTTTCAGGTGGTTGA
		R_F3H2	AATAGTCCCTTGCCCTCACC
		F_F3H3	CCTAAAACGCCACACAGACC
		R_F3H4	AGTTCACCACCGCTTGATG
DFR (Dihidroflavonol 4-Reductasa)	gi:40056989	F_DFRin5a	CCATCCATGGTTTAGCGGAGATG
		R_DFRin5a	CATTTGCCACAAGCGGGTTAGCT
		F_DFRin4	CACTAGTGGTTGGCCATT
		R_DFRin4	CCTTCTGCTTTGGGATGCTCAT
		F_DFRin3	CAACGTCCAACCACAACAAAAGCCTGTG
		R_DFRin3	TGTTGGGGTGATGAATGGGCCAACCACT
		F_DFRin2	ATGTGGCCACCCCTATGGA
		R_DFRin2	ACACAGGCTTTTGTGTGGTTGGA
		F_DFRin1	AACGAGGCTACCATGTTACGC
R_DFRin1	TTCACACCCTGCAATGGCT		
ANS (Antocianidin Sintasa)	gi:4512586 gi:32441920	F_ANS1	ATGCTAGTGGGCAGCTTGAGT
		R_ANS1	GCTGATTGAGTTGGCTGTTTGGGT
		F_ANS2	ACAGCCATCAGCTAACAGCT
		R_ANS2	TGGAAGAGTCACTACAGCCATCT
		F_ANS3	AGGTGTCATGAGCACATCCT
		R_ANS3	ACCGTTGTGGTTAATGCCCTCAG

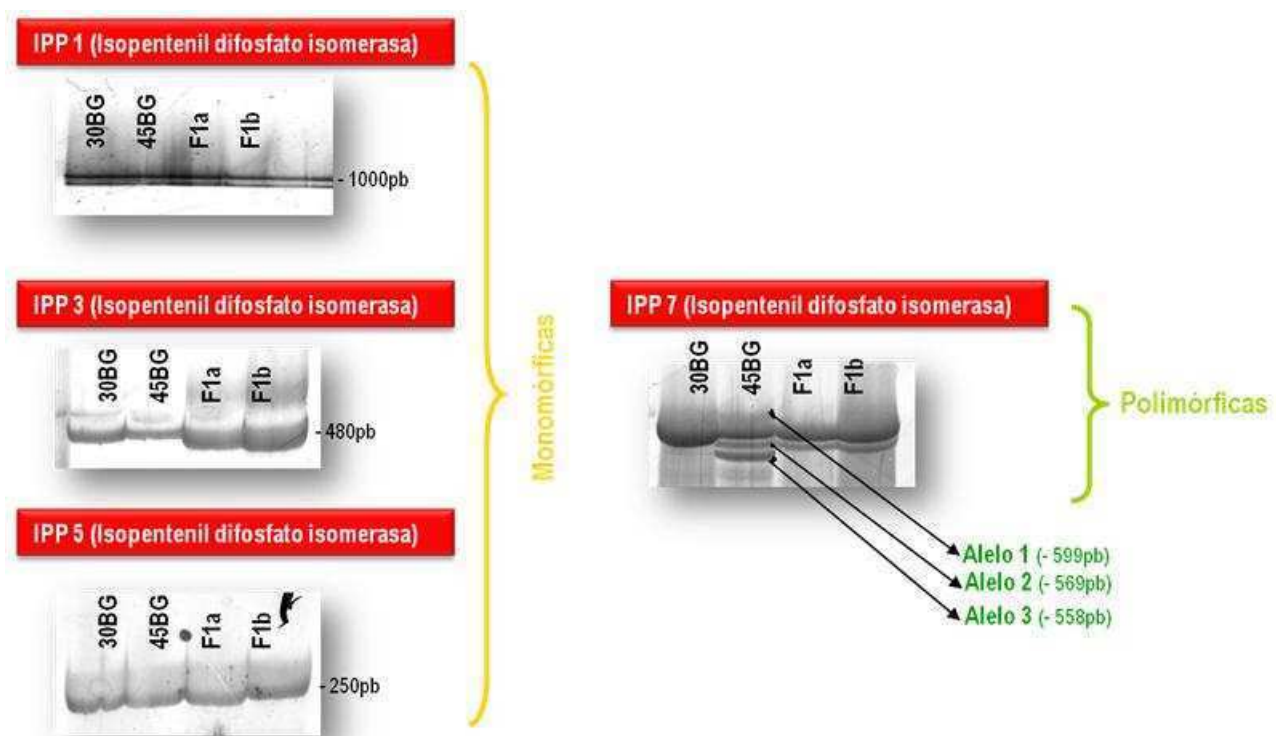
4. Carotenos

4.1 Isopentenil Difosfato Isomerasa (IPI-IPP)

Para el diseño de primers se trabajó con la secuencia de mRNA de *Ipomoea batatas* (DQ150100.1) de IPI. Se realizó un alineamiento con *Arabidopsis thaliana* (NC_003076) correspondiente al gen

completo que presenta con 6 exones. Se definieron así los límites de los posibles exones del mensajero de *Ipomoea batatas*. Cinco fueron las regiones que presentaron similitud entre ambas secuencias. La región correspondiente al primer exón no presenta homología entre ambas secuencias, así como tampoco la región 3' de exón 6 (Ver diagrama). Se diseñaron 4 pares de primers (IPP1, IPP3, IPP5 e IPP7) (Ver tabla 5). El primer IPP1 permite amplificar el segundo intrón, IPP3 al tercer intrón, el IPP5 al cuarto intrón y finalmente IPP7 al quinto intrón. Todos los primers diseñados permitieron una amplificación exitosa (Figura 23). Se observó polimorfismo para un solo marcador (IPP7).

Figura 23. Alelos amplificados con el marcador IPP. Se señalan los alelos con sus pesos moleculares. Parentales y una progenie.



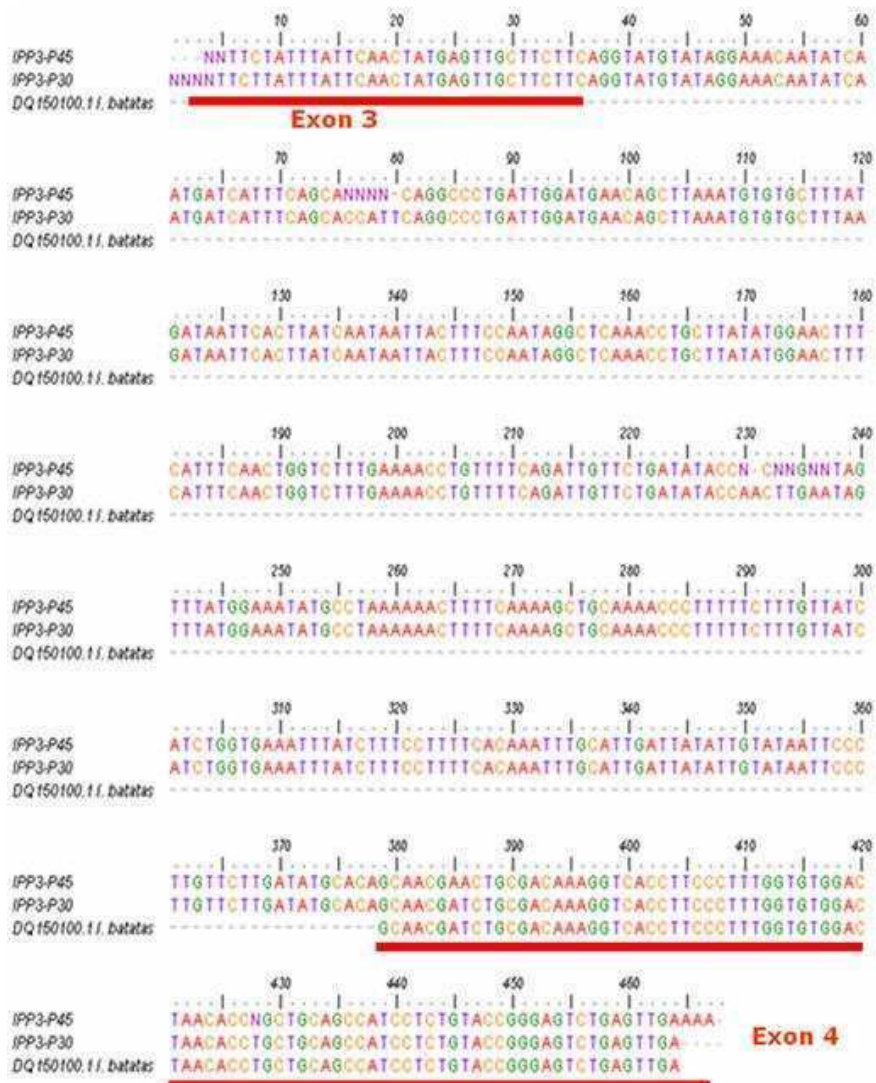
Evaluación del marcador IPP1

El tamaño esperado teniendo en cuenta solamente el exón era de 165pb. Se obtuvo un único alelo monomórfico de 1000 pb de la cual fue posible secuenciar 350 pares de bases de buena calidad. La región secuenciada no presenta similitud con la secuencia de *Arabidopsis thaliana* ni con ninguna secuencia del banco de datos.

Evaluación del marcador IPP3

Este marcador generó un único alelo monomórfico de 480pb. Los alelos purificados a partir de cada parental fueron secuenciados. Se obtuvieron secuencias de 470pb que presentan una alta homología de secuencia con la entrada del NCBI que fue usada para su diseño (DQ1500100.1), con valor de identidad cercana al 100% y e-value mayor al $2e^{-31}$. La región 3' de la secuencia (90pb) presenta 100% de identidad con el exón 4 cubriendo casi la totalidad de su longitud (102-107pb) (Figura 24). Los primeros 30 nucleótidos corresponden al final del exón 3. El resto de la secuencia analizada de *I. batatas* de 340pb no presenta similitud en el NCBI, esta región estimamos corresponde al intrón 3. No se detectaron SNP o InDels, así como tampoco SSR en el intrón. En *Arabidopsis* el intrón presenta un tamaño aproximado de 300pb.

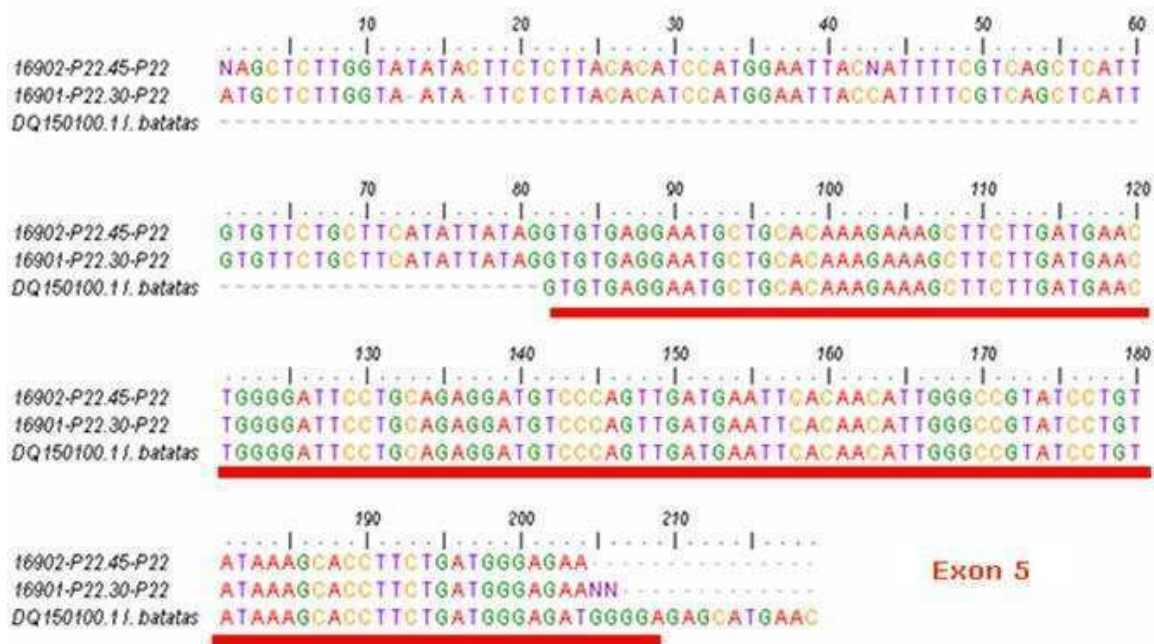
Figura 24. Alineamiento de secuencia del primer IPP3 entre ambos parentales y la secuencia de referencia de *Ipomoea batatas*. Se señala en rojo la región correspondiente al exón 3 y 4



Evaluación del marcador IPP5

Un solo alelo monomórfico de 250 pb fue amplificado. De los 200pb secuenciados (Figura 25) 123pb corresponden al exón 5, que tiene una longitud aproximada de 137pb. Igual que en el caso anterior, la región correspondiente al intrón 4 no presenta similitud con ninguna secuencia. En *Arabidopsis*, el intrón 4 presenta un tamaño de 90pb.

Figura 25. Alineamiento de secuencias del IPP5 entre ambos parentales y la secuencia de referencia de *Ipomoea batatas*. Se señala en rojo la región correspondiente al exón 5. La región 5' corresponde al intrón 4.



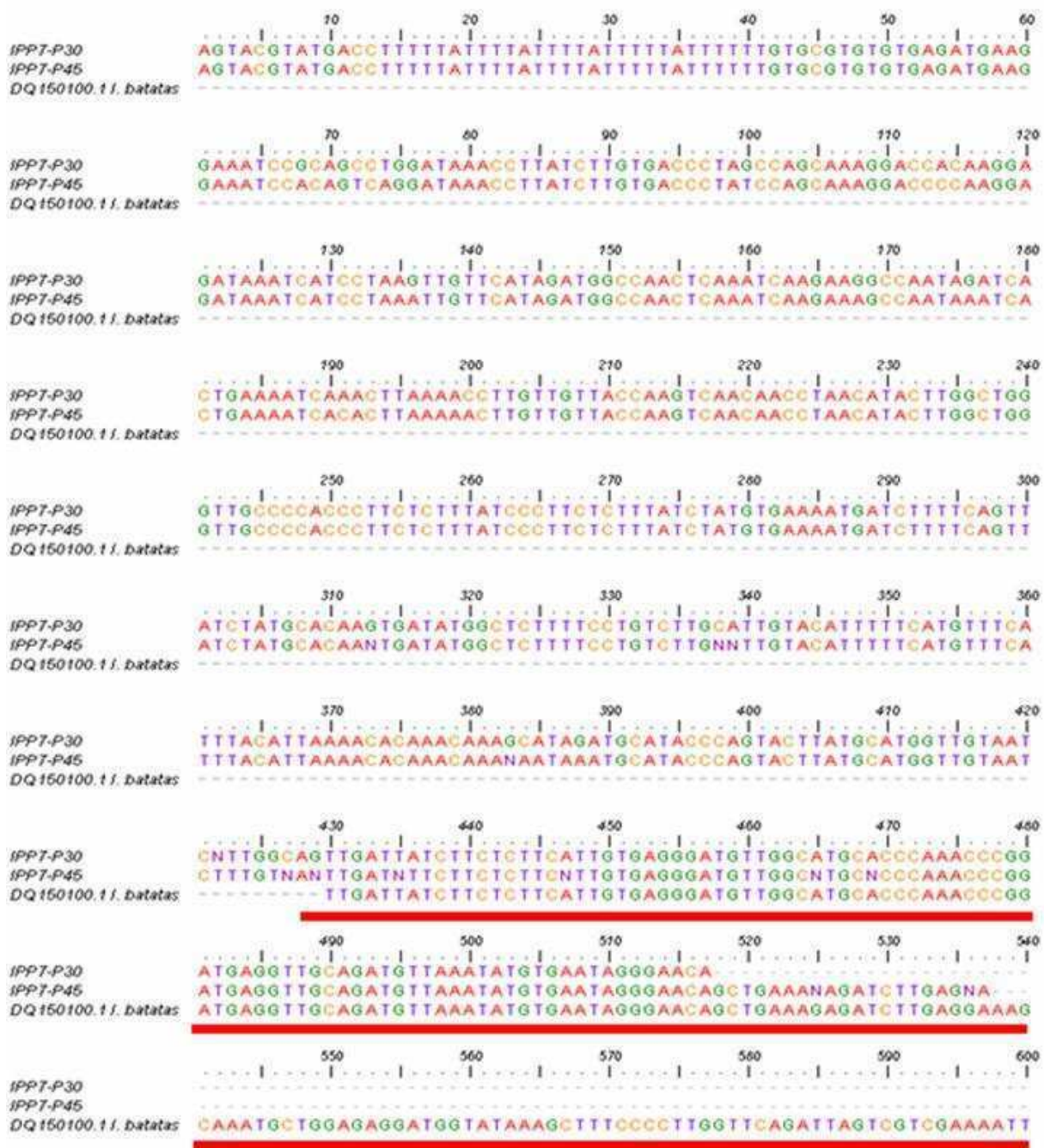
Evaluación del marcador IPP7

Este fue el único marcador del gen IPP que resultó polimórfico. Fue analizada la banda monomórfica para el padre 30BG mientras que para el padre 45BG se aislaron los diferentes fragmentos. Se obtuvieron secuencias de 500pb. La banda obtenida a partir del parental 30BG presentó una alta calidad de secuencia, mientras que a partir de la 45BG la secuencia no resultó de buena calidad. De cualquier manera fue posible su identificación. Ambas secuencias presentaron altos índices de similitud con el mRNA de IPP de *Ipomoea batatas* (DQ150100.1) ($2e^{-38}$) y un 83% de identidad con el mRNA de *Ipomoea sp. Kenyan* ($4e^{-21}$).

Presenta un 100% de identidad ($1e^{-35}$) con los primeros 80 nucleótidos del exón 6 (Figura 26). El resto pertenece a la región del intrón 5 que no presenta similitud con ninguna secuencia del gen IPP registrada en el banco de genes y presenta una longitud mínima de 430pb bastante mayor a la

observada en *Arabidopsis* (86pb). No hay datos dentro del género *Ipomoea* que permita realizar una comparación de la secuencia completa y longitud de los intrones, pero teniendo en cuenta que esta región es la más variable dentro de los genes, es un resultado posible. El intrón 5 presenta homología con el locus S ($6e^{-20}$). La zona de homología abarca 150pb y se corresponde con el intrón de una posible invertasa.

Figura 26. Alineamiento de secuencias del IPP7 entre ambos parentales y la secuencia de referencia de *Ipomoea batatas*. Se señala en rojo la región correspondiente al exón 6. La región 5' corresponde al intrón 5.

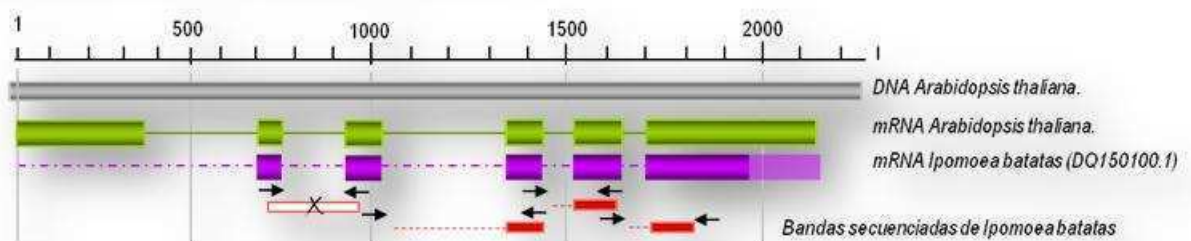


El diseño de los marcadores a permitido conocer y evaluar la secuencia de regiones intrónicas del gen IPP en *Ipomoea batatas* de la cuales no existían datos publicados. En las regiones correspondientes a las zonas que se expresan no se encontraron diferencias entre los parentales, como tampoco con las secuencia de *I. batatas* disponibles en el NCBI. El marcador IPP7 presenta polimorfismo entre los parentales y fue utilizado para la evaluación de la población de mapeo. El resto de los marcadores resultaron monomórficos, en un trabajo con genes candidatos en zanahoria, tampoco fue detectado polimorfismo para este gen (Just *et al.* 2007). A modo de resumen se presenta un diagrama con la ubicación de los primers utilizados, la localización de las secuencias analizadas respecto al mRNA de *Ipomoea batatas* (DQ150100.1) y de la secuencia tanto el mensajero como genómica de *Arabidopsis*.

Figura 27. Estructura del gen y RNA mensajero UF3GT para *Arabidopsis thaliana*. Alineamiento y zonas de homología con el mRNA de *Ipomoea batatas*. Se describen con flecha negra la localización de los primers desarrollados y las líneas rojas corresponden a las secuencias obtenidas.

Isopentenil Pirofosfato Isomerasa (Isopentenyl diphosphate isomerase) (IPI-IPP)

Arabidopsis thaliana. NC_003076.8 (Región:5371627-5373735)



4.2 Geranil-geranil Pirofosfato Sintasa (GGPS)

Pocas son las secuencias completas del gen de GGPS que se encuentran depositadas en las bases de datos públicas: hasta el momento han sido caracterizadas en *Capsicum annuum* (Kuntz *et al.* 1992) (Badillo *et al.* 1995), *Sinapis alba* (Laferriere & Beyer, 1991), *Lupinus albus* (Aitken *et al.* 1995), *Catharanthus roseus* (Bantignies *et al.* 1995) y *Arabidopsis thaliana* (Okada *et al.* 2000). En algunos casos presenta un único intrón y en otras ninguno. Al momento de diseñar los primers no existían datos pertenecientes al género *Ipomoea*. Sin embargo en la base de datos de EST de *Ipomoea batatas* se detectó una secuencia anotada por el Blast2Go como GGPS. La secuencia presenta una longitud de 650pb (DV037120.1) y presenta similitud con los mRNA de *Nicotiana*

tabacum, *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana* e inclusive con una nueva secuencia disponible de *Ipomoea sp. Kenyan* de 365pb, 366pb, 287pb y 315pb respectivamente. Todos estos casos presentan genes con un único intrón. El primer diseñado no generó ninguna amplificación. Se plantea como necesario un re-diseño de los mismos teniendo en consideración que se ha publicado recientemente (2010) un mRNA de *Ipomoea* perteneciente a este gen.

4.3 Fitoeno Sintasa (PSY)

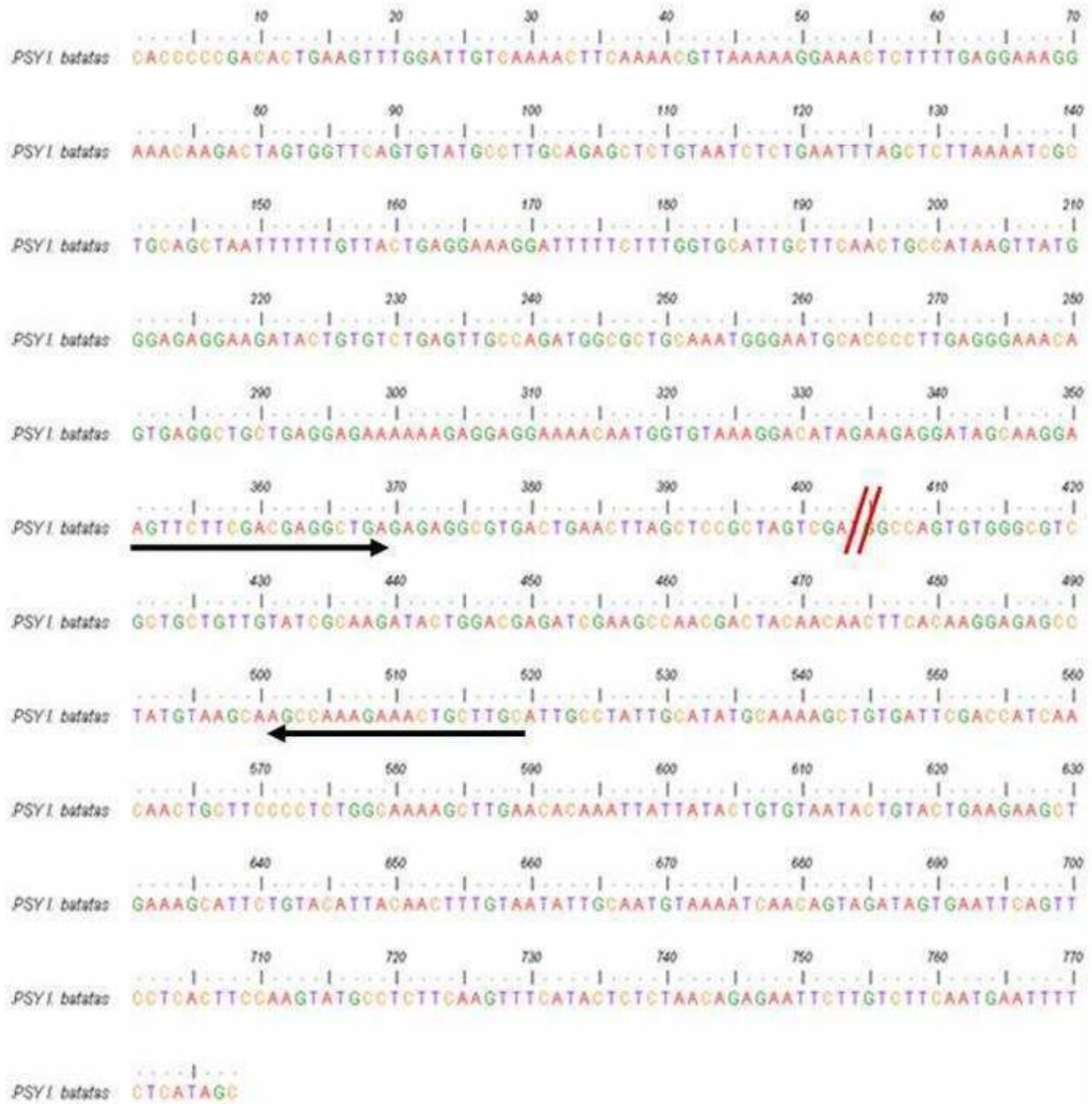
En la base de datos de ESTs o ADN Genómico no se detectaron secuencias de *Ipomoea* caracterizadas como Fitoeno Sintasa. Producto del análisis realizado con el Blas2Go de las bases de EST de *Ipomoea batatas* se identificó un contig de ESTs con alta homología al gen de la Fitoeno Sintasa. El contig agrupa tres entradas (gi:28879420, gi:114782885, gi:114782154) y presenta un tamaño de 778pb (Figura 28). El alineamiento con secuencias del NCBI permitió definir que corresponde al exón 5 y exón 6 del gen de la PSY.

Para la definición de la estructura del contig, se utilizó como referencia la secuencia del gen completo PSY1 de *Solanum Lycopersicum* (EF157835.1) que presenta una longitud de 4958pb y 6 exones. El contig presenta similitud con la región 3' del exón 5 y la región 5' del exón 6. Fue diseñado un par de primers utilizando la secuencia del contig PSY batata, el tamaño mínimo esperado era de 166pb más la región correspondiente al intrón 5.

La amplificación en los parentales y seis progenies F1 permitió detectar 4 alelos (Figura 29). Todos los alelos presentan valores que superan los 166pb, lo que indica que contienen el intrón 5. La banda denominada monomórfica*(515pb) solo estuvo ausente en 1 genotipo de 110, indicando que se encuentra en alta dosis en ambos parentales. Si un parental presenta triple dosis (AAAaaa) para un locus y el otro parental doble dosis (AAaaaa) para ese mismo locus, es posible detectar 1 individuo recesivo (aaaaaa) cada 100 aunque la ausencia también podría deberse a una doble reducción durante la meiosis. El alelo polimórfico (496bp) segrega con una tasa 1:1, lo que revela que se encuentra presente en dosis simple en el parental 30BG (Aaaaaa) y ausente en el otro (aaaaaa).

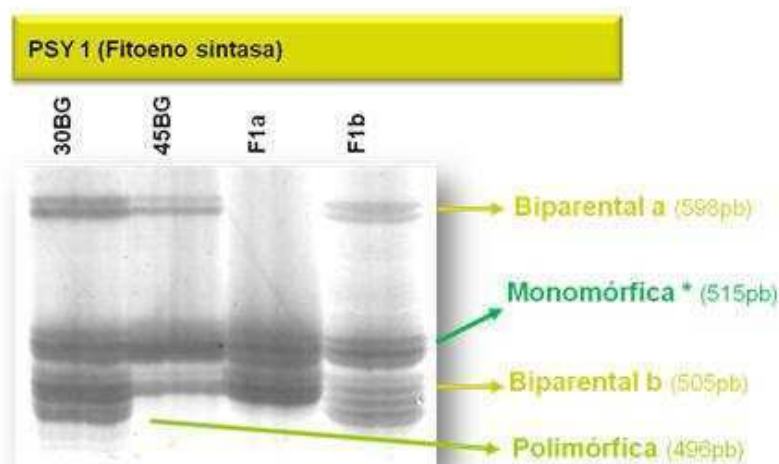
Las dos bandas restantes (598bp y 505bp) se encuentran presentes en ambos parentales pero segregan en la población, este comportamiento está relacionado con la dosis presente en cada parental del alelo analizado y resulta de suma importancia para el desarrollo de mapas de ligamiento (para más detalle referirse al capítulo 4).

Figura 28. Secuencia del contig PSY de *Ipomoea batatas*. Flechas negras: indica la secuencia de los primers. Doble raya roja, región donde finaliza el exón 5 y comienza el exón 6.



Una de ellas (598pb) segrega con una dosis 3:1, lo que nos permite deducir que esta presenta en única dosis en ambos parentales (Aaaaaa x Aaaaaa), y finalmente el otro alelo (biparental b -505 bp) no se ajusta a ninguna segregación esperada. Fueron purificadas y secuenciadas la banda biparental a (598pb) y la banda polimórfica (496bp) perteneciente al padre 30BG.

Figura 29: Gel de acrilamida del gen PSY1. Ambos parentales y dos genotipos de la población. Se indican las bandas y sus pesos moleculares.



Se obtuvieron secuencias de 560pb para ambos parentales de la banda Biparental “a”, y de la banda polimórfica se logró secuenciar 470pb. Las tres bandas presentaron buena calidad de secuencia y un alto grado de similitud con la región 5’ del exón 6 (los primeros 100 nucleótidos) de PSY de *Ipomoea sp. Kenyan* (87% al 93% con $2e^{-34}$ hasta $5e^{-43}$). La región correspondiente al intrón 5 detectado en esta tesis no presenta similitud con ninguna secuencia de la base de datos. Tiene un tamaño de 438 pb aproximadamente, menor al detectado en *Solanum Lycopersicum* que presenta 960pb.

Dos grandes deleciones de 40 nucleótidos cada una explican la diferencia de tamaño entre el alelo biparental “a” de 598pb y el alelo polimórfico de 496pb. Un análisis más detallado de las tres secuencias analizadas muestra además 13 SNPs entre los alelos de 598pb y la de 496pb, de los cuales dos se encuentran en la región correspondiente al exón 6. También en la región intrónica el alelo de 496pb presenta una inserción de 5 nucleótidos.

Estas diferencias de nucleótidos en los exones representan a nivel aminoacídico un solo cambio de aminoácido, pero perteneciente al mismo grupo. En la base de datos de proteína del NCBI (non-redundant) las tres bandas analizadas presentan alta similitud (89% al 76%) con la enzima Fitoeno Sintasa de diferentes especies (*Capsicum annum*, *Solanum lycopersicum*, *Lycopersicum esculentum*). La banda polimórfica presenta 4 aminoácidos cambiados respecto a la secuencia disponible de *Ipomoea sp. Kenyan* pertenecientes al exón 6. Si bien uno de los sitios activos está ubicado en el exón 6 (406-409 aa) esta región no presenta cambios en sus secuencias.

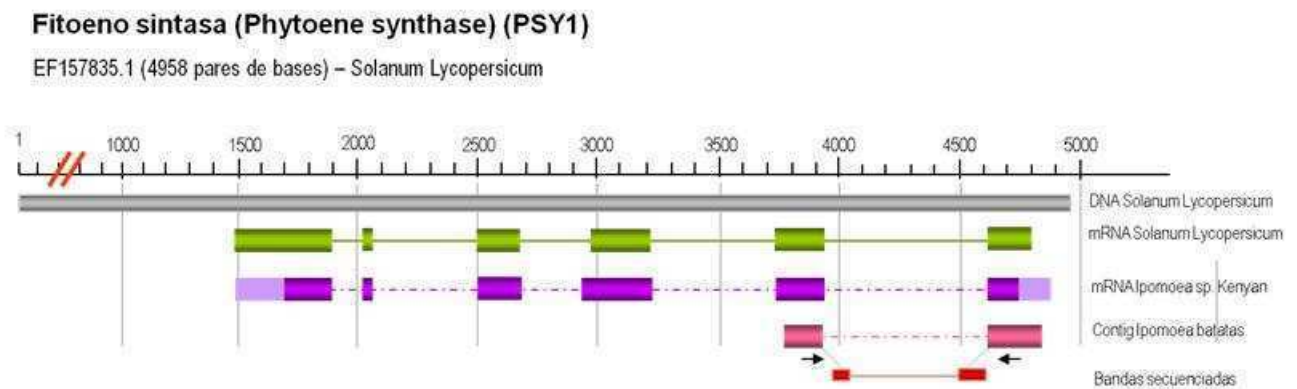
Figura 30. Alineamiento de secuencia entre los alelos analizados y el mRNA de PSY de *Ipomoea sp. Kenyan*. Se indican los exones 5 y 6 en rojo. En verde región correspondiente al intrón 5.



La Figura 31 detalla la región secuenciada: corresponde al intrón 5 y exón 6 como se muestra en la figura 30.

El primer diseñado permitió obtener un marcador génico polimórfico, apto para mapeo y conocer la secuencia del intrón 5 del gen PSY en *Ipomoea batatas*.

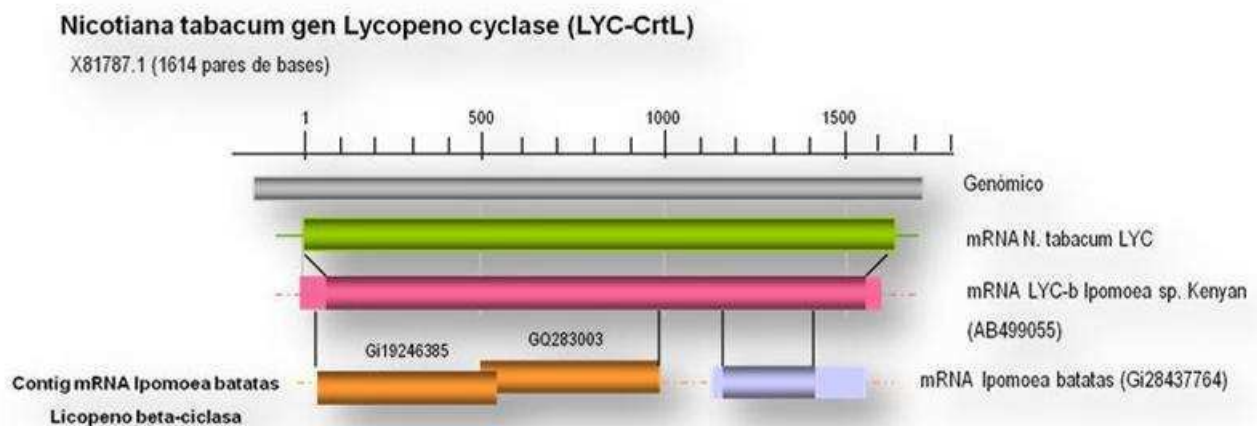
Figura 31. Esquema de la estructura del gen y RNA mensajero de Fitoeno Sintasa de *Lycopersicum esculentum*. Comparación de la estructura con *Ipomoea batatas*. Se detalla la localización del contigs detectado y la banda amplificada.



4.4 Licopeno β -ciclaza (LYC- β)

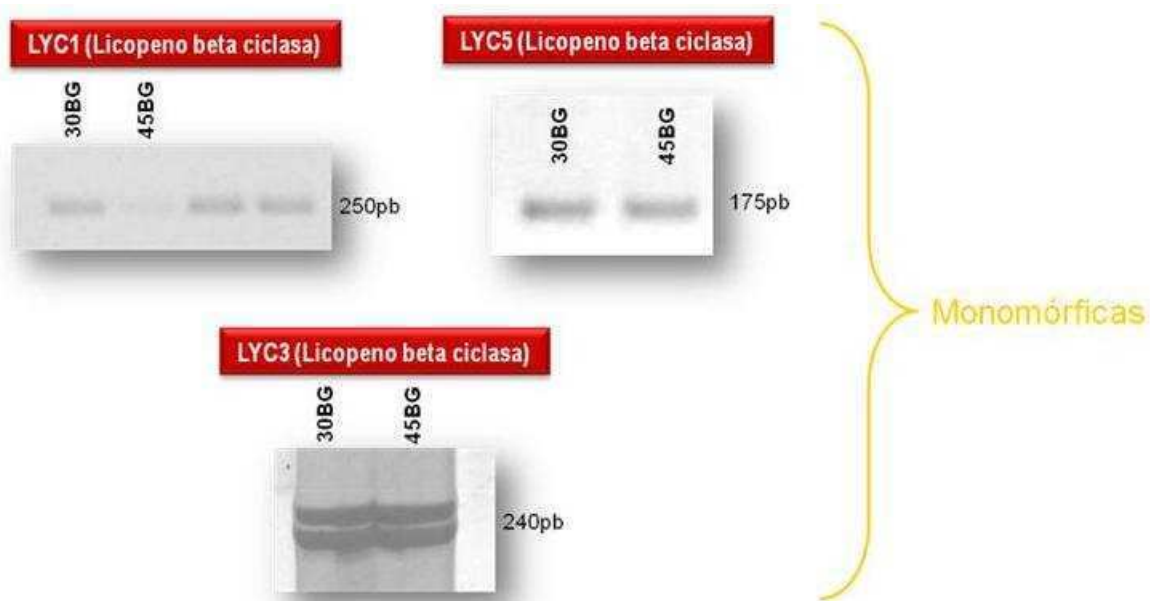
En *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis* y *Nicotiana tabacum* este gen no presenta ningún intrón. Para este gen fueron detectados dos EST de *Ipomoea batatas* con identidad (ID) asignada para la Licopeno β -ciclaza: gi:19246385 (613pb) y gi:257219006 (625pb). Se detectó además otro EST de 438pb (gi:28437764) también asociado a este gen mediante la asignación de función del Blast2Go. Estos ESTs cubren diferentes regiones del mRNA de *Ipomoea sp. Kenyan* (Figura 32). Uno se localiza en la región 5', uno en la región central y el otro en la región 3'. Los dos primeros se solapan, mientras que el último EST queda separado y es el que presenta menor similitud ($7e^{-16}$).

Figura 32. Esquema de la estructura del RNA mensajero de Licopeno ciclaza de *Nicotiana tabacum*. Comparación de la estructura con mRNA de *Ipomoea batatas*. Se detalla la localización del contigs detectado y del tercer EST.



A partir de estas secuencias fueron diseñados tres pares de primers. **LYC1** fue diseñado utilizando la secuencia correspondiente a la región 3' (color lila), mientras que los primers **LYC3** y **LYC5** fueron diseñados sobre la región 5' (bloques naranjas). Los tres pares de primers amplificaron y generaron bandas del tamaño esperado (250pb, 240pb y 172pb respectivamente) (Figura 33). Todos amplificaron un alelo único y resultaron monomórficas entre los parentales y los genotipos F1 analizados. Cada alelo fue purificado y secuenciado.

Figura 33. Amplificación del gen LYC. Se indican los tres primers utilizados y el peso molecular (pb) de las bandas obtenidas para los parentales.



Análisis del marcador LYC5

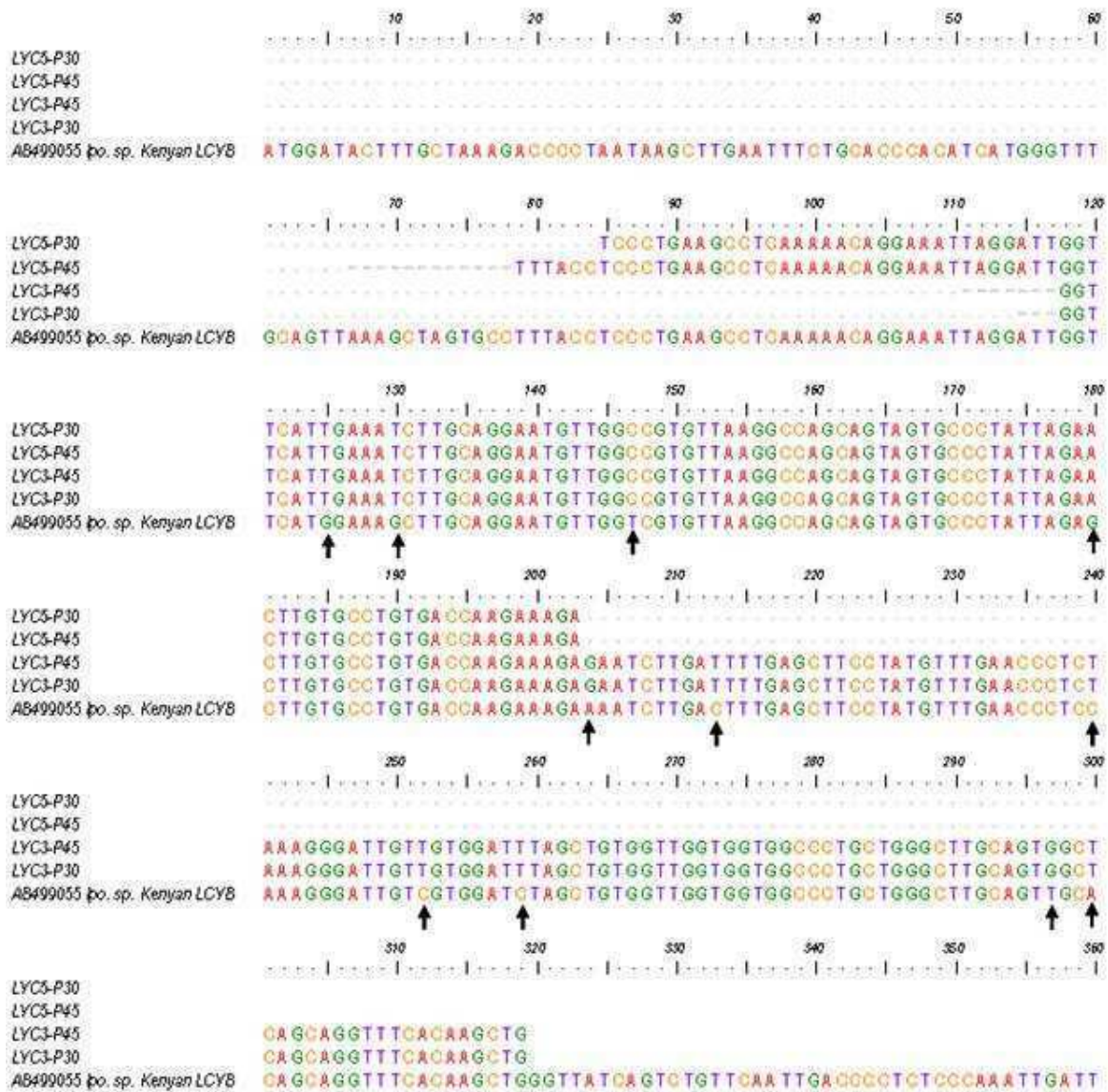
Se secuenciaron 135pb del alelo de 172pb. Su identidad fue confirmada mediante el Blast. Esta secuencia resultó idéntica entre ambos parentales y presenta algunos SNPs con respecto al mensajero RNA de *Ipomoea sp. Kenyan* de la Licopeno β -ciclasa. Un análisis de alineamiento la ubica en la región 5' del mensajero de *Ipomoea sp.*, desde los 80pb hasta los 200pb.

Análisis del marcador LYC3

El alelo de 240pb fue secuenciado en su totalidad y también fue confirmada su identidad. Los primers LYC3 y LYC5 generan alelos cuyas secuencias se solapan 80pb, lo que permitió generar una secuencia consenso para cada parental. La región no presenta diferencias entre los parentales, pero

si numerosos cambios simples de nucleótidos con respecto a la secuencia de *Ipomoea sp. Kenyan* disponible en el banco de datos.

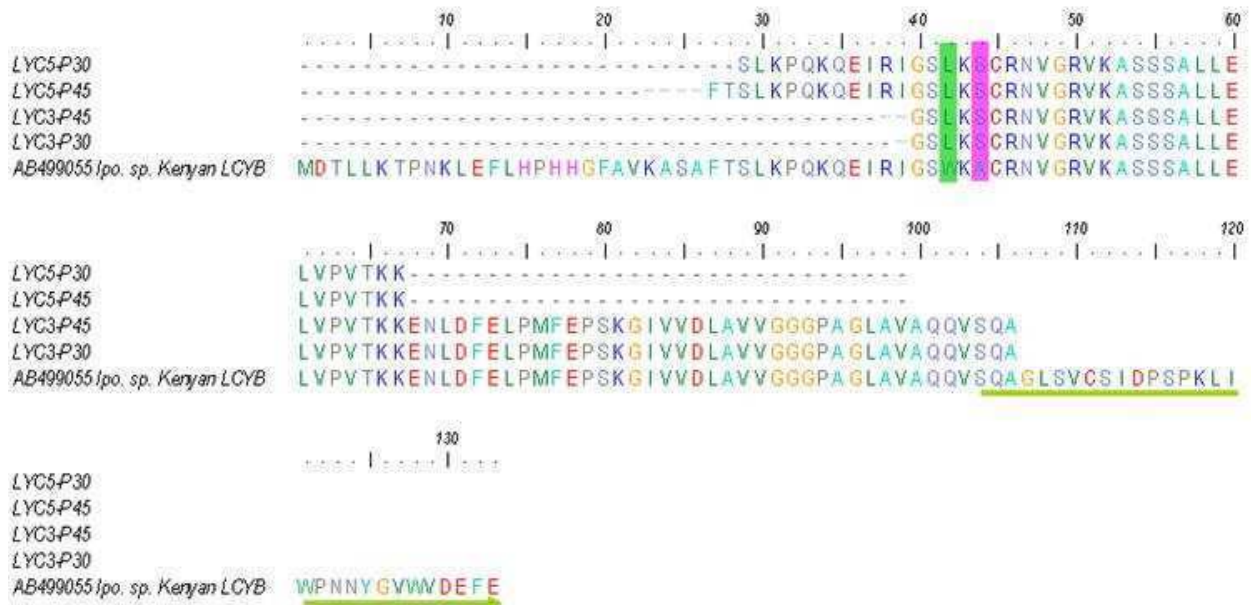
Figura 33. Alineamiento de secuencia de los loci LYC3 y LYC5 amplificados con *Ipomoea sp. Kenyan*. Flechas negras indican SNPs detectados.



El análisis aminoacídico de esta región consenso de 230 nucleótidos corresponde a la región 5' de la proteína Licopeno β -ciclasa. Puede observarse un total de 11 cambios nucleotídicos en la secuencia, siete de los cuales son transiciones y los cuatro restantes transversiones. De todos los cambios observados, solo dos generan cambios no-sinónimos (Figura 34). En la posición 125 y 130 pb ocurren los cambios en la segunda y primera base del codón. En la primera posición, el cambio es entre aminoácidos que presentan las mismas características químicas (Triptofano por Leucina)

ambos no polares, mientras que el otro es un cambio de un aminoácido no polar (Alanina) por uno polar no cargado (Serina).

Figura 34. Alineamiento de secuencia de Licopeno β -ciclase derivado de los análisis realizados con el programa Clustal W. En verde corresponde a la región NADB Rossmann. Franja en colores corresponde a los cambios de aminoácidos.



El mRNA de *Ipomoea sp. Kenyan* de LYCb contiene un marco abierto de lectura (ORF) que codifica para una proteína con 501 aminoácidos. Esta enzima presenta un dominio conservado denominado dominio “NADB Rossmann” o Rossmann-fold NAD(P) (+) –Binding proteínas que va desde los 104 a 479 aminoácidos (comienzo se muestra en la línea verde de la figura 34). Este dominio está presente en una gran cantidad de familias de proteínas como Deshidrogenasas o enzimas redox que actúan en diversas rutas metabólica e involucra numerosas uniones hidrógeno y contactos de van der Waals. Con los dos primers analizados no llega a abarcar esta región y los cambios de aminoácidos observados se localizan río arriba de ella. No podemos realizar ninguna conclusión respecto de qué consecuencias puede tener los cambios aminoacídicos en la estructura y función de esta enzima.

Análisis del marcador LYC1

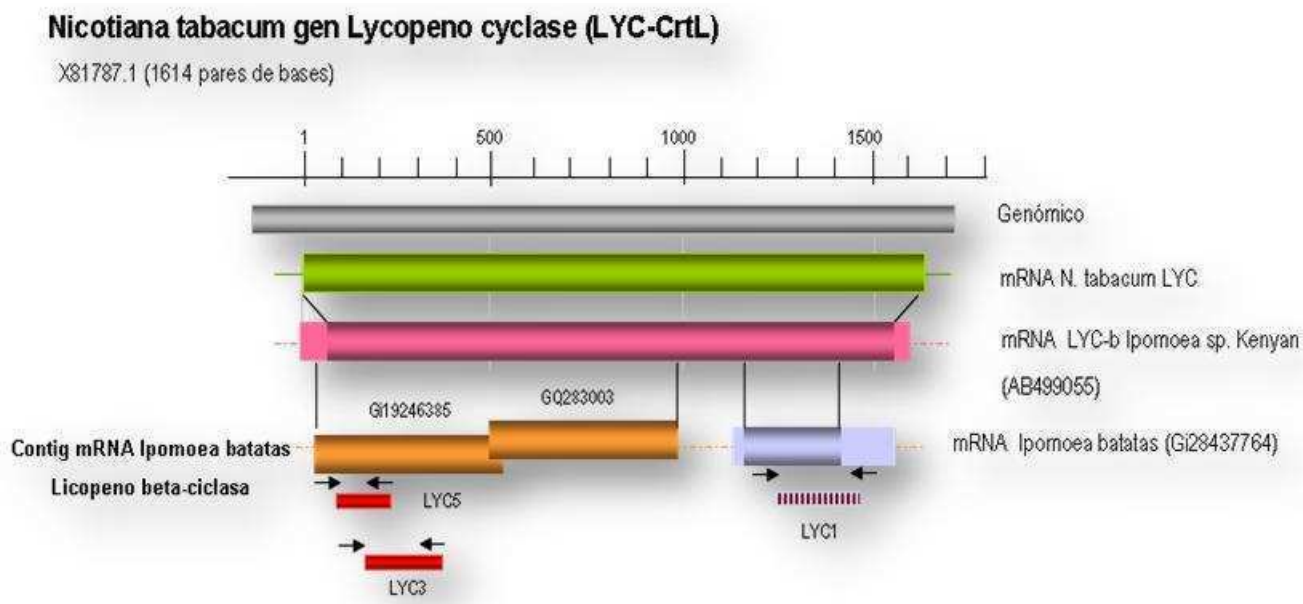
El marcador LCY1 amplificó un alelo de 250 pb y se secuenció 210pb. El análisis de similitud de secuencia en el Blast lo identifica con mRNA de Licopeno β -ciclase de *Actinidia deliciosa* ($9e^{-25}$), pero también con alta homología con el gen capsantin/capsorubin Sintasa (CCS) de *Citrus sinensis* ($2e^{-20}$),

Capsicum annuum y *Daucus carota* ($4e^{-17}$). El análisis con el mRNA de *Ipomoea* sp. Kenyan de LYCb no produce similitud estadística. Aunque si presenta una alta similitud con el mensajero que fue utilizado para el diseño de esos primers. Este mRNA de *Ipomoea batatas* presentó 66% de similitud con la región 3' del mRNA de *Ipomoea* sp. Kenyan. Varios trabajos (Just *et al.* 2006) (Ronen *et al.* 2000) nos llevan a pensar en la posibilidad de que el mensajero RNA (Gi:28437764) descrito como posible Licopeno β -ciclase por el Blast2Go sea en realidad un mensajero del gen Capsantin/Capsorubin Sintasa (CCS). La familia a la que pertenecen el licopeno β y ϵ ciclase también está constituida por las enzimas Capsantin/capsorubin y Neoxanthin ciclase. Estas últimas parecen haber evolucionado a partir de las Licopeno ciclase de plantas. Just *et al.* 2006, detecta en un trabajo con zanahorias un mRNA correspondiente a capsanthin–capsorubin synthase (CCS) (AF208530) aunque hasta el momento no se ha detectado producción de capsantin o capsorubin en dicha especie. CCS es miembro de una familia génica que incluye a las licopeno β -ciclase. En tomate por otro lado, se detectó licopeno β -ciclase específica de cromoplasto denominada CYC- β . Esta enzima es muy similar en composición aminoacídica a la CCS de ají y también puede llevar adelante la reacción de ciclación, por lo que Ronen *et al.* 2000 propone que todos estos genes (CCS, LYC- β y CYC- β) son ortólogos, donde CCS se originó de una duplicación de LYC- β .

Si se analiza la similitud entre la secuencia nucleotídica del gen Licopeno β -ciclase y Capsantin/Capsorubin Sintasa en *Capsicum annuum*, muestra una alta identidad de secuencia con el 67% y un e-value de $3e^{-53}$ en las $\frac{3}{4}$ partes finales del gen. A nivel de proteína, presentan un 53% de identidad, con un e-value de $5e^{-161}$ y un 98% de cobertura. Ambas proteínas presentan 498 aminoácidos (CAA54495-Capsantin/capsorubin Sintasa y ADH04277-Licopeno β -ciclase para *Capsicum annuum*). Cuando se analiza a nivel aminoacídico, la secuencia de LYC1 presenta similitud con un dominio conservado asociado a Licopeno β -ciclase (PLN02463). Estos dominios también fueron detectados en los primers LYC3 y LYC5. Se observó un mejor ajuste entre la banda generada por LYC1 con la secuencia de Capsantin/capsorubin Sintasa que con Licopeno β -ciclase.

Teniendo en cuenta lo descrito hasta el momento, podemos proponer que el mRNA detectado podría tratarse de un mRNA del gen Capsantin/Capsorubin Sintasa (CCS). Lo interesante es que este gen no ha sido citado hasta el momento en *Ipomoea batatas*. A manera de resumen se presenta una representación gráfica (Figura 35) similar a la presentada anteriormente, pero donde se detallan la localización de los marcadores y las secuencias amplificadas.

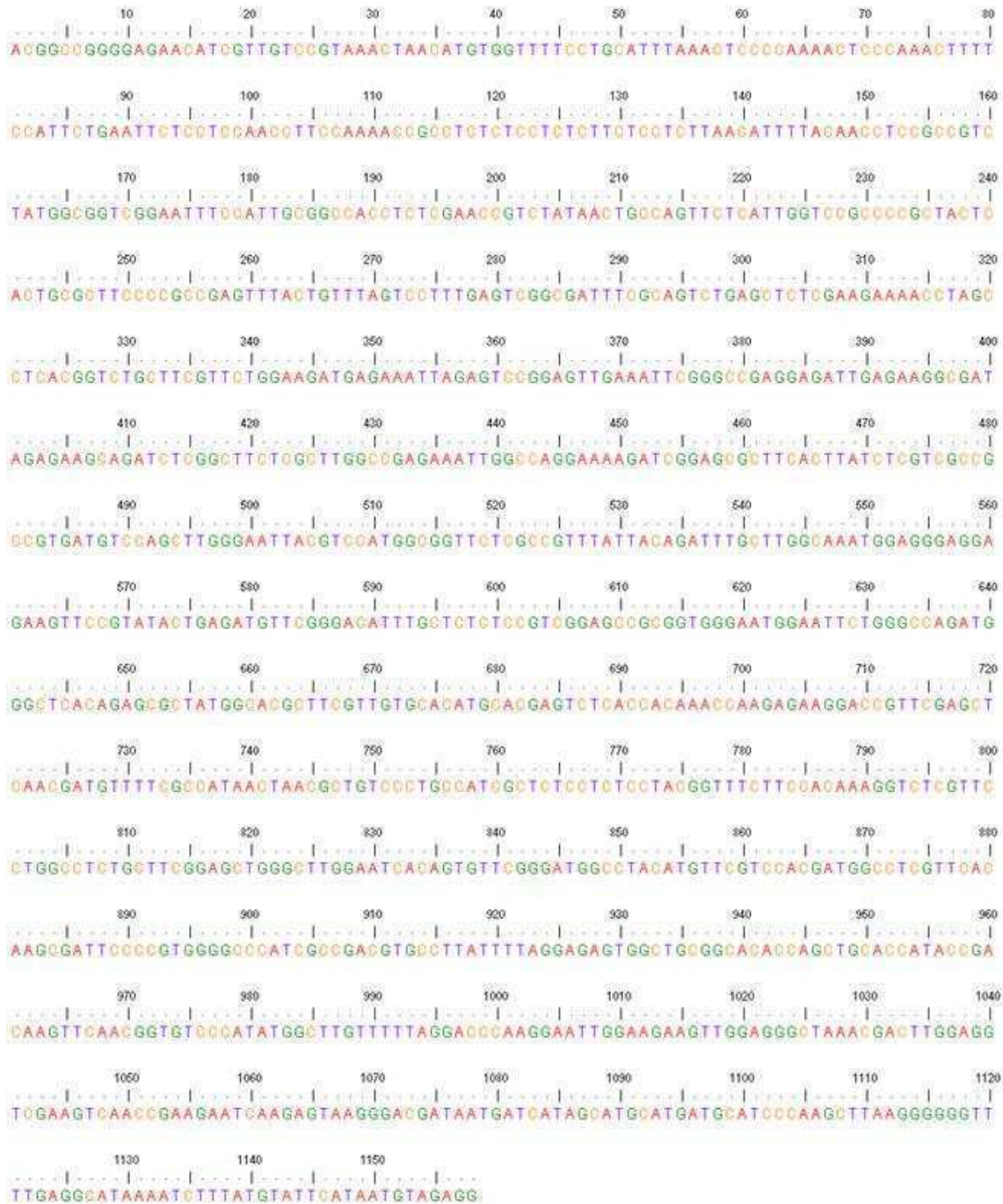
Figura 35. Representación gráfica de la estructura y similitud entre diferentes secuencias del gen Licopeno β -ciclasa. En verde: mRNA de *Nicotiana tabacum*. En rosa: mRNA de *Ipomoea sp. Kenyan*. En naranja: contig de *Ipomoea batatas*. En celeste: mRNA asignado como LYC, pero que corresponde posiblemente a CCS. Se muestran la localización de los primers y las bandas obtenidas.



4.5 Anillo β -hidroxilasa o beta caroteno hidroxilasa (CHY- β)

La búsqueda de secuencias anotadas en el NCBI para este gen, no arrojó ningún dato disponible de secuencia genómica o mRNA para *Ipomoea batatas*, aunque si fue posible localizar un mRNA para *Ipomoea nil* (AB499058.1). A partir del análisis de la base de datos de EST con el EGassembler se detectó un contig formado por 5 entradas del NCBI que fue clasificado posteriormente como β -caroteno hidroxilasa (EC: 1.14.13) de 1158 pares de bases (figura 36). El contig presenta 94% de similitud con *I. nil* con un e-value de 0. También presenta alta similitud (79% y 78%) con buen e-value ($6e^{-175}$ y 0) con los mRNA de *Licopersicum esculentum* (Y14809.1) y *Capsicum annum* (Y09722.1) respectivamente.

Figura 36. Secuencia del contig (1478) de *Ipomoea batatas* identificado como β -caroteno hidroxilasa (EC: 1.14.13).



Los análisis de similitud con el mRNA publicado recientemente de *Ipomoea* sp. también son altos (92% y e-value 0), aunque presenta 3% de gaps.

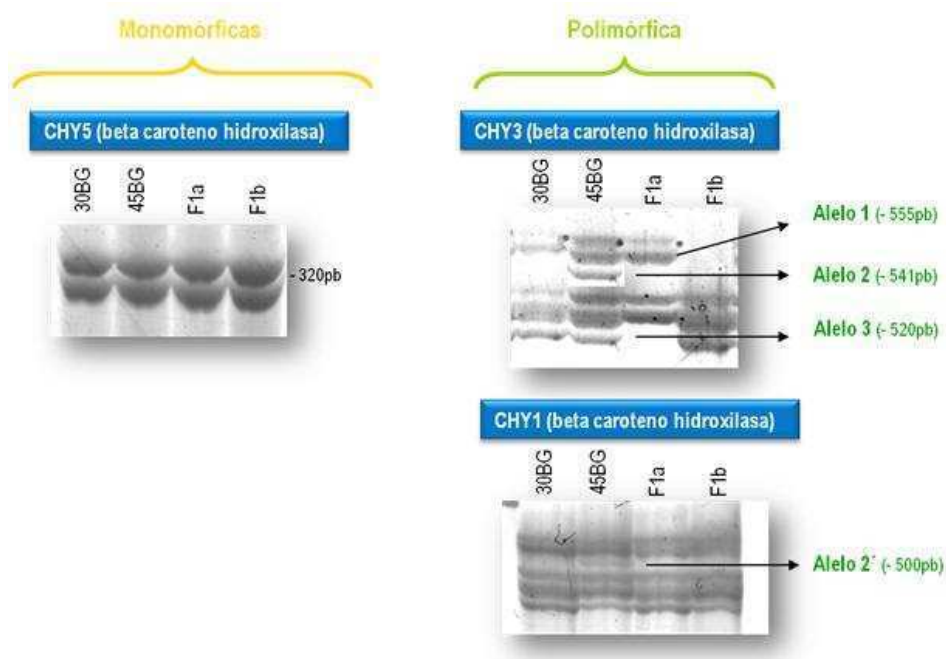
La estructura genómica del gen CHY- β muestra 7 exones en *Arabidopsis thaliana* (AF125577.1), en *Citrus kinokum* (AM408552.1), *Lycopersicum esculentum* (DQ650804.1) y *Brassica rapa* (DQ156907.1). El alineamiento entre *Citrus kinokum* y el contig 1478, cubre los primeros cinco exones sin gaps, con alta identidad (75% a 87%) y e-value (1e-07 a 2e-41), mientras que con

Lycopersicon esculentum el alineamiento presenta un 86% de identidad y un e-value de $4e^{-38}$ y cubre 6 de los 7 exones (1-3-4-5-6-7), este mismo fenómeno se da cuando se alinea con *Arabidopsis*, donde el exón 2 no encuentra secuencias estadísticamente similares.

A partir del contig se diseñaron 3 pares de primers. Los tamaños esperados son más difíciles de definir porque no se conoce el tamaño de los intrones. Podemos definir cuál es el tamaño mínimo esperado: CHY1 225pb, CHY2 260pb y CHY3 210pb. En la figura 37 puede observarse los productos de amplificación de los tres marcadores diseñados. Todos los primers generan un producto de amplificación con valores que superan al mínimo esperado, lo que indica la posible presencia de intrones.

El marcador **CHY1** y **CHY3** cubren la región desde el exón 1 hasta el 3 mientras que el marcador **CHY5** abarca del exón 5 al exón 6.

Figura 37. Productos de amplificación obtenidos con los marcadores CHY5, CHY3 y CHY1.



Análisis del marcador CHY5

El marcador CHY5 amplificó un único alelo de 320pb. Su secuenciación no produjo datos válidos.

Análisis de los marcadores CHY1 y CHY3

CHY1 y CHY3 comparten el mismo primer 3'. La región de amplificación de CHY3 incluye a CHY1. En el caso de CHY1 fue analizado el alelo de mayor peso molecular, aunque no podemos asegurar que sea una única banda, ya que en un gel de agarosa no es posible tener la separación que se observa en el gel de poliacrilamida. Para el primer CHY3 fueron analizados los 3 alelos. Si bien ambos

marcadores amplifican la misma región, al diseñar primers que permiten amplificar una zona más extensa (CHY3), fue posible una mejor visualización y detección de polimorfismo en los geles y su purificación. El análisis de identidad de las bandas secuenciadas, confirmó que los marcadores diseñados amplifican el gen de interés.

Para el marcador CHY1 fue analizado el alelo de 520pb para ambos parentales. Se secuenciaron 450pb con alta calidad. Para CHY3, fue posible secuenciar los tres alelos. El alineamiento de todas las secuencias junto al contig y el mRNA de *Ipomoea* sp. permitió definir la estructura de la región 5' del gen CHY para los genotipos parentales en *Ipomoea batatas*. Para ninguna especie de este género se conocía la estructura de los intrones: el primer intrón posee una longitud de 200 pb aproximadamente, mientras que el segundo es de 90pb. Con las secuencias obtenidas pudo cubrirse el exón 1 (región 3'), el 2 y el 3 (región 5') y los intrones 1 y 2 completos. Si comparamos con la estructura de los genes completos disponibles en las base de datos, podemos ver que el intrón 1 (200pb) de *I. batatas* duplica en tamaño a los analizados que presentan valores entre 70 y 105pb, mientras que el intrón 2 presenta 96 pb y se puede observar que es mucho más variable en tamaño en las especies de referencia ya que va desde 77 a 506 pb. El exón 2 presenta una longitud que se estima igual a las otras especies (59pb) (Tabla 3).

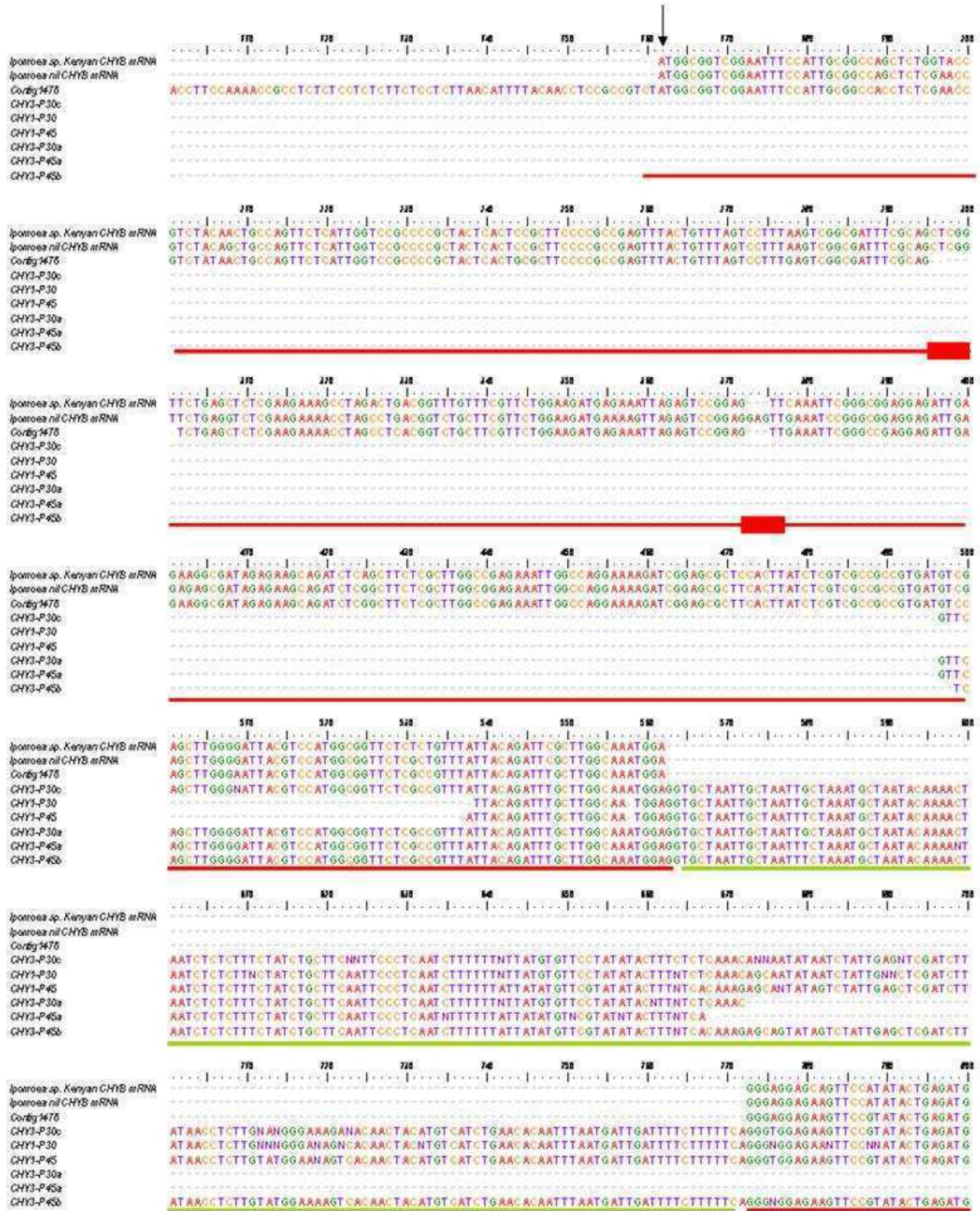
Tabla 3. Resumen de la estructura del gen CHY en diferentes especies. Tamaño expresado en pares de bases. (*) ± 5 pares de bases, dependiendo del alineamiento.

Especie	Exón1	Intrón1	Exón2	Intrón2	Exón3	Intrón3	Exón4	Intrón4	Exón5	Intrón5	Exón6	Intrón6	Exón7
<i>Arabidopsis thaliana</i> AF125577.1	377	80	59	77	71	74	134	375	125	106	56	87	131
<i>Citrus kinokuni</i> AM408552.1	410	105	59	216	71	113	134	118	125	134	56	438	83
<i>Lycopersicon esculentum</i> DQ650804.1	413	70	59	506	71	130	134	85	125	164	56	172	80
<i>Brassica rapa</i> DQ156907.1	366	95	59	84	71	84	134	466	125	241	56	92	86
<i>Ipomoea batatas</i>		208	59*	96									

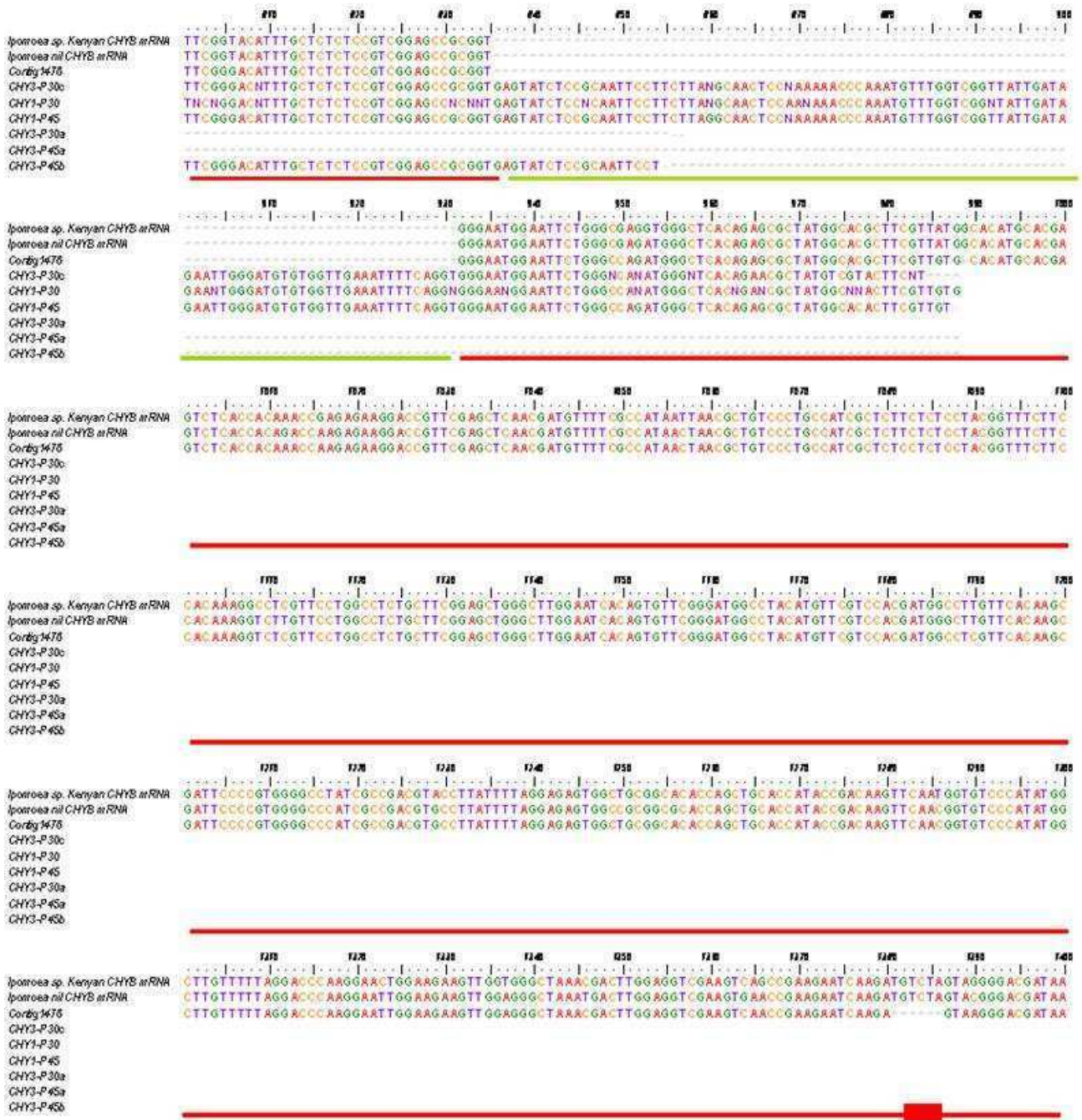
El alineamiento muestra algunos cambios de bases entre las líneas parentales ubicadas en los intrones. Además se evidencian SNPs entre las secuencias de las diferentes especies en los exones. La secuencia amplificada es parte del dominio conocido como FA_hidroxilasa, que caracteriza una superfamilia de hidroxilasas de ácidos grasos, caroteno hidroxilasas y esterol desaturadas

(CCD174545). Contiene dos copias de un motivo HXXHH muy conservado y algunos miembros son proteínas integrales de membrana.

Figura 38. Alineamiento de secuencia de las diferentes bandas de *Ipomoea batatas*, *Ipomoea sp. Kenyan* y el contig 1478. En rojo se indican los exones (1, 2 y 3), cajas rojas zonas de indels. En verde los intrones (1 y 2). La flecha indica el comienzo del exón 1.



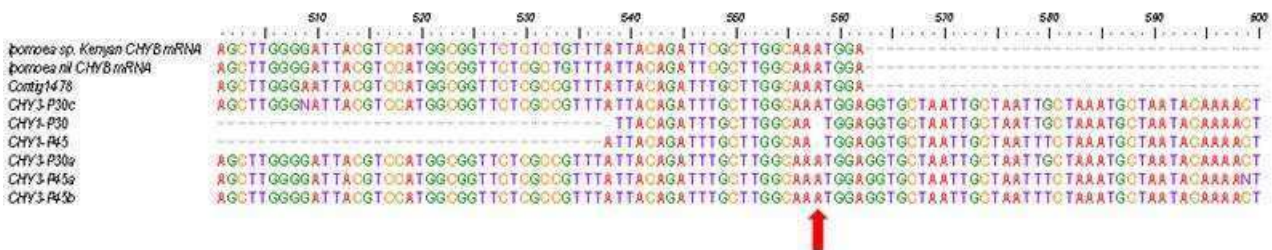
Continúa Figura 38.



Se observan alto número de cambio de bases entre las secuencias analizadas. El contig presenta tres deleciones de 5, 3 y 6 pb en diferentes regiones codificantes con respecto a los mRNA. Una deleción de una base se observa entre las secuencias amplificadas con el marcador CHY1 y CHY3 (Figura 39). Evidentemente CHY1 amplifica un locus diferente a CHY3. El análisis de la secuencia amplificada por CHY3 en la zona 5', muestra diferencia de dos bases en la secuencia entre ella y el marcador diseñado a partir del contig 1478. Además, el gen β -caroteno hidroxilasa fue descrito como una familia de genes en dicotiledóneas y monocotiledóneas. En *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana* (NM_118702.3 y NM_124636.3), han sido detectadas dos miembros de esta familia hasta

el momento, mientras que se han detectado 3 miembros en arroz (*Oriza sativa*) y hasta 6 para maíz (*Zea mays*) (Vallabhaneni *et al.* 2009).

Figura 39. Alineamiento de secuencias del final del exón 1 y comienzo del intrón 1. Flecha roja indica el lugar del indel en las secuencias de CHY1



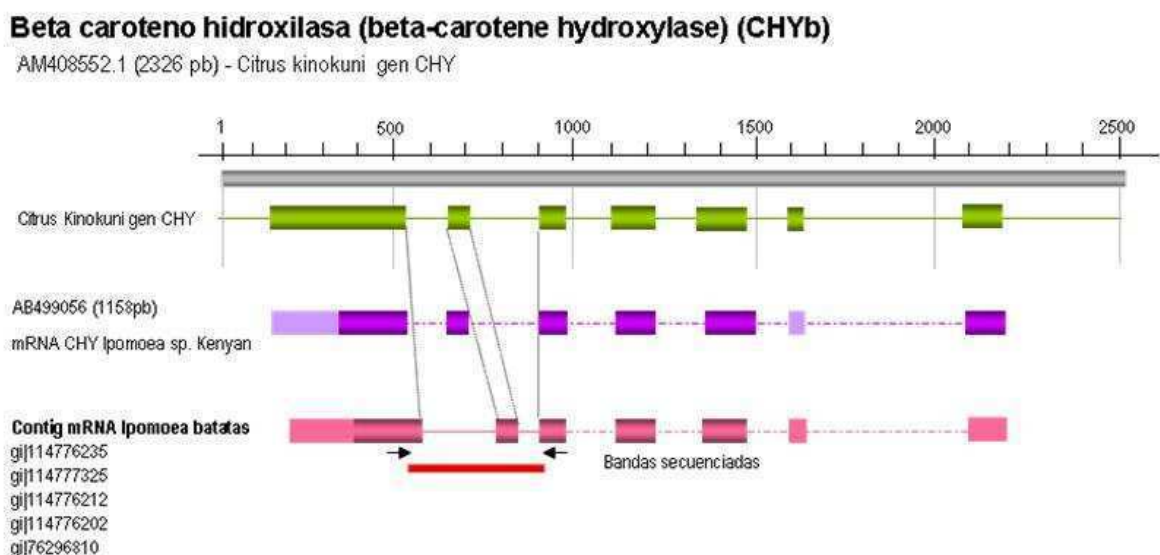
Hay que destacar además que en las dicotiledóneas analizadas todas presentan 7 exones, mientras que en maíz y arroz se observan no solo 6 exones sino que han sido detectados además variantes con exones fusionados e inclusive con menor número de exones. Un análisis fenético de la secuencia aminoacídica presentado por los mismos autores revela la existencia de tres grandes grupos: el de la monocotiledóneas (Arroz, Maíz y Sorgo), las dicotiledóneas (Tomate y Arabidopsis) y más alejado filogenéticamente CHY bacteriana (*Erwinia*). A nivel aminoacídico las CHY bacterianas presentan baja similitud con las observadas en el reino vegetal, con sólo un 40% de homología (Vallabhaneni *et al.* 2009).

Además de observar que CHY1 está amplificando otro locus, si analizamos la segregación de los alelos de CHY3, podemos proponer que este primer esta amplificando en realidad por lo menos dos locus. ¿Con que datos podemos apoyar esta hipótesis? Para eso, vamos a echar mano a la genética: el análisis de segregación de las diferentes bandas observadas en CHY3 en la población de mapeo (ver capítulo N^o4) nos permite acercarnos al genotipo de los padres. El alelo CHY3_2 es un alelo polimórfico con segregación 1:1, lo que indica que está presente en una única dosis en un parental (Aaaaa). Por otro lado tenemos los dos alelos biparentales (alelo 1 y 3). Uno de ellas ajusta a una segregación doble-simple (3:1), que nos permite deducir que para ese alelo, la configuración de la parentales es: Aaaaa x Aaaaa. Mientras que el otro alelo presenta un dosis mayor en alguno de los parentales. Finalmente tenemos un alelo monomórfico, que indica que se encuentra en al menos 4 dosis en alguno de los dos parentales (AAAAa), ya que no se observa ninguna segregación. Teniendo en consideración estos datos, tendríamos más alelos por locus que los esperables para una especie hexaploide que puede presentar hasta 6 alelos por cada locus. Esto nos lleva a proponer que es posible que CHY3 esté en realidad amplificando al menos dos *loci*. Intentando avanzar un poco más en esta hipótesis, nos propusimos analizar si estos alelos están ligados entre sí.

Interesantemente, los alelos biparentales están ligados entre sí a una frecuencia de recombinación de 7.78. Por lo cual, estos alelos biparentales pertenecen a dos locus diferentes con una distancia aproximada de 10cM. Con estos datos y suponiendo que CHY3 amplifica al menos dos loci y CHY1 un locus diferente, indicaría que en *I. batatas*, existen al menos tres miembros de la familia de este gen. Esto debería corroborarse por medio de la técnica de *Southern blot*. Además, la amplificación completa de estos genes permitiría determinar su estructura y establecer si se trata de genes completos o pseudogenes.

El análisis de estructura, revela homología entre la mayoría de los exones, aunque difieren de acuerdo a la especie con la que se compara. Se pudo establecer el tamaño de los intrones 1 y 2 así como el exón 2. Los intrones no presentan homología con ninguna secuencia de la base de datos.

Figura 40. Esquema de la estructura del gen CHYb y de los RNA mensajeros en *Citrus kinokuni*, *Ipomoea sp. Kenyan* y el contig de *Ipomoea batatas*.



Los marcadores desarrollados permitieron conocer la secuencia completa del intrón 1 y 2 del gen β -caroteno hidroxilasa de *Ipomoea batatas*, además se analizó la homología de secuencia con respecto a otras especies y se detectaron cinco entradas del NCBI de la base de datos de ESTs de batata que forman un contig que abarca el gen completo. Se detectaron alelos de diferentes locus del gen, mediante un análisis de segregación.

4.6 Zeaxanthin epoxidasa (ZEP)

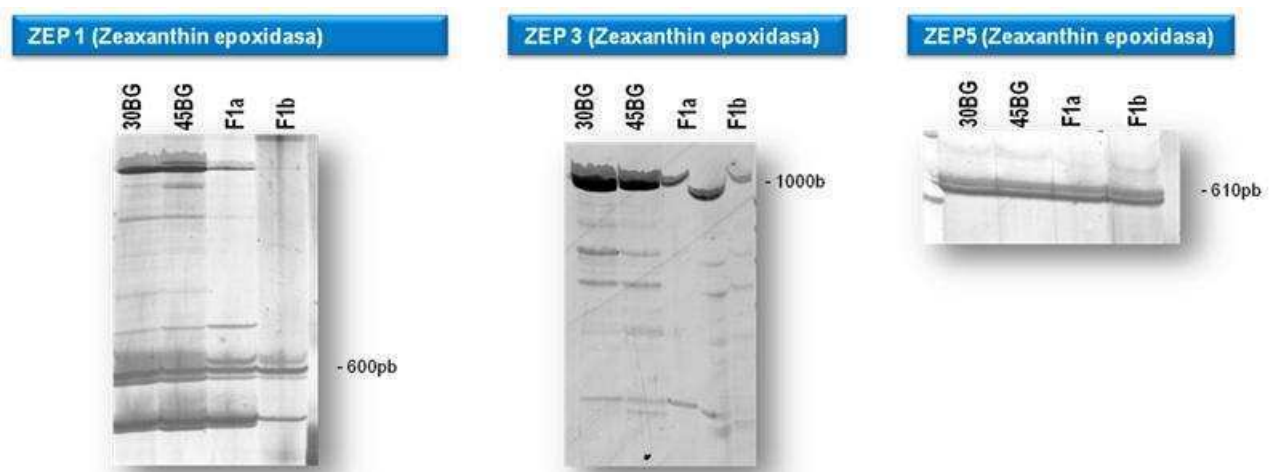
Una secuencia cDNA de *Ipomoea batatas* (EE879340.1) fue anotada como similar a Zeaxanthin epoxidasa, presenta una longitud de 842 pb y altos valores de similitud (67% al 74%) y e-value ($2e^{-66}$)

a $1e^{-150}$) con mRNA de diferentes especies: *Solanum lycopersicum* (DQ20669.1), *Vitis vinifera* (AY337615.1), *Daucus carota* (DQ192197.1), *Arabidopsis thaliana* (AF281655.1), *Zea mays* (NM_001157971.1) y *Lycopersicon esculentum* (Z83835.1). Considerando las secuencias genómicas disponibles, se observa que ZEP contiene 16 exones en las especies analizadas que presentaban la secuencia genómica: *Solanum tuberosum* (HM013965.1), *Arabidopsis thaliana* (AF283761.1) y *Citrus sinensis* (AB548573). El alineamiento entre el cDNA de *Ipomoea batatas* y mRNA de *Solanum tuberosum*, muestra alineamiento completo con los exones del 7 al 15 en su totalidad y parcialmente con el exón 6.

Se diseñaron 3 pares de primers: **ZEP1** que fue diseñado para amplificar desde la región 3' del exón 6 hasta exón 8, se espera un producto de 153 pb más los intrones 6 y 7. **ZEP3**, amplifica desde el exón 7 hasta la mitad del exón 9 (tamaño mínimo esperado de 208pb) y finalmente **ZEP5** desde el exón 8 hasta exón 11 con un tamaño de por lo menos 280pb.

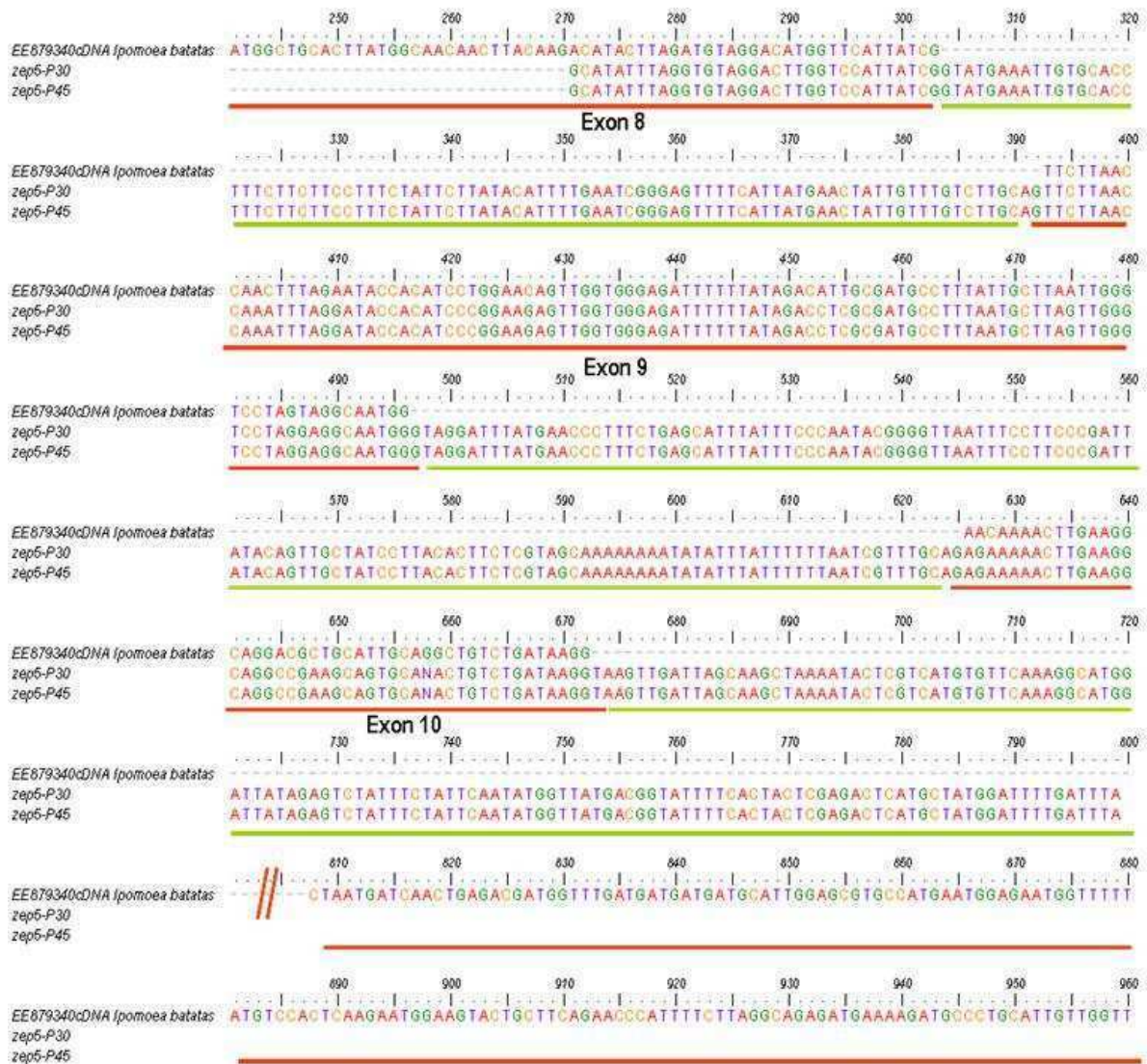
Los tres primers amplificaron bandas de alto peso molecular. En la siguiente figura (41) se observan los productos de amplificación del marcador ZEP1 y ZEP3: ambos amplificaron muchas bandas de diferente peso molecular, en un rango de tamaño entre 220pb y 1000pb) y sin polimorfismo entre los parentales. No se logró una amplificación reproducible, por lo que no fueron analizados.

Figura 41. Productos de amplificación de los tres marcadores diseñados para el gen Zeaxanthin Epoxidase.



Por otro lado, **ZEP5** amplificó un único alelo de 610pb que fue secuenciada para ambos parentales. Se obtuvieron 585pb y 570pb para el parental 30BG y 45BG respectivamente. El alineamiento de secuencia se muestra en la figura 42: ambas secuencias presentan homología con el exón 9 y 10 completo, la región 3' del exón 8 y los intrones 8 y 9 completos del gen Zeaxanthin epoxidasa ($4e^{-23}$).

Figura 42. Alineamiento de secuencia entre el alelo del locus ZEP5 de ambos parentales y el cDNA de *Ipomoea batatas* identificada como Zeaxanthin epoxidase.



El análisis de la posible estructura de este gen comparando con los anotados en el NCBI, permiten definir que el intrón 8 presenta 89pb aproximadamente, muy similar a los observados en otras especies. El exón 9 y 10 presentan una longitud aproximada de 103-104pb y entre 43-66pb respectivamente. Un tamaño similar fue observado en *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* y *Citrus sinensis*. Finalmente, el intrón 9 presenta un tamaño de 133pb, la longitud de este intrón es muy variable en las secuencias disponibles, desde 83pb hasta 473pb. Al igual que lo observado en la secuencia de CHY, el tamaño de los intrones de los extremos del gen son los que presentan mayor variabilidad, mientras que todos los interiores, están altamente conservados en cuanto a su longitud. *Arabidopsis* presenta en la mayoría de los intrones el menor tamaño (90pb) comparado con las otras secuencias disponibles. Esto concuerda con un trabajo de Vallabhaneni *et al.* (2009)

donde se observa que *Arabidopsis* presenta un tamaño promedio de intrones mucho menor (147pb) comparado con tomate (466pb) para los genes analizados.

Finalmente el intrón 10 presenta por lo menos 120pb, superando los 47pb de *Citrus sinensis* y los 82pb de *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 4: Estructura y comparación de la longitud de intrones y exones del gen Zeaxanthin epoxidasa. En naranja se muestran los datos obtenidos para *Ipomoea batatas*.

	Exon1	Intron1	Exon2	Intron2	Exon3	Intron3	Exon4	Intron4	Exon5	Intron5	Exon6	Intron6	Exon7	Intron7	Exon8	Intron8
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AF283761.1)	505	86	162	85	74	89	100	91	115	86	211	85	91	73	114	86
<i>Citrus sinensis</i> (AB548573)	496	465	162	106	74	77	100	107	115	698	211	863	91	230	114	94
<i>Solanum tuberosum</i> (HM013965.1)	520	390	162	154	74	197	100	121	115	578	211	154	91	224	114	97
<i>Ipomoea batatas</i>																89
	Exon9	Intron9	Exon10	Intron10	Exon11	Intron11	Exon12	Intron12	Exon13	Intron13	Exon14	Intron14	Exon15	Intron15	Exon16	
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AF283761.1)	103	83	45	82	64	124	86	116	54	83	88	82	87	107	89	
<i>Citrus sinensis</i> (AB548573)	103	473	45	47	64	108	89	128	54	124	88	86	87	272	86	
<i>Solanum tuberosum</i> (HM013965.1)	103	403	45	127	64	166	86	403	54	92	88	78	84	86	83	
<i>Ipomoea batatas</i>	103	133	43/60													

No se observan diferencias entre las secuencias en ambos parentales, aunque si algunos cambios con respecto al cDNA de *Ipomoea batatas*. Los cambios de secuencia tipo SNPs observados en los exones entre los parentales y los mRNA generan algunos cambios de aminoácidos, en la mayoría de los casos por aminoácidos de las mismas características. El alineamiento blastx contra la base nr de proteínas muestra similitud con proteínas correspondientes a la Zeaxanthin epoxidase de diferentes especies (BAI79260.1 *Citrus sinensis*, AAR11195.1 *Vitis vinífera*, ACM68704.1 *Brassica rapa* y ADF28629.1 *Solanum tuberosum*) con los tres exones amplificados.

Los marcadores desarrollados no mostraron polimorfismo de secuencia ni tamaño. A pesar de esto, si bien no pudieron ser utilizados para el desarrollo de un mapa de ligamiento, permitieron conocer la estructura y secuencia de algunos de los intrones, así como identificar un cDNA de este gen en la

base de datos. En la siguiente tabla (Nº5) se detallan los marcadores desarrollados para todos los genes analizados de la ruta de síntesis carotenos.

Tabla 5. Secuencia de los primers usados para amplificar los genes que sintetizan carotenoides en *Ipomoea batatas*. Se detallan además las secuencias utilizadas para su diseño y el tamaño de las bandas amplificadas.

Gen	Numero acceso NCBI	Secuencia Primers (5'-3')	
Ipi (Isopentenyl Diphosphate Isomerase)	DQ150100.1	F_IPP1	CCTCATGTTTGACGACGAGT
		R_IPP1	TGAAGAAGCAACTCATAGTTTGAA
		F_IPP3	TGAGAATCTGCTTCACAGAGC
		R_IPP3	CAACTCAGACTCCCGGTACA
		F_IPP5	TCCTCTGTACCGGGAGTCTG
		R_IPP5	TCTCCCATCAGAAGGTGCTT
		F_IPP7	AAGCACCTTCTGATGGGAGA
R_IPP7	CTCCAGCATTGCTTTCCTC		
Ggpp (Geranyl-geranyl Pirofosfato Sintasa)	gi:76297545	F_GGPP	ATCCACACCATGTCCCTCAT
		R-GGPP	ATGAATTCAAACGCGAAAGC
Psy (Fitoeno Sintesa)	gi:28879420 gi:114782885 gi:114782154	F_PSY1	AAGTTCTTCGACGAGGCTGA
		R_PSY1	GCAGTTTCTTTGGCTTGCTT
Lyc (Licopeno Ciclasa)	gi:19246385 gi:28437764 gi:257219006	F_LYC1	TTCTTCGACCTCAATCCTCA
		R_LYC1	AATGGTCACTTTCTGATATCTGATTAC
		F_LYC3	TACCTCCCTGAAGCCTCAAA
		R_LYC3	CAGCTTGTGAAACCTGCTGA
		F_LYC5	CTTGAATTTCTGCACCCACA
R_LYC5	CTTTCTTGGTACAGGCACA		
Chy (Anillo β hidroxilasa)	gi 114776235 gi 114777325 gi 114776212 gi 114776202 gi 76296810	F_CHY1	TCCAGCTTGGGAATTACGTC
		R_CHY1	ACAACGAAGCGTGCCATAG
		F_CHY3	CGGAGCGCTTCACTTATCTC
		R_CHY3	ACAACGAAGCGTGCCATAG
		F_CHY5	TGGCCTACATGTTTCGTCCAC
		R_CHY5	CTTCCAATTCCTTGGGTCTC
Zep (Zeaxanthin epoxidasa)	gi:114782715	F_ZEP1	GATGCATGGCCATAGAGGAT
		R_ZEP1	GCCCATGAATGATTCCAAC
		F_ZEP3	GTTGAGTCGGGAACCCCTAT
		R_ZEP3	ATCTCCCACCAACTGTTCCA
		F_ZEP5	GCTCGAATGGCTGCACTTAT
		R_ZEP5	ATTCATGGCAGCTCCAAT

La búsqueda de las secuencias de los genes de interés de ambas rutas metabólicas se realizó utilizando bibliografía y las bases de datos disponibles en el NCBI. Se buscaron preferentemente las

secuencias genómicas de las enzimas, aunque en muchos casos, sólo existen datos de los mRNA. Para la ruta de antocianinas, casi todos los genes cuentan con secuencias de mRNA para *Ipomoea batatas* y dentro del género están disponibles secuencias de genes completos. Sin embargo, para la ruta metabólica de carotenos, dentro del género *Ipomoea* o en particular para *Ipomoea batatas*, existen muy pocas secuencias en las bases de datos, sin embargo se cuenta con algunos mRNA de batata. Muchas de las secuencias utilizadas para el diseño de marcadores fueron obtenidas a partir de ESTs de *Ipomoea batatas* que la anotación GO asignó como posibles genes de nuestro interés. Los primers fueron diseñados de modo tal de amplificar las regiones correspondientes a los intrones, por ser regiones con mayor probabilidad de detectar polimorfismo (Ching *et al.* 2002). Nuestro objetivo principal fue la búsqueda de polimorfismo en la longitud de secuencia, que permita el análisis de variabilidad con un método sencillo sin necesidad de secuenciar. Se diseñaron para todos los intrones en aquellos casos donde el número de intrones fueran pocos y para algunos en aquellos que presentaran un alto número (más de 7 intrones). Los marcadores corresponden a las secuencias flanqueantes de los exones, lo que aumenta la posibilidad de tener una amplificación positiva dado que corresponden a regiones codificantes, altamente conservadas. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados para corroborar la identidad, permitiendo analizar el polimorfismo de secuencia y la estructura genómica así como definir tamaño y secuencia de intrones que no están disponibles en ninguna base de datos. La detección de polimorfismo tipo SNPs, abre la posibilidad al desarrollo de más marcadores a futuro. Para uno de los marcadores (DFR-1), el cambio de nucleótido origina un nuevo sitio de corte de una enzima de restricción. Esto permitirá el desarrollo de un marcador CAP de ese marcador que era monomórfico. Además, dado que los marcadores polimórficos fueron posteriormente analizados en cuanto a su segregación en una población de mapeo, se establecieron hipótesis en cuanto al número de loci amplificados con los marcadores diseñados, así como sobre la dosis o dosage de cada alelo.

Teniendo en cuenta que muchos de estos genes son familias génicas (localizadas en tándem) y la naturaleza hexaploide de *Ipomoea batatas*, es difícil asegurar si los alelos amplificados corresponden a un único loci o a diferentes loci de la familia génica. Para esto, resulta central poder identificar polimorfismo en todos los alelos amplificados que nos permitan localizarlos en un mapa y definir si se encuentran ligados (y por lo tanto pertenecen a diferentes loci) o se localizan en diferentes cromosomas.

Un punto a tener en cuenta es la cobertura del genoma de este tipo de marcadores. Particularmente porque al diseñar sobre los exones, nos estamos restringiendo a las regiones que contienen genes dentro de los genomas. Es sabido que en algunas especies vegetales, la proporción

de genes en el genoma es relativamente chica. En trigo por ejemplo se calcula que el 30% corresponde a genes mientras que el 70% son secuencias repetitivas y elementos retrotransposones, además a diferencia del arroz donde los genes están homogéneamente distribuidos, en trigo clusters de genes tienden a estar separados por largas regiones de elementos repetitivos (libre de genes) (Moolhuijzen *et al.* 2007). Para aportar información al respecto, el trabajo de Feltus *et al.* 2004 analiza la distribución de 6,062 pares de primers ILP a través de genoma de arroz donde puede observarse un enriquecimiento en la regiones de alta recombinación con gaps en las zonas cercanas al centrómero, una región rica en secuencias repetitivas (Feltus *et al.* 2006). El promedio de marcadores fue 1.06/Kb en eucromatina versus 0.32/Kb en la heterocromatina con una significancia estadística. Lo que sugiere que los ILP e ISNP son más frecuentes en las regiones eucromáticas. Esto más que restringir el uso de este tipo de marcadores, permite conocer bien sus limitaciones y ventajas para poder arribar a conclusiones certeras. Es necesario el uso de estos marcadores junto con marcadores que presenten una mejor distribución y cobertura del genoma.

5. Evaluación de Genes Candidatos en una colección núcleo de *Ipomoea batatas*: Análisis de diversidad y evaluación de su uso potencial para mapeo por asociación.

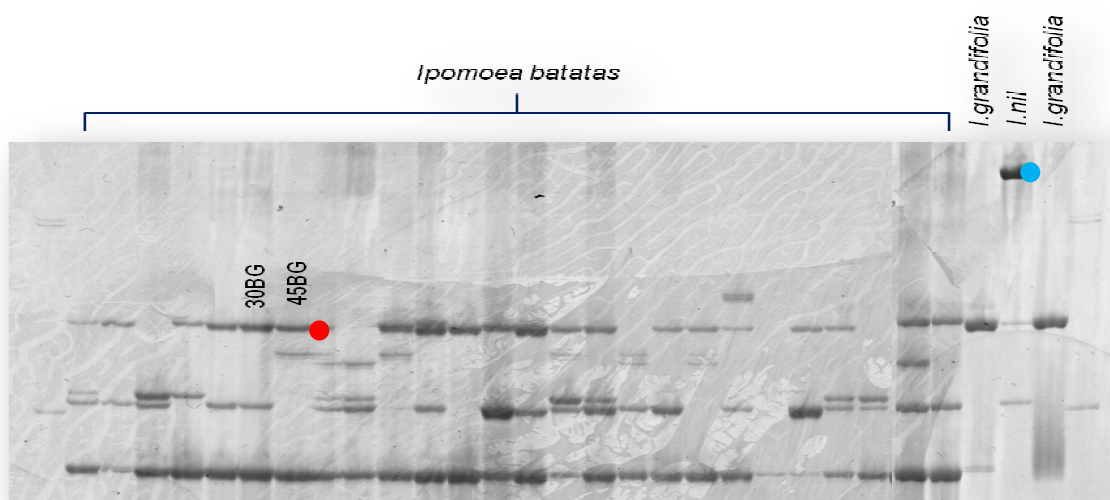
Los bancos de germoplasma conservan una gran diversidad de genotipos y poblaciones de diversas especies. La identificación y caracterización de las entradas conservadas las revaloriza, aportando información de gran utilidad no sólo para conservar de manera más eficiente, sino también para los fitomejoradores. La evaluación morfológica conjuntamente con la molecular permite la identificación de los materiales, la detección de duplicados y sinonimias, el estudio de la diversidad y de la estructura genética conservada. La caracterización de las entradas en cuanto a características de interés agronómico o nutricional acrecienta su utilidad. Un acercamiento con alto potencial es la evaluación de colecciones con marcadores relacionados con caracteres fenotípicos de interés. La utilización de marcadores desarrollados a partir de secuencias de genes candidatos tiene mayor probabilidad de estar involucrados en el control de un carácter de interés y por lo tanto también será mayor la probabilidad de éxito en la identificación de marcadores asociados útiles para el mejoramiento. La estrategia de genes candidatos desarrollada en este capítulo puede ser utilizada junto a marcadores neutros para mapeo por asociación.

Dieciséis (16) marcadores de genes candidatos fueron evaluados en una colección núcleo de *Ipomoea batatas*. Una colección núcleo es un set o sub-grupo que representa la diversidad genética de la colección completa (Frankel 1984). La colección núcleo de batatas cuenta con 40 genotipos

seleccionados de una colección de 380 entradas conservadas en el banco *in vitro* de germoplasma de *Ipomoea batatas* en el Instituto de Recursos Biológicos de INTA Castelar. La selección de los genotipos se realizó a partir de la caracterización de la colección mediante marcadores moleculares neutros como AFLP y SSR sumado a descriptores morfológicos (Manifesto *et al.* 2010).

La colección fue evaluada con los marcadores desarrollados en este trabajo, a fin de determinar su potencial uso como marcador funcional y evaluar la diversidad molecular de estos marcadores en genotipos no relacionados. La evaluación posterior de la colección completa permitiría avanzar en el mapeo por asociación de los genes candidatos. Algunos de los marcadores que no mostraron polimorfismo en la población de mapeo tampoco lo hicieron en la colección núcleo, evidenciando un alto nivel de conservación de dichos genes (LYC3, IPP1, IPP3). Otros presentan polimorfismo en los alelos caracterizados anteriormente como monomórficos o biparentales, así como nuevos alelos (DFR1, DFR2, LYC1, LYC5, CHY1, ANS1, ANS2, DFR5, PHY1, IPP7 y ZEP5). En la colección analizada fueron agregados tres genotipos de especies silvestres de *Ipomoea*: dos *Ipomoea grandifolia* e *Ipomoea nil* (Figura 44). En la figura 44 se detalla el ejemplo del DFR-2, donde se detectaron 5 alelos nuevos, dos exclusivos de las *Ipomoeas* silvestres y tres a *Ipomoea batatas*, ampliando de 4 a 9 los alelos amplificados para este gen y en algunos casos cambiando el status de alelo monomórfico a polimórfico, como es el caso del alelo marcado con un punto rojo. En algunos casos los nuevos alelos fueron los aportados por estas especies silvestres (punto celeste). Particularmente, los alelos aportados por *Ipomoea nil* fueron los que presentaban mayor diferencia de peso molecular con respecto a las obtenidas en *Ipomoea batatas*.

Figura 44. Alelos detectados mediante el marcador DFR-2 en la colección núcleo. Se indican las *Ipomoeas* silvestres amplificadas.



El análisis total, permitió contar con 67 alelos. Los marcadores CHY1 y DFR2 presentaron la mayor cantidad de bandas con 13 y 9 alelos.

Los marcadores desarrollados permitieron evaluar la diversidad funcional de la colección núcleo de *Ipomoea batatas*. Estos marcadores resultan aptos para realizar mapeo por asociación con la ventaja de ser marcadores génicos, en la cual se conoce la secuencia amplificada y es más probable la detección de asociación con las características de interés.

Se plantea como necesaria la caracterización de la secuencia de los nuevos alelos a fin de determinar la relación con las bandas ya secuenciadas. Además, la secuenciación permitirá desarrollar marcadores tipos SNPs para mapeo.

En relación a la transferibilidad de los marcadores desarrollados, fue posible evaluar la misma para once (11) marcadores, en ocho de los cuales se evidenció amplificación positiva (72%). Si bien ocho (8) alelos fueron exclusivos de las *Ipomoeas* silvestres, también se observaron alelos compartidos con *Ipomoea batatas* (Tabla 6).

La transferibilidad lograda con estos marcadores es alta y acorde a lo observado en Hu *et al.* 2004b. Donde marcadores EST-SSR desarrollados a partir de *Ipomoea trifida* presentan transferibilidad del 100% para *Ipomoea batatas*, 83% para *I. tiliacea*, 75% para *I. triloba* y 66.7% para *I. lacunosa*, respectivamente.

Tabla 6. Amplificación de genes candidatos en la colección núcleo de *Ipomoea batatas*. (*) Entre paréntesis indica alelos polimórficos aportados exclusivamente por *Ipomoeas* silvestres.

	Gen	Alelos	Rango pb.	Status	Alelos totales	Alelos x genotipo	Alelos monomórficos	Alelos Polimórficos*
1	DFR1	2	300-400pb	Polimórfico	29	1	-	2 (1)
2	DFR2	9	250-450pb	Polimórfico	113	3.05	1	8 (2)
3	DFR4	4	270-300pb	Polimórfico	68	1.7	1	3 (1)
4	DFR5	4	300-400pb	Polimórfico	39	2.05	0	4
5	LYC5	2	250pb	Polimórfico	39	1.05	1	1 (1)
6	LYC3	1	250pb	Monomórfico	38	1	1	-
7	LYC1	2	280pb	Polimórfico	33	1.26	1	1
8	CHY1	13	400-550pb	Polimórfico	175	4.37	-	13 (3)
9	ANS1	6	300-500pb	Polimórfico	62	1.78	-	6
10	ANS2	4	300-400pb	Polimórfico	63	1.57	-	4
11	ANS3	4	450-550pb	Polimórfico	46	1.24	-	4
12	IPP1	1	1000pb	Monomórfico	30	1	1	-
13	IPP3	1	300pb	Monomórfico	34	1	1	-
14	IPP7	4	590-610pb	Polimórfico	66	2	-	4
15	ZEP5	3	600pb	Polimórfico	49	1.44	1	2
16	PHY1	7	480-600pb	Polimórfico	85	2.74	-	7

La alta eficiencia en la transferibilidad indica que los sitios de unión de los marcadores posiblemente se encuentran conservada en el ADN genómico a lo largo de la historia evolutiva. Estos resultados indican que los marcadores GC podrían ser útiles en el mapeo comparativo entre batatas y sus silvestres relacionadas así como en el seguimiento de la introgresión de importantes características agronómicas desde las especies silvestres al germoplasma de batata.

Los marcadores de GC desarrollados en esta tesis, junto otros marcadores se espera poder aplicarlos en trabajos de mapeo por asociación de la colección de germoplasma de batata. La caracterización de la variación genética dentro de las poblaciones naturales y en líneas de mejoramiento resulta crucial para una efectiva conservación y explotación de los recursos para los programas de mejoramiento de los cultivos. Los marcadores moleculares han demostrado ser útiles para el análisis de la variación genética de la colecciones de germoplasma (Hausmann *et al.* 2004; Maccaferri *et al.* 2006). La evaluación de germoplasma con los genes candidatos aumenta la información funcional acerca de la colección, al evaluar genes que se transcriben y con función conocida.

El mapeo o asociación por desequilibrio de ligamiento (DL) en las especies cultivadas ha recibido una creciente atención en los últimos años debido a su potencial para obtener mapas más saturados con características de interés y para el desarrollo de marcadores funcionales. A través de la utilización de poblaciones con pedigree desconocido donde los eventos de recombinación han ido ocurriendo por muchas generaciones es posible generar mapas más refinados que mediante familias F2 o backcross (Flint-García *et al.* 2003). Este método tiene el potencial de proveer marcadores útiles para la selección asistida por marcadores (MAS) de los programas de mejoramiento. Primero fue utilizado como un acercamiento a los genes candidatos en plantas por Thornsberry *et al.* (2001), quién demostró asociación entre las variantes alélicas y el tiempo de floración en el gen Dwarf8 en maíz. Esto fue continuado por otros análisis en maíz (Yu *et al.* 2006), arroz (Bao *et al.* 2006), *Arabidopsis thaliana* (Aranzana *et al.* 2005), cebada (Kraakman *et al.* 2006), y trigo (Bresghehlo & Sorrells 2006).

La exploración y análisis de bases de datos de ESTs de Ipomoea batatas así como de otras especies ha permitido la identificación de los genes de interés para el desarrollo de marcadores génicos. Los conocimientos desarrollados por la comunidad científica previamente relacionados tanto en la comprensión de las rutas metabólicas así como en la estructura y secuencia de los genes de interés es la base de este trabajo. Las relaciones de sintenia, microsintenia y colinealidad resultan conceptos centrales.

Conclusiones

Se obtuvieron 30 marcadores génicos de 10 genes relacionados con la síntesis de pigmentos.

La estrategia utilizada de búsqueda de polimorfismo en la longitud de los intrones de genes candidatos permitió obtener marcadores génicos polimórficos para 8 genes de los 12 analizados.

Se avanzó en el conocimiento de la estructura de los genes de interés, definiendo tamaño, posición y secuencia de exones e intrones de los genes candidatos.

Se detectaron numerosos elementos móviles completos y delecionados en los intrones, muchos ya descritos en otras Ipomoeas.

Se definieron las dosis alélicas de genes candidatos.

La secuenciación de los genes candidatos permitirá avanzar en el desarrollo de marcadores tipo SNP, CAPs y SSR.

Se detectaron secuencias en las bases de datos sin identificar que corresponden a genes de interés.

Se detectó un EST que podría corresponder al mRNA del gen Capsantina/capsorubina Sintasa (CCS) que aún no fue descrito en *Ipomoea batatas*.

Los marcadores de genes candidatos presentan una alta transferibilidad hacia especies silvestres del género *Ipomoea*.

Los marcadores desarrollados resultan aptos para el desarrollo de mapas de ligamientos y para mapeo por asociación.

No fue posible obtener marcadores para los genes CHS y GGPP.

Bibliografía

- Aitken Susan M., Sylvie Attucci, Ragai K. Ibrahimn & Patrick J. Gulick. 1995. A cDNA Encoding Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase from White Lupin. *Plant Physiology* 108: 837-838
- Alquezar Berta, Lorenzo Zacarias & Maria J. Rodrigo. 2009. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene b-cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany* 60(6):1783-1797
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Aksamit-Stachurska Anna, Alina Korobczak-Sosna, Anna Kulma & Jan Szopa. 2008. Glycosyltransferase efficiently controls phenylpropanoid pathway. *BMC Biotechnology* 8:25.
- Badillo A, Steppuhn J, Deruère J, Camara B, Kuntz M. 1995. Structure of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Capsicum annum*. *Plant Mol Biol.* 27(2):425-8.
- Bantignies B, Liboz T & Ambid C. 1996. Nucleotide sequence of a *Catharanthus roseus* geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene. *Plant Physiology* 110:336.
- Bartley G.E. & Scolnik P.A. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, attraction and human health. *Plant Cell* 7:1027-1038.
- Botella-Pavía Patricia & Manuel Rodríguez-Concepción. 2006. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum* 126(3):369-381.
- Bradley, J.M., Davies, K.M., Deroles, S.C., Bloor, S.J., Lewis, D.H. 1998. The maize Lc regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *Plant Journal* 13:381–392.
- Choi Jeong-Doo, Atsushi Hoshino, Kyeong-I Park, In-Sook Park & Shigeru Iida. 2007. Spontaneous mutations caused by a Helitron transposon Hel-It1, in morning glory, *Ipomoea tricolor*. *The Plant Journal* 49:924-934.
- Chopra S, Hoshino A, Boddu J & Iida S. 2006. Flavonoid pigments as tools in molecular genetics. In: Glotewold E (ed) *The science of flavonoids*. Springer, New York 147-173.
- Clegg M. T. & Durbin M. L. 2000. Flower color variation: A model for the experimental study of evolution. *PNAS* 97(13)7016-7023.
- Conesa Ana, Stefan Götz, Juan Miguel García-Gómez, Javier Terol, Manuel Talón & Montserrat Robles. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676.
- Cunningham, F. X., B. Pogson, Z. R. Sun, K. A. McDonald, D. DellaPenna & E. Gantt. 1996. Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8:1613-1626.

- Cunningham, Jr. F. X. & Gantt E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant. Mol. Biol.* 49:557-583.
- Cunningham F.X. & Gantt E. 2000. Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiology* 41:119-123.
- De Jong W.S., De Jong D.M., De Jong H., Kalazich J. & Bodis M. 2003. An allele of dihydroflavonol 4-reductase associated with the ability to produce red anthocyanin pigments in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical Applied Genetic* 107:1375-1383.
- De Jong W.S., Eannetta N.T. & De Jong D.M. 2004. Candidate gene analysis of anthocyanin pigmentation loci in the *Solanaceae*. *Theoretical Applied Genetic* 108:423-342.
- Doyle J.J, Doyle J.L (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Durbin Mary L., Amy L. Denton & and Michael T. Clegg. 2001. Dynamics of mobile element activity in chalcone synthase loci in the common morning glory (*Ipomoea purpurea*). *PNAS* 98(9):5084-5089.
- Durbin Mary L., Karen E. Lundy, Peter L. Morrell, Claudia L. Torres-Martinez & Michael T. Clegg 2003. Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:507-518.
- Durbin, M.L., McCaig, B., Clegg, M.T., 2000. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Mol. Biol.* 42:79-92.
- Durbin M.L., Gerald H.Learn, Gavin A. Huttley & Micheal T. Clegg. 1995. Evolution of the chalcone synthase gene family in the genus *Ipomoea*. *PANS* 92:3338-3342.
- Epperson, B.K., Clegg, M.T., 1987. Instability at a flower color locus in the morning glory. *Journal Heredity* 78:346-352.
- Frankel OH. 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: Arber WK, Llimensee K, Peacock WJ, Starlinger P. (eds). *Genetic manipulation: impact on man and society*. Cambridge University Press, Cambridge 161-170.
- Fraser L.G., C.F. Harvey, R.N. Crowhurst & H.N. De Silva. 2004. EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theor Appl Genet* 108:1010-1016.
- Fraser P.D. & P.M.Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43:228-265.
- Galpaz Navot, Gil Ronen, Zehava Khalfa, Dani Zamir & Joseph Hirschberg. 2006. A Chromoplast-Specific Carotenoid Biosynthesis Pathway Is Revealed by Cloning of the Tomato white-flower Locus. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.105.039966.
- Gang D.R., J. Wang, N. Dudareva, K.H. Nam, J.E. Simon, E. Lewinsohn & E. Pichersky. 2001. An Investigation of the Storage and Biosynthesis of Phenylpropenes in Sweet Basil. *Plant Physiology* 125:539-555.

- Giorio G., Stigliani A.L & D'Ambrosio C. 2008. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J.* 275(3):527-35.
- Giovannucci E. Lycopene protaste cancer risk. 2002. Methodological consideration in the epidemiology literature. *Pure Appl. Chem* 74:1427-1434.
- Hagenimana V. & Low J. (2000) Potential of orange-fleshed sweet potatoes for raising vitamin A intake in Africa. *Food Nutrit Bull* 21:414-418.
- Hausmann BI, Hess DE, Omany GO, Folkertsma RT, Reddy BV, Kayentao M, Welz HG & Geiger HH. 2004. Genomic regions influencing resistance to the parasitic weed *Striga hermonthica* in two recombinant inbred populations of sorghum. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1005-1016.
- Heslop-Harrison J. S. 2000. Comparative Genome Organization in Plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *The Plant Cell* 12:617-635.
- Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 4:210-218.
- Hirschhorn Joel N. & Mark J. Daly. 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics* 6:95-108.
- Holton Timothy A. & Edwina C. Cornish. 1995. Genetics and Biochemistry of Ant hocyanin Biosynthesis. *The Plant Cell* 7:1071-1083.
- Hoshino Atsushi, Kyeong-I Park & Shigeru Iida. 2009. Identification of r mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory (*Ipomoea nil*). *Journal Plant Res* 122:215-222.
- Huang J.C. & M. Sun. 2000. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 100:1050-1060.
- Huh J.H., Kang B.C, Nahm S.H., Kim S., Ha K.S., Lee M.H. & Kim B.D. 2001. A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*capsicum* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* 102:524-530.
- Iida S, Hoshino A, Johzuka-Hisatomi Y, Habu Y & Inagaki Y. 1999. Floricultural traits and transposable elements in the Japanese and common morning glories. *Annals of the New York Academy of Sciences* 18(870):265-274
- Inagaki Yoshishige, Yasuyo Johzuka-Hisatomi, Tomoko Mori, Sakiko Takahashi, Yasuo Hayakawa, Surin Peyachoknagul, Yoshihiro Ozeki & Shigeru Iida. 1999. Genomic organization of the genes encoding dihydroflavonol 4-reductase for flower pigmentation in the Japanese and common morning glories *Gene* 226:181-188.
- Johzuka-Hisatomi, Y., Hoshino, A., Mori, T., Habu, Y. & Iida, S. 1999. Characterization of the Chalcone Synthase Genes Expressed in flowers of the Common and Japanese Morning Glories. *Genes & Genetics Systems* 74:141-147.

Jung CS, Griffiths HM, De Jong DM, Cheng S,. & De Jong WS. 2005. The potato plocus codes for flavonoid 3', 5'-hydroxylase. *Theoretical and Applied Genetics* 110:269-275.

Just B. J., C. A. F. Santos, M. E. N. Fonseca, L. S. Boiteux, B. B. Oloizia & P. W . Simon. 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 114:693-704.

Kim Sunggil, Yoo Kil-Sum y Pike Leonard. 2005. Development of a codominant PCR-based marker for allelic selection of the pink trait in onions (*Allium cepa*), based on the insertion mutation in the promoter of the anthocyanidin synthase gene. *Theoretical and Applied Genetics* 110:573-578.

Kosambo LM, Carey E, Misra AK, Wilkes J. & Hagenimana V. 1998. Influence of age, farming site, and boiling on pro-vitamin A content in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) storage roots. *Journal Food Comp Analysis* 11:305-321.

Kuntz M, Römer S, Suire C, Hugueney P, Weil JH, Schantz R. & Camara B. 1992. Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant Journal* 2:25-34.

Lange, B.M. and Croteau, R. 1999. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reducto isomerase from peppermint. *Arch. Biochem. Biophys.* 365:170-174.

Lange, B.M., Wildung, M.R., McCaskill, D. and Croteau, R. 1998. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *PNAS* 95:2100-2104.

Le Quang Hien, Stephen Wright, Zhihui Yu & Thomas Bureau. 2000. Transposon diversity in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* vol. 97(13):7376-7381.

Laferrrière André & Peter Beyer. 1991. Purification of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Sinapis alba* etioplasts. *Protein Structure and Molecular Enzymology* 1077(2):167-172.

Li Faqiang, Ratnakar Vallabhaneni & Eleanore T. Wurtzel. 2008. PSY3, a New Member of the Phytoene Synthase Gene Family Conserved in the Poaceae and Regulator of Abiotic Stress-Induced Root Carotenogenesis. *Plant Physiology* 46:1333-1345.

Li Li, Dominick J. Paolillo, Mandayam V. Parthasarathy, Elena M. DiMuzio & David F. Garvin. 2001. A novel gene mutation that confers abnormal patterns of b-carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *The Plant Journal* 26(1):59-67.

Liao Zhihua, Min Chen, Yijian Yang, Chunxian Yang, Yufan Fu, Qitang Zhang & Qiang Wang. 2008. A new isopentenyl diphosphate isomerase gene from sweet potato: cloning, characterization and color complementation. *Biologia* 63(2):221-226.

Lu Qi-Neng & Qing Yang. 2006. cDNA cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in wild potato (*Solanum pinnatisectum*). *African Journal of Biotechnology* 5(10):811-818.

- Lu Shan & Li Li. 2008. Carotenoid Metabolism: Biosynthesis, Regulation, and Beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(7):778-785.
- Maccaferri M, Sanguineti MC, Natoli E, Araus-Ortega JL, Ben Salem M, Bort J, Chenenaoui S, Deambrogio E, Garcia DML. & De Montis A. 2006. A panel of elite accessions of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) Suitable for association mapping studies. *Plant Genet Res* 4:79-85.
- Mares-Perlman J.A., Miller A.E., Ficek T.L. & Hankinson S.E. 2002. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. *Journal Nutrition* 132:518S-524S.
- Martin C., Prescott A., Mackay S., Bartlett J. & Vrljlandt E. 1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1:37-49.
- Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima S, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T. & Goto S,. 2006. EGAssembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.*34:W459-62.
- Matsumura H., S. Watanabe, K. Harada M. Senda S. Akada, S. Kawasaki, E. G. Dubouzet, N. Minaka & R. Takahashi. 2005. Molecular linkage mapping and phylogeny of the chalcone synthase multigene family in soybean. *Theor Appl Genet* 110:1203-1209.
- Nakamura A., Shimada H., Masuda T., Ohta H. & Takamiya K. 2001. Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco. *FEBS Letter* 506:61-64.
- Nitasaka Eiji. 2003. Insertion of an En/Spm-related transposable element into a floral homeotic gene DUPLICATED causes a double flower phenotype in the Japanese morning glory. *The Plant Journal* 36:522-531.
- Ogata H, S Goto, K Sato, W Fujibuchi, H Bono & M Kanehisa. 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 27(1):29–34.
- Ohlrogge John & Christoph Benning. 2000. Unraveling plant metabolism by EST analysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:224-228.
- Ohyanagi H, Tanaka T, Sakai H, Shigemoto Y, Yamaguchi K, Habara T, Fujii Y, Antonio BA, Nagamura Y, Imanishi T, Ikeo K, Itoh T, Gojobori T & Sasaki T. 2006. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. japonica genome information. *Nucleic Acids Res.* Jan 1:34.
- Okada K, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M, & Kamiya Y. 2000. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122(4):1045-56.
- Pflieger Stephanie, Veronique Lefebvre & Mathilde Causse. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review *Molecular Breeding* 7:275-291.

Phillips Michael A., John C. D'Auria, Jonathan Gershenzon & Eran Pichersky. 2008. The Arabidopsis thaliana Type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases Are Targeted to Multiple Subcellular Compartments and Have Overlapping Functions in Isoprenoid Biosynthesis. *The Plant Cell* 20:677-696.

Rajapakse Sriyani, Sasanda D. Nilmalgoda, Matthew Molnar, Robert E. Ballard, Daniel F. Austin & Janice R. Bohac. 2004. Phylogenetic relationships of the sweetpotato in Ipomoea series Batatas (Convolvulaceae) based on nuclear b-amylase gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:623-632.

Rausher MD 2006. The evolution of flavonoids and their genes. En E. Grotewold, ed. *The science of flavonoids*. Springer, Berlin. Pgs. 175-211.

Reese MG, Eeckman, FH, Kulp, D, & Haussler, D, 1997. Improved Splice Site Detection in Genie. *J. Comp. Biol.* 4(3):311-23.

Romer Susanne & Paul D. Fraser. 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta* 221:305-308.

Rothschild M & Soller M. 1997. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe* 8:13-20.

Rozen S. & Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132:365-86.

Santos C.A.F. & Simon P.W. 2002. QTL analysis reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes and lycopene in carrot roots. *Mol Genet Genomics* 268:122-129.

Scolnik P.A. & Bartley G.E. 1994. Nucleotide sequence of an Arabidopsis cDNA for geranylgeranyl pyrophosphate synthase. *Plant Physiol.* 104:1469-70.

Scolnik P.A. & Bartley G.E. 1995. Nucleotide sequence of a putative geranylgeranyl pyrophosphate synthase (Gen-Bank L40577) from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 108:1342.

Scolnik P.A. & Bartley G.E. 1996. Two more members of an Arabidopsis geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene family (Accession Nos.U44876 and U44877). *Plant Physiol.* 110:1435.

Seki M, Narusaka M, Kamiya A, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Oono Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y, Kawai J, Carninci P, Itoh M, Ishii Y, Arakawa T, Shibata K, Shinagawa A, & Shinozaki K. 2002. Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection. *Science* 5:296 (5565).

Shimada Norimoto, Toshio Aoki, Shusei Sato, Yasukazu Nakamura, Satoshi Tabata & Shin-ichi Ayabe. 2003. A Cluster of Genes Encodes the Two Types of Chalcone Isomerase Involved in the Biosynthesis of General Flavonoids and Legume-Specific 5-Deoxy(iso)flavonoids in Lotus japonicus. *Plant Physiol.* 131:941-951.

Sommer H. & Seadler H. 1986. *Mol. Gen. Genet.* 202:429-434.

Srisuwan Saranya, Sihachakr Darasinh & Siljak-Yakovlev Sonja. 2006. The origin and evolution of sweetpotato (*Ipomoea batatas* Lam) and its wild relatives through the cytogenetic approach. *Plant Science* 171:424-433.

Stein, N., C. Feuillet, T. Wicker, E. Schlagenhauf & B. Keller. 2000. Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the Lr10 resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(24):13436-13441.

Sterky Fredrik, Sharon Regan, Jan Karlsson, Magnus Hertzberg, Antje Rohde, Anders Holmberg, Bahram Amini, Rupali Bhalerao, Magnus Larsson, Raimundo Villarroel, Marc Van Montagu, Go Ran Sandberg, Olof Olsson, Tuula T. Teeri, Wout Boerjan, Petter Gustafsson, Mathias Uhle´N, Bjorn Sundberg & Joakim Lundeberg. 1998. Gene Discovery In The Wood-Forming Tissues Of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags. *PNAS* 95:13330-13335.

Tadmor Y , S. King, A. Levi, A. Davis, A. Meir, B. Wasserman, J. Hirschberg & E. Lewinsohn. 2005. Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. *Food Research International* 38:837-841.

Takahashi R, Githiri SM, Hatayama K, Dubouzet EG, Shimada N, Aoki T, Aoki T, Toda K, & Matsumura H. 2007. A single-base deletion in soybean flavonol synthase gene is associated with magenta flower color. *Plant Mol Biol* 63:125-135.

Tanaka M, Nakatani M, Nakazawa Y, & Takahata Y. 2004. Structural characterization of the dihydroflavonol 4-reductase B (DFR-B) gene in the sweet potato. *DNA Sequence* 15(4):277-282.

Tanaka Yoshikazu, Nobuhiro Sasaki & Akemi Ohmiya. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and Carotenoids. *The Plant Journal* 54:733-749.

Thorup TA, Tanyolac B, Livingsstone KD, Popovsky S, Paran I. & Jahn Molly. 2000. Candidate gene analysis of organ pigmentation loci in the Solanaceae. *PNAS* 97(21): 11192-11197.

Tian AG, Wang J, Cui P, Han YJ, Xu H, Cong LJ, Huang XG, Wang XL, Jiao YZ, Wang BJ, Wang YJ, Zhang JS, & Chen SY. 2004. Characterization of soybean genomic features by analysis of its expressed sequence tags. *Theor Appl Genet*.108(5):903-13.

Toda K, Yang DJ, Yamanaka N, Watanabe S, Harada K. & Takahashi R. 2002. A singlebase deletion in soybean flavonoid 3 '-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color. *Plant Mol Biol* 50:187-196.

Tomita N. R., Suzuki G., Yoshida K, Yano Y., Tsuchiya T., Kakeda K., Mukai Y. & Kowyama Y. 2004. Molecular characterization of a 313-kb genomic region containing the self-incompatibility Locus of *Ipomoea trifida*, a diploid relative os sweetpotato. *Breeding Science* 54:165-175.

- Vallabhaneni R., C. E. Gallagher, N. Licciardello, A. J. Cuttriss, R. F. Quinlan & E. T. Wurtzel. 2009. Metabolite sorting of a germoplasm collection reveals the Hydroxylase3 Locus as a new target for Maize provitamin A biofortification. *Plant Physiology* 151:1635-1645.
- van Tunen A. J., R. E. Koes, C. E. Spelt, A. R. van der Krol, A. R. Stuitje & J. N.M. Mol. 1988. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *The EMBO Journal* 7(5):1257-1263.
- Wallace B. (1968): In: *Topics in Population Genetics*. Norton, New York. 213-214.
- White J. A., J. Todd, T. Newman, N. Focks, T. Girke, O. Martínez de Ilárduya, J. G. Jaworski, J. B. Ohlrogge & C. Benning. 2000. A New Set of Arabidopsis Expressed Sequence Tags from Developing Seeds. The Metabolic Pathway from Carbohydrates to Seed Oil. *Plant Physiology* 124(4):1582-1594.
- Yamaguchi T, Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Saito N, Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Kusumi T. & Iida S. 2001. Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol.* 42(5):451-61.
- Yamamoto Chihiro, Sanae Kishimoto & Akemi Ohmiya. 2010. Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during *Ipomoea* petal development. *Journal of Experimental Botany* 61(3):709–719.
- Yan L.; Loukoianov A.; Tranquilli G.; Helguera M.; Fahima T. & J. Dubcovsky. 2003. Positional cloning of wheat vernalization gene VRN1. *PNAS* 100:6263-6268.
- Ya-Qin Lang, Yanagawa S., Sasanuma T. & Sasakuma T. 2004. Orange Fruit color in capsicum due to deletion of capsanthin-capsorubin synthesis gene. *Breeding Science* 54:33-39.
- Zhang Y. & Stommel J. R. 2000. RAPD and AFLP tagging and mapping of Beta (B) and Beta modifier (MoB), two genes which influence b-carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Theor. Appl. Genet.* 100:368-375.
- You MK, Hur CG, Ahn YS, Suh MC, Jeong BC, Shin JS, & Bae JM. 2003. Identification of genes possibly related to storage root induction in sweetpotato. *FEBS Letters* 536:101-105.
- Zufall R. A. & M. D. Rausher. 2003. The Genetic Basis of a Flower Color Polymorphism in the Common Morning Glory (*Ipomoea purpurea*). *Journal of Heredity* 94(6):442-448.
- Andersen JR, Lubberstedt T. 2003. Functional markers in plants. *Trends Plant Science* 8:554-560.
- Johzuka-Hisatomi Y., Hoshino A., Mori Y., Habu Y. & Iida, S., 1999. Characterization of the chalcone synthase genes expressed in flowers of the common and Japanese morning glories. *Genes Genet. Syst.* 74:141-147.
- Ching A., K. S. Caldwell, M. Jung, M. Dolan, O. S (Howie) Smith, S. Tingey, M. Morgante & A. J. Rafalski. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics* 3:19.

Wei H, Fu Y & Arora R. 2005. Intron-flanking EST-PCR markers: from genetic marker development to gene structure analysis in *Rhododendron*. *Theoretical and Applied Genetics* 111(7):1347-1356.

Wang Xusheng, Xiangqian Zhao, Jun Zhu & Weiren Wu. 2005. Genome-wide Investigation of Intron Length Polymorphisms and Their Potential as Molecular Markers in Rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 12:417-427.

Moolhuijzen P., D. S. Dunn, M. Bellgard, M. Carter, J. Jia, X. Kong, B. S. Gill, C. Feuillet, J. Breen & R. Appels. 2007. Wheat genome structure and function: genome sequence data and the International Wheat Genome Sequencing Consortium. *Australian Journal of Agricultural Research* 58:470-475.

4

**Caracterización
Morfológica y
Bioquímica de una
población de mapeo de
Ipomoea batatas L. Lam**

Carla Marcela Arizio

Resumen

La población segregante y sus parentales fueron caracterizados para diferentes variables relacionadas con los principales pigmentos identificados en *Ipomoea batatas*. En la progenie fue observada una amplia gama de colores en la piel y la pulpa. La piel presentó colores crema, amarillo, naranjas, rosas y morados. Mientras que en la pulpa se observaron blanco, crema, amarillos y naranjas. La intensidad y distribución del pigmento naranja en la pulpa fue heterogéneo. Color visual, color objetivo y contenido de β -caroteno en piel y pulpa mostraron una distribución continua. Para todas las variables, los padres mostraron diferencias significativas a lo largo de los tres años ensayados. Se observaron genotipos con valores superiores e inferiores a lo parentales. El parental 45BG que fue caracterizado visualmente con presencia de antocianinas en piel, también fue detectado que presenta carotenos, los mismos se encuentran enmascarados por las antocianinas. La presencia de ambos pigmentos subestima la caracterización visual de la presencia de carotenos en la piel. Se observó relación lineal entre el valor a^* y L con el contenido de β -caroteno para la pulpa, no así para la piel donde ninguna variable presenta una relación específica. La evaluación de β -caroteno fue realizada mediante dos metodologías (UV y HPLC), ambas aportaron la misma información, aunque los valores obtenidos por UV sobreestiman el contenido de β -caroteno al evaluar carotenos totales.

Introducción

Las frutas y vegetales son ricas en fitoquímicos, como pigmentos y compuestos fenólicos. Las batatas (*Ipomoea batatas* L. Lam) son ricas en fibras dietarias, minerales, vitaminas y antioxidantes, como los ácidos fenólicos, tocoferoles, antocianinas y carotenos (Woolfe 1992). Además, algunos de ellos proveen el color distintivo de los diferentes órganos en plantas. El color es uno de los atributos más importantes tenidos en cuenta por los consumidores al adquirir frutas y hortalizas (Marsili *et al.* 1996). El interés de los consumidores en productos con alto contenido de pigmentos se ha incrementado en las últimas décadas, en parte debido a cuestiones relacionadas con la apariencia de frutas y hortalizas y en parte debido a que se perciben como beneficiosos por sus propiedades antioxidantes que ayudan a reducir el riesgo de enfermedades crónicas. Si bien son tres los principales pigmentos en plantas, solo las antocianinas y carotenos son considerados de relevancia. En batata, los carotenos y antocianinas son los principales pigmentos reportados y su importancia reside principalmente en sus propiedades funcionales como proveedores de colorantes naturales y capacidad antioxidante. Debido a su estructura, capturan e inactivan radicales libres o especies reactivas de oxígeno. Los carotenos y antocianinas pueden estar presentes en el mismo órgano y su combinación aumenta la variedad de color.

1. Carotenos

Los carotenoides son compuestos isoprenoides y se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y microorganismos, son un componente esencial del fotosistema y confiere la coloración amarillo-rojo de flores y frutas. Su naturaleza liposoluble hace que su actividad antioxidante sea ejercida principalmente en la capa interna de las membranas biológicas. En batatas naranjas, el β -caroteno aparece como el carotenoide mayoritario, pero en las batatas de pulpa clara, otros carotenoides pueden ser los que estén presentes en mayor cantidad (Hagenimana *et al.* 1999; Kays, 1992). La ingesta de carotenoides está asociada con un amplio rango de beneficios para la salud humana (Beatty *et al.* 2004; Humphrey *et al.* 1992; Yeum & Russell, 2002), el principal está dado por el β -caroteno, el más importante precursor dietario de la vitamina A. La deficiencia de esta vitamina lleva a la ceguera y muerte prematura en humanos (Mayne, 1996). Se estima que la deficiencia de vitamina A causa 1.2 millones de muertes por año, principalmente en niños entre uno y cuatro años de edad (Humphrey *et al.* 1992). Varios estudios han aportado para visualizar el potencial rol de las batatas con alto contenido de β -caroteno para la prevención de esta deficiencia, en particular en el

Africa Sub-Sariana (Hagenimana *et al.* 1999; Jalal *et al.* 1998; Low *et al.* 2001; van Jaarsveld *et al.* 2005).

Típicamente todos los carotenoides pertenecen al gran grupo químico de los terpenoides, siendo mayoritariamente tetraterpenos: compuestos de C₄₀ constituidos de ocho unidades de isopreno C₅. La estructura del carotenoide es lo que define su función biológica. El patrón distintivo de enlaces dobles y simples alternados en su esqueleto es lo que permite absorber energía proveniente de otras moléculas, mientras que sus terminales específicas influyen su polaridad. La primera característica se encuentra relacionada con su capacidad antioxidante y la coloración, mientras que la segunda con su localización en membranas. En plantas, los carotenoides resultan esenciales para la fotosíntesis como pigmentos accesorios en la absorción de luz y como fotoprotectores, formando complejos con los radicales libres como las especies de oxígeno libre. La longitud del cromóforo determina su espectro de absorción y por lo tanto su color al ojo humano. Todos ellos se basan en siete diferentes grupos terminales, de los cuales sólo cuatro fueron encontrados en plantas superiores. Los colores de la mayoría de los carotenos (Figura 1) resultan de la absorción de luz por los cromóforos de siete o más enlaces conjugados (Cunningham & Gantt, 1998) así, mientras el carotenoide incoloro denominado **Fitoeno**, que solo posee tres enlaces conjugados, absorbe luz ultravioleta, los carotenos más insaturados como el **Licopeno**, con 11 enlaces conjugados, absorben longitudes de onda visibles, dando una tonalidad rojiza/rosada.

Figura 1: Coloración de los diferentes carotenoides expresados en plantas (Cunningham & Gantt, 1998)



Los carotenoides más complejos, sufren la ciclización del esqueleto carbonado lineal que puede ocurrir en uno o ambos extremos de la molécula. Adicionalmente, pueden ocurrir modificaciones

que involucren cambios en la elongación o degradación de la cadena. Todos los carotenoides derivan del compuesto Fitoeno (Howitt & Pogson, 2006). Considerando los elementos químicos presentes en sus moléculas, los carotenoides pueden dividirse en dos grandes grupos: carotenos, que son hidrocarburos, y xantófilas, que contienen átomos de oxígeno. Éste puede estar presente en forma de grupo hidroxilo (zeinoxantina, lactucaxantina, etc.), metoxilo (esferoidenona, espiriloxantina, etc.), epóxido (anteraxantina, licopeno-1,2-epóxido, etc.), carbonilo (capsantina, esferoidenona, etc.) o carboxilo (norbixina, neurosporaxantina, etc.), principalmente. Otros grupos oxigenados presentes en carotenoides son acetatos (fucoxantina, dinoxantina, etc.), lactonas (peridinina, uriólido, etc.) y sulfatos (caloxantina-3-sulfato, nostoxantina-3-sulfato, etc.) (Melendez-Martinez *et al.* 2007). Los carotenoides se localizan en los vegetales en diferentes plástidos como los cromoplastos, amiloplastos, elioplastos, leucoplastos y etioplastos (Howitt & Pogson, 2006). La coloración que ellos proveen, atraen animales e insectos que permiten la polinización y dispersión de semillas, jugando un rol central en la reproducción de las plantas. Los carotenoides muestran diferentes concentraciones dependiendo del órgano de la planta y de la especie, dando origen a la gran diversidad de coloración que se observa. Si bien las hojas y tallos se observan de color verde, los pigmentos carotenoides también se encuentran allí pero enmascarados por la clorofila. En los tejidos verdes el perfil de carotenoides resulta similar en diferentes especies, mientras que en los tejidos no-verdes, es donde se exhibe una composición distintiva y particular de cada una (Tanaka *et al.* 2008). En los frutos del tomate (*Solanum lycopersicum*) se acumula gran cantidad de Licopeno (Fraser *et al.* 1994); Capsantina, Capsorubina y Ketocarotenoides son típicos de ajíes rojos (*Capsicum annuum*) (Hornero-Méndez *et al.* 2000) y en las raíces engrosadas de batata (*Ipomoea batatas L. Lam*) y en zanahoria (*Daucus carota*) se acumula principalmente β -caroteno (Baranska *et al.* 2006 y Hagenimana *et al.* 1999). Más del 90% de los carotenoides de los pétalos de los crisantemos (*Chrysanthemum x morifolium*) y caléndulas (*Tapetes sp*) son luteína o derivados de luteína (Tanaka *et al.* 2008).

Además del rol central en los diversos procesos fisiológicos y de reproducción de los vegetales, muchos de los carotenoides, presentan propiedades relacionadas con la salud humana y actúan en un amplio rango de actividades biológicas esenciales y bien documentadas. Debido a su actividad antioxidante y neutralizadora de radicales libres (Grassmann *et al.* 2002), pueden modular la patogénesis de determinados tipos de cáncer (van Poppel & Goldbohm, 1995) y enfermedades coronarias (Kritchevsky, 1999). La ingesta en particular de Licopeno, está asociada a una disminución de la incidencia de cáncer de próstata (Giovannucci, 1999), mientras que altos niveles de β -caroteno, fue correlacionada con la reducción del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón

(Block *et al.* 1992). Por otra parte, las xantófilas, luteína y zeaxanthin proveen protección contra la degeneración relacionada con la edad, mediada por su habilidad de “atrapar” (quench) oxígeno singlete y la luz azul en la retina (Ma & Xiao-Ming, 2010). Una revisión general del rol de los carotenoides en la salud humana fue realizada por Fraser & Bramley (2004).

La característica más reconocida y quizás de mayor interés en relación con la nutrición humana, es la capacidad de ciertos carotenoides de ser convertidos en Retinol y en precursores de la vitamina A, esta capacidad viene dada por la presencia del anillo beta. Estos carotenoides, conocido como pro-vitamina A totalizan más de 50, de los cuales el β -caroteno es quien aporta la mayor actividad pro-vitamina A, debido a la presencia de dos anillos beta, mientras que α -caroteno y γ -caroteno aportan la mitad. Cuando estos compuestos son ingeridos en la dieta, son clivados en el intestino para formar el Retinol.

Con respecto a su nomenclatura, tradicionalmente, los carotenoides se nombraron en función de la fuente de la que se aislaron por primera vez. Así, el término Caroteno proviene del nombre científico de la zanahoria (*Daucus carota* L.), mientras que los pigmentos aislados del pensamiento (*Viola tricolor* L.) y algunas algas del género *Fucus* se denominaron Violaxantina y Fucoxantina, respectivamente. En la actualidad también se usa una nomenclatura semi-sistemática que proporciona información estructural (Tabla 1). Se consideran las dos mitades de la molécula del carotenoide y el compuesto se nombra como derivado del caroteno correspondiente, especificándose los grupos terminales mediante letras griegas. Los cambios en el nivel de hidrogenación y la presencia de sustituyentes se indican mediante el empleo de prefijos y sufijos.

Tabla 1. Nomenclatura de carotenoides

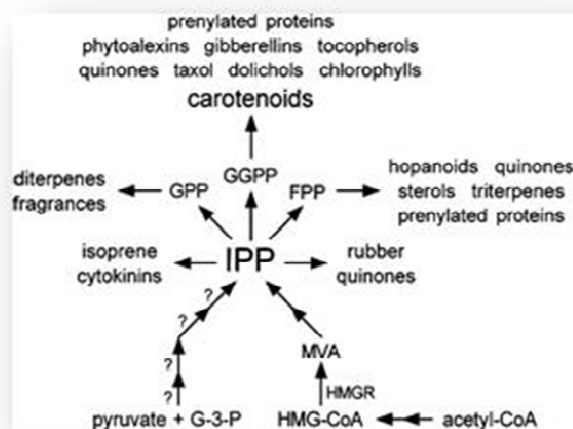
Trivial name	Systematic name
Phytoene	7,8,11,12,7',8'11',12'-Octahydrolycopene
ζ -Carotene	7,8,7',8'-Tetrahydrolycopene
δ -Carotene	(6R)- ϵ - ψ -Carotene
α -Carotene	(6R)- β - ϵ -Carotene
Lactucaxanthin	(3S, 6S, 3'S, 6S)- ϵ - ϵ -Carotene-3,3'-diol
Lutein	(3R, 3'R, 6'R)- β - ϵ -Carotene-3,3'-diol
γ -Carotene	β - ψ -Carotene
β -Carotene	β - β -Carotene
β -Cryptoxanthin	(3R)- β - β -Carotene
Zeaxanthin	(3R, 3'R)- β - β -Carotene-3,3'-diol
Antheraxanthin	5,6-Epoxy-5,6-dihydro- β - β -carotene-3,3'-diol
Violaxanthin	(3S, 5R, 6S, 3'S, 5'R, 6'S)-5,6,3',6'-Diepoxy-5,6,3',6'-tetrahydro- β - β -carotene
Neoxanthin	(3S, 5R, 6R, 3'S, 5'R, 6'R)-5',6'-Epoxy-6,7-didehydro-5,6,5',6'-tetrahydro- β - β -carotene-3,5,3'-triol
Capsanthin	(3S, 2'S)-3,1',2'-Trihydroxy-3',4'-didehydro-1',2'-dihydro- β - ψ -carotene-4-one
Capsanthin 5,6-epoxide	5,6-Epoxy-3,3'-dihydroxy-5,6-dihydro- β , χ -carotene-6'-one
Capsorubin	(3S, 5R, 3'R, 5'R)-3,3'-Dihydroxy- χ , χ -carotene-6,6'-dione

^a Britton *et al.*, 1995.

1.2 Ruta metabólica de los carotenoides

Los genes, la actividad enzimática y productos de la ruta metabólica de biosíntesis de los carotenoides han sido identificados en la década pasada (Cunningham & Gantt, 1998) (Hirschberg 2001). Esta ruta incluye una serie de 11 enzimas principales que catalizan los diferentes pasos que dan origen hasta el momento a más de 600 carotenoides caracterizados estructuralmente hasta el momento (Fraser & Bramley, 2004). Una particularidad de los isoprenoides, es que su síntesis parte de un metabolito central que constituye el “ladrillo” de todos los componentes isoprenoides: un compuesto de 5 carbonos, el **Isopentenil Difosfato (IDP) o pirofosfato (IPP)** (o su isómero el DMAPP-Dimetilalil pirofosfato) (Figura 2). Recientemente han sido encontradas dos diferentes rutas de síntesis del IPP en plantas. Una corresponde a la ruta del Mavelonato que comienza con la condensación de la acetyl-coenzimaA (acetyl-CoA) y otra es la ruta del gliceraldehido fosfato-piruvato, también denominada ruta no-mavelonato donde el piruvato es el precursor del IPP a cambio del mavelonato.

Figura 2. Isopentenil pirofosfato (IPP): metabolito central del cual deriva una inmensa variedad de isoprenoides en plantas. Cunningham & Grantt, 1998.

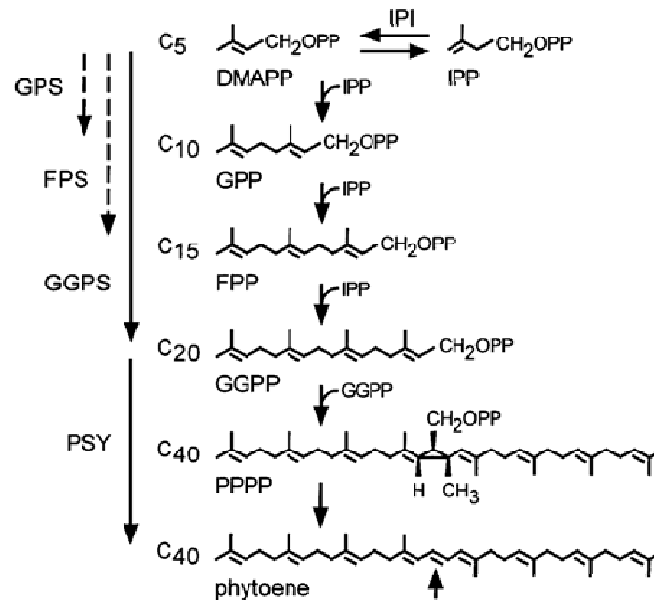


El IPP es producido en los plástidos mediante la ruta del mavelonato, mientras que la otra ruta es utilizada para la obtención del IPP en el citosol y las mitocondrias (Schwender *et al.* 1996) (Lichtenthaler *et al.* 1997).

Un proceso de condensación modular de los IPP produce compuestos de 10, 15, 20 o más carbonos permitiendo la biosíntesis del esqueleto base desde donde parten un variado número de compuestos más complejos. Este paso es llevado adelante por la enzima *IPP isomerasa*, *Geranil Pirofosfato Sintasa (GPS)*, *Farnesil Pirofosfato sintasa (FPS)* y finalmente la *Geranil-Geranil*

Pirofosfato sintasa (GGPs) generando una molécula de 20C denominado **geranil-geranil pirofosfato (GGPP)** (Figura 3).

Figura 3. Detalle de la adición de molécula de IPP para la obtención de Fitoeno. Cunningham & Gantt, 1998.

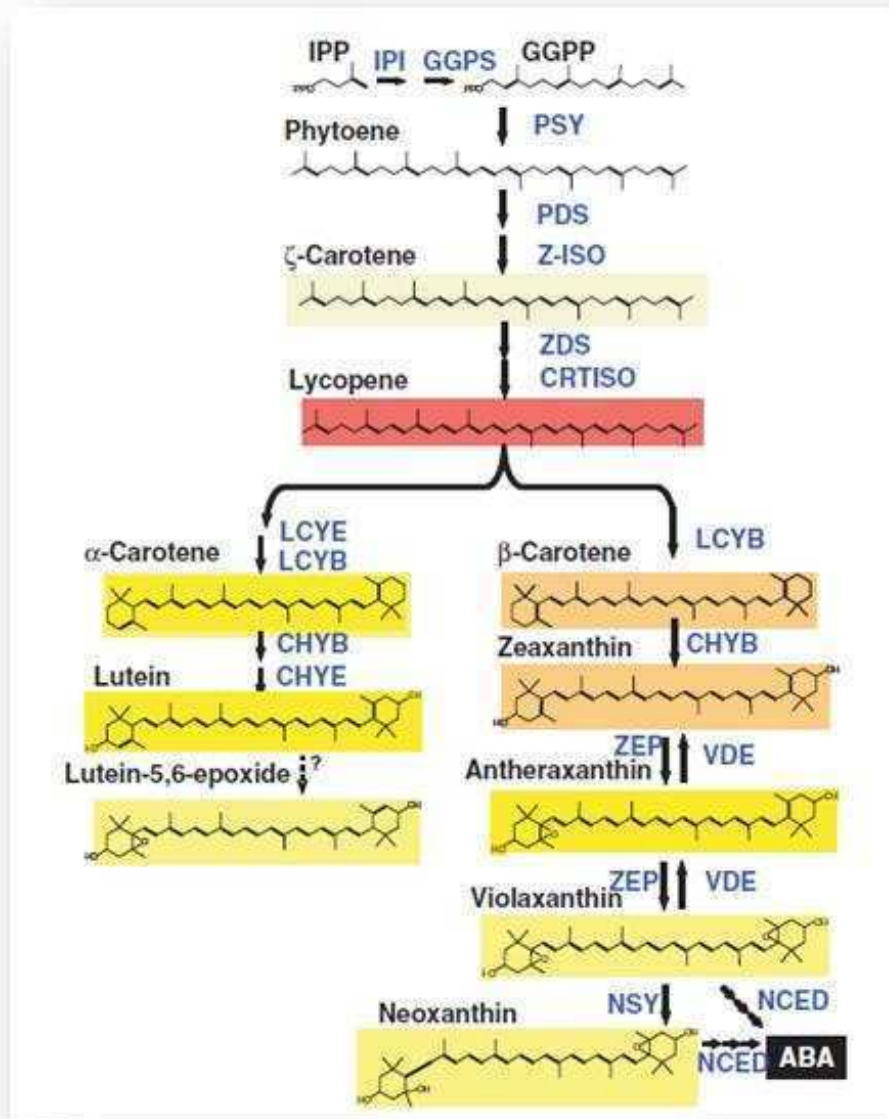


Esta molécula (GGPP) es uno de los isoprenoides claves que son convertidos en componentes necesarios para el crecimiento vegetal, como las giberelinas, carotenoides, quinonas y varios compuestos isoprenoides (Cunningham & Gantt, 1998).

Una posterior condensación cabeza-cabeza de 2 moléculas de GGPP, produce el primer carotenoide: **Fitoeno**, mediante la enzima *Fitoeno sintasa (PSY)*. El Fitoeno raramente se acumula en los tejidos vegetales y es incoloro. Todas las reacciones subsiguientes involucran la conversión de la estructura básica del Fitoeno (Cunningham & Grantt, 1998). El Fitoeno, sufre una serie de cuatro reacciones de desaturación hasta la formación del conocido **Licopeno**. La introducción de los dobles enlaces, se realiza de manera alternada a la derecha e izquierda de la parte central del Fitoeno (Cunningham, 2002). Estas desaturaciones aumentan las series de enlaces conjugados que se constituyen en el cromóforo de los pigmentos carotenoides (Fraser & Bramley, 2004) y transforman el compuesto sin color Fitoeno en un Licopeno de color rosado (Figura 4). Esta serie de desaturaciones son llevadas adelante por dos enzimas que actúan de manera secuencial, a diferencia de lo que ocurre en bacterias y hongos, donde un único producto génico realiza las cuatro desaturaciones (*crtI*): *Fitoeno*

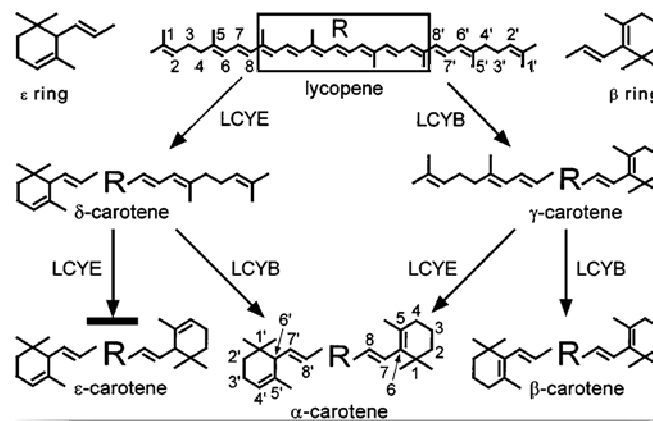
desaturasa (PDS) que produce **ξ-caroteno** y la *ξ-caroteno desaturasa (ZDS)* que genera finalmente el **Licopeno** (Cunningham & Gantt 1998).

Figura 4. Ruta simplificada de la biosíntesis de carotenos. Tanaka *et al.* 2008



La mayoría de los carotenoides presentan anillos en los extremos de la estructura carbonada. La ciclización del Licopeno, es un punto de bifurcación en la ruta. Uno lleva a la formación del **β-caroteno** y las xantofilas derivadas como la **zeaxanthin, violaxanthin y neoxanthin** (todos con ambos anillos tipo β) y la ruta alternativa que lleva a la síntesis de los carotenoides con un anillo β y uno ε, como el **α-caroteno** y la **Luteína**. (Figura 5). Las primeras enzimas involucradas son la Licopeno β-ciclase (LCYb) y Licopeno ε-ciclase (LCYe).

Figure 5. Ciclización del licopeno, un punto de ramificación en la biosíntesis de carotenoides



La excepción son el **δ-caroteno** y **γ-caroteno** con un sólo anillo epsilon y beta respectivamente y carotenoides con dos anillos epsilon (muy poco común en plantas). Las xantófilas o carotenoides oxigenados se generan por la hidroxilación del carbono 3 de cada anillo β-caroteno y α-caroteno. Este proceso esta catalizado por la enzima *β-caroteno Hidroxilasa (CHYb)* y *ε-caroteno Hidroxilasa (CHYe)* según el tipo de anillo, generando **Zeaxanthin** y **Luteína** respectivamente. El anteúltimo producto de la ruta de los anillos beta es el **Violaxanthin**, mediante la epoxidación catalizada por la *zeaxanthin epoxidasa (ZEP)*. Este producto es un precursor de la biosíntesis del regulador de crecimiento ABA junto a neoxanthin. Por último, dos productos de la ruta son la **Capsantina** y **Capsorubin**, obtenidos mediante la acción de la *Capsanthin-capsorubin sintasa (CCS)*.

Con respecto a la regulación de esta vía, es un aspecto del que aún se desconoce mucho. Existen diversas evidencias de que la carotenogénesis en plantas estaría regulada predominantemente a nivel transcripcional (Sandmann *et al.* 2006). Fraser & Bramley (2004) proponen a partir del rol central de los carotenoides en el desarrollo de la planta, que su síntesis estaría coordinada con otros procesos de desarrollo, como la formación de plástidos y el desarrollo de flores y frutas.

El análisis del contenido de carotenos ha sido utilizado en una diversidad de especies para diferentes objetivos y con distintas técnicas: medición de Licopeno en Papaya (*Carica papaya* L.) mediante HPLC (Devitt *et al.* 2010) para estudios de asociación con el gen de la Licopeno ciclasa; análisis de diferentes carotenoides en Zanahoria (*Daucus carota* L.) mediante espectroscopia (Baranska *et al.* 2006); color visual y HPLC en zucchini (*Cucurbita pepo*) en análisis genéticos (Tadmor *et al.* 2005) y para mapeo de loci relacionados con el contenido de β-caroteno mediante HPLC en Melon (*Cucumis melo*) (Cuevas *et al.* 2008).

En *Ipomoea batatas* numerosos trabajos han analizado el contenido de pigmentos. Mediante diversas metodologías han evaluado el tipo de carotenoide y su concentración ya sea en colecciones de germoplasma, materiales de trabajo de un programa de mejoramiento, poblaciones de mapeo y estudios de genética o expresión (Mc Gregor & LaBonte 2006). La caracterización fenotípica puede realizarse con diferentes metodologías dependiendo del objetivo propuesto. La **Cromatografía líquida de alta eficacia** (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. El tiempo de retención es la medida que permite corroborar la identidad del compuesto, comparado con los estándares. Otras aproximaciones son la caracterización visual mediante una cartilla de descriptores; medición del color objetivo, a través de un colorímetro y cuantificación mediante un espectro UV. Estos tres últimos resultan de menor costo y protocolos más sencillos que el HPLC. Una revisión general permite apreciar que todas las técnicas han sido utilizadas en batata (HPLC: Takahata *et al.* 1993; Huang *et al.* 1999; Simonne *et al.* 1993; Yamamizo *et al.* 2010; Ameny & Wilson (1997)- Color visual: Manifesto *et al.* 2010; Las directivas de la Unión Internacional para la protección de las obtenciones vegetales (UPOV) (2010) - Color objetivo: Ameny & Wilson (1997), Simonne *et al.* 1993; Mc Gregor & LaBonte 2006; Takahata *et al.* 1993; Martí 2004 - UV: Ameny & Wilson (1997).

Los pigmentos carotenoides y su concentración así como su distribución en piel y pulpa (Figura 6) difieren ampliamente en batata: Martin Franklin (1982) analiza los pigmentos carotenoides presentes en variedades de pulpa blancas-cremas-amarillas. Los principales carotenoides que detectó fueron fitoflueno, neurosporeno y β -zeacaroteno, todos precursores del β -caroteno. En las batatas anaranjadas, si bien varios carotenoides fueron detectados, el principal es el β -caroteno con un rango desde trazas hasta más de 130 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco (Simonne *et al.* 1993).

Figura 6: Variación en la coloración de pulpa. (Foto: Arizio 2010)



2. Antocianinas

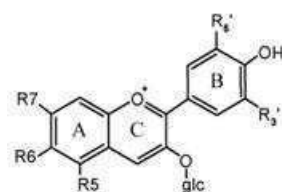
Las antocianinas, una clase particular de flavonoides son responsables de los colores naranja-azul en muchas flores, hojas, frutas, semillas y otros tejidos vegetales (Tanaka *et al.* 2008). Son solubles en agua, se almacenan en vacuolas y son influenciados por el pH. En la naturaleza los flavonoides se encuentran involucrados en un amplio rango de funciones, por ejemplo, proveyendo pigmentación de flores, frutas y semillas que atraen polinizadores y dispersores de semillas, en la protección contra la luz ultravioleta, en la defensa de la planta contra microorganismos patogénicos, en la fertilidad y germinación del polen y actuando como molécula señal en las interacciones planta-microbio (Schijlen *et al.* 2004). También los flavonoides están relacionados con potenciales beneficios a la salud humana (Harborne & Williams, 2000) sugiriéndose que actúan protegiendo contra el stress oxidativo, enfermedades coronarias, ciertos tipos de cáncer y enfermedades relacionadas con la vejez.

En particular las antocianinas cumplen importantes funciones en los vegetales. La presencia de antocianinas en las flores, es sin duda una función central, relacionada con la reproducción. La atracción de polinizadores está fuertemente influenciada por la coloración presente de los pétalos, mientras que en semillas y frutos, la coloración está relacionada con la dispersión. En relación a los beneficios en la salud, Suda *et al.* (2003) presenta los resultados de un extracto de las variedades de pulpa morada de batata, con alto contenido de antocianinas, donde se observa múltiples funciones fisiológicas *in vivo*, no solo como antioxidante, sino también como hepato-protector, antihipertensivo y antihipoglucémico. Efectos anti-hipertensivos fueron observados en ratas durante la ingestión a corto y largo término de batatas de pulpa totalmente moradas, con alto contenido de antocianinas (Kobayashi *et al.* 2005). También Middleton *et al.* 2000 informa funciones fisiológicas antibacterianas, antitrombóticas, vasodilatador, antiinflamatoria y anticarcinogénica.

Los flavonoides se encuentran entre los metabolitos secundarios mejor caracterizados en términos químicos, sobre el mecanismo de síntesis, biología molecular y genética (Grotewold, 2006; Harborne, 2000; Stafford, 1990). Presentan una estructura básica de C₆-C₃-C₆, y se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas. Dependiendo de su estructura, los flavonoides pueden ser clasificados en diversos grupos, como las chalconas, flavonas, flavonoles y antocianinas. Las diferentes modificaciones químicas que tienen lugar dentro de cada una de estas clases, tales como hidrogenaciones, hidroxilaciones, sulfuraciones, metilaciones y acetilaciones, así como la incorporación de distintos restos azucarados, dan lugar a la gran diversidad de flavonoides que se pueden encontrar en la naturaleza.

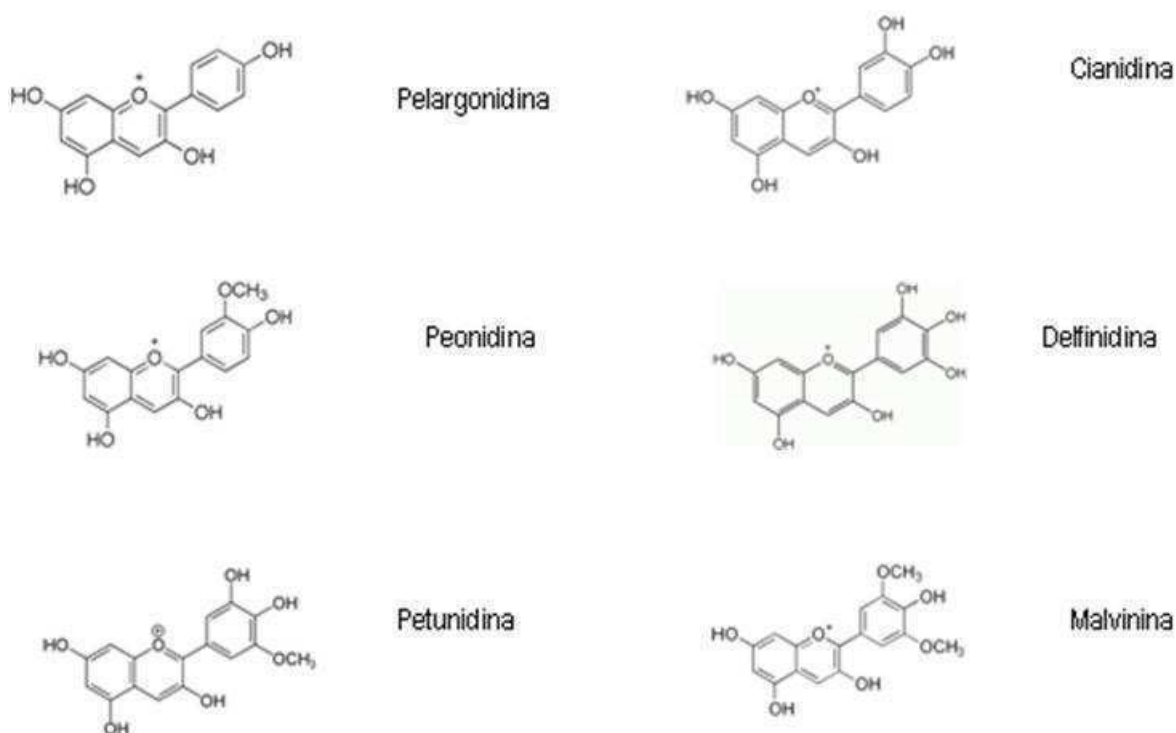
Químicamente, son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en plantas superiores. Estructuralmente (Figura 7) pueden ser considerados como fenilbenzo-pironas (fenilcromonas) compuestos de dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C). De acuerdo a los sustituyentes presentes en estas tres estructuras cíclicas, se subdividen en función de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del anillo C, de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, y de la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B. En función de sus sustituyentes químicos los flavonoides se clasifican en: flavanoles, antocianidinas, flavonas, flavanonas y chalconas

Figura 7. Estructura básica de las antocianinas



Hasta ahora, 19 tipos de antocianidinas o cromóforos de antocianinas son conocidos, seis son los principales (Figura 8): Pelargonidina, Cianidina, Peonidina, Delfinidina, Petunidina y Malvidina.

Figura 8. Principales antocianinas descritas en plantas



El color depende principalmente del número de grupos hidroxilos en los anillos beta, aunque también dependen de cambios en el pH, de la presencia de otros componentes sin color que co-existen (co-pigmentos como los flavones y flavanoles) y de iones metales. Las antocianinas propiamente aportan colores desde naranjas a azules, mientras que las chalconas, auronas,

flavonoles y flavones presentan amarillos, en particular los dos últimos, extremadamente tenues que no son detectados por el ojo humano.

Las antocianinas son responsables de la coloración rojo y morado de algunos cultivares de batata (Simmons *et al.* 1993) tanto en la piel como en la pulpa. Estos compuestos son también antioxidantes eficaces, debido a sus propiedades como captadoras de radicales libres y quelantes de iones metálicos, protegiendo a los tejidos de las especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica, actuando en la fase acuosa a diferencia de los carotenos.

Las antocianinas son ampliamente usadas como colorante natural para alimentos, por ejemplo, la cianidin acylglucósido proveniente de *Brassica oleracea var. capitata* y *Perilla frutescens*. En batata, una importante utilidad es su uso como colorante natural de alimentos, en particular una nueva variedad desarrollada en Japón de pulpa totalmente morada es una importante fuente de colorante morado.

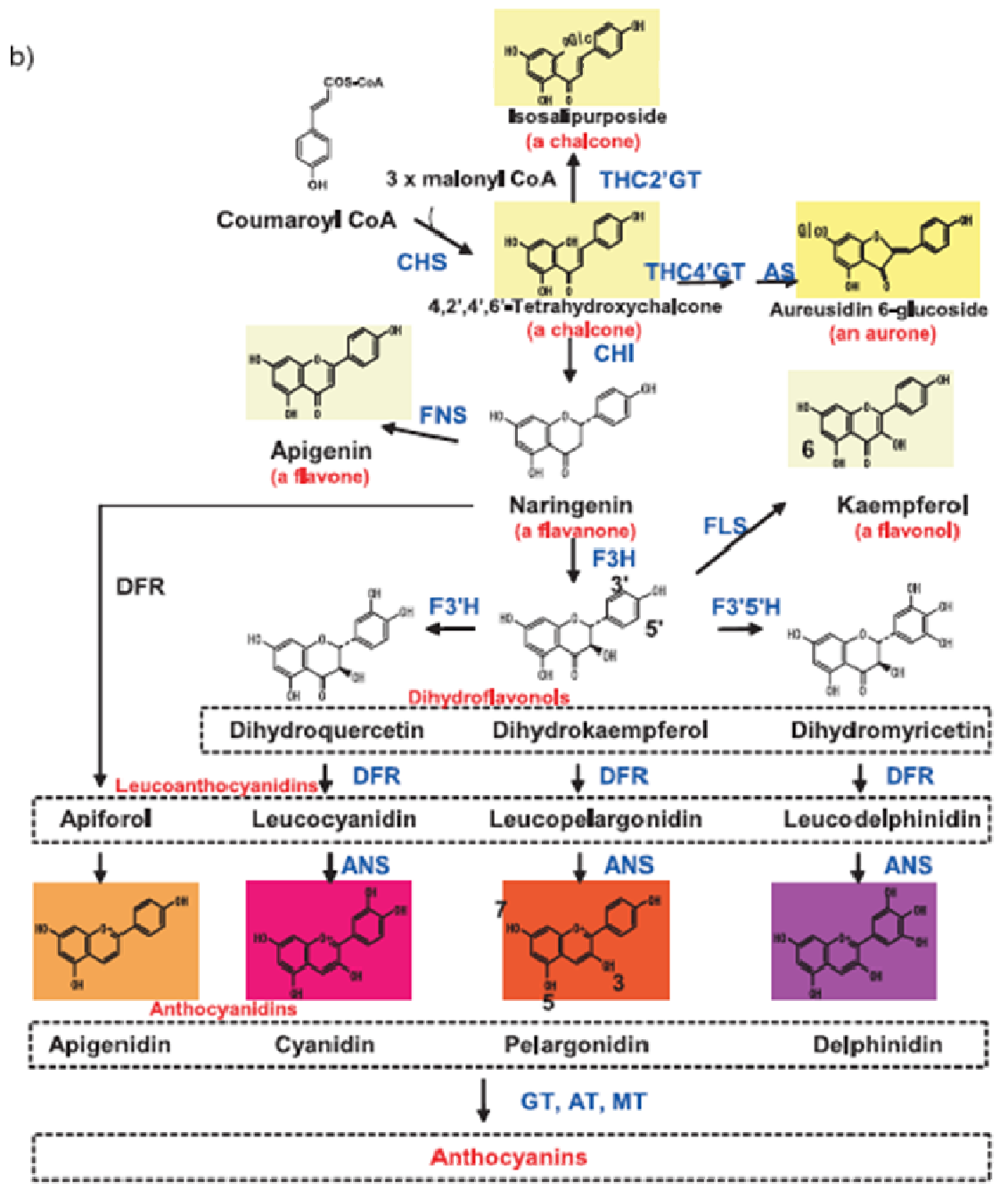
2.1 Ruta metabólica de las antocianinas

La ruta de síntesis de flavonoides y en particular de antocianinas es muy conocida y se encuentra conservada entre las plantas con semillas. Los flavonoides son sintetizados en el citosol, pero las enzimas involucradas son ensambladas en un gran complejo asociado a la membrana del retículo endoplásmico (Tanaka *et al.* 2008).

Una descripción de la ruta de biosíntesis muestra que los precursores de los flavonoides son el Malonyl-CoA y p-Coumaroyl-CoA. La Chalcona sintasa (CHS) cataliza la condensación de tres unidades de acetato del Malonyl-CoA con p-coumaroyl-CoA para generar **Tetrahidroxichalcona (THC)**. La **THC** (de color amarillo tenue) es rápidamente isomerizada por la Chalcona isomerasa (CHI) al compuesto **Naringenin** que no presenta coloración. El **Naringenin** es hidroxilado en la posición 3, generando **Dihidrokaempferol (DHK)** (un hidroflavonol) por la flavanone 3-hydroxylasa (F3H). **DHK** puede ser subsecuentemente hidroxilado por la flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) produciendo **dihidroquercetin (DHQ)** o por la flavonoid 3-5'-hydroxylase (F3'5'H) para producir **Dihidromiricetin (DHM)** (Figura 9). Estas enzimas, determinan la estructura de las antocianinas y por lo tanto su color. De hecho, en varias especies como las Rosas (*Rosa hybrida*) y los Crisantemos (*Chrysanthemum morifolium*) no se producen delphinidinas y por lo tanto no presentan variedades de color azul/violeta, esto es atribuido al hecho de que no poseen el gen F3'5'H (Tanaka *et al.* 2008). Estos tres productos (**DHK, DHQ y DHM**) son denominados Dihidroflavonoles y son incoloros. El paso siguiente es convertirlo en antocianinas y ocurre mediante la acción de 3 enzimas. La primera reduce los dihidroflavonoles a **Leucoantocianidinas** mediante la Dihidroflavonol-4-reductase (DFR).

Posteriormente, mediante oxidación, deshidratación o glicosilación las diferentes leucoanthocyanidinas producen los pigmentos **Pelargonidina, Cianidina y Delfinidina**. En esta etapa están involucradas las enzimas Antocianidin sintasa (ANS) y UDP glucosa: flavonoide 3-O-glicosiltransferasa (UF3TG). Por última, las antocianinas pueden además ser modificadas por glicosilación, metilación y acilación.

Figura 9. Ruta de Biosíntesis de flavonoles y antocianinas. Tanaka *et al.* 2008



En contraste con la alta conservación en las distintas especies vegetales de la ruta troncal de las principales antocianinas, la modificación de las mismas es dependiente de la familia o especie y origina una gran diversidad de compuestos.

Con respecto a su localización, los flavonoides glicósidos como las antocianinas se encuentran dentro de vacuolas y su transporte hasta allí es menos conocido que el de su biosíntesis. El primer mecanismo propuesto y mejor descrito hasta el momento estaría mediado por una proteína tipo glutathion-S-transferasa y una tipo "ABC transporter". Existe un segundo mecanismo propuesto el cual estaría mediado por vesículas hacia las vacuolas. Ambos aun están en etapa de investigación. Otro factor relacionado con la coloración, es el pH. La regulación del pH vacuolar, mecanismo que se encuentra parcialmente conocido, afecta en gran medida el color de las antocianinas. En *Ipomoea nil* donde se localizó un gen estructural que regula el pH vacuolar, el cual es una bomba de Na⁺/H⁺ (Fukada-Tanaka *et al.* 2000).

El conocimiento acerca de la regulación de esta ruta se encuentra más avanzado que en carotenos, ya que se conocen algunos de los factores de transcripción asociados a la expresión espacial y temporal de los genes estructurales. Según Tanaka *et al.* (2008) la expresión está determinada por la combinación de los factores de transcripción tipo R2R3 Myb, bHLH (Basic helix-loop-helix) y Wd40 y su interacción.

En batatas los principales antocianinas descritas en las variedades de pulpa moradas son la cianidin y peonidin (Suda *et al.* 2003). Las ocho (8) antocianinas mayoritarias en estas variedades, se caracterizan por la unión de al menos un grupo caffeoyl, el cual es responsable de su actividad contra los radicales libres. La presencia de pigmentos antociánicos en la piel juega un rol central en la elección del consumidor a pesar de no estar relacionada con beneficios a la salud por no ser ingerida. En Argentina, se están realizando ensayos para la obtención de productos de batata (como el dulce de batata) que utilicen además de la pulpa, la piel con antocianinas, ya que proveerían mayor capacidad antioxidante al producto (Marti comunicación personal). Yoshinaga *et al.* 1999, analiza el extracto de 19 clones de pulpa morada con espectroscopía y HPLC, observando considerable diferencias en el contenido y composición de antocianinas.

Al igual que para los carotenos, la diversidad en composición, contenido y distribución de antocianinas en piel y pulpa de batatas es muy amplia (Figura 10). Visualmente se observan desde colores rosas, rojos, rojos morados y totalmente morados. Variedades con pulpas totalmente moradas han aparecido recientemente en el mercado y su principal uso está relacionado con la extracción de los pigmentos. Japón y China aparecen como países a la vanguardia en el desarrollo y utilización industrial de esta especie.

Figura 10. Variación de antocianinas en la coloración de piel y pulpa.



3. Capacidad Antioxidante

La mayor parte de la capacidad antioxidante de frutas y vegetales es proporcionada por su contenido en vitamina E, C y carotenos, así como por diferentes polifenoles, entre los que se encuentran las antocianinas. La capacidad antioxidante de una muestra puede ser analizada por medio de diferentes técnicas, que reproducen una reacción de oxidación de un compuesto que al ser reducido cambia de color y puede ser medido mediante un espectro. Los polifenoles son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones- π . Las antocianinas, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos, o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. Una actividad antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado. Los grupos hidroxilos libres en las posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 son donadores de electrones. (Kuskoski *et al.* 2004).

La Batata fue descrita como uno de los cultivos del mundo que provee una importante fuente de fenoles y antioxidantes (Walter *et al.* 1979; Hayase & Kato, 1984). Diferentes trabajos revelan las potenciales propiedades quimiopreventivas de los extractos fenólicos de batata (Shimozono *et al.* 1996; Rabah *et al.* 2004). Esta capacidad está dada no sólo por la presencia de antocianinas sino que también por los ácidos fenólicos como el ácido clorogénico y dicaffeoilquimico (chlorogenic and dicaffeoylquinic acids), de hecho Padda & Picha (2008) observan una fuerte correlación ($r=0.98$) entre el contenido total de fenoles y la capacidad antioxidante. Cultivares con el mismo color de pulpa, pueden diferir en su contenido total de fenoles, en el perfil de un determinado ácido fenólico

y por lo tanto en su capacidad antioxidante. Harrison *et al.* 2003 observa que el contenido de ácido cafeico varía ampliamente en 24 variedades de batata conjuntamente con la bvariación de la capacidad antioxidante. Estudios recientes, indican que las batatas de pulpa morada presentan la mayor capacidad antioxidante comparada con los cultivares naranjas o blancas (Furuta *et al.* 1998; Teow *et al.* 2007).

Los principales compuestos que aportan a la capacidad antioxidante en batatas fueron específicamente las antocianinas tipo cianidina y peonidina así como compuestos relacionados con el ácido cinámico, y vitaminas como el ácido ascórbico y alfa-tocoferol. Estos compuestos pueden ser encontrados de acuerdo a su naturaleza en la fracción hidrosoluble o liposoluble. Los constituyentes responsables de la actividad antioxidante hidrofílica son principalmente los compuestos fenólicos y antocianinas, mientras que los carotenoides y tocoferoles son los principales constituyentes antioxidantes de los extractos lipofílicos (Teow *et al.* 1997). La capacidad antioxidante total medida en diferentes cultivares de batata, fue en todos los casos analizados mayor en la fase hidrofílica, lo mismo observó Alonso *et al.* (1999) analizando diferentes vegetales. Los valores de capacidad antioxidante de batata en la fase lipofílica presentan un rango entre el 2.65% al 52.88% del total de actividad antioxidante, siendo los de pulpa morada los que presentaban mayor actividad, seguidos por los anaranjados y finalmente los de pulpa blanca. Un dato relevante es la pobre correlación ($r=0.43$) entre el contenido de β -caroteno y la capacidad antioxidante del extracto lipofílico en batatas, posiblemente la capacidad antioxidante sea debida a otros componentes como los tocoferoles (Woolfe, 1992).

Otros compuestos de importancia, son los tocoferoles (colectivamente denominados vitamina E), también actúan como antioxidantes lipo-solubles, al igual que los carotenos. Son moléculas anfipáticas, con una cabeza polar y un grupo hidrofóbico. Están asociados a membranas y existen cuatro clases principales (α , β , γ , δ ,) que se diferencian en la posición y número de sustituyentes metilos en la cabeza aromática. La mayor capacidad antioxidante fue asignada a α -tocoferol, siendo diez veces mayor que las restantes, por lo tanto, la actividad de la Vitamina E está determinada principalmente por la concentración de α -tocoferol. Comparte con la ruta metabólica del β -caroteno el precursor GGPP (geranil-geranil pirofosfato).

4. Hipótesis

La caracterización fenotípica de la población permitirá conocer la distribución de los caracteres estudiados, evaluar la genética subyacente, y aportar datos relevantes para el mapeo de QTL.

5. Objetivo

Caracterizar fenotípicamente la población de mapeo en relación a los pigmentos y colores presentes para su posterior uso en mapeo de QTL.

6. Objetivos Específicos

Caracterizar fenotípicamente la población para diferentes caracteres: color visual, color objetivo y contenido de carotenos y antocianinas totales.

Conocer la distribución de dichos caracteres.

Evaluar la existencia de efecto materno sobre dichos caracteres empleando cruzamientos recíprocos.

Evaluar la existencia de asociación entre la coloración de la piel y la pulpa.

Materiales y Métodos

1. Material vegetal

Se utilizó la población de mapeo obtenida según Capítulo 1.

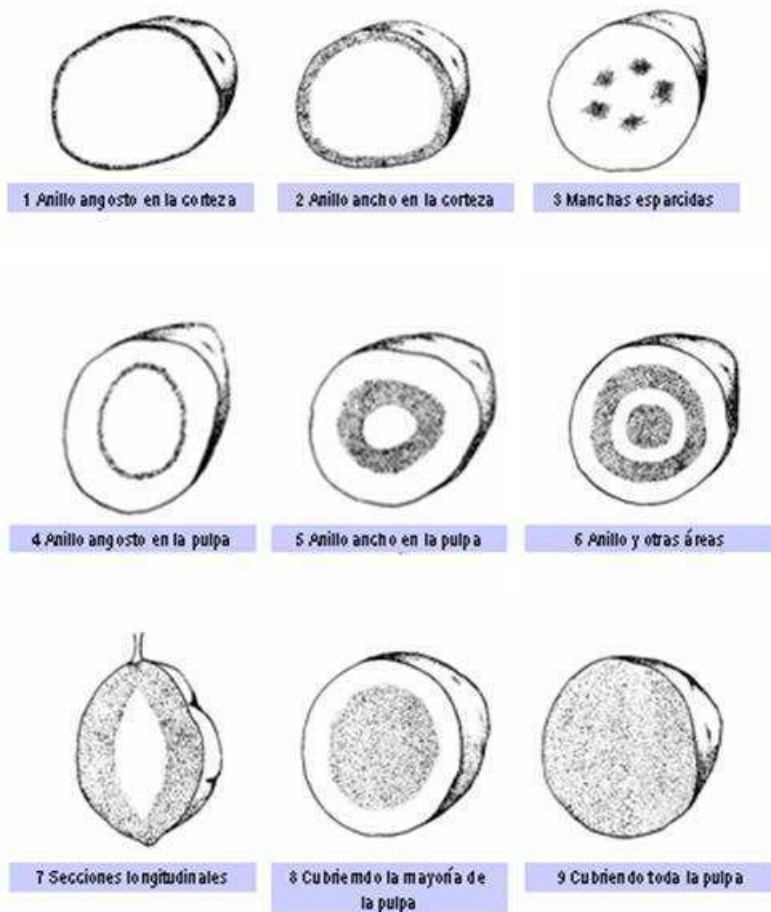
2. Diseño Experimental y Evaluación Fenotípica

Cada individuo fue multiplicado por esqueje y trasplantado a campo conjuntamente con los progenitores. Se utilizó un diseño de bloques al azar con dos repeticiones (una planta por bloque). Las plantas fueron cultivadas siguiendo las recomendaciones para el nordeste de la provincia de Buenos Aires, y se cosecharon a los 120 días. Durante el 2005, 20 genotipos fueron evaluados para color objetivo y color visual de manera exploratoria. El total de genotipos fue evaluado para color visual, color objetivo y carotenos totales en el 2007. El material fue cosechado, lavado y almacenado a 15°C de temperatura y 80 % de humedad relativa. Luego de un mes de almacenamiento se determinaron los valores de L, a* y b* de Hunter de la piel y la pulpa con un colorímetro Minolta CR-300. Se realizó la evaluación visual siguiendo la cartilla de colores de la especie. La piel y la pulpa fueron separadas y molidas. Se procedió a la extracción de carotenos de piel y pulpa para su análisis por HPLC. Una fracción fue conservada a -80°C para los análisis de contenido de carotenos totales y antocianinas mediante espectrofotómetro UV

2.1 Evaluación del Color visual

Fueron evaluados el color visual de piel y pulpa además de la distribución del color secundario en pulpa utilizando la Cartilla de Descriptores desarrollados por el Centro Internacional de la Papa (CIP 1991).

Color predominante de la piel	Color predominante de la pulpa	Color secundario de la pulpa	Distribución del color secundario de pulpa
1 Blanco	1 Blanco	0 Ausente	0 Ausente
2 Crema	2 Crema	1 Blanco	1 Anillo angosto de la corteza
3 Amarillo	3 Crema oscuro	2 Crema	2 Anillo ancho en la corteza
4 Naranja	4 Amarillo pálido	3 Amarillo	3 Manchas esparcidas en la pulpa
5 Naranja amarronado	5 Amarillo oscuro	4 Naranja	4 Anillo angosto en la pulpa
6 Rosa	6 Naranja pálido	5 Rosa	5 Anillo ancho en la pulpa
7 Rojo	7 Naranja intermedio	6 Rojo	6 Anillo y otras áreas en la pulpa
8 Rojo-Morado	8 Naranja oscuro	7 Rojo-Morado	7 En secciones longitudinales
9 Morado oscuro	9 Pigmentado con antocianinas	8 Morado	8 Cubriendo la mayoría de la pulpa
		9 Morado oscuro	9 Cubriendo toda la pulpa



Se establecieron grupos según la presencia de antocianinas (que incluye los colores rosas, rojos, rojos-morados y morados en sus diferentes intensidades) y ausencia de antocianinas (naranjas, marrones, cremas y blanco) en la piel. En la pulpa se analizó la presencia/ausencia de color naranja y su distribución sin diferenciar su intensidad.

2.2 Evaluación del Color Objetivo

Se determinaron los valores de L, a* y b* de Hunter (1958) de la piel y la pulpa con un colorímetro Minolta CR-300. Se midieron 3 puntos en la piel y tres en la pulpa (corte transversal en el punto medio) en tres batatas en ambos bloques, obteniéndose un total de 18 datos por genotipo. Para los padres, fueron tomados datos de color objetivo en tres años consecutivos. A partir de a* y b* se calcularon los valores de C (saturación ó intensidad) y h^o (ángulo Hue) mediante las ecuaciones descritas por McGuire (1992).

$$\text{- Croma métrica: } C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$\text{- Angulo de tono (Hue) } h_{ab} = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

La población completa fue analizada para estas variables para un único año.

2.3 Cuantificación de carotenos totales mediante espectrofotometría.

Para la curva de calibración se preparó una solución de β -caroteno (PM: 536.87 g/mol) diluida en diclorometano (concentración final aprox. 500 μ M). La medición de las diferentes concentraciones se realiza en espectrofotómetro a 470 nm y una temperatura aprox. de 30° C.

La extracción de carotenos totales se realizó según el siguiente protocolo: Se cosechó una planta de cada repetición y se eligieron las 2 mejores raíces caracterizadas por su excelente estado fitosanitario, libre de daños mecánicos y sin pudrición precosecha. Se tomaron las partes medias de cada una y se pelaron. Se picaron, mezclaron y se separaron 3 g para el análisis de carotenos. Se tomaron 3gr de piel (o pulpa) molida y fueron colocadas en tubos de vidrio junto a 15 ml del buffer de extracción (etanol, acetona, hexano). Se homogeneizó manualmente para permitir la liberación de los pigmentos. Se dejó reposar 40 minutos en oscuridad. Se tomó una alícuota de 1 ml de la fase hexano. La lectura se realizó a tres longitudes de onda: 430nm, 470nm o 502nm en un espectro de una sola cubeta.

2.4 Cuantificación de β -carotenos mediante HPLC

Se seleccionó un total de 57 genotipos para analizar el contenido de β -caroteno. El criterio utilizado asegura tener una representación de las diferentes coloraciones de piel y pulpa. La determinación de β -caroteno se realizó por HPLC según protocolo Takahata (1993). Las progenies seleccionadas fueron peladas. La cáscara y la pulpa fueron separadas y molidas en una procesadora de alimentos *Molinox*.

Protocolo cuantificación mediante HPLC

1. Se tomaron 5 gramos de tejido previamente molido en 10 ml (pulpa) o 20 ml (piel) de Buffer Fosfato 0.05M, pH7.
2. Se homogeneizó en Ultraturrax nivel 3, 30 segundos para pulpa y 1 minuto para piel.
3. Se tomó 1 gr. de homogenato y se agregó 3 ml de ácido ascórbico al 1% en etanol (preparado en el momento). Se mezcló en Vortex por 30 segundos.
4. Se agregó 5 ml de Hexano y posteriormente en Vortex 2 minutos. Se dejó separar las fases.



5. Se extrajo la fase superior (orgánica) y se colocó en un falcon de 15 ml (Repetir el agregado de hexano).
6. Se evaporó bajo N₂ y conservó a -20°C.
7. Finalmente se resuspendió en 500 microlitros de etanol calidad HPL y se purificó en filtros de 0.45 micrones.
8. Se analizó en HPLC con los estándares correspondientes.

3. Análisis estadístico

En los datos obtenidos fueron analizadas la dispersión y se calculó un promedio general para cada genotipo. Mediante el programa estadístico SAS se analizó el efecto año, bloque, repetición y las lecturas de las variables evaluadas para el color objetivo.

Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de los datos de color objetivo y contenido de carotenos. Se usó el test de múltiples rangos de Duncan para resolver el nivel de significancia entre medias a un nivel de $p < 0.05$.

Se analizó el ajuste a una distribución normal de las variables, mediante el procedimiento UNIVARIATE de SAS, utilizando el valor Shapiro-Wilk (W). Además se realizó el histograma de frecuencias y el trazado de la probabilidad normal de los datos.

Se determinó la relación entre el contenido de β -caroteno y los valores de color objetivo L, a*, b*, Cromo y hue (SAS 1994) por regresión lineal. Para el ANOVA de los datos de color se usó el procedimiento GLM y la diferencia entre medias fue determinada por el test de Duncan.

Se realizó el análisis de la varianza de dos formas. Por un lado se analizaron los clones (padres y progenies) como tratamientos, para determinar si había efecto del genotipo en las variables de color y calcular qué porcentaje de progenies diferían estadísticamente de los padres. Por otro lado, se analizaron los datos considerando como tratamientos a los progenitores y a la dirección del cruzamiento (30♀ x 45♂ o 45♀ x 30♂), para determinar si existe efecto materno en los parámetros de color. La población también se separó subjetivamente en clases según el color apreciado visualmente. Esto se realizó porque el ojo humano no es capaz de separar el color en las tres variables objetivas (L, C, y h^a), por lo que la expresión del color subjetivo es una integración de esas variables. La medición objetiva promedia distintas tonalidades que se dan tanto en la pulpa como en la piel, mientras que mediante la observación visual se pueden distinguir esas diferencias. Las clases (subjetivas) para la piel fueron blanco/crema, naranja y antociánica (morado a rosado), mientras que para la pulpa las clases fueron naranja o blanco/crema (presencia vs. ausencia de color naranja).

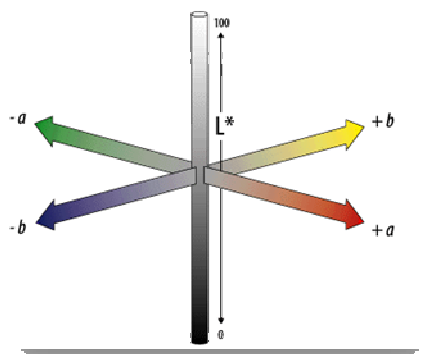
Genotipos de pulpa crema con manchas anaranjadas fueron considerados dentro del grupo de las naranjas. Se contabilizó el número de individuos por clase, y se examinó la existencia de asociación entre color de piel y de pulpa mediante la prueba de χ^2 (Chi cuadrado) (Sokal & Rohlf, 1969).

Resultados y Discusiones

1. Evaluación fenotípica de los parentales

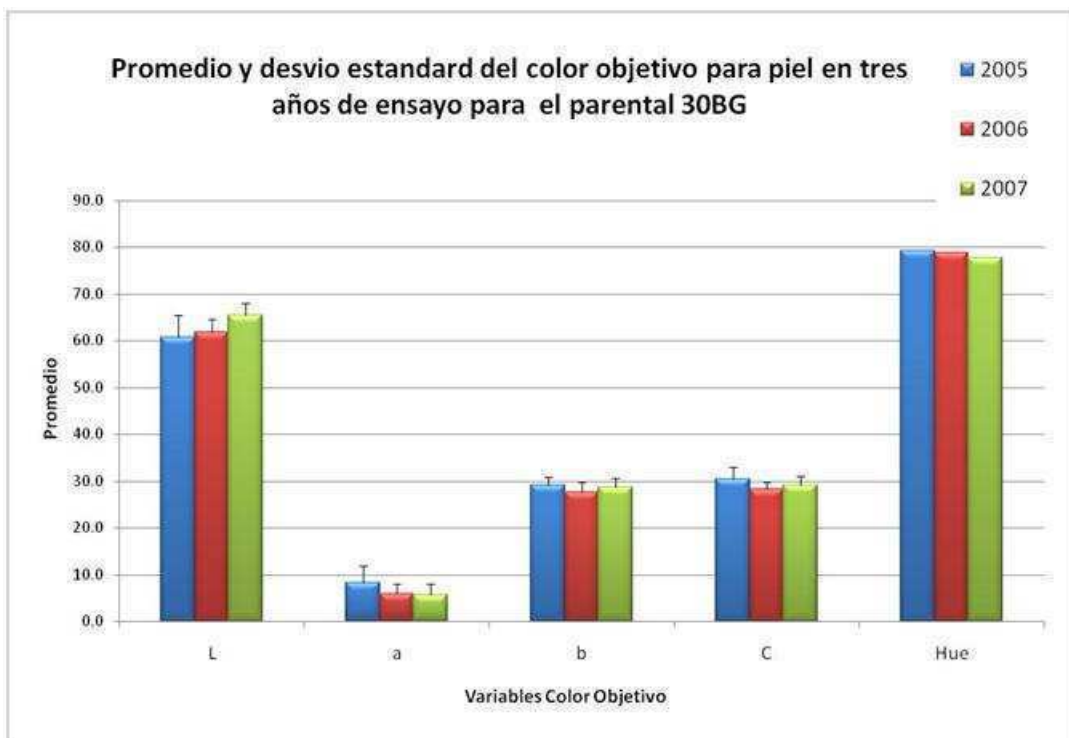
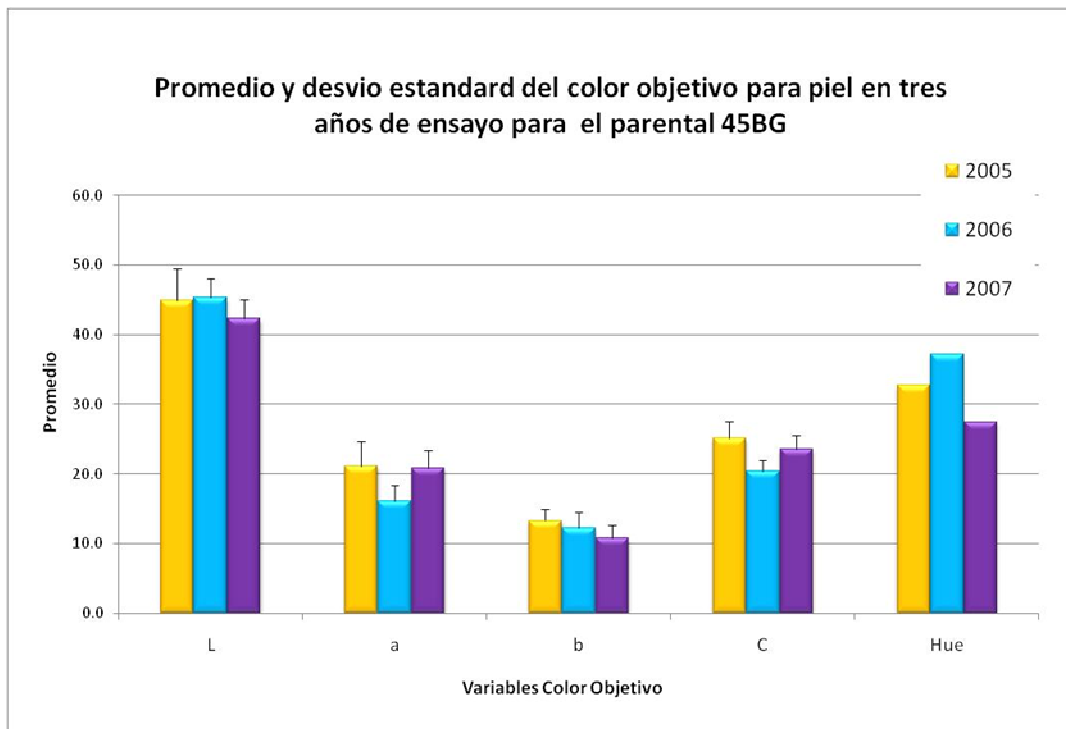
El CIE $L^*a^*b^*$ (CIELAB) es el más completo modelo de color usado convencionalmente para describir todos los color visibles al ojo humano. Fue desarrollado para este propósito específico por la “Internacional Comisión on Illumination” (www.cie.co.at). Este sistema de color está basado en la medición de L, a y b, donde L=luminosidad, a=escala rojo-verde y b: escala azul-amarillo (Figura 12). Este método mide el color usando una escala con números positivos hasta negativos. Para el descriptor a: los valores negativos son percibidos como rojo y los positivos como verdes, mientras que para el carácter b, los valores positivos son percibidos como amarillos y los negativos como azules. Por último, la luminosidad se mide en una escala de 0 a 100, donde 0 indica negro y 100 blanco. El ángulo hue (h°) o tono, distingue las diferentes tonalidad o colores y esta definido como el ángulo alrededor del eje vertical (L). El 0° corresponde al rojo, girando hacia el amarillo a 60° , el verde a 120° , el azul a 240° .

Figura 12. Representación del espacio CIELab.



Esta metodología ha sido ampliamente utilizada para caracterizar germoplasma, colecciones de trabajo de los planes de mejoramiento y poblaciones de mapeo para realizar posteriores asociaciones con QTL o genes. Se evaluaron ambos parentales para los tres años de ensayo. El parental 30BG presenta para la piel valores promedio de $L=62.741$, $a^*=6.3$, $b^*=28.4$, $C=29.14$ y $h^\circ=77.51$, acorde a una coloración amarillenta con un L alto indicando claridad. Mientras que el 45BG, $L=43.782$, $a^*=19.936$, $b^*=11.813$, $C=23.38$ y $h^\circ=31.03$. Este valor de h° más cercano al rojo y con un valor de L menor que el otro padre, o sea más “oscuro”. El gráfico 1 presenta los valores promedio de color objetivo de los parentales en los 3 años ensayados.

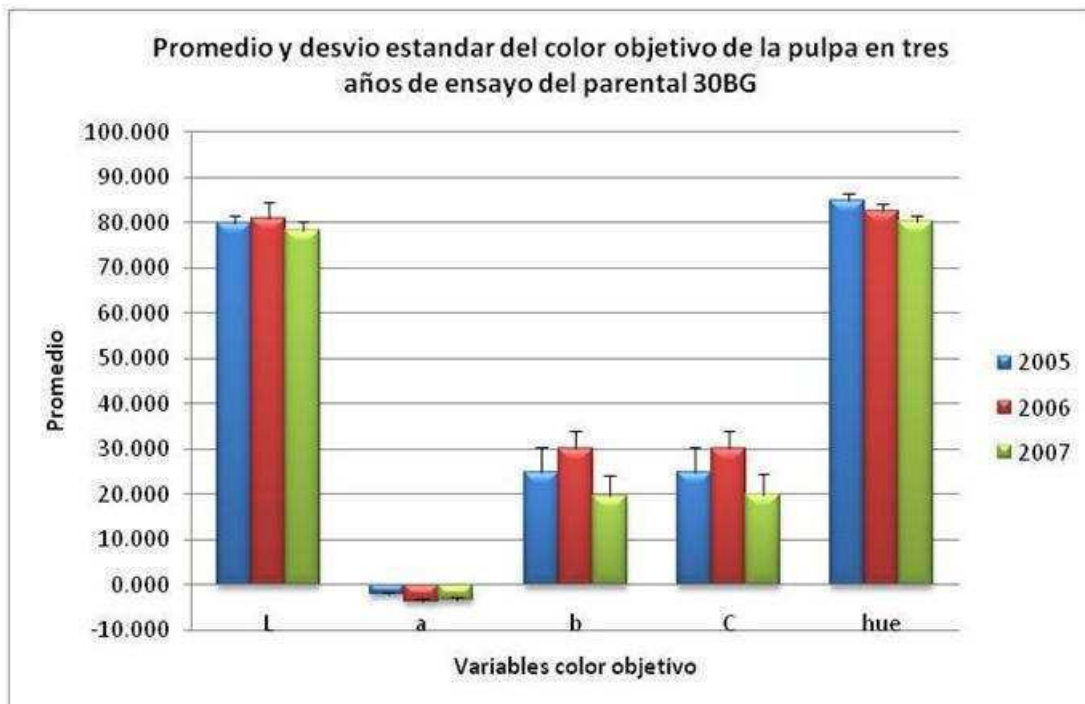
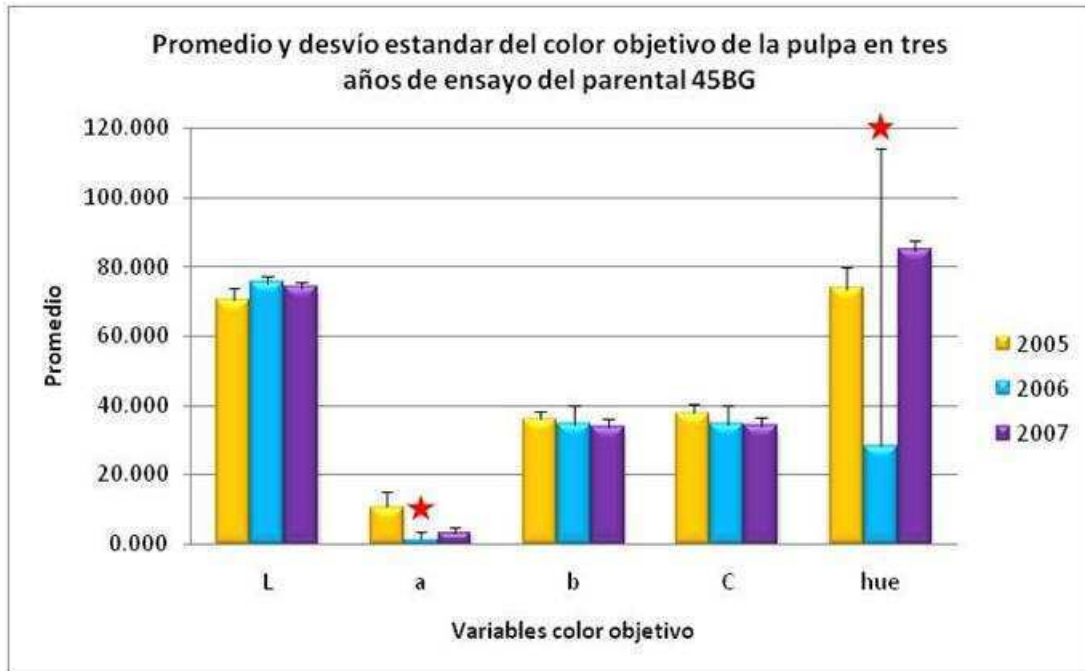
Gráfico 1 (a, b). Promedio y desvío estándar de las variables de color objetivo medidas en tres años de ensayo a campo para ambos parentales en piel.



Para la pulpa, el parental 30BG presenta para valores promedio de $L=79.972$, $a^*=-3.112$, $b^*=23.73$, $C=23.94$ y $h^\circ=82.2$. Mientras que el 45BG, $L=73.47$, $a^*=4.46$, $b^*=34.224$, $C=34.810$ y $h^\circ=67.8$. A modo de resumen podemos decir que la pulpa del 30BG presenta bajo a^* , alto b^* y alto L , mientras que el 45BG es alto a^* , bajo b^* y menor L que el otro parental. Los análisis de los valores de color

objetivo en piel y pulpa muestran diferencias significativas en todos los años entre los genotipos parentales ($P < 0.05$). Los desvíos fueron menores al 10%, excepto para la variable a* en la pulpa del parental 45 (Gráfico 2).

Gráfico 2 (a, b). Promedio y desvío estándar de las variables de color objetivo medidas en tres años de ensayo a campo para ambos parentales en pulpa.



La mayor variabilidad a lo largo de los diferentes años se observa en el parental 45BG con la variable a^* para la pulpa y en h^a . Esta variable cuantifica el eje rojo-amarillo y está relacionada con el contenido de carotenos o el color naranja. La pulpa del parental 45BG presenta una distribución heterogénea del color naranja, lo que genera un desvío estándar importante dentro de cada año. El parental 45BG en el año 2006 (estrella roja) presenta los valores más dispares de a^* , dando desde valores negativos (-2.3) hasta positivos (6.0) y además los menores valores a a^* observados en los tres años. Además para este carácter se observa un alto desvío estándar a lo largo de los años ensayados. El factor ambiental tiene un fuerte componente en la concentración de este pigmento. Manrique & Hermann (1999) observaron un claro incremento de los valores de β -caroteno por materia seca en 9 variedades de en cuatro localidades. Esto parece estar influenciado por los factores agroecológicos de las localidades ensayadas asociadas a las condiciones del aumento de la altitud, como es la calidad de la radiación, el promedio de temperaturas, la amplitud de temperatura y el stress hídrico. El aumento del contenido de β -caroteno fue dependiente de la variedad y presentó un rango desde 59% hasta 600%. Teniendo en consideración que este carácter es tan influenciado por el ambiente, es necesario aumentar el número de repeticiones ya sea realizando ensayos en diferentes años o diferentes localidades que nos permitan evaluar con mayor precisión la localización de este carácter en un mapa de ligamiento.

En la piel, a pesar que mediante los análisis de HPLC y UV se detectaron concentraciones importantes de β -caroteno en el parental 45BG, no se detecta tanta variabilidad en a^* . Es importante recordar que el color principal de este parental es morado debido a la presencia de antocianinas, que posiblemente enmascare el efecto ambiente/año en la concentración del pigmento anaranjado. Sin embargo, al igual que en la pulpa, durante el año 2006, el parental 45BG presenta el menor valor de a^* , evidenciando una menor síntesis de carotenos que afecta no solo la pulpa sino también la piel.

2. Evaluación del Color visual en la progenie

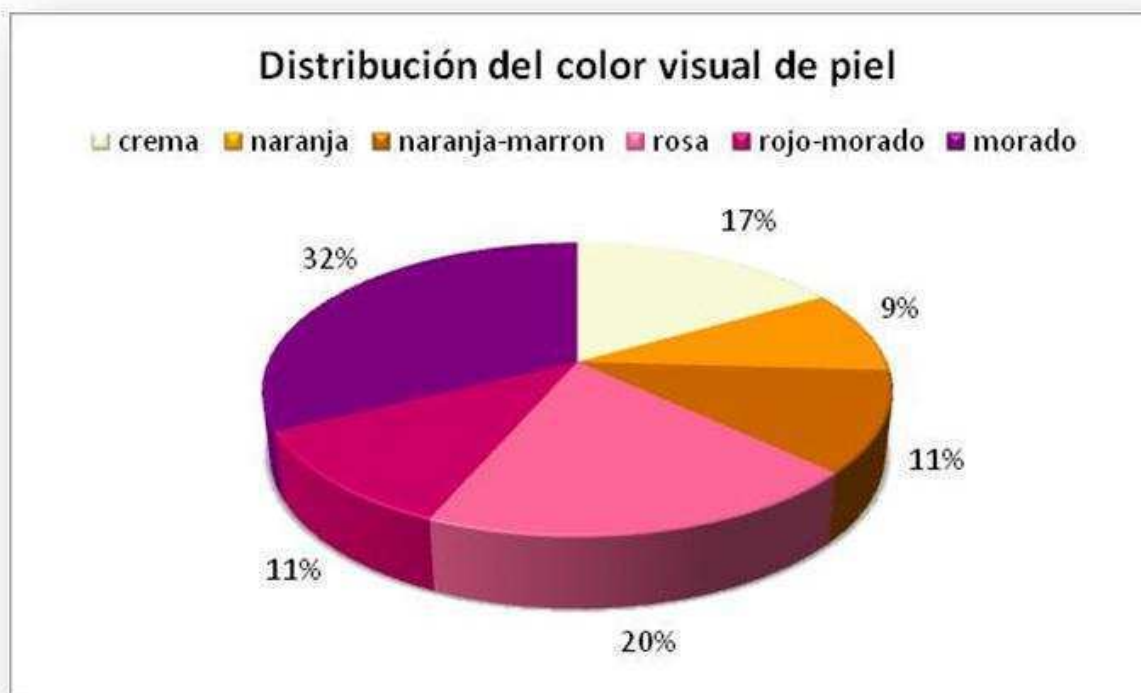
La progenie del cruzamiento entre el parental 30BG de piel y pulpa crema y el 45BG de piel morada y pulpa con manchas naranjas esparcidas presentó una amplia variedad de intensidades, colores y distribución del color en la piel y pulpa. Los genotipos fueron caracterizados utilizando los descriptores desarrollados para *Ipomoea batatas*. Sin embargo dada la variación continua del color que hace dificultoso definir las clases, algunas de ellas han sido unificadas, definiendo menos cantidad de categorías que las propuestas por CIP (1991). Si bien el color fue evaluado de manera objetiva con un colorímetro, la población también se separó subjetivamente en clases según el color

preciado visualmente. La medición objetiva promedia distintas tonalidades, intensidad y luminosidad que se dan tanto en la pulpa como en la piel, mientras que mediante la vista se pueden distinguir esas diferencias.

Se observaron individuos con piel crema, naranja, naranja amarronado, rosa, rojo morado y morado (Gráfico 3). Para la piel, donde nos encontramos con mayor dificultad para categorizar dado que en algunos individuos se observa la presencia de los dos pigmentos principales (carotenos y antocianinas), definimos trabajar con categoría presencia de antocianinas/ausencia de antocianinas, presencia de caroteno/ausencia de caroteno y ausencia de ambos pigmentos.

El ensayo en estos tres años para los parentales, ha permitido evaluar cómo se comportan los caracteres de interés relacionados con los principales pigmentos.

Gráfico 3. Distribución del color visual en la piel de una población de *Ipomoea batatas*.



Es interesante notar que se observaron morados más intensos que el genotipo 45BG y cremas más claros que el genotipo 30BG. Las pieles antocianicas, con toda su gama de intensidades fue la mayoritaria con un 63 % de genotipos seguida con un 17 % para la piel blanco/crema, y 20 % con piel naranja. Si bien algunos genotipos podrían ser clasificados en dos grupos, principalmente aquellos que presentaban una coloración naranja tenue o crema con zonas rosas, estos genotipos fueron clasificados como con presencia de antocianinas dado que nos interesaba principalmente

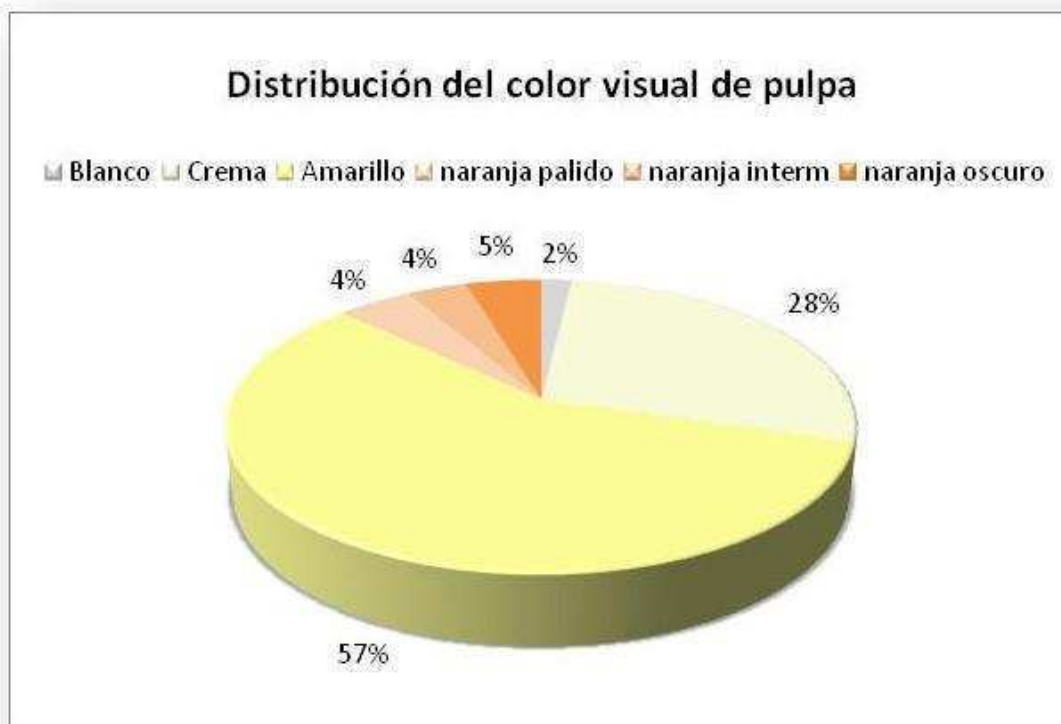
cuantificar cuantos genotipos sintetizaban en la piel antocianinas. La presencia de antocianinas en piel muestra una relación 3:1:1 (Moradas/Crema/Naranjas).

La evaluación de los datos obtenidos por medición de espectrofotometría para contenido de carotenos totales conjuntamente con los datos de color visual, evidencian que muchos genotipos que fueron clasificados como antociánicos, también presentan importantes cantidades de carotenos en la piel, siendo el parental 45BG uno de ellos. Esto explica la presencia de genotipos segregantes con coloraciones naranjas en la piel a pesar de que en la caracterización visual, ninguno de los dos padres parecía tener carotenos en la piel.

Por otro lado, nos permite observar que la categoría presencia de caroteno (colores naranjas) en piel esta subestimada debido a que la presencia de antocianinas enmascara a este pigmento. Por este motivo para la piel, el color visual no presenta ninguna relación con el contenido de carotenos.

En la pulpa, la progenie varió desde blanco, crema, amarillo y naranja con diferentes intensidades. Además, se genotipos con color secundario naranja (Gráfico 4).

Gráfico 4. Distribución del color visual en la pulpa de una población de *Ipomoea batatas*.



Para los análisis del color de la pulpa, también se unificaron varias categorías: los blancos, cremas y amarillos por un lado y las pulpas que presentaban acumulación de β -caroteno, evidenciado por la presencia de color naranja. Las pulpas de algunos individuos presentaron colores que visualmente

superan en intensidad a los observados en ambos progenitores al igual que en la piel. La separación visual entre crema y amarillo resultaba sumamente dificultosa por lo que esas clases fueron fusionadas. En la pulpa, los colores más frecuentes fueron los cremas/amarillos. Solo se observaron dos genotipos de pulpa blanca. Un 87% de los genotipos tuvo pulpa blanco/crema/amarillo, mientras que el 13% presentó pulpas completamente naranjas. Además, se observaron 28 genotipos (28,3%) con pulpas cremas/amarillas pero con color secundario de pulpa: presentaban zonas de color naranja con diferente distribución e intensidad. De todas las distribuciones del color secundario descritas en la Cartilla de Descriptores del CIP, algunas no fueron observadas, como el anillo angosto o ancho en la corteza (distribución 1 y 2 de la Cartilla) o en secciones longitudinales. En todos los casos, el color secundario observado fue naranja pálido, intermedio o intenso (Figura 13). La distribución más frecuente del color secundario fue el de manchas esparcidas con 21 genotipos, aunque generalmente se presentaba junto a un anillo angosto o ancho en la corteza, igual al observado en el parental 45BG. Si tenemos en cuenta solamente presencia/ausencia de β -caroteno en pulpa, aparece una relación 1:1 ($p=0.05$), indicando la presencia de un gen mayor segregando en la población.

Figura 13. Diferentes distribuciones secundarias en pulpa. Cubriendo casi la totalidad de la pulpa, o manchas esparcidas con franja ancha o delgada en la corteza.



Cuando se analiza de manera conjunta los datos de color visual con el contenido de carotenos totales, si bien se puede referenciar el contenido de carotenos totales al de β -caroteno por ser el principal carotenoide identificado en batata, esto no tiene una estricta correlación con el color visual de pulpa, ya que las pulpas amarillas también corresponden a carotenoides que son cuantificados por UV pero no son β -caroteno.

El color visual es un descriptor ampliamente utilizado. En los primeros estudios sobre genética y bioquímica relacionados con pigmentos, los loci genéticos fueron fácilmente correlacionados con los

cambios de color observados. Posteriormente, cuando la estructura de los pigmentos fue determinada, fue posible la asociación de genes simples con las modificaciones observadas o presencia/ausencia de determinada antocianina o carotenoide. Las mutaciones en los genes relacionados con los pigmentos han sido estudiados por muchos años por ser fácilmente detectados y porque en general no presentan efectos deletéreos en el desarrollo y crecimiento de la planta (Holton & Cornish 1995). Los descriptores para color de piel y pulpa permiten una aproximación estandarizada simple y económica. Zhang *et al.* 2009, analiza la pigmentación de la pulpa de papa para un análisis genético, estableciendo una escala de distribución del color fenotípico de 1 a 10, donde 1 representa pulpa sin coloración morada y 10 pulpa totalmente pigmentada en una población de F1. Estos datos son utilizados para la localización de QTL y relacionados con marcadores moleculares CAPS desarrollados a partir de genes de antocianina. Esta aproximación les permitió la detección de 3 QTL de influencia mayor en 3 cromosomas de papa. También en papa, Wolters *et al.* 2010 utiliza con éxito para la identificación de alelos de genes de la ruta de carotenoides una escala de color visual, asignando 4 para pulpas blancas hasta 9 para anaranjadas de acuerdo al catalogo Dutch de variedades de papa (www.nivap.nl). Análisis genéticos en *Cucurbita melo* también recurren a una caracterización fenotípica del mesocarpo de la fruta con el objetivo central de observar los efectos de los genes que están implicados en la acumulación de carotenos (Tadmor *et al.* 2005).

Uno de los objetivos que nos planteamos, era poder evaluar si existía asociación entre el color de piel y pulpa. Entre los individuos con piel naranja, la mayoría (63 %) también tuvo color naranja en la pulpa, mientras que cuando la piel fue antociánica o blanco/crema, la mayoría de los genotipos tuvo pulpa blanco/crema sin inclusiones naranja. Esto se vio reflejado en los test parciales de asociación. Cuando se consideraron sólo los individuos de piel antociánica o crema, no hubo asociación entre color de piel y pulpa, pero sí la hubo cuando se incluyeron los genotipos con piel naranja (Tabla 2). La combinación más frecuente fue piel antociánica y pulpa crema, y en menor frecuencia piel blanco/crema y pulpa con naranja. A partir de estos datos, hemos observado que existe asociación entre el color de la piel y el de la pulpa (Tabla 2). Cervantes-Flores *et al.* 2007 y Lin *et al.* 2007 también detectan correlación entre estas variables. En este sentido, Zhang *et al.* 2009, informa que la pigmentación de la pulpa en papa está conferida por el locus *Pf*. Este locus se encuentra fuertemente ligado con el gen *I*, que es requerido para la pigmentación de la piel.

Tabla 2. Frecuencia de clases de color de piel y pulpa y test de asociación en la descendencia del cruzamiento de dos clones de batata del banco de germoplasma del INTA con colores contrastantes de piel y pulpa. Arizio *et al.* 2008

Pulpa	Piel			Totales
	Antociánica	Naranja	Blanco/Crema	
Blanco/Crema	45	7	16	68
Naranja	25	12	4	41
Totales	70	19	20	109

Test de asociación color de piel vs. color de pulpa. General: $\chi^2 = 8,03$; $\chi^2_{0,05[2]} = 5,99$. Piel antociánica vs. piel blanco-crema: $\chi^2 = 1,76$; $\chi^2_{0,05[1]} = 3,84$. Piel antociánica vs. piel naranja: $\chi^2 = 4,63$; $\chi^2_{0,05[1]} = 3,84$. Piel blanco-crema vs. piel naranja: $\chi^2 = 29,99$; $\chi^2_{0,005[1]} = 7,879$

3. Evaluación del color objetivo en la progenie

La evaluación del color objetivo de la población completa fue realizada en el año 2007. Dado que los parámetros siguen una distribución normal (Shapiro-Bill) y que no hay efectos de los bloques, repeticiones y lecturas, los datos fenotípicos fueron promediados y calculada su desviación estándar. Utilizando los valores de color objetivo fueron realizados análisis para determinar si existía efecto debido a los cruzamientos recíprocos.

Tabla 3. Parámetros de color de piel y pulpa de los padres y su descendencia en un cruzamiento recíproco de dos clones de batata con colores contrastantes de piel y pulpa. Arizio *et al.* 2008

Genotipos	Piel			Pulpa		
	L	C	h°	L	C	h°
Padre 30	62,9 a	28,6 a	79,3 a	80,8 a	20,9 c	98,9 a
30♀ x 45♂	56,0 b	25,6 b	60,7 b	78,7 ab	26,2 b	89,5 b
45♀ x 30♂	52,7 b	24,4 bc	53,5 b	77,8 b	27,4 b	89,5 b
Padre 45	42,5 c	23,3 c	25,5 c	74,5 c	33,1 a	84,8 b
Media Padres	52,7	25,95	52,4	77,65	27,0	91,85
CV	12,3	13,4	27,8	5,1	27,4	13,2
R ² del modelo	0,09	0,03	0,09	0,02	0,02	0,01

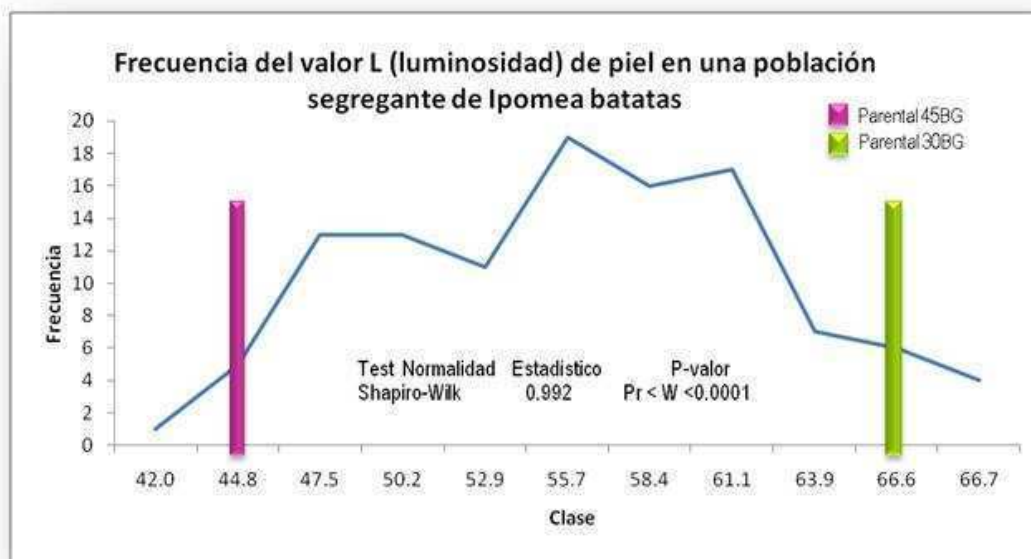
Promedios seguidos por la misma letra dentro de cada columna no presentan diferencias significativas (Duncan, 5 %).

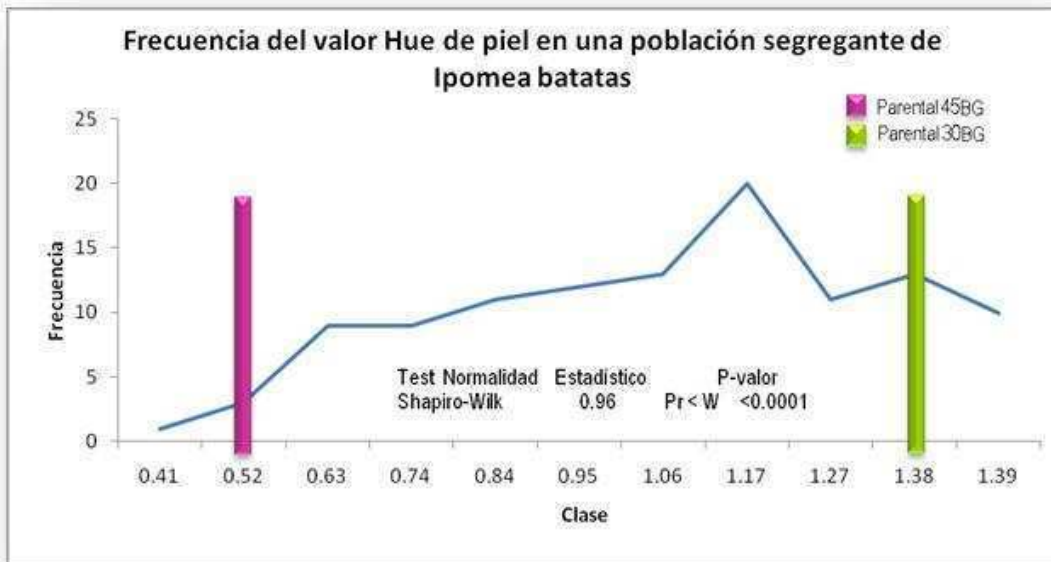
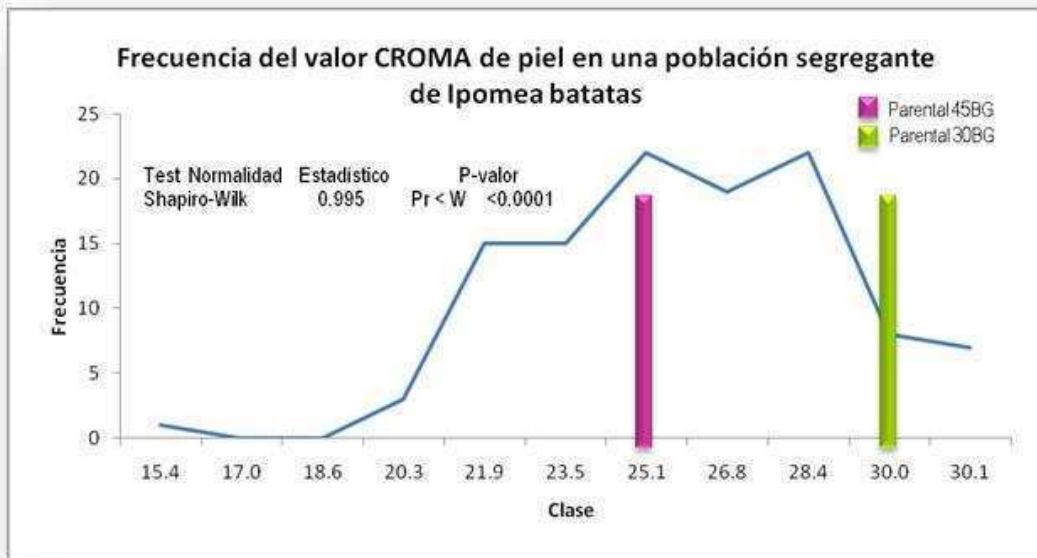
En la piel, el parental utilizado como genotipo materno no afectó a ninguno de los parámetros analizados en los cruzamientos recíprocos, por lo que es esperable que el promedio de la

descendencia no sea afectado por la dirección del cruzamiento (30♂ x 45♀ o 45♂ x 30♀). La descendencia presentó valores promedio para estos parámetros cercanos al promedio de los padres (Tabla 3).

El parental 30BG presentó valores más altos que el 45BG para los parámetros L, C y hº. El valor de hº para el parental 30BG está dentro de la gama del amarillo, y el del 45BG dentro de la gama del rojo. El análisis de variancia para L, C, y hº reveló la existencia de diferencias altamente significativas entre los genotipos (padres y descendencia) (Tabla 4). Para la mayoría de los parámetros hubo genotipos con valores significativamente ($\alpha = 0,05$) más altos o más bajos que el de alguno de los progenitores. Esto fue más evidente en la saturación (C), con un 56 % de los individuos por fuera del rango de los progenitores, mientras que para L y hº se registro un 13 % de los individuos en esa condición (Gráfico 5).

Gráfico 5. Frecuencia de distribución de las variables L (luminosidad), C (croma) y hº (ángulo hue) en piel de una población segregante de *Ipomea batatas*. Se identifican en los mismos los valores de los parentales.



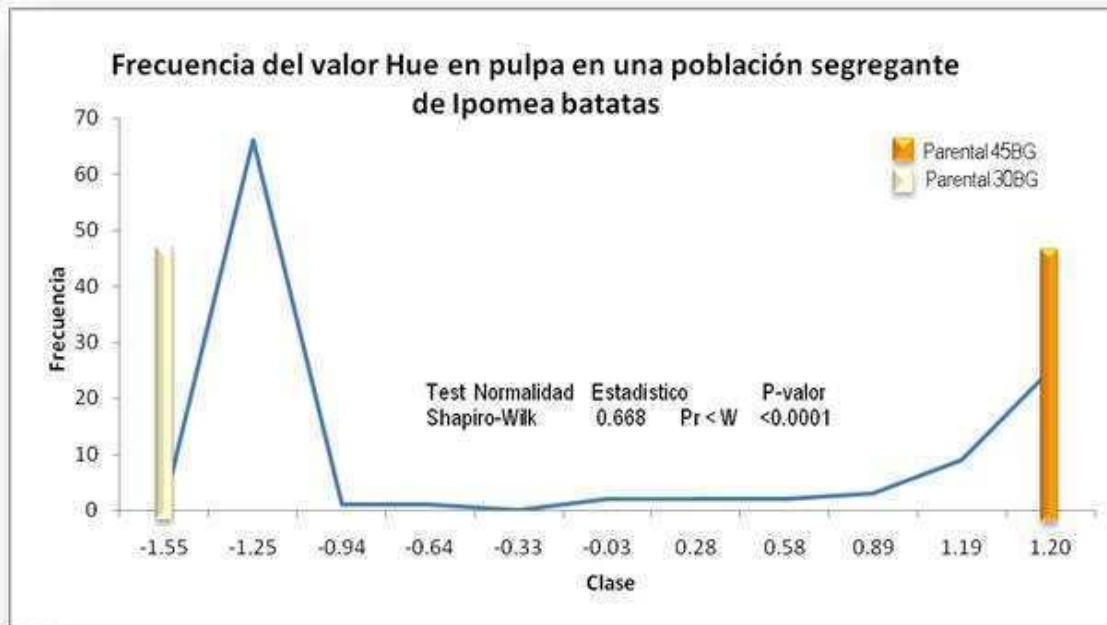


Para la pulpa, tampoco se observó efecto del orden del uso como madre o padre de los genotipos progenitores sobre L, C, y h^a. Para L y C el promedio de la descendencia presentó valores cercanos al promedio entre los padres, mientras que para h^a ese valor estuvo desviado hacia el progenitor 45BG, no detectándose diferencias significativas entre el promedio de la descendencia y el del progenitor 45BG. Así como para la piel, hubo diferencias altamente significativas entre los genotipos para las tres variables de color (Tabla 3). Se registraron individuos que presentaron valores de L, C y h^a fuera del rango de los padres. El 50 % de la descendencia presentó valores de h^a por fuera de ese

rango, mientras que para C y L el porcentaje de individuos bajo esa condición fue de 32% y 27%, respectivamente (Gráfico 6).

Gráfico 6. Frecuencia de distribución de las variables L (luminosidad), C (croma) y hº (ángulo hue) en pulpa de una población segregante de *Ipomea batatas*. Se identifican en los mismos los valores de los parentales y test de normalidad.





A partir de estos datos, podemos aproximarnos a la genética de este carácter: los colores de piel con pigmentos antociánicos resultaron incompletamente dominantes sobre la piel no antociánica. En la pulpa, se observa que la coloración crema es parcialmente dominante sobre naranja. Estos datos son coincidentes con los observados por Hernández *et al.* (1965), donde en los cruzamientos entre un genotipo de pulpa crema con tres genotipos con creciente concentración de carotenos se obtienen más del 80 % de progenies de color crema. Esta dominancia parcial de pulpa blanco crema sobre pulpa naranja aparentemente se contradice con el promedio de h° de la pulpa de la descendencia, que resultó más próximo al valor del padre con color naranja (progenitor 45). Sin embargo debe recordarse que el ojo humano no distingue esas tres variables, sino que las integra en una sola expresión, por lo que h° no puede asimilarse a la expresión subjetiva.

Si se consideran las otras dos variables, se observa que el valor L de la descendencia estuvo más próximo al padre 30 (blanco/crema), mientras que para C el promedio de la descendencia fue equidistante del promedio de los progenitores (Tabla 4). Esos resultados sugieren que en un proceso de selección es conveniente combinar la medición objetiva con la apreciación visual del color.

Tabla 4. Análisis de Varianza del efecto del genotipo (progenitores y progenie) sobre las variables de color de la piel y la pulpa resultantes del cruzamiento de dos clones de batata. Arizio *et al.* 2008

Fuente			
<i>L piel CV=5,1; R²=0,84</i>			
	GL	CM	p>F
Bloques	1	7.4	0.34
Batatas (bloques)	4	14.8	0.12
Genotipos	113	632.8	<0.0001
<i>C piel CV=6,6; R²=0,78</i>			
	GL	CM	p>F
Bloques	1	1.82	0.42
Batatas (bloques)	4	1.71	0.65
Genotipos	113	136.7	<0.0001
<i>h^e piel CV=9,6; R²=0,90</i>			
	GL	CM	p>F
Bloques	1	420.4	0.0002
Batatas (bloques)	4	7.7	0.9
Genotipos	113	3822.8	<0.0001
<i>L pulpa CV=2,2; R²=0,82</i>			
	GL	CM	p>F
Bloques	1	55.8	<0.0001
Batatas (bloques)	4	3.2	0.38
Genotipos	113	198.7	<0.0001
<i>C pulpa CV=12,7; R²=0,80</i>			
	GL	CM	p>F
Bloques	1	9.6	0.36
Batatas (bloques)	4	25.7	0.06
Genotipos	113	643.2	<0.0001
<i>h^e pulpa CV=3,2; R²=0,95</i>			
	GL	CM	p>F
Bloques	1	8.06	0.31
Batatas (bloques)	4	26.5	0.01
Genotipos	113	1894	<0.0001

4. Evaluación del Contenido de Caroteno

El contenido de carotenoides en los vegetales ha sido ampliamente estudiado, ya sea detectando y cuantificando específicamente un pigmento mediante HPLC o cuantificando la concentración de carotenos totales utilizando UV. Ambas metodologías fueron abordadas en esta tesis. Los estudios realizados mediante HPLC han permitido en batata determinar que las de pulpas anaranjadas contienen principalmente β -caroteno. Inclusive, en aquellas de color amarillo con manchas naranjas, el principal pico observado en el cromatograma corresponde al β -caroteno (Kimura *et al.* 2007). Por otro lado, Martín Franklin 1982 informa que los principales carotenoides detectados en diferentes cultivares de batatas amarillas y blancas fueron fitoflueno, ϵ -caroteno, neoporeno (inoloro) y β -zeacaroteno. Estos son precursores del β -caroteno. Si bien muchas no presentan β -

caroteno, el precursor β -zeacaroteno presenta una actividad provitamina A de entre el 20% y el 40%, ya que presenta un anillo beta.

4.1 Contenido de carotenos totales mediante espectrofotometría

Sobre el total de genotipos se analizó mediante UV el contenido de carotenos totales. La absorbancia fue medida a tres longitudes de onda (430nm, 470nm y 502nm). Se analizaron los datos obtenidos en la longitud de 470 nm, por ser la más cercana al pico de mayor absorbancia informada para el β -caroteno. El contenido de carotenos fue expresado como microgramo por gramo de tejido fresco. Se observó un rango de contenido de carotenos totales para piel desde 3.98ug/g a 102.24 ug/g de peso fresco, mientras que para pulpa fue de 2.49ug/g hasta 106.83ug/g (Gráficos 7 y 8). La mayoría de las progenies presentaron valores bajos, cercanos al parental 30BG.

Los valores están en consonancia con los observados en bibliografía, aunque se informan variedades con mayor contenido de carotenos. Los parentales presentaron 6.13ug/g y 38.14ug/g para piel del padre 30BG y 45BG respectivamente. Para la pulpa el padre 30BG presentó un valor de 6.42ug/g mientras que el 45BG fue de 14.97ug/g. Las diferencias entre ambos parentales resultaron significativas.

Gráfico 7. Frecuencia de la concentración de β -carotenos detectados en pulpa mediante UV (470nm). Se indican los parentales y dos progenies extremas.

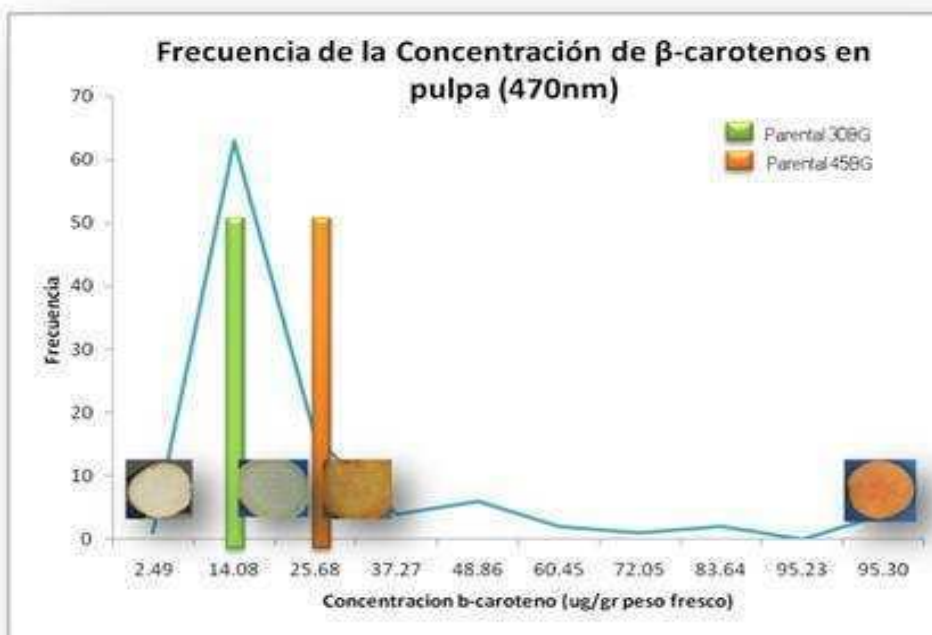
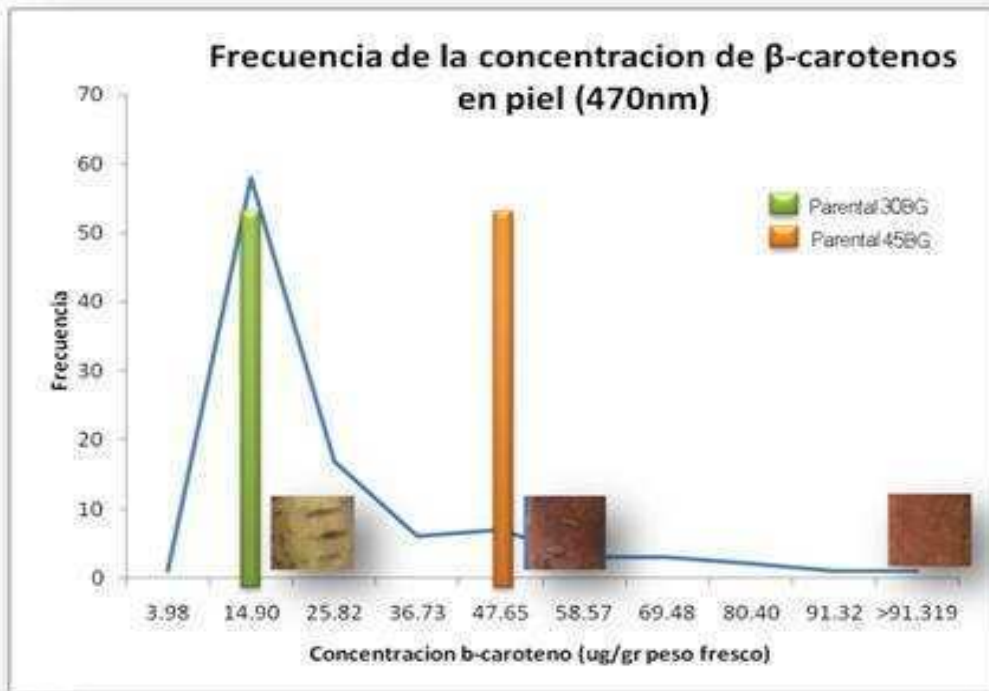
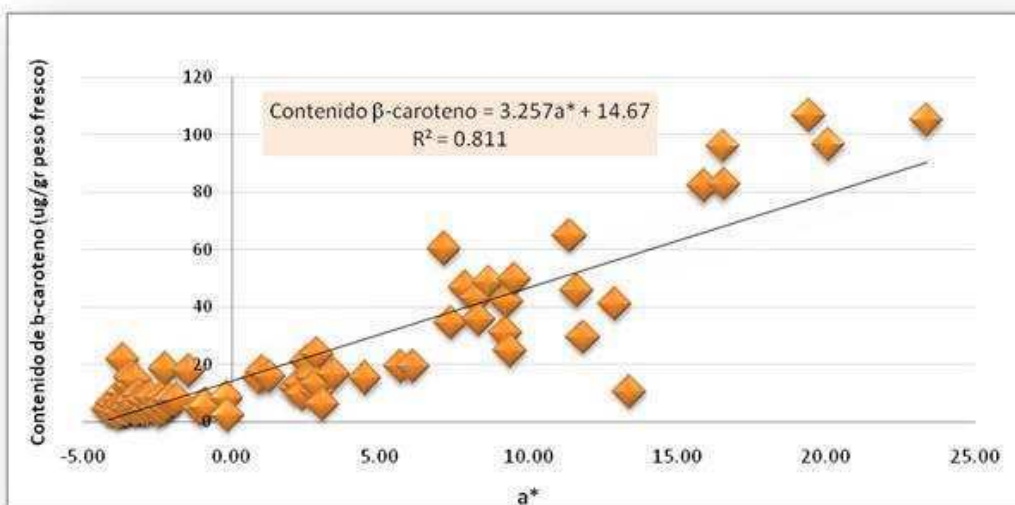


Gráfico 8. Frecuencia de la concentración de β -carotenos detectados en piel mediante UV (470nm). Se indican los parentales y dos progenies extremas.



Cuando se analiza por otra parte la relación entre el contenido de carotenos (medida con ambos métodos) y el color visual, las variables a^* y L son las que presenta el mejor ajuste cuando se analiza la pulpa.

Gráfico 9. Representación de la relación entre la concentración de carotenos totales y a^* (eje rojo-verde) en la pulpa de la población de mapeo.



Tanto mediante UV como HPLC, muestran una relación positiva con la variable a^* y un R^2 de 0.811 y 0.769 para UV y HPLC respectivamente (Gráfico 9).

La variable L, por otro lado presenta relación negativa con un R^2 de 0.662 y 0.514. Las otras variables de color objetivo como b^* , C y h° no presentan relación. Estos resultados resultan acordes a los informados por Takahata *et al.* (1993) que estudió la relación entre el contenido de β -caroteno y los valores del color Hunter en diferentes cultivares de batata. Ellos detectaron que la variable a^* presenta el mayor coeficiente de correlación (0.891) con el β -caroteno, por lo que esta variable puede ser utilizada como una estimación rápida del contenido de β -caroteno.

A diferencia de la pulpa, la piel no presenta ninguna relación entre las variables de color y el contenido de caroteno. Esto es totalmente esperable, ya que el valor a^* en piel, esta dado en mucho genotipos por la presencia exclusiva de antocianinas, por lo que presentan altos valores de a^* , aún en ausencia de caroteno. Esto nos permite concluir que la variable a^* es una buena herramienta para evaluar el contenido de carotenos en la pulpa, no así en la piel cuando se trabaja con variedades moradas.

4.2 Contenido de carotenos totales mediante HPLC

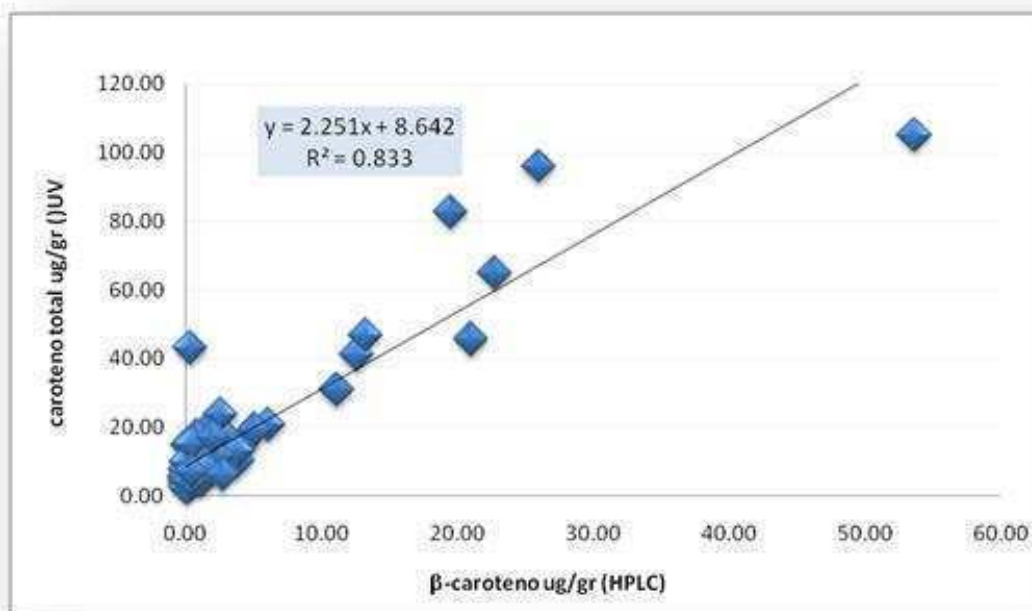
El análisis mediante HPLC fue realizado en 52 genotipos de la población y ambos parentales. Los individuos fueron seleccionados de modo tal de tener una representación de todas las variantes de color. El contenido de β -caroteno en la pulpa varió entre 0.0 $\mu\text{g}/\text{gr}$ de tejido fresco a 53.0 $\mu\text{g}/\text{gr}$. Los parentales presentaron bajos valores entre 0.17 $\mu\text{g}/\text{gr}$ y 2.3 $\mu\text{g}/\text{gr}$ para el 30BG y 45BG respectivamente. Al igual que para las características evaluadas anteriormente, se observa un porcentaje de progenies (26%) que exceden los valores parentales, aunque la mayoría presenta concentración de β -caroteno muy bajos. Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango observado en la amplia bibliografía que existe: Takahata *et al.* 1993, analiza 22 cultivares de batata y encuentra que todos contienen mayoritariamente β -carotenos y su contenido varía entre 11 y 266 $\mu\text{g}/\text{g}$ para pulpas amarillas/crema o anaranjadas. Bicudo de Almeida-Muradian *et al.* 1992, encuentran una variación entre 0.1 a 218 $\mu\text{g}/\text{g}$ del contenido de carotenos en 10 cultivares de batat, representando el β -caroteno entre el 10% y el 93% del contenido total de carotenoides. Kosambo *et al.* 1998 por su parte observa un rango entre valores menores a 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ y 80 $\mu\text{g}/\text{g}$, representando entre 0.1 y 90.8% de contenido total de carotenoides. En este mismo rango, Hagenimana *et al.* 1999 obtiene entre 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ y 63 $\mu\text{g}/\text{g}$, siendo la contribución igual que en el trabajo anterior. Huang *et al.*

1999, analiza también variedades de diferentes coloraciones, encontrando que para las naranjas el contenido varía entre 67 y 131 $\mu\text{g/g}$, de 1 $\mu\text{g/g}$ a 6 $\mu\text{g/g}$ en las pulpas amarillas/blancas y también de 1 $\mu\text{g/g}$ a 5 $\mu\text{g/g}$ en variedades de pulpas moradas.

Teniendo en cuenta las categorías propuestas por Simonne *et al.* 1993, la población de mapeo y los parentales se consideran entre bajo (1 a 39 $\mu\text{g/gr}$) y moderado (40 a 129 $\mu\text{g/gr}$) contenido de β -caroteno. Menor de 1 $\mu\text{g/gr}$ considera que no es detectable.

Es interesante analizar la relación entre las dos metodologías utilizadas, principalmente, porque si ambas aportan información similar, la medición mediante UV es más simple y de bajo costo y es posible de utilizar en grandes cantidades de muestras. El análisis de esta relación muestra un coeficiente de determinación R^2 de ajuste de la regresión alto: 0.833. Puede observarse que los valores obtenidos mediante UV son mayores a la cuantificación por HPLC. Este resultado es esperable, ya que en UV detectamos no solo el β -caroteno sino todos los carotenoides que absorben a esa longitud. Si bien la utilización de UV podría estar sobreestimando el contenido de β -caroteno, el gráfico 10 muestra una buena relación entre ambos métodos.

Gráfico 10. Relación entre el contenido de β -caroteno y carotenos totales.



Resultados similares fueron obtenidos por Kimura (2007) cuando compara ambos métodos para estimar el contenido de carotenos: UV versus HPLC. La comparación incluye dos variedades completamente anaranjadas y una amarilla con manchas salmón en la pulpa. Ambas metodologías

presentan resultados similares, la mayor diferencia se observa en la de pulpa amarilla, donde la evaluación del total de carotenoides por UV es significativamente más alta que su medición mediante HPLC, ya sea en cuanto a β -carotenos totales como con los β -carotenos (β - β). Sin embargo como método de aproximación la espectroscopia UV se presenta como una metodología apropiada, no solo porque permite alcanzar el nivel de profundidad necesario para una aproximación a la cuantificación, sino principalmente porque es un método de mayor simplicidad y económico que el HPLC.

Para todas las variables analizadas, se observaron genotipos que presentan valores mayores o menores que los parentales. La variación transgresiva es frecuente en poblaciones que derivan de parentales genéticamente divergentes. Padres divergentes difieren en la constitución alélica de muchos loci, generando individuos que pueden ser “mejores” o “peores” para características específicas de alguno de los padres. El cruzamiento entre líneas divergentes provee a los mejoradores un gran espectro de variación genética sobre la cual realizar una posterior selección. En el caso particular de batata, teniendo en cuenta su genoma hexaploide, podemos tener 12 alelos segregando para un loci dado, lo que nos puede originar hasta 400 fenotipos diferentes en la progenie (Kriegner *et al.* 2003). Esto es altamente probable, dado que es una especie de fertilización cruzada que presenta alto grado de heterocigosidad.

5. Contenido de Antocianinas

El contenido de antocianinas no pudo ser cuantificado debido a que el protocolo utilizado para conservar el material no resultó el apropiado. La molienda de la piel llevó a una oxidación de las antocianinas, generando un color pardo. Se ensayó posteriormente que la mejor forma de mantener las antocianinas de la piel es cortando tiras anchas de la misma y conservarlas a -20°C.

Conclusiones

La dirección en que se realiza el cruzamiento entre los clones 30BG y 45BG no afecta a las variables de color L, C, y h^a.

Si bien el promedio de las variables estudiadas en la descendencia se espera sea próximo al promedio de los progenitores, la existencia de herencia transgresiva explica individuos con valores que superan a los de los padres.

En la piel, el color dado por pigmentos antociánicos es parcialmente dominante sobre las otras tonalidades sin antocianinas, y en la pulpa la coloración blanco/crema es parcialmente dominante sobre la naranja.

Los colores de piel y pulpa están asociados, siendo la combinación piel con antocianinas y pulpa blanco/crema la más esperada.

El uso de UV para la medición del contenido de carotenos totales resulta apropiado para evaluar el contenido de β -caroteno en la pulpa en poblaciones con coloraciones naranjas.

El valor a* de color objetivo presenta una relación lineal con el contenido de caroteno con un coeficiente de correlación alto que permite su uso como medición indirecta del contenido de carotenos en pulpa.

Ninguna variable de color objetivo resulta apropiada para la cuantificación de β -caroteno en piel de variedades con antocianinas.

La variable a* presenta la mayor variación a lo largo de los años en la pulpa del parental 45BG.

La concentración de caroteno está fuertemente influenciada por el ambiente, por lo que se hace necesario aumentar el número de repeticiones a ensayar, ya sea en diferentes localidades o en varios años.

Los caracteres siguen una distribución normal.

Los datos generados permitirán su uso en la búsqueda de regiones genómicas asociadas a estos caracteres.

Bibliografía

- Alonso D.P., Salucci M., Lázaro R., Maiani G. & Ferro-Luzzi A. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentos y Nutrición*. 13(2):104-111.
- Ameny, M.A. & P.W. Wilson. 1997. Relationship between Hunter color and β -carotene content in white-fleshed African sweetpotato. *J. Sci. Food Agric.*73:301-306.
- Arizio C.M., M.M. Manifesto & H.R. Martí. 2008. Análisis de caracteres relacionados con el color de la raíz engrosada en un cruzamiento de dos clones de *Ipomoea batatas* L. (Lam.). *Horticultura Argentina* 28(65):5-13.
- Baranska M.; Baranski R.; Schulz H. & Nothnagel T. 2006. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* 224: 1028-1037
- Beatty, S., J. Nolan, H. Kavanagh, & O. O'Donovan. 2004. Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. *Archive Biochemical Biophysics* 430:70–76.
- Bicudo de Almeida-Muradian I; DeVouno Camargo Penteadó M & Pupo DeFerreira V.I. 1992. Relationship between carotenoid content and hunter lab colour parameters of Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 32(6): 611-619.
- Block G., Patterson B. & Sauber A. 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18:1–29.
- Cervantes-Flores J., Craig Yencho G., Kriegner A., Pecota K.V., Faulk M.A., Mwangi O.M & Sosinski B. 2007. Development of genetic linkage map and identification of homologous linkage group in sweetpotato using multiple-dose AFLP markers. *Molecular Breeding*.
- CIP, AVRDC, IBPGR. 1991. Sweet Potato: Descriptors for Sweet potato. Huaman Z, editor. IBPGR, Rome, Italy.
- Cuevas H. E., J. E. Staub, P. W. Simon, J. E. Zalapa & J. D. McCreight. 2008. Mapping of genetic loci that regulate quantity of beta-carotene in fruit of US Western Shipping melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* 117:1345-1359
- Cunningham Jr., F.X. 2002. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* 74(8):1409-1417
- Cunningham, Jr. F. X. & Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. 1998. *Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49:557-583.

Devitt Luke C., Kent Fanning, Ralf G. Dietzgen & Timothy A. Holton. 2010. Isolation and functional characterization of a lycopene b-cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Experimental Botany* 61(1):33-39.

Fraser P.D. & P.M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43: 228–265

Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM. 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiology* 105:405-413

Fukada-Tanaka S., Y. Inagaki, T. Yamaguchi, N. Saito and S. Iida. 2000. Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature* 407, 581

Furuta Shu , Ikuo Suda, Yoichi Nishiba & Osamu Yamakawa. 1998. High tert-Butylperoxyl Radical Scavenging Activities of Sweet Potato Cultivars with Purple Flesh. *Food Science and Technology International, Tokyo.* 4(1):33-35

Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiological literature. *Journal of the National Cancer Institute* 91:317–331

Grassmann, J., Hippeli, S. & Elstre, E.F. 2002. Plant's defence mechanism and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:471-478.

Grotewold E. 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology* 57:761-780.

Hagenimana V., Oyunga M.A., Low J., Njoroge S.M., Gichuki S.T. & Kabira J. 1999. The effects of women farmer's adoption of orange-fleshed sweet potatoes: raising vitamin A intake in Kenya. *International Center for Research on Women, Research Report Series* 3.

Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.

Harrison Howard F., J. K. Peterson, M. E. Snook, J. R. Bohac & D. M. Jackson .2003. Quantity and Potential Biological Activity of Caffeic Acid in Sweet Potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] Storage Root Periderm. *J. Agric. Food Chem.* 51(10):2943-2948.

Hayase F & Kato H. 1984. Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 30(1):37-46.

Hernández T.P.; Hernández T.; Constantin R. & Miller J. 1965. Inheritance of and method of rating flesh color in *Ipomoea batatas*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1965. 87:387-390.

Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4:210-218.

- Holton, T.A. & Cornish, E.C., 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*. 7:1071-1083
- Hornero-Mendez D, Minguez-Mosquera M.I. 2000. Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplasts of *Capsicum annum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *Journal of Biological Chemistry* 48:1617-1622.
- Howitt, C.A. & B.J. Pogson. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell and Environment* 29:435-445.
- Huang A. S. , L. Tanudjaja & D. Lum. 1999. Content of Alpha-, Beta-Carotene, and Dietary Fiber in 18 Sweetpotato Varieties Grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* 12(2):147-151
- Humphrey, J.H., K.P. West Jr., & A.V. Sommer. 1992. Vitamin A deficiency and attributable mortality amongst 5-year-olds. *World Health Organization Bulletin* 70:225–232.
- Jalal F., MC Nesheim, Z Agus, D Sanjur, & JP Habicht. 1998. Serum retinol concentrations in children are affected by food sources of β -carotene, fat intake, and anthelmintic drug treatment. *American Journal Clinical Nutrition* 68:623-629.
- Kays S.J. 1992. The chemical composition of the sweetpotato. In: W.A. Hill and P.A. Loretan, Editors, *Sweetpotato technology for the 21st century*, Tuskegee University:201-262.
- Kimura M., Kobori C.N., Rodriguez-Amaya D.B. & Nestel P. 2007. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chemistry* 100:1734-1746.
- Kobayashi M., Oki T., Masuda M., Nagai S., Fukui K., Matsugano K. & Suda I. 2005. Hypotensive effect of anthocyanin-rich extract from purple-fleshed sweet potato cultivar "Ayamurasaki" in spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 52(1):41-44.
- Kosambo L.M., E.E. Carey, A.K. Misra, J. Wilkes & V. Hagenimana. 1998. Influence of age, farming site and boiling on pro vitamin A content in sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] storage roots. *J. Food Composition and Analysis* 11: 305-321.
- Kriegner A., Carlos Cervantes J., Burg K., Mwanga R.O.M., & Zhang D. 2003. A genetic linkage map of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] based on AFLP markers. *Mol. Breed.* 11:169-185
- Kritchevsky S. B. 1999. β -Carotene, Carotenoids and the Prevention of Coronary Heart Disease. *The Journal of Nutrition* 129:5-8.
- Kuskoski E. M; A. G. Asuero; M. C. García-Parilla; A. M. Troncoso & R. Fett. 2004. Atividade antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24(4):691-693
- Kyung-Jin Yeum & Robert M. Russell. 2002. Carotenoid Bioavailability and Bioconversion. *Annual Reviews Nutrition* 22:483-504.

- Lichtenthaler H.K., Schwender J., Disch A. & Rohmer M. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plants proceeds via a mevalonate independent pathway. *FEBS Letter* 400:271-274
- Lin K.; Lai Y.; Chang K.; Chen Y.; Hwang S. & Lo H. 2007. Improving breeding efficiency for quality and yield of sweet potato. *Botanical Studies* 48:283-292.
- Low, J., T. Walker, & R. Hijmans. 2001. The potential impact of orange-fleshed sweetpotatoes on vitamin A intake in Sub-Saharan Africa. The VITAA Project, vitamin A and orange-fleshed sweetpotatoes in Sub-Saharan Africa, http://www.cipotato.org/vitaa/Publications/Paper_vitaa.pdf.
- Ma Le & Xiao-Ming Lin. 2010. Effects of lutein and zeaxanthin on aspects of eye health. *Journal Science Food Agricultural* 90:2-12.
- Manifesto M.M., S.M. Costa Tartara, C.M. Arizio, M.A. Alvarez & N.R. Hompanera. 2010. Analysis of the morphological attributes of a sweetpotato collection. *Annals of Applied Biology* ISSN 0003-4746
- Marsili, R. 1996. Food color: more than meets the eye. *Food Product Design* (on line).
- Martí H. R. 2004. Effects of storage time and boiling on root tuber colour in two sweet potato [*Ipomoea batatas* L. (Lam.)] cultivars. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2(4):570-575.
- Maynes S.T. 1996. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 10:690-701.
- McGregor C.E. & D.R. La Bonte. 2006. Differential expression of genes between storage roots of sweetpotato cultivars Jewel and White Jewel. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 798-805.
- McGuire R.G. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27(12):1254-1255.
- Meléndez-Martínez A.J., I.M. Vicario & F.J. Heredia. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol. 57(2).
- Middleton E.Jr., Kandaswami C. & Theoharides T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Reviews* 52:673-751
- Padda Malkeet S. & David H. Picha. 2008. Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes. *Scientia Horticulturae* 119:17–20.
- Rabah, I.O., Hou, D.X., Komine, S.I., Fujii, M., 2004. Potential chemopreventive properties of extract from baked sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam. cv. Koganesengan). *J. Agric. Food Chem.* 52:7152-7157.
- Sandmann G, Romer S, Fraser PD. 2006. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering* 8:291-302.
- Schijlen Elio G.W.M., C.H. Ric de Vos, Arjen J. van Tunen & Arnaud G. Bovy. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65:2631-2648.

- Schwender J. S, Myriam Seemann, H. K. Lichtenthaler & Michel Rohmer. 1996. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehydes 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus Obliquus*. *Biochemical Journal* 316:73-80.
- Shimozono, H., M. Kobori, H. Shinmoto and T. Tsushida, 1996. Suppression of the melanogenesis of mouse melanoma B 16 cells by sweetpotato extract. *Nipp. Shok. Kagaku Kogaku Kaishi*, 43:313-317.
- Simmons, A.H.; Kays, S.J.; Koehler, P.E. & Eitenmiller, R.R. 2003. Assessment of β -Carotene content in sweetpotato breeding lines in relation to dietary requirements. *Journal Food Composition and Analysis*. 6:336-345.
- Sokal R.R. & Rohlf F.J. 1969. *Biometry*. Freeman, San Francisco
- Stafford, H.A. 1990. *Flavonoid Metabolism*. (Boca Raton, FL: CRC Press).
- Suda, I., Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., 2003. Physiological functionality of purple-fleshed sweet potatoes containing anthocyanins and their utilization in foods. *J. Agric. Res. Quart.* 37:167-173.
- Tadmor Y., S. King, A. Levi, A. Davis, A. Meir, B. Wasserman, J. Hirschberg & E. Lewinsohn. 2005. Comparative fruit colouration in watermelon and tomato. *Food Research International* 38:837-841
- Takahata, Y., T. Noda, & T. Nagata. 1993. HPLC determination of beta carotene content of sweet potato cultivars and its relationship with color values. *Japanese Journal of Breeding* 43:421-427.
- Tanaka Yoshikazu , Nobuhiro Sasaki & Akemi Ohmiya. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal Volumen* 54(4):733-749.
- Teow Choong C., Van-Den Truong, Roger F. McFeeters, Roger L. Thompson, Kenneth V. Pecota & G. Craig Yencho. 2007. Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry* 103:829-838.
- UPOV (Unión internacional para la protección de la obtención vegetal). 2010. Directrices para Ipomoea batatas IPOMO_BAT. http://www.upov.int/es/publications/tg-rom/tg258/tg_258_1.pdf
- Van Jaarsveld P.J, M. Faber, S. A Tanumihardjo, P. Nestel, C. J Lombard & A. J Spinnler Benad. 2005. β -Carotene rich orange fleshed sweet potato improves the vitamin A status of primary school children assessed with the modified-relative-dose-response test. *American Journal Clinical Nutrition* 81:1080-1087.
- Van Poppel G. & Goldbohm R.A. 1995. Epidemiological evidence for b-carotene and cancer prevention. *American Journal of Clinical Nutrition* 62:1493-1503.
- Walter, W.M., Purcell, A.E., 1979. Evaluation of several methods for analysis of sweet potato phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 27:942-946.

Wolters Anne-Marie A., Jan G. A. M. L. Uitdewilligen, Bjorn A. Kloosterman, Ronald C. B. Hutten, Richard G. F. Visser & Herman J. van Eck. 2010. Identification of alleles of carotenoid pathway genes important for zeaxanthin accumulation in potato tubers. *Plant Mol Biol* 73:659-671

Woolfe, J.A. 1992. Sweet potato an untapped food resource. Cambridge University Press, New York. www.foodproductdesign.com/archive/1996/1096QA.html

Yamamizo Chihiro, Sanae Kishimoto & Akemi Ohmiya. 2010. Carotenoid composition and carotenogenic gene expression during Ipomoea petal development. *Journal of Experimental Botany* 61(3):709-719,

Yoshinaga M., O. Yamakawa & M. Nakatani. 1999. Genotypic Diversity of Anthocyanin Content and Composition in Purple-Fleshed Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Breeding Science* 49(1):43-48.

Zhang Yongfei, Chun Suk Jung & Walter S. De Jong. 2009. Genetic analysis of pigmented tuber flesh in potato. *Theo Appl Genet* 119:143-150.

5

Desarrollo de un mapa de ligamiento y localización de marcadores funcionales

Carla Marcela Arizio

*“Identifying a gene or QTL within a plant genome is
like finding the proverbial needle in a haystack.”*

Collard et al. 2005

Resumen

Fueron desarrollados dos mapas genéticos enriquecidos con genes candidatos relacionados con la síntesis de antocianinas y carotenos, utilizando un población F1 segregante de 113 individuos. La estrategia de mapeo utilizada fue pseudo test cross. Se utilizaron marcadores de dosis simple, doble y doble-simple. El mapa del parental 30BG presenta 29 grupos de ligamiento conformado por 78 marcadores y un tamaño de 1049 cM, mientras que para el parental 45BG se obtuvieron 16 grupos de ligamiento con 41 marcadores. La distancia promedio entre marcadores fue de 13 cM. En ambos parentales se identificaron posibles cromosomas homólogos mediante los marcadores multialélicos (SSR y GC). Los marcadores doble dosis detectados no permitieron la identificación de homólogos. Fue posible localizar alelos de 6 genes candidatos. Los diferentes análisis relacionados con el tipo de ploidía apoyan la hipótesis de un genoma autopoliploide con apareamientos preferenciales. La determinación de la dosis alélicas y configuraciones permitió avanzar en la descripción de los marcadores desarrollados en *Ipomoea batatas*. Se desarrollaron las frecuencias genotípicas esperadas en una especie hexaploide con segregación hexasómica para alelos de dosis múltiple-simple y múltiple-múltiple. El número de marcadores utilizados para desarrollar el mapa de *Ipomoea batatas* resultó insuficiente para cubrir todo el genoma. No se detectaron QTL relacionados con el color y contenido de caroteno de la piel y pulpa. Los mapas de ligamientos obtenidos son los primeros que localizan marcadores SSR y genes del metabolismo de pigmentos en *Ipomoea batatas*.

Introducción

Los mapas de ligamiento genético basados en marcadores moleculares proveen una poderosa herramienta para la detección de *loci* que controlan características de interés y para el estudio de la organización y evolución del genoma de muchas especies.

A pesar de la importancia global del cultivo de batata las investigaciones en el área de genética molecular se encuentran limitadas. Hasta el momento han sido publicados sólo cuatro trabajos de mapeo en batata. Los mapas obtenidos presentan de baja a mediana saturación, con el número esperado de grupos de ligamiento (GL). Todos ellos fueron realizados con marcadores dominantes y ninguno presenta localización de genes de interés.

El mapeo de marcadores co-dominantes, permitiría la detección de cromosomas homólogos y aumentar la información genética aportada por los microsatélites. Los datos derivados de los análisis de segregación de los alelos contribuirían a entender el tipo de ploidía que presenta *Ipomoea batatas*. Estudios actuales muestran marcadores segregando con herencia hexasómica y otros con tetrasómica/tetradisómica, que evidencian patrones de segregación mixta y la existencia de algunos apareamientos preferenciales.

Por otra parte, contar con marcadores asociados a características relevantes, aportaría nuevas herramientas como la selección asistida a los programas de mejoramiento tradicionales. Estos programas se enfrentan con problemas que limitan su eficiencia: naturaleza hexaploide de la especie, limitada producción de semillas, autoincompatibilidad e incompatibilidad cruzada (Vimala, 1990). El desarrollo de herramientas moleculares podría ser un paso para superar estos aspectos.

Un mapa de ligamiento saturado en batata que incluya genes candidatos que codifican componentes de rutas metabólicas relacionadas con calidad nutricional, es necesario para poder detectar ligamientos entre genotipo y fenotipo y poder identificar marcadores eficientes para su uso en el mejoramiento asistido por marcadores.

1. Marcadores Genéticos

Los marcadores genéticos representan diferencias entre organismos o especies y son heredables, lo que permite seguirlos a lo largo de diferentes generaciones. No necesariamente ellos implican los genes de interés, pero actúan como indicadores por estar localizados en la proximidad de dichos genes (fuertemente ligados). Todos los marcadores genéticos ocupan una posición genómica dentro de los cromosomas denominado *loci* (o *locus* en su singular). Tres son los tipos de marcadores genéticos: los morfológicos, los bioquímicos y los moleculares.

Tradicionalmente, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual, que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Estos marcadores morfológicos (ej.: número y forma de lóbulos de la hoja, coloración de piel y pulpa de raíces engrosadas o color de cubierta de las semillas), pueden ser utilizados como predictor de un determinado genotipo. Sin embargo, su bajo número, limitado polimorfismo y la posibilidad de interferencia epistática o ambiental limitaban su uso. Un avance en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos que detectan polimorfismo entre genes a través de los productos proteicos que ellos codifican. Sin embargo, la revolución en el área se da con el desarrollo de las modernas técnicas de la biología molecular que permiten la detección de la variabilidad genética directamente a nivel del DNA: los llamados marcadores moleculares.

1.2 Marcadores moleculares

La esencia de los marcadores moleculares radica en revelar diferencias a nivel del ADN, ya sea por variaciones en la longitud de una secuencia o en la propia secuencia. Estas diferencias se denominan polimorfismo y permiten la discriminación entre genotipos. La obtención de las variantes a nivel de ADN pueden obtenerse de diferentes maneras: por amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa; por corte con enzima de restricción y posterior amplificación o hibridación o por amplificación y secuenciado de un fragmento. La visualización de las diferencias puede ser realizada mediante la técnica de electroforesis en geles de acrilamida-bis-acrilamida o agarosa, que separan los fragmentos de ADN en función de su tamaño y/o conformación seguida de tinción con reactivos químicos (bromuro de etidio o nitrato de plata), hibridación con sondas radiactivas o reacciones colorimétricas y finalmente por secuenciación, dependiendo del tipo de marcador molecular usado. De acuerdo a la capacidad de discriminar entre individuos homocigotas de heterocigotas los marcadores pueden dividirse en dos grupos: marcadores co-dominantes y marcadores dominantes. Con los marcadores pertenecientes al primer grupo (incluye SSR, RFLP, SNPs) pueden distinguirse los homocigotas de los heterocigotas. Los del segundo grupo (AFLP, RAPD) no permiten realizar esta discriminación y su polimorfismo es detectado como la presencia o ausencia de un fragmento. Cada una de las técnicas presenta determinadas ventajas y desventajas y su elección depende del objetivo final del estudio, de la conveniencia y de los costos implicados en el mismo. Los RFLPs y RAPDs fueron los primeros marcadores desarrollados y los preferidos durante los primeros años de

aplicación de la técnica en el mejoramiento de los cultivos (RFLPs: Ma *et al.* 2001, Williams *et al.* 1994, Korzun *et al.* 1997, RAPDs: Penner *et al.* 1996, Ukoskit & Thompson 1997). Estos marcadores presentan algunas desventajas que hicieron que fueran reemplazados por nuevos marcadores que obvian el uso de radioactivos, requieren menor cantidad de ADN o protocolos más sencillos. Sin embargo los RAPD a pesar de su baja reproducibilidad continúan utilizándose por su bajo costo en aquellas especies con la que no se cuenta con ninguna información acerca del genoma de la especie en estudio o no hay desarrollados marcadores específicos (Samsampour *et al.* 2010).

La última generación de marcadores surge a partir del conocimiento generado por los grandes proyectos de secuenciación: STS, ESTs, SNPs e InDels.

En particular, los ESTs son marcadores que se desarrollan a partir de las secuencias de los mensajeros de ARN y permiten detectar diferencias a nivel de los genes que se están expresando, haciéndolos aplicables al estudio funcional de los genomas. Los SNPs por otro lado son marcadores co-dominantes extremadamente abundantes que identifican cambios en la secuencia de ADN de una única base. Estos marcadores son muy frecuentes, pero requieren la secuenciación de los fragmentos a estudiar, con el costo adicional que esto implica. Una opción para disminuir los costos de detección de gran cantidad de muestras es convertir estos SNPs en marcadores CAPs, si los cambios de base identificados por secuenciación son viables de ser clivados con alguna enzima de restricción, por lo cual, el polimorfismo puede ser detectado en geles.

Dos marcadores ampliamente utilizados son los AFLP y los SSR. Los AFLPs, se basan en la combinación de digestión con enzimas de restricción y posterior amplificación. Permiten analizar el polimorfismo de muchos loci a la vez, se consideran que tienen una amplia distribución genómica y utilizan primers universales, por lo cual, al igual que los RAPDs no se necesitan conocimientos previos acerca de las secuencias. Su principal desventaja es su costo, y su incapacidad para distinguir entre homocigotas y heterocigotas. Para el desarrollo de mapas, es una herramienta muy útil, ya que permite obtener gran cantidad de datos, logrando mapas más saturados.

Finalmente, uno de los marcadores moleculares más robustos y polimórficos son los microsatélites o repeticiones de secuencia simple (SSR). Son repeticiones cortas en tandem (1 a 6 pb) de un motivo de ADN. Su polimorfismo se basa en el número de repeticiones presentes y se traducen en diferencia de tamaño (pares de bases) entre alelos. Los loci de SSR son amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando primers específicos de 18 a 25 pares de bases que resultan complementarios a las regiones flanqueantes al microsatélite, las cuales son muy conservadas dentro de cada especie. Los SSR se distribuyen a través del todo el genoma de un organismo tanto en regiones codificantes como no codificantes. En general han sido detectados

diferencias en cuanto al tipo de repeticiones asociadas a la región donde se localizan los SSR: preferentemente dinucleótidos en las regiones no-codificantes y trinucleótidos en las codificantes relacionadas con una presión de selección (Li *et al.* 2004). Las características distintivas de los loci SSR son su alto contenido de información genética por su naturaleza codominante y alto nivel de polimorfismo, alta reproducibilidad y ser locus específico. Su automatización es posible y requieren poca cantidad de ADN. Existen dos estrategias para el desarrollo de SSR. Si no existe información genómica en la especie de estudio los SSR (Guo *et al.* 2007) deben ser desarrollados mediante la construcción de genotecas, hibridación aislamiento y secuenciación de clones, y posterior diseño de primers que flanquean las regiones SSR. La segunda estrategia es posible si se dispone de bases públicas de EST. Consiste en el diseño de primers *in silico*. Como característica ventajosa pueden mencionarse su bajo costo para su desarrollo, y una mayor tasa de transferibilidad entre especies por estar diseñados a partir de regiones codificantes y por lo tanto más conservadas en el genoma (Varshney *et al.* 2005).

Las características de los SSR (naturaleza multialélica, herencia codominante, relativa abundancia y buena cobertura del genoma) ha hecho que el empleo de los mismos sea preferido para los programas de selección asistida por marcadores (MAS), para estudios de mapeo genético (Ramsay *et al.* 2000; Albertini *et al.* 2003) y de diversidad (Christensen *et al.* 2007).

1.3 Marcadores moleculares disponibles en *Ipomoea*

Los marcadores moleculares neutros, RAPDs (random amplified polymorphic DNA), AFLPs (amplified fragment length polymorphism), ISSRs (inter-simple sequence repeats) y SAMPL (selective amplification of microsatellite polymorphic loci) han sido utilizados ampliamente para el genotipado de cultivares, detección de duplicados, estimación y monitoreo de la diversidad genética en (Jarret & Bowen 1994, Conolly *et al.* 1994; He *et al.* 1995; Dhillon e Ishiki 1999, Hwang *et al.*, 1999; Sagredo *et al.*, 1998; Rossel *et al.* 1999; Huang & Sun 2000 ; Zhang *et al.*, 1997,1998 1999; 2000, 2004; Hu *et al.* 2003; Gickuki *et al.*, 2003, Tseng & Hwang 2002; Wang *et al.* 1998; Elameen *et al.* 2008; Okada *et al.* 2003; Fabri 2009) en batata y especies silvestres relacionadas.

Los primeros SSR desarrollados en batata fueron obtenidos a partir de la estrategia de búsqueda en bibliotecas de DNA copia, 5 SSR (Jarret & Bowen 1994) y 9 SSR (Buteler *et al.* 1999). Un dato relevante surgido del trabajo de Buteler *et al.* (1999) está relacionado con el bajo porcentaje (14%) de primers capaces de amplificar *loci* de microsatélites en batata: de 63 diseñados sólo 9 resultaron exitosos, siendo mucho menor que el citado en otras especies poliploides, donde se observa un rango entre 32% y 41% para el trigo hexaploide (Roder *et al.* 1995, 1998), un 86% en papas

tetraploides (Provan *et al.* 1996) y lejos del casi 100% citado para especies diploides (Liu *et al.* 1995 y Morchen *et al.* 1996). A pesar de ser pocos los SSR que presentan tasas de segregación mendeliana (5 de 9), han sido utilizados en pruebas de paternidad (Buteler *et al.* 1997) (Buteler & LaBonte 2002), identificación de cultivares (Hwang *et al.*, 2002; Arizio *et al.* 2008, Jarret & Bowen 1994) y diversidad genética (Veasey *et al.* 2008; Borges *et al.* 2006; Zhang *et al.* 1999). En particular en *Ipomoea batatas* L. Lam nunca han sido utilizados en mapeo. La principal limitante de los SSR en batata, es su escaso número. Recientemente con el desarrollo de los EST-SSR su número se ha incrementado. Hasta el año 2004, se contaba con un reducido set de SSR para *Ipomoea batatas*, sin embargo ese año aparecen disponibles en la bibliografía (Hu *et al.* 2004) nuevos SSR utilizando dos estrategias diferentes: una aproximación clásica, a partir de una librería enriquecida y de una librería de insertos genómicos pequeños (small-insert genomic library) con la que obtuvieron 46 SSR, 27 de los cuales resultaron polimórficos. La segunda estrategia utilizada fue a través de la búsqueda de SSR a partir de dbEST de planta entera, raíz engrosada y hoja, la cual hasta ese momento contaba con 4153 ESTs. Encontraron 379 secuencias que contenían 394 SSRs. Las secuencias que contienen SSR comprenden el 9.1% del total de la secuencias publicadas. A partir de estas secuencias fueron diseñados 151 pares de primers de los cuales 120 presentaron un tamaño de bandas adecuadas (menor a 300bp). Setenta y cinco (62%) mostraron polimorfismo y fueron publicados. Hu *et al.* (2004b) desarrolló además marcadores microsatélites (SSR) a partir de EST de *Ipomoea trifida* disponibles en el Genbank, de los cuales 12 presentaron transferibilidad a diferentes cultivos de batata y especies silvestres de *Ipomoea*, aportando nuevos marcadores posibles de ser usados para mapeo.

2. Desarrollo de Mapas genético en plantas

El mapeo genético de una especie consiste en el desarrollo de un conjunto ordenado de información sobre la secuencia de ADN que cubre todo el genoma. Es un proceso que define puntos (marcadores genéticos, secuencias de ADN o genes) en una línea que representa un cromosoma en términos físicos o genéticos. El posicionamiento relativo de los marcadores está basado en la frecuencia de recombinación entre ellos. El resultado, es una representación gráfica que describe la organización de un conjunto de marcadores.

Uno de los usos más extenso e importante de los marcadores moleculares ha sido el desarrollo de mapas genéticos y físicos de genomas. La aplicación quizá más importante de éstos es identificar regiones cromosómicas que contienen genes y QTL asociados a características de interés, estos mapas pueden ser denominados como mapas genéticos. Los Mapas Genéticos de alta densidad son

poterosas herramientas para la localización y el clonado posicional. Es también la base de la selección asistida por marcadores (MAS), donde los marcadores asociados con los caracteres de interés pueden ser usados para la introgresión de genes específicos. El mapeo de QTL está basado en el principio de que genes y marcadores segregan durante la meiosis por los eventos de recombinación de los cromosomas, permitiendo su análisis en la progenie (Collard *et al.* 2005).

Los mapas de ligamiento ofrecen además información para entender la base genética de caracteres complejos y el tipo de poliploidía. El mapeo comparativo de genomas en plantas ha aportado valiosa información acerca de la organización y evolución del genoma de plantas superiores y sigue siendo una herramienta irremplazable que junto a las nuevas técnicas moleculares y al desarrollo de la bioinformática, se ha potenciado. Es el paso inicial para el posterior clonado de genes, el mapeo físico o directamente la secuenciación.

El concepto teórico de mapeo de genomas ha sido establecido a mediados del 1900 (Haldane 1919, Kosambi 1944, Allard 1956). Pero el desarrollo de mapas basados en marcadores de ADN, es más reciente y han sido construidos para numerosas especies de plantas cultivadas. Esto incluye no sólo los principales cultivos como los cereales (Paillard *et al.* 2003), leguminosas (Julier *et al.* 2003), gramíneas (Stein *et al.* 2007), y las oleaginosas o aquellas productoras de azúcar (Al-Janabi *et al.* 1993), sino también plantas frutales y forestales (Cuevas *et al.* 2008, Grattapaglia & Sederoff, 1994). En general, el desarrollo de un Mapa de Ligamiento implica la selección de una apropiada población de mapeo, la evaluación del polimorfismo de los marcadores en las líneas parentales y en la población segregante, el cálculo de la fracción de recombinación (Pairwise Recombination Fraction) entre los *loci* marcadores y la estimación de la distancia entre los mismos, el agrupamiento de los marcadores (o sea el establecimiento de los grupos de ligamiento) y finalmente la determinación del orden del mapa (Staub *et al.* 1996). Existen diferentes programas que permiten el análisis de datos y la construcción de un mapa de ligamiento, estos programas utilizan los datos obtenidos de la población segregante para estimar la frecuencia de recombinación y luego estos son usados para determinar el ordenamiento lineal de los marcadores genéticos minimizando los eventos de recombinación.

La distancia de mapa entre dos loci se define como el número promedio de eventos de recombinación entre ellos. La relación entre la distancia de mapa y el valor de recombinación está caracterizada por la función de mapeo genético utilizada. Es una fórmula que expresa la relación cuantitativa entre distancias en un mapa de ligamiento utilizando la frecuencia de cruzamiento, convirtiendo la fracción de recombinación en centiMorgan (cM). Cuando la distancia de mapa es pequeña (<10cM) la distancia de mapa es igual a la frecuencia de recombinación, pero a mayores

distancias ($>10\text{cM}$) no puede ser aplicada esta relación. Dependiendo del grado de interferencia asumido en el cruzamiento (Ausencia o interferencia positiva), la función de mapeo a usar será la desarrollada por Haldane (1919) o la de Kosambi (1944). La función más utilizada es la de Kosambi (1944) que asume que los eventos de recombinación ocurridos en una región influyen la ocurrencia de un evento de recombinación adyacente (Staub *et al.* 1996), representando matemáticamente de mejor manera lo que ocurre empíricamente.

Dos genes (o marcadores) se definen como ligados cuando se encuentran en el mismo cromosoma. Existen dos posibles arreglos para estos genes: que estén en fase de acoplamiento o en fase de repulsión. La fase de acoplamiento implica que los dos alelos recesivos se encuentren en un cromosoma y los dos dominantes en el otro (AB/ab), mientras que la configuración en repulsión es el arreglo alternativo (Ab/aB). Esta relación es particularmente importante cuando se trabaja con marcadores dominantes, ya que solo pueden ser reconocidos en fase de acoplamiento. Esto es así, porque la clase heterocigota no puede ser distinguida de la homocigota dominante, a diferencia de los marcadores codominantes. La fase de ligamiento resulta de importancia en los procesos de selección asistida por marcadores, cuando se trabaja con marcadores dominantes (Staub *et al.* 1996).

2.1 Mapeo en genomas poliploides

La poliploidización es un importante factor evolutivo en plantas con flores (Stebbins 1971; Soltis & Soltis 2000; Wu *et al.* 2001). Una definición sencilla de poliploides aportada por Ripol *et al.* (1999) los define como organismos con múltiples copias del set básico de cromosomas (denotado χ) o número monoploide. El nivel de ploidía, denotada como m , representa el número de cromosomas homólogos en cada célula somática. Una posible clasificación de los poliploides pueden ser en base a su origen: los aloploiploides derivan de la combinación de genomas distintos seguidos de una duplicación, mientras que los autopoliploides se originan de especies con duplicación cromosómica resultado de la fusión de gametas $2n$ (Stebbins 1950; Soltis & Soltis 2000). Se estima que entre el 30% y el 80% de las especies con flores han experimentado episodios de poliploidización (Stebbins 1971; Grant 1981; Masterson 1994) incluso algunas de ellas han pasado varias veces por ese proceso (múltiples orígenes) (Soltis & Soltis, 1995). Este porcentaje puede ser aún mayor si nos restringimos a las plantas cultivadas (Hilu 1993): papas, soja, trigo, alfalfa y batatas: todos ejemplos de especies poliploides de relevancia económica. Para algunas especies de poliploides, los mapas genéticos han sido construidos inicialmente utilizando las especies diploides relacionadas: como en

el caso de tomate (Bernatzky & Tanksley, 1986), maíz (Hoisington *et al.* 1988) papa (Bonierdale *et al.* 1988) y trigo (Kam-Morgan *et al.* 1989).

Si bien los poliploides se encuentran dentro de importantes cultivos, su mapeo genético se encuentra retrasado con respecto a las especies diploides debido a varios factores. En primer lugar podemos citar que el comportamiento de los cromosomas en muchos poliploides aún permanece sin conocerse, en particular la co-existencia de apareamientos bivalentes y multivalentes durante la meiosis dificulta definir el patrón de herencia y por lo tanto estimar con exactitud la segregación esperada. Además, en especies con alto nivel de ploidía el genoma es una mezcla de alopoliploides y autopoliploides (Wu *et al.* 1992) que pueden presentar patrones de segregación mixta (una combinación de asociación al azar y preferenciales de los cromosomas). Segundo, para el caso particular de los autopoliploides, la posibilidad de detectar ligamientos en fase de repulsión es baja, a menos que se cuente con poblaciones de gran tamaño, por lo tanto, el análisis se restringe en general a los marcadores en fase de acoplamiento (Wu *et al.* 1992; Hackett *et al.* 1998; Ripol *et al.* 1999) a diferencia de los diploides o poliploides disómicos, donde la fase de ligamiento en acoplamiento o repulsión pueden aparecer en la misma frecuencia (Da Silva & Sorrells, 1996).

En tercer lugar podemos nombrar el gran número de posibles genotipos, lo que hace que el patrón de bandas en la mayoría de los marcadores moleculares sea complejo (Grivet *et al.* 1996). Y finalmente es necesario identificar los cromosomas homólogos. Más allá de las dificultades nombradas, en una gran proporción de cultivos alopoliploides se han desarrollado mapas, pero presentan herencia disómica y pueden ser analizados como diploides. El tabaco, algodón, algunos pastos y el trigo son ejemplo de ello. En estos casos los cromosomas son denominados homeólogos y se comportan como diploides. Por otro lado, en los autopoliploides, donde todos los cromosomas provienen de la misma especie ancestral, debido al apareamiento de los cromosomas durante la meiosis que puede dar lugar a multivalentes podrían presentar herencia polisómica. A pesar de esto, suele observarse bajo número de multivalente en especies autopoliploides. Jackson (1982) propone que las especies con este tipo de ploidía podrían tener algún tipo de regulación que favorece el apareamiento bivalente.

Dadas las dificultades intrínsecas, el mapeo en poliploides complejos se realiza en un proceso de dos pasos (Wu *et al.* 1992; Hackett *et al.* 1998; Ripol *et al.* 1999; Qu & Hancock 2001): en una primera etapa se evalúa el orden de los loci en los cromosomas, pero de aquellos marcadores de dosis simples (DS) (también denominados Fragmentos Simples de Restricción (SDRF) o Fragmentos de Amplificación de Dosis Única (SDAF)) que se definen como fragmentos de ADN presentes en solo un cromosoma de uno de los parentales (ej: Aaaaaa x aaaaaa) y segregan en la progenie con una tasa

1:1 en una población F1 o BC1. Estos marcadores no están influenciados por el tipo de ploidía y se analizan con las herramientas disponibles para diploides. Posteriormente, hay que asignar los cromosomas a los grupos homólogos (Ripol *et al.* 1999). Los homólogos pueden ser identificados por mapeo con RFLP o SSR que reconocen múltiples fragmentos de dosis simple (Da Silva *et al.* 1993), utilizando fragmentos de dosis múltiples (Ripol *et al.* 1999) o como propone Al-Janabi *et al.* 1993 mediante la detección de los marcadores en fase de repulsión localizados en cromosomas homólogos. En el caso de poliploides y en particular de especies hexaploides, hay que recordar que los marcadores pueden estar presentes no solo en diferentes configuraciones (acoplamiento o repulsión) sino también en diferentes dosis o "dosage". Los marcadores pueden estar en dosis simple (DS) (Aaaaaa), dosis doble (DD) (AAaaaa), dosis triple (DT) (AAAaaa), etc. La estrategia de Ripol *et al.* (1999) que describe el uso de marcadores de dosis múltiples para identificar el set de cromosomas homólogos, asume que esos alelos corresponden al mismo locus y están solamente presentes en los cromosomas homólogos y por lo tanto no hay duplicación de esa región homóloga en un cromosomas no-homólogo, esta estrategia permite que cada marcador de dosis múltiple puede alinear no mas grupos de ligamiento que su dosis, por ejemplo: los marcadores de dosis doble pueden alinear no más que dos grupos de ligamiento, los de triple dosis no más de tres grupos de ligamiento y así sucesivamente. Este tipo de estrategia de mapeo ha sido ampliamente utilizada (Sobral & Honeycutt 1993; Stein *et al.* 2007, Da Silva & Sorrels 1996, Kriegner *et al.* 2003, Cervantes-Flores *et al.* 2007, Ukoskit & Thompson *et al.* 1997, Grattapaglia & Sederoff, 1994), y supone un apareamiento al azar de los cromosomas, formación de bivalentes y la ausencia de doble reducción, supuestos que no siempre se cumplen.

La mayoría de las publicaciones sobre mapas de ligamientos en poliploides están basada únicamente en el mapeo de los marcadores de dosis simple, ya que los programas de mapeo solo permiten trabajar con este tipo de dosis. Aunque más recientemente han sido publicados mapas que localizan loci con dosis altas también y en fase de repulsión, debido al desarrollo de más herramientas estadísticas y programas, así como avances en aspectos teóricos. Lo óptimo es utilizar padres altamente heterocigotas para obtener la mayor cantidad de fragmentos o alelos de dosis simple. Una población haploide derivada de una planta altamente heterocigota sería la más eficiente población en cuanto a cantidad de SDRF (Wu *et al.* 1992). Con respecto al sistema de marcador molecular a utilizar, para mapeo en poliploide debe ser aquel que maximice por lo menos dos parámetros: a) el porcentaje de fragmentos de dosis simples detectados por ensayo y b) la posibilidad de reconocer los alelos del marcador (Albertini *et al.* 2003).

Recientemente, varios trabajos presentan mapas de ligamiento contruidos por combinación de marcadores multialélicos y co-dominantes, como SSR o SNPs, diferentes tipos de marcadores codominantes (Aitken *et al.* 2005; Arcade *et al.* 2000; Carlier *et al.* 2004; Khlestkina *et al.* 2002; Korzun *et al.* 2001; Lacape *et al.* 2003) y marcadores dominantes y co-dominantes como RFLP, AFLP, SSR, CAPS (Lee *et al.* 2008).

Una particularidad en el desarrollo de mapas, surge cuando se trabaja con especies de polinización cruzada y autoincompatible (Ver capítulo 1) en estos casos la obtención de datos para el desarrollo de mapas se basan en la estrategia denominada “pseudo-test cross”, definida en un trabajo de Grattapaglia & Sederoff (1994). Esta estrategia implica el cruzamiento entre dos padres heterocigotas y la obtención de un mapa de ligamiento de cada parental. La denominación “pseudo testcross” se refiere a que en este tipo de cruzamiento se desconoce *a priori* la configuración de los marcadores para un locus de interés. La configuración es inferida *a posteriori* después de analizar la segregación de los marcadores en la progenie. Cuando esta inferencia es hecha para los dos padres que están involucrados en el cruzamiento, el término más correcto es “two way pseudo testcross” (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Estos cruzamientos son equivalentes a realizar test cross, donde un padre puede ser considerado como el tester del otro y viceversa. Si bien cada mapa de ligamiento es único y es producto de una población de mapeo (derivado de dos padres específicos) y del tipo de marcador usado, la posibilidad de obtener mapas “consenso” o “integrados” o también denominados “emergentes” surge como necesario cuando se trabaja con la estrategia “pseudo test cross”. La posibilidad de integrar el mapa materno y el paterno en uno solo de la especie, mejora la calidad del mapa. Para poder correlacionar la información de un mapa con otro, se requieren marcadores en común. Los marcadores en común, en general son altamente polimórficos y son denominados marcadores “ancladores” (anchor), biparentales o puentes alélicos. Son alelos presentes en ambos parentales y si bien se presentan en diversas configuraciones o dosis, solo las de simple dosis (AaaaaaxAaaaa) son utilizadas para mapeo por presentar el menor desvío estándar. También pueden actuar como ancladores marcadores como los SSRs o RFLPs, o sea marcadores codominantes (Ablett *et al.*, 2003; Varshney *et al.* 2007; Gardiner *et al.*, 1993, Grattapaglia & Sederoff, 1994). Si marcadores “puentes” han sido incorporados dentro de diferentes mapas, ellos pueden ser utilizados para producir mapas “consenso” (Ablett *et al.* 2003; Karakousis *et al.* 2003). Estos mapas consenso pueden resultar sumamente útiles para la construcción de nuevos mapas, mejorando el nivel de saturación o por ejemplo indicando que marcadores están localizados en una región específica que contiene un QTL, y ser utilizados para identificar marcadores más fuertemente ligados (Collard *et al.* 2005).

2.2 Genética y mapeo en *Ipomoea batatas*

El conocimiento de la constitución genómica, la segregación y el tipo de apareamiento entre cromosomas se tornan relevantes para el desarrollo de mapas de ligamiento y las estrategias de mejoramiento. Las definiciones acerca de la constitución genómica en batata fueron variando a lo largo del tiempo, proponiéndose como un autopoliploide estricto hasta alopoliploide. *Ipomoea batatas* fue definida como un hexaploide con $2n=6x=90$ cromosomas (Ting & Kehr, 1953; Jones 1965, Magoon *et al.* 1970). Austin (1988) propone como el ancestro más probable a *Ipomoea trifida*. Datos surgidos de trabajos citológicos (Srisuwan *et al.* 2006) y con marcadores moleculares (ISSR, RFLP y RAPD) también apoyan esta hipótesis (Jarret & Austin 1994; Huang & Sun. 2000; Huang *et al.* 2002; Hu *et al.* 2003).

El gran número de cromosomas y su pequeño tamaño, explican los pocos trabajos en citología realizados en batata. Uno de los primeros fue el de Ting & Kehr (1953) que basándose en la observación de bivalentes como única configuración, proponen a *Ipomoea batatas* como una especie alopoliploide. Sin embargo Magoon (1970) también mediante un análisis citológico, observa la existencia de algunos multivalentes (principalmente tetraivalentes, aunque algunos hexavales también), y describe a *Ipomoea batatas* con dos genomas con un alto grado de homología y un tercero más distante. Esta observación es confirmada más tarde por Shiotani & Kawase (1989) que proponen la fórmula genómica B1B1B2B2B2B2, donde el genoma B1 presenta un alto grado de homología con los genomas B2. En este sentido, el análisis de herencia de caracteres como la actividad de β -amilasa y la resistencia a los virus sweetpotato Feathery Mottle Virus (SPFMV) y al Sweetpotato Chlorotic Stunt Virus (SPCSV) muestran segregación hexasómica y tetradisómica (Kumagai *et al.* 1990; Mwangi *et al.* 2002), segregación esperada según la hipótesis de Shiotani & Kawase (1989).

Los trabajos más recientes utilizando marcadores moleculares, apoyan la idea de autoploidía con algunos apareamientos preferenciales entre cromosomas (Ukoskit & Thompson 1997; Kriegner *et al.* 2003; Cervantes-Flores *et al.* 2007; Chang *et al.* 2009).

Teniendo en cuenta que el mapeo de autoploidios, implica primero ordenar los *loci* a lo largo de los grupos de ligamiento y segundo, asignar los grupos homólogos, en el caso particular de *Ipomoea batatas*, un mapa saturado debe tener 90 grupos de ligamiento organizados en 15 grupos homólogos de 6 cromosomas cada uno.

Hasta el momento, han sido desarrollados cuatro mapas de ligamiento en *Ipomoea batatas*. El primero por Ukoskit & Thompson (1997) basado en RAPDs, donde solo fueron utilizadas las bandas

de dosis simples y obtuvieron 5 grupos de ligamiento (GL) con 2 marcadores cada uno. Los otros dos mapas, fueron desarrollados a partir de marcadores dominantes AFLP (Kriegner *et al.* 2003 y Cervantes-Flores *et al.* 2007). Kriegner *et al.* 2003 utilizó los marcadores de dosis simple y dosis doble simple, mientras que Cervantes-Flores *et al.* 2007 utilizó los doble y triples aunque no los de dosis doble simple. Ambos identificaron algunos cromosomas homólogos y llegaron a obtener entre 80 y 90 GL en cada parental. El trabajo de Cervantes-Flores (2007), presenta los mapas (materno y paterno) más saturados hasta el momento, con 726 y 947 marcadores de dosis simples. El trabajo de Mwangi (2001) utiliza el mismo cruzamiento que Kriegner *et al.* (2003) y desarrolla el mapa para un solo parental por no tener suficiente cantidad de alelos del otro parental.

2.3 Mapeo comparativo y genes candidatos

El mapeo comparativo es una de las estrategias más importante que pueden ser utilizadas cuando se cuenta con mapas genéticos. El mapeo comparativo permite la comparación de mapas de ligamiento entre diferentes especies cuya conservación de la estructura genómica se base en la evolución y ancestros en común. Si un grupo de marcadores moleculares mantiene el orden y sus relaciones de ligamiento entre dos especies se dice que son colineales o que muestran relaciones de sintenia. Un ejemplo lo aportan los estudios con RFLP, que permitieron identificar sitios comunes en distintas especies que servían como puntos de referencia para la comparación de sus genomas. Es así que los mapas comparativos dieron las primeras evidencias de que el ligamiento de grupos de genes podría haberse conservado a través de largos períodos evolutivos. Estudios en diversos grupos taxonómicos han revelado una estrecha relación entre los genomas de las especies comprendidas dentro de cada grupo. Esto se ha observado, por ejemplo, entre especies pertenecientes a las Solanáceas (tomate, papa, pimiento) (Tanksley *et al.* 1992) (Bonierbale *et al.* 1988), entre *Arabidopsis* y cultivos del género *Brassica* (Lim *et al.* 2007) o arroz y maíz (Ahn & Tanksley, 1993) y dentro de las gramíneas entre especies pertenecientes a las Triticeas (trigo, cebada, centeno) así como entre especies pertenecientes a distintas subfamilias taxonómicas, tal el caso de arroz, maíz y sorgo. Es importante señalar que los tamaños de los genomas de las especies comparadas, en general, son significativamente diferentes. Sin embargo, a pesar de esa gran variación en el tamaño del genoma, el orden lineal de los genes se encuentra altamente conservado.

La utilidad de los mapas comparativos puede apreciarse desde distintos puntos de vista. Por un lado, aportan información muy valiosa para conocer los cambios producidos en la estructura

cromosómica (inversiones, translocaciones, duplicaciones, deleciones) durante el proceso evolutivo que lleva a la diferenciación de especies a partir de un antecesor común, así como también permiten evaluar niveles de ploidía o los cambios que ocurren durante el establecimiento de un nuevo poliploide. Por ejemplo, a partir de la comparación de mapas moleculares, ciertas especies consideradas inicialmente diploides han modificado su status. Sobre la base de estudios citogenéticos, el maíz posee un comportamiento meiótico que corresponde al de una especie diploide típica. Sin embargo, numerosos *loci* RFLP de arroz están representadas dos veces en el genoma de maíz por lo que actualmente se considera que el maíz descende de un poliploide ancestral (Ahn & Tanksley, 1993). Por otro lado, los mapas comparativos posibilitan la transferencia de información entre especies con genomas simples y bien caracterizados, tales como *Arabidopsis* y arroz, a especies con genomas más complejos tales como trigo, cebada y avena. Este ha sido tal vez el objetivo principal para impulsar el desarrollo de estos mapas. Las notables similitudes observadas entre genomas fue la base sobre la que se postuló el uso de especies modelos, como arroz o *Arabidopsis*, a partir de las cuales estudiar y avanzar en el conocimiento de genomas más complejos. Asimismo, partiendo del supuesto de que los genes que gobiernan aspectos fundamentales de la biología vegetal muy probablemente están conservados entre distintas especies (no sólo en cuanto a su localización relativa, sino también en cuanto a su secuencia), y el hecho de que la variación en el tamaño de los genomas de especies relacionadas se debe fundamentalmente a variación en la cantidad de ADN no codificante y no a una variación en el número de genes, la idea de llegar a la identificación, clonado y estudio de genes en las especies modelo se vio fortalecida. De este modo la información generada podría hacerse extensiva a una amplia gama de especies, incluyendo las cultivadas, facilitando así su estudio. Un importante desprendimiento de esta herramienta es la estrategia de Genes Candidatos.

La estrategia de Genes Candidatos (GC) ha sido aplicado a la genética de plantas para la caracterización y clonado de *loci* de características cuantitativas (QTL) y mendelianas. Es una estrategia complementaria al clonado basado en mapas y la mutagénesis por inserción. El análisis de GC está basado en la hipótesis de que genes de función conocida (los genes candidatos) pueden corresponder a *loci* que controlan características de interés. Los GC se refieren a genes que se presume que afectan un carácter dado (GC funcionales) o genes que por su proximidad a un *loci* en un mapa de ligamiento controla un determinado carácter (GC posicional).

Varios trabajos utilizan la estrategia de genes candidatos junto a mapeo, y han podido detectar la co-segregación entre GC y *loci* de interés, a través del análisis de poblaciones de mapeo. Muchos de ellos se han centrado en los genes relacionados con resistencia a patógenos (Mwanga 2001). En

Brassica co-localizaron en dos mapas los genes FAE1 y FAD3 con los loci L1 y E1 relacionados con la producción de aceite y ácidos grasos. Para las características que nos interesan en particular en este trabajo, Lefebvre (1998) y Lang (2004) detectaron que el polimorfismo presente en el gen CCS (capsanthin-capsorubin synthase) que corresponde al último paso de la ruta de biosíntesis de carotenos, se encontraba completamente ligado al color de la fruta en una población F2. En el mismo sentido, Deng & Davis (2001) en un trabajo con frutilla (*Fragaria vesca*) localizaron en un mapa varios genes de la ruta de antocianinas. Uno de ellos (F3H) fue asociado al *locus c* que controla el color de la fruta: amarillo y rojo. En este caso, fue posible llegar hasta la validación del GC, realizando experimentos de complementación con el alelo wild-type. Trabajar directamente con marcadores de genes aumenta la posibilidad de detectar asociaciones. De cualquier manera, es importante comenzar con la localización en un mapa de dichos genes dando el punta pie inicial para los estudios de asociación.

2.4 Mapeo de QTL

Numerosos caracteres de importancia agronómica como la calidad, rendimiento, así como la resistencia a enfermedades o el contenido de pigmentos están controlados por más de un gen, y exhiben variación de manera continua. La región dentro de un genoma que contiene genes asociados a un carácter cuantitativo particular se conoce como loci de carácter cuantitativo o QTL. Uno de los usos más importantes de los mapas de ligamientos, es identificar estas regiones cromosómicas que contienen genes o QTLs. Esta identificación se denomina mapeo de QTL y se basa en el principio de que genes y marcadores co-segregan vía recombinación (crossing-over) durante la meiosis, permitiendo su análisis en la progenie (Paterson, 1996). Genes o marcadores que están muy cercanos o fuertemente ligados pueden ser transmitidos juntos a la progenie con mayor frecuencia que si dichos genes se localizaran alejados. De manera sencilla, podemos decir que el análisis de QTL permite buscar una asociación significativa entre la segregación del marcador y la presencia de un fenotipo particular. Los marcadores son utilizados para separar la población de mapeo en diferentes grupos genotípicos basados en la presencia o ausencia de un locus particular y determinar si existen diferencias significativas entre los grupos con respecto al carácter medido (Tanksley, 1993). Una diferencia significativa entre el promedio fenotípico de los grupos, indica que el marcador utilizado para separar la población está ligado al QTL que controla el carácter.

La variación genética en la naturaleza generalmente toma la forma de un rango fenotípico continuo más que de clases discretas. La variación genética subyacente en los caracteres cuantitativos resulta en la segregación de numerosos loci de caracteres cuantitativos interactuando, cuya expresión

además es modificada por el ambiente. En especies poliploides, aún las características o rasgos determinados por un único gen aparecen como variantes cuantitativas por el gran número de alelos que pueden estar segregando para cada carácter. Las distintas combinaciones de los factores genéticos y ambientales resulta en diferentes fenotipos (Langridge *et al.* 2001).

La identificación de marcadores ligados a los *loci* que controlan caracteres cuantitativos o QTLs es sustancialmente más compleja que la de caracteres simples. El hecho de que muchos caracteres cuantitativos estén fuertemente condicionados por el ambiente hace necesario que las evaluaciones deban ser replicadas en múltiples ambientes y durante varios años para poder tener una medida real de la heredabilidad del carácter y eliminar el componente ambiental asociado al mismo.

Actualmente existen cuatro métodos para la detección de QTL: análisis de marca simple, mapeo por intervalo simple, mapeo por intervalo compuesto (Collard *et al.* 2005) y finalmente mapeo por intervalo múltiple (Kao *et al.* 1999).

El Análisis por marca simple (SMA) es el método de detección más fácil de implementar dado que no requiere el desarrollo previo de un mapa de ligamiento. Utiliza el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la regresión lineal. Detecta exclusivamente asociaciones marcador-carácter a través de un desvío de la media fenotípica de los genotipos del marcador que son atribuidos al efecto aditivo de una región cromosómica o QTL ligado a dicho marcador. Brindan sólo una estimación de los efectos asociados a los QTLs como también así una estimación de la distancia a la que se encuentran respecto del marcador que fue asociado al carácter. La principal desventaja que tiene este método es que mientras más lejos esté el QTL del marcador menor será la probabilidad de poder detectarlo. Esto se debe a la posibilidad de que ocurra recombinación entre el QTL y el marcador considerado, lo que lleva a una subestimación de la magnitud del efecto de dicho QTL. Una forma de minimizar este problema es cubrir todo el genoma con un gran número de marcadores situados a intervalos menores a los 15 cM (Tanksley 1993). El análisis por marca simple se utiliza en general como una primera aproximación para la identificación de las posibles regiones portadoras de QTLs.

El Mapeo por intervalo simple (SIM) utiliza el mapa de ligamiento para analizar la presencia de un QTL dentro de un intervalo definido por un par de marcadores ligados sobre un mismo cromosoma. Al analizar simultáneamente la posible asociación de los dos marcadores con el QTL, los efectos de un evento de recombinación son minimizados debido a que la probabilidad de perder por recombinación la asociación marcador-QTL es mucho menor cuando son considerados dos marcadores en lugar de uno. Permite posicionar de forma más exacta el QTL sobre el cromosoma y estimar con mayor precisión sus efectos. Se considera un método estadístico más robusto y apropiado para el mapeo de QTLs que el SMA. Debido a que el método considera a los intervalos

como entidades aisladas del resto del genoma puede estar sujeto a cierto nivel de detección de falsos positivos o “QTLs fantasmas” en las regiones adyacentes a las que poseen los QTLs. El programa MapMaker QTL, es usado comúnmente para este tipo de análisis.

Los dos últimos métodos, Mapeo por intervalo compuesto (CIM) y Mapeo por intervalo múltiple (MIM) permiten un análisis con mayor precisión. La principal ventaja de CIM además de su mayor poder de resolución es que permite la utilización de datos procedentes de varios ambientes y con ello, analizar las interacciones QTLs x ambiente y estimar la magnitud de sus efectos. Por otro lado, MIM es la metodología más reciente que ha sido propuesta para abordar el análisis de QTLs (Kao *et al.* 1999). Se fundamenta también en el mapeo por intervalo pero incorpora al modelo los posibles efectos epistáticos entre los QTLs.

El mejoramiento en batata, debido a las características del cultivo como ser la poliploidía, alta heterocigosidad y comportamiento sexual resulta en un gran desafío para los mejorados utilizar las clásicas técnicas de mejoramiento. El uso de las técnicas moleculares y el desarrollo de mapas genéticos pueden proveer una importante cantidad de información acerca de la genética, modos de herencia y servir de guía para acelerar la introgresión de importantes características económicas en las líneas de mejoramiento.

5. Problemática abordada

- Los mapas desarrollados hasta el momento en *Ipomoea batatas* definen la posición de pocos rasgos de interés agronómicos.
- Se desconoce el modo de herencia y la localización cromosómica de los genes estructurales que sintetizan carotenoides y antocianinas en batatas.
- Los microsatélites desarrollados no han sido ubicados en los mapas existentes, disminuyendo su uso potencial como marcador co-dominante.
- No se conoce la segregación de los SSR desarrollados.
- No existen marcadores moleculares específicos de genes relacionados con la síntesis de carotenos y antocianinas en la especie.

6. Hipótesis

El desarrollo de un mapa de ligamiento con SSR, AFLP y genes candidatos permitirá avanzar en el conocimiento del genoma de *Ipomoea batata*, localizar marcadores funcionales y potenciar el uso de herramientas moleculares para los programas de mejoramiento.

7. Objetivo general

Obtener un mapa de ligamiento parcial mediante SSR y AFLP, con localización de genes relacionados con la síntesis de carotenos y antocianinas. Identificar regiones genómicas que modifican el contenido de carotenos y las variables de color objetivo en batata.

8. Objetivos específicos

- Detectar marcadores polimórficos.
- Analizar las dosis alélicas de los loci amplificados.
- Localizar los marcadores SSR, AFLP y genes candidatos en un mapa de ligamiento.
- Potenciar el uso de los SSR disponibles para batata.
- Aportar conocimiento sobre la segregación de los microsátelites, AFLPs y genes candidatos que permita comprender la organización el genoma de *Ipomoea batatas* L. Lam.
- Identificar regiones cromosómicas asociadas a la presencia y concentración de pigmentos.

Materiales y Métodos

1. Material Vegetal

La población de mapeo consistió en una F1 segregante de 113 genotipos obtenidos a partir de los padres heterocigotas de coloración contrastante de piel y pulpa de la raíz engrosada (Capítulo 2).

2. Evaluación Molecular

2.1 Extracción de DNA y Cuantificación

Hojas jóvenes de cada parental y de la progenie fue recolectada en bolsas con la correspondiente identificación y puestas en hielo. Las muestras fueron liofilizadas y molidas en microtubos de 2 ml y conservadas en desecadores con sílica gel hasta la extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó mediante el método de CTAB (Murray & Thompson 1980). La cuantificación y verificación de la integridad del ADN se realizó mediante geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio.

2.2 Evaluación y Amplificación de Marcadores SSR y GC

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron loci de microsatélites y los marcadores de GC utilizando un termociclador BioRad en ambos padres y 6 progenies a fin de detectar los loci polimórficos entre parentales y los monomórficos pero segregantes en las progenie. Los marcadores que produjeron bandas polimórficas de buena calidad en el sub-grupo de hijos, fueron seleccionadas para la evaluación del total de la población de mapeo. Los SSR fueron analizados para realizar siembras multiplex que permitieron optimizar tiempo y reactivos. La lista de los SSR evaluados se puede ver en el Anexo (Tabla 1), para los GC referirse al Capítulo 3.

2.3 Evaluación y Amplificación de Marcadores AFLP

Para la evaluación con AFLP se utilizó el protocolo descrito por Vos *et al.* 1995 con las modificaciones citadas en Kahn *et al.* 2000.

Digestión-Ligación

La reacción de llevó a cabo en un volumen final de 30 ul, conteniendo 10 ul de templado (100ug de ADN genómico) y 20 ul de una solución denominada mix de *Buffer* RL (restricción-ligación) 1X (10mM Tris-HAc pH 7.5, 10mM MgOAc, 50mM K2OAc, 5mM DTT, 50ng/ul BSA), 25pmol del adaptor

MseI (MA) y 2.5pmol del adaptador EcoRI (EA), 0.2mM de ATPasa, 0.5 U T4 DNA ligasa (Life technologies-Gibco) 0.2 mM de ATP, 5 U de las enzimas *MseI* y *EcoRI*. Las muestras se incubaron a 37°C durante 5 horas.

Adaptador para los sitios *MseI*

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

5'-TACTCAGGACTCAT-3'

Adaptador para los sitios *EcoRI*

5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

5'-AATTGGTACGCAGTC-3'

Reacciones de preamplificación selectiva

Las reacciones de preamplificación se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 25 ul que contenía 5ul de la reacción restricción-ligación como templado y 20ul de una mix conteniendo *Buffer* LD 1X con MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM dNTPs, 1 U de AmpliTaq LD Polimerasa y 0.075 ug de iniciadores (primers) con un nucleótido selectivo.

E01 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

M01 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

El programa de pre-amplificación usado fue: 30 ciclos con 94°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 60seg. La reacción se llevo a cabo en un ciclador térmico BioRad.

Reacciones de Amplificación final

Las reacciones de amplificación final con 3 nucleótidos selectivos se llevaron a cabo en un volumen final de 20 ul, *Buffer* Taq polimerasa 1X, MgCl₂ 1.5mM, 0.2 mM dNTPs, 0.03 ug de cada primer con tres nucleótidos selectivos (*MseI* +3 y *EcoRI* +3), 1.2 U Taq DNA polimerasa y como templado, 1.2 ul de producto de preamplificación.

Se evaluó el polimorfismo de 20 combinaciones de AFLP teniendo en cuenta las usadas anteriormente en otros trabajos de mapeo en batata (Kriegner *et al.* 2003).

Se utilizaron 5 combinaciones de primers:

EcoRI – *MseI*: E38_M38, E44_M32, E45_M38, E38_M45, M33_M38

La reacción de amplificación se llevó a cabo partiendo de un calentamiento previo de las muestras a 94°C por 3 minutos seguido de 10 ciclos con las siguientes condiciones: 94°C (30segundos) *desnaturalización*, 65°C (30segundos) *hibridación* de los primers (esta etapa fue disminuyendo un grado por ciclo hasta los 56°C) y 72°C (60segundos) de extensión. Esta etapa continuó a 56°C como temperatura de hibridación durante 25 ciclos y se finalizó con una extensión final a 72°C (7 minutos)

Sebaración y visualización

A la reacción de amplificación final, se añadieron 5 µl de buffer de siembra (98% v/v de formamida, 10 mM EDTA pH 8, 0.05% p/v de azul bromofenol y 0.05% v/v xilencianol) para su desnaturalización a 95°C por 4 minutos en un termociclador BioRad. Para su análisis se sembraron entre 4 y 7 µl en geles de poliacrilamida al 6% (acrilamida: bisacrilamida; 19:1, 42% urea p/v y TBE 0,5 X -45 mM Trisborato, 1 mM EDTA). La electroforesis fue llevada a cabo a 50 watt constante por 3 horas, utilizando un buffer TBE 0.5X en el ánodo y buffer NaAcO 1M en el cátodo a fin de mejorar la resolución de los fragmentos amplificados.

Al finalizar la corrida, el gel se colocó en una solución fijadora (ácido acético glacial al 10%) durante 20 minutos. Luego se realizaron 3 lavados de 2 minutos con agua destilada. Se tiñó con una solución con nitrato de plata (AgNO₃ 0.1% p/v, 1.5 ml/l de formaldehído al 37%) durante 30 minutos, en oscuridad y agitación constante. Posteriormente, se realizó un breve lavado y se procedió al revelado con una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃ 3 % p/v, 1,5 ml/l de formaldehído 37 % y 400 ul/l de tiosulfato de sodio (10mg/ml)) y se fijó en una solución de ácido acético glacial al 10% por 2 minutos, finalmente se realizaron dos lavados en agua corriente de 2 minutos. Se secaron a temperatura ambiente.

2.4 Evaluación de los marcadores

La evaluación de los resultados se llevó a cabo manualmente, colocando los geles sobre un transiluminador de luz blanca. El tamaño de los fragmentos fue calculado por comparación con un marcador de peso molecular de 10bp (Invitrogene). El cálculo del tamaño molecular de las bandas se realizó mediante comparación de la migración relativa con los marcadores de peso por medio del método de los recíprocos (Elder & Southern 1987), empleando un programa de computación *ad hoc* creado en el laboratorio por el Dr. Jorge Dubcovsky.

Los geles fueron analizados para ausencia (0) o presencia (1) de bandas de manera manual. Para los SSR y genes candidatos cada banda amplificada polimórfica fue identificada por el código correspondiente al marcador y una letra relacionado con su peso molecular (Ej.: SSR318a). Cada fragmento de AFLP fue identificado por el código correspondiente a la base selectiva y una letra relacionado con su peso molecular (Ej.: E32M38c).

Las bandas polimórficas fueron elegidas en base a la presencia en un parental y ausencia en el otro o presencia en ambos padres pero segregantes en la población.

3. Segregación de marcadores

Debido a que la población de mapeo fue generada a partir del cruzamiento de dos parentales heterocigotas, los alelos derivados de cada parental fueron analizados de manera separada. Se generaron dos archivos de datos correspondientes a cada parental y un tercer archivo correspondiente a los marcadores presentes en ambos padres pero segregantes (puntos dialélicos). La dosis de cada marcador fue determinado analizando la tasa de segregación observada (presencia vs ausencia) de los marcadores en la progenie, de acuerdo al dosage esperado según tres de las cuatro hipótesis citológicas propuestas por Jones (1967) para batata (Tabla 2), dado que la alopoliploidía estricta fue descartada por las últimas investigaciones. Todos los marcadores fueron analizados mediante una Prueba de Bondad de Ajuste a una segregación esperada utilizando un test χ^2 ($\alpha=0.05$) con 1 grado de libertad.

Tabla 2: Tasa de segregación esperada (presencia: ausencia) para la herencia de un marcador dominante en *Ipomoea batata* para las cuatro hipótesis citológicas propuestas por Jones (1967).

Dosage	Hipótesis I		Hipótesis II y III		Hipótesis IV	
	Autohexaploide (hexasómica)		Tetraploide (tetradisómica, tetrasómica y disómica)		Alohexaploide (disómica)	
Simple	Aaaaaa	1:1	Aaaa aa aaaa Aa	1:1 1:1	Aa aa aa	1:1
Doble	AAaaaa	4:1	AAaa aa Aaaa Aa aaaa AA	5:1 ^a 3:1 ^b 1:0 ^c	Aa Aa aa AA aa aa	3:1 1:0
Triple	AAAaaa	19:1	AAAa aa AAaa Aa Aaaa AA	1:0 11:1 1:0	Aa Aa Aa AA Aa aa	7:1 1:0
Cuadruple	AAAAaa	1:0	AAAA aa	1:0	AA Aa Aa	1:0

- ^a Herencia tetrasómica
- ^b Herencia tetradisómica
- ^c Herencia Disómica

Fuente: Cenantes-Flores 2007

Los marcadores fueron clasificados dentro de cuatro grupos de acuerdo a su tasa de segregación. Se utilizó la denominación a) DS para fragmentos de amplificación de dosis simple (marcadores que están presentes en un única copia en un solo parental y ausente en el otro y que segrega con una tasa 1:1 en la progenie); b) DD para fragmentos de amplificación de dosis doble (presentes en un padre en dos copias y que segrega de una manera hexasómica (4:1), tetrasómica (5:1) y tetradisómica (3:1)); DT: Fragmentos de amplificación de dosis triples (presentes en un parental en tres copias y que segrega de una manera hexasómica (19:1) o tetradisómica (11:1) y d) DSD, Fragmentos de Amplificación de dosis doble-simple o biparentales (marcadores presentes en ambos padres en copia única y que segregan 3:1 en la progenie). Podemos también observar marcadores biparentales de dosis múltiple (DSM). Los marcadores de dosis mayores (cuatro o más) no se espera que resulten en segregación observable en la población, excepto en el caso de segregación de cromátidas al azar, que puede resultar en un genotipo que no muestra el marcador. También se determinaron aquellos marcadores que no se ajustaban a ninguna segregación esperada y fueron denominados como “distorsionados”.

4. Análisis de Ligamiento

El mapa de ligamiento fue basado en la utilización de marcadores de dosis simples no distorsionados derivados de una población de mapeo pseudo test-cross. Se construyeron dos mapas de ligamiento correspondientes a cada parental. Las unidades de mapa en centimorgan (cM) fueron derivadas de la función de mapeo de Kosambi (1944). Los análisis de ligamiento se llevaron adelante con MAPMAKER/EXP 3.0 (Lander *et al.* 1987) y JoinMap 1.4 (Stam 1993) a un LOD 6.0 – 2.0 y una frecuencia de recombinación theta: 0.39. Marcadores no ligados anteriormente fueron adicionados a los grupos mediante el comando “assign”. El comando “order” fue utilizado para establecer el orden de Máxima Verosimilitud de los marcadores en cada grupo de co-segregación. Los grupos de ligamiento fueron denominados como GL con un número y un subíndice indicando el parental, (ej: GL8₃₀).

El procedimiento para la construcción de los mapas fue realizado en dos etapas, primero se establecieron los grupos de ligamiento de marcadores ligados en fase de acoplamiento y luego estos grupos de co-segregación fueron asignados a grupos de homólogos. El par de alelos ligados en repulsión provenientes de diferentes grupos de co-segregación, fueron considerados como cromosomas homólogos (Al-Janabi *et al.* 1993). La tasa de segregación esperada y la ecuación para DS ligados en acoplamiento es equivalente a la utilizada para los diploides. Lo mismo ocurre para los

ligados en fase de repulsión para las especies que presentan apareamiento preferencial como los aloploidos. Para el caso de especies autoploidos, la definición de la tasa esperada de segregación es más complicada: el nivel de ploidía, el comportamiento de los cromosomas durante el apareamiento en la meiosis y la tasa de doble reducción son factores que aportan a esta complejidad (Barcaccia *et al.* 2003). La fracción de recombinación y las frecuencias fenotípicas esperadas para marcadores de dosis simple fueron tomadas de Wu *et al.* 1992.

Los diferentes alelos del mismo locus amplificados con marcadores co-dominantes (SSR y GC), que sean detectados en diferentes grupos de ligamiento, fueron considerados cromosomas homólogos. (Aitken *et al.* 2007) (da Silva *et al.* 1995).

Posteriormente el ligamiento entre los marcadores de dosis simple (1:1) y dobles-simples (3:1) fue analizado mediante el programa JoinMap 1.4 (Stam 1993) a un LOD 3. El JoinMap presenta dos características distintivas para la estrategia de mapeo utilizada: 1) permite trabajar con marcadores que presentan distintos tipos de segregación en la misma población y 2) posibilita la construcción de mapas genéticos integrados a partir de datos obtenidos de diferentes poblaciones e inclusive incorporando referencias bibliográficas. Un archivo correspondiente a cada parental fue creado con los datos de los marcadores de dosis simples y dobles simples. Posteriormente, los dobles-simples fueron utilizados para la determinación de los grupos homeólogos entre ambos parentales.

Finalmente se analizó la existencia de ligamiento teniendo en cuenta los loci de segregación múltiple (doble). La fracción de recombinación fue estimada para las diferentes situaciones asumiendo apareamiento al azar de los cromosomas homólogos y ausencia de doble reducción, según la Tabla 3.

Cada progenie puede ser clasificada dentro de cuatro clases fenotípicas, determinadas según la presencia o ausencia de cada fragmento. Las cuatro clases fueron denominadas como AB, A0, 0B y 00. El número de progenies en cada clase fenotípica sigue una distribución multinomial donde las probabilidades fenotípicas dependen de la configuración del fragmento y de la fracción de recombinación. Para cada configuración las cuatro clases se indican como:

$$p(r) = (p_{AB}(r), p_A(r), p_B(r), p_0(r))$$

Para cada configuración las probabilidades fenotípicas se utilizan para definir la verosimilitud:

$$L(p(r)|x) \propto (p_{AB}(r))^{x_{AB}} (p_A(r))^{x_A} (p_B(r))^{x_B} (p_0(r))^{x_0}$$

Donde X_{AB} , X_A , X_B y X_0 son los números observados de cada clase fenotípica. Ripol *et al.* 1999 da las frecuencias fenotípicas esperadas para diferentes configuraciones (simples/dobles, dobles/dobles, doble/triple, simple/triple) tanto en acoplamiento como en repulsión de manera general y Kriegner *et al.* 2001 presenta las fórmulas aplicadas a hexaploides. Por otro lado Meyer *et al.* 1998, presenta la fórmula para el cálculo de la fracción de recombinación entre un marcador simple y uno doble-simple. El estimador de la máxima verosimilitud (EMS) se calcula resolviendo la ecuación de verosimilitud: para esto se realiza la primera derivada del logaritmo natural de la verosimilitud igualada a cero para cada configuración. Las ecuaciones resultan en diferentes polinomios de grado 2, 3 y 5 con raíces simples en un intervalo (0, ½) y puede ser resuelta aplicando el algoritmo de Newton-Rhapson. El logaritmo de la máxima verosimilitud (likelihood) es:

$$L = X_{AB} \log p_{AB}(r) + X_A \log p_A(r) + X_B \log p_B(r) + X_0 \log p_0(r)$$

Tabla 3. Configuraciones de pares de marcadores y frecuencias fenotípicas esperadas bajo la hipótesis hexasómica en configuración de acoplamiento

Configuración del par de marcadores	Probabilidad Fenotípica
Simple/simple acoplamiento AB/00/00/00/00/00 x 00/00/00/00/00/00	AB $\frac{1}{2}(1-r)$ A0 $\frac{1}{2}r$ 0B $\frac{1}{2}r$ 00 $\frac{1}{2}(1-r)$
Simple/doble acoplamiento AB/0B/00/00/00/00 x 00/00/00/00/00/00	AB $\frac{1}{2} - \frac{1}{5}r$ A0 $\frac{1}{5}r$ 0B $\frac{3}{10} + \frac{1}{5}r$ 00 $\frac{1}{5} - \frac{1}{5}r$
Doble/doble acoplamiento AB/AB/00/00/00/00 x 00/00/00/00/00/00	AB $\frac{4}{5} - \frac{2}{5}r + \frac{1}{5}r^2$ A0 $\frac{2}{5}r - \frac{1}{5}r^2$ 0B $\frac{2}{5}r - \frac{1}{5}r^2$ 00 $\frac{1}{5} - \frac{2}{5}r + \frac{1}{5}r^2$
Simple/doble-simple acoplamiento AB/00/00/00/00/00 x A0/00/00/00/00/00	AB $\frac{1}{2} - \frac{1}{4}r$ A0 $\frac{1}{4} + \frac{1}{4}r$ 0B $\frac{1}{4}r$ 00 $\frac{1}{4} - \frac{1}{4}r$
Doble-simple/doble-simple acoplamiento AB/00/00/00/00/00 x AB/00/00/00/00/00	AB $(3 - 2r + \frac{1}{5}r^2)/4$ A0 $\frac{1}{2}r - \frac{1}{4}r^2$ 0B $\frac{1}{2}r - \frac{1}{4}r^2$ 00 $(1-r)^2/4$

Reemplazando las probabilidades fenotípicas dentro de las ecuaciones de máxima verosimilitud, obtenemos las ecuaciones para el cálculo de r:

1) Dosis Simple/Dosis doble en acoplamiento

$$L = X_{AB} \log(1/2 - 1/5r) + X_A \log(1/5r) + X_B \log(3/10 + 1/5r) + X_0 \log(1/5 - 1/5r)$$

2) Dosis Doble/Dosis doble en acoplamiento

$$L = X_{AB} \log(4/5 - 2/5r + 1/5r^2) + X_A \log(2/5 - 1/5r^2) + X_B \log(2/5 - 1/5r^2) + X_0 \log(1/5 - 2/5r + 1/5r^2)$$

3) Dosis Simple/Dosis doble-simple en acoplamiento

$$L = X_{AB} \log(1/2 - 1/4r) + X_A \log(1/4 + 1/4r) + X_B \log(1/4r) + X_0 \log(1/4 - 1/4r)$$

4) Dosis Doble-simple/Dosis doble-simple em acoplamiento

$$L = X_{AB} \log((3 - 2r + r^2)/4) + X_A \log(1/2r - 1/4r^2) + X_B \log(1/2r - 1/4r^2) + X_0 \log((1 - r^2)/4)$$

Estas ecuaciones derivadas quedan expresadas de la siguiente manera:

a) Dosis Simple/Dosis Doble en acoplamiento

$$(4 X_{AB} + 4 X_A + 4 X_B + 4 X_0) r^3 + (2 X_{AB} - 8 X_A - 14 X_B - 4 X_0) r^2 + (-6 X_{AB} - 11 X_A + 10 X_B - 15 X_0) r + 15 X_A = 0$$

b) Dosis Doble/Dosis Doble en acoplamiento

$$r = \frac{X_A + X_B \mp \sqrt{(X_A + X_B)^2 + 8(X_{AB} + X_A + X_B + X_0)(X_A + X_B)}}{2(X_{AB} + X_A + X_B + X_0)}$$

c) Dosis Simple/Dosis doble-simple en acoplamiento

$$(X_{AB} + X_A + X_B + X_0) r^3 + (-3X_A - 2X_B - X_0) r^2 + (-X_{AB} + 2X_A - X_B - 2X_0) r + 2 X_B = 0$$

d) Dosis Doble-simple/Dosis doble-simple en acoplamiento

$$(X_{AB} + X_A + X_B + X_0) r^5 + (-3 X_{AB} - 3X_A - 3X_B - 4X_0) r^4 + (X_{AB} + 4X_A + 4X_B + 7X_0) r^3 + (3X_{AB} - 6X_0) r^2 + (-2X_{AB} - 5X_A - 5X_B) r + 3X_A + 3X_B = 0$$

Exceptuando la ecuación b) de fácil resolución por ser de grado 2, las otras tres ecuaciones son resueltas utilizando el algoritmo de Newton-Rhapson para estimar la fracción de recombinación. El LOD score fue calculado para cada par como: $\log_{10}(\text{likelihood para } r = \check{r}) - \log_{10}(\text{likelihood para } r = 0.5)$.

La distancia fue calculada por Kosambi. El mapa final fue dibujado utilizando el programa MapChart 2.2 (Voorrips 2002).

5. Determinación de ligamientos en repulsión y acoplamiento.

Una matriz espejo fue creada para todos los marcadores de dosis simples y adicionada a la matriz original. Se analizó el ligamiento de pares mediante el programa MapMaker 3.0 a un LOD score de 3.0 y $\theta=0.39$ con el total de datos. Los marcadores que se presentan ligados entre el original y la invertida se encuentran en repulsión.

La detección de los marcadores ligados en repulsión permite utilizarlos para el análisis del tipo de poliploidía (auto vs alo) y la detección de los cromosomas homólogos. La estimación de la recombinación entre marcadores ligados en fase de acoplamiento es similar para auto y aloploidios (Wu *et al.* 1992). Sin embargo para marcadores ligados en fase de repulsión la recombinación difiere significativamente. En los autoploidios la recombinación observada (R) se compone de la recombinación debida a la segregación independiente (R_i) de los cromosomas que tienen marcadores ligados en fase de repulsión y al entrecruzamiento que puede ocurrir entre ellos (R_c), mientras que en aloploidios es más sencillo, ya que solo depende del entrecruzamiento de las cromátidas hermanas. La frecuencia de apareamiento entre cromosomas homólogos que llevan marcadores ligados en repulsión es $1/(h-1)$, donde h es el número de homólogos en el grupo, siendo para batatas: $1/5$. La recombinación debida a la segregación independiente es $R_i = (h-2)/2(h-1)$. La recombinación resultante de un evento de entrecruzamiento es $R_c = r^2/(h-1)$, donde r^2 es la distancia genética entre los marcadores ligados [$r^2 = (h-1) R - R_i$]. Entonces, la recombinación observada para dos marcadores ligados en fase de repulsión en caso de autoploidía se define como $R = R_i + R_c$. El valor mínimo que asume R para un autoploide verdadero es R_i y para todo par de marcadores ligados en repulsión R_i será mayor que R_c . Vemos que por definición R_i es un valor fijo para cada especie, ya que depende del nivel de ploidía, en el caso de batata $R_i = 0.2$. Sin embargo, R_c es un parámetro variable que depende de la distancia genética entre dos loci y del grado de apareamiento preferencial.

Los valores de R pueden ser utilizados como indicativos del tipo de apareamiento entre los cromosomas: al azar o preferenciales. Si $R < R_i$, r^2 asume un valor negativo (r^2 varía entre -1 y 0.5) (Qu & Hancock 2001), indicativo de un apareamiento preferencial entre cromosomas homólogos. Por otro lado, si $R > R_i$ ($r^2 > 0$) se asume que la asociación de cromosomas durante la meiosis es totalmente al azar.

6. Estimación del tipo de ploidía.

La segregación de los marcadores fue utilizada para analizar el tipo de ploidía de batata. Se analizó la hipótesis de apareamiento preferencial de los cromosomas *versus* la hipótesis alternativa de apareamiento al azar de los cromosomas. La proporción de marcadores no-simples y simples es un indicador del tipo de poliploidía (autopoliploide vs aloploiploide). Esta metodología fue utilizada previamente en caña de azúcar (Kehrer 1994, Al-Janabi *et al.* 1994) y en batata (Ukoskit & Thompson 1997; Kriegner *et al.* 2003; Cervantes-Flores *et al.* 2008). Asumiendo apareamiento al azar de los cromosomas en un autopoliploide, se espera que un 75% de los marcadores sean de dosis simples y un 25% de dosis múltiples. Para un genoma aloploiploide, los marcadores de dosis simples serían el 62.5%, y de dosis múltiple 37.5%.

7. Mapeo de caracteres fenotípicos

7.1 Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de la población de mapeo esta detallada en el capítulo 4.

7.2 Análisis de QTLs

Para la detección de QTLs relacionados con los pigmentos en la población se construyó una matriz de segregación geno-fenotípica en la que cada columna representa a un individuo de la población y cada fila corresponde al genotipo que lleva dicho individuo para cada marcador mapeado. La última fila corresponde a la característica cuantitativa y lleva los valores de color objetivo (L, a*, b*, C y h^º) y contenido de caroteno (ug/gr de peso fresco) para piel y pulpa.

Se analizó la detección de QTL para el año 2007 mediante el programa Map Maker/QTL (Paterson *et al.* 1988) por Intervalo Simple (SIM).

Resultados

Para la generación de los mapas de ligamientos de cada parental fueron utilizados marcadores SSR, AFLP, EST-SSR y GC en una población de mapeo de 113 individuos. Fueron evaluadas las segregaciones de cada marcador para estimar tipo de ploidía, marcadores en fase de repulsión y el desarrollo del mapa de ligamiento.

1. Análisis genético de los marcadores moleculares

1.1 Selección de marcadores

Fueron analizadas 20 combinaciones de AFLP, 80 loci microsatélites y 32 loci de genes candidatos de los cuales fueron seleccionados, 5 combinaciones de AFLP, 50 loci SSR y 11 GC. Los marcadores fueron seleccionados debido a su polimorfismo y reproducibilidad. Se detectaron 207 bandas polimórficas, 124 correspondientes al parental 30BG y 83 al parental 45BG. Además, fueron detectadas 71 bandas presentes en ambos padres pero segregantes en la población, haciendo un total de 278 alelos (Tabla 4). También se observaron alelos monomórficos que no segregaban en la población.

Tabla 4. Loci analizados en la población de mapeo disgregado por tipo de marcador y parental

Tipo de Marcador	lb SSR	EST-lbSSR	EST-ItSSR	AFLP	Genes Candidatos	Total
Padre 30BG	23	36	10	48	7	124
Padre 45BG	16	28	4	26	9	83
Biparental	8	27	5	16	15	71
Total	47	91	19	90	31	278

De las 20 combinaciones de AFLP ensayadas, fueron seleccionadas 5 por presentar un patrón claro y mayor número de bandas polimórficas. Es de importancia aclarar que la selección de las combinaciones se hizo en referencia a las utilizadas por Kriegner *et al.* 2001 a fin de poder sumar nuestros datos a los mapas existentes. Las cinco combinaciones analizadas aportaron un total de 90 bandas polimórficas entre los parentales, cuarenta y ocho (53,33%) proveniente del parental 30BG, 26 (28.89%) del parental 45BG y finalmente 16 (17.78%) biparentales. El promedio de bandas fue de 18 por combinación, superior al 13.5 observado por Kriegner *et al.* 2001 con 13.5.

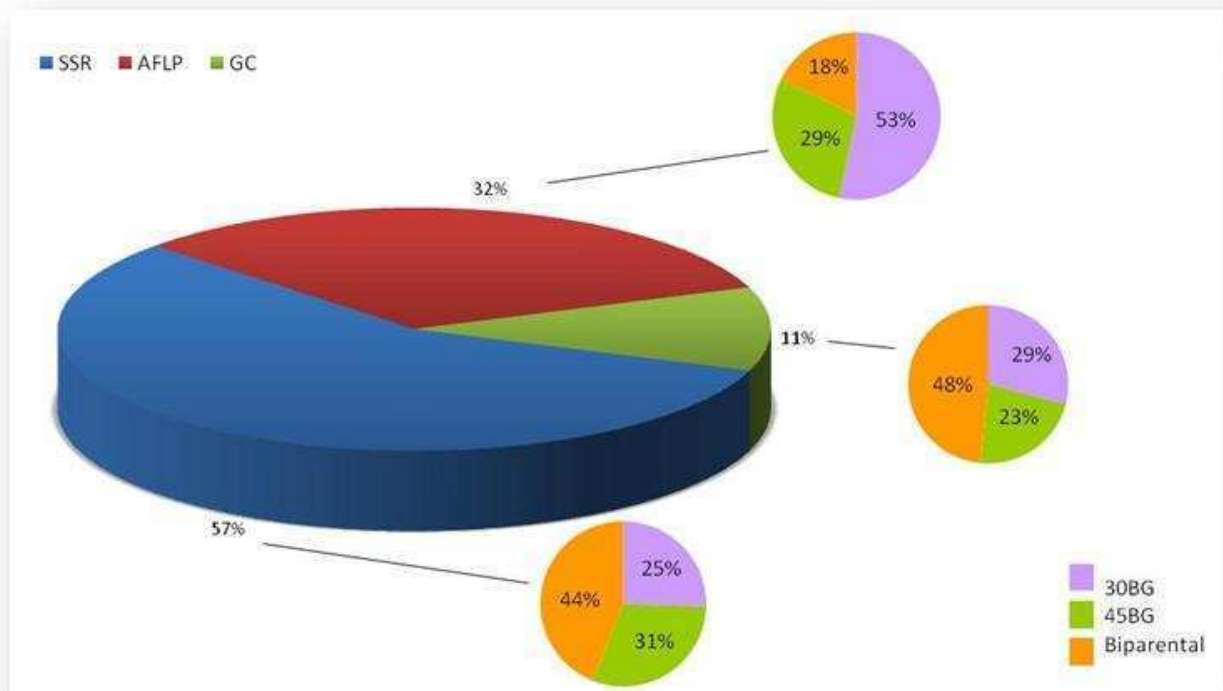
Del total de 80 loci de SSR analizados, 50 (62.5%) fueron seleccionados para generar los datos de la población de mapeo por presentar polimorfismo y un patrón claro de amplificación. Los SSR seleccionados generan un total de 157 bandas polimórficas, el 44% provenientes del parental 30BG,

el 30.6% del parental 45BG y el 25.4% restante bandas biparentales. Para los SSR, el promedio de alelos por marcador fue de 3,14 con un rango entre 1 y 8 alelos. Dentro de los 30 loci SSR restantes, 8 no amplificaron, 10 no presentaban polimorfismo, mientras que 12 presentaron un patrón confuso de amplificación (Ver Tabla Anexa).

Por último, de los 32 marcadores diseñados a partir de genes candidatos (GC), 11 de ellos presentaban un patrón polimórfico entre los padres y algunos de ellos solo presentaban bandas biparentales. Se obtuvieron 31 bandas con una distribución de 22.6%, 29.03% y 48.39% para el parental 30BG, 45BG y biparental, respectivamente. Puede observarse el mayor porcentaje de alelos biparentales y a la vez el menor promedio de alelos por marcador con solo 2.8 alelos. Encontrar menor cantidad de alelos es esperable para marcadores genéticos provenientes de genes que se encuentran altamente conservados, no solo dentro del mismo género, sino también entre especies distantes.

En el gráfico 1 puede verse la contribución de cada marcador al total de alelos amplificados, más de la mitad fue aportado por los microsatélites con un 57% de las bandas, mientras que el 32% provienen de los AFLP y el 11% restante corresponde a los genes candidatos (GC).

Gráfico 1. Porcentaje de bandas polimórficas según los diferentes marcadores, desglosado por el aporte de cada parental o banda biparental.



El análisis dentro de cada tipo de marcador, revela una contribución diferencial de bandas provenientes de cada uno de los padres o de ambos. El parental 45BG, mantiene un porcentaje entre el 23% y el 31%, mientras que el padre 30BG presenta una mayor variación en cuanto a su aporte a la cantidad de bandas polimórficas según los diferentes marcadores, aportando el 53% de las bandas detectadas en AFLP. Dentro de los SSR y genes candidatos se observa un claro predominio de los alelos biparentales con el 44% y 48% respectivamente. Zhang *et al.* 2010, en Crisantemo (hexaploide) observan una distribución de los marcadores similar a la que observamos en los SSR. En batata no podemos realizar comparaciones porque no han sido utilizados para mapeo.

Dentro de los AFLP, el parental 30BG aporta más de la mitad de las bandas. Barcaccia *et al.* 2003, también observa una distribución desbalanceada del aporte de cada parental a las bandas totales: 50.4% provenientes de *Salix alba*, 26.4% de *Salix fragilis* y 23.2% de bandas compartidas. Stein *et al.* 2007 con AFLP también presenta un 46% y 38% de bandas de cada parental y 15% biparentales, todos valores similares a los observados por nosotros. Cervantes-Flores *et al.* (2007) al igual que Kriegner *et al.* (2003) presenta valores un poco más equilibrados con 40% y 32% para los alelos polimórficos y 27% para los biparentales.

1.2 Segregación de los marcadores

Teniendo en cuenta que batata es una especie hexaploide, los alelos amplificados pueden encontrarse en diferentes configuraciones o dosis, de acuerdo al número de copias de cada uno de ellos. La dosis puede ser nula, cuando no hay amplificación, simple cuando es única copia de ese alelo (Aaaaaa), doble cuando se encuentra en dos dosis (AAaaaa) y así sucesivamente hasta el máximo número de alelos esperados por locus que es seis. Se determinó la configuración alélica o dosis de cada *locus* comparando la segregación observada con la segregación esperada para las dos teorías que co-existen sobre el comportamiento durante la meiosis de los cromosomas en batata: herencia hexasómica y tetrasómica/tetradisómica. Los marcadores fueron agrupados de acuerdo a su presencia en un padre, en el otro o en ambos padres pero segregantes en la población (Tabla 5). Los 207 marcadores provenientes del parental 45BG y del 30BG fueron clasificados como alelos de dosis simple (DS), de dosis doble (DD) y dosis triple (DT), para alelos de dosis mayor no pueden observarse segregantes, ya que todas las gametas posibles llevan el alelo dominante. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos y se indica segregación y número de marcadores para cada configuración. Se incluyen además los alelos biparentales y los marcadores distorsionados, correspondiente a aquellos que no se ajustaron a ninguno de los valores esperados. El tamaño de la

población utilizada en esta investigación no es suficiente para distinguir entre la situación hexasómica, tetrasómica y tetradisómica de los marcadores de dosis doble. Por lo cual los datos fueron tomados de manera conjunta. Muchos marcadores fueron clasificados en la configuración de doble dosis para las tres hipótesis.

Tabla 5. Segregaciones observadas para el total de marcadores en la población de mapeo.

*Incluye 3:1, 4:1 y 5:1.

	P30BG	P45BG	Biparentales	Total	
Segregación de Marcadores	Número	Número	Número	Número	(%)
Dosis simple (DS)	80	44		124	44.60
Dosis Doble Simple (DDS)			36	36	12.95
Dosis Doble (DD)*	32	31		63	22.66
Dosis Triple (DT)	2	1		3	1.08
Distorsionados	10	7	35	52	18.71
Total	124	83	71	278	100

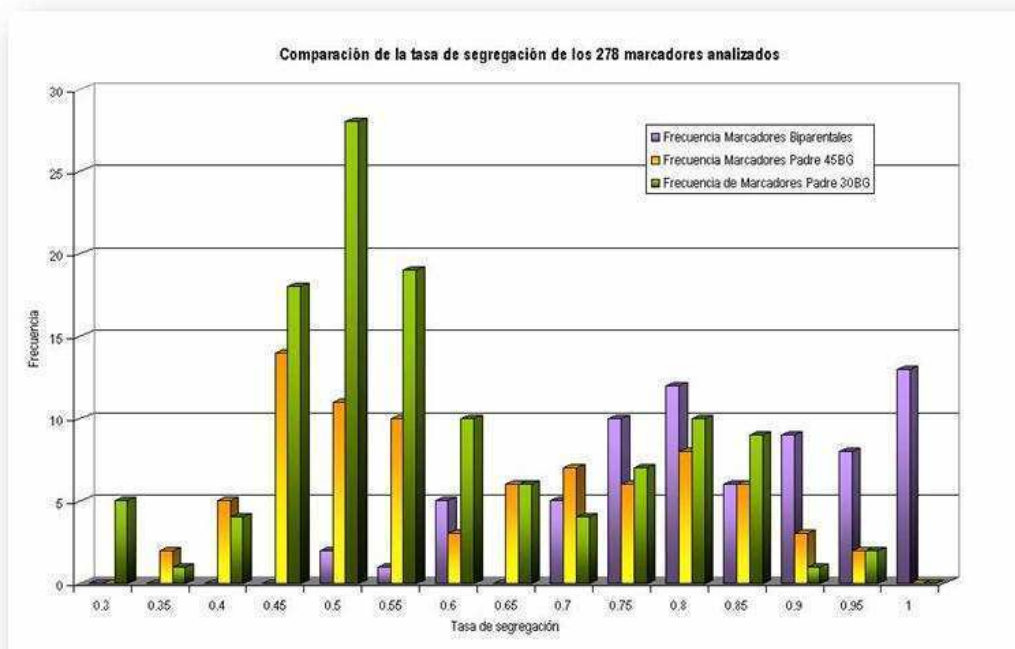
Nuestros análisis de segregación detectaron 124 marcadores de dosis simple ($\alpha \leq 0.01$) sobre un total de 278 marcadores. El porcentaje de marcadores de dosis simples alcanza el 44.6%, este valor se mantiene cuando se analiza la segregación disgregada por tipo de marcador utilizado. (Gráfico XX). Si tenemos en cuenta solamente los alelos polimórficos entre ambos parentales (207 marcadores), el porcentaje de alelos de dosis simples alcanza el 59.9%, similar al observado por Ukoskit & Thompson 1997, Kriegner *et al.* 2003, Stein *et al.* 2007 y Julier *et al.* 2003, que muestran valores entre 60%-66%. A diferencia de Grattapaglia & Sederoff 1994 y Al-Janabi *et al.* 1993 que presentan una alta frecuencia de alelos dosis simples (87.9% y 74.5% respectivamente), Aitken *et al.* 2005, en caña de azúcar (poliploide de alto nivel) detecta un 75% de bandas simple dosis utilizando los mismos marcadores: AFLP y SSR. Es importante destacar que el tipo de población de mapeo con la que se trabaja influye en el porcentaje de alelos de dosis simple que pueden ser detectados. Aitken *et al.* (2005) genera una población a partir de un cruzamiento interespecífico entre *Saccharum officinarum* y *S. spontaneum*. Y Al-Janabi *et al.* 1993 a pesar de trabajar con una especie octoploide, su población de mapeo es doble haploide, que asegura una alta tasa de dosis simple.

Un total de 63 (30.43%) marcadores polimórficos entre parentales se ajustan a segregaciones 3:1, 4:1 y 5:1, que es la esperada para marcadores de dosis doble bajo segregación tetradisómica hexasómica, tetrasómica respectivamente. Kriegner *et al.* (2003) cita un 18.6% de marcadores dosis doble, pero solo considerando aquellos que ajustan a la segregación hexasómica o tetrasómica, valor similar al observado por Aitken *et al.* 2005 en caña de azúcar. Solo tres marcadores se ajustan

a segregación de dosis triple 11:1 o 19:1 esperada para comportamiento hexasómico o tetrasómico. Marcadores de dosis cuádruples o mayores no se espera que presenten segregación en la población de mapeo excepto para casos de doble reducción donde resulta un individuo que no muestra el marcador (Kriegner *et al.* 2003).

La tasa de segregación de los marcadores provenientes del padre 30 (124 bandas) y del padre 45 (83 bandas) se muestran en el gráfico 2. Se observa una distribución binomial, con mayor cantidad de marcadores agrupados alrededor del valor 0.5, que corresponde a la tasa de segregación de los marcadores simples y un grupo menor alrededor del valor 0.75 (correspondientes a los marcadores de dosis doble simple). Esta distribución es similar a la observada por Kriegner *et al.* 2003 y Cervantes Flores *et al.* 2007 en batata, Stein *et al.* 2007 en *Paspalum notatum* y Aitken *et al.* 2007 en *Saccharum officinarum*. Alrededor de los 0.9 podemos ubicar a aquellos fragmentos que presentan dosis triples.

Gráfico 2: Comparación de la tasa de Segregación Observada para los 278 marcadores discriminado por parental.



La tasa de segregación de los 71 marcadores presentes en ambos padres fue analizada (gráfico 2). Un total de 36 (50.7%) se ajustan a la segregación esperada para marcadores de dosis doble-simple (Aaaaaa x aaaaaa): 3:1 (presencia:ausencia). Estos marcadores se centran alrededor del valor 0.75. Stein *et al.* 2007 y Aitken *et al.* 2007 presentan valores de 57% y 62% respectivamente.

En los gráficos N°3 y N°4 se observa la segregación de los marcadores polimórficos entre los parentales según las dos hipótesis de herencia en batata. Casi el 60% corresponden a marcadores de dosis simples, seguidas por los de dosis doble con 28% y triple dosis con solo 1.45%. Los distorsionados alcanzan el 8.21%. Como se observa en el gráfico 3, algunos marcadores ajustan simultáneamente a dos relaciones de segregación; 3:1/5:1 o 5:1/11:1, una población de mayor tamaño podría resolver mejor la tasa a la que se ajustan.

Gráfico 3. Porcentaje de bandas asignadas a las diferentes segregaciones esperadas para una herencia tetrasómica ($\alpha \leq 0.05$).

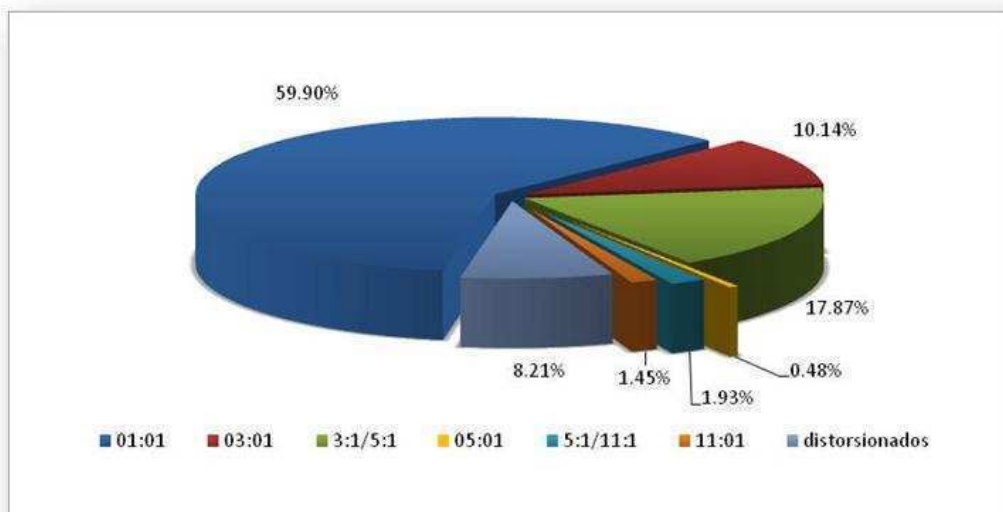
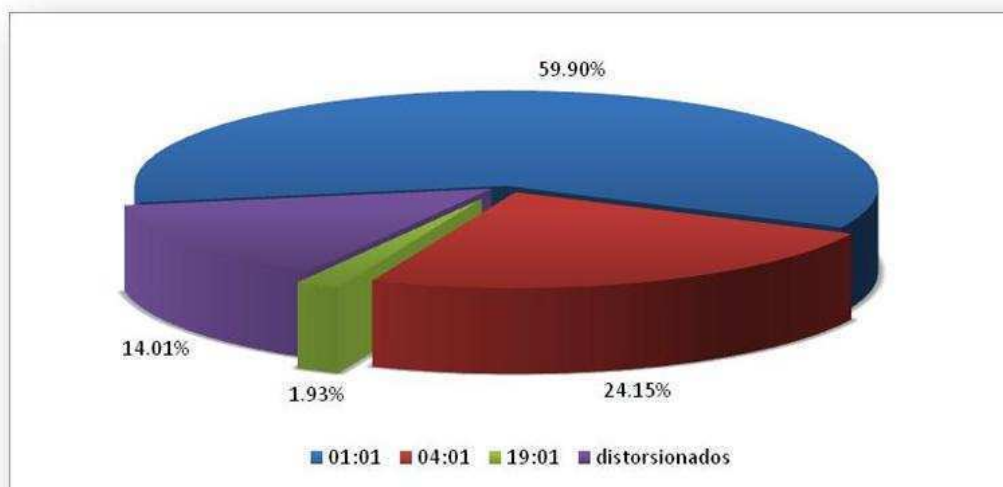


Gráfico 4. Porcentaje de alelos asignados a las diferentes dosis esperadas para una herencia hexasómica ($\alpha \leq 0.05$).



Podemos concluir teniendo en cuenta el análisis de ambas hipótesis, que la presencia de marcadores 4:1 y 19:1 (o 5:1 y 11:1) es indicativa de que la especie presenta principalmente herencia polisómica. Sin embargo, la presencia de marcadores que se ajustaron exclusivamente a una segregación 3:1, sería un indicativo de que en las regiones donde se localizan estos marcadores ocurre apareamiento preferencial de cromosomas ya que esta relación de segregación corresponde exclusivamente a una herencia disómica. La presencia de bivalentes durante meiosis observadas en trabajos citológicos, refuerza esta observación (Ting & Kehr, 1953).

El tamaño poblacional sin embargo resultó una limitante para poder definir entre la hipótesis de herencia hexasómica y tetrasómica/tetradisómica. La detección de herencia polisómica es acorde con los trabajos citológicos previos y con el trabajo de Buteler *et al.* 1999, donde estableció la segregación de los primeros 9 SSR. Cuatro de ellos presentaban herencia polisómica, y específicamente fueron clasificados con segregación tetrasómica.

Los resultados obtenidos en esta tesis respecto a los SSR en *Ipomoea batatas* confirman lo descrito por Buteler *et al.* (1999) y difieren de los obtenidos con los SSR en trigo, donde los loci homeólogos parecen ser genoma específico (Roder *et al.* 1995; Bryan *et al.* 1997). Lógico para un especie aloploidioide.

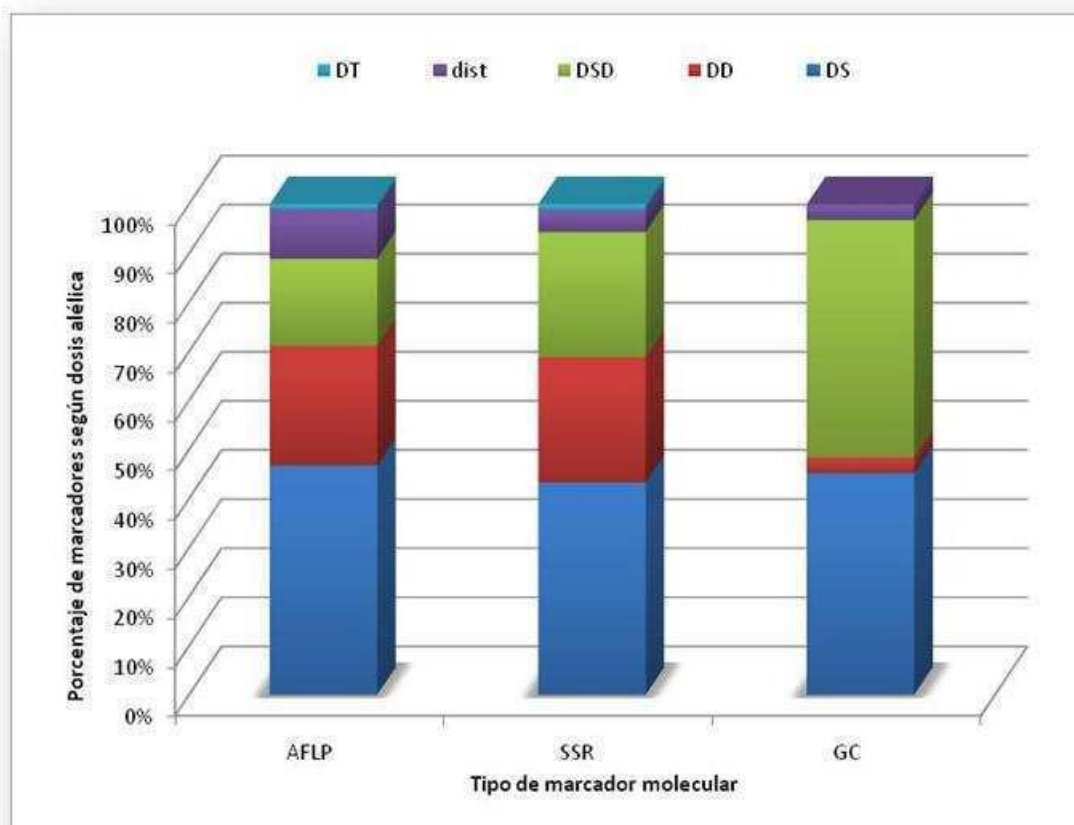
Sería importante poder avanzar en la determinación de la herencia, confirmando o descartando la existencia de herencia hexasómica. Contar con ese conocimiento, permitiría un análisis más preciso de los alelos que podríamos esperar cuando se trabaja con marcadores codominantes. Si estamos ante una especie con herencia tetrasómica/tetradisómica, los SSR deberían amplificar cuatro alelos como máximo si hibrida en los dos genomas B2, mientras que si el SSR amplifica sobre el genoma B1, solo dos alelos son esperable. Una herencia hexasómica implica hasta 6 alelos por locus.

1.3 Segregación de los alelos según tipo de marcador molecular

Cuando se analiza la segregación discriminando por marcador molecular pueden observarse algunas características interesantes: todos los marcadores utilizados (AFLP, SSR y GC) presentan el mismo porcentaje de alelos de dosis simple (entre un 43.3% y 46.7%), sin embargo los AFLP y SSR presentan un 25% de alelos de dosis doble, mientras que en los GC, este valor es de apenas el 3.2%. En el gráfico 5 puede notarse una clara diferencia en el porcentaje de alelos biparentales (DSD) aportado por cada marcador, los provenientes de los GC, alcanza casi el 50% de los alelos descritos, mientras que este disminuye a 25.5% en los SSR y por último, los AFLP con solo un 17.8%. Una posible explicación de este fenómeno (que deberá ser corroborada) es que en genes relacionados con procesos metabólicos centrales, por lo menos un alelo en cada parental debe estar

presente, dando origen a la alta tasa de marcadores DSD en GC. Los marcadores de dosis triple (DT) sin embargo presentan valores similares para todos los casos. Por último, los AFLP presentan el mayor valor de marcadores distorsionados con un 10%, más del doble observado en los SSR y GC (4.4% y 3.2%).

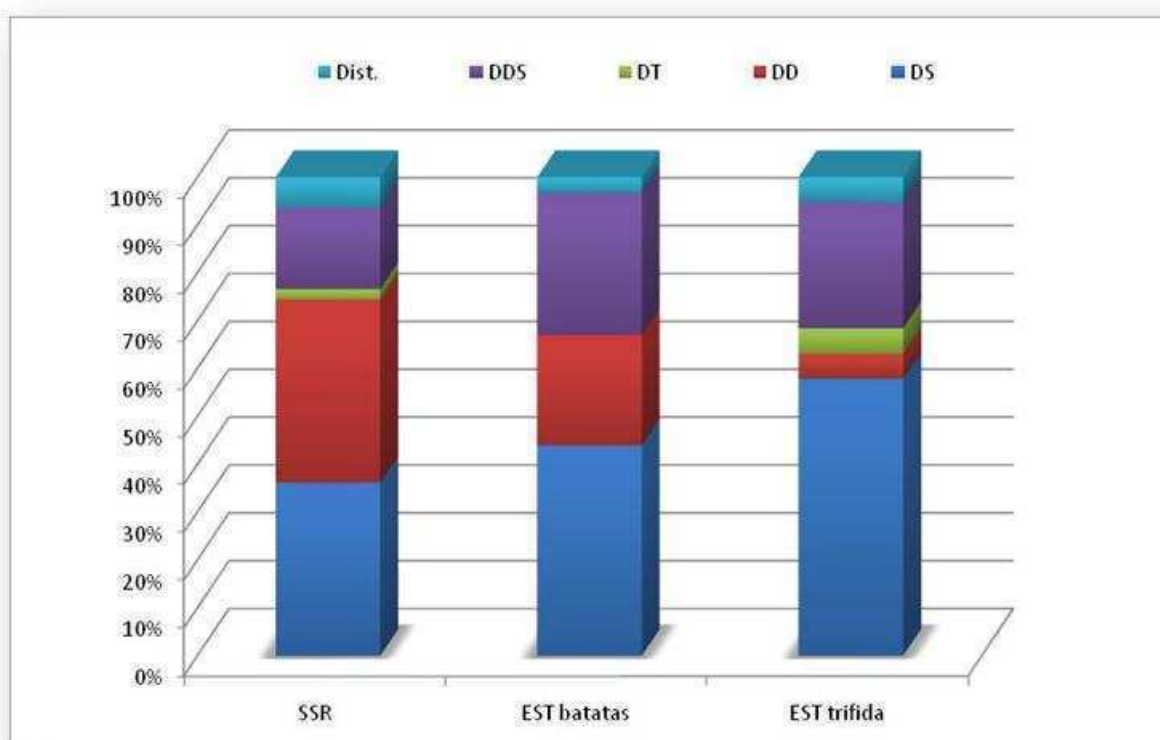
Gráfico 5: Distribución de las diferentes dosis alélica por tipo de marcador molecular.



Resulta relevante indicar que dentro de los SSR analizados, tenemos aquellos generados mediante la clásica estrategia a partir de una genoteca genómica y los desarrollados a partir de EST: algunos a partir de *Ipomoea batatas* y otros de *Ipomoea trifida*. ¿El origen diferente de los SSR puede estar influyendo en la capacidad de amplificación, de polimorfismo y de tasa de segregación esperada? En el gráfico 6 pueden observarse que las bandas generadas a partir de los SSR de *Ipomoea trifida* presentan el mayor porcentaje (57.9%) de bandas que se ajustan a una segregación de dosis simples, seguidas de las aportadas por los EST-SSR de batata con un 43.9% frente a tan solo el 36.7% de los “clásicos” SSR. Con respecto a los alelos biparentales, los provenientes de los “clásicos” SSR presentan hasta un 10% menos de este tipo de alelos que los observados en los EST-SSR, la misma explicación ensayada párrafos arriba podría explicar esto también. El porcentaje de alelos

biparentales de los SSR “clásicos” es de 17.2% similar a los observados en los AFLP (17.8%). Otro dato que encontramos relevante que muestra diferencias entre los SSR, son el porcentaje de marcadores de dosis doble: en los SSR “clásicos” es del 38%, los EST-SSR *Ipomoea batata* del 23% y solo se observa un 5.3% cuando se utilizan los SSR derivados de EST de *Ipomoea trifida*. Esta diferencia podría estar relacionada con el origen del genoma de batata, sería oportuno recordar en este momento, que *Ipomoea trifida* es uno de los ancestros de batata. Los SSR desarrollados a partir de *I. trifida* podría estar amplificando de manera específica en alguno de los genoma de batata.

Gráfico 6. Distribución de las configuraciones alélicas según tipo de microsatélite



1.4 Tipo de ploidía

Con el objetivo de aportar elementos para determinar el tipo de herencia en los cultivares de batatas analizados, se realizaron análisis de segregación de los marcadores moleculares utilizados. Para la determinación del tipo de ploidía, han sido propuestos tres métodos en la bibliografía disponible:

a) El análisis de la tasa de segregación de los marcadores de dosis doble y triple. Tasas polisómicas (4:1, 5:1, 19:1 y 11:1) indican autoploidía y disómicas (3:1 y 7:1) aloploidía (Soltis & Rieseberg 1986; Qu & Hancock, 1995).

b) Comparación del número de loci ligados en acoplamiento vs repulsión (Sorrels 1992 y Wu *et al.* 1992). La detección del ligamiento en repulsión está determinada por el tipo de apareamiento entre cromosomas durante la meiosis y la segregación en cada parental. En diploides así como poliploides disómicos (alopoliploides) el ligamiento en repulsión y acoplamiento aparecen en la misma frecuencia. Se considera la relación 0-0.25:1 como indicativa de herencia polisómica mientras que la relación 1:1 indica herencia disómica.

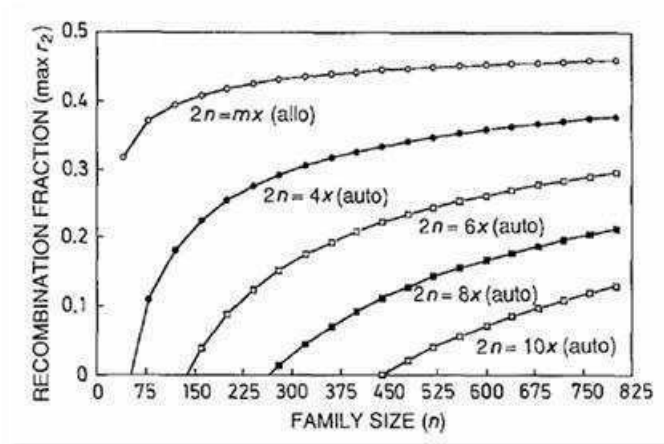
c) Comparación de la proporción de marcadores simples y de dosis múltiple (Da Silva *et al.* 1993). Baja frecuencia de marcadores de dosis múltiple o ligados en fase de repulsión son relacionados con la autoploidia.

Para el primer método, se analizaron las relaciones de segregación de los marcadores de dosis doble. Del total de fragmentos obtenidos, 63 segregaron como alelos de dosis doble y 3 de dosis triple. De ellos algunos se ajustaron exclusivamente a una relación 4:1 o 5:1, mientras que otros no pudieron ser distinguidos estadísticamente de la relación 3:1 debido al tamaño de la población, como ya se indicó anteriormente. La presencia de segregaciones 4:1 y 5:1 indican herencia polisómica. Sin embargo debido a la presencia de marcadores de sólo ajustan en una relación 3:1 que corresponden a una herencia disómica, podemos proponer que determinadas regiones del genoma han sufrido el proceso denominado “diploidización” (Chen Jeffrey, 2007) (Udall & Wendel, 2006) y presentan apareamiento preferencial de cromosomas. En frutilla (*Fragaria virginiana*) una especie octoploide específicamente considerada autoploide, fue detectado un alto nivel de diploidización: ocho de nueve microsatélites analizados presentaron segregación estrictamente disómica (Ashley *et al.* 2003). Loci que segregan 7:1 exclusivamente fueron solamente 8 en ambos padres y 20 que se ajustaban a 3:1 y 7:1 simultáneamente.

El segundo método, implica la comparación entre marcadores en fase de ligamiento y repulsión. Dado el número de genotipos con los que se cuenta y el nivel de ploidía de *Ipomoea batatas* es poco probable detectar marcadores en fase de repulsión: si bien para detectar marcadores en fase de acoplamiento se requiere un mínimo de 75 individuos sin importar si la especie se comporta como auto o aloploide, en el caso de autoploides, la estimación de los ligamientos en repulsión requiere de un tamaño poblacional enorme, con más de 750 individuos para un $r=0.3$ (Wu *et al.* 1992) (Gráfico 7). El análisis permitió detectar solo un marcador ligado en fase de repulsión. Esto daría una proporción indicativa de herencia polisómica, comportamiento propio de un autoploide, confirmando lo visto en trabajos anteriores (Ukoskit & Thompson 1997; Kriegner *et al.* 2003; Cervantes-Flores *et al.* 2007; Chang *et al.* 2009). Kriegner Albert 2001 no detecta ningún marcador en fase de repulsión a un LOD 4 y una fracción máxima de recombinación de 0.4,

indicando la prevalencia de apareamientos al azar entre los cromosomas homólogos. Con una LOD menor de 3.0 y una fracción de recombinación de 0.5 se observaron algunos marcadores ligados en repulsión, evidenciando un parcial apareamiento preferencial de los cromosomas.

Gráfico 7. Máxima fracción de recombinación detectable ($\max r_2$) para ligamientos en fase de repulsión en alopoliploides y autopoliploides con diferente nivel de ploidía ($2n = mx$, donde $m =$ nivel de ploidía) Las curvas se establecieron en base a un $\max r_2 = 0.5 (1 - 2.3264)^{(h-1)} \sqrt{1/h}$ con $P < 0.01$. Extraído de Wu et al. 1992.



Kriegner Albert 2001, hace un interesante análisis acerca de los marcadores ligados en fase de repulsión. En un diploide o alopoliploide la “imagen espejo” de un marcador dominante de dosis simple simula el alelo homólogo recesivo y puede ser usado para la detección de ligamientos en fase de repulsión. En autohexaploides sin embargo, un total de 6 alelos segregan por cada locus, por lo cual la imagen espejo de un marcador simple dominante no representa necesariamente el alelo recesivo. El propone que la detección de la fase de ligamiento en poliploides polisómicos requiere de marcadores codominantes además de una gran población de mapeo. Qu & Hancock (2001) plantean que no es correcto realizar el cálculo de marcadores ligados en fase de repulsión al menos que se conozca el grado de apareamiento preferencial entre cromosomas homólogos y que debe ser calculado de a par de marcadores y no de manera conjunta como fue descrito en Da Silva *et al.* 1993; Al-Janabi *et al.* 1994. Sin embargo la mayoría de los trabajos realizados en poliploides calculan los marcadores en fase de repulsión a pesar de desconocer algunos parámetros. Esto permite acercarse un poco más a la estructura de genomas complejos sin desconocer las limitantes. En este sentido, Stein *et al.* 2007 utiliza marcadores AFLP para la detección de marcadores en fase de repulsión en *Paspalum notatum* (tetraploide) observando entre 51 y 23 pares ligados para ambos padres aunque la relación ligados en repulsión versus ligados en acoplamiento difieren entre ellos, 0.04:1 y 0.11:1. Lerceteau-Kohler *et al.* 2003, también detecta marcadores ligados en fase de

repulsión utilizando AFLP en un octoploide, pero la tasa de marcadores en fase repulsión:acoplamiento es intermedia entre 1:0 y 0:0, proponiendo los autores que el genoma presenta herencia mixta. Es llamativo que pueda detectar marcadores en fase de repulsión en un poliploide de tan alto nivel, teniendo en cuenta algunos aspectos teóricos propuesto por Wu *et al.* (1992) donde expresa las limitantes en la detección de marcadores ligados en fase de repulsión en autopoliploides. Solo en poblaciones de gran tamaño es posible detectarlas cuando se trabaja con especie de ploidía 6x, 8x y 10x. Al menos que el proceso de diploidización de la especie este lo suficientemente avanzado y que presente principalmente herencia disómica.

Recientemente Wu *et al.* 2004, proponen avances en este aspecto, presentando fórmulas que permiten calcular el grado de apareamiento preferencial entre cromosomas homólogos en tetraploides. Esto permitirá en el futuro tener una dimensión más precisa de estos complejos genomas.

La detección de marcadores ligados en diferentes fases permite identificar los cromosomas homólogos, a pesar de que esto no fue posible detectarlos, contar con marcadores SSR permitirá resolver esta limitación.

Por último, la proporción de marcadores simples versus no-simples fue usado como el tercer método indicador del tipo de ploidía. En una especie hexaploide los alelos con configuración simple, doble y triple pueden generar polimorfismo mientras que las configuraciones mayores no pueden ser evidenciadas. Según Kriegner Albert 2001, considerando que no hay apareamiento preferencial de los cromosomas, en un autohexaploide se espera un 25% de marcadores no simples y un 75% de marcadores simples. En un alopoliploide, el porcentaje esperado de no simples es del 37.5% contra el 62.5% de simples.

Para la estimación mediante el tercer método, fueron utilizados los marcadores que segregaban de manera hexasómica (1:1, 4:1 y 19:1) considerando los fragmentos de dosis simple, doble y triple. Se generó un archivo combinando los datos de ambos parentales y se comparó la proporción de marcadores simples versus no simples (dobles y triples). El presente estudio muestra un 69.66% de simples y 30.34% de no simples (Tabla 6) y soporta la naturaleza autopoliploide de *Ipomoea batatas* mediante una prueba de chi-cuadrado. La opción alopoliploide presenta un p significativo a un $\alpha \leq 0.05$.

Todos estos datos en conjunto resultan consistentes con un modelo de herencia polisómica y genoma autopoliploide. Sin embargo la ocurrencia de apareamiento preferencial entre algunos cromosomas es posible.

Tabla 6. Análisis de chi-cuadrado ($\alpha \leq 0.05$) para tipo de ploidía en batatas mediante el porcentaje de marcadores simples y no simples suponiendo naturaleza hexasómica.

ns y *** corresponde a no significativo y significativo a un nivel $\alpha=0.05$ para $H_0 = \text{tasa observada} - \text{tasa esperada} = 0$.

Tipo de configuración alélica	Marcadores Observados		Marcadores Esperados			
			Autohexaploide		Alopoliploide	
	Número	%	Número	%	Número	%
Simple	124	69.66	133.5	75	111.25	62.5
No simples	54	30.34	44.5	25	66.75	37.5
Totales	178	100	178	100	178	100
χ^2			p=0.1 ns		p=0.04***	

1.5 Distorsión de la segregación

Del total de 278 marcadores, el 18.74% no ajusta a ninguna tasa de segregación esperada para el modelo de herencia hexasómica o tetradisómica a un nivel de significancia ($\alpha=0.01$). Este porcentaje involucra el total de los marcadores analizados (Tabla 5). Sin embargo resulta conveniente analizar por separado los marcadores polimórficos y los biparentales a fin de poder comparar con otros trabajos. Teniendo en cuenta solamente los alelos polimórficos entre parentales el 8.2% fueron consideradas distorsionadas. Kriegner *et al.* (2003) presenta un 11.9%, y Cervantes-Flores *et al.* 2007, solo un 5.9% de distorsionados. De cualquier manera, no resulta claro cómo realizó el cálculo este último. Si bien estos marcadores no son incluidos en un principio en el análisis de mapeo, no deben ser descartados ya que existen antecedentes de marcadores distorsionados asociados a caracteres de interés fenotípico. Algunas regiones genómicas presentan tasas de recombinación particularmente altas o bajas, esto genera que los marcadores ligados a esas regiones presenten tasas de segregación alejadas de las esperadas. Por ejemplo podría citarse el locus asociado a la aposporia en *Paspalum notatum*, fuertemente asociado con marcadores de segregación distorsionada (Stein *et al.* 2007).

Los datos de segregación de los 71 marcadores presentes en ambos padres y que segregan en la población puede ser analizada de manera parcial a menos que se realicen los cálculos de las frecuencias genotípicas esperadas para un hexaploide con dosis superiores a uno, dato que no ha sido publicado hasta el momento. Treinta y cinco (35) (49.3%) de estos marcadores no se ajustan a la segregación de dosis doble-simple (3:1). Kriegner *et al.* (2003) informa un 60% de biparentales distorsionados. Sin embargo dentro de estos marcadores, solo algunos son efectivamente distorsionados y otros simplemente corresponden a otras configuraciones alélicas como: simples-dobles (Aaaaaa x AAaaaa), simple-triple (Aaaaaa x AAAaaa), doble-doble (AAaaaa x AAaaaa), doble-

triple (AAaaaa x AAAaaa) y triple-triple (AAAaaa x AAAaaa). Dado que la segregaciones esperadas para estas configuraciones no fueron hasta ahora calculadas, en la mayoría de publicaciones estos marcadores fueron contabilizados dentro del grupo “distorsionados”, excepto en Stein *et al.* 2007 que evalúa las otras configuraciones alélicas posible para marcadores biparentales con herencia tetrasómica/disómica, e informa solamente 5,7% de alelos biparentales distorsionados.

En las siguientes tablas (Nº6 y 7) se presentan las segregaciones gaméticas y frecuencias genotípicas esperadas para un hexaploide suponiendo apareamiento bivalente y ausencia de doble reducción, con herencia hexasómica. Esto permitió contabilizar de forma más precisa la presencia de distorsionados y aportar los datos de frecuencias gaméticas en hexaploides.

Tabla 6: Segregación gamética de un hexaploide con apareamiento bivalente en ausencia de doble reducción.

Genotipo Parental	Gametas				Tasa A___:aaa
	aaa	Aaa	AAa	AAA	
Aaaaaa	1	1			1:1
AAaaaa	4	12	4		3:1
AAAaaa	1	9	9	1	19:1
AAAAaa		4	13	3	1:0
AAAAAa			10	10	1:1

Con estos datos, fue posible calcular las segregaciones esperadas para loci biparentales con diferentes configuraciones alélicas:

Tabla 7: Frecuencias esperadas genotípicas (A____:aaaaaa) en cruzamientos de genotipos con diferentes dosis alélicas y herencia hexasómica. Elaboración propia

Dosis Alélica	Frecuencias esperada
doble-simple (AAaaaa x Aaaaaa)	9:1
doble-doble (AAaaaa x AAaaaa)	14:1
simple-triple (Aaaaaa x AAAaaa)	23:1
doble-triple (AAaaaa x AAAaaa)	27:1
triple-triple (AAAaaa x AAAaaa)	79:1

A partir de estos cálculos fue posible determinar que de los 35 marcadores biparentales que no segregan como dosis doble simple, 25 de ellos se ajustan a segregaciones 9:1 y/o 14:1. Por lo que

solamente quedan 10 marcadores distorsionados que corresponde a un 14%. Sin embargo, si se consideran además las posibles segregaciones teniendo en cuenta herencia tetradisómica, posiblemente, el porcentaje de distorsionados entre los alelos biparentales sea aún menor. Edme *et al.* 2006 no detecta marcadores distorsionados dentro de este grupo en una población interespecífica de *Saccharum*.

A los fines del mapeo, los marcadores biparentales que no se ajustan a una segregación 3:1 no fueron utilizados y fueron incluidos dentro de la categoría distorsionados.

2. Mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas*

Como se detalló en la introducción del capítulo, el mapeo en especies autoploiploides implica una serie de pasos: a) determinar las configuraciones alélicas de cada marcador, b) selección de marcadores polimórficos entre padres que segregen 1:1, c) realizar el análisis de ligamiento y determinar los grupos de co-segregación (potenciales cromosomas), d) calcular las distancias y orden de los marcadores y finalmente e) detectar cromosomas homólogos. Después de generar un mapa marco, fue posible agregar los marcadores biparentales que segregan 3:1 y los marcadores de dosis múltiple.

Cada grupo de co-segregación corresponde a un único cromosoma homólogo. Para *Ipomoea batatas*, el número de cromosomas totales es de 90, arreglados en 15 grupos de 6 cromosomas homólogos cada uno.

En la primera etapa del análisis de ligamiento, los mapas parentales fueron construidos utilizando únicamente los 80 y 44 marcadores de dosis simple, provenientes de cada parental mediante el MapMaker (Lander *et al.* 1987) y confirmado en el JoinMap 3.0 (Stam 1993). El grupo de marcadores ligados en fase de ligamiento fueron denominados LG (grupos de ligamiento o de co-segregación). Se partió de un LOD=6.0 y un valor máximo de recombinación de 0.39. A partir de ahí, se fue disminuyendo el LOD hasta 3.0 analizando los marcadores que se unían a los grupos conformados y atendiendo que la adición de nuevos marcadores no causaran distorsión en el orden y distancia establecidos anteriormente. Marcadores de dosis doble y biparentales fueron adicionados posteriormente al mapa marco. Una vez obtenidas las frecuencias de recombinación estimadas mediante el algoritmo Newton-Rhapson y con LOD mayor a 2.0 se analizaron las distancias mediante la ecuación de Kosambi. Estos marcadores fueron colocados en el mapa mediante el análisis de ligamiento simple. Dos grupos de ligamiento fueron considerados y declarados homólogos si poseían el mismo marcador múltiple dosis (Da Silva 1993). En la tabla 8 se detallan los SSR analizados, el número de alelos de cada dosis y los grupos de ligamiento donde

fueron localizados. Puede verse en las dos últimas columnas observando la localización de los SSR y GC que cromosomas fueron considerados homólogos entre ambos parentales. El análisis de marcadores ligados en repulsión solo detecto un único marcador ligado en el parental 30BG. Los alelos distorsionados no fueron colocados en el mapa dado que modificaban los grupos de co-segregación y las distancias pre-establecidas.

Tabla 8. SSR, AFLP y GC analizados en el cruzamiento entre 30BG y 45BG. Nivel de polimorfismo, número de marcadores de dosis simple, doble, triple, distorsionados. Numero de marcadores de dosis doble simple (3:1) y dosis doble múltiple. Número de alelos ligados y grupo de ligamiento asignado.

SSR	Bandas polimóricas					DDS	DDM	Mapeados	Grupo de Ligamiento 30BG	Grupo de Ligamiento 45BG
	Total	DS	DD	DT	d					
SSR3	3	1	0	0	2	0	0	1	23	-
SSR4	4	1	1	0	0	0	2		-	-
SSR7	4	1	0	0	0	2	1		-	-
SSR9	1	1	0	0	0	0	0	1	-	1
SSR10	6	4	0	0	0	1	1	2	8	1
SSR11	8	4	3	0	1	0	0	2	15	2
SSR12	2	2	0	0	0	0	0	1	27	-
SSR13	1	1	0	0	0	0	0	1	-	8
SSR14	3	1	1	0	0	0	1		-	-
SSR15	2	1	0	0	0	1	0	2	10	8
SSR17	4	0	1	0	0	1	2	2	16-22	-
SSR18	2	2	0	0	0	0	0		-	-
SSR21	2	1	1	0	0	0	0	1	24	-
SSR22	5	3	1	0	0	0	1	1	14	-
SSR26	2	1	1	0	0	0	0		-	-
SSR112	4	1	1	0	0	1	1	2	4	11-12
SSR230	5	3	1	0	0	0	1	2	1-2	-
SSR238	5	3	2	0	0	0	0	2	12	16
SSR242	2	2	0	0	0	0	0	2	8	1
SSR248	1	1	0	0	0	0	0	1	28	-
SSR255	3	0	1	0	1	0	1	1	11	-
SSR269	5	1	3	0	0	0	1	2	20	5
SSR286	6	2	1	0	1	0	2	2	10-11	-
SSR297	6	0	4	1	1	0	0		-	-
SSR318	3	1	1	0	0	1	0	1	-	1
SSR320	6	3	1	0	0	0	2	3	5-6	7
SSR328	3	2	1	0	0	0	0	2	20	5
SSR331	3	0	2	0	0	0	1		-	-
SSR403	1	1	0	0	0	0	0	1	27	-
SSR471	2	1	0	0	0	1	0	2	3-4	12
SSR658	2	0	2	0	0	0	0	1	-	3
SSR739	3	1	1	0	0	0	1	1	13	-

Continúa Tabla 8.

SSR	Bandas poliméricas					DDS	DDM	Mapeados	Grupo de Ligamiento 30BG	Grupo de Ligamiento 45BG
	Total	DS	DD	DT	d					
SSR739	3	1	1	0	0	0	1	1	13	-
SSR762	3	0	0	0	0	3	0	1	16	-
SSR763	2	1	0	0	0	1	0	1	-	7
SSR798	1	1	0	0	0	0	0		-	-
SSR917	3	2	0	0	0	1	0	2	-	2-3
SSR940	4	2	1	0	0	0	1	2	1-2	-
SSR969	4	0	3	0	0	1	0	1	13	-
SSR984	2	2	0	0	0	0	0	1	13	-
SSR245B	4	1	3	0	0	0	0		-	-
SSR255F1	6	3	1	0	0	1	1	4	6-7	5-6
E33_M38	22	10	7	0	2	1	2	8	12-14-15-18-19	15
E38_M38	19	7	6	0	0	4	2	11	5-12-14-15-18-19-25	15
E38_M45	20	8	6	0	2	3	1	5	6-16-17-28-29	14
E44_M32	15	7	3	1	4	0	0	4	3-16-21	-
E45_M38	14	8	2	0	1	2	1	11	8-10-13-21-28-29	4-13-14-16
IT14	4	3	0	0	1	0	0	1	22	-
IT2	3	3	0	0	0	0	0		-	-
IT3	2	1	0	0	0	1	0	1	-	1
IT4	3	1	0	1	0	1	0		-	-
IT6	3	1	0	0	0	1	1		-	-
IT7	1	1	0	0	0	0	0		-	-
IT8	1	1	0	0	0	0	0		-	-
IT9	2	1	0	0	0	1	0	2	6-7	6
ANS3	3	1	0	0	0	1	1	2	26-27	13
CHI3	3	1	0	0	0	0	2		-	-
CHI5	1	1	0	0	0	0	0	1	24	-
CHY3	3	1	0	0	0	1	1	1	-	4
DFR	3	2	0	0	0	1	0	3	9-10	9-10
DFRE	4	2	0	0	0	2	0	4	9-10	9-10
F3H1	2	0	1	0	0	0	1	1	-	4
F3H3	4	2	0	0	0	0	2	2	15	3
IPP7	3	2	0	0	1	0	0		-	-
PSY1	4	2	0	0	0	1	1	1	-	-
UF3GT	1	0	0	0	0	1	0		-	-
Total	278	124	63	3	17	36	35	109		

2.1 Mapa del parental 30BG

El mapa marco del parental 30BG consistió en 48 marcadores simple dosis (60%) asignados a 20 grupos de ligamiento. La adición de marcadores biparentales al análisis permitió obtener 3 nuevos grupos de ligamiento entre marcadores de dosis simples no mapeados anteriormente y marcadores biparentales, además se conformaron 5 grupos de ligamiento conformados exclusivamente con marcadores biparentales.

El análisis de ligamiento se extendió finalmente a marcadores de dosis doble. Para esto se realizaron los cálculos detallados en materiales y métodos y permitió analizar el ligamiento entre marcadores doble dosis/simple dosis y doble dosis/doble dosis.

De los 32 marcadores doble dosis (DD) (AAaaaa x aaaaaa), 13 (40.6%) fueron adicionados al mapa, sumando dos nuevos grupos conformados exclusivamente por marcadores DD, mientras que el resto se localizó en los diferentes grupos de ligamiento. Varios de los marcadores DD presentaban ligamiento con dos marcadores mapeados dentro de un mismo cromosoma, dando robustez al mismo. Si bien estos marcadores DD fueron mapeados, ninguno de ellos permitió la identificación de los grupos homólogos dado que solo fueron asignados a un único GL. Kriegner *et al.* 2003 logra ordenar 33 y 22 grupos de ligamientos de cada padre en 13 y 10 grupos homólogos, gracias a 50 alelos doble dosis mapeados simultáneamente en dos cromosomas. Los 68 marcadores doble dosis restantes solo fueron localizados en un único cromosoma.

Como vimos anteriormente, la asignación de los grupos homólogos pueden definirse a través de 3 estrategias: detección de marcadores ligados en diferentes fases, marcadores de dosis múltiples y marcadores altamente polimórficos como los SSR o RFLP. Si bien no fue posible detectar más que un único marcador ligado en repulsión y que los alelos de dosis doble fueron mapeados en un único cromosoma, los SSR y GC permitieron no solo la identificación de los cromosomas homólogos, sino que también permitieron la identificación de los posibles cromosomas homeólogos entre los parentales.

Esto requiere asumir que las diferentes bandas amplificadas corresponden a los alelos de un único locus. Si bien este acercamiento es útil para definir los homólogos, debemos tomarlos como potenciales homólogos que deben ser confirmados cuando se avance en los estudios genómicos de la especie. La presencia de diferentes marcadores con alelos múltiples o de dosis múltiples en los mismos cromosomas, podrán confirmar esta presunción.

Fue posible identificar 6 grupos de homólogos, de 3 y 2 grupos de ligamiento cada uno mediante la identificación de los diferentes alelos de locus de microsatélites (SSR). Estos junto a los marcadores

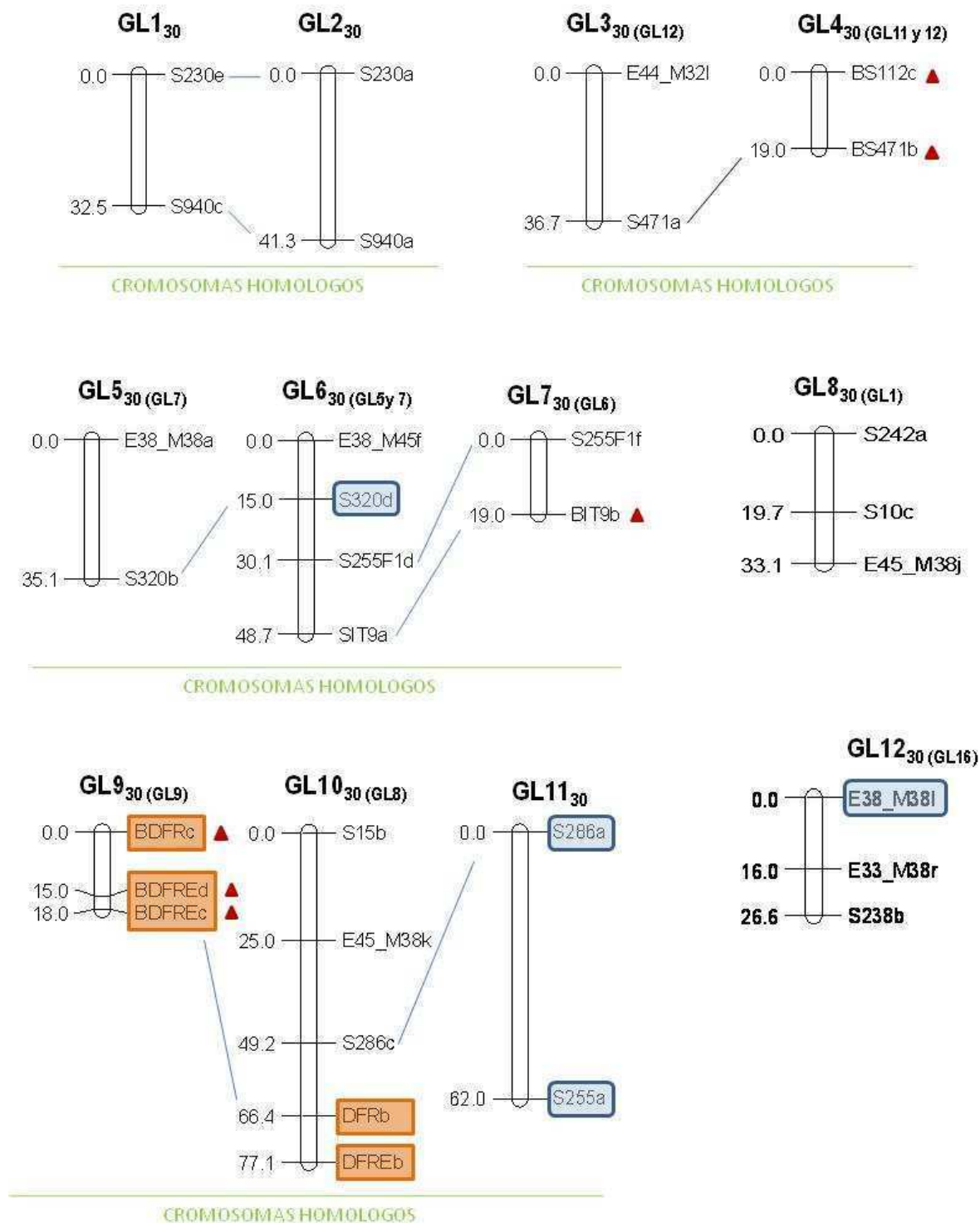
de genes candidatos también multialélicos permitieron establecer los diferentes cromosomas homólogos.

Con respecto a la eficiencia de mapeo entre los diferentes marcadores utilizados, los SSR mapeados alcanzan el 44.5% (36), los AFLP el 59.26% (32) y los genes candidatos (GC) presentan la mayor eficiencia con un 71.4% (10).

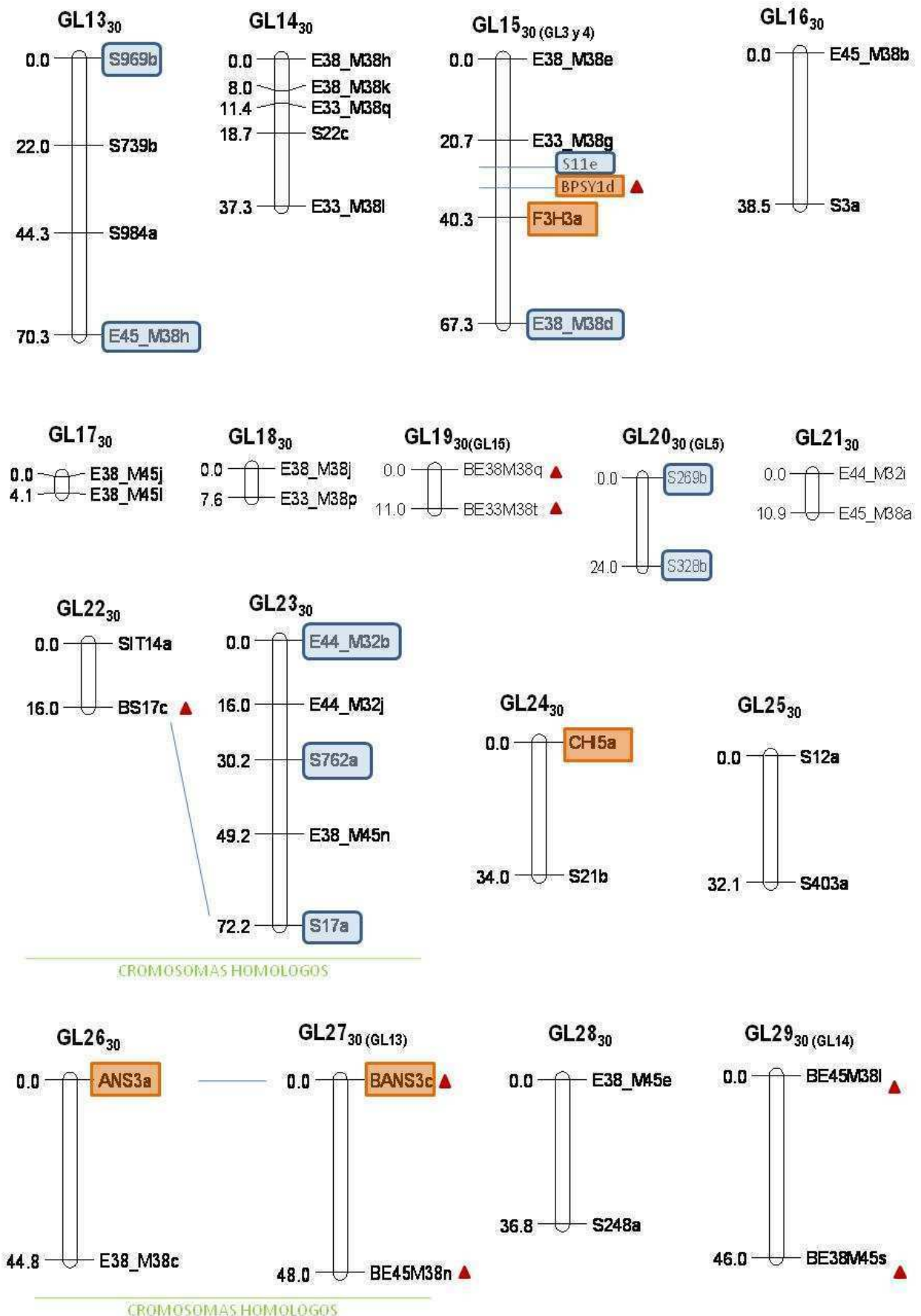
El mapa final del parental 30BG, presenta 29 grupos de ligamiento (Figura 1), denominados arbitrariamente como GL1 (por grupo de ligamiento uno) al GL29, conformado con 78 marcadores, cubriendo una distancia total de 1049.8 cM. La distancia promedio entre marcadores fue de 13.46 cM. Sesenta (60) marcadores polimórficos permanecieron sin asignarse a algunos de los grupos pre-establecidos. El tamaño de los grupos de ligamiento osciló entre 4.1 cM y 77.1 cM. Nueve GL fueron conformados con 3, 4, 5 y 6 marcadores mientras que los restantes presentaron sólo dos marcadores ligados.

En relación a los genes candidatos, fue posible localizarlos en el mapa con una alta eficiencia. Este mapa provee la primera localización de alelos pertenecientes a 5 locus relacionados con la síntesis de pigmentos en *Ipomoea batatas*: los alelos del locus Dihidroflavonol 4- reductasa (DFR), Flavonol 3- hidroxilasa (F3H), Antocianidín Sintasa (ANS) y Chalcona isomerasa (CHI), todos pertenecientes a la ruta de síntesis de antocianinas, mientras que de la ruta de síntesis de carotenos, un único alelo perteneciente al locus de la Fitoeno Sintasa (PSY) fue localizado en el mismo cromosoma que un alelo de la F3H.

Figura 1: Mapa genético del padre 30BG basado en marcadores AFLP, SSR y GC. 76 marcadores dosis simple, dosis doble (recuadro azul) y dosis doble simple (triangulo rojo). Los marcadores SSR (36) se indican con un prefijo S; los 32 AFLP con la combinación utilizada y una letra relacionada con su peso molecular; los 10 GC mapeados se marcan con sombreado naranja. Los grupos de ligamientos homólogos se indican uno al lado del otro con una línea verde y en azul los marcadores que permitieron hacer el puente entre los cromosomas. Las distancias de mapa acumuladas en cM se indican a la izquierda de cada marcador. Entre paréntesis se indica el grupo de ligamiento homólogo respecto al otro parental.



Continúa Figura 1.



2.2 Mapa del parental 45BG

Para el parental 45BG fue posible conformar 16 grupos de ligamiento con 24 marcadores simple dosis (50%). La adición de marcadores biparentales al análisis permitió obtener 2 nuevos grupos de ligamiento entre marcador de dosis simples no mapeados anteriormente y marcadores biparentales, además de los 5 grupos citados en la descripción del padre 30BG.

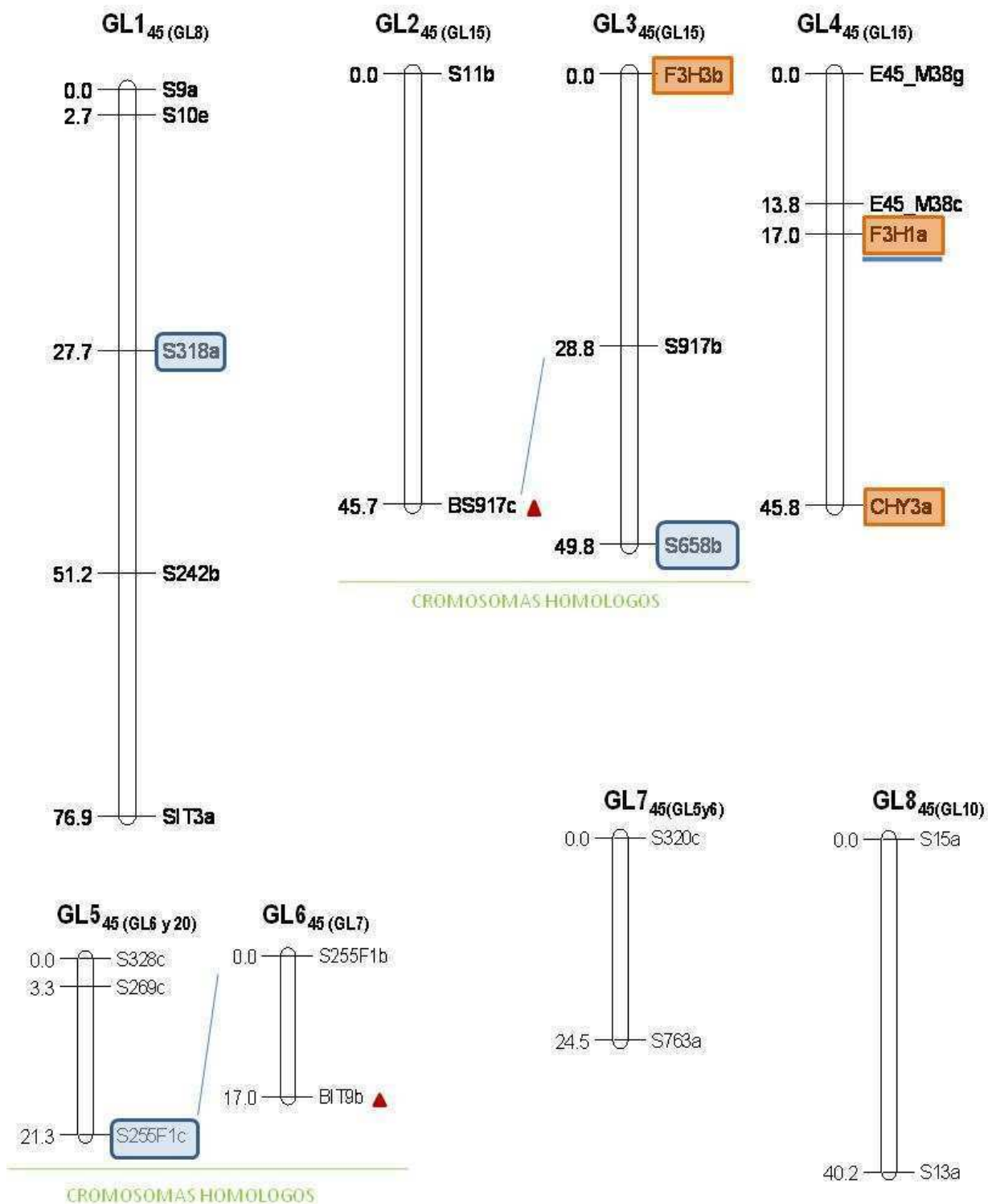
Cuando se adicionaron los marcadores de dosis doble, solo 4 de los 31 (13%) fueron adicionados al mapa ubicándose en tres diferentes grupos de ligamiento. Estos marcadores permitieron localizar grupos homólogos pero no por su condición de doble dosis, sino porque correspondían a alelos de SSR y GC. Dos grupos de homólogos fueron detectados gracias a su incorporación (Figura 2).

La eficiencia de mapeo fue más baja que la observada para el parental 30BG, esto sumado al menor número de marcadores polimórfico, trae como consecuencia que el número de grupos de ligamiento conformados sea mucho menor. Con respecto a la eficiencia de mapeo entre los diferentes marcadores utilizados, los SSR mapeados alcanzan el 34.4% (22), los AFLP el 29.4% (10) y los genes candidatos (GC) presentan la mayor eficiencia con un 60% (9). Si bien la relación se mantiene con respecto al otro padre, los porcentajes son menores, particularmente con los marcadores AFLP.

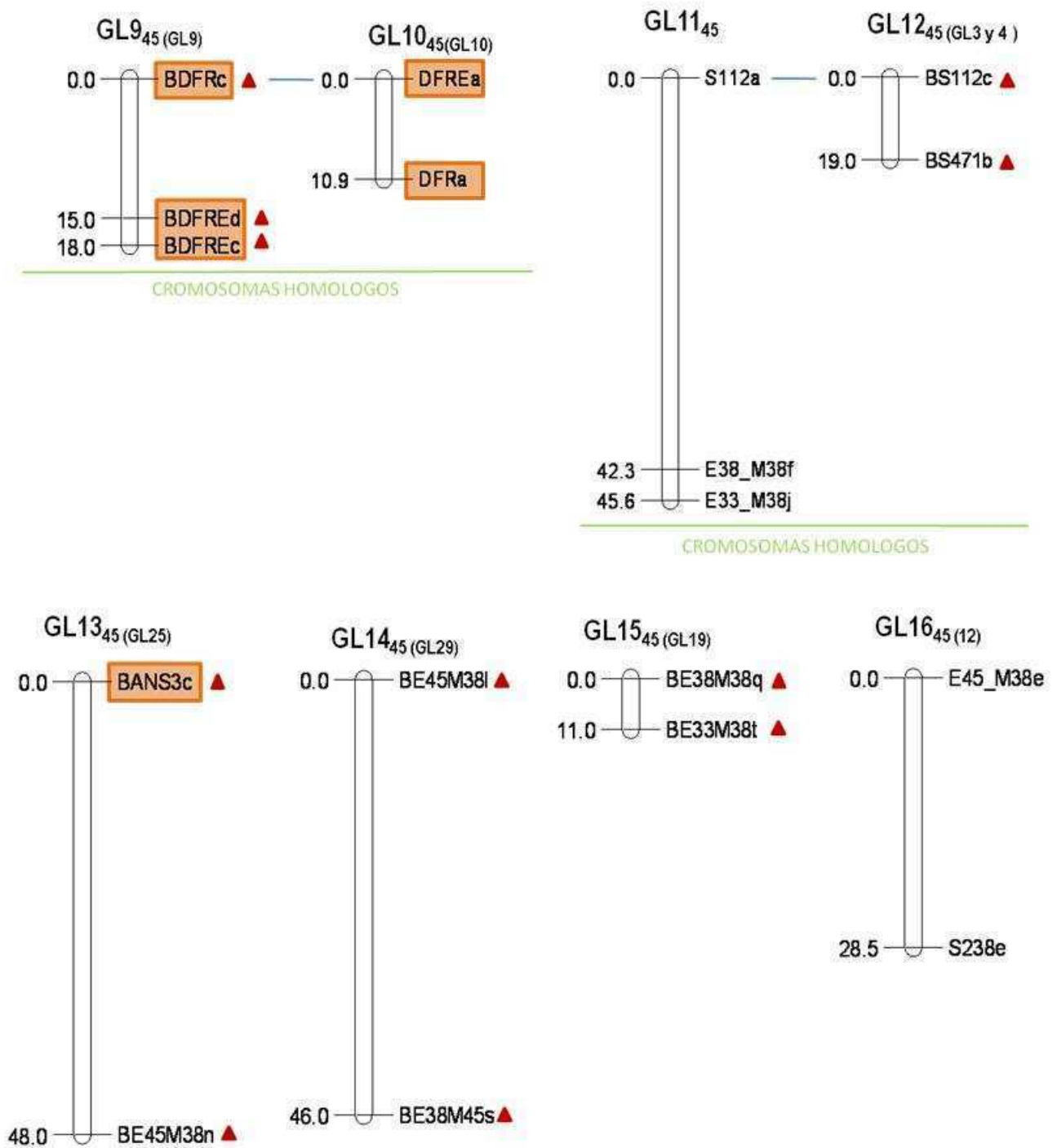
El mapa del padre 45BG considerando los marcadores dosis simple, doble y doble-simple, presenta 16 grupos de ligamiento, con 41 marcadores, se identificaron 4 grupos de cromosomas homólogos, con dos cromosomas cada grupo. La distancia promedio de los marcadores fue de 13.4cM, mientras que la distancia total cubierta alcanzó los 548.2cM. El 66.3% de los marcadores polimórficos quedaron sin ligar. El tamaño promedio de los grupos de ligamiento es de 34.3cM, con un mínimo de 10.9cM y un máximo de 76.9cM.

Los genes candidatos que fueron posible localizar en el mapa fueron: F3H1 y F3H3, correspondientes a dos intrones del gen Flavonol 3'hidroxilasa; el CHY3a (β -Caroteno Hidroxilasa) de la ruta de síntesis de los carotenoides, ubicado en el mismo grupo que el F3H1. Además el grupo de ligamiento GL10 presenta ligados los alelos DFRa y DFREa, al igual que en el padre 30BG, manteniendo inclusive la misma distancia.

Figura 2: Mapa genético del padre 45BG basado en marcadores AFLP, SSR y GC. Incluyen un total de 41 de dosis simple, dosis doble (recuadro azul) y dosis doble simple (triángulo rojo). Los marcadores SSR (18) se indican con un prefijo S; los 5 AFLP con la combinación utilizada y una letra relacionada con su peso molecular; los 5 GC mapeados se marcan con sombreado naranja. Los grupos de ligamentos homólogos dentro de cada parental se indican uno al lado del otro con una línea verde y en azul los marcadores que permitieron hacer el puente entre los cromosomas. Las distancias de mapa acumuladas en cM se indican a la izquierda de cada marcador. Entre paréntesis se indica el grupo de ligamiento homólogo respecto al otro parental.



Continúa Figura 2.



3. Definición de los alelos SSR

Un resultado central de este trabajo de mapeo, es el avance en la caracterización de los SSR disponibles hasta el momento en la bibliografía, en cuanto a su localización cromosómica, ligamiento con otros marcadores, tasa de segregación y la identificación de los alelos de cada locus, dado que hasta ahora no hay datos para estos marcadores. En la siguiente tabla (9) se resumen aquellos locus SSR que pudieron identificarse como potenciales alelos del mismo locus.

Tabla 9. Alelos de SSR identificados como pertenecientes al mismo locus.

S230e (165pb)	S230a (185pb)
S940e (89pb)	S940a (111pb)
S471a (122pb)	BS471b (114pb)
S320b (235pb)	S320d (200pb)
S255F1d (231pb)	S255F1f (212pb)
S255F1c (232pb)	S255F1b (235pb)
SIT9a (117pb)	BIT9b (128pb)
S112a (172pb)	S112c (162pb)
S917b (157pb)	BS917c (161pb)
S286a (108pb)	S286c (96pb)
S10c (176pb)	S10e (170pb)
S242b (132pb)	S242a (134pb)

Otros alelos no pudieron confirmarse debido a que fueron mapeados únicamente un alelo del locus.

4. Mapeo de Genes Candidatos

Seis (6) genes estructurales de la síntesis de antocianinas y carotenoides fueron localizados en un mapa genético de *Ipomoea batatas*: DFR, CHI, F3H, ANS de la biosíntesis de antocianinas, mientras que PSY y CHY de la biosíntesis de carotenos.

Del gen DFR se detectaron dos alelos ligados muy cerca (10cM) en ambos parentales. Resulta relevante recordar que para analizar el gen DFR, fueron sintetizados dos pares de primers que abarcaban el intrón 2: DFR y DFRE. En los análisis de ligamientos los alelos de simple dosis de ambos marcadores aparecen ligados a 10cM. Esto refuerza la consistencia de los análisis realizados, ya que sabemos que ambos locus abarcan regiones superpuestas. De manera más detallada podemos decir que el primer DFRE amplifica una región que contiene a DFR. Por otro lado, los alelos biparentales de estos locus, se encuentran localizados en otro cromosoma. Es interesante notar que dos alelos del gen DFRE (d y c) aparecen ligados a una distancia de 3 cM, lo que estaría indicando que no son alelos del mismo locus, sino que este primer está amplificando no solo el locus de interés, sino además otra región cercana. Considerando los pesos moleculares observados de ambas bandas,

puede verse que el alelo denominado DFREc es el que se presenta más alejado al resto de los alelos, con un peso de 500pb. El análisis conjunto de los datos de ligamiento junto a la visualización de los geles, permiten proponer que este primer DFRE amplifica otra región además de la esperada.

Sería importante conocer la secuencia correspondiente a esta banda para analizar la similitud de secuencia entre el alelo DFREc con el DFR, lo que permitiría saber si es una región relacionada o no. Esto se torna relevante si se tiene en cuenta que el gen DFR es en realidad una familia génica compuesta de 3 genes (DFRA-DFRB y DFRC) ubicada en tándem (Holton & Cornish 1995). El alelo DFREc podría tratarse de un alelo de otro componente de esta familia.

Dado el desarrollo parcial del mapa, no es posible aún realizar estudios comparativos de la localización de estos genes en otras especies. Thurop *et al.* 2000 analiza la localización de 10 genes de la biosíntesis de carotenos en *Capsicum* en comparación con la localización de esos mismos genes o loci en *Lycopersicum*, Chen *et al.* 2001 realiza un trabajo similar entre *Solanum* y *Lycopersicum*. Varios de los genes analizados se localizan en la misma región en ambas especies. Estos resultados demuestran que el análisis comparativo utilizando genes candidatos puede ser útil para unir fenotipos metabólicos específicos y los loci que afectan esos fenotipos en especies relacionadas. En zanahoria (Just *et al.* 2007) 24 genes relacionados con la síntesis de carotenos fueron distribuidos en 9 grupos de ligamientos, indicando la presencia de varios genes en un mismo grupo. En nuestro trabajo, dos grupos de ligamiento (uno en cada parental) presentan alelos de dos genes candidatos: El GL4 (45BG) con el gen F3H y CHY3, mientras que el parental 30BG, el GL15 presentó el gen F3H y PSY.

5. Comparación entre los mapas parentales

Los mapas parentales presentan 12 y 13 marcadores dosis dobles-simples (biparentales), sin embargo solo uno permitió la identificación de un grupo de ligamiento homeólogo entre los dos padres. Kriegner *et al.* 2003 consigue identificar 15 grupos de ligamiento de ambos padres mediante 70 y 31 marcadores dosis doble simple o marcadores puente o biparentales. La detección de homología entre los dos mapas parentales es un importante criterio de consistencia de los mapas. En este caso, la consistencia fue dada por los marcadores SSR y GC. En varios grupos de ligamiento o co-segregación, se observó la misma asociación de marcadores en ambos padres. El ejemplo más claro está dado por el grupo de ligamiento 1 del padre 45BG (GL1₄₅) con el GL8₃₀ del padre 30BG, que comparten dos marcadores SSR (S10 y el S242).

El tamaño de ambos mapas difiere significativamente relacionado con el menor número de marcadores que fue posible mapear. El mapa del parental 30BG alcanza los 1049.8 cM mientras que

el 45BG sólo 548.2 cM, sin embargo ambos presentan la misma distancia promedio entre marcadores de 13 cM. Las diferencias en el tamaño entre los mapas parentales fue observada en varios trabajos publicados, no solo en *Ipomoea batatas* (Kriegner *et al.* 2003) sino también en *Fragaria x ananassa* (Lerceteau-Kohler *et al.* 2003), *Paspalum notatum* (Stein *et al.* 2007) y *Gossypium spp.* (Guo *et al.* 2007), relacionado con el diferente nivel de polimorfismo de cada parental en algunos casos o del tamaño del genoma en casos de cruzamientos interespecíficos.

El tamaño de los mapas desarrollados por Kriegner *et al.* 2003 alcanza los 3655 cM y 3011 cM, casi tres veces el tamaño del parental 30BG, lo que es esperable, ya que Kriegner (2003) mapea 632 y 435 marcadores AFLP. Por otro lado, Cervantes-Flores (2007) estima el tamaño del mapa en 5792 cM y 5276cM para los dos parentales, con una distancia promedio de 4.5cM entre marcadores.

Los marcadores compartidos entre ambos mapas, permitiría obtener un mapa consenso, principalmente porque contamos con SSR compartidos. Este tipo de marcadores son los más deseables para realizar mapas integrados que los AFLP por la robustez propia de los SSR. Kriegner *et al.* 2003 a pesar de contar con un alto número de marcadores compartidos, no genera un mapa consenso, aduciendo que son pocos los marcadores en común. Si bien en nuestro caso, contamos con los marcadores SSR, nuestro número es aún más limitado como para intentar esbozar un mapa emergente.

Es importante destacar que el mapa marco fue elaborado utilizando LOD entre 4 y 6, sugiriendo que los grupos de ligamiento detectados son altamente reproducible. Como señalamos más arriba, los marcadores de dosis múltiples juegan un rol importante en la identificación de los homólogos. En un hexaploide, las dosis que generan polimorfismo son sólo las de dosis simple, doble y triple. El análisis de ligamiento de los marcadores dosis doble-dosis doble, así como dosis doble-dosis simple permitió mejorar la calidad del mapa.

Si bien fueron detectados algunos marcadores dosis triples, debido a su bajo número (solo fueron detectados 3) no fueron incluidos en los análisis. Kriegner *et al.* 2003 detecta 66 marcadores que se ajustan a dosis triples (4.6% de alelos), pero tampoco son utilizados. Cervantez-Flores *et al.* 2007 localiza los marcadores de dosis dobles y triples logrando identificar el total de grupos homólogos, aunque no utiliza los marcadores biparentales. De los 4499 marcadores analizados, solo 11 ajustan a una dosis triple considerando una segregación hexasómica, un porcentaje aún menor que el detectado por Kriegner.

La proporción de marcadores simples no ligados en nuestro mapa alcanzó 36.25% y 41.5% en ambos padres, muy superior al observado en otros trabajos: 10% y 10.5% en batata (Kriegner *et al.* 2003, Cervantes-Flores *et al.* 2007), 10% en papa (Gebhardt *et al.* 1993), 15.4% y 12.9% en caña de

azúcar (Al-Janabi *et al.* 1994). Sin embargo, en un cruzamiento interespecífico entre *Salix alba* y *Salix fragilis*, presentó valores cercanos a los nuestros con 37.6% y 53.1% de marcadores dosis simple no ligados.

Es importante destacar que las combinaciones de AFLP seleccionadas para este trabajo se hicieron en base a las utilizadas por Kriegner *et al.* 2003 a fin de poder localizar nuestros marcadores, principalmente los SSR y GC en un mapa más denso. Sin embargo esto no fue posible de realizar debido a que los marcadores mapeados por Kriegner *et al.* 2003 eran mayoritariamente alelos de alto peso molecular (entre 400pb y 600pb), alelos que nosotros no detectamos. Esta diferencia en el peso de los alelos analizados se debe a las diferentes técnicas utilizadas, ya que Kriegner *et al.* 2003 utiliza una técnica radioactiva marcando uno de los primers, lo que implica que sólo se visualizan las bandas de alto y medio peso molecular, a diferencia de nosotros que trabajamos con el conjunto de bandas de tamaño intermedio. La cantidad de grupos de ligamiento detectados (29 y 16 en cada parental) es baja respecto del esperado (90). Es necesario aumentar significativamente el número de marcadores, principalmente los AFLP para generar un mapa marco más completo que permita la localización de los restantes SSR y GC.

Con respecto al mapeo de SSR, es el primer mapa en batata que localiza microsatélites. Su condición muti-alélica ha resultado sumamente importante para la localización de los cromosomas homólogos dentro de cada parental así como identificar los cromosomas homólogos entre ambos parentales. Estos marcadores co-dominantes junto a los GC, muestran una alta eficiencia para la detección de cromosomas homólogos. Fue detectado en ambos parentales ligamientos entre los mismos locus, dando mayor robustez al análisis. Los análisis de ligamiento han permitido definir que alelos pertenecen al mismo locus. La localización de la totalidad de SSR permitirá definir completamente cuales alelos pertenecen al mismo locus, permitiendo analizar la información como marcadores co-dominantes.

La identificación de cromosomas homólogos resulta de suma importancia en el análisis de mapeo genético en poliploides, principalmente porque los pares de cromosomas homólogos recombinan durante la meiosis definiendo el patrón de segregación, además es crucial para entender la constitución genómica y los mecanismos de herencia. En este sentido, los marcadores más apropiados resultan los SSR. El valor distintivo de los microsatélites radica en su naturaleza multi-alélica, su herencia co-dominante, abundancia y distribución a lo largo de todo el genoma, así como la habilidad de detectar variabilidad de secuencia mediante una simple amplificación por PCR. La detección de secuencias SSR en regiones codificantes también permite expandir esta herramienta

para el estudio de genes. Además, se ha probado que estos marcadores son altamente transferibles dentro de especies relacionadas, y frecuentemente entre especies relacionadas genéticamente. Brondani *et al.* 2002, logra identificar el total de cromosomas homólogos no sólo dentro de las dos especies estudiadas sino entre ellas (*Eucalyptus grandis* y *E.urophylla*) al agregar marcadores SSR a un mapa desarrollado previamente con marcadores RAPDs. Con 77 alelos polimórficos identifica los 11 cromosomas con sus homólogos. Por otra parte Cregan *et al.* 1999, logro organizar el total de homólogos mediante SSR en soja.

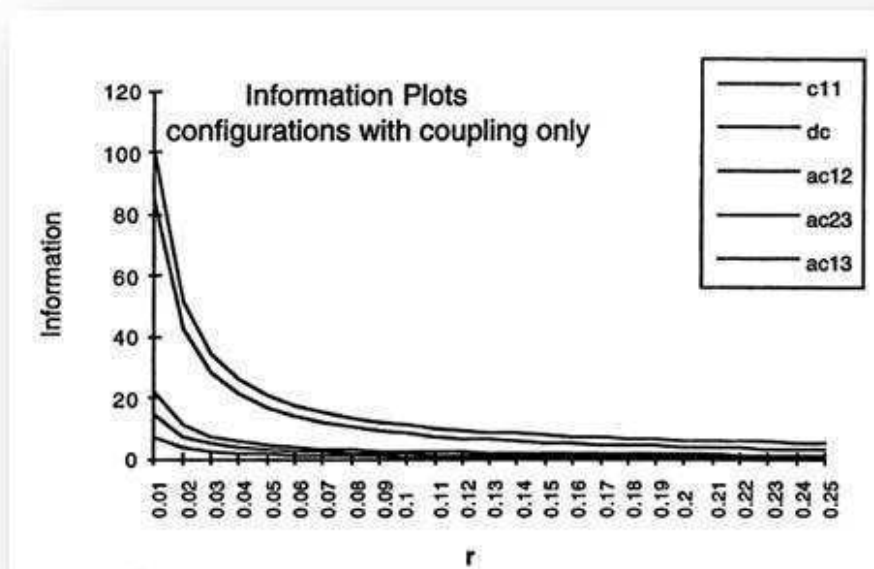
Los marcadores dominantes de segregación múltiple también resultan sumamente útiles, Kriegner *et al.* 2003, utilizando los marcadores doble dosis (DD) logró identificar 10 y 13 grupos de cromosomas homólogos (CH) para ambos parentales utilizando 101 DD. De cualquier manera, usando marcadores de dosis doble, solo es posible detectar dos de los 6 homólogos, así como el uso de marcadores de triple dosis permitiría identificar tres homólogos. En 2007, Cervantes-Flores, avanza en este aspecto con la utilización de los marcadores de dosis triples también. Ripol *et al.* 1999 calculan el mínimo número de marcadores múltiples o de alta dosis para poder identificar el total de homólogos en un octoploide, concluyen que necesitarían más de 200 para garantizar la conectividad de todos los homólogos (8 en el caso de estudio para *Saccharum spontaneum*).

Una limitante actual para avanzar en el mapeo de poliploides está relacionada con la limitada disponibilidad de herramientas bio-informáticas que permitan analizar ligamiento entre marcadores que superen los cuatro alelos por locus. Así como tampoco se encuentran disponibles programas de mapeo para poliploides que analicen las frecuencias fenotípicas y puedan calcular la frecuencia de recombinación de situaciones más complejas que tetraploides. El cálculo de la fracción de recombinación para configuraciones más complejas que un diploide lleva el diseño de algoritmos para programas estadísticos tipo R, Matlab o Fontran. Todos los cálculos realizados han partido de supuestos que no siempre se cumplen, como apareamiento al azar de cromosomas y ausencia de doble reducción. Los cálculos de segregación de los marcadores, dan indicios (visto también en otros trabajos en batata) de regiones con segregación disómica, indicativo de apareamiento preferencial entre cromosomas. Además, la presencia de multivalentes y la detección de herencia polisómica permiten pensar la posibilidad de doble reducción. Sería relevante poder avanzar en la cuantificación de estas variables, para tener un mapa que exprese de manera fiel el genoma de *Ipomoea batata* con toda su complejidad. En este camino Wu *et al.* 2004 ha comenzado a elaborar fórmulas que permiten calcular estas situaciones para tetraploides. Queda planteado ahora quien tomará este desafío para especies con mayor ploidía. Por lo pronto, en el proceso de elaboración de

resultados de esta tesis, hemos avanzado en el entendimiento de “como analizar” un genoma hexaploide, su complejidad y cuál sería la manera más eficiente de continuar.

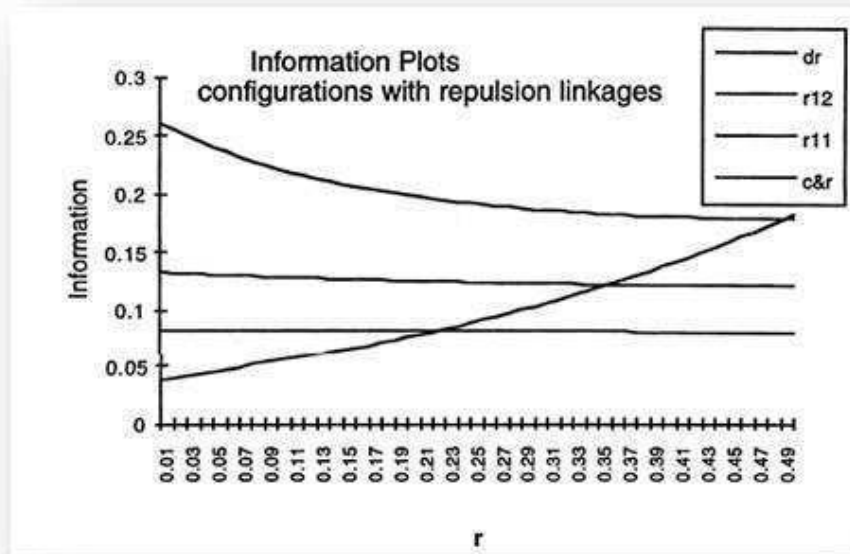
Un aspecto interesante y distintivo del mapeo con poliploides, es la necesidad de determinar la dosis de los alelos y su configuración, o sea en qué fase se encuentran. La determinación de la fase de ligamiento es un dato central, ya que la misma está relacionada con dos parámetros: Información (I) (Gráfico 8) y la varianza. En general, la información es mayor para genes fuertemente ligados en configuraciones en acoplamiento solamente. Esto se debe a que aquellos fragmentos ligados en fase de acoplamiento pueden siempre estar bajo recombinación mientras que aquellos ligados en repulsión, deben primero aparearse los cromosomas homólogos.

Gráfico 8. Información de las dosis alélicas en acoplamiento en función de la recombinación. Ripol *et al.* 1999



Para un mismo valor de r (recombinación), todas las configuraciones en acoplamiento superan ampliamente en información a aquellas en repulsión. Para un $r=0.12$, la información (I) de dos alelos en dosis simple en acoplamiento es aproximadamente 9, mientras que si estuviesen en repulsión $I=0.083$. Es interesante notar que es poca la diferencia en cantidad de información aportada por dos alelos ligados en acoplamiento de dosis simples o dosis doble. Ripol *et al.* 1999, grafica la información en relación al r para configuraciones en acoplamiento (Gráfico 8) y repulsión (Gráfico 9).

Gráfico 9. Información de las dosis alélicas en repulsión en función de la recombinación. Ripol *et al.* 1999.

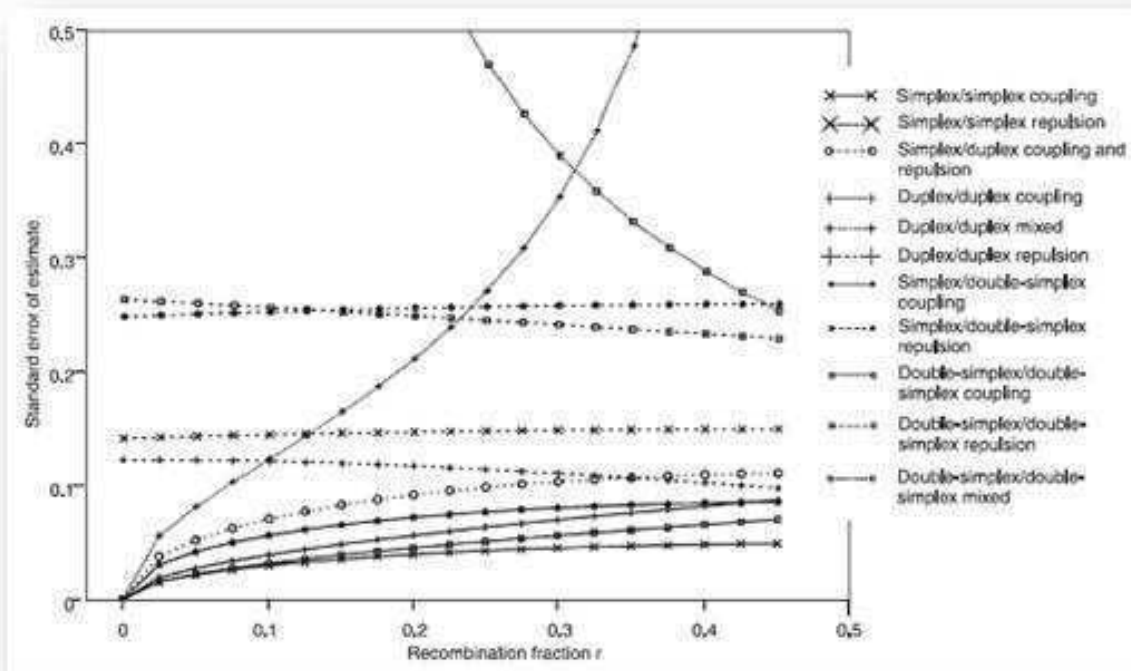


La variable I_r (información) tiene una relación inversa con la varianza de la frecuencia de recombinación r . $V(r)=1/I_r$. Por lo tanto a una mayor información de determinada configuración menor será la varianza. Meyer *et al.* (1998) presenta un gráfico de la distribución del error estándar (Gráfico 10) para la estimación de la fracción de recombinación a una población con 78 individuos. Para algunas configuraciones el error estándar estimado supera a la propia fracción de recombinación.

En una revisión de la bibliografía puede observarse que no hay consenso relacionado con el uso de marcadores ligados en fase de repulsión, ya que varios trabajos indican que no es correcta su utilización cuando se trabaja con marcadores dominantes, o cuando no se cuenta con información del grado de apareamiento preferencial, además del gran error estándar asociado a esos marcadores. Sin embargo muchos han calculado los ligamientos y establecido los grupos homólogos a través de ellos. Como en tantos otros aspectos, algunos investigadores han preferido un acercamiento al genoma aún con las limitantes o errores que puede implicar, mientras que otros han optado por un análisis más conservador.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, es que solo se han mapeado los alelos ligados en acoplamiento y que presentaban el menor error estándar: Simple/simple (AB/00/00/00/00 x 00/00/00/00/00), Simple/doble (AB/0B/00/00/00 x 00/00/00/00/00), Doble/doble (AB/AB/00/00/00 x 00/00/00/00/00), Simple/doble-simple (AB/00/00/00/00 x A0/00/00/00/00), Doble-simple/doble-simple (AB/00/00/00/00 x AB/00/00/00/00).

Gráfico 10. Distribución del error Standard para estimar la fracción de recombinación para las diferentes configuraciones y fases en una población de 78 individuos. Meyer *et al.* 1998.



A pesar del alto error estándar de algunas configuraciones, se podría evaluar a futuro si existe ligamiento entre algunos de los marcadores de dosis doble mapeados y los biparentales, para confirmar y dar mayor peso a la ubicación de algunos alelos. Las frecuencias fenotípicas y ecuaciones para estimar la frecuencia de recombinación para este caso no están calculadas en ningún trabajo hasta el momento.

5. Mapeo de QTL

Los análisis de localización de QTL se llevaron delante de manera exploratoria para las características fenotípicas relacionadas con el color visual, color objetivo y contenido de carotenos en la piel y la pulpa. Ningún QTL fue detectado en el mapa de ligamiento desarrollado con los marcadores de dosis simple en ninguno de los parentales. Esto puede ser debido a varios factores: limitado número de marcadores mapeados, el genoma hexaploide que actúa como un “buffer” debido a la cantidad de alelos por locus y una complejidad extra puede estar dada por el problema de la redundancia genética. La mayoría de los genes de la biosíntesis de antocianinas y carotenos se presentan en múltiples copias, y sortear esta redundancia para hallar los alelos o genes responsables de un fenotipo particular no parece tarea fácil. Raboin *et al.* 2006 plantea la

importancia de desarrollar un mapa saturado para ser capaz de localizar de manera eficiente genes mayores o factores Mendelianos involucrados en QTL. Además plantea el gran desafío de mapear QTL en especies como caña de azúcar donde muchos alelos coexisten en cada locus debido a la alta poliploidía. Para un locus particular, el efecto de un alelo puede ser perceptible solo si excede el promedio del efecto del resto de los alelos segregando en un determinado fondo genético, pero no, como ocurre en diploides, si ese efecto simplemente excede el otro alelo simple alternativo.

Varios trabajos informan que si bien han podido localizar QTLs y genes candidatos en mapas de ligamientos, en muchos casos estos no co-localizan. Harel-Beja *et al.* 2010 logra la localización de más de 30 genes de las rutas metabólicas de carotenos y azúcares en Melón, así como la localización de QTL del color de la pulpa que co-localizan con QTL del contenido de carotenos. Sin embargo ninguno mapeo dentro de las regiones donde fueron detectados los QTL. También Liu *et al.* 2003 localiza 16 QTL que modifican la intensidad del color rojo en tomate y 23 loci de la ruta de biosíntesis de carotenos, pero solo 5 QTL cosegrega con genes candidatos.

En *Ipomoea batatas*, un único trabajo de tesis publica la detección de QTL para Resistencia al nematodo *Meloidogyne incognita* (9QTLs) y para contenido de almidón, materia seca, β -caroteno y producción de raíces (Cervantes Flores 2006).

Varios son los factores que afectan el poder de detección de los QTLs:

1. La magnitud genética de los efectos del QTL individual que hace que solo sean detectables QTLs que tienen efectos lo suficientemente grandes sobre el fenotipo como para superar el valor del umbral de significancia y la distancia existente entre QTLs ligados que contribuyen al mismo carácter. QTLs muy cercanamente ligados, distante entre sí 20 cM o menos, son detectados usualmente como un mismo QTL para los tamaños típicos de poblaciones que son utilizados en el mapeo (menor a 500 individuos) (Tanksley 1993).
2. La fuerte influencia ejercida por el ambiente sobre la expresión del carácter cuantitativo que introduce mucha fuente de error haciendo necesarias múltiples evaluaciones, replicadas a través de distintos ambientes y a lo largo del tiempo para poder así eliminar este efecto ambiental (Lindhout 2002).
3. El diseño experimental y el tamaño de la población que son utilizados en el mapeo. Cuanto mayor sea el número de individuos evaluados mayor será la precisión del mapeo y mayor la probabilidad de detectar QTLs de efectos pequeños (Tanksley 1993). Las poblaciones de mayor tamaño permiten incrementar el poder estadístico de los métodos de detección (Collard *et al.* 2005), la estimación de los efectos genéticos y los intervalos de confianza dentro de los cuales son localizados los QTLs (definidos usualmente por un valor de LOD por arriba y por debajo del valor de LOD máximo). La

importancia del tamaño poblacional para la detección de QTL ha sido enfatizado fuertemente por muchos investigadores (Collard *et al.* 2005; Doerge *et al.* 1997; Ripol *et al.* 1999; Tanksley 1993). En una especie poliploide, como batata, resulta crítica un gran tamaño poblacional para poder observar una muestra representativa de los genotipos recombinantes.

4. Los errores experimentales introducidos durante la genotipificación o la fenotipificación. Los errores en el análisis molecular o la ausencia de datos pueden afectar el orden y la distancia que presentarán los marcadores en el mapa de ligamiento pero la precisión de las evaluaciones fenotípicas es de extrema importancia, ya que de ella dependerá la precisión con la que se localice el QTL. Sólo a partir de datos fenotípicos seguros se podrá mapear de manera confiable un QTL. Los QTLs sólo pueden ser detectados para características fenotípicas que estrictamente estén segregando en la población de mapeo siendo fundamental para este aspecto la elección de los parentales. Mientras más conspicua sea la expresión del carácter entre los padres mayor será la probabilidad de identificar un QTL de importancia o de efecto significativo para el control del mismo. Se considera que dichos QTLs son mayoritarios por explicar un porcentaje importante de la variación fenotípica observada (mayor al 10%) y por ser estables a través de los distintos ambientes (detectados en una misma región y en más de una evaluación fenotípica ya sea en un ambiente determinado o bien a lo largo de distintos ambientes). En tanto, son considerados como QTLs minoritarios todos aquellos que contribuyen a explicar sólo una pequeña proporción de la variación fenotípica observada (menor al 10%) y cuya detección es altamente sensible a los distintos ambientes. Una clasificación más formal de los QTLs puede hacerse en relación al nivel de confianza o significancia que se fije para declarar su existencia como real, considerándose como QTLs significativos y altamente significativos a aquellos que son detectados con un nivel de confianza del 5 y 0,1%, respectivamente (Lander y Kruglyak 1995).

Finalmente, al igual que para la detección de cualquier asociación marcador-carácter la detección de un QTL y la estimación de su efecto genético por intermedio de un marcador debe ser validada en poblaciones independientes a la población donde fue mapeado originalmente.

Se plantea a futuro la necesidad de mejorar la calidad del mapa para la localización de regiones genómicas relacionadas con caracteres fenotípicos utilizando varias estrategias de manera conjunta: aumentando el número de marcadores mapeados, aumentando el número de progenies y los años o localidad de los ensayos fenotípicos.

Podría además, extenderse a la evaluación de la diversidad de los genes reguladores, dado la experiencia previa de Zhang *et al.* 2009 que detecta un QTL relacionado con la presencia de

antocianinas en pulpa de papas diploides que co-segrega con un regulador de la ruta homólogo al gen *an1* de *Petunia* un regulador transcripcional tipo bHLH.

Además, se podría explorar la asociación de marcadores (tanto de dosis simple cómo dosis múltiple) con características fenotípicas mediante técnicas de estadística mutivariada. El análisis discriminante (DA) es una técnica mutivariada que fue utilizada en batata por Mcharo *et al.* 2005 para la detección de asociación entre marcadores moleculares y características cuantitativas (contenido de β -caroteno y azúcares). Detectando varios marcadores AFLP que permitirían discriminar entre genotipos de alto o bajo contenido de caroteno.

Conclusiones

Se desarrollaron dos mapas de ligamiento parcial que permitió la localización de marcadores microsatélites, AFLP y genes candidatos involucrados en la síntesis de los principales pigmentos en *Ipomoea batatas*.

Fueron evaluados mediante tres métodos las diferentes hipótesis del genoma de batata, confirmándose que es un autopoliploide con apareamientos preferenciales.

Se analizó la segregación de los alelos amplificados, detectándose alelos de dosis simple así como de dosis superiores (dobles y triples) indicativo de herencia polisómica.

Se detectaron alelos con segregación disómica, acorde con la presencia de bivalentes citados en estudios citológicos.

La cantidad de alelos de dosis simples obtenidos resultó independiente del tipo de marcador utilizado.

La cantidad de alelos de dosis doble y dosis simple-doble mostró dependencia del tipo de marcador utilizado. Los alelos de DD fueron observados con mayor frecuencia en los marcadores SSR y AFLP mientras que los de dosis simple-doble en los genes candidatos.

Se desarrollaron las frecuencias genotípicas esperadas en una especie hexaploide con segregación hexasómica para alelos de dosis múltiple-simple y múltiple-múltiple.

El número de marcadores utilizados para desarrollar el mapa de *Ipomoea batatas* resultó insuficiente para cubrir todo el genoma.

El mapeo en poliploides como batata requiere de un número de marcadores y progenie mucho mayor que en genomas diploides.

Los alelos de DD no permitieron la identificación de cromosomas homólogos debido a que solo fueron localizados en un único cromosoma.

Se detectaron posibles cromosomas homólogos mediante los SSR y GC. También permitieron la identificación de cromosomas homeólogos entre parentales.

No fue posible detectar marcadores en fase de repulsión que permitieran la identificación de cromosomas homólogos.

No fue posible la detección de regiones cromosómicas asociadas a características fenotípicas.

Bibliografía

Ablett, G.A., A. Karakousis, L. Banbury, M. Cakir, T.A. Holton, P. Langridge & R.J. Henry, 2003. Application of SSR markers in the construction of Australian barley genetic maps. *Aust J Agric Res* 54: 1187–1195.

Ahn S. & S. D. Tanksley. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *PNAS* 90(17):7980-7984

Aitken K.S., Jackson P.A. & Mc Intyre C.L. 2007. Construction of a genetic linkage map for *Saccharum officinarum* incorporating both simplex and duplex markers to increase genome coverage. *Genome* 50:742-756.

Aitken K.S., Jackson P.A. & McIntyre C.L. 2005. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theoretical Applied genetics* 110:789-801

Albertini Emidio, Andrea Porceddu, Gianpiero Marconi, Gianni Barcaccia, Luca Pallottini, & Mario Falcinelli. 2003. Microsatellite-AFLP for genetic mapping of complex polyploids. *Genome* 46: 824–832

Al-Janabi S.M., Honeycutt R.J. and Sobral B.W.S. 1994. Chromosome assortment in *Saccharum*. *Theor. Appl. Genet.* 89: 959–963.

Al-Janabi S.M., Honeycutt R.J., McClelland M. and Sobral B.W.S. 1993. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* (L.) 'SES 208'. *Genetics* 134: 1249–1260.

Allard, R. W. 1956. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values of heredity. *Hilgardia*, 235-278.

Arcade A. , F. Anselin, P. Faivre Rampant, M. C. Lesage and L. E. Pâques, 2000 Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 299-307

Arizio C.M., N. Hompanera, E. Y. Suarez & M. M. 2009. Manifesto. Genotypic identification and diversity evaluation of a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L). Lam) collection using microsatellites. *Plant Genetic Resources*, Volume 7, Issue 02, Aug 2009, pp 135-138. doi: 10.1017/S147926210809847X, Published online by Cambridge University Press 10 Oct 2008

Ashley M. V., J. A. Wilk, S. M. N. Styan, K. J. Craft, K. L. Jones, K. A. Feldheim, K. S. Lewers & T. L. Ashman. 2003. High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). *Theor Appl Genet.* 107:1201–1207

Austin, D.F., 1988. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potato and related wild species. In: *Exploration, Maintenance, and Utilization of Sweet Potato Genetic Resources*. International Potato Center, Lima, Peru, pp. 27–60.

- Barcaccia G., Meneghetti S., Albertini E., Triest L. & Lucchin M. 2003. Linkage mapping in tetraploid willows: segregation of molecular markers and estimation of linkage phases support an allotetraploid structure for *Salix alba* x *Salix fragilis* interspecific hybrids. *Heredity* 90:169-180
- Bernatzky R, Tanksley SD. 1986. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112:887-898
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120:1095–1103
- Borges A., Silva I.R.Q., Rosa M.S., Bressan E.A., Spironello F.S.A. & Veasey E.A. 2006. Diversidade genética em etnovarietades de batata-doce (*Ipomoea batatas*) por meio de microssatélites (SSR). Resumos do 52º Congresso Brasileiro de Genética. Pagina: 1049.
- Brondani R.P.V., C. Brondani & D. Grattapaglia. 2002. Towards a genus-wide reference linkage map for Eucalyptus based exclusively on highly informative microsatellite markers. *Mol Genet Genomics* 267:338-347.
- Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J.B., Gale, M.D., 1997. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theoret. Appl. Genet.* 94, 557–563
- Buteler M.I. & LaBonte D.R. 2002. Microsatellite based paternity analysis in polyploid sweetpotato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 173 (3):392-396
- Buteler M.I., Jarret, R.L., & La Bonte, D.R. 1999. Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *Theoretical and Applied Genetics* 99:123-132.
- Carlier, J. D. A. Reis, , M. F. Duval, G. Coppens D'eeckenbrugge & J. M. Leitao. 2004. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. *Plant Breeding* 123(2):186-192.
- Cervantes Flores J.M. 2006. Development of a genetic linkage map and QTL analysis in Sweetpotato. Dissertation Graduate Faculty of North Carolina State University. Horticultural Science.
- Cervantes-Flores J., Craig Yencho G., Kriegner A., Pecota K.V., Faulk M.A., Mwanga O.M & Sosinski B. 2007. Development of genetic linkage map and identification of homologous linkage group in sweetpotato using multiple-dose AFLP markers. *Molecular Breeding*.
- Chang Kuang-Yi, Hsiao-Feng LO, Yung-Chang LAI, Po-Jen YAO, Kuan-Hung LIN, & Shih-Ying HWANG. 2009. Identification of quantitative trait loci associated with yield-related traits in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Botanical Studies* 50: 43-55.
- Chen Z. Jeffrey. 2007. Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annual Review of Plant Biology.* 58:377–406

- Christensen S.A., Pratt D.B., Pratt C., Nelson P.T., Stevens M.R., Jellen E.N., Coleman C.E., Fairbancks D.J., Bonifacio A. & Maughan P.J. 2007. Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers.. *Plant genetic Resources: Characterization and Utilization* 5(2):82-95
- Collard B.C.Y, M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer & E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- Connolly A.G., I.D. Godwin, M. Cooper, & I.H. DeLacy. 1994. Interpretation of Randomly amplified polymorphic DNA marker data for fingerprinting sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 88: 332-336.
- Cregan P. B., T. Jarvik, A. L. Bush, R. C. Shoemaker, K. G. Lark, A. L. Kahler, N. Kaya, T. T. VanToai, D. G. Lohnes, J. Chung, & J. E. Specht. 1999. An Integrated Genetic Linkage Map of the Soybean Genome. *Crop Sci.* 39:1464–1490
- Cuevas H. E., J. E. Staub, P. W. Simon, J. E. Zalapa & J. D. McCreight. 2008. Mapping of genetic loci that regulate quantity of beta-carotene in fruit of US Western Shipping melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* (2008) 117:1345–1359
- da Silva JA and Sorrells ME. 1996. Linkage analysis in polyploids using molecular markers. In: Jauhar P (ed) *Methods of Genome Analysis in Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 211-228.
- da Silva, J., Honeycutt, R.J., Burnquist, W., Al-Janabi, S.M., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., & Sobral, B.W.S. 1995. *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208' genetic linkage map combining RFLP and PCR-based markers. *Mol. Breed.* 1: 165–17
- da Silva, J.A.G., Sorrells, M.E., Burnquist, W.L., & Tanksley, S.D. 1993. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome*, 36: 782–791
- Deng C, Davis TM. 2001 Molecular identification of the yellow fruit color (c) locus in diploid strawberry: a candidate gene approach. *Theor Appl Genet* 2001 , 103(2-3):316-322
- Dhillon N.P.S. & Ishiki K. 1999. Genomic variation and genetic relationships in *Ipomoea* spp. *Plant Breeding* 118: 161-165.
- Edme SJ, NG Glynn & JC Comstock. 2006. Genetic segregation of microsatellite markers in *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum*. *Heredity* 97, 366–375
- Elameen A., Klemsdal S. S , Steinar Draglanda, Siri Fjellheimb & Odd Arne Rognlib. 2008. Genetic diversity in a germplasm collection of roseroot(*Rhodiola rosea*) in Norway studied by AFLP. *Biochemical Systematics and Ecology* 36(9): 706-715
- Elder.J.K. & Southern,E.M. 1987. Computer-aided analysis of one dimensional restriction fragment gels. In Bishop, M.J. and Rawhngs.C.J. (eds) *Nucleic acid sequence analysis - a practical approach*. IRL Press, Oxford, pp. 165-172.

Fabri Eliane Gomes. 2009. Diversidade genética entre acessos de batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam) avaliada através de marcadores microssatélites e descritores morfo-agronômicos. Tesis de Doctorado Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP. Brasil

Ferreira M. & Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA 218

Gardiner, J., E. Coe, S. Melia-Hancock, D. Hoisington & S. Chao, 1993. Development of a core RFLP map in maize using an immortalised F2 population. *Genetics* 134: 917–930.

Gichuki S.T., Maria Berenyi, Dapeng Zhang, Michael Hermann, Josef Schmidt, Josef Glossl & Kornel Burg. 2003. Genetic diversity in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) in relationship to geographic sources as assessed with RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50 (4):429-437.

Grant, V. 1981. *Plant Speciation*, Ed. 2. Columbia University Press, New York.

Grattapaglia, D., & Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137: 1121–1137

Grivet L. D'Hont A., Roques D., Feldmann P. & Glaszmann J.C. 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): Genome organization in a highly polyploidy and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142:987-1000.

Guo Wangzhen, Caiping Cai, Changbiao Wang, Zhiguo Han, Xianliang Song, Kai Wang, Xiaowei Niu, Cheng Wang, Keyu Lu, Ben Shi & Tianzhen Zhang. 2007. A Microsatellite-Based, Gene-Rich Linkage Map Reveals Genome Structure, Function and Evolution in *Gossypium*. *Genetics* 176: 527–541

Hackett, C.A., Bradshaw, J.E., Meyer, R.C., McNicol, J.W., Milbourne, D., and Waugh, R. 1998. Linkage analysis in tetraploid species: a simulation study. *Genet. Res. Camb.* 71: 144–154.

Haldane J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors.

Harel-Beja R., G. Tzuri, V. Portnoy, M. Lotan-Pompan, S. Lev, S. Cohen, N. Dai, L. Yeselson, A. Meir, S. E. Libhaber, E. Avisar, T. Melame, P. van Koert, H. Verbakel, R. Hofstede, H. Volpin, M. Oliver, A. Fougere, C. Stalh, J. Fauve, B. Copes, Z. Fei, J. Giovannoni, N. Ori, E. Lewinsohn, A. Sherman, J. Burger, Y. Tadmor, A. A. SchaVer & N. Katzir. 2010. A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theor Appl Genet* 121:511–533

He Guohao, C. S. Prakash, & R. L. Jarret. 1995. Analysis of genetic diversity in a sweetpotato (*Ipomoea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. *Genome* 38(5): 938–945

Hilu, K.W. 1993. Polyploidy and the evolution of domesticated plants. *Am. J. Bot.* 80: 1491–1499

Hoisington DA, Coe EH, Neuffer MG. 1988. Gene list and linkage map of maize (*Zea mays* L.). *Maize Genet Coop Newslett* 62:125

- Holton TA, Cornish EC. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 1071-1083.
- Hu Jingjie, Makoto Nakatani, Antonio Garcia Lalusin, Tatsuhito Fujimura. 2004b. New microsatellite markers developed from reported *Ipomoea trifida* sequences and their application to sweetpotato and its related wild species. *Scientia Horticulturae* 102: 375–386.
- Hu Jingjie, Makoto Nakatani, Kouichi Mizumo & Tatsuhito Fujimura. 2004. Development and characterization of microsatellite markers in sweetpotato. *Breeding Science* 54:177-188.
- Hu, J., Nakatani, M., Lalusin, A.G., Kuranouchi, T. & Fujimura, T., 2003. Genetic analysis of sweetpotato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breed. Sci.* **53**:297–304
- Huang Junchao, Harold Corke and Mei Sun. 2002. Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 541–550
- Huang, J.C. & Sun, M., 2000. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoret. Appl. Genet.* **100**:1050–1060.
- Hwang S.Y., Y.T. Tseng, y H.F. Lo. 2002. Application of simple sequence repeats in determining the genetic relationships of cultivars used in sweet potato polycross breeding in Taiwan. *Science Horticultural.* 93: 215-224.
- Hwang, S.Y., Y. T. Chou, Y. T. Tseng, H. F. Lo, L. Li, & L.F.O. Chen. 1999. Determining genetic relationship among elite cultivars used in polycross breeding of sweet potato (*Ipomoea batatas*) with RAPD analysis. *Chi. Agron. J.* 9: 185-194.
- Jackson RC. 1982. Polyploidy and diploidy: new perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. *American Journal of Botany* 69: 1512–1523.
- Jarret R.L. & Austin, D.F. 1994. Genetic diversity and systematic relationship in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 41:165-173.
- Jarret RL and Bowen N. 1994. Simple sequence repeats (SSRs) for sweetpotato germplasm characterization. *Plant Genet Resour Newsl* 100:9-11
- Jones A. 1965. Cytological observations and fertility measurements of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 86: 527–537.
- Jones A. 1967. Theoretical segregation ratios of qualitatively inherited characters for hexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *Bul. No. 1368. USDA Tech.*

- Julier B, Flajoulot S, Barre P, Cardinet G, Santoni S, Huguet T & Huyghe C. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol.* 19;3:9.
- Kam-Morgan L. N. W., B. S. Gill, & S. Muthukrishnan. 1989 DNA restriction fragment length polymorphisms: a strategy for genetic mapping of D genome of wheat. *Genome* 32:724-732
- Karakousis, A., J.P. Gustafson, K.J. Chalmers, A.R. Barr & P. Langridge, 2003. A consensus map of barley integrating SSR, RFLP, and AFLP markers. *Aust J Agric Res* 54: 1173– 1185.
- Kao CH, Zeng ZB & Teasdale RD. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152, 1203–1216.
- Kehrer R.L. 1994. A RAPD analysis of the segregation patterns in the cross of *Saccharum officinarum* (La Purple) with *Saccharum robustum* (Molokai 5829). MSc Dissertation, Brigham Young University, Salt Lake City, Utah, USA.
- Korzun V., S. Malyshev, R.A. Pickering, & A. Börner. 1999. RFLP mapping of a gene for hairy leaf sheath using a recombinant line from *Hordeum vulgare* L. × *Hordeum bulbosum* L. cross. *Genome* 42: 960–963
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172–175.
- Kriegner A. 2001. Genetic linkage mapping, determination of ploidy type, and genetic variability of hexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) – 115 Bl. University of Bodenkultur, Vienna, Austria, (Dissertation).
- Kriegner, A., Carlos Cervantes, J., Burg, K., Mwangi, R.O.M., & Zhang, D. 2003. A genetic linkage map of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] based on AFLP markers. *Mol. Breed.* 11: 169–185
- Kumagai T., Umemura Y., Baba T. and Iwanaga M. 1990. The inheritance of beta-amylase null in storage roots of sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Theor. Appl. Genet.* 79: 369–376.
- Lacape J-M, Nguyen TB, Thibivilliers S, Courtois B, Bojinov BM, Cantrell RG, Burr B, & Hau B, 2003. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* 46:612–626
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE & Newburg L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174–181
- Langridge P, Lagudah E, Holton T, Appels R, Sharp P & Chalmers K. 2001. Trends in genetic and genome analyses in wheat: A review. *Australian Journal of Agricultural Research* 52, 1043–1077.

- Lang Ya-Qin, Satoshi Yanagawa, Tsuneo Sasanuma & Tetsuo Sasakuma. 2004. Orange Fruit Color in Capsicum due to Deletion of Capsanthin-capsorubin Synthesis Gene. *Breeding Science* 54(1):33-39
- Lee Heung-Ryul, Ik-Hyun Bae, Soung-Woo Park, Hyoun-Joung Kim, Woong-Ki Min, Jung-Heon Han Ki-Taek Kim, & Byung-Dong Kim. 2008. Construction of an Integrated Pepper Map Using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC End Sequences. *Mol. Cells* 21:21-37
- Lefebvre, V., Kuntz, M., Camara, B. and Palloix, A. 1998 The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant Mol. Biol.* 36:785-789
- Lerceteau-Kohler E., G. Gurin, F. Laigret, B & Denoyes-Rothan. 2003. Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *Theor Appl Genet* 107:619–628
- Li You-Chun, Abraham B. Korol, Tzion Fahima, Avigdor Beiles & Eviatar Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453-465
- Lim G. A.C., E. G. Jewell, X. Li, T. A. Erwin, C. Love, J. Batley, G. Spangenberg & D. Edwards. 2007. A comparative map viewer integrating genetic maps for Brassica and Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 7:40
- Liu Z.-W. , R. L. Jarret, S. Kresovich and R. R. Duncan. 1995. Characterization and analysis of simple sequence repeat (SSR) loci in seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). *Theoretical and Applied Genetics* 91(1) 47-52
- Ma, X.F., K. Ross & J.P. Gustafson, 2001. Physical mapping of restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers in homoeologous groups 1 and 3 chromosomes of wheat by in situ hybridization. *Genome* 44: 401–412.
- Magoon M.L., Krishnar R. & Vijaya Bai K. 1970. Cytological evidences on the origin of sweetpotato. *Theor. Appl. Genet.* 40: 360–366.
- Masterson, J. 1994. Stomatal size in fossil plants - evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* (Washington, D.C.), 264: 421–424.
- Meyer R.C., Milbourne D., Hackett 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.
- Morchen M. Cuguen J. Michaelis G. Hanni C. y Saumitou-Laprade P. 1996. Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats en *Beta vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet* 92:326-333
- Murray M. & Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325

- Mwanga, O. M. Robert. 2001. Nature of Resistance and Response of Sweetpotato to Sweetpotato Virus Disease. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias de la Horticultura. Universidad de Carolina del Norte.
- Mwanga, R.O. M., Kriegner, A., Cervantes-Flores, J.C., Zhang, D.P., Moyer, J.W., & Yencho, G.C. 2002. Resistance to sweetpotato chlorotic stunt virus and sweetpotato feathery mottle virus is mediated by two separate recessive genes in sweetpotato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 798-806
- Okada Y., Saito A., Nasu H., Uchita S., Miyazaky C., Matsuda Y. & Murata T. 2003. The genetic relationship between japanese sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars analyzed by random amplified polymorphic DNA. *Proc. Sch.Agric. Kyushu Tokai Univ.* 22:1-7
- Paillard S, Schnurbusch T, Winzeler M, Messmer M, Sourdille P, Abderhalden O, Keller B & Schachermayr G. 2003. An integrative genetic linkage map of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.* 107 (7):1235-42.
- Paterson A., E. Lander, S. Lincoln, J. Hewitt, S. Peterson, & S. Tanksley. 1988. Resolution of Quantitative Traits into Mendelian Factors Using a Complete RFLP Linkage Map. *Nature* 335:721-726.
- Paterson A.H. 1996. Making genetic maps. In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.
- Penner, G., 1996. RAPD analysis of plant genomes, In: P.P. Jauhar (Ed.), *Methods of Genome Analysis in Plants*, pp. 251–268. CRC Press, Boca Raton.
- Procnier JD, Townley-Smith TF, Prashar S, Gray M, Kim WK, Czarnecki E, & Dyck PL. 1995. PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes Lr29 and Lr25 in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Gent Breeding* 49:87-89
- Provan J., Powell W. & Waugh R. 1996. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet* 92:1078-1084
- Qu L, & Hancock JF. 1995. Nature of 2n gamete formation and mode of inheritance in interspecific hybrids of diploid *accinium darrowii* and tetraploid *V. corymbosum*. *Theor Appl Genet* 91:1309-1315.
- Qu L., & Hancock, J.F. 2001. Detecting and mapping repulsion-phase linkage in polyploids with polysomic inheritance. *Theor. Appl. Genet.* 103: 136–143
- Raboin L. M., K. M. Oliveira, L. Lecunff, H. Telismart, D. Roques, M. Butterfield, J. Y. Hoarau & A. D'Hont. 2006. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk color and a new rust resistance gene. *Theor Appl Genet* 112: 1382–1391
- Ramsay L., M. Macaulay, S. degli Ivanissevich, K. MacLean, L. Cardle, J. Fuller, K. J. Edwards, S. Tuveesson, M. Morgante, A. Massari, E. Maestri, N. Marmiroli, T. Sjakste, M. Ganal, W. Powell, & R. Waugh. 2000. A Simple Sequence Repeat-Based Linkage Map of Barley. *Genetics* 156: 1997-2005

- Ripol, M.I., Churchill, G.A., Da Silva, J.A.G., & Sorrells, M. 1999. Statistical aspects of genetic mapping in autopolyploids. *Gene*, 235: 31–41.
- Roder Marion S., Victor Korzun, Katja Wendehake, Jens Plaschke, Marie-Helene Tixier, Philippe Leroy & Martin W. Ganal. 1998. A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* 149: 2007–2023
- Roder, M. S., J. Plaschke, S. U. König, A. Börner, & M. E. Sorrells. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246:327-333
- Rossel G., A. Kriegner & D.P. Zhang. 1999. From Latin America to Oceania: The Historic Dispersal of Sweetpotato Re-examined Using AFLP. CIP Program Report 1999 – 2000
- Sagredo B., Hinrichsen P., López H., Cubillos A. & Muñoz C. 1998. Genetic variation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Chile determined by RAPDs. *Euphytica* 101: 193-198.
- Samsampour B. Maleki Zanjani, J. K. Pallavi, Anupam Singh, A. Charpe, S. K. Gupta & K. V. Prabhu. 2010. Identification of molecular markers linked to adult plant leaf rust resistance gene Lr48 in wheat and detection of Lr48 in the Thatcher near-isogenic line with gene Lr25. *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-009-0114-2. Publisher online
- Shiotani I. & Kawase T. 1989. Genomic structure of the sweetpotato and hexaploids in *Ipomoea trifida* (HBK) DON. *Japan J. Breed.* 39: 57–66.
- Sobral B.W.S. & Honeycutt R.J. 1993. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers. *Theor. Appl. Genet* 86:105-112
- Soltis D.E. & Soltis P. S. 1995. The dynamic nature of polyploid genomes. 92: 8089-8091
- Soltis DE & Rieseberg LH. 1986. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): evidence from enzyme electrophoresis. *American Journal of Botany* 73: 310–318.
- Soltis PS. & Soltis DE. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 7051–7057.
- Srisuwan Saranya, Darasinh Sihachakr & Sonja Siljak-Yakovlev. 2006. The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science* 171:424-433.
- Stam, P., 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal* 3:739-744.
- Staub, J.E., F. Serquen & M. Gupta, 1996. Genetic markers, map construction and their application in Plant Breed. *HortScience* 31:729-741.
- Stebbins GL. 1950. Variation and evolution in plants. New York, USA: Columbia University Press.
- Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. London, UK: Addison-Wesley.

Stein J., S. C. Pessino, E. J. Martínez, M. P. Rodriguez, L. A. Siena, C. L. Quarinand & J. P. A. Ortiz. 2007. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* 20(2):153-166

Tanksley, S. D., M. W. Ganal, J. P. Prince, M. C. de Vicente, M. W. Bonierbale, P. Broun, T. M. Fulton, J. J. Giovannoni, S. Grandillo, G. B. Martin, R. Messeguer, J. C. Miller, L. Miller, A. H. Paterson, O. Pineda, M. S. Roder, R. A. Wing, W. Wu, & N. D. Young. 1992. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160.

Tanksley SD. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27, 205- 233.

Ting Y.C. & Kehr A.E. 1953. Meiotic studies in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *J. Hered.* 44: 207-211.

Tseng Y., Lo H & Hwang S., 2002. Genotyping and assessment of genetic relationships in elite polycross breeding cultivars of sweet potato in Taiwan based on SAMPL polymorphisms. *Botanical Bulletin. Academia Sinica.* 43:99-105.

Udall J. A. & Wendel J. F. 2006. Polyploidy and Crop Improvement. *The Plant Genome [A Supplement to Crop Science]* Nº 1.

Ukoskit K. & Thompson P.G. 1997. Autopolyploidy versus allopolyploidy and low-density randomly amplified polymorphic DNA linkage maps of sweetpotato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 822–828.

Varshney R. K., T. C. Marcel, L. Ramsay, J. Russell, M. S. Roder, N. Stein, R. Waugh, P. Langridge, R. E. Niks & A. Graner. 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* 114:1091–1103

Varshney RK, Graner A, & Sorrells ME. 2005 Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23:48–55

Veasey Elizabeth Ann, Aline Borges, Mariana Silva Rosa, Jurema R. Queiroz-Silva, Eduardo de Andrade Bressan & Nivaldo Peron. 2008. Genetic diversity in Brazilian sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam., Solanales, Convolvulaceae) landraces assessed with microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 3, 725-733

Vimala B. 1989. Fertility and incompatibility in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) *Ann. Agric. Res.* 10: 109-114.

Voorrips R.E., 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* 93 (1): 77-78.

Vos Pieter, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie Friters, Jerina Pot, Johan Paleman, Martin Kuiper & Marc Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414

Wang J., He G., Prakash C. S. & Lu S. 1998. Analysis of genetic diversity in Chinese sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) germplasm using DNA amplification fingerprinting. *Plant Genetic Resources Newsletter* 113: 13-16

- Williams K. J., J. M. Fisher & P. Langridge. 1994. Identification of RFLP markers linked to the cereal cyst nematode resistance gene (Cre) in wheat. *THEORETICAL AND APPLIED GENETICS* 89(7-8):927-930.
- Wu R, Chang-Xing Ma & George Casella. 2004. A Mixed Polyploid Model for Linkage Analysis in Outcrossing Tetraploids Using a Pseudo-Test Backcross Design. *Journal of Computational Biology*. 11(4):562-580.
- Wu Rongling, Maria Gallo-Meagher, Ramon C. Littell & Zhao-Bang Zeng. 2001. A General Polyploid Model for Analyzing Gene Segregation in Outcrossing Tetraploid Species. *Genetics* 159:869-882.
- Wu, K.K., Burnquist, W., Sorrells, M.E., Tew, T.L., Moore, P.H., & Tanksley, S.D. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.* 83: 294–300.
- Zhang D.P., Carbajulca D., Ojeda L., Rossel G., Mill S., Herrera C. & Ghislain M. 1999. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity in Sweetpotato Varieties from Latin America. CIP Program Report 1999-2000.
- Zhang D.P., Cervantes J., Huamán Z., Carey E. and Ghislain M. 2000. Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 659–665.
- Zhang D.P., Ghislain M., Huamán Z. Cervantes J.C. & Carey E.E. 1997. AFLP Assessment of sweet potato genetic diversity in our tropical American regions. CIP Program Report 303-310
- Zhang D.P., M. Ghislain Z., Huamán A, Golmirzaie & Hijmans R. 1998. RAPD variation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars from South America and Papua New Guinea *Genetic Resources and Crop Evolution*. 45: 271-277.
- Zhang D. P., G. Rossel, A. Kriegner & R. Hijmans. 2004. AFLP assessment of diversity in sweetpotato from Latin America and the Pacific region: Its implications on the dispersal of the crop. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 115–120
- Zhang F., Chen S., Chen F., Fang W. & Li F. 2010. A preliminary genetic linkage map of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars using RAPD, ISSR and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*. Doi:10.1016/j.scientia2010.03.028

Anexo.

Tabla de marcadores amplificados.

Locus	Microsatelite	Primers		Tamaño (pb)	Ta	Origen
		Forward	Revers			
CB330416 (SSR416)	(AT)9	ATggATCggTTTgCTCCCTC	AgTTCAACTACCTATTTgACCC	223	60°C	Hu et al. 2004
BU691865 (SSR865)	(GT)7	gCTgTgggTgTTAgATgTgC	AggATTCTCCAACgAgCACTATg	188	55°C	Hu et al. 2004
BU692763 (SSR763)	(TC)8	gggAgCggTCAAAATCATC	ATTAAGCTgAggAggCAACA	169	62°C	Hu et al. 2004
CB330471 (SSR471)	(GAA)7	CTCCATCgTTTCAgTTCgATCAC	ACAATCCACgCTCTgCTTCTCg	115	62°C	Hu et al. 2004
CB330269 (SSR269)	(GAA)8	TgCATCAAAGAAATCCAg	CAACCAACATAgCAATATCC	93	55°C	Hu et al. 2004
CB329940 (SSR940B)	(TCT)7	ATCCCTATTTCAgCTCAC	AgACCTTCACTgCCTTTCC	117	60°C	Hu et al. 2004
CB330083 (SSR083)	(AT)7	CAACAACATCTTgACCgACC	ggATgCgATAgCAATATggg	95	55°C	Hu et al. 2004
CB330917 (SSR917)	(GA)7	AgggTTTTTCTgCTgCCTCT	CCTCAACCTCAATTTCTTCTg	157	60°C	Hu et al. 2004
BU691762 (SSR762)	(AGG)7	ggCgCgAgTgATgTggAgCTg	gTgTCCACCgTCTCCAggAC	164	60°C	Hu et al. 2004
BU690969 (SSR969)	(CAC)6	CgCgATggTgAACATgCCTATg	TTCTCACTTCCCCAgAgCAACACC	118	62°C	Hu et al. 2004
BU690134 (SSR134)	(GCA)6	gAggAACTTTTACgACACAggAgg	TTgATgACgAgCACACTTgCTg	128	60°C	Hu et al. 2004
CB330694 (SSR964)	(GAA)6	AAgAAATCAAACCTgAgCg	ATCAACAGCCTTCTgCTCATC	139	55°C	Hu et al. 2004
BM878879 (SSR879)	(CGC)5	CgAAAAATggACggAggTTCAg	CggTgATCTCAAAACgTTgCC	198	60°C	Hu et al. 2004
BU692658 (SSR658)	(ACA)5	gCTTCCAgAAgTgACAACACTgC	TTTgTTCCTCggTgAgTTCAgg	119	62°C	Hu et al. 2004
BU692403 (SSR403)	(GAT)5	CTACAgCgTCTAgATATACAC	CCTAACATCTCAgCTAAg	145	55°C	Hu et al. 2004
CB330112 (SSR112)	(AAG)6	CCATCgTTTCCAgTTCgATCAg	TTGgAAgCCTTggTCCCTTC	169	55°C	Hu et al. 2004
BU690615F (SSR615)	(TC)8	AATTAGTCTATTAAGCC	AAACAGCTTGATTCCTG	106	53°C	Hu et al. 2004
BU691949F (SSR949)	(CAC)7	AGAGAAAATGGCGCACCGT	CAGATCAGAGATGACCGAAG	262	60°C	Hu et al. 2004
BU691984F (SSR984)	(TGG)6	TGGCATGCCCAAGCTTCTGG	GCGGTAGCGGTAGTGGATCA	269	60°C	Hu et al. 2004
BU692320F (SSR320)	(AT)12	GCTTACCAGCAGTTCAAGATCAAC	CCAAAATTTGTTCCAACACCTTC	165	60°C	Hu et al. 2004
BU692739F (SSR739)	(CGG)6	AGGACGGTGCCGGATTTACT	CTGCGCTGTATCGTCACATTC	125	60°C	Hu et al. 2004
BU692940F (SSR940)	(GA)13	AGGTTTTAAGCAAACTC	ATGCGATTTCTGTAGTTCT	230	55°C	Hu et al. 2004
CB330657F (SSR657)	(AG)18	TCTATCTCTCTAAAGGGGCTCGG	TGGGTGTCTCTGATCTCTTTCC	149	60°C	Hu et al. 2004
CB330798F (SSR798)	(ACT)7	TTAAATTAGATCCCCCTCCTCC	CCCATGAGAAATCATAGCATACGG	170	60°C	Hu et al. 2004
IBSSR01	(GA)14	5'CGTCACCATT AACAGCTCTGAGT G '3	5'CCATTCGCTGAGCATCTGGAAC '3	188	59°C	Hu et al. 2004
IBSSR03	(GA)12	5'TGTCATAATGGGATCAAG '3	5'TTTCGTTAATCTACATCC '3	200	50°C	Hu et al. 2004
IBSSR04	(GA)11	5'CTCCTTTGCCTCCTTTCATGC '3	5'CCTTGCCTCCCATTTTCTTCTTG '3	200	60°C	Hu et al. 2004
IBSSR05	(GA)27	5'GGGTTCAACCTTTGCTCTTAAAATC '3	5'TCATCCGCCATTTCCGTGAG '3	245	66°C	Hu et al. 2004
IBSSR06	(GA)8	5'GACCTTGTCTTTGTGCTTGAGC '3	5'CTTAGATTCCTGCACCTCGTGG '3	217	60°C	Hu et al. 2004
IBSSR07	(CT)7A(TC)4	5'TTTTCAACGACAAGCCTCTTGC '3	5'TCAAAGGTCCCGATGGAAATC '3	160	56°C	Hu et al. 2004
IBSSR08	(CT)15	5'TAGCCATAATCCTCTTCTCC '3	5'CATGGTAAGGAGTCTATCATCG '3	234	52°C	Hu et al. 2004
IBSSR09	(GAA)5(GAG)3	5'AAGTTAATCTAAGGTGGCGGG '3	5'CGTCGATTCAGTCTAATCCAATCC '3	200	58°C	Hu et al. 2004
IBSSR10	(AG)8A2(AG)7	5'ATTCTCTCTTCTATGCGTGGCC '3	5'CACACAAAAGTCCCAATCTTG '3	170	60°C	Hu et al. 2004
IBSSR11	(AC)21	5'AACTTTAGGATCCCAG '3	5'CAATCTCTATCAGAGCATAG '3	180	56°C	Hu et al. 2004
IBSSR12	(TG)7	5'CAGTGTAGTGTATGTTCTGAGC '3	5'AAATTCATTTGGAGTCTTCC '3	100	56°C	Hu et al. 2004
IBSSR13	(GA)7N(GA)14	5'GGATGTAGCAGTTAGTGCTTCTTCC '3	5'CCAAACCAATGCTGTGTTG '3	172	66°C	Hu et al. 2004
IBSSR14	(GA)9	5'CAAACCTCAGACGCCATGATG '3	5'CCCGAGGTATTTATATCACACC '3	180	66°C	Hu et al. 2004
IBSSR15	(TC)11	5'TGGAGCAGATGTTCTGGAG '3	5'GATTTGAAGCAGAGTTCATCC '3	170	65°C	Hu et al. 2004
IBSSR16	(CT)21	5'CCAAGTAATCTGCTATATGCC '3	5'TGAAAGTATCCAGGGATTCAG '3	182	55°C	Hu et al. 2004
IBSSR17	(AG)6N(AG)17	5'ACGTGCAGACTTAGCCACAC '3	5'AGGAAGCCAGATGTTGATG '3	200	56°C	Hu et al. 2004
IBSSR18	(GA)7(AG)5(GA)4	5'GATCTTGAATTAGCCAC '3	5'AGATGGATGACCGTATGC '3	100	58°C	Hu et al. 2004
IBSSR19	(CA)25	5'CGAATCAAGTCTTTGTCCAC '3	5'GGGACTGTCTTTGGGTATG '3	180	65°C	Hu et al. 2004
IBSSR20	(CT)5(TC)7	5'CCACTTCTCCTCAACTGATTGCG '3	5'TTTGAGGGATGTTGGTGTGAGG '3	270	66°C	Hu et al. 2004
IBSSR21	(CA)14	5'AAACAACCAACGGGCTTTTGC '3	5'CTCTAGGGTCGCCATAAAATCAC '3	200	65°C	Hu et al. 2004
IBSSR22	(ACA)4(AT)4	5'GGTTATCAAATGGGCGAGG '3	5'AAAGCATGAACGGGAGAGACTGCG '3	140	65°C	Hu et al. 2004
IBSSR23	(CT)14(TA)6	5'GAAAGACAAGCCAGAAAAGTCC '3	5'TTCGCTTCTCGGACACTTC '3	190	62°C	Hu et al. 2004
IBSSR24	(GA)10N(GA)5	5'CCATGCCCTCTGATTGAACG '3	5'GAACCAATGAACCTCGCCAC '3	200	66°C	Hu et al. 2004
IBSSR25	(GT)15T2(TG)9	5'TCTTGCTTCTAGTCGCTG '3	5'CCAGGTGAACCAAGTGAACCT '3	130	60°C	Hu et al. 2004
IBSSR26	(CA)13(TA)6	5'CCATTGCACATCAAAGTTG '3	5'TGACCTTGCCCTTTTCCCC '3	230	66°C	Hu et al. 2004
IBSSR27	(TA)6(CA)16(TA)3	5'GTGTTATCACATCGTTTCTG '3	5'GGCTCGTACAATTTTCAAAG '3	150	60°C	Hu et al. 2004

Continúa Tabla de marcadores amplificados

Locus	Microsatelite	Primers		Tamaño (pb)	Ta	Origen
		Forward	Revers			
IT SSR01	(TC)12	GCTCTCAATTCCCATCCAAC	TCTGCACCATCCTTCTTGG	130	66°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR02	(TA)6(TG)12	AGGTCAAGTGGTTTTGGTCTG	TGGCCCTCCAACAGCATCCC	200	64°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR03	(AT)18	AATAACTACAATGCAAGTCG	TCATCCAGGAAACAGCCAG	140	60°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR04	(AT)13	GCGTAACACATAAATGGACTG	GGAAGTTTAAAAGGTTAAGCC	200	64°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR06	(TCT)6	ACACAAAAGAGTTGATCCTCCACC	TCCGGCTCTCGAGCCTATTG	170	50°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR07	(ATT)7	CACCATACCCAATTTTACAGATGC	GATTGAATGAATGATGCGG	170	60°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR08	(AAT)3(TAA)5	CAATCTGGGAGGAATGACATC	AAGTGTGTTGAAGATCCTGCAAC	160	56°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR09	(AAAC)4	TGTGTACCTTAGGGACATAACTC	TTGGTATAGGTTAGGGCTTAGAAG	110	58°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR11	(TGCA)4	GGCTCCTTAAAAGGCAAACAC	CCCTATTCGTAATGGACTACAGC	120	65°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR12	(TTATT)4	CGTTGGTGAGTTTCCCAAACC	AAAACGACGGCGTATCTGAGGCAG	120	64°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR14	(TGTTTT)3	CTCCATTCAAACAGCGTCTC	CGGGCAATTCAGTTGACTC	150	56°C	Hu et al. 2004 b
IT SSR15	(AGATTC)3	CGAGATAACCCATTTTGTGG	ATTGTGGTGTGAGCATTGG	150	64°C	Hu et al. 2004 b
lb2-30	s/d	5' ACGCATAGGGATTGGTGAAG 3'	5' ACGGAGGATGGTTCAGTG 3'	170	60°C	Hwang et al. 2002
lb2-38	(AAT)19	5' CCAGATTATGCCCCTC 3'	5' CATTATTGTTACCATGCACACT 3'	250	58°C	Jarret et al. 1994
lb-242	(CT)3CA(CT)11	5' GCGGAACGGACGAGAAAA 3'	5' ATGGCAGAGTGAAAATGGAACA 3'	140	59°C	Buteler et al. 1999
lb2-45B	(AAT)13	5' TTGCAATACCATGATAACCC 3'	5' TGCGAACTTATTGATCCATAC 3'	100	56°C	Jarret et al. 1994
lb-248	(CT)9(CT)8	5' GAGAGGCCATTGAAGAGAA 3'	5' AAGGACCACCGTAAATCCAA 3'	189	58°C	Buteler et al. 1999
lb-255	(CT)14	5' TGGGCATTCTCATATTTGCT 3'	5' GCCACTCCAACAGCACATAA 3'	160	56°C	Buteler et al. 1999
lb-255F1	(CT)10	5' CGTCCATGCTAAAGGTGTCAA 3'	5' ATAGGGGATTGTGCGTAATTTG 3'	220	60°C	Buteler et al. 1999
lb-286	(CT)12	5' AGCCACTCCAACAGCACATA 3'	5' GGTTCCTCAATCAGCAATTC 3'	100	56°C	Buteler et al. 1999
lb-297	(CT)13	5' GCAATTTCACACACAACACG 3'	5' CCCTTCTTCCACCCTTTCA 3'	150	60°C	Buteler et al. 1999
lb-318	(CT)9C(CT)5	5' AGAACGCATGGGCATTGA 3'	5' CCCACCCTGTAAAGAAATCA 3'	120	56°C	Buteler et al. 1999
lb3-28	s/d	5' TCGCCTTTCTCTTGCACC 3'	5' CCCCTCTCTTCTACAACCCTTC 3'	120	66°C	Hwang et al. 2002
lb3-31	s/d	5' TTCCTTTCTTTCTTCCC 3'	5' ACCCAAATCCCAACTCCA 3'	240	62°C	Hwang et al. 2002
lb3-24	s/d	5' TTTGGCATGGGCCTGTATT 3'	5' GTTCTTCTGCACTGCCTGATTC 3'	s/d	Touchdown	Hwang et al. 2002
lb2-27	(CT)22	5' CACAACCCGCCAACCTCATC 3'	5' ATCCCCCCTCCCACAAGGAA 3'	240	Touchdown	Jarret et al. 1994
lb2-45A	(AAT)14	5' TAACCACGGCTGCATTA 3'	5' TAATGCAGCGTGGTTAT 3'	150	Touchdown	Jarret et al. 1994
lb2-66	(ATT)20	5' CACACCACCACCATACC 3'	5' TTGATTTTCCCTTAGGTTTGTG 3'	280	Touchdown	Jarret et al. 1994
lb-275	(CT)27	5' GAGTTCCAAAGAGAAGAGTGGAG 3'	5' AAGCCTACCCGAGAGATAACC 3'	263	Touchdown	Buteler et al. 1999
lb-316	(CT)3C(CT)8	5' CAAACGCACAACGCTGTC 3'	5' CGCGTCCCGCTTATTTAAC 3'	150	Touchdown	Buteler et al. 1999

Conclusiones generales y perspectivas

Los clones ensayados pertenecen a diferentes grupos de compatibilidad. Se detectó un clon auto-compatibile (30BG). Se observaron diferencias en el número de cruzamientos positivos entre los cruzamientos recíprocos. Se seleccionaron dos parentales segregantes para la coloración de piel y pulpa, con abundante floración, compatibles entre si y con baja similitud genética. Los parentales elegidos permitieron desarrollar una población de mapeo con 113 progenies.

Se desarrollaron 30 marcadores génicos de 12 genes relacionados con la síntesis de pigmentos. La estrategia utilizada de búsqueda de polimorfismo en la longitud de los intrones de genes candidatos permitió obtener marcadores génicos polimórficos para 8 genes de los 12 analizados. Se avanzó en el conocimiento de la estructura de los genes de interés, definiendo tamaño, posición y secuencia de exones e intrones de los genes candidatos. Se detectaron numerosos elementos móviles completos y delecionados en los intrones, muchos ya descritos en otras Ipomoeas. Los marcadores de genes candidatos presentan una alta transferibilidad hacia especies silvestres del género Ipomoea. Los marcadores desarrollados resultan aptos para el desarrollo de mapas de ligamientos y para mapeo por asociación.

La dirección en que se realiza el cruzamiento entre los clones 30BG y 45BG no afecta a las variables de color L, C, y h^a. Si bien el promedio de las variables estudiadas en la descendencia se espera sea próximo al promedio de los progenitores, la existencia de herencia transgresiva explica individuos con valores que superan a los de los padres. En la piel, el color dado por pigmentos antociánicos es parcialmente dominante sobre las otras tonalidades sin antocianinas, y en la pulpa la coloración blanco/crema es parcialmente dominante sobre la naranja. Los colores de piel y pulpa están asociados, siendo la combinación piel con antocianinas y pulpa blanco/crema la más esperada. La variable a* presenta la mayor variación a lo largo de los años en la pulpa del parental 45BG. La concentración de caroteno está fuertemente influenciada por el ambiente, por lo que se hace necesario aumentar el número de repeticiones a ensayar, ya sea en diferentes localidades o en varios años. Los caracteres siguen una distribución normal. Los datos generados permitirán su uso en la búsqueda de regiones genómicas asociadas a estos caracteres.

Se desarrollaron dos mapas de ligamiento parcial que permitió la localización de marcadores microsatélites, AFLP y genes candidatos involucrados en la síntesis de los principales pigmentos en

Ipomoea batatas. Batata se comporta como autopoliploide con apareamientos preferenciales. Se detectaron alelos de dosis simple así como de dosis superiores (dobles y triples) indicativo de herencia polisómica. Se desarrollaron las frecuencias genotípicas esperadas en una especie hexaploide con segregación hexasómica para alelos de dosis múltiple-simple y múltiple-múltiple. El número de marcadores utilizados para desarrollar el mapa de *Ipomoea batatas* resultó insuficiente para cubrir todo el genoma. Se detectaron posibles cromosomas homólogos mediante los SSR y GC. También permitieron la identificación de cromosomas homeólogos entre parentales. No fue posible la detección de regiones cromosómicas asociadas a características fenotípicas.

Los resultados obtenidos en esta tesis son un punto de partida. La detección de un genotipo autocompatible y contar con la población de mapeo segregante para el carácter autocompatibilidad, posibilita comenzar estudios relacionados con el comportamiento reproductivo de la especie. Teniendo en cuenta además que las secuencias del Locus S de *Ipomoea trifida* se encuentran disponibles en las bases de datos. El análisis de otros caracteres segregantes entre los parentales, permitirá la localización en el mapa de dichos caracteres. Para la localización de QTL será necesario saturar el mapa obtenido. Desarrollar más SSR a partir de ESTs que podrán ser localizados en el mapa en conjunto con nuevas combinaciones de AFLP permitirá alcanzar ese objetivo. Además, los ensayos de evaluación fenotípica serán repetidos en diversos ambientes o años. A partir de la gran cantidad de secuencias obtenidas en esta tesis, se podrán corroborar los SNP entre parentales a fin de detectar más marcadores polimórficos. Es necesario desarrollar más marcadores funcionales correspondientes a las rutas metabólicas de interés en aquellos que no resultaron polimórficos o no amplificaron y extenderlos hacia los genes reguladores.