

Uso de marcadores moleculares y aplicación de la técnica iPBS en cultivares de papa (*Solanum tuberosum*)

Use of molecular markers and application of the technique iPBS in potato cultivars (*Solanum tuberosum*)

Trabajo de Fin de Grado

Nerea Norro Lago

Tutor:

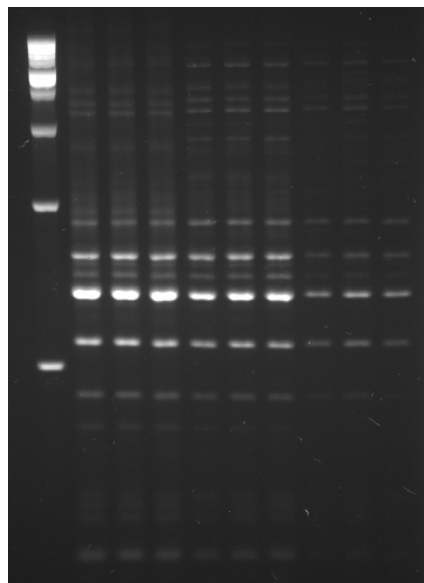
Dr. José Antonio Pérez Pérez (Área de Genética).

Cotutor:

Dr. David Jiménez Arias (Área de Fisiología Vegetal)

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología celular y Genética.

Grado en Biología. Junio 2020.



Índice

<i>Resumen</i>	3
<i>Abstract</i>	3
<i>1. Introducción</i>	4
<i>2. Objetivos</i>	12
<i>3. Material y métodos</i>	13
3.1 Muestras vegetales	13
3.2 Purificación y extracción de ADNg	14
3.3 Análisis iPBS.....	15
<i>4. Resultados y discusión</i>	16
4.1 Purificación de ADN	16
4.2 Optimización concentración ADNg.....	17
4.3 Optimización técnica iPBS	18
<i>5. Conclusiones</i>	23
<i>Conclusions</i>	23
<i>6. Bibliografía</i>	24

Resumen

Existen dos clases de marcadores genéticos: los fenotípicos y los moleculares. El primero de ellos presenta ciertas limitaciones. Es por ello que en el presente estudio se realizó una revisión bibliográfica del uso de marcadores moleculares en *Solanum tuberosum* (papa). Comprende aspectos relacionados con su uso e importancia, características, ventajas y desventajas. Por otro lado, se utiliza la técnica iPBS para la detección de variantes genéticas basada en el uso de retrotransposones con repeticiones terminales largas (LTR) en 20 cultivares de papa, con 10 cebadores, obteniendo uno como óptimo para la generación de una huella genética. En plantas superiores los retrotransposones pueden representar más de la mitad del ADN repetitivo. Dicha técnica permite la detección de variantes genéticas sin necesidad de conocer la secuencia previamente para establecer relaciones filogenéticas, identificar marcadores genéticos y caracterizar LTRs en cualquier especie vegetal o animal.

Palabras clave: *Solanum tuberosum*, LTR, retrotrasposón, iPBS, filogenéticas.

Abstract

There are two different types of genetic markers. Phenotypic and molecular. The first of them has some limitations. That's the reason why in this study we made a bibliographic review about the use of molecular markers in a *Solanum tuberosum* (potato). It includes aspects related to its use, importance, characteristics, advantages and disadvantages. On the other hand, the iPBS technique is used for the detection of genetic variables based on the use of retrotransposons with long terminal repeats (LTR) in 20 potato cultivars, with 10 primers, obtaining one as optimal for the generation of a genetic fingerprint. In superior plants, retrotransposons can contain more than half of the repetitive DNA. This technique allows the detection of genetic variants without prior knowledge of the sequence to establish phylogenetic relations, identify genetic markers, and characterize LTRs in any plant or animal species.

Key words: *Solanum tuberosum*, LTR, retrotransposon, iPBS, phylogenetic.

1. Introducción

La papa (*Solanum tuberosum*) es una de las especies más importantes desde el punto de vista económico dentro de la familia *Solanaceae*. Dicha familia incluye también otros cultivos importantes como son entre otros, el tomate, la berenjena y el tabaco. La papa pertenece al clado asteroidae, que representa aproximadamente el 25% de las plantas con flores (Xu et al., 2011). Su valor se ha ido incrementando a lo largo de los años debido a que es una importante fuente de nutrientes tales como, el almidón, vitaminas, antioxidantes y proteínas (Burlingame et al., 2009). Su distribución mundial, ocupa un amplio rango geográfico, existiendo dos zonas importantes según la distribución, el área de cultivo y la densidad de población (Figura 1): la primera zona se encuentra en una latitud de entre 45 ° N y 57 ° N y representa las zonas de producción de papa en climas templados, donde la papa es un cultivo de verano; la segunda, está ubicada entre la latitud de 23 ° N y 34 ° N, representa especialmente la producción en áreas de las bajas tierras subtropicales (Hijmans, 2001). La papa europea es conocida como *Solanum tuberosum L. subsp. tuberosum*, aunque los cultivares modernos están formados por mezcla de especies de *S.tuberosum* con el fin de obtener unas mejores características agronómicas (Ríos et al., 2007).

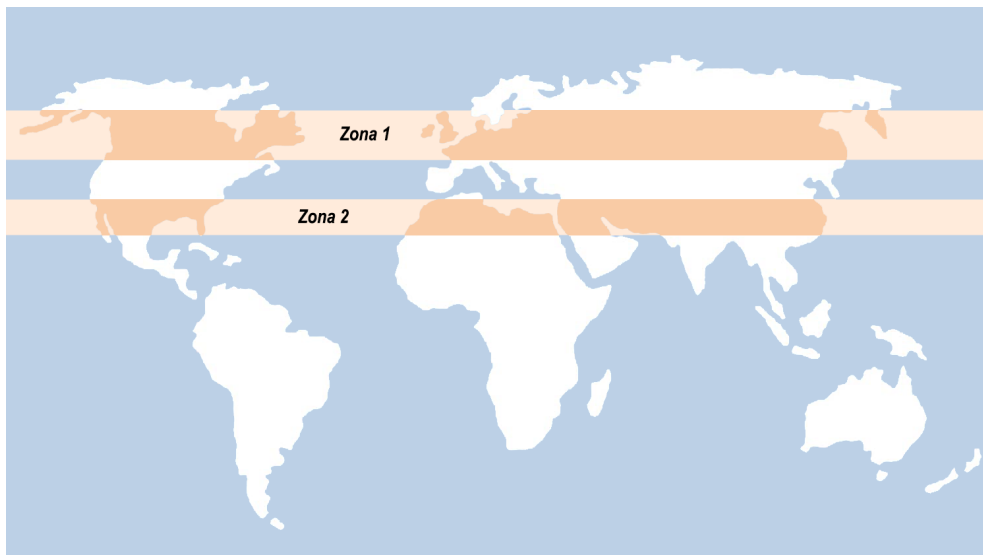


Figura 1: Principales picos de distribución de la papa de acuerdo a su latitud. Zona 1 producción en climas templados. Zona 2 producción en tierras subtropicales.

Según Ríos et al. (2007) la papa fue descrita por primera vez en Chile por europeos, en el año 1551. El primer registro que se tuvo del cultivo ya en Europa fue el 28 de noviembre de 1567 en las Islas Canarias. Hawkes y Francisco Ortega (1993)

contemplaron la posibilidad de que las papas se introdujeran en 1552 para el desarrollo de un cultivo de exportación. Se cree que la primera fecha de introducción en las Islas Canarias desde un lugar conocido fue en 1622, cuando D. Juan Bautista de Castro sembró papas que trajo de Perú a Icod del Alto, siendo una de las zonas de Tenerife para el cultivo de papas más importantes en la actualidad (Hawkes & Francisco Ortega, 1993). Alrededor del año 1797 existía un gran número de variedades locales presente en las Islas, convirtiéndose en una parte importante de la dieta en las mismas (Ríos et al., 2007).

En la actualidad, la papa es el cultivo alimentario no cereal más importante del mundo, concretamente el cuarto más grande después de el maíz, el trigo y el arroz (Zhang et al., 2017). Se considera como uno de los vegetales más productivos cultivados en el mundo, y provee de una gran fuente de ingresos en muchas sociedades. Hasta la fecha se han descrito 190 especies silvestres de papa, divididas a su vez en 4 clados, representan varias relaciones inter-específicas y gran variabilidad (Spooner et al., 2007). Este alto número de especies se debe a que se trata de una especie que presenta poliplodías, siendo el 70% diploides, las restantes tetraploides y un número muy reducido triploides y pentaploides. La mayoría de los cultivares de papa son autotetraploides ($2n = 4x = 48$), y pueden sufrir depresión por endogamia haciéndolas susceptibles a muchas plagas y patógenos (Xu et al., 2011).

La taxonomía de las especies cultivadas y silvestres continua siendo extremadamente compleja, generando conflicto y revisándose continuamente (Spooner et al., 2007). Debido a su gran capacidad de hibridación muchas de las especies existentes podrían parecer iguales, a pesar de tener apariencias diferentes (Lara Cabrera & Spooner, 2004). Es por ello, que existe una tendencia a creer que las poblaciones de papas introducidas han sufridos pocos cambios desde su exportación, pero al llevar a cabo análisis fenotípicos y moleculares se afirma que esto no es así (Ríos et al., 2007).

El primer paso en programas de mejora y conservación de los cultivos está basado en la caracterización fenotípica destacando los descriptores de tubérculo, tallos, hojas, flores, frutos y hábito de crecimiento de la planta (Huaman et al., 1977). Se han utilizado desde hace años para identificar las plantas cultivadas, estudiar la diversidad genética y conservar las diferentes variedades. Hasta hace pocos años, los marcadores fenotípicos establecían las bases para diferenciar e identificar variedades, pero estos

presentan ciertas desventajas entre las que destacan su alta complejidad, normalmente proporcionan resultados en un largo periodo de tiempo, siendo preciso realizar los ensayos en estados específicos del desarrollo del cultivo, son caros, subjetivos y se encuentran influenciados por el ambiente (Yasmin et al., 2006).

En la actualidad, los marcadores moleculares han supuesto una mejora en comparación con los caracteres fenotípicos. Han cambiado la forma de conducir los estudios sobre diversidad genética, debido a sus ventajas, entre las que destacan su rapidez, fiabilidad y sencillez (Yasmin et al., 2006). A diferencia de los marcadores fenotípicos, los marcadores moleculares permiten su uso en cualquier etapa de desarrollo del cultivo y no se encuentran influenciados por el ambiente (Onamu et al., 2012). En los últimos años, el análisis de la variación genética intra/inter-cultivares se ha convertido en una herramienta fundamental para realizar programas de mejora. Hasta la fecha, varios son los marcadores moleculares utilizados en papas para tales fines. Entre ellos destacan los microsatélites o SSRs (Ruiz De Galarreta et al., 2007), ADN polimórfico amplificado al azar o RAPD (Yasmin et al., 2006) y Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados o AFLP (McGregor et al., 2000) entre otros.

Algunos polimorfismos pueden resultar de cambios en la secuencia pudiendo afectar al sitio de unión de un cebador de PCR. Provocando la aparición o desaparición de un determinado amplicón, esto ocurre en diferentes técnicas, entre ellas RAPD. También afecta a AFLP, ISSR e iPBS. En general, afecta a las técnicas de análisis multilocus con marcadores dominantes. Los polimorfismos producidos por un cambio en el sitio de unión del iniciador por una mutación puntal se denominan marcadores RAPD (Chalmers et al., 1992). Los RAPD son capaces de generar un gran número de bandas, sin la necesidad de requerir un conocimiento previo para cada especie, además, la cantidad de ADN que precisa en comparación con los RFLPs es mucho menor (Phillips et al., 1995). Los resultados obtenidos en papa en el estudio realizado por Yasmin et al. (2006) fueron los siguientes. Fueron analizados seis cultivares utilizando tres cebadores los cuales generaron un 94,29% de polimorfismo. Dichos resultados indicaron una alta variabilidad genética en los cultivos. Los Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) permiten el análisis de un elevado número de locis por experimento, sin requerir información previa sobre su secuencia, son altamente reproducibles y en su mayoría dominantes (Karp et al., 1997). Los resultados obtenidos en papa en el estudio realizado por McGregor et al. (2000) presentaron una reproducibilidad del 99,6%. Generando 244 fragmentos polimórficos en 39 cultivares.

Estos datos aportaron un mayor número de polimorfismos en comparación con otros estudios (Milbourne et al., 1997). Los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeats*) representan marcadores codominantes y son altamente polimórficos. Son repeticiones en tandém de secuencias simples (1-7 nt), altamente distribuidos por todo el genoma. Presentan un alto nivel de variación por lo que se han convertido en marcadores moleculares por excelencia. Además, son fáciles de usar en reacciones de PCR (de Galarreta et al., 2011). Los SSRs representan un nivel importante en cuanto a información genómica se refiere ya que se pueden usar para la determinación de polimorfismos, así como para estudios de mapeo (Phillips et al., 1995). En el estudio de la Galarreta et al. (2011) se utilizaron 19 marcadores microsatélites para identificar un conjunto de variedades de papas de La Palma. Los SSR generaron 62 polimorfismos, de los cuales 13, estaban presentes en todas las variedades locales. Generalmente las variedades locales se han agrupado conjuntamente. Sin embargo, en algunos casos es preciso un estudio comparativo y morfológico mas detallado ya que han surgido algunas discrepancias con asignaciones anteriores en ciertas especies.

Los marcadores nombrados anteriormente presentan ciertas limitaciones entre las que destacan su carácter dominante y su gran coste inicial en soporte técnico especializado (Onamu et al., 2012). Los RAPD se encuentran influenciados por multitud de factores, entre ellos encontramos el número de ciclos de amplificación, cantidad de ADN, la temperatura, entre otros, es por ello que es fácil obtener resultados erróneos o no deseados (Phillips et al., 1995). En el caso de los AFLP se trata de una técnica mucho más compleja que la de los RAPD y la de los microsatélites. Es por ello, que resulta imprescindible técnicos especializados, así como materiales complejos y caros, además requieren una mayor cantidad de ADN (Jones et al., 1997). Por último, los microsatélites presentan un desarrollo de marcadores muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas. Se precisa conocer la secuencia y, por lo tanto, los estudios son menos numerosos que los de otros marcadores (Cervera et al., 2002).

Es por ello, que Kalendar et al. (2010) propone una alternativa a la variación detectada mediante los tipos de marcadores nombrados anteriormente. Esta podría ser aportada por la localización variable de algunos elementos móviles como los retrotransposones, de los cuales también existen varios estudios hasta la fecha (Kirdök & Ozden Ciftci, 2015; Demirel et al., 2018; Milavanov et al., 2019).

Los elementos móviles son secuencias de ADN que presentan la capacidad de moverse por el genoma, cambiando su localización. Entre sus características destacamos, la capacidad de cambiar su número de copias, generar mutaciones por inserción, el silenciamiento génico, aumento del tamaño del genoma, duplicación de genes o segmentos e incluso funcionar como promotores o reguladores (Schulman, 2013). Los retrotransposones son muy comunes en plantas superiores pudiendo representar más de la mitad del ADN repetitivo. Los elementos móviles, pueden ser catalogados en base a la estrategia que usan para moverse (Wicker et al., 2007). La clase I contiene los retrotransposones que primero se replican a través de un intermedio de ARN y luego propagan copias hijas en un proceso de “copiar y pegar”, como es el caso de los LINEs y los retrotransposones con repeticiones terminales largas (LTR). Por otro lado, la clase II, los transposones de ADN, se mueven generalmente en un proceso de "cortar y pegar”, estos son bastante menos conocidos que los anteriores, un ejemplo podrían ser los TIR (Wicker et al., 2007; Schulman, 2013). Las superfamilias y órdenes de los elementos móviles se organizan en base a las diferencias estructurales, siendo estas discrepancias la presencia o ausencia de LTR (Figura 2). Los LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*) y SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*) son ejemplos de retrotransposones sin LTR. Debido a la importancia que presentan algunos de estos en los genomas de los mamíferos, los LINEs son los más estudiados, de hecho, representan aproximadamente el 20% del genoma humano.

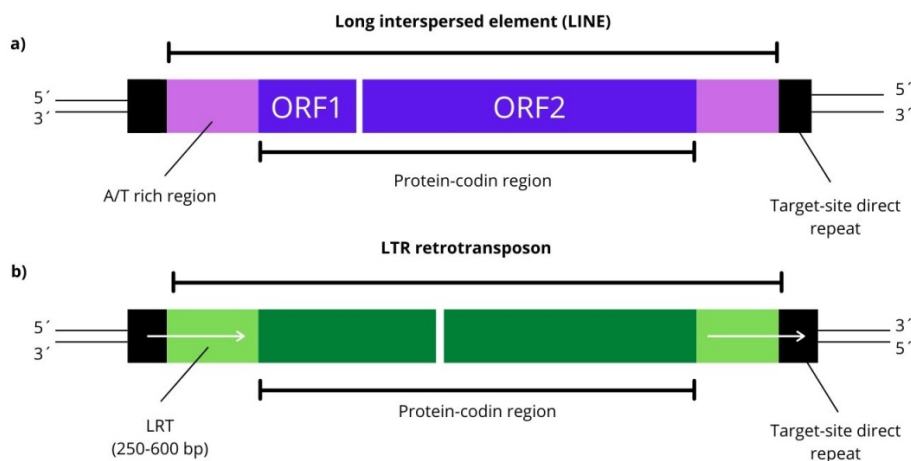


Figura 2: Estructura elementos móviles. Ejemplo elemento móvil sin LTR (a), ejemplo de elemento móvil con LTR (b). Imagen tomada de (Alberts et al., 2002)

Se cree que los LINEs tienen un origen de aproximadamente 600 millones de años, siendo los retrotransposones eucarióticos más antiguos. En cuanto al mundo vegetal se

refiere, los elementos más comunes e importantes son los LTR-retrotransposones (Schulman, 2013). Es por esto, y para el estudio de *Solanum tuberosum*, que queremos evaluarlos como marcadores moleculares potenciales, en comparación con otros marcadores. Los LTR-retrotransposones se encuentran flanqueados por una región de tamaño variable denominada LTR, importantes en la replicación. Dos son las superfamilias que se describen en los LTR-retrotransposones, *Gypsy* y *Copia* (Figura 3), las cuales se diferencian en el orden de los genes que codifican las enzimas utilizadas en la replicación (Wicker et al., 2007). Los LTR-retrotransposones son considerados como virus intracelulares debido a estar ligados con los retrovirus, según los expertos son descendientes de los LTR-retrovirus (Schulman, 2013).

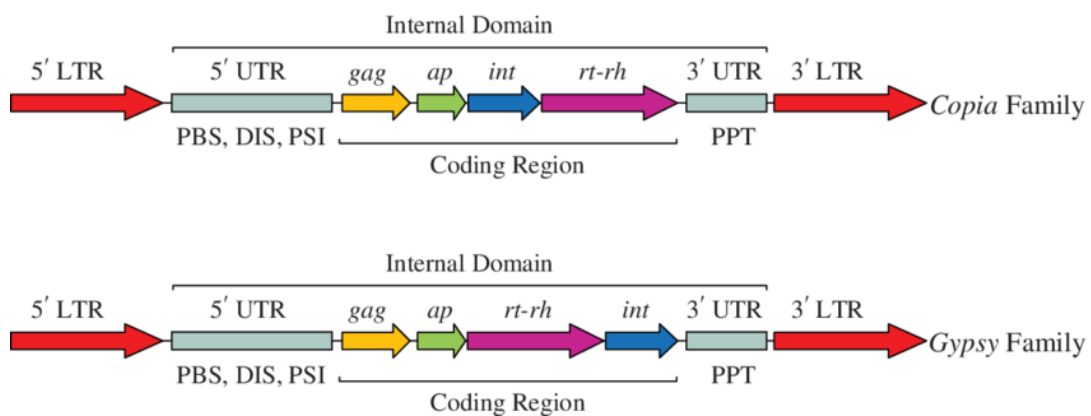


Figura 3: Superfamilias LTR-retrotransposones. Imagen tomada de (Alzohairy et al., 2014).

Varias son las técnicas de detección de variación genética basadas en retrotransposones como por ejemplo REMAP, IRAP, SSAP o iPBS (Figura 4 y 5). Serán descritas a continuación:

- La técnica SSAP (*Sequence-specific Amplified Polymorphism*) se fundamenta en el uso de dos cebadores de PCR, uno reconoce un LTR conocido y el otro un adaptador (Kalendar et al., 2010). En este caso, el ADN genómico (ADNg) es digerido por una enzima de restricción (Figura 4.a). A continuación, el adaptador se une a los extremos de los fragmentos de restricción. Es entonces, cuando se lleva a cabo la amplificación, si existe un LTR cerca y en la orientación adecuada, de la región entre la zona de restricción y la LTR (Waugh et al., 1997).
- Por otro lado, la técnica IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplification Polymorphism*). En este caso, los LTR son utilizados como sitio de unión del cebador o cebadores de la PCR, de tal manera que se produce la amplificación

de la región que se encuentra entre las dos secuencias de LTR (Figura 4.b). Se puede emplear un solo cebador si los LTR presentan orientación invertida y dos cebadores si estos presentan la misma orientación (Kalendar et al., 1999).

- En cuando a la técnica REMAP (*Retrotransposon Microsatellite Amplification Polymorphism*) fue descrita con el fin de generar huellas de ADN, amplificando locis genómicos que se encuentran entre una región LRT y un microsatélite (Figura 4.c). Es necesario por tanto el diseño de un cebador capaz de reconocer dichas regiones (Kalendar et al., 1999). Para ello se debe conocer un LTR en la especie de interés (Kalendar et al., 2014).

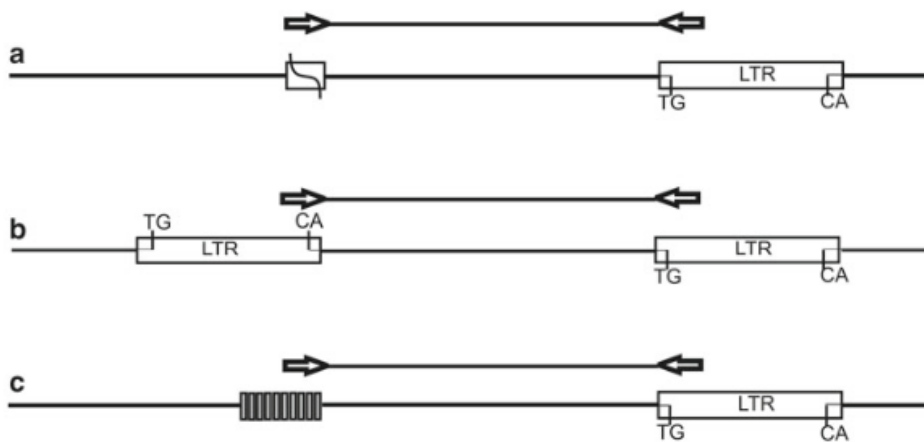


Figura 4: Métodos de obtención de marcadores moleculares basados en retrotransposones (a) SSAP. (b) IRAP. (c) REMAP. Imágenes tomadas de (Kalendar et al., 2014).

- La técnica más reciente es el iPBS (*Inter-Primer Binding Site*). Fue desarrollada con el fin de generar huellas de ADN (Figura 5). En este caso no existe la necesidad de conocer las secuencias LTR ya que el cebador se une a la región PBS (*primer binding site*), un conjunto de secuencias de 18 nucleótidos que comparten la mayoría de LTR-retrotransposones, sitio de unión para el cebador de la transcripción inversa. Para aplicar esta técnica se usa un solo cebador, por tanto, amplifica entre dos retrotransposones adyacentes en orientación inversa (Kalendar et al., 2010). La alta conservación de secuencia de PBS permite el diseño de cebadores prácticamente universales.

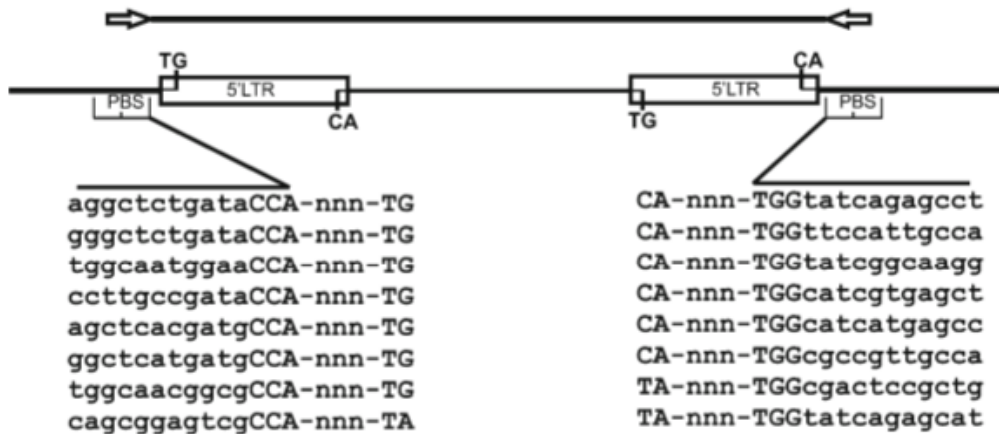


Figura 5: Esquema de *Inter-Primer Binding Site* (iPBS) y la estructura del retrotrasposón LTR. Dos LTR en orientación invertida amplificados con un único cebador o dos cebadores diferentes (Kalendar et al., 2014).

El método, iPBS se basa en la presencia de un tRNA como un sitio de unión del cebador de transcriptasa inversa (PBS) en los rototransposones LTR. El método es aplicable no solo a los retrovirus y retrovirus endógenos, sino también a los retrotransposones *Gypsy* y *Copia* LTR, así como a los elementos LARD y TRIM no autónomos, en todo el reino animal y vegetal. Además, la técnica de amplificación iPBS ha demostrado ser una poderosa tecnología de obtención de huellas digitales sin la necesidad de un conocimiento de la secuencia (Kalendar et al., 2010). Por este motivo, hemos escogido la técnica iPBS para la realización del presente estudio. Nos permitirá observar la variabilidad genética de la papa y diseñar un ensayo de genotipado para poder distinguir entre cultivares.

2. Objetivos

1. Evaluar el potencial de la técnica iPBS para revelar la diversidad genética en cultivares de *Solanum tuberosum*.

3. Material y métodos

3.1 Muestras vegetales

Se inicio el ensayo con 20 muestras de tubérculos en el laboratorio que representaban una importante muestra de las variedades locales. La mayoría procedían de agricultores localizados en Icod del Alto y miembros de la asociación de papas antiguas de Canarias de Icod del Alto, también de agricultores de Taganana. Las muestras fueron proporcionadas por el Dr. David Jiménez. Por otro lado, fueron recolectados otros ejemplares en distintos municipios de la isla de Tenerife y Gran Canaria (Tabla 1).

Muestras	Variedad	Lugar de recolección
1	Bonita ojo de perdiz	Icod del Alto
2	Terrenta	Icod del Alto
3	Bonita colorada	Icod del Alto
4	Borralla colorada	Icod del Alto
5	Bonita negra	Icod del Alto
6	Palmera yagada	Agricultor Taganana
7	Peluca roja	Icod del Alto
8	Borralla taganana	Agricultor Taganana
9	Bonita blanca	Icod del Alto
10	Palmera colorada	Agricultor Taganana
11	Holandesa	Agricultor Taganana
12	Palmera negra	Agricultor Taganana
13	Negra de taborno	Agricultor Taganana
14	Negra Yema de huevo	Mercado Santa Cruz
15	Palmera blanca	Agricultor Taganana
16	Azucena negra	Icod del Alto
17	Azucena Blanca	Icod del Alto
18	Negra Yema Huevo	Carboneras
19	Negra de Oro	Güímar
20	Negra	El Sauzal, El Ravelo

Tabla 1: Muestras analizadas

Los tubérculos recolectados fueron sembrados en turba comercial tras el inicio de la “grelación” (tallos provenientes del tubérculo) y se mantuvieron en condiciones de invernadero durante un mes aproximadamente. Durante la recolección de hojas se seleccionaron aquellas más jóvenes, con un aspecto sano, sin picaduras de insectos, manchas, pestisidas o cualquier otro síntoma de enfermedad. Esto se llevo a cabo con el fin de minimizar contaminantes en la hoja y asegurar una buena calidad de ADN.

3.2 Purificación y extracción de ADNg

El ADNg fue purificado a partir de 70mg de hoja fresca, evitando cualquier imperfección de la misma, el peciolo o el nervio para facilitar la trituración de la muestra. Se empleo el kit comercial *E.Z.N.A®. SP Plant DNA kit (Omega BIO-TEK)* siguiendo las indicaciones del comerciante exceptuando algunas modificaciones que serán explicadas a continuación.

Las muestras de hojas fueron pesadas, troceadas e introducidas en un tubo de homogeneización de 2ml (*Lysing Matrix A; M.P. Biomedicals*), el cual en su interior contiene unas pequeñas bolas de cerámica para disgregar los tejidos vegetales y romper bien las células liberando el ADNg. Acto seguido, se sometió a la muestra a una agitación intensa empleando el sistema FastRep. Se empleo la velocidad 5 durante 30 segundos, primero en seco, y luego se le añadió 700 µl de tampón de lisis. Posteriormente, se añadieron 7 µl de RNasa y se mezcló en agitador mecánico durante 10 segundos. Se incubó a 65°C durante 10 minutos, mezclando cada 5 minutos. A continuación, se centrifugó a 16.000g con el fin de sedimentar el material no solubilizado. Se recuperó unos 400 µl evitando el sedimento o material flotante no deseado. Una vez añadido el tampón de precipitación se incubaron en hielo durante 10 minutos, a continuación, se centrifugaron en frío a 4°C durante 10 minutos a una velocidad de 20.000g. Este proceso fue repetido dos veces, cambiando la orientación de los tubos. De esta manera se consigue una mayor compactación del sedimento. Se recuperan 350 µl de sobrenadante y se transfieren a la columna de filtración. Se centrifuga a una velocidad de 20.000g durante 10 minutos y se añaden 450 µl de tampón de unión que contiene guanidina. Para la realización de los últimos pasos del protocolo es necesario activar la membrana de la columna de purificación con 100 µl de tampón de equilibrado (NaOH 3M) lavando al final del proceso con agua. Cargar todo el lisado en la columna de purificación, centrifugar, eliminar el sobrante y lavar con tampón de lavado. Finalmente, el ADNg fue recuperado en un volumen de 50 µl de tampón de elución.

La concentración y pureza del ADNg se midió empleando un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix), teniendo en cuenta los ratios A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} . Se consideraron como valores óptimos los comprendidos entre 1,7 - 1.9 en el caso del ratio A_{260}/A_{280} y valores superiores a 1,8 para el ratio A_{260}/A_{230} (Thermo Scientific, 2000). Todas las

muestras fueron diluidas con Tris-HCl 10 mM a pH 8 hasta obtener una concentración final de 10ng/μl.

3.3 Análisis iPBS

Para la realización de este análisis se testaron 10 cebadores iPBS diferentes (Tabla 2) con el fin de seleccionar aquellos más óptimos para el análisis de la variación genética en *Solanum tuberosum*. En cuanto a la realización de las PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl de los cuales 5 μl pertenecían a ADNg de muestra a diferentes concentraciones (menos el control negativo donde se utilizaron 5 μl de agua de calidad biología molecular). La mezcla maestra de PCR consistió, por cada reacción, en 4 μl de tampón Phire II, 2 μl de dNTP a una concentración de 2mM, 2 μl de cebador PBS a una concentración de 10 μM, 0,2 μl de enzima Phire II y 4,8 μl de agua de calidad de biología molecular.

Nomenclatura			
Original ^a	Interna del laboratorio	Secuencia	T ° anillado ^b
PBS2232	iPBS-C	AGAGAGGCTCGGATACCA	55,4
PBS2239	iPBS-F	ACCTAGGCTCGGATGCCA	55,0
PBS2229	iPBS-M	CGACCTGTTCTGATACCA	52,5
PBS2252	iPBS-N	TCATGGCTCATGATACCA	51,6
PBS2257	iPBS-O	CTCTCAATGAAAGCACCA	50,0
PBS2402	iPBS-P	TCTAAGCTCTTGATACCA	50,0
PBS2242	iPBS-G	GCCCCATGGTGGGCGCCA	57,0
PBS2395	iPBS-J	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	52,8
PBS2373	iPBS-I	GAACTTGCTCCGATGCCA	51,0
PBS2415	iPBS-L	CATCGTAGGTGGGCGCCA	61,0

Tabla 2: Cebadores PBS. ^a Kalendar et al. (2010). ^b Recomendada por los mismos autores.

Las amplificaciones se incubaron en un termociclador *ProFlex PCR System (Applied Biosystems; ThermoFisher Scientific)* con el siguiente perfil térmico (Figura 6):

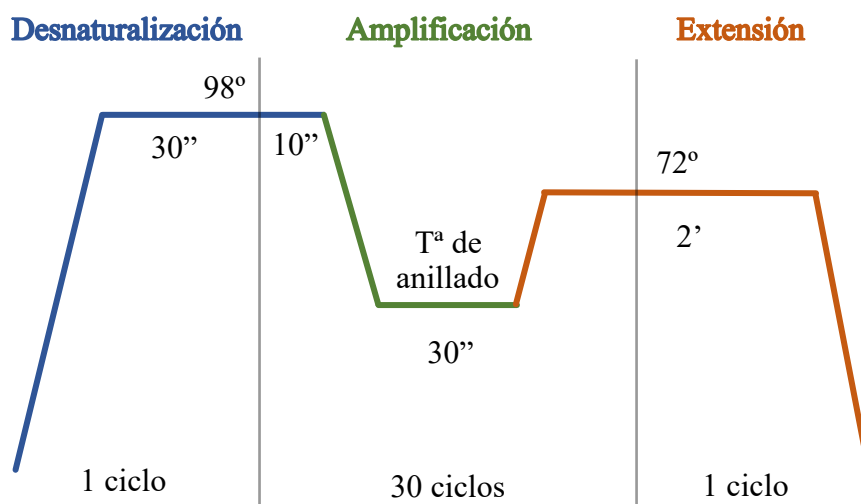


Figura 6: Perfil térmico. Desnaturalización inicial a 98°C durante 30 segundos, 30 ciclos de amplificación con desnaturalización a 98°C durante 10 segundos, anillado a la temperatura indicada en la Tabla 2, durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 2 minutos.

Los resultados se analizaron en geles de agarosa al 2% y tampón de electroforesis TBE 1X. A la hora de cargar las muestras amplificadas, se añadió 4 µl de tampón de carga 6X, y se depositaron entonces 10 µl de la mezcla en los pocillos. Se realizaron electroforesis cortas las cuales duraban 4h a 50V. Todos los geles fueron teñidos con bromuro de etidio durante 2h y fotografiados en presencia de luz ultravioleta con el sistema de captura de imágenes *ChemiDocTM* (BioRad).

4. Resultados y discusión

4.1 Purificación de ADN

Las muestras obtenidas fueron recolectadas en los diferentes lugares reflejados en la Tabla 1. Se seleccionaron las hojas más tiernas y sanas para evitar cualquier condicionante que pudiera interferir en las reacciones de amplificación. La realización de la técnica mejora el rendimiento de las muestras con el tiempo, lo que permite obtener mejores concentraciones en las últimas extracciones en comparación con las primeras (Tabla 3).

Nuestra intención era obtener concentraciones de ADNg que nos permitiera la optimización. El rango de concentraciones obtenidos varía entre los 18,00 ng/µl y 165,00 ng/µl (Tabla 3). Los valores del ratio A_{260}/A_{280} oscilaron entre 1,55 y 1,87. En cuanto a los valores del ratio A_{260}/A_{230} estos oscilaron entre 1,60 y 2,33. En todos los

casos se obtuvo una concentración y cantidad de ADNg suficiente para todas las muestras y de buena calidad (Thermo Scientific, 2000), permitiendo realizar los ensayos posteriores.

Muestra	ng/ μ l	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Bonita ojo de perdiz	23,38	1,55	1,60
Terrenta	18,00	1,70	1,80
Bonita colorada	52,66	1,75	2,10
Borralla colorada	33,82	1,75	2,09
Bonita negra	25,56	1,77	2,08
Palmera yagada	25,18	1,73	2,00
Peluca roja	32,11	1,71	1,97
Borralla taganana	29,11	1,82	2,08
Bonita blanca	33,00	1,78	2,04
Palmera colorada	39,88	1,79	2,07
Holandesa	81,94	1,81	2,27
Palmera negra	56,60	1,87	2,19
Negra de taborno	74,64	1,82	2,25
Negra Yema de huevo	49,81	1,80	1,98
Palmera blanca	53,33	1,82	1,93
Azucena negra	61,63	1,82	1,98
Azucena Blanca	75,82	1,85	2,01
Negra Yema Huevo	124,00	1,78	2,33
Negra de Oro	165,00	1,80	2,32
Negra	150,00	1,82	2,20

Tabla 3: Concentraciones y rendimiento del ADN. Medidos empleando un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix).

4.2 Optimización concentración ADNg

Las técnicas de detección de variación genética basadas en elementos móviles son especialmente útiles para la generación de marcadores moleculares en especies vegetales debido a que los elementos móviles constituyen una parte importante del genoma de las plantas (Kalendar et al., 2019).

Una vez extraído en ADNg de la papa, se eligió una preparación que presentaba una buena calidad para iniciar la optimización del análisis iPBS. El ejemplar elegido fue Negra Taborno (Tabla 1) por ser la más representativa de las papas antiguas de canarias (Ríos, 2012), el cual fue testado con el cebador iPBS- I (Tabla 2), ya que este se había empleado con anterioridad en el laboratorio arrojando buenos resultados.

Se probaron tres concentraciones diferentes de ADNg (2, 0,4 y 0,08 ng/μl). Las diluciones fueron realizadas por triplicado para observar la repetitividad de las bandas. La concentración óptima de ADNg elegida fue la de 0,4 ng/μl (Figura 7). Ésta proporcionó un alto número de bandas bien definidas y repetitivas. La concentración de 0,08 ng/μl proporcionaba también un alto número de bandas, pero eran más débiles y menos repetitivas. En cuanto a la concentración de 2 ng/μl la definición de las bandas fue mucho menor en el rango de mayor peso molecular debido a la formación de “smear” por la presencia de una alta concentración de ADN. Comprobado que el cebador iPBS-I satisfacía el requisito de generar un buen patrón de bandas a una concentración de 0,4 ng/μl, se procedió a la dilución de todas las muestras a dicha concentración.

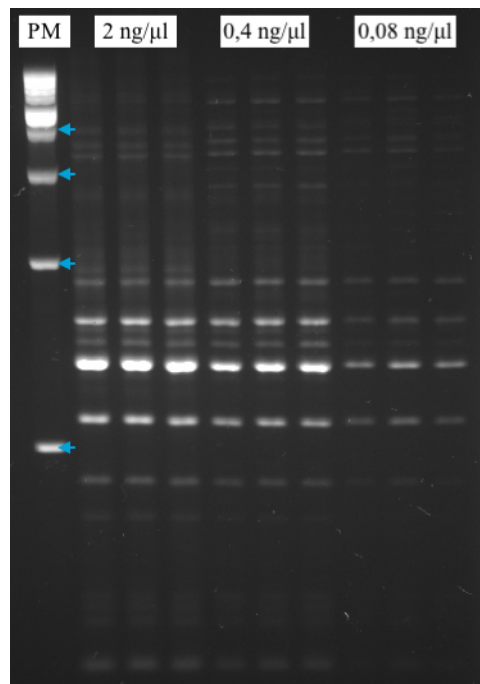


Figura 7: Optimización de la concentración ADNg. Se utilizó el cebador iPBS-I y el ADNg proveniente de la variedad Negra taborno. Cada concentración de ADN fue ensayada por triplicado. PM: Marcador de peso molecular (AppliChem). Las flechas azules señalan los marcadores de 0,5, 1, 1,5 y 2 Kb.

4.3 Optimización técnica iPBS

Un cebador óptimo para un análisis multilocus de marcadores dominantes debe proporcionar un buen patrón de bandas y ser capaz de revelar la existencia de variabilidad genética. La técnica iPBS ha sido descrita recientemente (Kalendar et al., 2010) y es limitado el número de estudios publicados. La ventaja más destacada, según

Kalendar et al. (2010) del análisis iPBS es que no requiere un conocimiento previo sobre secuencias de nucleótidos de retrotransposones en la especie de interés.

Para optimizar el análisis iPBS en papa, se utilizaron dos variedades, Negra taborno y Azucena negra (Tabla 1). Las muestras de ADN_g correspondiente fueron ensayadas por duplicado con 10 cebadores (Tabla 2). Los criterios de selección de cebadores óptimos para el análisis iPBS fueron el número de bandas obtenidas, la repetitividad de las bandas y la capacidad para revelar variantes genéticas (Tabla 4).

Cebador	Bandas totales	Bandas variables	% Bandas variables	Bandas no repetitivas
C	30	9	30.00%	0
F	28	10	35.71%	2
M	32	9	28.13%	0
N	14	4	28.57%	0
O	16	8	50.00%	1
P	17	6	35.29%	0
G	30	7	23.33%	0
I	25	7	28.00%	3
J	20	5	25.00%	0
L	26	4	15.38%	0

Tabla 4: Recuento de bandas observadas. Figuras 8 y 9.

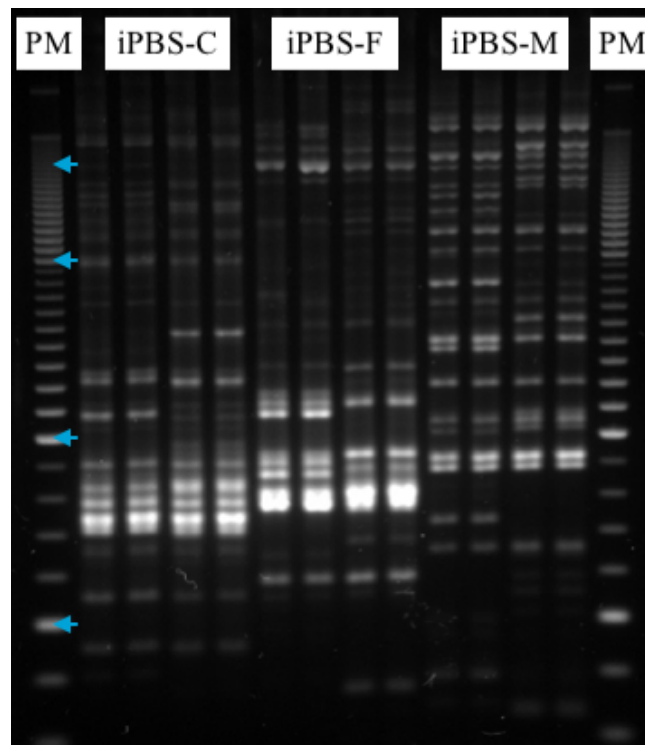
En la Figura 8 se muestra el proceso de optimización en el cual es elegido el cebador iPBS-M como óptimo para el análisis. Los demás cebadores resultaron menos convenientes debido al reducido número de bandas, al mayor ruido de fondo que se presentaba en algunos casos, el cual dificulta la anotación de las bandas más débiles, y la falta de repetitividad en los duplicados.

En primer lugar, observamos como los cebadores iPBS-C, iPBS-F y iPBS-M (Figura 8) proporcionan también un número alto de bandas totales y este caso un buen número de bandas variables. A simple viste, podríamos decir que el más adecuado, es el cebador F ya que presenta un porcentaje mayor de bandas variables que los demás, pero de estas 10 bandas variables existentes, 2 no son repetitivas por lo que no son fiables. El cebador iPBS-M presenta un buen número de bandas totales, así como de bandas variables en comparación con el resto de los valores, las bandas se separan bastante bien y la

suciedad en la muestra es prácticamente inexistente por lo que permite cuantificarla adecuadamente. Este resultado era de esperar ya que es uno de los cebadores propuesto por Kalendar et al. (2010) para realizar amplificaciones en papa.

En segundo lugar, los cebadores iPBS-N, iPBS-O y iPBS-P (Figura 8), presentan un bajo número de bandas totales, pero un alto número de bandas variables. En este caso, estos no son seleccionados como los adecuados, ya que la mayoría de las bandas no se ven con claridad y existe suciedad, lo que dificulta su cuantificación.

Por ultimo, cabe destacar que los cebadores iPBS-G, iPBS-I, iPBS-J y iPBS-L (Figura 9) proporcionan un número elevado de bandas totales, estas son difíciles de cuantificar ya que no se separan bien y existe mucha suciedad en la muestra que impide su cuantificación. Por otro lado, también observamos que a pesar de que este valor sea alto, el número de bandas variables es bastante bajo, por lo que no serían seleccionados como los mejores cebadores para realizar las siguientes amplificaciones. Como conclusión, podemos afirmar que el mejor cebador es el iPBS-M debido a los buenos resultados obtenidos (Tabla 4).



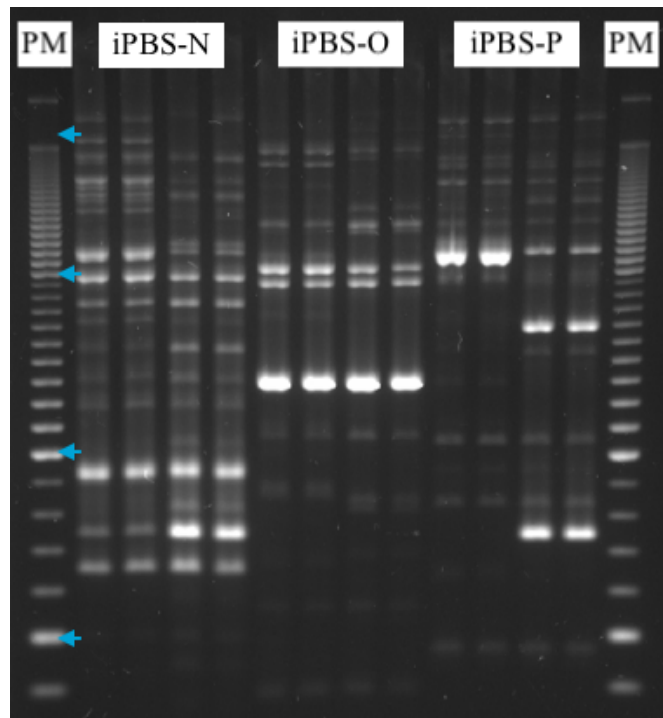


Figura 8: Optimización del análisis iPBS en papa. Se muestran los resultados de las PCRs con 6 cebadores (Tabla 2) corridos en electroforesis cortas. Las muestras son de izquierda a derecha y por duplicado: Negra taborno y Azucena negra. PM: Marcador peso molecular (Promega). Las flechas azules señalan los marcadores de 0,5, 1, 2 y 4 Kb.

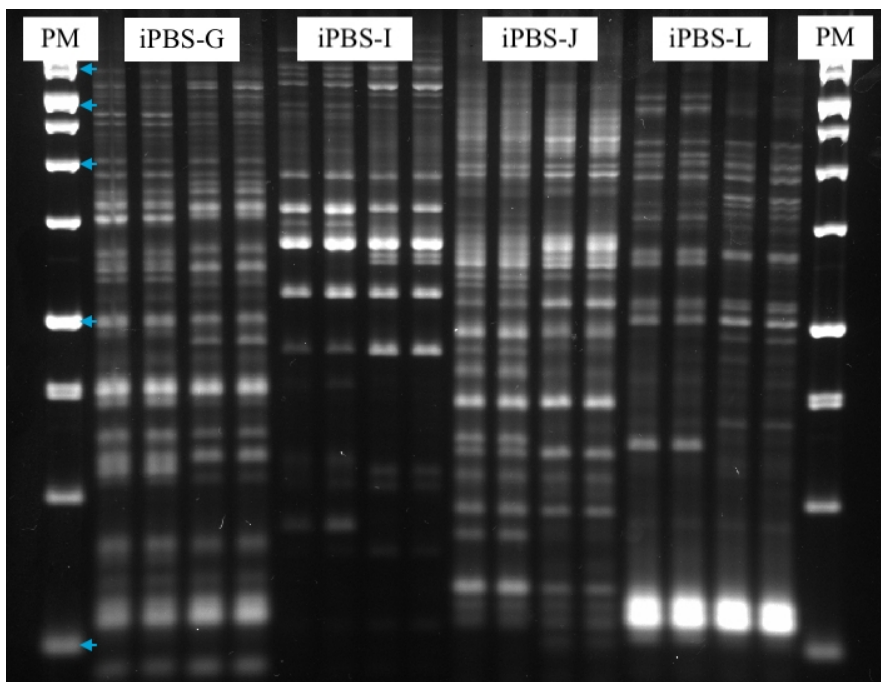


Figura 9: Optimización del análisis iPBS en papa. Se muestran los resultados de las PCRs con 4 cebadores (Tabla 2) corridos en electroforesis cortas. Las muestras son de izquierda a derecha y por duplicado: Negra taborno y Azucena negra. PM: Marcador peso molecular (AppliChem). Las flechas azules señalan los marcadores de 0,25, 1, 2, 3 y 4 Kb.

Diferentes autores han propuesto la necesidad de modernizar la clasificación y nomenclatura de las plantas cultivadas, especialmente la revisión sobre la clasificación de la papa (Spooner et al., 2003; Spooner et al., 2007). Para ello es necesario la realización de una clasificación con los distintos marcadores moleculares. A lo largo de este estudio varios han sido los comentados para este fin, los cuales presentan ciertas limitaciones como su inversión inicial en soporte técnico especializado (Onamu et al., 2012), estar influenciados por multitud de factores (Phillips et al., 1995), técnicas complejas, deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas, se precisa conocer la secuencia entre otros (Cervera et al., 2002). Por ello, se aplica la técnica iPBS debido a las ventajas que presenta, nombradas en apartados anteriores y avaladas por Kalendar et al. (2010).

5. Conclusiones

- La calidad de las purificaciones de ADNg varía con la madurez, calidad de la hoja y mejora con las repeticiones en la realización de la técnica, pudiendo esto afectar a los resultados del análisis iPBS.
- La concentración de ADNg elegida como óptima fue 2ng de ANDg en 20 µl de PCR debido a que generaba bandas bien definidas y repetitivas
- De entre los 10 cebadores utilizados en la técnica iPBS en *Solanum tuberosum*, el cebador PBS2229 (iPBS-M) descrito por Kalendar et al. (2010) proporciona los resultados más robustos.

Conclusions

- The quality of gDNA purifications varies with maturity and leaf quality. And it improves with repetitions in performing the technique, which may affect the results of the iPBS analysis.
- The optimal concentration of gDNA was 2ng of gDNA in 20 µl PCR because it generated well defined and repetitive bands.
- Among the 10 primers used in the iPBS technique in *Solanum tuberosum*, the primer PBS2229 (iPBS-M) described by Kalendar et al. (2010) provides the most consistent results.

6. Bibliografía

- Alberts, Johnson, & Lewis. (2002). *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*.
- Alzohairy, A., Sabir, J., Gyulai, G., Younis, R., Jansen, R., & Bahieldin, A. (2014). Environmental stress activation of plant long-terminal repeat retrotransposons. *Functional Plant Biology*. <https://doi.org/10.1071/FP13339>
- Burlingame, B., Mouillé, B., & Charrondiére, R. (2009). Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2009.09.001>
- Cervera, M., Cabezas, J., & Martínez, J. (2002). *Análisis genético de la vid*.
- Chalmers, K. J., Waugh, R., Sprent, J. I., Simons, A. J., & Powell, W. (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*. <https://doi.org/10.1038/hdy.1992.151>
- de Galarreta, J. I. R., Barandalla, L., Rios, D. J., Lopez, R., & Ritter, E. (2011). Genetic relationships among local potato cultivars from Spain using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9583-3>
- Demirel, U., Tındaş, İ., Yavuz, C., Baloch, F., & Çalışkan, M. (2018). Assessing genetic diversity of potato genotypes using inter-PBS retrotransposon marker system. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*.
- Hawkes, J. G., & Francisco Ortega, J. (1993). The early history of the potato in Europe. *Euphytica*. <https://doi.org/10.1007/BF00029633>
- Hijmans, R. J. (2001). Global distribution of the potato crop. *American Journal of Potato Research*. <https://doi.org/10.1007/BF02896371>
- Huaman, Z., Williams, J. T., Salhuana, W., & Vincent, L. (1977). *Descriptors for the Cultivated Potato*.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Karp, A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*. <https://doi.org/10.1023/A:1009612517139>
- Kalendar, Antonius, K., Smýkal, P., & Schulman, A. H. (2010). iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1398-2>
- Kalendar, Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., & Schulman, A. (1999). IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s001220051124>
- Kalendar, R., Amenov, A., & Daniyarov, A. (2019). Use of retrotransposon-derived genetic markers to analyse genomic variability in plants. *Functional Plant Biology*. <https://doi.org/10.1071/FP18098>
- Kalendar, Schulman, R., & H, A. (2014). Molecular Plant Taxonomy. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9>
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K. V., Ayad, W. G., & Hodgkin, T. (1997). *Molecular*

tools in plant genetic resources conservation.

- Kırdök, E., & Özden Çiftçi, Y. (2015). Retrotransposon Marker Systems as a Tool to Analyze Molecular Diversity of Mediterranean Pistacia Species. *International Journal of Agriculture and Biology*. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0132>
- Lara Cabrera, S. I., & Spooner, D. M. (2004). Taxonomy of North and Central American diploid wild potato (*Solanum* sect. *Petota*) species: AFLP data. *Plant Systematics and Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00606-004-0185-4>
- McGregor, C. E., Lambert, C. A., Greyling, M. M., Louw, J. H., & Warnich, L. (2000). A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*. <https://doi.org/10.1023/A:1003925620546>
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., & Waugh, R. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*. <https://doi.org/10.1023/A:1009633005390>
- Milovanov, A., Zvyagin, A., Daniyarov, A., Kalendar, R., & Troshin, L. (2019). Genetic analysis of the grapevine genotypes of the Russian Vitis ampelographic collection using iPBS markers. *Genetica*. <https://doi.org/10.1007/s10709-019-00055-5>
- Onamu, R., Solano, J. P. L., Castellanos, J. S., Rodríguez de la, O., & Nieto, J. P. (2012). Análisis de marcadores morfológicos y moleculares en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*.
- Phillips, W., Rodríguez, H., & Fritz, P. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*).
- Ríos, D. (2012). Las papas antiguas de Canarias: origen y diversidad. *Agricultura En Canarias. Conciliando Tradición y Ciencia*.
- Ríos, D., Ghislain, M., Rodríguez, F., & Spooner, D. M. (2007). What is the origin of the European potato? Evidence from Canary Island landraces. *Crop Science*. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.05.0336>
- Ruiz De Galarreta, J. I., Barandalla, L., Lorenzo, R., Gonzalez, J., Rios, D. J., & Ritter, E. (2007). Microsatellite variation in potato landraces from the island of La Palma. *Spanish Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.5424/sjar/2007052-5360>
- Schulman, A. H. (2013). Retrotransposon replication in plants. *Current Opinion in Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.009>
- Spooner, D. M., Bryan, G. J., Berg, R., & Del Rio, A. (2003). Species concepts and relationships in wild and cultivated potatoes. *Acta Horticulturae*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.619.8>
- Spooner, & Hetterscheid, W. (2007). *Origins, Evolution, and Group Classification of Cultivated Potatoes*. <https://doi.org/10.13140/2.1.4715.3601>
- Spooner, Núñez, J., Trujillo, G., del Rosario Herrera, M., Guzmán, F., & Ghislain, M. (2007). Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709796104>

- Thermo Scientific. (2000). *NanoDrop 2000 / 2000c Spectrophotometer*.
- Waugh, R., McLean, K., Flavell, A. J., Pearce, S. R., Kumar, A., Thomas, B. B. T., & Powell, W. (1997). Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genetics*.
<https://doi.org/10.1007/s004380050372>
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., & Schulman, A. H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2165>
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., Orjeda, G., Guzman, F., Torres, M., Lozano, R., Ponce, O., Martinez, D., De la Cruz, G., Chakrabarti, S. K., Patil, V. U., Centre, W. U. & R. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature10158>
- Yasmin, S., Islam, M. S., Nasiruddin, K. M., & Alam, M. S. (2006). Molecular Characterization of Potato Germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. In *Biotechnology(Faisalabad)*.
<https://doi.org/10.3923/biotech.2006.27.31>
- Zhang, H., Xu, F., Wu, Y., Hu, H. hai, & Dai, X. feng. (2017). Progress of potato staple food research and industry development in China. *Journal of Integrative Agriculture*. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61736-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61736-2)