

NOTA TÉCNICA

CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES EN CULTIVARES DE PAPA

CONDITIONS FOR AMPLIFICATION MICROSATELLITES IN POTATO CULTIVARS

Martha Osorio Delgado*, Ariadne Vegas García*, Alexis Marques Urdaneta** y Lourdes González Pérez***

*Investigadoras y **Técnicos Asociados a la Investigación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Zona Universitaria. Maracay 2101, estado Aragua.

***Investigadora. INIA Mérida, Venezuela. Correo electrónico: mosorio@inia.gov.ve

RESUMEN

La identificación de cultivares de papa, *Solanum tuberosum* L., es de suma importancia para el manejo de bancos de germoplasma, programas de mejoramiento genético, análisis de diversidad genética, procesos de micropropagación y producción de semilla. Por su alto grado de polimorfismo, los microsatélites (SSR) han demostrado ser una herramienta muy poderosa para análisis de variabilidad, además es reproducible. El objetivo del trabajo fue estandarizar las condiciones para la amplificación de ADN utilizando cuatro accesiones provenientes del Banco de germoplasma del INIA-Mérida usando marcadores microsatélites. La extracción del ADN se realizó con un rápido, económico y confiable método. De los 24 iniciadores propuestos para estudios de diversidad se seleccionaron por su mayor contenido polimórfico 12 marcadores. Los productos amplificados se resolvieron en geles de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio. Se probaron diferentes métodos utilizados en estudios previos para diversidad genética e identidad en papa, siendo la de reducciones en las concentraciones de Taq polimerasa, cloruro de magnesio e iniciadores, así como en los tiempos del perfil térmico, la que permitió obtener patrones de fragmentos de ADN nítidos, precisos y reproducibles. Se establecieron concentraciones óptimas de 0,2 U de Taq polimerasa, 1,5 mM de MgC₁₂ y 0,2 μM de iniciadores y se redujo 30 min en cada amplificación, obteniéndose una mayor eficiencia por reacción. De los 12 iniciadores, cuatro fueron seleccionados basados en su polimorfismo y la calidad de los fragmentos de ADN amplificados.

Palabras Clave: *Solanum tuberosum* L.; marcadores moleculares; banco de germoplasma; SSR; diversidad.

SUMMARY

The identification of cultivars of potato, *Solanum tuberosum* L., is critical for the management of genebanks, breeding programs, genetic diversity analysis, processes micropropagation and seed production. Because of its high degree of polymorphism, microsatellites (SSR) have proved a powerful tool for analysis of variability is also reproducible. The objective was to standardize the conditions for DNA amplification using four accessions from the germplasm bank of INIA-Merida using microsatellite markers. DNA extraction was performed with a fast, economical and reliable method. Of the 24 primers proposed diversity studies were selected for their higher content polymorphic 12 markers. The amplified products were observed in gels of 3% agarose, stained with ethidium bromide. We tested different methods used in previous studies for genetic diversity and identity in potato, being it possible to obtain DNA fragment patterns sharp, accurate and reproducible one whose optimum concentrations was 0.2 U of Taq polymerase, 1.5 mM MgC₁₂ and 0.2 μM of primers and 30 min decreased over time in each amplification, yielding greater efficiency per reaction. Of the 12 primers, four were selected based on their polymorphism and the quality of the amplified DNA fragments.

Key Words: *Solanum tuberosum* L.; molecular markers; germoplasm bank; SSR; diversity.

INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares han contribuido a un mayor conocimiento genético en muchas especies vegetales, entre las cuales se incluye la papa *Solanum tuberosum* L. Además, permiten seleccionar de manera eficiente individuos con características específicas, incluso en fases tempranas o juveniles, comparar diferentes materiales promisorios y monitorear nueva diversidad en programas de mejoramiento genético (Egúzquiza, 2000).

Los marcadores de ADN utilizados para la identificación varietal a través de la huella genética, constituyen una herramienta precisa y complementaria a los métodos convencionales de identificación, basados en observaciones morfológicas y estudios fotoquímicos (Orona-Castro *et al.*, 2006).

La caracterización molecular de los materiales de papa constituye la base para iniciar trabajos de mejoramiento genético que permitan dar respuesta a la creciente exigencia de nuevos cultivares, con resistencia a plagas y enfermedades, altos niveles de producción y calidad culinaria (Colman *et al.*, 2009).

El uso de los marcadores microsatélites (SSR) para estudios de diversidad genética en papa, es de suma importancia para el manejo de los bancos de germoplasma (colecciones núcleo, detección de duplicados), en programas de mejoramiento genético, en la micropropagación y en la producción de papa semilla (Norero *et al.*, 2003). Su amplia utilización está soportada en su base genética codominante, su abundancia en el genoma, rapidez y sencillez; alto grado de polimorfismo y alta reproducibilidad entre laboratorios (Norero *et al.*, 2002; Norero *et al.*, 2003; Izpizúa *et al.*, 2003; Mathias *et al.* 2004; Merino, 2006).

El objetivo de este estudio fue estandarizar las condiciones para la amplificación de ADN mediante SSR, utilizando cuatro cultivares de papa pertenecientes al Banco de germoplasma *in vitro* del INIA-Mérida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN: Para la extracción del ADN genómico se utilizaron vitroplantas de cuatro accesiones pertenecientes al Banco de germoplasma del INIA-Mérida (Cuadro 1). Los cultivares Fri papa INIA, María Bonita y Tibisay fueron liberadas por el INIA, mientras que Monserrate forma parte del grupo de cultivares

comerciales de mayor preferencia por parte de los agricultores de las zonas altas de Venezuela. Los mismos se procesaron de acuerdo a la metodología propuesta por Zambrano *et al.* (2002).

CUADRO 1. Cultivares de papa del Banco de Germoplasma *in vitro* del INIA-Mérida, utilizados en la estandarización de las condiciones para la amplificación de ADN mediante microsatélites, indicando el código de registro del CIP y del INIA, respectivamente.

Cultivar	Código CIP	Código INIA
Monserrate	720071	003
Fripapa INIA	388790.24	007
María Bonita	388676.1	013
Tibisay	-----	059

Fuente: Registros INIA-Mérida.

Cuantificación del ADN

La concentración del ADN se evaluó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml), esta determinación se hizo tanto de manera visual (por comparación con marcadores estándares de ADN de lambda no digerido) como digitalizada mediante el uso del programa Quantity One del Chemi Doc (marca BIO RAD).

Amplificación de SSR en los materiales de papa

Para la estandarización de la metodología de amplificación de los ADNs con el uso de SSR, se utilizaron metodologías descritas en estudios de identidad y diversidad genética en papa, entre ellas la propuesta por Norero *et al.* (2003); Mathias *et al.* (2004); Ghislain *et al.* (2004); Feingold *et al.* (2005); Marchezi *et al.* (2010). Se probaron en la forma originalmente descrita y con modificaciones tanto en la mezcla de amplificación como en los tiempos de los perfiles de temperatura (Cuadros 2 y 3).

De los 24 iniciadores propuestos para estudios de diversidad e identidad genética en papa (Ghislain *et al.*, 2004; Feingold *et al.*, 2005; Marchezi *et al.*, 2010), para este estudio se seleccionaron 12 por su alto índice de contenido polimórfico (Cuadro 4), los cuales se probaron con el ADN de las cuatro accesiones seleccionadas. Los

ciclos de amplificación se llevaron a cabo utilizando un termociclador modelo Gene Pro marca BIOER.

Separación de los productos amplificados: Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa MS8 al 3%, en buffer TBE 1X y corrido en TBE 0,5X, en condiciones de 100 V, 45 mA y 5 W (Osorio *et al.*, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología de extracción del ADN genómico de los cultivares de papa utilizados, permitió obtener altas concentraciones de ADN por gramo de tejido foliar, además, los ADN obtenidos fueron de alta calidad y pureza óptimo para la amplificación por SSR (Figura 1).

CUADRO 2. Mezclas de amplificación del ADN utilizadas para SSR en papa, en un volumen total de 25 µl.

Mezcla de amplificación	CIP (Ghislain <i>et al.</i> , 2004)	INTA (Feingold <i>et al.</i> , 2005)	EMBRAPA (Marchezi <i>et al.</i> , 2010)
Buffer	1X	1X	1X
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 mM	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Primer Izq.	0,5 µM	100 µM	0,3 µM
Primer Der.	0,5 µM	100 µM	0,3 µM
Taq. Pol	1 U	0,5 U	1 U
ADN	10 ng	50 ng	20 ng

Fuente: Ghislain *et al.*, 2004; Feingold *et al.*; 2005; Marchezi *et al.*, 2010.

CUADRO 3. Perfiles térmicos utilizados para microsatélites en papa, según la metodología probada.

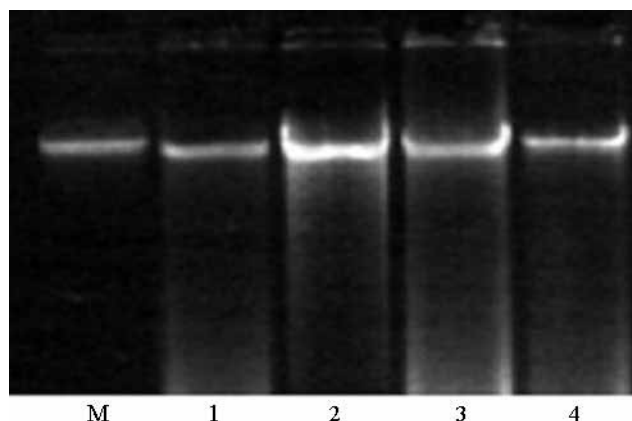
Perfil térmico (Ghislain <i>et al.</i> , 2004)	Perfil térmico (Feingold <i>et al.</i> , 2005)	Perfil térmico (Marchezi <i>et al.</i> , 2010)
3 min a 94 °C	3 min a 94 °C	2 min a 94 °C
2 min a temperatura de acoplamiento	0 min	0 min
1 min y 30 seg a 72 °C	0 min	0 min
29 Ciclos:	30 Ciclos	29 Ciclos:
1 min a 94 °C	1 min a 94 °C	1 min a 94 °C
2 min a temperatura de hibridación	2 min a temperatura de hibridación	2 min a temperatura de hibridación
1 min y 30 seg a 72 °C	1 min a 72 °C	1 min y 30 seg a 72 °C
5 min a 72° C	5 min a 72 °C	5 min a 72 °C

Fuente: Ghislain *et al.*, 2004; Feingold *et al.*; 2005; Marchezi *et al.*, 2010.

CUADRO 4. Iniciadores para diversidad genética en papa utilizados en este estudio, indicando el nombre del locus, índice de contenido polimórfico (PIC), motivo repetitivo, secuencia, ubicación en los cromosomas y temperatura de hibridación (TH).

Locus	PIC	Motivo repetitivo	Secuencia 5'-3'	Crom.	TH(°C)
STM 0019	0,8808	(AT)7(GT)10(AT)4(GT)5(GC)4(GT)4	AATAGGTGTACTGACTCTCAATG TTGAAGTAAAAGTCCTAGTATGTG	VI	47
STM 2022	0,7531	(CAA)3...(CAA)3	GCGTCAGCGATTTTCAGTACTA TTCAGTCAACTCCTGTTGCG	II	53
STM 1049	0,7531	(ATA)6	CTACCAGTTTGTGATTGTGGTG AGGGACTTTAATTTGTTGGACG	I	57
STM 0031	0,7714	(AC)5...(AC)3 (GCAC)(AC)2 (GCAC)2	CATACGCACGCACGTACAC TTCAACCTATCATTGTTGAGTCG	VII	57
STM 1052	0,8320	(AT)14 GT (AT)4 (GT)6	CAATTTTCGTTTTTCATGTGACAC ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA	IX	50/60
STM 2013	0,8728	(TCTA)6	TTCGGAATTACCCTCTGCC AAAAAAGAACGCACG	VII	55
STM 1104	0,8916	(TCT)5	TGATTCTCTTGCCTACTGTAATCG CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA	VIII	57
STM 1016	0,7757	(TCT)9	TTCTGATTTTCATGCATGTTCC ATGCTTGCCATGTGATGTGT	VIII	53
STM 3012	0,6944	(CT)4, (CT)8	CAACTCAAACCAGAAAGGCAAA GAGAAATGGGCACAAAAACA	IX	57
STM 1106	0,8216	(ATT)13	TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG ATGCGAATCTACTCGTCATGG	X	55
STM 0037	0,7865	(TC)5(AC)6 AA(AC)7 (AT)4	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC ATTTGGTTGGGTATGATA	XI	53
STM 0030	0,8641	Compuesto (GT/GC)(GT)8	AGAGATCGATGTAAAACACGT GTGGCATTGATGGATT	XII	53

Fuente: Merino, 2006; Ghislain *et al.*, 2004



(M=Marcador lambda; 1=Monserrate; 2=Fri papa INIA; 3=María bonita; 4=Tibisay).

FIGURA 1. Análisis electroforético de la calidad de ADN extraído en los cultivares de papa en estudio, comparados con 100 ng de ADN de lambda no digerido.

La metodología de amplificación de ADN de papa mediante SSR descrita por Ghislain *et al.* (2004) con reducciones en las concentraciones de Taq polimerasa, cloruro de magnesio ($MgCl_2$) e iniciadores en la mezcla de reacción, así como en el tiempo en que se cumplió el perfil térmico del proceso de amplificación, fue la que permitió, en nuestro laboratorio y con los reactivos empleados, la obtención de patrones de fragmentos de ADN nítidos, precisos y reproducibles (Cuadros 5 y 6).

En las modificaciones realizadas a la metodología de amplificación de ADN de papa mediante SSR descrita por Ghislain *et al.* (2004), se determinaron las concentraciones óptimas de 0,2 U de Taq polimerasa, 1,5 mM de $MgCl_2$ y 0,2 μM de iniciadores, así como un tiempo de desnaturalización inicial de 2 min de hibridación 1,5 min y alargamiento de 1 min en el perfil térmico, manteniéndose constantes las temperaturas de hibridación sugeridas para cada iniciador (Cuadro 4).

CUADRO 5. Mezcla de amplificación del ADN, en un volumen total de 25 µl, modificada en este estudio.

Mezcla de amplificación	Metodología modificada
Buffer (10X)	1X (Promega Corp.)
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM (Promega Corp.)
dNTP's (10 mM)	0,2 mM (Promega Corp.)
Primer izq. (10 mM)	0,2 µM (Bio Source)
Primer der. (10 mM)	0,2 µM (Bio Source)
Taq. Polimerasa	0,2 U GoTaq Flexi (Promega)
ADN	10 ng

CUADRO 6. Comparación de los perfiles térmicos y tiempos de desnaturalización, hibridación y elongación para la amplificación del ADN, en un volumen total de 25 µl, según la metodología original y la modificada en este estudio.

Perfil térmico	Perfil térmico (modificado)
3 min a 94 °C	2 min a 94 °C
2 min a temperatura de hibridación	
1 min y 30 seg a 72 °C	
29 Ciclos:	29 Ciclos:
1 min a 94 °C.	1 min a 94 °C.
2 min a temperatura de hibridación	1,5 min a temperatura de hibridación
1 min y 30 seg a 72 °C	1 min a 72 °C
5 min a 72 °C	5 min a 72 °C

Fuente: Ghislain *et al.*, 2004.

Todas las metodologías probadas en este estudio, con las cantidades de reactivos indicadas en las mezclas de amplificación y los tiempos en los perfiles térmicos, permitieron la amplificación de los microsatélites de ADN de los cultivares de papa utilizados, sin embargo, con las modificaciones realizadas no sólo se disminuyeron los costos y los tiempos de las reacciones, sino que además los patrones de fragmentos de ADN obtenidos fueron más nítidos, precisos y reproducibles.

De los 12 iniciadores microsatélites de alto índice de contenido polimórfico utilizados en este estudio, los

patrones de fragmentos de ADN obtenidos con los iniciadores STM-0019, STM-3012, STM-2022 y STM-2013, permitieron discriminar los cuatro cultivares de papa estudiados (Figura 2).

Con los iniciadores STM-3012, STM-2022, STM-2013, se logró de uno a dos fragmentos de ADN, según el cultivar; mientras que con el iniciador STM-0019 se amplificaron hasta cinco fragmentos de ADN y se obtuvo un patrón particular y específico para cada cultivar. No obstante, a pesar de que los tres primeros iniciadores definieron un máximo de dos fragmentos de ADN, permitieron hacer diferenciaciones entre los cultivares empleados en este estudio, además, todos los fragmentos amplificados con estos iniciadores fueron nítidos, intensos y reproducibles. Los ocho iniciadores restantes describieron patrones de fragmentos de ADN monomórficos, en todos los casos para los cuatro cultivares estudiados.

La selección del sistema de amplificación de ADN mediante el uso de microsatélites en papa, se basó en: **1.** la calidad (definición e intensidad) de fragmentos de los productos amplificados por evaluación visual en gel de agarosa, el nivel de polimorfismo y su reproducibilidad; **2.** el ajuste de las cantidades de Taq polimerasa e iniciadores en la mezcla de amplificación modificada, las cuales fueron menores al compararlas con las recomendadas para estudios de microsatélites en papa (Norero *et al.*, 2003; Mathias *et al.*, 2004; Ghislain *et al.*, 2004; Feingold *et al.*, 2005; Marchezi *et al.*, 2010), lo que es importante si se considera que la disminución en las cantidades de reactivos importados de elevado precio, sobretodo en el caso de la Taq polimerasa, redundan en un menor costo por reacción; **3.** La disminución en el tiempo en que se cumplieron los perfiles térmicos de la amplificación fue aproximadamente 30 min. cuando se compararon con los protocolos de Ghislain *et al.* (2004); Feingold *et al.* (2005) y Marchezi *et al.* (2010), haciendo que hubiese mayor eficiencia por amplificación.

Los iniciadores STM-0019, STM-3012, STM-2022 y STM-2013, pueden ser ampliamente usados para la identificación y la determinación de la diversidad existente en las accesiones de papa conservadas en los bancos de germoplasma de papa del país. El uso de un reducido número de iniciadores para la determinación de diversidad e identidad genética en cultivos es soportado por estudios como los de Reid y Kerr (2007) y Marchezi *et al.* (2010), quienes utilizaron apenas seis y dos iniciadores microsatélites para determinar la diversidad existente en 400 y 14 genotipos de papa, respectivamente.

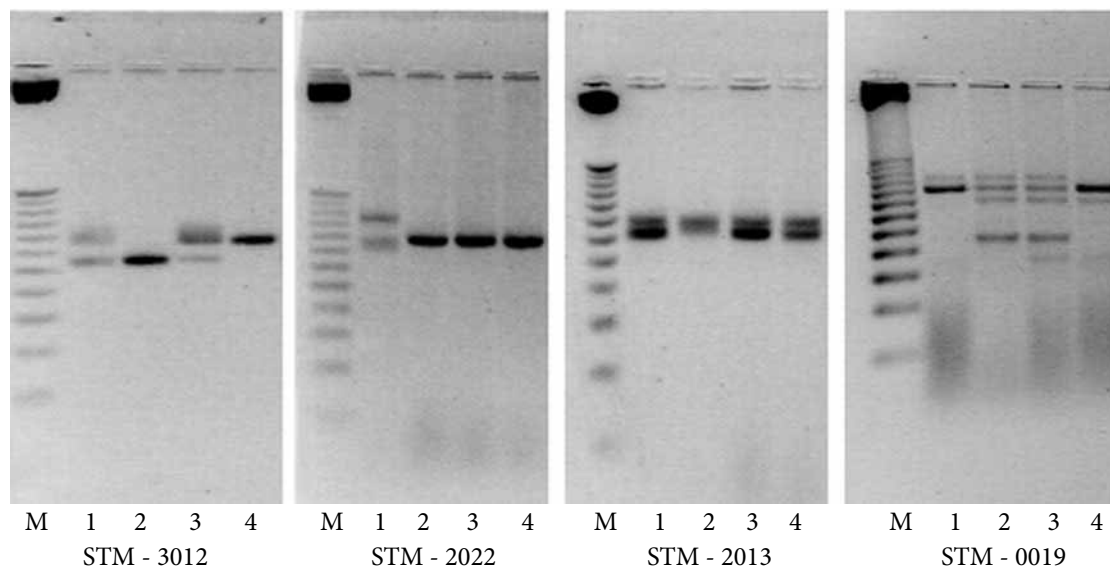


FIGURA 2. Geles de agarosa mostrando los productos de amplificación de los cuatro cultivares *in vitro*, con los iniciadores STM-3012, STM-2022, STM-2013 y STM-0019 (M= marcador 25 pb DNA step ladder de Promega, 1= Monserrate, 2= Fripana INIA, 3= María bonita y 4= Tibisay).

El iniciador STM-0019 fue capaz de definir patrones que mostraron hasta 5 fragmentos de ADN por patrón electroforético, siendo el iniciador más polimórfico, de más alto poder discriminatorio para las accesiones utilizadas, y con potencial para identificar cultivares y/o patrones únicos en nuestros materiales.

CONCLUSIÓN

- La metodología modificada en este estudio redujo los costos por reacción y demostró ser más eficiente, debido a que con menor cantidad de reactivos en la mezcla de amplificación y disminución de los tiempos en el perfil térmico, permitió la obtención de patrones de fragmentos de ADN nítidos, precisos y reproducibles, similares a los observados en otros estudios con microsatélites en papa. Por lo tanto, puede ser ampliamente usada para determinar la identidad y diversidad genética existente en las papas nativas y cultivares comerciales conservados en parcelas de agricultores (as) y en los bancos de germoplasma *in vitro* e *in vivo* del país.
- Los resultados obtenidos constituyen la base para iniciar trabajos de caracterización molecular que complementen la caracterización morfológica tradicional requerida para la selección de materiales promisorios, para apoyar los programas de certificación

de semillas, la determinación de patentes, e identificación y selección de nuevos cultivares a utilizar en los programas de mejoramiento genético de papa.

- Se recomienda la utilización de los cuatro iniciadores STM-0019, STM-3012, STM-2022 y STM-2013 para la identificación y la determinación de la diversidad del resto de las accesiones de papa del Banco de Germoplasma del INIA-Mérida, basado en la calidad de los fragmentos de ADN y el polimorfismo obtenido.

BIBLIOGRAFÍA

- Colman, S. L., M. C. Monti, S. B. Divito, A. Digilio y S. E. Feingold. 2009. Marcadores funcionales asociados al endulzamiento inducido por frío en papas nativas de Argentina. *Revista Latinoamericana de la Papa* 15(1):61-65
- Egúsqiza, B. R. 2000. La papa: Producción, transformación y comercialización. CIMAGRAF S.R.L. PRISMA-PPA. Perú 192 p.
- Feingold, S., J. Lloyd, N. Norero, M. Bonierbale and J. Lorenzen. 2005. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 11(1):456-466.

- Ghislain, M., D. M. Spooner, F. Rodríguez, F. Villamón, J. Núñez, C. Vásquez and R. Waugh. 2004. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 108:881-890.
- Ispizúa, V., A. Clausen, R. Guma y S. E. Feingold. 2003. Estudio de la diversidad genética en variedades nativas de *Solanum tuberosum* L. ssp. Andígena mediante la utilización de microsatélites. UNMDP-EEA-Balcarce. INTA., CC.276. Balcarce-Buenos Aires, Argentina. *Biología Molecular y Genética*.
- Mathias, M., J. Kalazich y B. Sagredo. 2004. Identificación de cultivares de papa a través de marcadores SSR en Chile. Suplemento Revista Latinoamericana de la papa **In: XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP)**. ISSN:1019-6609.
- Marchezi R. P., T. de Campos, A. C. Barbosa de Sousa, D. A. Sforça, G. A. Montan Torres e A. Pereira de Souza. 2010. Identificação de cultivares de batata por marcadores moleculares. *Pesq. agropec. Bras.* 45(1):15-28.
- Merino, C. G. 2006. Divergencia de Loci Microsatélites entre Papas Silvestres y Cultivadas (Familia Solanaceae, Género *Solanum* sección Petota). Tesis para optar al título de Biólogo, Mención Biología Celular y genética. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
- Norero, N. S., M Huarte y S. E. Feingold. 2003. Microsatélites: Potente herramienta para la identificación de cultivares de papa. **In: IV Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, Mar del Plata, Argentina 10-14 de nov. 2003.**
- Norero, N., J. Mallevile, M. Huarte y S. E. Feingold. 2002. Identificación de cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante amplificación de microsatélites. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), CC276, Balcarce-Buenos Aires, Argentina. *Biología Molecular y Genética* www.biologia.org
- Osorio, M., A. Vegas y A. Marques. 2005. Estandarización de las condiciones para la separación electroforética de productos amplificados por microsatélites (SSRs) en materiales de papa. CENIAP HOY N° 8. Disponible en: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n8/arti/osorio_m/osorio_m.htm
- Orona-Castro, F., V. Pecina-Quintero, M. A. Rocha-Peña, M. A. Cadena-Hinojosa, O. Martínez de la Vega e I. H. Almeyda-León. 2006. Caracterización molecular de genotipos comerciales y élite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México. *Agricultura Técnica en México* 32(2):171-180
- Reid, A. and E. M. Kerr. 2007. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. *Plant Genetic Resources* 5:7-13.
- Zambrano, A. Y., J. R. Demey, G. Martínez, F. Fuenmayor, Z. Gutiérrez, G. Saldaña y M. Torrealba. 2002. Método rápido, económico y confiable de minipreparación de ADN para amplificaciones por RAPD en Bancos de Germoplasma. *Agronomía Trop.* 52(2):235-243.