

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Validación de Allele Specific Primers (ASP) para el genotipado de SNP en  
como herramienta para realizar selección asistida por marcadores  
moleculares en *Solanum tuberosum***

**María del Cisne González Maldonado**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito para la obtención  
del título de: Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 04 de diciembre de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN  
CURRICULAR**

**Validación de Allele Specific Primers (ASP) para el genotipado de SNP en  
*Solanum tuberosum* como herramienta para realizar selección asistida por  
marcadores moleculares**

**María del Cisne González Maldonado**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico      María José Pozo Andrade, Ms. Sc.

Firma del profesor

\_\_\_\_\_

Quito, 04 de diciembre de 2019

**© Derechos de Autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior

Firma del Estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y Apellidos: María del Cisne González Maldonado

Código: 00125480

Cédula de Identidad: 1900520212

Lugar y fecha: Quito, 04 de diciembre de 2019

## RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum*) es el tercer cultivo más importante del mundo; la mayoría de cultivares de papa no están adaptados a las amenazas del cambio climático, situación que pone en riesgo la seguridad alimentaria.

Los recursos del germoplasma de las especies silvestres de *Solanum tuberosum* son la fuente de genes más relevante para los análisis de resistencia o susceptibilidad a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Caracterizar este germoplasma ha sido posible gracias a herramientas genómicas que han permitido detectar los genes candidatos correlacionados con características relevantes, el estudio de la diversidad alélica y su forma de expresión fenotípica, ha logrado seleccionar las combinaciones de alelos más eficaces y el desarrollo de marcadores moleculares para esos rasgos de interés agronómico.

Características como: el peso promedio del tubérculo (ATW), daño a heladas (FD), área infectada por *Phytophthora infestans* (AUD), número de tubérculos (NT) y rendimiento (Y), fueron analizadas a nivel fenotípico en las siguientes variedades; Victoria, Libertad, Cecilia, Superchola, 11-9-172 y 12-4-145, de forma que los resultados obtenidos facilitaron la clasificación en genotipos tolerantes y susceptibles para cada uno de los caracteres. Dicha información en conjunto de los datos del banco de germoplasma, los cuales fueron utilizados para la selección de genes candidatos a través de la técnica molecular RARSeq (Restriction Site Associated RNA Sequencing), estos fueron la base para los análisis bioinformáticos realizados, y determinaron las combinaciones alélicas sugerentemente implicadas en la expresión de las características de interés, las cuales fueron utilizadas para la generación de cebadores específicos o Allele Specific Primers (ASP).

Hasta el momento, los resultados moleculares no son congruentes con el análisis fenotípico, pues no existe distinción de presencia o ausencia de bandas de alelos, implicados en la expresión de las características de interés en relación al fenotipo. Sin embargo, el estudio abre la oportunidad de seguir analizando genes posiblemente implicados en las mismas y así continuar con el desarrollo de programas de mejoramiento genético de esta especie de importancia mundial

**Palabras claves:** *Solanum tuberosum*, biótico, abiótico, RARSeq, Allele Specific Primers.

## ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum*) is the third most important crop in the world; most of potato crops are not adapted to the threats of climate change, what is risky for worldwide food security. That is why germplasm resources of wild species of *Solanum tuberosum* are the most relevant source of genes for the analysis of resistance or susceptibility to different types of biotic and abiotic stress. Characterizing this germplasm has been possible thanks to genomic tools that allows the detection of candidate genes for relevant characteristics, the study of allelic diversity and its phenotypic expression forms, to achieve the selection of the most effective allele combinations and the development of molecular markers for those traits of interest.

Characteristics such as: average tube weight (ATW), frost damage (FD), area infected by *Phytophthora infestans* (AUD), number of tubers (NT) and yield (Y), were analyzed at phenotypic level in the following varieties: Victoria, Libertad, Cecilia, Superchola, 11-9-172 and 12-4-145, these results were used to distinguish them like tolerant or susceptible for each of the characters. This information added to the germplasm bank data, was used for the selection of candidate genes through the molecular technique RARSeq (RNA sequencing associated with the restriction site), these were the basis for the bioinformatic analysis performed which determined allelic combinations suggestively involved in the expression of the characteristics of interest, so they could be used for the design of specific primers or Allele Specific Primers (ASP).

So far, the molecular results are not congruent with the phenotypic analysis because there is no distinction of presence or absence of allele bands involved in the expression of the characteristics of interest. However, the study opens the opportunity to continue analyzing genes possibly implicated in the phenotypic expression of interest, and thus continue with the development of genetic improvement programs of this species of global importance.

**Key words:** *Solanum tuberosum*, biotic, abiotic, RARSeq, Allele Specific Primers

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. Introducción</b> .....	8
1.1. <i>Solanum tuberosum</i> . Generalidades. ....	8
1.2 Herramientas de análisis molecular.....	10
1.3. Justificación.....	12
<b>2. Metodología.</b> .....	14
2.1 Selección y diseño de Allele Specific Primers (Ritter,2019). ....	14
2.2. Validación de Allele Specific Primers .....	15
2.2.3 Extracción de ADN. ....	15
2.2.4 Determinación pureza ADN. ....	15
2.2.5 Técnica de PCR.....	15
2.2.6 Electroforesis genotipado.....	17
2.2.7 Análisis de Resultados. ....	17
<b>3. Resultados:</b> .....	18
<b>4. Discusión.</b> .....	22
<b>5. Conclusiones</b> .....	25
<b>6. Referencias Bibliográficas</b> .....	27
<b>7. Anexos</b> .....	29

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Caracterización fenotípica 10 variedades de <i>Solanum tuberosum</i> . .....	14
Tabla 2. Composición reacción PCR .....	16
Tabla 3. Programa de Amplificación ASPs en Termociclador .....	16
Tabla 4. Amplificación Primer Set I para Cold Tolerance (CT) .....	18
Tabla 5. Amplificación Primer Set I para Area Under Disease (AUD) después de infección de <i>P. infestans</i> .....	18
Tabla 6. Amplificación Primer Set II para Cold Tolerance (CT) .....	19
Tabla 7. Amplificación Primer Set II para Area Under Disease (AUD) después de infección de <i>P. infestans</i> .....	19
Tabla 8. Información Alélica y Contenido Polimórfico Primers Set I.....	20
Tabla 10. Caracterización Set I ASP.....	29
Tabla 11. Caracterización Set II ASP.....	30

## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Solanum tuberosum*. Generalidades.

Según varias investigaciones recientes el origen de la papa, *Solanum tuberosum*, corresponde a la parte norte del lago Titicaca; donde el paso de diversidad de culturas andinas y los primeros agricultores, a través de la combinación de características genéticas y el entendimiento de la variabilidad ambiental lograron domesticar a la papa silvestre. Se dio lugar, entonces, a la generación de una gran colección de diferentes variedades que se han adaptado a diferentes ambientes, siendo la región andina, desde Colombia, atravesando por Ecuador, Perú, Bolivia, hasta el norte de Chile y Argentina, el territorio comprendido como centro de diversificación de la especie (Tenorio & De la Cruz, 2019). *Solanum tuberosum* es el tercer cultivo alimenticio del mundo, detrás del trigo y el arroz. Su importancia económica radica en la elevada capacidad de producción de energía, y la superioridad de sus proteínas, por unidad de superficie; el cultivo está adaptado en más de 130 países en los cuales se encuentran más de la mitad de la población mundial (Díaz, et.al. 2014).

La especie está representada por 8 especies cultivadas y aproximadamente 200 especies silvestres de amplia diversidad genética, precisamente porque el flujo genético dentro de esta especie se reporta como alto dentro de las variedades tanto cultivadas como silvestres; su número cromosómico en el gametofito corresponde a  $2n=12$ ; en cuanto al esporofito el germoplasma cultivado de los Andes está constituido por una serie poliploide  $2n=24,36,48$  y  $60$ ; además, la especie presenta una alta heterocigosidad esperada con valores entre 0,46 y 0,52 (CONABIO, 2014; Soto, 2016). La papa a nivel comercial es reproducida a través de tubérculos- semilla, pero como alternativa se lo ha hecho también por vía sexual, teniendo ambos métodos sus ventajas y desventajas. A través de la vía sexual, las papas dan

lugar a una descendencia altamente variable, y, por tanto, se considera a cada semilla genética diferente y, por tanto, el tubérculo también. El potencial de hibridación de *Solanum tuberosum* depende directamente de algunos factores como la ploidía de las variedades, además del número de balance del endospermo, la distribución geográfica, el periodo de floración y la existencia de barreras estilares de los tubos polínicos; en la mayoría de casos, los híbridos resultantes son fértiles, de descendencia altamente fértil y con introgresión hacia los parentales (Díaz, et.al. 2014).

El cultivo de papa es atacado constantemente por varios patógenos, como virus, hongos, bacterias, nemátodos y de forma particular el oomiceto *Phytophthora infestans*, causante de la enfermedad más severa del mundo, no obstante, condiciones abióticas desfavorables para el cultivo, conllevan altos costes para los agricultores (Mosquera, et.al. 2008). La zona de producción de papa, se extiende aproximadamente de 2700 a 3400 msnm, territorios caracterizados por un clima frío, sub-húmedo, con temporadas lluviosas desde mayo- junio hasta septiembre-octubre, posteriormente se da lugar a una estación seca que coincide con estaciones de frío, motivos por el cual los riesgos de heladas son altas (Biarnes & Duchenne, 1995).

Por este motivo, centros de investigación y mejoramiento de cultivos se encuentran en la ardua tarea de introducir rutinas de selección asistida por marcadores, puesto que la mayoría de rasgos importantes en la mayoría de cultivos (producción, calidad y formas de resistencia a enfermedades), son producto de la función de diferentes genes que pueden ser asociados a marcadores moleculares (Mosquera, et.al. 2008).

## 1.2 Herramientas de análisis molecular.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son cambios de un solo par de bases en el ADN de los individuos de una misma especie, los mismos que desde su descubrimiento han sido utilizados como marcadores moleculares en diferentes ensayos debido a su abundancia y estabilidad en los genomas de la mayoría de organismos, son sobre todo un recurso adecuado para el análisis de marcadores genotípicos a diferencia de otros cuantos que se usan de forma convencional (Liu, et.al. 2012).

Alabady, et.al., (2015) mencionan que el desarrollo de esta clase de marcadores moleculares requiere el uso de las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), para los cuales se han probado varios métodos de genotipado genómico, entre los que resaltan los métodos basados en la digestión de enzimas de restricción y enriquecimiento objetivo. Este último, se utiliza específicamente para descubrir SNPs a partir de datos de RNAseq estándar y los datos de captura de la secuencia objetivo, si bien es un mecanismo útil, puede resultar poco eficiente ante la presencia de transcripciones alternativas, lo que dificulta la identificación del genotipo.

En alternativa a estas deficiencias de la metodología se presenta la secuenciación de ARN asociada a sitios de restricción (RARseq) para el desarrollo de marcadores genómicos. El ARN aislado es utilizado para la generación de ADN complementario por retrotranscripción el cual es digerido por enzimas de restricción específicas, las lecturas del genoma tanto de cadena simple y como de doble cadena son ensambladas por métodos de *novo* y *reference based* de acuerdo a eficiencia y necesidades del proyecto. Algunas de las

ventajas de este método de caracterización genómica son la reducción de lecturas de regiones no codificantes del genoma, así como una mayor precisión en el genotipado de SNPs (Liu, et.al. 2012).

Bosamia, et. al (2014) señalan que los SNPs son uno de los marcadores moleculares más utilizados y más importantes dentro de la genómica, gracias a su naturaleza co-dominante, es decir nos permite identificar de forma sencilla la heterocigosidad u homocigosis presentes. El genotipado de los mismos, requiere del diseño de Primers de Alelos Específicos (Allele Specific Primer – ASP), este método se basa en el empleo de tres cebadores para la detección de cada alelo, dos de ellos son regiones flanqueantes en común y tan solo uno corresponde al primer de alelo específico, cuyo último nucleótido en el extremo 3' corresponde a cada SNP.

Por tanto, para que la ADN polimerasa extienda el cebador específico, éste debería coincidir perfectamente con el desajuste del extremo 3' del alelo inespecífico, de forma que, la amplificación se genera solamente bajo estas condiciones. Entonces, el genotipado se basa en la determinación del primer que genera un amplicón y, si bien cada ASP es un marcador dominante, un par de AS primers para ambos alelos implicados, podrían ser usados como un marcador co-dominante (Drenkard, et.al. 2000).

En la actualidad existe una gran variedad de software disponible para el diseño de primers, cada uno con cualidades y funciones diferente, sin embargo, la mayoría de ellos utilizan como fundamento el algoritmo para el cálculo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) para el primer (Bosamia, et. al, 2014).

Primer 3 es el software no comercial más utilizado para el diseño de cebadores debido a sus capacidades, entre ellas una gran flexibilidad para optimizar un amplio número de parámetros como el tamaño del producto,  $T_m$ , contenido de GC, longitud del cebador, posibilidad del dímeros en el cebador, autocomplementariedad y algunas otras, con el objetivo de obtener el mejor par de cebadores para diferentes tipos de PCR. BatchPrimer 3 es una versión mejorada cuyo objetivo es la implementación de nuevas opciones de diseño, así como aumentar la capacidad de procesamiento de secuencias largas de ADN, una de las innovaciones del software es precisamente la posibilidad de diseñar ASPs (You, et.al. 2008).

En esencia los Allele Specific Primers corresponde a una secuencia de nucleótidos en cuyo extremo 3' se encuentra el cambio de un alelo de un par de bases nitrogenadas, de manera que la amplificación corresponde a la presencia de un SNP facilitando el genotipado de secuencias importantes en especies de interés.

### **1.3. Justificación.**

La papa posee la diversidad genética más abundante entre las plantas cultivadas, las variedades silvestres de los Andes sudamericanos poseen una diversidad de características importantes como la resistencia a plagas, alto valor nutritivo y la adaptación a condiciones climáticas extremas, es por ello que el recurso genético de las mismas han permitido el desarrollo de diversos programas que permitan la introducción de estas características en líneas comerciales (FAO,2008)

No obstante, los patrones de herencia en esta especie son complejos y por ello, la creación de variedades mejoradas mediante técnicas tradicionales resulta difícil y toma largos periodos de tiempo. De allí, la necesidad de utilizar técnicas de biología molecular para ampliar los métodos tradicionales de producción de papa. La generación de marcadores de

moleculares para características de interés optimizaría la determinación de rasgos convenientes simplificando la selección de variedades mejoradas (Sonnino & Ghosh, 2008).

Este proyecto se realizó en el marco del proyecto “PapaCLIMA” de la FAO, en el cual instituciones ecuatorianas como la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) y el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en conjunto de colaboración internacional con la Universidad Agraria La Molina y el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, se han apropiado de las diferentes fases de este proyecto, desde la caracterización fenotípica y genómica de variedades sudamericanas de interés comercial de *S. tuberosum*, hasta el diseño y validación de posibles marcadores moleculares útiles en programas de mejoramiento genético de esta especie de importancia alimentaria mundial.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Selección y diseño de Allele Specific Primers (Ritter,2019).

Las combinaciones alélicas implicadas en la expresión de los rasgos de interés, son observables a través de la caracterización fenotípica realizada en algunas variedades comerciales ecuatorianas por parte del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Entre otras características de interés, son relevantes para este proyecto el análisis de los daños provocados por heladas (Cold Tolerance- CT) y el área infectada por *Phytophthora infestans* (Area Under Disease- AUD):

**Tabla 1: Caracterización fenotípica 10 variedades de *Solanum tuberosum*.**

Variedad	Características	
	Cold Tolerance (CT)	Area Under Disease (AUD)
<b>Capiro</b>	-	Susceptible
<b>Catalina</b>	-	Tolerante
<b>Cecilia</b>	Susceptible	Susceptible
<b>Superchola</b>	Tolerante	Susceptible
<b>Tushpa</b>	-	Susceptible
<b>Victoria</b>	Medianamente tolerante	Susceptible
<b>11-9-172</b>	Medianamente tolerante	Susceptible
<b>11-9-186</b>	-	Tolerante
<b>12-4-145</b>	Tolerante	Susceptible

Se analizó varios lotes de genes candidatos, provenientes tanto de literatura previa, como de los resultados obtenidos a partir de RAR Seq, cuya distinción se realizó de acuerdo a la presencia o ausencia de determinados alelos. A continuación, se registró los valores de composición alélica, los efectos de las combinaciones alélicas para cada gen candidato y, finalmente los patrones de SNPs para cada gen candidato. Aquellos genes con valores más altos de acuerdo con la caracterización fenotípica, fueron seleccionados positivamente para el diseño de ASPs. Las secuencias seleccionadas fueron procesadas en formato FASTA en el software BatchPrimer 3 obteniendo así los Allele Specific Primers a ser evaluados y validados.

## **2.2. Validación de Allele Specific Primers.**

### **2.2.3 Extracción de ADN.**

Se realizó la extracción de ADN de las 10 variedades previamente caracterizadas, para ello se utilizó el E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit de Omega Bio-tek.

### **2.2.4 Determinación pureza ADN.**

La determinación de la pureza del ADN extraído se realizó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). Se cargó en los pocillos del gel 4µl de ADN con 2µl de buffer de carga, y se corrió en la cámara Labnet a 100V por 30 minutos. La intensidad de la banda visualizada en el fotodocumentador ENDURO

### **2.2.5 Técnica de PCR**

Como parte del análisis de calidad de ADN se realizó una amplificación de la región ribosomal ITS como marcador general en filogenética de plantas. Una vez se verificó que todas las muestras de ADN eran viables, se procedió a estandarizar una reacción y programa de amplificación adecuado para los ASP seleccionados. La composición de los reactivos es

igual, sin embargo, el programa del termociclador de acuerdo al tamaño de banda esperado para cada uno de los primers.

**Tabla 2. Composición reacción PCR**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
ADN	2,00 $\mu$ l
Buffer + MgCl <sub>2</sub> (10X)	1,00 $\mu$ l
dNTP's (10mM)	0,20 $\mu$ l
BSA	1,00 $\mu$ l
DMSO	0,75 $\mu$ l
Primer F	0,30 $\mu$ l
Primer R	0,30 $\mu$ l
Dream Taq Polimerasa	0,20 $\mu$ l
Volumen total	10 $\mu$ l

**Tabla 3. Programa de Amplificación ASPs en Termociclador**

<b>Proceso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	
Denaturación inicial	95°C	5 min	
Denaturación	95°C	40 seg	35 ciclos
Annealing	60 – 62°C	0,25 min	
Elongación	72°C	0,40 seg	
Elongación final	72°C	10 min	

### **2.2.6 Electroforesis genotipado.**

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). Se cargó en los pocillos del gel la muestra completa de 10  $\mu$ l, y se corrió en la cámara Labnet a 80V por 25 minutos.

### **2.2.7 Análisis de Resultados..**

En base a los polimorfismos observados tras la electroforesis se calculó para cada ASP el Contenido de Información Polimórfica, la misma que es una medida de normatividad para el marcador genético, su valor depende del número de alelos para el locus y sus frecuencias relativas (Álvarez, 2016). Se calcula con la siguiente ecuación:

$$PIC = 1 - (p_i^2) - 2 p_i^2 p_j^2$$

Donde  $p_i \dots p_n$  corresponde a las frecuencias alélicas.

### 3. RESULTADOS

**Tabla 4. Amplificación Primer Set I para Cold Tolerance (CT)**

Locus	Allele	Size (bp)	Libertad Tolerante	Superchola Tolerante	12-4-145 Tolerante	Victoria (+/-) Tolerante	11-9-172 (+/-) Tolerante	Cecilia Susceptible
ASP6	G	63						
ASP7	T	97						
ASP8	C	91						
	T							
ASP9	A	61						
	G							
ASP10	C	59						
	T	61						
ASP11	C	63						
	T	66						
ASP12	C	99						
	G	99						

**Descripción:** ASPs correspondientes a los locus de posible incidencia en la tolerancia o susceptibilidad a daños producidos por heladas. El alelo T en el locus 7 muestra amplificación en las variedades medianamente tolerantes, en comparación a aquellas consideradas susceptibles.

**Tabla 5. Amplificación Primer Set I para Area Under Disease (AUD) después de infección de *P. infestans***

Locus	Allele	Size (bp)	Victoria Tolerante	Catalina Tolerante	11-9-186 Tolerante	Libertad Tolerante	11-9-172 Tolerante	Capiro Susceptible	Cecilia Susceptible	Superchola Susceptible	12-4-145 Susceptible	Tushpa Susceptible
ASP 18	T	44										
ASP 22	G	64										
	A	63										
ASP 27	T	65										
	C	65										
ASP 29	A	75										
	G	75										

**Descripción:** ASPs correspondientes a locus con posibles efectos en la resistencia o susceptibilidad a la infección provocada por *Phytophthora infestans*. Ninguno muestra distinción clara entre las variedades resistentes y susceptibles.

**Tabla 6. Amplificación Primer Set II para Cold Tolerance (CT)**

Locus	Allele	Size (bp)	Victoria Tolerante	Catalina Tolerante	11-9-186 Tolerante	Libertad Tolerante	11-9-172 Tolerante	Capiro Susceptible	Cecilia Susceptible	Superchola Susceptible	12-4-145 Susceptible	Tushpa Susceptible
ASP3-1	T	138										
Asp3-7	T	217										
ASP3-2	A	239										
	G	239										
ASP3-3	A	101										
	G	100										
ASP 3-4	A	135										
	C	134										
ASP3-5	A	148										
	C	148										
ASP3-9	C	212										
	T	210										

**Descripción:** ASPs correspondientes a los locus de posible incidencia en la tolerancia o susceptibilidad a daños producidos por heladas. No se muestran distinción en la amplificación entre variedades tolerantes o susceptibles.

**Tabla 7. Amplificación Primer Set II para Area Under Disease (AUD) después de infección de *P. infestans***

Locus	Allele	Size (bp)	Libertad Tolerante	Superchola Tolerante	12-4-145 Tolerante	Victoria (+/-) Tolerante	11-9-172 (+/-) Tolerante	Cecilia Susceptible
ASF3-1	C	133						
	T	133						
ASF3-3	C	201						
	T	201						
ASF3R-3	C	127						
	T	127						
ASF3-2	A	237						
ASF3-4	A	138						

**Descripción:** ASPs correspondientes a locus con posibles efectos en la resistencia o susceptibilidad a la infección provocada por *Phytophthora infestans*. Ninguno muestra distinción clara entre las variedades resistentes y susceptibles.

**Tabla 8. Información Alélica y Contenido Polimórfico Primers Set I**

Característica	Locus	Alelo	Tamaño	Np	PIC
Tolerancia a heladas (DH)	ASP 6	T	63	1	-
	ASP7	G	97	3	0,164
	ASP8	C	91	2	0,888
		T	91	1	-
	ASP9	A	61	2	0,525
		G	61	3	0,050
	ASP10	C	59	3	0,164
		T	61	2	0,497
	ASP11	C	63	1	-
		T	66	1	-
	ASP12	C	99	6	0,008
		G	99	1	-
Área infectada por <i>phytophthora infestans</i> (AUD)	ASP 18	T	44	1	-
	ASP 22	G	64	3	0,969
		A	63	4	0,034
	ASP 27	T	65	3	0,050
		C	65	1	0,749
	ASP 29	G	75	1	-
A		75	1	-	

**Descripción:** Se muestran los valores obtenidos para la información del contenido polimórfico para cada uno de los primers del Set I probados; ASP8-C, ASP22-G y ASP27-C poseen valores altos para el índice.

**Tabla 9. Información Alélica y Contenido Polimórfico Primers Set II**

Característica	Locus	Alelo	Tamaño (pb)	Np	PIC
Área infectada por <i>phytophthora infestans</i>  (AUD)	ASP3-1	T	138	3	0,499
	ASP3-7	T	217	3	0,977
	ASP3-2	A	239	1	0,448
		G	239	3	-
	ASP3-3	A	101	3	0,791
		G	100	1	-
	ASP 3-4	A	135	3	0,791
		C	134	3	0,050
	ASP3-5	A	148	1	0,525
		C	148	1	0,525
ASP3-9	C	212	4	-	
	T	210	4	0,132	
Daño por heladas  (CT)	ASF 3-1	T	91	3	0,027
		C	91	3	0,777
	ASF 3-2	A	237	1	-
	ASF 3-3	G	61	3	0,104
		A	61	3	-
	ASF 3R-3	T	61	1	0,050
		C	59	2	0,104
ASF 3-4	A	138	3	0,202	

**Descripción:** Se muestran los valores obtenidos para la información del contenido polimórfico para cada uno de los primers del Set II probados; ASP3-7-T, ASP3-3-A, ASP3-4-A y ASF3-1-C poseen valores altos para el índice.

#### 4. DISCUSIÓN

De acuerdo a la naturaleza del proyecto, la metodología establecida para la caracterización del genoma fue útil y con ventajas sobre otras para el reconocimiento de SNPs. Sin embargo, la generación de Allele Specific Primers para PCR es considerado como un método para aplicaciones de bajo rendimiento, puesto que la discriminación de alelos no es suficientemente confiable para lograr el uso de los métodos establecidos, pues cada sitio SNP específico puede generar al menos 18 posibles cebadores con un desajuste de una sola base, generándose así varias extensiones con diferentes eficiencias, y por tanto, los cebadores no muestran la especificidad alélica requerida. (Liu, et.al., 2012).

Es precisamente por este motivo que en las tablas 4, 5, 6 y 7, los patrones de amplificación para los diferentes ASP no son congruentes con la caracterización fenotípica previa. Se puede observar diferentes grados de amplificación, sin distinción entre variedades tolerantes o susceptibles al daño por heladas o la infección provocada por *P. infestans*. Solamente ASP 7 alelo T podría ser considerado como un marcador parcialmente informativo, ya que el producto amplificado de las variedades medianamente tolerantes al daño causado por heladas es distintivo de aquellas totalmente tolerantes o susceptibles.

Alternativamente, en la actualidad se presentan gran variedad de técnicas para el genotipado de SNP de alto rendimiento como Taqman, Amplifluor y matrices SNP, las desventajas de estas técnicas corresponden a sus altos costos y necesidad de equipos especializados. Para superar este problema, la metodología original para de AS-PCR se sugiere la introducción de un cambio adicional en un par de bases de la secuencia correspondiente a las últimas cuatro bases del cebador diseñado, la adición de este desajuste produce un cambio drástico en el rendimiento del producto de PCR de forma que se aumenta

la especificidad, no obstante, la amplificación del alelo específico será relativamente menor (Drenkard, et.al. 2000).

Literatura más reciente reporta la validación de un nuevo método de genotipado SNP que se basa en la AS-PCR convencional combinada con el uso de Amplifluor univesal con transferencia de energía, tras haber ensayado con nueve diferentes SNP, Myakishev, et.al. (2019) demostraron que la capacidad de obtener una amplificación casi por completo específica corresponde a la competencia creada en una reacción entre la baja concentración de los ASP y el exceso de un cebador marcado con ET, generado así una PCR con un producto más selectivo.

Debido a la carencia de especificidad en los marcadores diseñados y la naturaleza tetraploide de *Solanum tuberosum*, se pudo observar además de la amplificación del tamaño de banda esperado para los ASP diseñados, otras bandas correspondientes a las diversas formas alélicas presentes en las variedades de esta especie. Es por ello que calcular el índice de contenido polimórfico (PIC) constituye una herramienta sencilla pero sumamente útil para determinar la cantidad de información genética que puede brindar cada uno de estos marcadores moleculares, en base a la riqueza alélica de las variedades analizadas (Juyó, 2012).

Los valores para el PIC, oscilan entre 0 y 1, siendo éste último el valor máximo de información que puede brindar un marcador molecular, dentro de los ensayos realizados en este proyecto, se determinaron como altamente informativos los siguientes: ASP8-C (0.888), ASP22-G (0.969), ASP27-C (0.749), ASP3-7-T (0.977), ASP3-3-A (0.791), ASP3-4-A (0.791) y ASF3-1-C (0.777).

En otros estudios relacionados con la papa, es común el uso de marcadores microsátélites, debido a la mínima cantidad de ADN que se requiere para el análisis, así como su eficiencia para la determinación de la diversidad genética poblacional. Cadami, Veramendi & Gabriel (2013) mencionan que el mayor número de alelos únicos presentes en un buen indicador de la diversidad alélica y, por tanto, un potencial reservorio de nuevos alelos para el mejoramiento genético. De acuerdo a los valores de PIC encontrados para estos ensayos se puede observar la reducida cantidad de alelos únicos detectados por los ASP seleccionados.

Realizar genotipado para SNP en *Solanum tuberosum* es una iniciativa completamente nueva, enfocada en la preservación de la seguridad alimentaria mundial debido a la importancia del cultivo. Los resultados hasta el momento no son concluyentes respecto a la selección y validación de esta clase de marcadores moleculares en esta especie debido a la dificultad y costo que implica la utilización de métodos que permitan aumentar la especificidad de los mismos.

## 5. CONCLUSIONES

- La técnica de AS-PCR es por excelencia el método comúnmente utilizado para la validación de marcadores SNP, ésta ha sido mejorada a través de la adición de otros desajustes cercanos al alelo de interés en el extremo 3', a pesar de ello los problemas de especificidad siguen siendo recurrentes en estudios de esta naturaleza,
- Las reacciones de PCR se estandarizaron a través de prueba y error, con un gradiente de temperaturas en el termociclador y la adición de diferentes concentraciones de los adyuvantes BSA y DMSO para aumentar la especificidad de las mismas.
- Puesto que la mayoría de marcadores probados mostraban amplificación sin distinción de la caracterización fenotípica entre variedades, se procedió a realizar una edición de las fotografías de los geles de la electroforesis utilizando un filtro negativo, que permitió observar la presencia de otras bandas distintas a la de tamaño esperado y que corresponde a las diversas formas alélicas presentes para esos genes en *S. tuberosum*.
- De acuerdo a los valores de PIC obtenidos, solamente unos cuantos marcadores podrían ser utilizados como un buen indicador en la determinación de la diversidad alélica entre las variedades analizadas.
- El presente proyecto requiere de una reestructuración tanto en la selección de nuevos genes candidatos, así como en la metodología empleada para la aplicación de ASP, a fin de encontrar marcadores moleculares más eficientes para la selección de características de interés.

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo agradecer a la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) por la iniciativa y financiamiento del proyecto “PapaCLIMA” y a cada uno de sus participantes: Universidad San Francisco de Quito (USFQ) y el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Universidad Agraria La Molina y el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, puesto que sus investigaciones y aportes previos, son la base de este trabajo de integración curricular.

De manera especial al Laboratorio de biotecnología agrícola y alimentos de la USFQ, y a quienes forman parte de él, Darío Ramírez, Esteban Espinosa, Noelia Barriga y principalmente Antonio León por el apoyo, generosidad y conocimiento brindado a lo largo de este proceso.

## 6. Referencias Bibliográficas

- Álvarez, M. (2016). Evaluación de la variabilidad genética en cinco especies de mora (*Rubus* spp) mediante marcadores microsatélites SSR. Tesis de pregrado Universidad San Francisco de Quito. Quito. Recuperado el 15 de noviembre de 2019 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5695/1/126382.pdf>
- Biarnes, A., & Duchenne, T. (1995). *El manejo agronomico del cultivo de papa: un control dificil*. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de [https://www.researchgate.net/publication/32972855\\_El\\_manejo\\_agronomico\\_del\\_cultivo\\_de\\_papa\\_un\\_control\\_dificil](https://www.researchgate.net/publication/32972855_El_manejo_agronomico_del_cultivo_de_papa_un_control_dificil)
- Bosamia, T., et.al. (2014). Designing Allele Specific Primers: A Bioinformatics Approach. *AGROBIOS NEWSLETTER*.8. (5), 31-32. ISSN: 972-7027
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de de la Biodiversidad. (2014). *Solanum tuberosum*. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20914\\_sg7.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20914_sg7.pdf)
- Cadima, X., Veramendi, S. & Gabriel, J. (2013). Uso de marcadores moleculares microsatélite para el análisis de la diversidad genética de papa nativa de Bolivia. *Journal of the Selva Andina Research Society*,4, (1), 18-30. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de [http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v4n1/v4n1\\_a03.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v4n1/v4n1_a03.pdf)
- Díaz, J., et.al. (2014). Morphoagronomic evaluation of the true potato seed progenies (*Solanum tuberosum*, L.) in Cuba. *Cultivos Tropicales*. 35. 75-84. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de [https://www.researchgate.net/publication/297759619\\_Morphoagronomic\\_evaluation\\_of\\_the\\_true\\_potato\\_seed\\_progenies\\_Solanum\\_tuberosum\\_L\\_in\\_Cuba](https://www.researchgate.net/publication/297759619_Morphoagronomic_evaluation_of_the_true_potato_seed_progenies_Solanum_tuberosum_L_in_Cuba)
- Drenkard, E., et.al. (2000). A Simple Procedure for the Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms Facilitates Map-Based Cloning in Arabidopsis. *Plant Physiology*,124, 1483–1492. Recuperado el 11 15 de octubre de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539302/pdf/hw1483.pdf>
- Juyó, D. (2012). *Diversidad Genética y Estructura Poblacional en Genotipos Diploides de Papa*. Tesis de Maestría Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de <http://bdigital.unal.edu.co/9778/1/790771.2012.pdf>
- Liu, J., et.al. (2012). An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, 8, (34).doi:10.1186/1746-4811-8-34
- Myakishev, M., et.al. (2019). High-Throughput SNP Genotyping by Allele-Specific PCR with Universal Energy-Transfer-Labeled Primers. *Genome Research - CSCH PRESS*, 163-169. doi: 10.1101/gr.157901

- Sonnino, A. & Ghosh, K. (2008). *La papa y la Biotecnología*. Año Internacional de la PAPA. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/biotecnologia.html>
- Soto, J., et.al. (2013). Diversidad genética de papas nativas (*Solanum spp.*) conservadas en cultivares nativos del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 20, (3). Recuperado el 15 de octubre de 2019 de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332013000300003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332013000300003)
- Tenorio, S. & De la Cruz, M. (2019). Análisis de la diversidad de papas (*Solanum spp.*) con marcadores moleculares microsatélite de los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata (Huancavelica) y Santillana (Ayacucho). *Journal of the Selva Amazónica Research Society*, 10, (1), 4-15. Recuperado el 15 de octubre de 2019 de [http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v10n1/v10n1\\_a02.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v10n1/v10n1_a02.pdf)

## 7. Anexos

Tabla 10. Caracterización Set I ASP

Característica	Locus	Alelo	Tamaño (pb)	Secuencia	Genes Candidatos
<b>DH</b>	ASP6	G	63	F-CAGCCCATGGGTTTGATATT R - CTCTCCAAGACAGTAATCAAATGC	2-ABH1 (295BP)
	ASP7	T	97	F-T GGCAAAGAGTTTGGGTATTG R- CTTCCAAGTAAATAGACCAGCCATA	A3-Atrbo (280BP)
	ASP8	C	91	F - GCGATCTATACACCCTCGGC R – GCGTAGTCGATACCGGAAGA	A8-CaPK (300BP)
		T		F - GCGATCTATACACCCTCGGT R – GCGTAGTCGATACCGGAAGA	
	ASP9	A	61	F - CAATCTTAATGTTGGTCTGTTTTCA R – CATGGTACCACCAAGGAAAGA	A1-CLC (281BP)
		G		F - CAATCTTAATGTTGGTCTGTTTTCG R - CATGGTACCACCAAGGAAAGA	
	ASP 10	C	59	F - TGACCCTGGGAGATTACAGC R – GTACCGCTCCAGAGATCAA	A3-GORK (287BP)
		T	61	F - TTTGACCCTGGGAGATTACAGT R - GTACCGCTCCAGAGATCAA	
	ASP 11	C	63	F - GGTAGTTTGACCCTGGGAGATTAT R – AGTTTGACCCTGGGAGATTAC	A5-GORK (287BP)
		T	66	F - GTACCGCTCCAGAGATCAA R – AGTTTGACCCTGGGAGATTAC	
	ASP 12	C	99	F - CATCCAACCTAGCAGCAACC R – ATCGAACGTCGTTGAGGAAG	A1-PER64 (300BP)
		G	99	F - C ATCCAACCTAGCAGCAACG R - ATCGAACGTCGTTGAGGAAG	
<b>AUD</b>	ASP 18	T	44	F - GGAGGACAGAAGAAGCGTGT R – CCGACAATCATTTCACCAGTAGTA	A10-ABCG1-40 (298BP)
	ASP 22	G	64	F - AGGTCATGCAGAATGTGTCAAG R – TCCACCAAGCAACAACAGTG	A2-HDA191(285BP)
		A	63	F - GGTCATGCAGAATGTGTCAAA R – TCCACCAAGCAACAACAGTG	
	ASP 27	T	65	F - CCGAGAAAGCCTGGACCTAT R – CCGATGTGGGTGCATAAAATA	A4-EFF (254BP)
		C	65	F - CCGAGAAAGCCTGGACCTAT R – CGATGTGGGTGCATAAAATG	
	ASP 29	G	75	F - CCGAGAAAGCCTGGACCTAT R – CTCAAGCTCTGGATTCTTGTATTTC	A4-IICB (253BP)
A		75	F - CCGAGAAAGCCTGGACCTAT R - CTCAAGCTCTGGATTCTTGTATTT		

Tabla 11. Caracterización Set II ASP

Característica	Locus	Alelo	Tamaño (pb)	Secuencia	Genes candidatos
AUD	ASP 3-1	T	138	F - ATGGAATTCAGCCCAATCAA R - ACAATATTCCTCCGTCATGAAAA	CP023757.1 Solanum lycopersicum cultivar I-3 chromosome 1
	ASP 3-7	T	217	F - TTGAAGTATTTGGGCAGCAA R - TTTTCAAATCCCCAAAGGGT	>XM_006339839.2 PREDICTED: Solanum tuberosum heat shock factor protein HSF24 (LOC102593941),
	ASP 3-2	A	239	F - TCCAGTTTCTGGACTGCAT R - GAGACCAGCTCGAAGTGTATCTAT	>XM_015310240.1 PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC107061266 (LOC107061266), mRNA
		G	239	F - TCCAGTTTCTGGACTGCAT R - GAGACCAGCTCGAAGTGTATCTAC	
	ASP 3-3	A	101	F - TGAAAATATAGAAGAAAGGGGTTTGTA R - GGATAATTATGTTGGAGTTGAGTCG	>NC_041634.1 Solanum violaceimarmoratum voucher PI 473396 plastid, complete genome
		G	100	F - GAAAATATAGAAGAAAGGGGTTTGTA R - GGATAATTATGTTGGAGTTGAGTCG	
	ASP 3-4	A	135	F - CCCTGCATTCTTGAAATGGT R - GCACCAGGATCAGCACCT	>XM_006351735.2 PREDICTED: Solanum tuberosum chlorophyll a-b binding protein CP24 10B, chloroplastic (LOC102586172), mRNA
		C	134	F - CCCTGCATTCTTGAAATGGT R - CACCAGGATCAGCACCG	
	ASP 3-5	A	148	F - CAATGAAGAGAAAAAACAACGAT R - CAATGAAGAGAAAAAACAACGAT	>XM_006357680.2 PREDICTED: Solanum tuberosum LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase HSL2 (LOC102583659), mRNA
		C	148	F - CAATGAAGAGAAAAAACAACGAT R - CAATGAAGAGAAAAAACAACGAG	
ASP 3-9	C	212	F - AAATCTAAGGCTCAATGTTGCT R - CAAGTGACAAATCTGCTG	>XM_006346102.2 PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC102592665 (LOC102592665), transcript variant X3, mRNA	
	T	210	F - GAAAATCTAAGGCTCAATGTTGCT R - CAAGTGACAAATCTGCTG		
CT	ASF 3-1	C	133	F - TCTGGTGAGGGCTTTACGTTAC R - ATTCTGCAAACCGAGGGATA	>NM_001288468.1 Solanum tuberosum glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform-like (LOC102595038), mRNA
		T	133	F - TCTGGTGAGGGCTTTACGTTAT R - ATTCTGCAAACCGAGGGATA	
	ASP3-2	A	237	F - CATGGATCCTTCTCAACGA R - GCCACCCTACAATCCCTTCT	>XM_006340884.2 PREDICTED: Solanum tuberosum peroxidase 64-like (LOC102601994), mRNA
	ASF 3-3	C	201	F - AGATCAATCTCTCTAAAGTGTGAATAACTG R - GTGCGCAGGGTTACTGACTT	>XM_006360318.2 PREDICTED: Solanum tuberosum potassium channel SKOR-like (LOC102595275), mRNA
		T	201	F - AGATCAATCTCTCTAAAGTGTGAATAACTA R - GTGCGCAGGGTTACTGACTT	
	ASF 3R-3	C	127	F - AAAATAGCAAAAATTGCACCAAG R - GTAGCTGCCGTTGTTGATGA	>XR_368543.2 PREDICTED: Solanum tuberosum uncharacterized LOC102601347 (LOC102601347), ncRNA
		T	127	F - AAAATAGCAAAAATTGCACCAAC R - GTAGCTGCCGTTGTTGATGA	
ASF3-4	A	138	F - TCCACCAAGCAACAACAGTG R - GCCAGACAAGGAATCTGCT	>XM_006360267.2 PREDICTED: Solanum tuberosum histone deacetylase 19 (LOC102606021), mRNA	