

Marcadores funcionales asociados al endulzamiento inducido por frío en papas nativas de Argentina

S.L. Colman¹, M.C. Monti², S.B. Divito³, A. Digilio⁴, S.E. Feingold⁵

RESUMEN

La variabilidad alélica en el locus de invertasa *invGE/GF* y su asociación con el endulzamiento inducido por frío fue estudiada en una colección de 47 genotipos de *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Se utilizaron como marcadores dos microsatélites diseñados sobre genes del metabolismo primario: *StI002*, localizado sobre una región del gen *invGF* y *StI057*, localizado sobre el gen de la enzima de ramificación del almidón *Sbe II* y ligado genéticamente al locus *invGE/GF*, ambos en el cromosoma IX del genoma de la papa. Los genotipos de la ssp. *andigena* estudiados presentaron concentraciones variables de azúcares reductores (AR) frente al almacenamiento a baja temperatura, identificándose algunos resistentes al endulzamiento inducido por frío. Se encontraron 9 alelos para *StI002* y 10 para *StI057* en los genotipos analizados. A partir de la combinación de estos alelos en las especies tetraploides se observó una alta diversidad, dado que se diferenciaron 23 patrones electroforéticos, siendo el índice de diversidad para cada uno de los microsatélites de 0,91. Se encontraron 7 alelos de *StI002* y *StI057* asociados al contenido de AR luego del almacenamiento a baja temperatura. Dos alelos independientes (uno de cada marcador) estuvieron asociados con menores valores de AR luego del almacenamiento. Los mismos son candidatos para ser utilizados en la selección asistida por marcadores en el mejoramiento de variedades de papa con buena aptitud industrial.

Palabras clave: papa, azúcares reductores, endulzamiento por frío

Functional markers associated with cold sweetening in native potato of Argentina

ABSTRACT

The allelic variability at the invertase locus *invGE/GF* and its association with cold sweetening was studied in 47 genotypes of *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Two microsatellites, *StI002* designed on *invGF* gene of potato chromosome IX and the linked *StI057*, designed on a starch branching enzyme gene (*Sbe II*) were used as markers. Varying concentrations of reducing sugars, before and after storage at 4 °C for two weeks, were found among the studied genotypes. Nine and 10 alleles of *StI002* and *StI057* were found among the 47 genotypes, respectively. Their combination in tetraploid cultivars defined 23 electrophoretic patterns determining a diversity index of 0,91 for each marker. Seven alleles of *StI002* and *StI057* were associated with reducing sugar content. Two independent alleles (one per marker) were associated with low reducing sugar concentration after storage. These alleles are candidates for marker assisted selection of genotypes with better industrial quality.

Keys Words: potato, reducing sugar, cold sweetening

¹ Lic. Ciencias Biológicas. Becaria Doctoral de la Comisión Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

² Ing. Agrónoma. Docente de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Buenos Aires, Argentina.

³ Técnica del Laboratorio de Agrobiotecnología. Unidad Integrada, Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA INTA), Balcarce, Argentina.

⁴ Ing. Agrónoma. Banco de Germoplasma de Papa y Forrajeras. Unidad Integrada, EEA INTA, Balcarce, Argentina.

⁵ Ing. Agr. y Doctor en Ciencias Exactas y Naturales. Responsable del Laboratorio de Agrobiotecnología. Unidad Integrada, EEA INTA, Balcarce, Argentina. biotecal@balcarce.inta.gov.ar

Introducción

Una de las características requeridas para la industria de las papas fritas es un bajo contenido de azúcares reductores (AR) (Bonierbale *et al.*, 2000). Esto se debe a que durante la fritura los grupos carbonilo de los AR reaccionan con aminoácidos, dando como resultado la producción de pigmentos oscuros denominados melanoidinas. Como consecuencia, las papas fritas adquieren color oscuro, sabor amargo e inferior valor nutritivo (Chefter y Chefter, 1976). Los AR incrementan su concentración durante el proceso de endulzamiento inducido por frío, cuando los tubérculos son almacenados a temperaturas inferiores a 10°C para su conservación por periodos prolongados (Burton, 1969). El endulzamiento inducido por frío ha sido correlacionado con el incremento de la actividad de las invertasas y de las enzimas que degradan almidón (Pressey y Shaw, 1966; Zrenner *et al.*, 1996). El locus complejo de invertasa *invGE/GF*, ha sido postulado como candidato para esta característica, debido a que co-localiza con el QTL *Sug9a* para endulzamiento por frío (Menéndez *et al.*, 2002). Particularmente, ha sido encontrada una asociación entre el color de las papas fritas y variaciones naturales de *invGE/GF* (Li *et al.*, 2005).

Actualmente, existe una extensa base de datos de microsatélites que cubren una importante región del genoma de la papa, tanto en secuencias codificantes como en regiones intergénicas. En particular, el motivo microsatélite *StI002* está localizado en una región del gen *invGF*. Por otro lado, el microsatélite *StI057* está diseñado a partir de secuencias exónicas del gen de la enzima de ramificación del almidón *Sbe II* y se encuentra genéticamente ligado al locus *invGE/GF* (Feingold *et al.*, 2005). En trabajos preliminares sobre genotipos de *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* se han encontrado variaciones de *StI002* y *StI057* asociadas al color de las papas fritas en tubérculos recién cosechados y luego de ser almacenados a baja temperatura. Interesantemente, estos microsatélites en genotipos de la ssp. *andigena* presentan variantes alélicas ausentes en los genotipos de la ssp. *tuberosum*, remarcando la

potencialidad de las variedades nativas como fuente de diversidad para el mejoramiento de las variedades comerciales de papa (Colman, 2009). El objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad alélica de los microsatélites *StI002* y *StI057* en una colección de 47 genotipos de papa de la ssp. *andigena* y su contribución al endulzamiento inducido por frío.

Materiales y métodos

Se estudiaron 47 genotipos de *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* que integran la colección de nativas del Banco de Germoplasma de Papa y Forrajeras de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA INTA), Balcarce. Diez tubérculos de cada variedad (Blanca, Criolla, Tuni blanca, Collareja, Chaqueña Redonda, Moradita, Rosada, Santa María, Colorada, Overa, Tuni Morada, Cuarentona, Malgacha, Dulce, Rara Cauqueva, Collareja Larga, Chaqueña, Blanca Larga, Runa Redonda, Imilla Negra, Rosada Bola, Oquecha, Churqueña, Papa Oca), provenientes del Norte Argentino, fueron plantados en invernáculo. Luego de seis meses se cosecharon los tubérculos y se almacenaron a 4°C por dos semanas. Se determinó el contenido de AR de los tubérculos antes y después del almacenamiento, utilizando el método de Somogyi Nelson (Somogyi, 1951). Se realizó la extracción de ADN y se amplificaron por PCR con iniciadores de *StI002* y *StI057*, según lo descrito por Feingold *et al.* (2005). Los productos fueron sometidos a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y teñidos con plata. Se determinó la asociación entre la concentración de AR con las variaciones alélicas encontradas mediante el test estadístico de Kruskal Wallis.

Resultados y discusión

La concentración de AR en los tubérculos a la cosecha estuvo dentro del límite aceptable para la producción de papas fritas (2 mg/g de peso fresco, PF), con unas pocas excepciones. El incremento de AR en respuesta al almacenamiento en frío fue variado entre los genotipos ensayados, aumentando

significativamente en la mayoría de los mismos. Sin embargo, se identificaron genotipos en los cuales los niveles de AR no fueron significativamente diferentes a los valores iniciales, por lo que pueden considerarse como resistentes al endulzamiento inducido por frío. Los genotipos de la ssp. *andigena* analizados presentaron una alta variabilidad para los marcadores estudiados, dado que se

diferenciaron 23 patrones electroforéticos, siendo el índice de diversidad para ambos microsatélites de 0,91. El ligamiento de *invGF* y *SbeII* se vio reflejado en la correspondencia de los patrones electroforéticos de los genotipos para ambos microsatélites. En general, genotipos que presentaron patrones genéticos iguales tuvieron un comportamiento fenotípico similar (Figura 1).

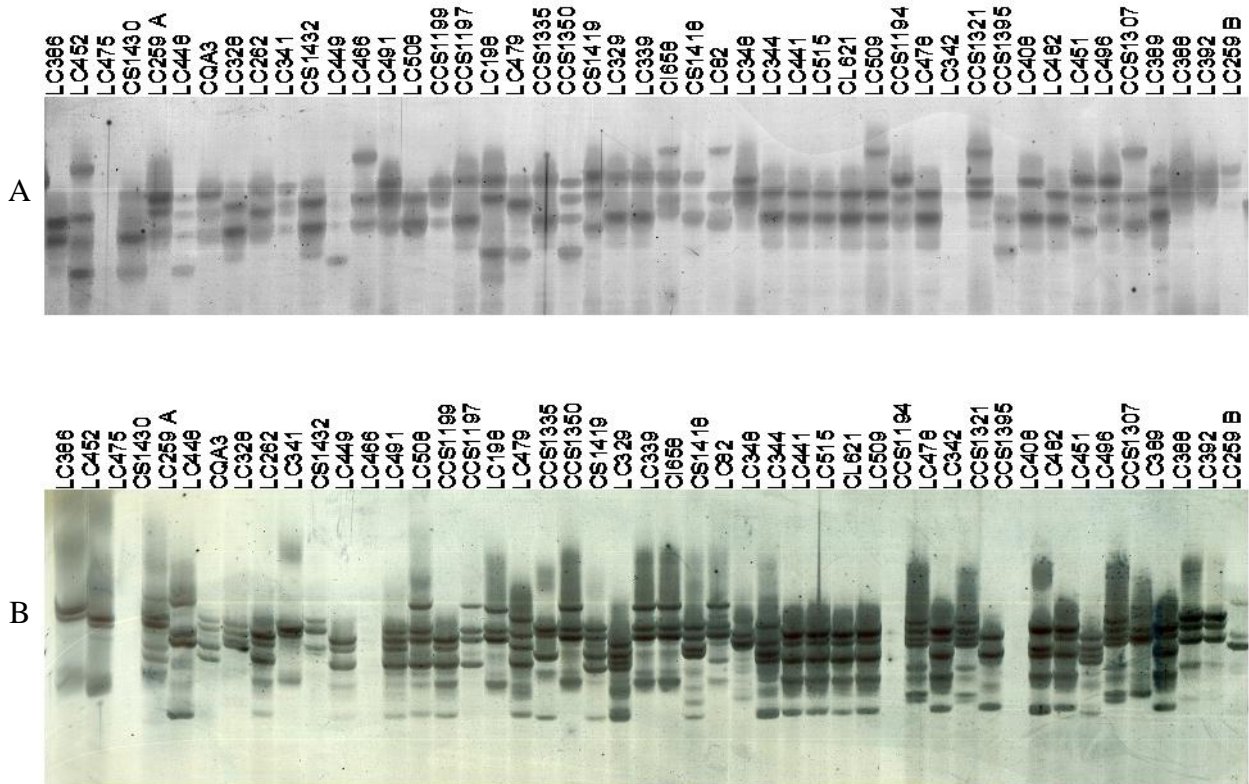


Figura 1. Variación alélica revelada por *StI002* y *StI057* en 47 genotipos de *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Electroforesis en geles de poliacrilamida de los microsatélites *StI002* (A) y *StI057*(B)

Se identificaron 9 alelos para *StI002* y 10 para *StI057* en los genotipos analizados, los cuales se corresponden a los reportados previamente por Colman (2009). De ellos, 7 (3 de *StI002* y 4 de *StI057*) estuvieron asociados al contenido de AR luego del almacenamiento a baja temperatura

(Tabla 1). Estos alelos también se asociaron a la diferencia entre el contenido de AR inicial y post-almacenamiento. Cabe destacar, que los alelos *StI002_5*, *StI057_6*, *StI057_8* y *StI057_9* también se asociaron al contenido de AR inicial de los tubérculos.

Tabla 1. Alelos asociados al contenido de azúcares reductores (AR) en tubérculos almacenados a baja temperatura

Alelo	Presencia del alelo		Ausencia del alelo		Significancia
	AR mg/g PF ^a	N° de individuos	AR mg/g PF	N° de individuos	
StI002_4	5,87	16	2,89	21	*** ^b
StI002_5	2,10	13	5,30	24	****
StI002_7	4,77	28	2,33	9	***
StI057_6	5,38	17	3,18	20	***
StI057_7	2,05	8	4,78	29	***
StI057_8	5,74	18	2,71	19	*****
StI057_9	5,56	9	3,75	28	*

^a PF: peso fresco.

^b Niveles de significancia: *: 0.1; **: 0.05; ***: 0.01; ****: 0.005; *****: 0.001; *****: 0.0005; *****: 0.0001

Conclusiones

Los genotipos de la ssp. *andigena* estudiados presentaron respuestas variables frente al almacenamiento a baja temperatura, identificándose algunos resistentes al endulzamiento inducido por frío. Se observó una alta diversidad para los genes estudiados, encontrándose alelos asociados al contenido de AR luego del almacenamiento a baja temperatura. Entre éstos, dos alelos estuvieron asociados con menores valores de AR luego del almacenamiento. Estos alelos son candidatos para ser utilizados en la selección asistida por marcadores en el mejoramiento de variedades de papa con buena aptitud industrial.

Agradecimientos

Los autores del presente trabajo agradecen por su colaboración en la realización de esta investigación a Patricia Suárez, Florencia Ialonardi y Martín Carboni. Esta investigación fue financiada parcialmente por proyectos INTA-AETA282811 “Bases bioquímicas y sensoriales para preservar y mejorar la calidad de los agroalimentos”, INTA-AERG-231221 “Conservación ex situ y valoración de las colecciones de germoplasma de la Red de Recursos Genéticos Vegetales de INTA”, “Genoma de la Papa”, Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur (PROCISUR) y el proyecto FEMCIDI-OEA: “Fortalecimiento de capacidades regionales en Biotecnología a través de la exploración y valoración del genoma de la

papa: un cultivo de las Américas” (SEDI/AE 305/07).

Literatura citada

Bonierbale, M., Amorós, W., Espinoza, J., Li, X.-Q., Walker, T. 2000. Estrategias y desafíos para el mejoramiento de papa para procesamiento. <http://www.redepapa.org>. Consulta: julio 2008. 12 p.

Burton, W.G. 1969. The sugar balance in some British potato varieties during storage. The effects of tuber age, previous storage temperature, and intermittent refrigeration upon low-temperature sweetening. *European Potato Journal* 12:81-95.

Chefter, J.C., Chefter, H. 1976. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Acribia, España. pp 291-305.

Colman, S.L. 2009. Variación alélica de invertasas y su relación con el endulzamiento inducido por frío en papa (*Solanum tuberosum* L.). Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Mar del Plata, Argentina. 63 p.

Feingold, S., Lloyd, J., Norero, N., Bonierbale, M., Lorenzen, J. 2005. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111:456–466.

Li, L., Strahwald, J., Hofferbert, H.R., Lübeck, J., Tacke, E., Junghans, H., Wunder, J.,

Gebhardt, C. 2005. DNA variation at the invertase locus *invGE/GF* is associated with tuber quality traits in populations of potato breeding clones. *Genetics* 170:813–821.

Menéndez, M.C., Ritter, E., Schafer-Pregl, R., Walkemeier, B., Kalde, A., Salamini, F., Gebhardt, C. 2002. Cold sweetening in diploid potato: mapping quantitative trait loci and candidate genes. *Genetics* 162:1423-1434.

Pressey, R., Shaw, R. 1966. Effect of temperature on invertase, invertase inhibitor, and

sugars in potato tubers. *Plant Physiology* 41:1657–1661.

Somogyi, M. 1951. Notes on sugars determinations. *The journal of Biological Chemistry* 195:19-23.

Zrenner, R., Schuler, K., Sonnewald, U. 1996. Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 198:246–252.