

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Integración de marcadores microsatélites en el mapa
ultradenso de *solanum tuberosum* y su comparación
con el de *solanum phureja***

TESIS

Para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Yerisf Carla Torres Ascurra

ASESORES

M.Sc. Giovanna Sotil

Ph D. Gisella Orjeda

Lima – Perú

2012

DEDICATORIA

*A la persona que más admiro en el mundo,
mi madre, por su enorme fortaleza y
por todo el amor que me brinda.*

*A mi padre por su constante e
incondicional apoyo
y a mis eternas compañeras,
mis hermanas Yozi y Nela.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, de manera especial a mis padres Zoraya y Carlos, porque aunque a la distancia, siempre pude contar con ellos, recibir sus consejos y su invaluable apoyo. A mi hermana Yozi, pues me acogió en su hogar y me hizo sentir en familia y a mi hermana Nela, por todos los momentos de alegría que hemos compartido.

A la Ph. D. Gisella Orjeda por darme la oportunidad de realizar la tesis bajo su asesoría. Y al mismo tiempo a Frank Guzmán, por haberme permitido formar parte del laboratorio, y por todo el apoyo que me ha brindado.

A mi asesora interna, Giovanna Sotil, por su inmensa colaboración, por todos los consejos y recomendaciones que recibí de ella y por su continuo apoyo.

A Paty y Diana, pues me hicieron sentir como en casa cuando ingrese al laboratorio, me ayudaron, aconsejaron y fueron una gran compañía. A Edgar, Roberto, Michael, Ceci, Melissa, Sr. Germán, por ser unos grandes compañeros, por su ayuda y todas las facilidades que me brindaron.

A mis amigos Ingrid, Aling, Mildred y Galina porque siempre estuvieron y están para mí, por su constante apoyo y por su amistad.

Finalmente expreso mi sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que estando involucradas o no, hicieron posible la culminación de este trabajo de investigación.

ABREVIATURAS

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

CTAB: Cetil trimetil bromuro de amonio

DArT: Diversity array technology

cDNA: DNA complementario

DM1-3516R44: Individuo doble monohaploide de la especie *S. phureja*.

EST: Expressed Sequence Tags

FAOSTAT: Estadísticas de la FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations).

LOD: Likelihood of odds

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PGSC: Potato Genome Sequencing Consortium

PIC: Índice de contenido polimórfico

QTL: Quantitative trait loci

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SCRI: Scottish Crop Research Institute

SH83-92-488: Parental femenino de la población SH x RH de *S. tuberosum*.

RH89-039-16: Parental femenino de la población SH x RH de *S. tuberosum*.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeat

UHD: Ultra High Density

WGS: Whole Genome Shotgun

ÍNDICE GENERAL

CARÁTULA.....	i
CONTRACARÁTULA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
1. LA PAPA.....	5
1.1. LAS PAPAS CULTIVADAS.....	6
a. <i>Solanum tuberosum</i>	7
b. <i>Solanum phureja</i>	8
2. MEJORAMIENTO GENÉTICO.....	9
3. MARCADORES GENÉTICOS Y MARCADORES MOLECULARES.....	10
3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES.....	12
3.2. LOS MARCADORES MICROSATÉLITES O SSR (REPETICIONES DE SECUENCIA SIMPLE).....	14
a. Características y Aplicaciones.....	16
3.3. DESARROLLO DE MARCADORES MICROSATÉLITE EN PAPA.....	17
4. MAPAS GENÉTICOS O DE LIGAMIENTO.....	19
4.1. Conceptos y definiciones.....	19
4.2. Principios básicos en la cartografía genética.....	20
4.3. Distancia genética y funciones de cartografía.....	22
4.4. Formación de los grupos de ligamiento.....	24
4.5. Programas informáticos para la cartografía genética.....	24
5. CONSTRUCCIÓN DE UN MAPA GENÉTICO CON MARCADORES MOLECULARES.....	25
5.1. Población de cartografía.....	25
5.2. Elección de la población de segregación.....	26
5.3. Tamaño de la población.....	27
5.4. Selección del marcador molecular.....	27
6. MAPAS DE ALTA DENSIDAD Y DE ULTRA ALTA DENSIDAD.....	28
7. LA CARTOGRAFÍA GENÉTICA EN PAPA.....	29

8. COLINEALIDAD, SINTENIA Y CARTOGRAFÍA GENÉTICA COMPARATIVA	32
8.1. Colinealidad y Sintenia.....	32
8.2. Cartografía genética comparativa	32
III. HIPÓTESIS.....	35
IV. OBJETIVOS	35
1. OBJETIVO GENERAL	35
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
1. MATERIAL BIOLÓGICO	36
2. MÉTODOS.....	37
2.1. Extracción de DNA.....	37
2.2. Evaluación de la calidad y cuantificación de DNA.....	37
2.3. Marcadores e Iniciadores.....	37
2.4. Estandarización de las condiciones de la PCR	41
2.5. Evaluación del polimorfismo en los marcadores microsatélites	43
2.6. Registro de bandas	44
2.7. Elaboración de los archivos de entrada.....	44
2.8. Determinación de la ubicación cromosómica de los SSRs	47
2.9. Representación el mapa UHD en centiMorgans.....	48
2.10. Comparación de los mapas genéticos de <i>S. tuberosum</i> y <i>S. phureja</i>	48
VI. RESULTADOS.....	49
1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL DNA Y CUANTIFICACIÓN	49
2. CONDICIONES DE PCR	49
3. POLIMORFISMO Y SEGREGACIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES.....	50
4. SEGREGACIÓN DE LOS LOCI EN LA POBLACIÓN SHXRH.....	55
5. POSICIONAMIENTO E INTEGRACIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES EN EL MAPA UHD DE <i>SOLANUM TUBEROSUM</i>	57
6. COMPARACIÓN DE LOS MAPAS GENÉTICOS RH89-039-16 (<i>Solanum tuberosum</i>) Y DM1-3516R44 (<i>Solanum phureja</i>).....	67
VII. DISCUSIÓN	82
VIII. CONCLUSIONES	87
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

RESUMEN

La papa, es el cultivo no cereal más importante del mundo con una producción mundial que ha alcanzado los 329 millones de toneladas anuales. A pesar de la enorme importancia de este cultivo, aún se desconocen aspectos sobre la genética de muchas de sus características cualitativas y cuantitativas. El mapa UHD (> 10 000 AFLPs) de *Solanum tuberosum*, ha sido una herramienta de gran utilidad para el proyecto de secuenciación del genoma de la papa, que se enfocó inicialmente en el individuo RH89-039-16. Sin embargo, debido a su heterocigocidad se optó por una línea doble monohaploide de la especie *S. phureja* (DM1-3516R44), para lo cual fue necesario la construcción *de novo* de un mapa genético. Con la finalidad de identificar cambios en la estructura genómica de estos dos individuos, se analizaron 74 marcadores microsatélites cartografiados previamente en DM1-3516R44, lográndose integrar 62 loci microsatélite en el mapa UHD de RH89-039-16. La comparación de los mapas genéticos de RH89-039-16 y DM1-3516R44 reveló la existencia de colinealidad en grandes fragmentos de los cromosomas II, V y VI, mientras que los cromosomas I, IV, X y XII presentan diferencias en cuanto al contenido de ciertos marcadores. Los cromosomas VII y IX muestran la presencia de rearrreglos cromosómicos que podrían ser inversiones o translocaciones, además la presencia de loci duplicados en los cromosomas VIII, I y II, indicaría la ocurrencia de eventos de duplicación intra e intercromosómica. Sin embargo para verificar tales cambios es necesario cartografiar más microsatélites y saturar la zona cromosómica de interés.

Palabras clave: Papa, marcador molecular, microsatélite, cartografía genética, mapa UHD, colinealidad.

ABSTRACT

Potato is the most important non-grain food crop in the world, with production in 2009 reaching 330 million tons. Despite the importance of the potato in the world, the genetics of many important qualitative and quantitative agronomic traits are poorly understood. The UHD map (>10 000 AFLP markers) of *Solanum tuberosum*, was a great tool for the Potato Genome Sequencing Project (clon RH89-039-16). However due to the high heterozygosity of RH89-039-16, it was decided to sequence the *S.phureja* doubled monoploid clone, DM1-3 516R44, for which it was necessary the *de novo* construction of a genetic map. Microsatellites markers mapped in DM was mapped in the UHD map, with two purposes, integrate microsatellites in the UHD map, and identify changes in the chromosomal organization of *Solanum tuberosum* (RH89-039-16) and *Solanum phureja* (DM1-3516R44), by comparison of their genetic maps. The alignment of microsatellites of RH89-039-16 and DM1-3516R44 maps along chromosomes has shown the existence of collinearity in the chromosomes II, V and VI, while the chromosomes I, IV, X and XII has shown differences in content of some markers. The chromosomes VII y IX has shown the presence of chromosomal rearrangements that could be inversions or translocations, further the presence of duplicated loci in chromosomes VIII, I and II might indicate that of intra- and interchromosomal duplications have occurred. However in order to verify these alterations would be necessary mapping more microsatellite markers and saturate the chromosomal region of interest.

Key words: potato, molecular marker, microsatellite, genetic mapping, UHD map, collinearity.

I. INTRODUCCIÓN

La papa es el tercer cultivo más importante a nivel alimentario (después del arroz y el trigo) con una producción mundial de 329 millones de toneladas anuales (FAOSTAT, 2009). En el Perú, es el principal cultivo en superficie sembrada y representa el 25% del PBI (Producto Bruto Interno) agropecuario, base de la alimentación de la zona andina y producido por 600 mil pequeñas unidades agrarias (MINAG, 2009).

A nivel mundial, su producción se ha incrementado a una tasa media anual del 4,5 por ciento, aunque en los últimos años está atravesando por grandes cambios. El año 2005, la producción de la papa de los países en desarrollo excedió a la de los países desarrollados, y representa actualmente más de la mitad de la producción mundial. Sin embargo, el principal productor de papa en el mundo es China y junto a la India representan la tercera parte de la producción mundial (FAOSTAT, 2009).

Este cultivo tiene un alto rendimiento, capaz de crecer en climas hostiles, de gran calidad nutricional y una diversidad de usos culinarios. La papa es una fuente rica de proteínas de alta calidad, vitamina C y otras vitaminas esenciales, y elementos traza; también tiene constituyentes como las antocianinas, carotenoides y compuestos fenólicos, los cuales son potentes antioxidantes y benéficos para la salud del hombre (Singh y Kaur, 2009).

Desafortunadamente, el cultivo de papa está constantemente amenazado por numerosos patógenos, entre ellos *Phytophthora infestans* que constituye el patógeno de mayor importancia que puede ocasionar daños a toda una cosecha, llegando a provocar pérdidas de 3 mil millones de dólares al año (Haverkort *et al.*, 2008). Es así que los objetivos claves de los programas de mejoramiento buscan optimizar su

producción en condiciones de estrés biótico y abiótico (heladas, sequías, suelos salinos, inundación), explotando la enorme diversidad genética que tiene este cultivo. Existen muchas especies nativas y silvestres de papa que presentan un amplio rango de resistencias a pestes, enfermedades, estrés ambiental, con características nutritivas superiores que las convierten en recursos muy útiles para el mejoramiento y desarrollo de nuevos cultivares.

Es indudable la importancia mundial de la papa, sin embargo la genética de las características cualitativas y cuantitativas de interés agronómico y de calidad es poco comprendida. Esto se debe principalmente a la naturaleza tetraploide de su genoma, el alto grado de heterocigotidad y la ausencia de líneas homocigotas (Visser *et al*, 2009). En tal sentido, es necesario conocer la genómica estructural y funcional de este cultivo para poder desarrollar estrategias de mejoramiento realmente eficientes.

Los marcadores moleculares representan una de las tecnologías más importantes para el análisis de los genomas, nos permiten asociar variaciones genómicas y características heredables de interés agronómico y de calidad, que resultan importantes dentro de un programa de mejoramiento. Además, la construcción de mapas genéticos empleando marcadores moleculares constituye un prerrequisito para estudiar la genética de características cualitativas y cuantitativas (van Os *et al.*, 2006), localizar genes simples y QTL que controlan caracteres de importancia (Ferreira y Grattapaglia, 1998) y es indispensable para estudiar la estructura de un genoma. Es así que hasta hoy ningún organismo superior ha sido secuenciado sin tomar como referencia de alguna manera u otra un mapa de ligamiento.

Dentro de los tipos de marcadores moleculares empleados para la construcción de mapas de ligamiento, los microsatélites ofrecen varias ventajas, entre ellas su comportamiento codominante, multialelismo, el alto nivel de polimorfismo, simplicidad

de trabajo, el bajo requerimiento de la cantidad y la calidad de DNA, gran distribución en el genoma y su reproducibilidad (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Milbourne *et al.*, 1998).

El primer mapa genético de papa fue construido en 1988 (Bonierbale *et al.* 1988), utilizando los marcadores RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism). Desde entonces, se han desarrollado diversos mapas utilizando otros tipos de marcadores tales como los AFLPs - Amplified Fragment Length Polymorphism (van Eck *et al.*, 1995) y los SSRs - Simple Sequence Repeats (Milbourne *et al.*, 1998; Feingold *et al.*, 2005; Ghislain *et al.*, 2004; Ghislain *et al.*, 2008). Estos primeros mapas de ligamiento fueron construidos con un limitado número de marcadores moleculares.

El primer mapa genético ultra denso (Ultra high density - UHD) de *Solanum tuberosum* que contiene más de 10 000 marcadores AFLPs fue recién construido por Van Os *et al.* en el 2006. Este último representó una herramienta de gran utilidad para el proyecto de secuenciación del genoma de la papa, ya que permitió anclar secuencias genómicas en posiciones genéticas y así construir posteriormente el mapa físico.

En el año 2006, el PGSC inició el secuenciamiento de un individuo diploide heterocigota RH89-039-16 de *S. tuberosum*, utilizando una estrategia jerárquica Bac x Bac, la tecnología Sanger y el mapa UHD. Sin embargo, debido a la dificultad en el ensamblaje y extensión de “contigs” (conjunto de secuencias de DNA que se sobrelapan entre sí) causada por la heterocigotidad del genotipo RH89-039-16, se decidió abandonar esta estrategia y secuenciar un nuevo genotipo.

Este nuevo individuo fue DM1-3516R44 (DM), una línea doble monohaploide de la especie *S. phureja*, es decir un diploide homocigote que resultó de la duplicación de un

genoma haploide (de Richard Veilleux, Virginia Tech, USA). Este nuevo genotipo se secuenció usando una estrategia “Whole Genome Shotgun (WGS)” con tecnología Solexa y 454 (Margulies *et al.*, 2005).

Debido a la estrategia WGS empleada durante el proceso de secuenciamiento de DM, ha sido necesario construir su mapa genético *de novo*, que permita ordenar las secuencias genómicas. En primer lugar se desarrolló una población segregante haciendo un retrocruce de F1 (DMxDI) con DI (especie *S. goniocalyx*), y se desarrollaron abundantes marcadores moleculares (SSR o Simple Sequence Repeats, DARTs o Diversity Arrays Technology, y SNPs o Single Nucleotide Polimorfisms).

Se identificaron un total de 550 marcadores SSR a partir de las 500 secuencias genómicas más grandes (*scaffolds*). De estos, 100 fueron asignados a la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú) para su análisis correspondiente en la población (DM x DI) x DI, y la posterior construcción del mapa genético.

En el presente trabajo, los microsatélites cartografiados en DM (*Solanum phureja*) serán posicionados en el mapa UHD usando la población SH x RH, generada del cruce de dos individuos heterocigotos dihaploides de *Solanum tuberosum* (Roupe Van Der Voort *et al.*, 1997). Este análisis nos permitirá integrar marcadores microsatélites en el mapa UHD e identificar cambios en la estructura genómica de DM1-3516R44 y RH89-039-16 mediante la comparación de sus mapas genéticos.

II. MARCO TEÓRICO

1. La papa

La papa es una planta herbácea que produce tubérculos como parte de su sistema de tallos, siendo éstos los principales órganos de almacenamiento. La papa pertenece a la familia *Solanacea*, conformada por más de 3000 especies. El género *Solanum* (dividido en siete subgéneros) es uno de los más importantes económicamente dentro de esta familia, que incluye a especies como papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*S. lycopersicum*), berenjena (*S. melongena*), ajíes, pimientos y otras frutas menores como el pepino (*S. muricatum*), y el aguaymanto (Spooner y Salas, 2006). Dentro de este género, las papas silvestres y cultivadas se encuentran en el subgénero *Potatoe*, en la sección *Petota* que comprende aproximadamente 188 especies silvestres y 7 especies cultivadas (Spooner y Salas, 2006).

La mayor parte de las 188 especies de papas silvestres son raras y endémicas, y están distribuidas en 16 países, desde el sur oeste de los Estados Unidos hasta la costa central de Chile. Las papas cultivadas nativas crecen principalmente en los Andes, desde Venezuela hasta Argentina, y en la parte central de Chile. Entre las especies silvestres y cultivadas, se encuentran marcadas diferencias morfológicas. Estas diferencias también son muy notables entre las especies cultivadas y dentro de cada una de ellas. La morfología de la papa puede ser afectada por factores ambientales como la temperatura, el fotoperíodo, humedad y la fertilidad del suelo (Huamán, 1986).

El Perú es el país con mayor diversidad de papas en el mundo, al contar con 8 especies nativas domesticadas y 2,301 de las más de 4,000 variedades que existen en Latinoamérica. Además, nuestro país posee 91 de las 200 especies que crecen en forma silvestre en casi todo nuestro continente (y que generalmente no son comestibles) (MINAG, 2010).

1.1. Las papas cultivadas

La papa cultivada tiene sus orígenes en el área del lago Titicaca, en la región de los Andes del Perú, donde comenzó la domesticación de las papas silvestres. Se cree que la papa tiene un origen único a partir de una especie silvestre del complejo *S. brevicaula* (Spooner *et al.*, 2005). Su expansión como un cultivo de importancia alimenticia mundial comenzó durante la conquista española, se asume que las más tempranas introducciones de papas cultivadas a Europa provinieron de los Andes y de la costa de Chile (Bradshaw y Bonierbale, 2010).

Inicialmente cobró interés a nivel botánico, siendo estudiada en invernaderos con intereses y propósitos médicos. Su potencial como cultivo alimenticio fue por primera vez visto en Irlanda, a finales del siglo XVII y durante el siglo XVIII, país en el cual representó un cultivo de mucha importancia alimenticia. El cultivo de la papa se expandió en todo el mundo durante el siglo XIX, así como en China y la India durante la segunda mitad del siglo XX (Bradshaw y Bonierbale, 2010).

Entre las papas cultivadas, según Hawkes (1990), existen siete especies y siete subespecies, *S. ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. phureja subsp. phureja*, *S. phureja subsp. estradae*, *S. phureja subsp. hygrothermicum*, *S. stenotomum subsp. stenotomum*, *S. stenotomum subsp. goniocalyx*, *S. tuberosum subsp. andigenum*, and *S. tuberosum subsp. tuberosum*.

Sin embargo esta taxonomía no es universalmente aceptada. En el 2002, Huamán y Spooner, estudiaron las diferencias morfológicas entre las papas cultivadas nativas, y sus resultados los llevaron a reconocer a todas las papas cultivadas como una sola especie *S. tuberosum*, con ocho grupos: Ajanhuiri, Andigenum, Chaucha, Chilotanum, Curtilobum, Juzepczukii, Phureja, y Stenotomum.

a. *Solanum tuberosum*

Posición taxónomica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Sección: Petota

Especie: *Solanum tuberosum*

(Hawkes, 1990)

Característica e importancia

Solanum tuberosum es una especie cultivada tetraploide, con un número cromosómico de $2n=4x=48$. Es cultivada en todo el mundo, y es la especie de mayor importancia económica dentro de las papas cultivadas. Se divide en dos subespecies poco diferentes: *S.t. andigena* adaptada a las condiciones de días cortos, cultivada principalmente en los andes, y *S.t.*

grupo *tuberosum* que hoy se cultiva en todo el mundo y que está adaptada a días más prolongados (FAO, 2008)

b. *Solanum phureja*

Posición taxónomica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Sección: Petota

Especie: *Solanum phureja*

(Hawkes, 1990)

Características e importancia

Solanum phureja es una especie cultivada diploide ($2n=2x=24$), adaptada a día corto, y cuyo tubérculo no presenta dormancia (Ghislain *et al.*, 2006). Esta especie crece en los Andes, desde el oeste de Venezuela hasta la parte central de Bolivia, a una altura entre los 2000 y 3400 msnm (Ochoa, 1990). Es una especie con gran potencial de incorporación de variabilidad y características como resistencia a enfermedades y tolerancia al calor. Los agricultores de América del Sur la cultivan debido a su rendimiento y vigor regional superior (Owen, 1987).

2. Mejoramiento genético

El mejoramiento genético de plantas es un área dinámica de la ciencia aplicada. Se basa en la variación genética y utiliza la selección para gradualmente mejorar caracteres de la planta que son de interés para el agricultor y el consumidor.

El mejoramiento tradicional de las plantas se refiere al uso eficiente de variabilidad presente en material vegetal disponible y a la mejora continua de las variedades cultivadas. Otro modo de mejorar los cultivos consiste en introducir un nuevo material genético (genes de resistencia, de calidad nutricional) proveniente de especies relacionadas o no (van Berloo, 2000).

Con el mejoramiento genético de las plantas se espera contribuir sustancialmente a aumentar la productividad agrícola. Esto se debe hacer mediante la obtención de variedades que estabilicen su producción a través de la resistencia o tolerancia a malezas, a daños causados por plagas y enfermedades, a la sequía, al calor, a heladas, u otros factores negativos. Además, estas variedades deben poseer una mayor eficiencia fisiológica en la absorción de nutrientes; deben ser capaces de aprovechar mejor el agua, los fertilizantes, y en general deben poseer características que tiendan a controlar las fluctuaciones extremas de los rendimientos.

El uso de marcadores moleculares para rastrear loci y regiones genómicas de diversos cultivos es ahora aplicado de manera rutinaria en muchos programas de mejoramiento genético. Para que un marcador sea eficiente en un programa de mejoramiento, debe estar fuertemente ligado a un loci de interés y debe ser capaz de detectar polimorfismo. Entre las aplicaciones de los marcadores tenemos su probada utilidad para seleccionar a parentales adecuados de cruces, la eliminación de defectos genéticos específicos en germoplasma élite; además los marcadores

moleculares han ayudado a los científicos a entender el control genético de caracteres complejos como la calidad y la adaptación al ambiente (Langridge y Chalmers, 2005).

La construcción de mapas genéticos es considerada una de las aplicaciones de mayor impacto del uso de marcadores moleculares, en el análisis genético de especies y potencialmente en el mejoramiento de plantas (Ferreira y Grattapaglia, 1998). La disponibilidad cada vez mayor de un gran número de marcadores genéticos neutros y altamente polimórficos, ha permitido la construcción de mapas de ligamiento de varias especies vegetales.

La construcción de mapas genéticos con alta cobertura del genoma tiene varios propósitos dentro del mejoramiento genético vegetal (Semagn *et al.*, 2006a):

- Análisis genético detallado de características cuantitativas y cualitativas.
- Localización de genes de importancia y QTLs.
- Introgresión de genes de interés, mediante una selección asistida por marcadores.
- Clonamiento posicional de genes de interés.

3. Marcadores genéticos y marcadores moleculares

El concepto de los marcadores genéticos no es nuevo, Gregorio Mendel empleó marcadores genéticos basados en fenotipo para sus experimentos con guisantes en el siglo XIX. Posteriormente el uso de los estos marcadores fenotípicos en *Drosophila melanogaster* por Alfred Sturtevant y Morgan llevó al establecimiento de la teoría del ligamiento genético (Agarwall *et al.*, 2008). Según Griffiths *et al.* (2000),

un marcador genético es una variante alélica que es usada para diferenciar o marcar una estructura biológica o proceso a través del curso de un experimento.

Se han desarrollado muchos sistemas de marcadores genéticos, los que se han agrupado generalmente en tres tipos: 1) marcadores morfológicos, que usualmente son características fenotípicas visibles; 2) marcadores bioquímicos, llamados isoenzimas o aloenzimas, que son polimorfismos en ciertos tipos de enzimas; 3) marcadores moleculares (o de DNA), son marcadores que revelan sitios de variación en el DNA (Segman *et al.*, 2006).

La mayor desventaja que presentan los marcadores morfológicos y bioquímicos es que están limitados en número y son en muchos casos influenciados por factores ambientales. Además su expresión puede estar restringida a etapas específicas de desarrollo o tejido. Los marcadores moleculares son actualmente los más ampliamente usados, debido a su abundancia y especialmente porque los más modernos pueden ser automatizados, tales como los que se apoyan en el secuenciamiento y en la PCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa (Farooq y Azam, 2002).

Un marcador molecular es definido como un segmento particular del DNA que permite detectar diferencias a nivel genómico entre plantas u organismos, que podrían o no correlacionarse con la expresión fenotípica de una característica. Los marcadores moleculares van a revelar diferencias genéticas, llamadas polimorfismos, y pueden ser codominantes o dominantes, dependiendo de si pueden discriminar entre homocigotos y heterocigotos.

Un tipo de marcador molecular ideal debe tener las siguientes características: (1) ser polimórfico y eventualmente estar distribuido a lo largo del genoma, (2) proveer

una adecuada resolución de las diferencias genéticas, (3) simple, rápido y de bajo costo, (4) requerir pequeñas cantidades de DNA, (5) específico de un locus y (6) no requerir información *a priori* acerca del genoma de determinado organismo. Sin embargo, ningún tipo de marcador molecular es ideal para todas las situaciones. Cada técnica difiere de otra, respecto a características importantes como la abundancia genómica, el nivel de polimorfismo detectado, la especificidad de locus, la reproducibilidad, los requerimientos técnicos y el costo (Agarwal *et al.*, 2008). Debido a esto, la elección del marcador depende principalmente de la finalidad de la investigación, de la especie o individuo en estudio, y de las capacidades del laboratorio.

3.1. 3.1. Clasificación de los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares pueden ser clasificados en 2 grupos en base al método de análisis que se usa:

a. Marcadores moleculares basados en hibridización.

- Marcadores RFLPs (Restriction fragment length polymorphism): Fueron por primera vez usados en 1975 para detectar el polimorfismo en secuencias de DNA de Adenovirus, y cartografiar una mutación sensible a la temperatura (Grodzicker *et al.*, 1975). El polimorfismo es detectado por hibridización de una sonda de DNA marcada químicamente con fragmentos de DNA genómico digeridos por endonucleasas de restricción. De esta manera se generan diferentes perfiles de fragmentos de DNA, debido a sustituciones nucleotídicas u otro tipo de variación en la secuencia. Los marcadores RFLPs son relativamente de alto polimorfismo, tienen herencia codominante y son reproducibles, sin embargo la técnica requiere bastante tiempo, es

costosa por el tipo de reactivos que emplea y necesita DNA de alta calidad (Semagn *et al.*, 2006).

- Marcadores Minisatélites: De manera similar a los RFLPs, el desarrollo de los minisatélites involucra la digestión del DNA genómico con enzimas de restricción. Los minisatélites consisten en repeticiones en “tandem” que frecuentemente se muestran polimórficas en longitud, debido a un evento de recombinación desigual. Estos marcadores son altamente polimórficos y en su momento fueron muy usados para pruebas forenses y de paternidad, sin embargo actualmente han sido reemplazado por otros marcadores basados en PCR, debido principalmente a la complejidad de su procedimiento y a sus requerimientos de cantidad y calidad de DNA (Schlötterer, 2004).

b. Marcadores moleculares basados en la Reacción Cadena de Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica que permite amplificar pequeñas cantidades de DNA fuera de un organismo vivo. Fue inventada en 1993 por Kary Mullis, y en ese entonces, por primera vez cualquier región genómica podía ser amplificada y analizada en varios individuos, sin los requerimientos de clonación o de grandes cantidades de DNA de alta calidad. Desde entonces la PCR ha permitido el desarrollo de varios tipos de marcadores moleculares.

- Marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Esta técnica amplifica fragmentos de DNA de cualquier especie sin conocimiento *a priori* de la secuencia. Para generar estos marcadores se emplean iniciadores arbitrarios de 10 bp (pares de bases) que tiene una temperatura de alineamiento constante. La técnica es muy útil debido a

que no requiere información de la secuencia para el desarrollo de iniciadores y tampoco el desarrollo de sondas. Es una técnica simple, rápida y de bajo costo, sin embargo es dominante y existen problemas con su reproducibilidad (Arif *et al.*, 2010)

- Marcadores AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism): La técnica fue desarrollada en 1993 (Zabeau y Vos), consiste esencialmente en una combinación de RFLP y PCR, en la cual se digiere enzimáticamente el ADN y se ligan adaptadores a los fragmentos derivados. De esta manera los fragmentos pueden ser amplificados por PCR. El marcador AFLP es dominante, requiere DNA de buena calidad y es técnicamente demandante. Una característica útil de los AFLPs es que se genera un alto número de bandas, sin embargo se podrían generar problemas de homoplasia.

3.2. Los marcadores microsatélites o SSR (Repeticiones de Secuencia Simple)

Los microsatélites o SSR, fueron reportados como un sistema de marcadores en combinación con el PCR, por primera vez en 1989 por tres grupos independientes (Weber y May, 1987; Tautz, 1989; Litt y Luty, 1989). Con la información inicial del borrador del genoma humano, se determinó que los microsatélites representan el 3% del genoma. Estos marcadores son iteraciones de un motivo nucleotídico de 1 a 6 bp (pares de bases). Las repeticiones mono-, di-, tri- y tetranucleotídicas son las más comunes, mientras que las repeticiones penta- y hexanucleotídicas son las de menor frecuencia (Ellegren, 2004).

La variación en número de las unidades repetidas en “tandem” de estos marcadores, se debe al deslizamiento o “slippage” de la DNA polimerasa durante la replicación del DNA. Los errores generan inserciones o deleciones de pares de bases, que resultan respectivamente en regiones de mayor o menor longitud. Debido a que el proceso de “slippage” durante la replicación es más probable que las mutaciones puntuales, los *loci* de microsatélites tienden a ser hipervariables y se los considera dentro del tipo de secuencias más variables en el genoma (Agarwal *et al.*, 2008).

El aislamiento de microsatélites se puede hacer por varios métodos. La búsqueda en bibliotecas genómicas por hibridización con sondas conteniendo repeticiones y el secuenciamiento de aquellos clones con hibridización positiva fue el método tradicional, aunque laborioso y costoso. El uso de bibliotecas enriquecidas para secuencias microsatélite es una estrategia recomendada para disminuir el costo del desarrollo de estos marcadores, mientras se incrementa la oportunidad de identificar marcadores. Sin embargo, para especies con disponibilidad de base de datos de secuencias genómicas, un enfoque más práctico, económico y fácil es la búsqueda de la secuencia de microsatélites en estos bancos de datos.

Una de las mayores desventajas de los marcadores microsatélites es que necesitan ser aislados *de novo* en la mayoría de las especies que se analizan por primera vez. Los microsatélites se encuentran usualmente en regiones no codificantes, por lo que la estrategia de diseñar iniciadores universales no funciona completamente bien para este tipo de marcadores. Sin embargo, se ha reportado que algunos microsatélites tienen regiones flanqueantes muy conservadas, lo que permite amplificar estos microsatélites en especies divergentes (Zane *et al.*, 2002).

Las repeticiones más frecuentes son las dinucleotídicas seguidas por las mono y tetranucleotídicas, y con menor frecuencia están las repeticiones trinucleotídicas. El motivo dinucleotídico más frecuente es (CA)_n, y está seguido en frecuencia por (AT)_n, (GA)_n y (GC)_n. Estudios genómicos en ratón indican que la abundancia de los microsatélites se mantiene entre mamíferos, además se ha demostrado que la densidad de estos marcadores es proporcional al tamaño del genoma (Tóth *et al.*, 2000; Ellegren, 2004).

En plantas, de manera contraria se ha determinado que la densidad de los microsatélites está inversamente relacionada con el tamaño del genoma, y su frecuencia es mayor en regiones transcritas que en el DNA genómico (Morgante *et al.*, 2002). Se ha estimado que la frecuencia de los SSR es de uno por cada 6-7 kb; además también se conoce que los motivos más comunes de SSR en plantas son los ricos en A/T, siendo la repetición de dinucleótido más común AT seguido de AG, en contraste con lo encontrado en mamíferos donde el dinucleótido más común es AC/TG (Lagercrantz *et al.* 1993; Morgante y Olivieri, 1993; Cardle *et al.*, 2000).

a. Características y Aplicaciones

Con el advenimiento de la PCR, el análisis y genotipificación de los microsatélites se volvió más simple (Litt y Luty, 1989). Ferreira y Grattapaglia, 1998 y Milbourne *et al.*, 1998 proponen que los microsatélites ofrecen muchas ventajas frente a otros marcadores moleculares y tienen características muy útiles tales como:

- Son numerosos y se distribuyen ampliamente a lo largo de todo el genoma.

-
- Se heredan de modo mendeliano como marcadores codominantes, lo que facilita el seguimiento de su transmisión dentro de poblaciones de mapeo.
 - Son multialélicos y tienen un alto nivel de polimorfismo.
 - La mayoría de los loci microsatélite tienen un tamaño relativamente pequeño.
 - Son transferibles entre linajes o especies próximas, esta característica los hace muy útiles para estudios de genómica comparativa.
 - Poseen simplicidad de trabajo.
 - Tienen bajos requerimiento de cantidad y calidad DNA.
 - Son altamente reproducibles.

Debido a estas características favorables, los microsatélites rápidamente se han convertido en los marcadores de elección para la cartografía genética, mejoramiento asistido por marcadores, estudios de genética poblacional, evolución, diversidad genética y áreas relacionadas (Ellegren, 2004). En la genética humana, el desarrollo de la tecnología de los microsatélites fue un paso clave para el clonamiento posicional subsecuente de numerosos genes responsables de enfermedades monogénicas (Kong *et al.*, 2002; Gortari *et al.*, 1998). La alta sensibilidad de la PCR hizo de los microsatélites el método de elección para estudios forenses, análisis de muestras tomadas de modo no invasivo y análisis de diminutos insectos (Schlötterer, 2004).

3.3. Desarrollo de marcadores microsatélite en papa

Veilleux *et al.* (1995) fueron los primeros en reportar el uso de microsatélites en papa. A partir de secuencias genómicas publicadas en bases de datos se obtuvieron siete microsatélites con los cuales se caracterizaron la composición genética de plantas de papa derivadas de cultivo de anteras de un individuo

diploide (*Solanum chacoense* × *S. phureja*). Schneider y Douches (1997) usaron estos mismos iniciadores para caracterizar 39 cultivares de *S. tuberosum subsp. tuberosum* de importancia comercial en Norte América.

Provan *et al.* (1996) desarrollaron un trabajo similar con cultivares europeos, para lo cual realizaron una búsqueda de microsatélites en bases de datos de secuencias de papa, encontrándolos en las regiones no codificantes de 24 genes analizados, diseñaron iniciadores y lograron amplificar 19 marcadores microsatélites polimórficos para *S. tuberosum*. Además utilizaron iniciadores desarrollados para tomate y amplificaron 17 microsatélites también polimórficos en *S. tuberosum*.

En 1998, Milbourne *et al.*, empleando la base de datos del EMBL (The European Molecular Biology Laboratory) de ESTs (Expressed Sequence Tag) y la búsqueda en una librería genómica de *S. Tuberosum*, desarrollaron 112 microsatélites de papa. Posteriormente en el 2001, Ashkenazi *et al.*, construyeron 3 bibliotecas genómicas, 2 de ellas enriquecidas para las repeticiones ATT y GT, con lo que se obtuvieron 18 pares de iniciadores; 12 pares de iniciadores adicionales fueron obtenidos de una búsqueda que realizaron en base de datos de secuencia de papa. Ghislain *et al.* (2004, 2009) reportaron 13 y 30 SSRs nuevos respectivamente, y Feingold *et al.* (2005) por su parte reportaron 61 SSRs desarrollados a partir de base de datos de ESTs. En los últimos años, gracias al proyecto de secuenciamiento del genoma de la papa, fue posible identificar aproximadamente 550 marcadores microsatélites nuevos encontrados en secuencias genómicas grandes o *scaffolds* (PSGC, datos no publicados).

4. Mapas genéticos o de ligamiento

4.1. Conceptos y definiciones

El ligamiento es la tendencia que tienen los genes o marcadores para ser heredados juntos, debido a que están localizados juntos y en el mismo cromosoma, y se puede medir en términos de su fracción de recombinación o de su distancia genética. El análisis de ligamiento de marcadores es la base para la construcción de un mapa de ligamiento y su subsecuente uso en proyectos de secuenciamiento o para identificar QTLs.

Un mapa de ligamiento es una representación lineal de la probabilidad de ocurrencia de recombinación entre dos genes o marcadores, un mapa puede presentarse en forma de tabla o gráfico, la posición de genes o marcadores dentro de un grupo de ligamiento. La cartografía genética o *genetic mapping* en inglés determina la posición de marcadores moleculares o genes dentro de grupos de ligamiento en base a la segregación que presenten en la población (Duran *et al.*, 2008). El primer mapa genético fue publicado en 1913 por Alfred Sturtevant y Morgan (Griffiths, 2000), quienes mostraron la localización de seis genes ligados al cromosoma X en la mosca de la fruta. Los primeros mapas de ligamiento contenían, en la mayoría de casos, solo unos pocos marcadores morfológicos, generalmente genes para los cuales el fenotipo mutante era disponible (Stam, 1993).

La construcción de un mapa genético, empleando marcadores moleculares, nos permite organizar el genoma de las plantas, entender la evolución de las especies, identificar sintenia entre especies relacionadas y rearreglos del material genético entre taxa determinados. Además, un mapa genético permite identificar la

localización genética de regiones genómicas que gobiernan características de interés agronómico, y facilita el aislamiento de genes responsables de determinadas características de importancia económica (Paterson y Wing, 1993).

4.2. Principios básicos en la cartografía genética

La segunda Ley de Mendel, llamada ley de la segregación independiente, establece que durante la formación de los gametos, los alelos se separan de manera independiente para determinar la constitución filial del gameto. En algunos casos esta ley es adecuada, sin embargo existen muchas excepciones, originadas del fenómeno de ligamiento. Esta ley se aplica a genes cuyos loci están en diferentes cromosomas. Los genes cuyos loci están en el mismo cromosoma tienden a permanecer juntos dependiendo de la cercanía que existe entre ellos, y no segregan de manera independiente.

a. Recombinación

Durante la profase de la primera meiosis, los cromosomas homólogos están en pares con sus loci alineados, si consideramos el genotipo parental AB/ab, el alineamiento lo podríamos representar como se muestra en la figura 1. El DNA de los cromosomas alineados es duplicado para formar dos cromátides hermanas unidas a nivel de una región cromosómica denominada centrómero, formando un complejo denominado tétrada. Durante esta etapa de duplicación ocurre el intercambio de material genético en regiones denominadas quiasmas, donde cada quiasma representa un punto en el que un “crossing over” puede ocurrir. Este intercambio que origina nuevas combinaciones de alelos de marcadores y/o genes es llamado recombinación.

Cada gameto recibe una cromátide de la tétrada, y pueden ser AB o ab tales como los cromosomas parentales y son tipos no recombinantes (NR), o pueden ser Ab y aB y son denominados tipos recombinantes (R).

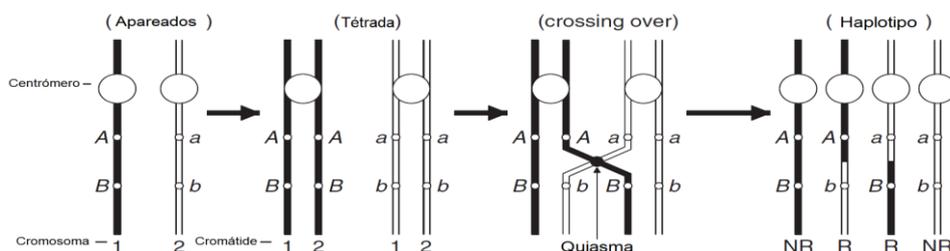


Figura 1. Diagrama del “crossing over” entre los dos loci (A y B) ligados.
NR: tipos no recombinantes, R: tipos recombinantes

Si existe ligamiento significa que se generarán más gametos AB y ab parentales, y menos gametos Ab y aB recombinantes. Si a la fracción de gametos recombinantes denominamos r , entonces la fracción de gametos parentales es $1-r$. Si r alcanzaría valores de $\frac{1}{2}$, esto sería equivalente a una segregación independiente o de no ligamiento. Es así que si dos loci se encuentran muy ligados, la frecuencia de que se presenten puntos de intercambio es baja, y por tanto la fracción de recombinación correspondiente también.

b. Análisis de dos y tres puntos

La frecuencia de eventos de recombinación que ocurren durante la meiosis es la base para calcular la distancia genética entre loci. Mientras menos eventos de recombinación ocurran entre dos loci cercanos físicamente, será menor la frecuencia de genotipos recombinantes. Para determinar la frecuencia de recombinación entre dos loci A y C, se divide simplemente el número de genotipos recombinantes entre el total de genotipos analizados. Este valor calculado de la frecuencia de recombinación solo considera los

productos recombinantes que resultarían de un número impar de crossovers entre los loci.

Cuando existe un locus adicional entre los loci A y C, productos recombinantes adicionales de un doble crossovers pueden ser detectados y esto podría cambiar la frecuencia de recombinación anterior. Si se considera un tercer locus B entre los loci A y C, para calcular las frecuencias de recombinación se debe proceder con análisis separados de dos puntos en los intervalos A→B y B→C, esta vez considerando los “crossovers” dobles. De este modo, se determina las frecuencias de recombinación entre los loci A - B, y B - C, y la frecuencia de recombinación entre los loci A y C corresponde a la suma de las frecuencias anteriores, que es mayor a la frecuencia calculada anteriormente, esto se debe a que en el análisis de tres puntos si se consideran los productos del “crossovers” doble.

4.3. Distancia genética y funciones de cartografía

Las distancias genéticas en un mapa se estiman a partir de la frecuencia de eventos de recombinación (r) entre loci. La estimación de las distancias genéticas, se realiza convirtiendo las frecuencias de recombinación en unidades de mapa o centiMorgans aplicando una función de cartografía que tiene en cuenta ciertas asunciones. Sin considerar tales asunciones, un centiMorgan (cM) es la distancia genética entre dos loci que tienen una frecuencia de recombinación de 1%, en general, la distancia genética en centiMorgans es numéricamente igual a la frecuencia de recombinación expresada como porcentaje.

Es importante tener en consideración que, debido al modo en que se calcula la frecuencia de recombinación, no es posible obtener más del 50% de genotipos

recombinantes, por lo que la distancia máxima que puede ser determinada entre dos genes es de 50cM. Si dos genes están distanciados más de 50cM, no se podría determinar si ellos residen en el mismo o en diferentes cromosomas, en este caso es necesario usar otras técnicas de cartografía o tener en cuenta otra evidencia para determinar la relación de ligamiento entre estos dos genes asociados distantemente. Es necesario hacer una corrección estadística de la relación que existe entre la frecuencia de recombinación y la distancia genética expresada en cM. Esto se debe a que a medida que la distancia entre dos loci se incrementa, también se incrementa la probabilidad de no detectar los doble “crossover”.

Afortunadamente los investigadores han desarrollado funciones de cartografía que corrigen este aspecto (Wu *et al.*, 2007). Existen dos funciones de cartografía. La función de Haldane (propuesta en 1919) asume que los “crossovers” ocurren al azar y de manera independiente sobre el cromosoma entero sin interferencia de otro crossover y la función de Kosambi (propuesta en 1944) permite una interferencia parcial y ajusta las distancias del mapa basándose en la interferencia la cual cambia la proporción de “crossovers” dobles (Wu *et al.*, 2007).

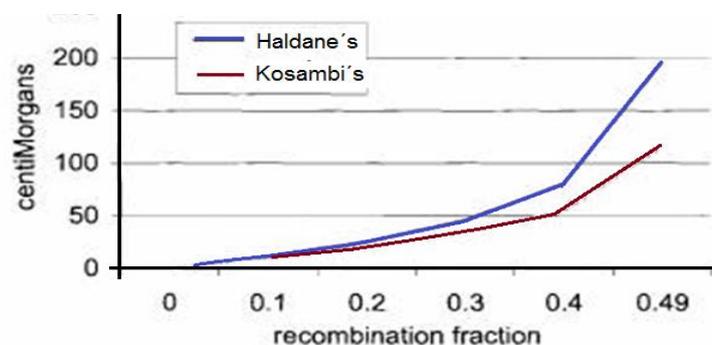


Figura 2. Comparación de las dos funciones de cartografía Kosambi y Haldane. En el eje de las abscisas se tienen la fracción de recombinación, mientras que en el eje de las ordenadas la distancia genética en centiMorgans. La diferencia entre ambas funciones se acentúa en cuanto la fracción de recombinación aumenta (Fuente: Mihavilovich *et al.*, 2008).

4.4. Formación de los grupos de ligamiento

Una vez que se han estimado las distancias entre cada par de loci, el paso siguiente es agrupar los loci en segmentos de cromosomas candidatos o grupos de ligamiento. De manera ideal el número de grupos de ligamiento debe igualar al número haploide de cromosomas de la especie en estudio. Si dos marcadores están significativamente ligados entonces pertenecen al mismo grupo.

El valor de *LOD* (*Likelihood of odds*) es una técnica ampliamente usada en la cartografía humana, animal y vegetal. El valor de LOD es el log (logaritmo) en base 10 de la relación de probabilidades bajo la hipótesis de ligamiento y no ligamiento. Por ejemplo, un valor de LOD de 3.0, significa que la probabilidad de que ocurra ligamiento a una distancia determinada o probabilidad de recombinación es 1000 veces mayor a que no ocurra ligamiento entre dos loci (Semagn *et al.* 2006).

El umbral del valor de LOD es determinante en la formación de los grupos de ligamiento, si este valor es muy alto se podría formar más grupos de ligamiento que el número cromosómico haploide, o de modo contrario si el umbral es muy bajo, marcadores de distintos cromosomas podrían ser asignados al mismo cromosoma (Semagn *et al.*, 2006).

4.5. Programas informáticos para la cartografía genética

Los avances en la informática han sido esenciales para el progreso de los mapas genéticos basados en un gran número de marcadores moleculares. El orden del ligamiento aún se basa en la máxima verosimilitud, es decir en el orden de marcadores que resulte en la distancia menor y que requiera el menor número de “crossovers”. Los mapas genéticos basados en marcadores de DNA pueden

llegar a miles de marcadores, por lo que se ha requerido un gran progreso en el desarrollo de programas de cartografía genética (Stam, 1993).

El programa más ampliamente usado para la cartografía genética es el programa MapMaker (Lander *et al.* 1987), el cual está basado en el concepto del valor de LOD (LOD significa logaritmo de odds). El programa JoinMap (Stam, 1993) es otro software muy empleado para el cálculo de mapas de ligamiento genético en poblaciones experimentales de especies diploides. Un análisis adicional que permite hacer este programa, es relacionar un mapa obtenido con otros mapas construidos a partir de otras poblaciones de mapeo, es decir, a diferencia de otros permite integrar mapas genéticos en base a marcadores moleculares comunes a ellos. En el 2006, se lanzó la cuarta versión del programa (Van Ooijen, 2006), basada en la versión 3.0 pero con una interface mejorada para usuario, y con varios nuevos métodos analíticos de utilidad.

5. Construcción de un mapa genético con marcadores moleculares

Para construir un mapa genético se requiere considerar los siguientes aspectos:

5.1. Población de cartografía

La población utilizada para construir un mapa de ligamiento es denominada comúnmente como *población de cartografía*. El desarrollo de esta población requiere en primera instancia la elección de los padres y el esquema de cruzamiento que estos tendrán. Esta decisión se debe fundamentar en los objetivos del experimento. Los padres de una población de cartografía deben diferir genéticamente no solo para la característica de interés, sino también para

los marcadores genéticos que sean empleados en la construcción del mapa. Maximizar la variación genética entre los padres es esencial para cartografiar un QTL de interés o para construir un mapa genético denso, ya que mientras mayor variación genética exista, será más sencillo encontrar marcadores informativos (polimórficos y segregantes) y por tanto construir mapas genéticos saturados (Semagn *et al.*, 2006).

5.2. Elección de la población de segregación

Luego de la elección de los padres de la población, se debe tener en consideración que tipo de población genética será empleada para la cartografía de ligamiento. Existen diferentes tipos de poblaciones genéticas. Entre las poblaciones más simples tenemos a la población F2 y la población Retrocruce o “Backcross” (Collard *et al.*, 2005).

Para originar la población F2, los padres (P1 y P2) con características contrastantes son cruzados originando una progenie F1, la cual es después autofecundada para producir una población segregante F2. Las ventajas de esta población es que son fáciles de desarrollar en especies que no tienen depresión por “inbreeding” y requieren poco tiempo pues solo son necesarias dos generaciones. La población Retrocruce o Backcross es generada por un retrocruce de individuos F1 con uno de los dos padres utilizados en el cruce inicial (P1 o P2). La elección del padre es determinada por la finalidad del experimento. La ventaja de esta población es que su desarrollo ocurre en solo dos generaciones.

5.3. Tamaño de la población

Determinar el tamaño de la población es un paso muy importante durante la construcción de un mapa genético. La resolución del mapa y la determinación del orden adecuado de los marcadores es largamente dependiente del tamaño de la población, en términos generales mientras más grande la población mejor la resolución del mapa. Es así que, poblaciones con menos de 50 individuos generan mapas de resolución pobre, por lo que se recomienda trabajar con un tamaño aproximado de 100 individuos (Semagn *et al.*, 2006).

5.4. Selección del marcador molecular

Otro requerimiento es el empleo de marcadores genéticos que revelen diferencias entre los padres, es decir marcadores polimórficos. Diversos marcadores moleculares pueden ser usados para construir un mapa de ligamiento, es así que RFLP, SSRs, EST (Expressed sequence tag), RAPD (Random amplified polymorphic), AFLP, DArT (Diversity array technology) y SNP, han sido usados para la construcción de mapas genéticos en varias especies de plantas. Cada marcador tiene ventajas y desventajas, como ha sido mencionado anteriormente. Los primeros marcadores empleados para construir un mapa de ligamiento fueron los RFLP. Posteriormente, con el desarrollo de marcadores basados en PCR, estos fueron los preferidos para la construcción de mapas de ligamiento (Collard *et al.*, 2005).

Los microsatélites han tenido un gran impacto en la construcción de mapas genéticos para diversas especies. Fueron empleados por primera vez, para construir un mapa genético detallado del genoma humano (Weissenbach *et al.*, 1992). El mapa resultante contenía 813 marcadores microsatélites agrupados en

23 grupos de ligamiento correspondientes a los 22 autosomas y al cromosoma sexual "X". Años más tarde, con la finalidad de refinar los intervalos de ligamiento, se aumentó el número de marcadores a 1267 marcadores, y el mapa resultante se ha empleado para cartografiar características mendelianas y en particular enfermedades humanas monogénicas (Gyapay *et al.* 1994).

6. Mapas de alta densidad y de ultra alta densidad (UHD)

Los primeros mapas genéticos publicados han sido de densidad baja a moderada, con un número menor a 300 marcadores y con un espacio entre marcadores mayor a 5 cM. Estos mapas, ciertamente útiles, tuvieron grandes limitaciones que se podían superar si se cartografiaba un mayor número de marcadores y se disminuía la distancia entre los marcadores (Mihavilovich *et al.*, 2008).

Los mapas densos son herramientas clave para varias aplicaciones importantes en investigación básica y aplicada. El hecho de que los mapas de alta densidad ofrecen una mayor probabilidad de cubrir todo el genoma con marcadores moleculares, asegura que cualquier gen de interés este ligado a por lo menos un marcador molecular y que de este modo sean útiles en programas de mejoramiento y de selección asistida. Los mapas genéticos UHD son mapas genéticos saturados, contruidos con miles de marcadores en vez de cientos de marcadores. Estos mapas ofrecen ventajas adicionales y facilidades sobre los mapas de alta densidad, ya que cubren de manera global el genoma entero y facilitan el anclaje de regiones genómicas grandes (van Os *et al.*, 2006).

Algunas de las limitaciones durante la construcción de estos mapas, es la baja velocidad de los programas de cartografía disponibles para la enorme cantidad de

data, la ocurrencia como en cualquier experimento de cartografía de errores, inconsistencia y datos incompletos. Debido a esto ha sido necesaria la creación de nuevos programas de cartografía más rápidos y menos susceptibles a algunos errores. Es así que, durante la construcción del UHD de papa, van Os y col (2005 a y b) desarrollaron dos programas, el programa RECORD que le permitió ordenar los marcadores dentro de los grupos de ligamiento, y SMOOTH, un método estadístico que le permitió remover los errores genotípicos.

7. La cartografía genética en papa

El primer mapa genético de papa fue construido por Bonierbale y col. en 1988. Este mapa fue desarrollado a partir de una población diploide del cruce de *S. phureja* x (*S. tuberosum* x *S. berthaultii*), utilizando 135 sondas de RFLP desarrolladas previamente para tomate (Bernatzky y Tanksley, 1986). El uso de estas sondas comunes permitió la comparación de ambos mapas genéticos de papa y tomate, reportándose que entre ambas especies, nueve cromosomas (I, II, III, IV, VI, VII, VIII, XI y XII) parecían no haber sido alterados por ningún rearrreglo cromosómico, y que los únicos cambios cromosómicos detectables fueron inversiones paracéntricas en los cromosomas V, IX y X. Un año más tarde Gebhardt *et al.* (1989), utilizando sondas RFLP de DNA genómico y cDNA (DNA complementario) construyeron un segundo mapa de ligamiento para papa en una población de retrocruce de *S. tuberosum*, en el que posicionaron 141 loci y cubrieron 690 cM del genoma.

Posteriormente, mapas de ligamiento de alta densidad, con más de 1000 marcadores (principalmente RFLPs), fueron construidos para tomate y papa (Tanksley *et al.*, 1992). Estos mapas desarrollados para ambas especies se basaron en un conjunto común de sondas, por lo que fue posible compararlos y determinar

con precisión el punto de rotura correspondiente a cinco inversiones cromosómicas que diferenciaban ambos genomas. Cuatro de las inversiones, involucraron el brazo corto de los cromosomas V, IX, XI y XII, mientras que una estaba presente en el brazo largo del cromosomas X.

Jacobs *et al.* (1995) desarrollaron un mapa genético integrando marcadores moleculares, morfológicos e isoenzimas. El mapa desarrollado tiene una longitud de 1120 cM y contiene 175 marcadores (10 morfológicos, 8 isoenzimas, y 92 derivados de secuencias de transposones y marcadores moleculares clásicos). Este mismo año van Eck *et al.*, desarrollaron un mapa basado en marcadores AFLP, con seis combinaciones de iniciadores, identificando 264 productos de amplificación segregantes que fueron mapeados y mostraron finalmente una distribución al azar en el genoma.

Milbourne *et al.* (1998) desarrollaron 112 pares de iniciadores para SSRs, de los cuales 98 mostraban ser polimórficos en un grupo de seis individuos. De estos, 65 SSRs fueron cartografiados en dos poblaciones distintas. Al mapa de la población MPI de *S. tuberosum* (Gebhardt *et al.* 1989), se incorporaron 47 loci de SSR, y en la población Germicopa (previamente no cartografiada) se cartografiaron 65 loci; 23 loci compartidos con el mapa de MPI, permitieron asignar las posiciones cromosómicas a los loci restantes.

En el 2005, Yamanaka *et al.* construyeron un mapa integrado para un población diploide de *S. tuberosum* utilizando marcadores previamente desarrollados, y nuevos marcadores funcionales denominados PBA (análogos relacionados al citocromo P450). Este trabajo evidenció la posibilidad de integrar marcadores mapeados anteriormente en diferentes poblaciones permitiendo evaluar y utilizar los recursos genéticos más eficientemente en programas de mejoramiento. Este mismo año,

Feingold *et al*, cartografiaron 61 microsatélites adicionales derivados de un base de datos de EST (Expressed sequence tag), localizándolos en mapas genéticos ya existentes; aumentando en más del 50% en número total de SSRs mapeados previamente en papa. Tres años más tarde, Ghislain y col (2009) cartografiaron microsatélites en tres poblaciones diploides distintas: PD (*S. tuberosum* x *S. phureja*), BCT (*S. phureja* x [*S. tuberosum* x *S. chacoense*]) y PCC1 (*S. chomatophilum* x [*S. paucissectum* x *S. chomatophilum*]). Esto le permitió construir un mapa integrado de microsatélites muy completo con 138 marcadores SSR cartografiados en 147 posiciones del mapa.

Los mapas genéticos anteriormente mencionados tienen un número limitado de marcadores moleculares, y es importante resaltar que la utilidad real de un mapa genético depende largamente de su densidad, es decir, del número de marcadores. Los mapas densos facilitan el clonamiento posicional de genes importantes, permiten la disección genética de QTL, el anclaje de secuencias genómicas con ubicación cromosómica desconocida, dentro del secuenciamiento de un genoma y son un gran apoyo en los estudios de sintenia. La importancia de estos mapas genéticos densos la vemos reflejada en el desarrollo que han tenido para diversos cultivos como el arroz (Harushima *et al.*, 1998), trigo (Boyko *et al.*, 2002), papa y tomate (Tanksley *et al.*, 1992), sorgo (Bowers *et al.*, 2003), entre otros.

En este contexto, van Os y col. en el 2006 construyeron un mapa genético ultradenso de AFLPs de *S. tuberosum*. La población de cartografía fue generada a partir de un cruce de dos genotipos diploides de *S. tuberosum* SH83-92-488 y RH89-039-16. Se emplearon un total de 131 combinaciones de iniciadores, resultando 10365 marcadores AFLPs. Sin embargo, este elevado número de marcadores hace que también se eleven los errores de registro, por lo que las distancias genéticas entre los marcadores podrían verse afectadas (incrementadas) por algún evento

falso de recombinación. Es por esto que optaron por organizar los marcadores en **bins**, definiendo un “bin” como la posición en el mapa genético con un único patrón de segregación y que está separado de bins adyacentes por un único evento de recombinación. Al ordenamiento de estos bins se le denominó “skeleton binmap”. Un bin puede contener un número “x” de marcadores cosegregantes, definiéndose así un patrón de segregación, denominado “bin signature” (van Os *et al.*, 2006).

8. Colinealidad, sintenia y cartografía genética comparativa

8.1. Colinealidad y Sintenia

Hace varios años, se definía la sintenia como la conservación del ligamiento de genes o marcadores en un cromosoma, en ausencia de un orden definido, mientras que el orden preservado de genes o marcadores en cromosomas de especies relacionadas se denominaba colinealidad (Coghlan *et al.*, 2005). En los últimos años el término sintenia viene siendo mal empleado como un sinónimo de colinealidad (McCouch, 2001). Sin embargo, a lo largo de la evolución, los rearrreglos cromosómicos originan la interrupción de esta sintenia. Se dice que una región cromosómica de una especie es sinténica con la región cromosómica de otra especie si están llevando dos o más genes o marcadores comunes.

8.2. Cartografía genética comparativa

La cartografía genética comparativa basada en el alineamiento de cromosomas usando marcadores moleculares comunes ayuda a los investigadores a trasladar la información de un mapa genético a otro, y permite la transferencia de conocimiento de un genoma a otro relacionado (Bennetzen y Devos, 2001). La cartografía genética comparativa se basa en el principio de conservación intra e

inter-familiar de genes homólogos a lo largo de cromosomas de diferentes especies eucariotas (Schmidt, 2000). La conservación del orden de genes o marcadores (colinealidad/sintenia) en regiones cromosómicas definidas de diferentes especies sugiere que estos segmentos cromosómicos probablemente derivan de un grupo de ligamiento ancestral (es decir que estos segmentos son homólogos).

Conforme aumenta la resolución de la cartografía comparativa, también pequeñas regiones de sintenia pueden ser reconocidas. Incrementando el número de marcadores podría ser posible documentar las relaciones cromosómicas entre genomas relacionados o entre especies distantes. Esto también nos daría información acerca de los mecanismos que llevaron a la evolución del genoma.

La comparación de mapas genéticos es un herramienta poderosa para conseguir información genética acerca de organismos relacionados, para inferir relaciones filogenéticas, y para evaluar hipótesis acerca de la evolución de familia de genes y el significado funcional de genes ortólogos (Tang *et al.*, 2008). Los genes ortólogos, son genes de diferentes especies que divergieron de un gen común ancestral en el momento de la especiación, estos genes normalmente retienen la misma función en el curso de la evolución.

La construcción de mapas genéticos en genomas de diferentes especies usando un grupo común de sondas de genes o de marcadores moleculares, nos permite explotar la investigación acumulada colectiva para cada especie en consideración, y esto sugiere la hipótesis acerca del origen y relaciones filogenéticas entre las especies, así como principios fundamentales de la evolución del genoma (Duran *et al.*, 2008). Además hace posible usar información estructural acerca de un genoma (el más estudiado) y hacer predicciones en el otro. En

particular, estos mapas ayudan en la eficiente localización de genes de interés y contribuyen al aislamiento y caracterización de estos genes.

El primer trabajo de cartografía genética comparativa en plantas fue desarrollado en miembros de la familia Solanaceae por Bonierbale y col (1988). Posteriormente en 2002, Doganlar *et al.* construyeron un mapa genético para *Solanum melongena* (berenjena), empleando marcadores desarrollados previamente para tomate. Esto le permitió realizar una comparación de ambos mapas, y evidenció la presencia de 28 rearrreglos cromosómicos, la conservación de largos segmentos cromosómicos, y la presencia de marcadores colineales. Esta ha resultado ser una característica común en la evolución de la familia Solanaceae, y en otras familias vegetales.

Estudios de cartografía comparativa también se han realizado en la familia Poaceae. A comienzos de los años 90 el análisis de marcadores RFLP en los genomas de especies relacionadas como el trigo, cebada, sorgo y maíz, reveló una gran conservación de los marcadores dentro de segmentos cromosómicos largos de estos genomas (Ahn y Tanksley, 1993; Keller y Feuillet, 2000). Otros trabajos de cartografía genética en maíz y de comparación con mapas genéticos de sorgo han revelado regiones duplicadas (Whitkus *et al.*, 1992). En general estos estudios han ayudado a elucidar aspectos evolutivos de los cereales.

III. HIPÓTESIS

H_0 : Existen similitudes y diferencias en la estructura genómica de RH89-039-16 (*S. tuberosum*) y DM1-3516R44 (*S. phureja*) que no pueden ser reveladas por la comparación de marcadores microsatélites comunes en sus mapas genéticos.

H_1 : Existen similitudes y diferencias en la estructura genómica de RH89-039-16 (*S. tuberosum*) y DM1-3516R44 (*S. phureja*) que pueden ser reveladas por la comparación de marcadores microsatélites comunes en sus mapas genéticos.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Identificar cambios en la estructura genómica de *Solanum tuberosum* (RH89-039-16) y *Solanum phureja* (DM1-3516R44), mediante la comparación de marcadores microsatélites.

2. Objetivos específicos

- Analizar el polimorfismo y la segregación de los marcadores microsatélites en la población SHxRH de *Solanum tuberosum*.
- Determinar la posición de los marcadores microsatélites en el mapa ultra denso de *Solanum tuberosum* (mapa UHD) e integrar la información obtenida a partir de los marcadores AFLPs y microsatélites.
- Comparar los mapas genéticos de *Solanum tuberosum* (RH89-039-16) y *Solanum phureja* (DM1-3516R44).

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

Para construir el mapa de *S. tuberosum*, se utilizó una población diploide F1 de 86 individuos, generada a partir de un cruce entre dos padres heterocigotos SH83-92-488 como hembra y RH89-039-16 como macho (Roupe Van Der Voort *et al.*, 1997).

El parental diploide femenino SH83-92-488 se originó de un cruce entre un clon diploide de *S. tuberosum* SH76-128-1857 y un dihaploide del clon Y66-13-628, el cual es derivado de un *S. tuberosum spp. andígena*. El parental femenino SH83-92-488 será también denominado SH. El parental diploide masculino RH89-039-16, se originó a partir de un cruce entre clon dihaploide de *S. tuberosum* SUH2293 y BC1034.

Esta población se mantiene *in vitro* en la Universidad de Wageningen en Holanda. Los individuos de la población de mapeo fueron importados al Perú y son mantenidos en condiciones *in vitro* en el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA).

2. Métodos

2.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó según el método de Doyle y Doyle (1990) a partir de hojas frescas y porciones de tallos de todos los individuos (2 parentales SH83-92-488 y RH89-039-16, y 86 individuos de la progenie). La extracción se realizó utilizando buffer CTAB 2X, pH. 8 y lavados sucesivos con cloroformo: alcohol isoamílico. El precipitado obtenido fue resuspendido en buffer TE pH 8.0 y almacenado hasta su uso a -20 °C (Anexo 1).

2.2. Evaluación de la calidad y cuantificación de DNA

Se evaluó la calidad del DNA en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X pH 7.3, considerando la ausencia de RNA y la integridad del DNA. La concentración de DNA total fue determinada utilizando un espectrofotómetro NANODROP (ND-1000), realizando lecturas de absorbancias a 260 y 280 nm para evaluar la pureza del DNA. Conocida la concentración de DNA, se realizaron las diluciones con agua libre de nucleasas, hasta alcanzar una concentración final de 5 ng/μl de DNA. Estas diluciones fueron almacenadas en una caja de dilución de 96 pozos, a una temperatura de 4 °C.

2.3. Marcadores e Iniciadores

Para este estudio se analizaron marcadores microsatélites cartografiados previamente en el mapa de *S. phureja* DM1-3516R44 (PGSC, datos no publicados).

Se utilizaron iniciadores liofilizados resuspendidos en agua libre de nucleasas (SIGMA). Se prepararon los *stocks* de iniciadores a una concentración de 100 uM. La concentración final, para su empleo en las amplificaciones, fue de 10 uM. Se emplearon iniciadores “forward” que poseen una cola M13 en el extremo 5', de secuencia 5' CACGACGTTGTAAAACGA 3', que es el sitio de unión del colorante (IRDye) 700 y 800 para la detección infrarroja con el equipo *LI-COR*. Se trabajó con 74 microsatélites, que se listan en el Tabla 1 y 2.

Tabla 1. Relación de microsátélites de la serie PM (Potato Microsatellite), desarrollados por el Consorcio de Secuenciación del genoma de la papa (PSGC), a partir de los *scaffolds* de DM1-3 516R44.

Nombre	Motivo	Iniciador <i>Forward</i>	Iniciador <i>Reverse</i>
PM0319	AT(2*11)	TTTCAATCTATCACAGGATACAACACG	TGGACTAAAGAGCGTCTGAATCAGTAT
PM0321	TTC(3*9)	TGGCGATAAATACATGAGTTCCCT	TCACAATCCTTCAATGAAAAAGGTG
PM0329	TA(2*13)	TGTACCCTTATGTGTATGCCTTATCC	CCACGTAGGCTATCTAGGGTCT
PM0331	TA(2*16)	TGGTGGTTGTTGGTTAGAGAAACTT	TGGGATTTGAGTTGACTGAATTGTT
PM0333	AT(2*11)	GGGTGGGGTATTTAAAAACACGATA	TGGTCCTAACTCCACAACACTTCA
PM0336	AT(2*11)	GCATATGCTTAGGGCGCTCAATA	ATACATGGAGTCCAGGGGTTTCATC
PM0355	AT(2*15)	TCGAAATACTATCACGGACCAACA	TGACATCAACTCACGTTCACTATCTTT
PM0360	TA(2*10)	TCCCAAATTTTACTTTGAAACAAG	TTATTTTCATGCCACAAAAGTAGCG
PM0365	TAT(3*24)	CTTGATCTATGACTGGGCGGA	TGGTGGAAACTCTTAATTAGTGGTAAGA
PM0371	TA(2*12)	GCATGCACATGATGTAACAACAAC	CCCCAAAACAGAAAATGAAAGATT
PM0378	AT(2*10)	AACCTTTTTCTTATTGTTTTGCGA	CTACTCTCCAGCAAAGCAAAAG
PM0380	AT(2*11)	TGGTTTACTCAGTGGTCTATATCAGCA	CCCAGCAATGTATTACTTTTTGCC
PM0382	CTT(3*9)	GAGCTTGATTCTCAACCTACCT	TTCAAGTCATTAACCACCCCATTT
PM0385	TTC(3*9)	TGCAAGTTTCCAATTTACCCATTT	CGGTAAGGATTTTGCTATCTACGTG
PM0395	AT(2*13)	CAAAAATAAACAATTCCTTTTTCCC	TTTTTGGTACAAATTTTGATGTGTTT
PM0413	TA(2*13)	TGGTGGTAAATATATACATGGCAAAT	GCTTTTCTTTTCACTTACTCTTGCC
PM0417	TA(2*15)	AAACATAATCATCGTAAAGGCAA	AAAAATCGAAAGAACCAAATTTCTCT
PM0423	CT(2*15)	ACGAAGTGTCAAATCTCCAGACC	TTGGAGAAGACTGGCGTAGGTTTA
PM0427	TA(2*12)	CCACGTGATATGTTAAAACCACAA	TCAAGTGCTAGACATGAAATCTCCA
PM0429	CA(2*13)	CAGATATCAGTTAAGTATTTGAACCCCC	GAGGGTAAACGGGAAGGAAAAA
PM0436	AT(2*17)	CTCCTTATCCCAAAGTTTTCCC	TGTTAGTTCTTGTGGCAATTGAA
PM0439	AT(2*10)	AACAACCACAATACCCCAATCAAG	ACAATTGCTTATTTTGTGGGTGG
PM0442	AT(2*13)	CACAATTGACCAAGCGTAGAAGA	CAAGATGCTGTCAGTTCTGTTTG
PM0449	TA(2*10)	AAAATTTTCATCTTCTTCTGTAAAGTG	TGCATTGGTTATATGAATTATTGATTG
PM0451	TC(2*17)	ATCTATGGAAGGTCAATGGCTTCA	TCGTGTGCATATGTTTGATCACTG
PM0459	TA(2*11)	TGCTAGCACAGTTATTCTAGGGCT	TGGGATCTTGGATTGATTTGATT
PM0467	AT(2*10)	TTCTCTGTTCTTATAATGAAGGGGATT	TGCATCTTAAGTCATCAAAAATACAAAA
PM0471	GT(2*12)	GACAGATGAAAAACAACCTTGTC	TCCAACCTCATCAATTTTTATCAAG
PM0473	AT(2*14)	AAGGTGCAATGGAGCAAAAATAC	CCCTGGTGATTTCTCAGTTCTAAAAG
PM0478	AG(2*12)	AAAGTTGAGACCAGAAGCCATTTG	AATCTTGCAACTGCTGACACAGTAA
PM0489	AT(2*13)	CAACTTTTCTATTCTTCGTACATCA	TCATGCACATTACCATATCAACAA
PM0492	TA(2*12)	TTTTTGAAAATTTGGGACAAGTTCA	AAGTGTTTGAGTCAAGGAAGGCAC
PM0495	AAAAT(5*5)	CACAAAACTGACCAACAATTGGA	CTACTAACCTCCTCCCTCACACCA
PM0503	AT(2*14)	GTTCTTCTGATGTCTGTGGGATAAG	CTCGAATACCTTCGTTTCGTAATCC
PM0505	AAT(3*9)	TCATCATTGTGTAACAAAAAGAACAAT	TGCAATAATTTTAATTGATGGCTTATTA
PM0512	AT(2*13)	CATTTGTTGATGGTCTCTATGCT	GACAGACCTACATAGAGTTCCGGG
PM0518	TA(2*11)	TGTAATGCATGGTTTGATATTCACG	AAGTGTTGGTCAAAGTCCATATCATT
PM0520	AT(2*10)	CAGGACCAAAAACAACTTACCCA	TTATGAGGCACCAAATTCATCTCA
PM0522	ACA(3*8)	TGTTCTAATTCCTTTTGCACGAT	TGTGCTCATGGATTGTCTTTTCAAT
PM0529	AGA(3*7)	TCTTTGCCAACTTTTACAATTTTT	TTTATTTTTCCACTTCCGTGCAAT
PM0531	AT(2*11)	TTCTTTTGGTTTTGCATTTTCTTG	ACCTCGTATTAATAAAAATTTGCGATG
PM0541	TTC(3*12)	TATGCCCTCTTCTTCTTCTCTCT	ATACCCAAAATCCTCACCAAGAAA

Tabla 2. Relación de microsatélites desarrollados a partir de librerías enriquecidas y de bases de datos de ESTs.

SCRI- *Scottish Crop Research Institute*

Nombre	Motivo	Iniciador Forward	Iniciador Reverse	Referencia
STI0002	(ATT)n	ACAGGAATCACACCTGCACA	TTCAACATCCGAATGTCATA	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0005	(ACA)n(GCA)n	CTAATTTGATGGGGAAGCGA	CAAAAGATAAAACCCAAGTCC	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0009	(AGC)n(AAC)n	GCGAAAACCTTGAAGCAACT	CTGCTGTTGCTGTTGATGGT	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0022	(ACCCG)n	TCTCCAATTACTTGATGGACCC	CAATGCCATACACGTGGCTA	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0026	(TA)n(GT)n	CAACGCTACTCAATGGCTCA	ACAACCTAGAACGAGAGGAACA	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0028	(CAA)imp	ATACCCTCAATGGGTCTTT	CTTGGAGATTTGCAAGAAGAA	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0036	(AC)n(TC)imp	GGACTGGCTGACCATGAACT	TTACAGGAAATGCAAACCTCG	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0038	(CTG)n	CCAATGAGGCTAAGGGTGA	GGCCAAGAAAATCAAGAACG	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0043	(ACC)imp	CAATGCGAATGTTGCTACTGGT	ATCCACCAAGACTCCAGAA	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0049	(TCTT)n	GGAAGTCCTCAACTGGCTG	TCAACTATATGAATACTGCCAA	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0050	(ATA)n	TTCTCTAAGCGGCAAAAGG	GGAGGAGACTTGGGTTTCTCC	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0052	(CTT)n	TCATCACAACGTGACCCCA	GGGCTTGAATGATGTGAAGCTC	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0054	(CCA)n	GCCACTATGCAAGCCATTG	GGGTCGATGTTTCGGTTGAG	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0057	(AAG)n	CCTTGTAGAACAGCAGTGGTC	TCCGCCAAGACTGATGCA	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STI0060	(ATA)n	ACTTCTGCARCRGGRGAAGC	GGTCTGGATTCCAGGTTG	Feingold <i>et al.</i> , 2005
STG0002				SCRI (no publicado)
STG0006	(AC)n	TGAAAACCTGGTTCCGCATT	TAAGCAAGCTCTCTCCAGGG	Ghislain <i>et al.</i> , 2009
STG0018				SCRI (no publicado)
STG0022				SCRI (no publicado)
STM0003	(AC)9(AT)9	GGAGAATCATAACAACCAG	AATTGTAACCTGTGTGTGTG	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM0013	(AC)23 (AT)6 (AG)9	AACTATCAACTAAATGCCTTTTT	TTAATATTTTTTACTCGGCTATTG	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM0051	(AC)7..(AC)7 (AT)4	TACATACATACACACACGCG	CTGCAACTTATAGCCTCCA	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM1051	(TAT)4TTT(TAT)7	TCCCCTTGGCATTCTTCTCTCC	TTTAGGGTGGGGTGGAGGTTGG	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM1056	(AAAAT)4	AGGTAAGTTTTATTTCAATTGC	GGGTATGGGAATAGGTAGTTT	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM1057	(AAAT)4	TTATGTTTCGGTTAAAATGTA	AAATTAATGGAAGACAACC	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM1105	(ACTC)6	AAACCTGCTACAAATAAGGC	CAGAAATAATTGGAGGAGATG	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM2028	(TAC)5..(TA)3..(CAT)3	TCTCACCAGCCGGAACAT	AAGCTGCGGAAGTGATTTTG	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM3009	(TC)13	TCAGCTGAACGACCACTGTTC	GATTTCAACAAGCATGGAAGTC	Milbourne <i>et al.</i> , 1998
STM5115				SCRI (no publicado)
STM5119				SCRI (no publicado)
STM5140	(AAT)n	GCTATTGTTGCAGATAAATACG	GCCATGCACTAATCTTTGATTC	SCRI (no publicado)
STM5146.				SCRI (no publicado)

2.4. Estandarización de las condiciones de la PCR

Las condiciones de la reacción se presentan en la Tabla 3. Para determinar la temperatura de alineamiento de cada par de iniciadores (“Forward” y “Reverse”) utilizado para amplificar un determinado microsatélite, se realizó una gradiente de temperatura de 50 a 60 °C. Cada par de iniciadores fue probado a cinco temperaturas distintas y solo en los parentales, en un Termociclador de Gradientes.

El perfil de temperatura de amplificación fue de: predenaturación a 94 °C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 minuto, alineamiento en gradiente de 50 - 60 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1 minuto, y al terminar los ciclos una extensión a 72 °C durante 4 minutos.

Tabla 3. Condiciones de la reacción para *S. tuberosum*, papa. cc = concentración, vol = volumen, NFW: Agua libre de nucleasas.

Condiciones de la Reacción		
Reactivo	cc	Vol
NFW (SIGMA)		5.1 µl
Buffer Go Taq (Promega)	5 X	2.0 µl
MgCl ₂	25 mM	1.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2 µl
Dye 700, 800 (LI-COR)	1 uM	0.1 µl
Iniciador F	10 uM	0.2 µl
Iniciador R	10 uM	0.2 µl
Taq polimerasa		0.2 µl
DNA molde	5 ng/ul	1.0 µl

Tabla 4. Condiciones de amplificación por PCR de los microsatélites para *S. tuberosum*. T = temperatura, t = tiempo en minutos

Paso	Ciclo de PCR	
	T (°C)	t (min)
Pre denaturación	94°C	4
Denaturación	94°C	1
Alineamiento	50- 60 °C	1
Extensión	72 °C	1
N° de ciclos	30	
Extensión	72°C	4
	4°C	ilimitado

Una vez amplificadas las muestras, se les agregó una solución de carga (Blue Stop Solution- BSS), se homogenizó y centrifugó la placa, luego se la sometió a denaturación en un termociclador durante cinco minutos. Después de la denaturación se mantuvo la placa en hielo y de manera rápida se cargó entre 0.8 µl- 1.0 µl del amplificado en cada pocillo del gel.

Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida 6.5%, mediante el analizador genético LI-COR 4300 (Bioscience). Todas las corridas electroforéticas se realizaron con placas de vidrio (25 cm x 2 5cm), espaciadores de 0,25 mm de grosor, gel 6.5% LI-COR KBPlus, y por un tiempo de 1,5 horas (Anexo 2).

La elección de la temperatura de alineamiento adecuada para cada par de iniciadores, se realizó tomando en cuenta la nitidez de las bandas, y la ausencia de bandas falsas. Como ejemplo se muestra la evaluación de la temperatura de alineamiento del marcador STI0036 (Figura 3).

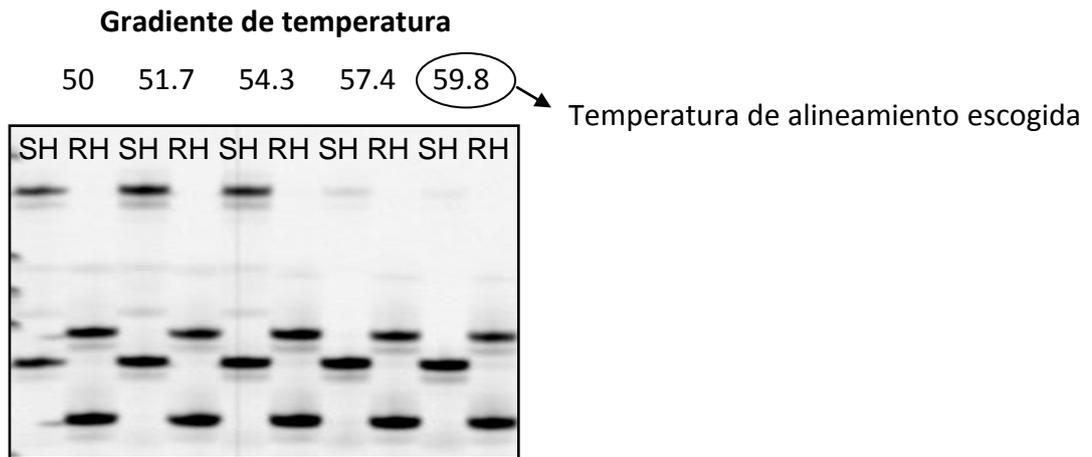


Figura 3. Evaluación de la temperatura de alineamiento para el marcador STI0036. De acuerdo a las bandas la óptima temperatura de alineamiento es 59.8.

2.5. Evaluación del polimorfismo en los marcadores microsatélites

Para determinar el polimorfismo de cada microsatélite, éstos fueron amplificados en los dos parentales SH83-92-488 y RH89-039-16 y seis individuos de la población diploide F1. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las utilizadas para estandarizar la temperatura de alineamiento. Los productos de la amplificación fueron analizados por el Sistema *LI-COR 4300*.

Para seleccionar los microsatélites, se determinó inicialmente el estado monomórfico o polimórfico, y segregante. De ser polimórficos, se evaluó la presencia de alelos de RH89-039-16, de SH83-92-488, o de ambos que segreguen en la progenie, seleccionando finalmente aquellos marcadores con alelos de RH89-039-16 segregantes en la población.

Solo aquellos microsatélites polimórficos que presentaron alelos de RH89-039-16 segregantes en la población, fueron amplificados en los parentales y la población diploide F1 total, con las condiciones antes mencionadas.

2.6. Registro de bandas

El software SAGA™ del equipo LI-COR graba de manera automática una imagen digitalizada de cada gel en un archivo creado para cada microsatélite, esto nos permite identificar cada una de las bandas amplificadas para cada microsatélite en la población completa. El programa además, nos permite calibrar el tamaño de cada una de las bandas obtenidas de acuerdo a un “ladder” LI-COR (Anexo 3). De manera visual se identificaron los alelos informativos representados por bandas polimórficas y segregantes.

2.7. Elaboración de los archivos de entrada

a. Matriz Binaria de Datos: Para cada microsatélite, se registró la presencia o ausencia de los alelos de RH89-039-16 segregantes en la población, con 1 y 0 respectivamente. Esta información se registró en una matriz binaria de datos, empleando el programa Excel de Windows (Figura 3).

Tamaño (bp)	Alelo	SH	RH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
168	PM382-a	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
160	PM382-b	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
170	PM382-c	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
164	PM382-d	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1

Figura 4. Matriz Binaria de datos. Registro de los alelos (PM382-a, b, c, d) del marcador microsatélite PM382 en los padres (SH y RH) y en los iniciadores 10 hijos de la población SHxRH. bp: pares de bases.

b. Archivo de entrada del programa JoinMap: Este programa requiere un archivo con extensión *.loc*, para lo cual se transformó la matriz binaria de acuerdo al tipo de parentales y cruce (Tabla 5). Se escogió el tipo de población CP, ya que tiene un sistema de codificación muy similar al que necesita el programa BINMAP.

Tabla 5. Códigos del tipo de segregación para la población CP en el programa Join Map.

Código	Descripción	Población SHxRH
<hkxhk>	Locus heterocigoto en ambos padres, dos alelos	Locus heterocigoto para SH y RH
<lmxll>	Locus heterocigoto en el primer padre	Locus heterocigoto para SH
<nnxnp>	Locus heterocigoto en el segundo padre	Locus heterocigoto para RH

Los loci de interés para este trabajo corresponden a los del tipo **<nnxnp>** pues están presentes en RH, pero ausentes en el parental SH. Estos loci son seleccionados y son los que se posicionarán en el mapa UHD del parental RH. Es así que al transformar los datos obtuvimos la matriz de la figura 5.

El archivo con extensión *.loc* contiene algunas instrucciones acerca del contenido de los datos, tales como: el nombre de la población, el número de individuos, el número de loci. Esta parte denominada encabezado tiene una estructura secuencial necesaria para el reconocimiento por el programa JoinMap (Figura 5).

Encabezado														
name = SHRH														
popt = CP														
nind=130														
nloc=62														
PM382-a	<aaxab>	nn	..	np	nn	..	nn	nn	np	np	..	np
PM382-b	<aaxab>	np	..	nn	np	..	np	np	nn	nn	..	nn
PM371-a	<aaxab>	np	..	nn	nn	..	nn	nn	np	nn	..	nn
STI0036-a	<aaxab>	np	..	nn	np	..	np	np	np	nn	..	nn
STI0036-b	<aaxab>	nn	..	np	nn	..	nn	nn	nn	np	..	np
STI0052-a	<aaxab>	nn	..	np	nn	..	np	nn	nn	nn	..	np

Figura 5. Modelo del archivo de entrada para el Programa JoinMap. En la parte superior se muestra la estructura del encabezado.

c. Archivo de entrada del programa BINMAP: Para generar este archivo de entrada, los individuos analizados son de vital importancia, debido a que tanto el número y orden de éstos en el archivo de entrada debe ser el mismo al archivo denominado RHBIN130. Este último es parte del programa BINMAP y contiene los patrones de segregación de todos los “bins” del mapa de RH, en 130 individuos de la población SHxRH. Con el programa JoinMap se generó anteriormente un archivo de entrada, con datos genotípicos de loci heterocigotos en RH que permitieran construir el mapa de este parental. Sin embargo el programa BINMAP no reconoce los códigos <nnxnp>, sino más bien <aaxab>, debido a esto se reemplazaron “nn” por aa” y “np” x “ab”; de esta manera se tiene listo el archivo de entrada para el programa BINMAP al que se denominó RH.loc.

2.8. Determinación de la ubicación cromosómica de los SSRs

Para determinar la ubicación de los marcadores microsatélites en los “bins” del mapa UHD de *S. tuberosum*, se utilizó el software BINMAP (van Os., no publicado). Binmap compara el patrón de segregación de los alelos de cada microsatelite y el de cada “bin”, y determina el o los “bins” más probables para el microsatélite. El programa BINMAP trabaja en el sistema operativo DOS, y tiene un archivo ejecutable denominado BINMAP.EXE, el cual compara el archivo de entrada RH.loc con el archivo preexistente RHBIN130.loc.

Para utilizar el programa, debemos ejecutar el programa BINMAP, posteriormente se editó en primer lugar la palabra **Binmap**, seguido del nombre del archivo de entrada (**rh**) y del nombre del archivo contra el cual será analizado (**rhbin130**). Como resultado se obtuvo un archivo con extensión *.bmo*.

```
C:\WINDOWS\System32\CMD.exe - binmap rh rhbin130
Microsoft Windows XP [Versión 5.1.2600]
(C) Copyright 1985-2001 Microsoft Corp.

C:\Documents and Settings\Yerisf Torres>cd Escritorio
C:\Documents and Settings\Yerisf Torres\Escritorio>cd Binmap_package
C:\Documents and Settings\Yerisf Torres\Escritorio\Binmap_package>BINMAP.EXE
syntax: BinMap MarkerFile BinFile <default extension: ".loc">
C:\DOCUME~1\YERISF~1\ESCRIT~1\BINMAP~1>binmap rh rhbin130
```

Nombre del archivo .loc

Archivo con el que se analiza .loc

Figura 6. Interface del Programa BINMAP, en el sistema DOS. Se muestra de que modo se debe cargar el archivo de entrada para que el programa realice el análisis.

2.9. Representación el mapa UHD en centiMorgans

En el mapa UHD, los marcadores están organizados en “bins” (es así que marcadores que no están separados por un evento de recombinación pertenecen a un mismo “bin”). Para organizar los marcadores en centiMorgans se multiplicó el número de bins por 100/130, donde 130 representa al número de individuos de la población de mapeo del UHD (van Os *et al.*, 2006). Esto quiere decir que si tenemos el “bin” RH09B008, este pertenece al cromosoma nueve de RH y estaría localizado en la posición 6.15cM (resultado del producto de 8 y 100/130).

2.10. Comparación de los mapas genéticos de *Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*

Una vez añadidos los microsatélites al mapa UHD de RH89-039-16, se realizó la comparación de éste con el mapa genético de DM1-3 516R44 (PGSC, datos no publicados), usando los marcadores comunes. Se empleó el software Map Chart (Voorrips, 2002) para representar gráficamente los mapas de ligamiento y realizar las comparaciones.

VI. RESULTADOS

1. Evaluación de la calidad del DNA y cuantificación

La primera evaluación de calidad en geles de agarosa al 1% evidenció la presencia de RNA, por lo que fue necesario un segundo tratamiento con RNAsa, para limpiar el DNA. En la Figura 7 se muestra la calidad final del DNA, en los padres (SH y RH) y de algunos individuos de la progenie (del 1 al 15). La concentración del DNA varió entre 167 y 1633 ng/ul.

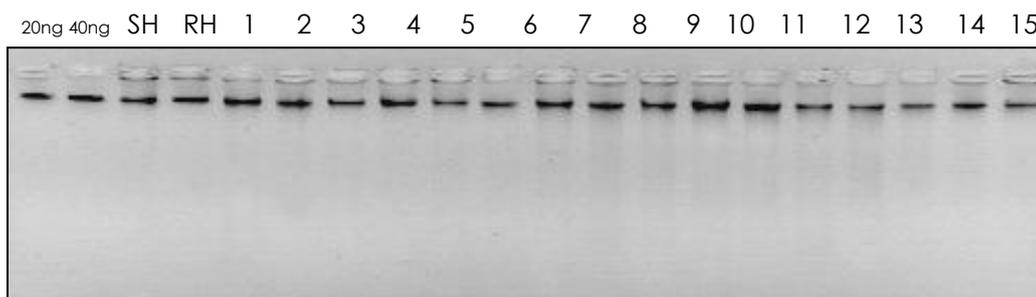


Figura 7. Gel de agarosa para la evaluación de calidad de DNA de los padres (SH y RH) y algunos individuos de la progenie (1 al 15). Los dos pocillos iniciales corresponden a marcadores de peso, el primero de 20ng/ul y el segundo de 40ng/ul.

2. Condiciones de PCR

Se determinó la temperatura de alineamiento de 14 marcadores SSR, pues de estos no se tenía información previa.

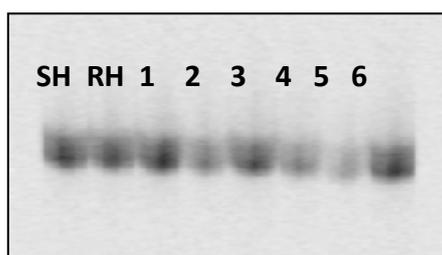
Tabla 6. Temperatura de alineamiento (°C) de 14 marcadores microsatélite analizados.

Marcador	T (°C) Alineamiento
STI0036	60
STM5115	60
STG0018	55
STI0038	50
STI0009	50
STG0006	60
STG0022	55
STG0002	55
STI0002	60
STI0005	53
STI0050	58
STI0022	58
STG0018	55
STG0022	55

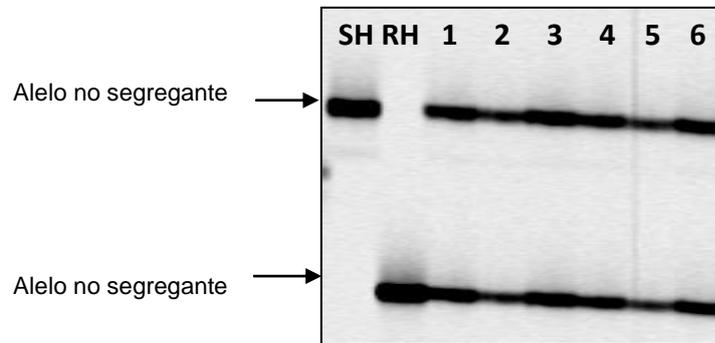
3. Polimorfismo y segregación de los marcadores microsatélites

Al analizar el polimorfismo de los marcadores microsatélites se observaron diferentes tipos:

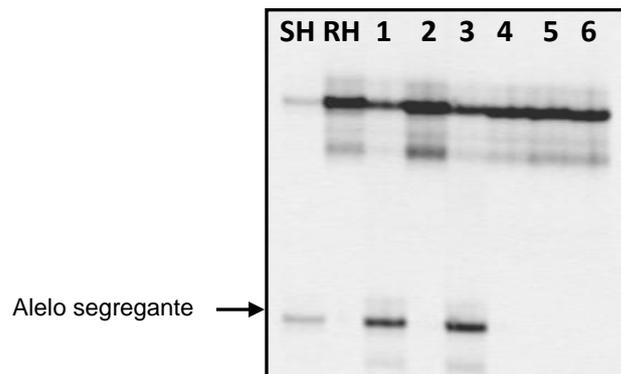
- Marcadores monomórficos: que presentaron solo una banda en todos los individuos de la población SHxRH. Ejemplo: Marcador STI0054.



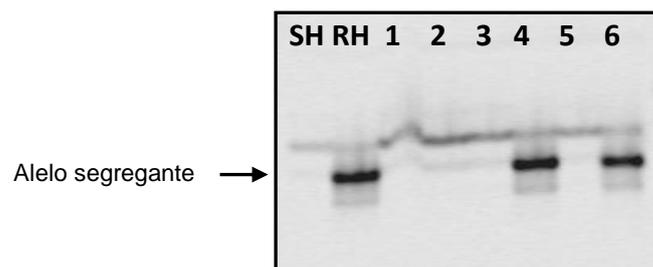
-
- Marcadores polimórficos con alelos no segregantes: Con más de un alelo, sin embargo toda la progenie tiene el mismo patrón de bandas. Ejemplo: Marcador STG0021.



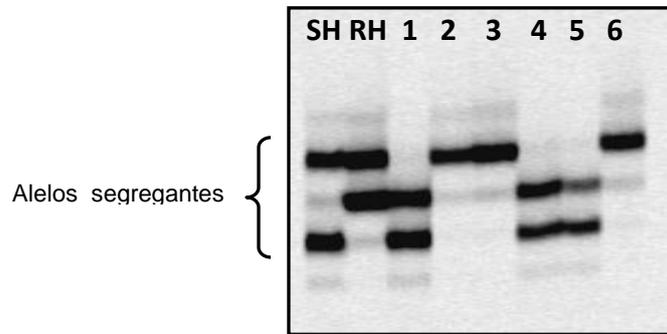
- Marcadores con alelos de SH que segregan en la población.



- Marcadores con alelos de RH que segregan en la población.



-
- Marcadores con alelos de SH y RH que segregan en la población



De los 74 marcadores microsatélites analizados, solo 1 no pudo amplificarse, mientras que 12 resultaron ser monomórficos, 3 polimórficos no segregantes, 9 marcadores presentaron alelos de SH que segregan en la población, 15 marcadores presentaron alelos de RH que segregan en la población, y 34 presentaron tanto alelos de RH y SH segregantes en la población SHxRH. (Tabla 7).

A partir de esta información se seleccionaron aquellos marcadores que presentaron alelos de RH segregantes en la población SHxRH, esto incluye 49 marcadores microsatélite.

Tabla 7. Polimorfismo y segregación de marcadores microsatélite evaluados en la población SHxRH.

Número	Marcador	T° alineamiento	Polimorfismo y Segregación
1	PM0385	55	SH
2	PM0436	42	SH
3	PM0467	58	SH
4	PM0520	50	SH
5	STG0022	55	SH
6	STI0022	58	SH
7	STI0026	50	SH
8	STM1057	50	SH
9	STM5115	60	SH
10	PM0331	58	RH – SH
11	PM0333	58	RH – SH
12	PM0355	55	RH – SH
13	PM0365	58	RH – SH
14	PM0378	58	RH – SH
15	PM0439	60	RH – SH
16	PM0478	57	RH – SH
17	PM0522	60	RH – SH
18	STI0002	60	RH – SH
19	STI0005	53	RH – SH
20	STI0009	50	RH – SH
21	STI0043	55	RH – SH
22	STI0050	58	RH – SH
23	STM0003	57	RH – SH
24	STM1056	50	RH – SH
25	STM3009	50	RH – SH
26	STM5119	50	RH - SH
27	STM5140	54	RH – SH
28	PM0329	58	RH – SH
29	PM0336	60	RH – SH
30	PM0360	50	RH – SH
31	PM0371	60	RH – SH
32	PM0382	55	RH – SH
33	PM0413	50	RH – SH
34	PM0423	60	RH – SH
35	PM0449	50	RH – SH
36	PM0473	50	RH – SH
37	PM0492	50	RH – SH

Número	Marcador	T° alineamiento	Polimorfismo y segregación
38	PM0505	60	RH – SH
39	STI0036	60	RH – SH
40	STI0052	55	RH – SH
41	STI0057	50	RH – SH
42	STM1051	60	RH – SH
43	STM1105	60	RH – SH
44	PM0319	50	RH
45	PM0321	60	RH
46	PM0380	60	RH
47	PM0427	60	RH
48	PM0429	50	RH
49	PM0459	50	RH
50	PM0489	50	RH
51	PM0512.	57	RH
52	PM0518	50	RH
53	PM0531	60	RH
54	PM0541	60	RH
55	STG0006	60	RH
56	STI0038	50	RH
57	STM0013	52	RH
58	STM0051	60	RH
59	PM0495	50	Pol. no segregante
60	STI0049	60	Pol. no segregante
61	STI0060	52	Pol. no segregante
62	PM0417	60	No amplificó
63	PM0395	60	Monomórfico
64	PM0529	60	Monomórfico
65	STG0002	55	Monomórfico
66	STI0054	50	Monomórfico
67	STM2028	57	Monomórfico
68	STM5146.	50	Monomórfico
69	PM0442	60	Monomorfico
70	PM0451	60	Monomorfico
71	PM0471	50	Monomorfico
72	PM0503	50	Monomorfico
73	STG0018	55	Monomorfico
74	STI0028	60	Monomorfico

RH: Marcador polimórfico con alelos de RH segregantes en la población, SH: Marcador polimórfico con alelos de SH segregantes en la población, RH-SH: Marcador polimórfico con alelos de RH y SH segregantes en la población

4. Segregación de los loci en la población SHxRH

En la población SHxRH completa, se amplificó un total de 49 marcadores (15 marcadores con alelos segregantes solo de RH y 34 con alelos de RH y SH segregantes), obteniéndose 66 loci de RH segregantes en la población. La frecuencia de segregación esperada para estos loci es 1:1. De los 66 marcadores evaluados, solo 4 (PM531.164, PM0429.155, PM0492.251 y STM1056.241) no cumplieron con la frecuencia de segregación, según la prueba del Chi- cuadrado realizada con el programa JoinMap. Por tanto, solo se emplearon 62 loci para el posicionamiento de los marcadores en el mapa UHD de *S. tuberosum*.

Tabla 8. Evaluación de la segregación de los loci en la población SHxRH según la prueba del Chi- cuadrado realizada en el programa JoinMap.

Locus	Chi-cuadrado
PM0531.164	12.19 *****
PM0429.155	12.19 *****
STM1056.241	13.12 *****
PM0492.251	10.98 *****
PM0459.203	10.71 ****
PM0492.255	9.56 ****
PM0492.247	9.56 ****
STI0043.152	8.05 ****
STI0043.149	8.05 ****
STI0036.135	6.86 ***
PM0449.153	7.38 ***
STI0036.147	5.76 **
STI0052.180	4.76 **
PM0512.143	4.76 **
PM0378.165	4.76 **
PM0355.198	3.95 **
STI0050.183	4.35 **
PM0413.178	3.05 *
PM0355.255	3.12 *
PM0360.128	2.71 *
PM0518.153	3.05 *
STM0013.149	3.05 *

Locus	Chi-cuadrado
STM1056.251	2.71 *
STM0051.131	2.71 *
PM382.168	1.71
PM382.160	2.33
PM0371.152	1.71
STM1105.110	0.43
PM0541.196	0.76
PM0541.172	0.76
PM0321.210	0.76
PM0505.236	0.59
PM0505.216	0.59
PM0505.212	0.59
PM0333.205	0.19
PM0380.169	1.71
PM0427.248	2.33
PM0439.173	0.76
PM0439.171	0.43
STI0038.125	0.76
STM1051.221	0
STM1051.209	1.71
PM0478.169	0.76
PM0365.159	0.76
PM0365.139	0.76
PM0331.165	1.19
PM0329.143	0.76
PM0319.141	1.46
PM0319.139	0.98
PM0473.172	0.43
PM0489.175	0.11
PM0489.171	0.05
PM0423.157	0.05
PM0423.119	0.05
STI0057.209	0.2
STI0057.198	0.01
PM0522.136	0.05
PM0336.140	1.11
STI0002.137	1.19
STM3009.167	0.43
STM5140.210	0.59
STM5140.194	0.59
STM0013.183	1.71
STI0009.282	0.05
STM0003.157	1.19
STM1056.236	0.98

Aquellos loci, cuya segregación observada es significativamente diferente a la segregación esperada 1:1 (**** o más), no son considerados. (*) Representan el nivel de significancia.

5. Posicionamiento e integración de los marcadores microsatélites en el mapa UHD de *Solanum tuberosum*

5.1. Posición de los microsatélites en los “bins” del mapa UHD.

El programa BINMAP permitió posicionar cada locus, en uno o varios “bins” del mapa UHD, mediante la comparación de los patrones de segregación. El programa BINMAP arroja un archivo con extensión .bmo que contiene una serie de parámetros que permite evaluar la confiabilidad del posicionamiento de cada locus. Estos parámetros son: la fracción de recombinación, el valor de LOD y el número de “singletons”. En la siguiente tabla se muestra el locus analizado, el “bin” en el que está posicionado, la frecuencia de recombinación, el valor de LOD y el número de “singletons”. En algunos casos, se observó que algunos marcadores se pueden posicionar en más de un “bin” con la misma probabilidad.

Tabla 9. Posicionamiento de los marcadores microsatélite en los “bins” del mapa UHD de *S. tuberosum*, empleando el programa BINMAP.

Marcador	BIN	Fracción de recombinación	Valor LOD	“Singletons”	Otros bins
STI0043.152	RH01B007	0.119	11.9702	10	RH01B008
STI0043.149	RH01B007	0.119	11.9702	10	RH01B008
PM0459.203	RH01B013	0.0952	13.8136	8	RH01B014
PM0423.157	RH01B089	0.0833	14.8225	7	
PM0423.119	RH01B089	0.0833	14.8225	7	
STI0009.282	RH01B101	0.0732	15.3625	6	
PM0331.165	RH02B001	0.0833	14.8225	7	
PM382.168	RH02B003	0.0952	13.8136	8	RH02B005
PM382.160	RH02B003	0.1071	12.8648	9	RH02B005
STI0036.147	RH02B031	0.0952	13.8136	8	RH02B035/RH02B036
STI0036.135	RH02B031	0.0833	14.8225	7	
STI0052.180	RH02B051	0.0595	17.0544	5	RH02B052/RH02B053
PM0355.255	RH02B068	0.075	14.8273	6	
PM0355.198	RH02B068	0.0625	15.9596	5	
STI0050.183	RH03B040	0.1566	9.3401	13	
STM5140.210	RH04B029	0.0602	16.7802	5	RH04B030
STM5140.194	RH04B029	0.0602	16.7802	5	RH04B030
PM0541.196	RH04B033	0.0595	17.0544	5	RH04B035 /RH04B036
PM0541.172	RH04B033	0.0833	14.8225	7	RH04B035 /RH04B036
PM0321.210	RH04B033	0.0595	17.0544	5	RH04B035 /RH04B036
PM0505.236	RH04B033	0.0602	16.7802	5	RH04B035 /RH04B036
PM0505.216	RH04B033	0.0602	16.7802	5	RH04B035 /RH04B036
PM0505.212	RH04B033	0.0602	16.7802	5	RH04B035 /RH04B036
PM0365.159	RH04B033	0.0595	17.0544	5	RH04B035 /RH04B036
PM0365.139	RH04B033	0.0595	17.0544	5	RH04B035 /RH04B036
PM0319.141	RH04B073	0.0723	15.6307	6	
PM0319.139	RH04B073	0.0843	14.5595	7	
STM1056.236	RH04B073	0.0602	16.7802	5	
PM0427.248	RH05B004	0.0714	15.8993	6	
STM0013.183	RH05B004	0.0833	14.8225	7	

Marcador	BIN	Fracción de recombinación	Valor LOD	"Singletons"	Otros bins
STM0013.149	RH05B004	0.0833	14.8225	7	
PM0371.152	RH05B021	0.0595	17.0544	5	RH05B022/RH05B023
PM0380.169	RH05B044	0.0476	18.3025	4	RH05B045/RH05B046
PM0333.205	RH05B062	0.0714	15.8993	6	
PM0439.173	RH06B016	0.0952	13.8136	8	RH06B017
PM0439.171	RH06B016	0.0833	14.8225	7	RH06B017
PM0329.143	RH06B016	0.0952	13.8136	8	RH06B017
PM0478.169	RH06B043	0.0952	13.8136	8	
STM3009.167	RH07B001	0.0595	17.0544	5	RH07B002
PM0378.165	RH07B061	0.0595	17.0544	5	
PM0518.153	RH07B068	0.1071	12.8648	9	RH07B069
PM0492.255	RH08B020	0.0854	14.297	7	RH08B021/RH08B022/RH08B024
PM0492.247	RH08B020	0.0854	14.297	7	RH08B021/RH08B022/RH08B024
STM1105.110	RH08B092	0.119	11.9702	10	
STI0038.125	RH09B003	0.1071	12.8648	9	
STM1051.209	RH09B003	0.131	11.1249	11	
STI0002.137	RH09B003	0.119	11.9702	10	
STM1051.221	RH09B004	0.1667	8.8497	14	
PM0473.172	RH09B004	0.1548	9.5677	13	
STI0057.209	RH09B009	0.125	10.9921	10	
STI0057.198	RH09B009	0.1111	12.1123	9	
PM0336.140	RH09B030	0.2055	5.8728	15	
PM0413.178	RH09B031	0.119	11.9702	10	RH09B032
PM0360.128	RH09B031	0.1205	11.7246	10	RH09B032
PM0522.136	RH09B031	0.1486	8.7668	11	RH09B032
STM1056.251	RH09B031	0.1205	11.7246	10	RH09B032
PM0449.153	RH09B060	0.0897	13.252	7	RH09B061
STM0051.131	RH10B063	0.0602	16.7802	5	RH10B064/RH10B066
PM0489.175	RH11B033	0.0843	14.5595	7	
PM0489.171	RH11B033	0.0952	13.8136	8	
STM0003.157	RH12B001	0.0833	14.8225	7	RH12B002/RH12B004
PM0512.143	RH12B010	0.119	11.9702	10	

Si BINMAP posiciona a un marcador en el “bin” RH05B044, esto indica que corresponde al parental masculino RH, al cromosoma 5, y en el “bin” número 44. El posicionamiento de todos los marcadores en el mapa UHD se realizó considerando valores de LOD altos (8 a 18), lo que indica la confiabilidad del análisis. Con los datos obtenidos del archivo de salida del programa BINMAP .bmo, se logró integrar los microsatélites en el mapa UHD de *S. tuberosum* y representarlo de manera gráfica, como se muestra en la figura 8

La distribución de los marcadores microsatélites a lo largo del genoma fue heterogénea. En algunos cromosomas se posicionaron varios marcadores, observándose que el mayor número de loci (13) fue posicionado en el cromosoma IV, mientras que en otros se posicionó solo un marcador (como los cromosomas III y X). En la tabla 9 se muestra el número de marcadores posicionados en cada cromosoma del mapa UHD de *Solanum tuberosum*.

Tabla 10. Número de loci posicionados en cada cromosoma del mapa genético de RH89-039-16.

Cromosoma	Número de loci
I	6
II	8
III	1
IV	13
V	6
VI	4
VII	3
VIII	3
IX	13
X	1
XI	2
XII	2

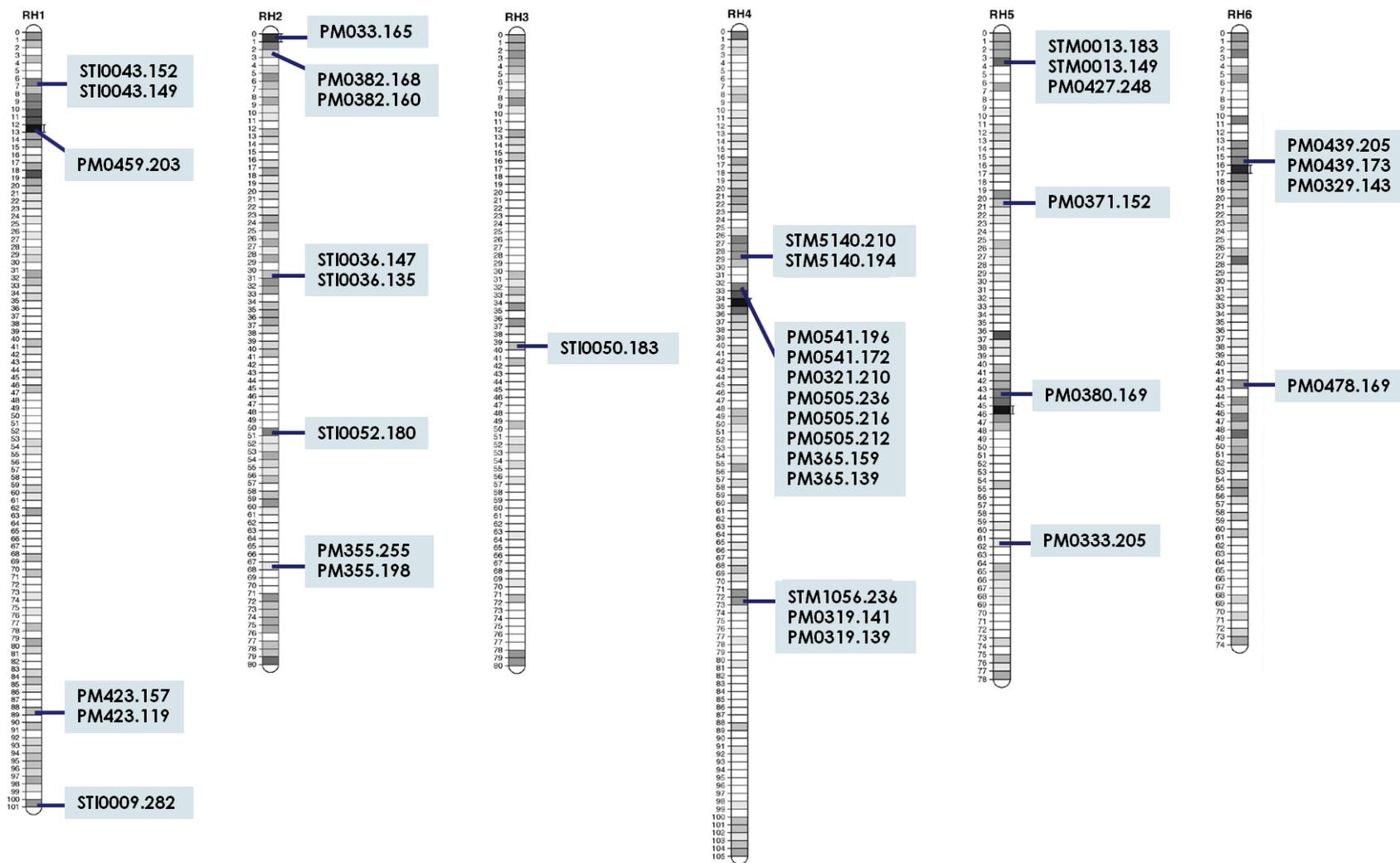
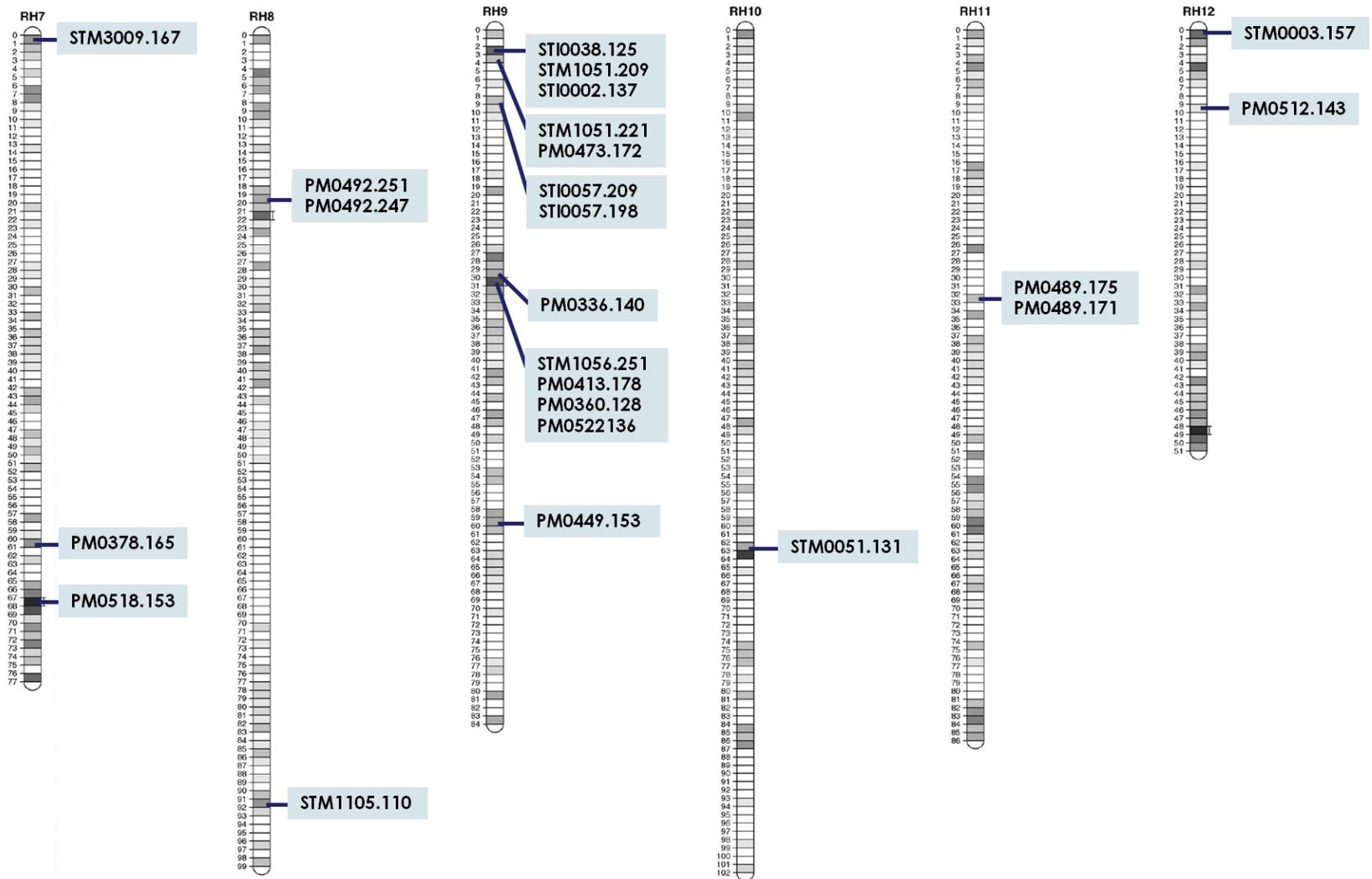


Figura 8: Esquema del posicionamiento de los marcadores microsatélites en el mapa UHD de *Solanum tuberosum*. RH1-RH12: corresponden a los doce cromosomas de RH89-039-16.



Continuación de la Figura 8: Esquema del posicionamiento de los marcadores microsatélites en el mapa UHD de *Solanum tuberosum*. RH1-RH12: corresponden a los doce cromosomas de RH89-039-16.

5.2. Posición de los marcadores microsatélites en el mapa UHD en centiMorgans.

La posición de los marcadores microsatélites en cM se muestra en la tabla 9. En la figura 9 se representa el posicionamiento de los microsatélites dentro del mapa UHD en cM.

Tabla 11. Posición de los microsatélites en el mapa UHD de *S. tuberosum* en centiMorgans (cM).

Cromosoma	Locus	Distancia (cM)
I	STI0043_152	4.6
	STI0043_149	4.6
	PM0459_203	9.2
	PM0423_157	71.1
	PM0423_119	71.1
	STI0009_282	80.2
II	PM0331_165	0.0
	PM0382_168	1.4
	PM0382_160	1.4
	STI0036_147	23.9
	STI0036_135	23.9
	STI0052_180	39.7
	PM0355_225	53.6
	PM0355_198	53.6
III	STI0050_183	31.8
IV	STM5140_210	22.0
	STM5140_194	22.0
	PM0541_196	25.9
	PM0541_172	25.9
	PM0321_210	25.9
	PM0505_236	25.9
	PM0505_216	25.9
	PM0505_212	25.9
	PM0365_159	25.9
	PM0365_139	25.9
	PM0319_141	56.8
	PM0319_139	56.8
	STM1056_236	56.8

Continuación de la tabla 11.

Cromosoma	Locus	Distancia (cM)
V	PM0427_248	2.3
	STM0013_183	2.3
	STM0013_149	2.3
	PM0371_152	16.2
	PM0380_169	34.8
	PM0333_205	49.2
VI	PM0439_173	11.5
	PM0439_171	11.5
	PM0329_143	12.2
VII	PM0478_168	31.9
	STM3009_167	0.8
	PM0378_165	49.3
	PM0518_153	55.3
VIII	PM0492_255	16.3
	PM0492_247	16.3
	STM1105_110	75.5
IX	STI0038_125	1.6
	STM1051_209	1.6
	STI0002_137	1.6
	STM1051_221	2.4
	PM0473_172	2.4
	STI0057_209	7.5
	STI0057_198	7.5
	PM0336_140	23.7
	PM0413_178	24.5
	PM0360_128	24.5
	PM0522_136	24.5
	STM1056_251	24.5
PM0449_153	46.0	
X	STM0051_131	48.5
XI	PM0489_175	26.5
	PM0489_1751	26.5
XII	STM0003_157	0.0
	PM0512_143	6.9

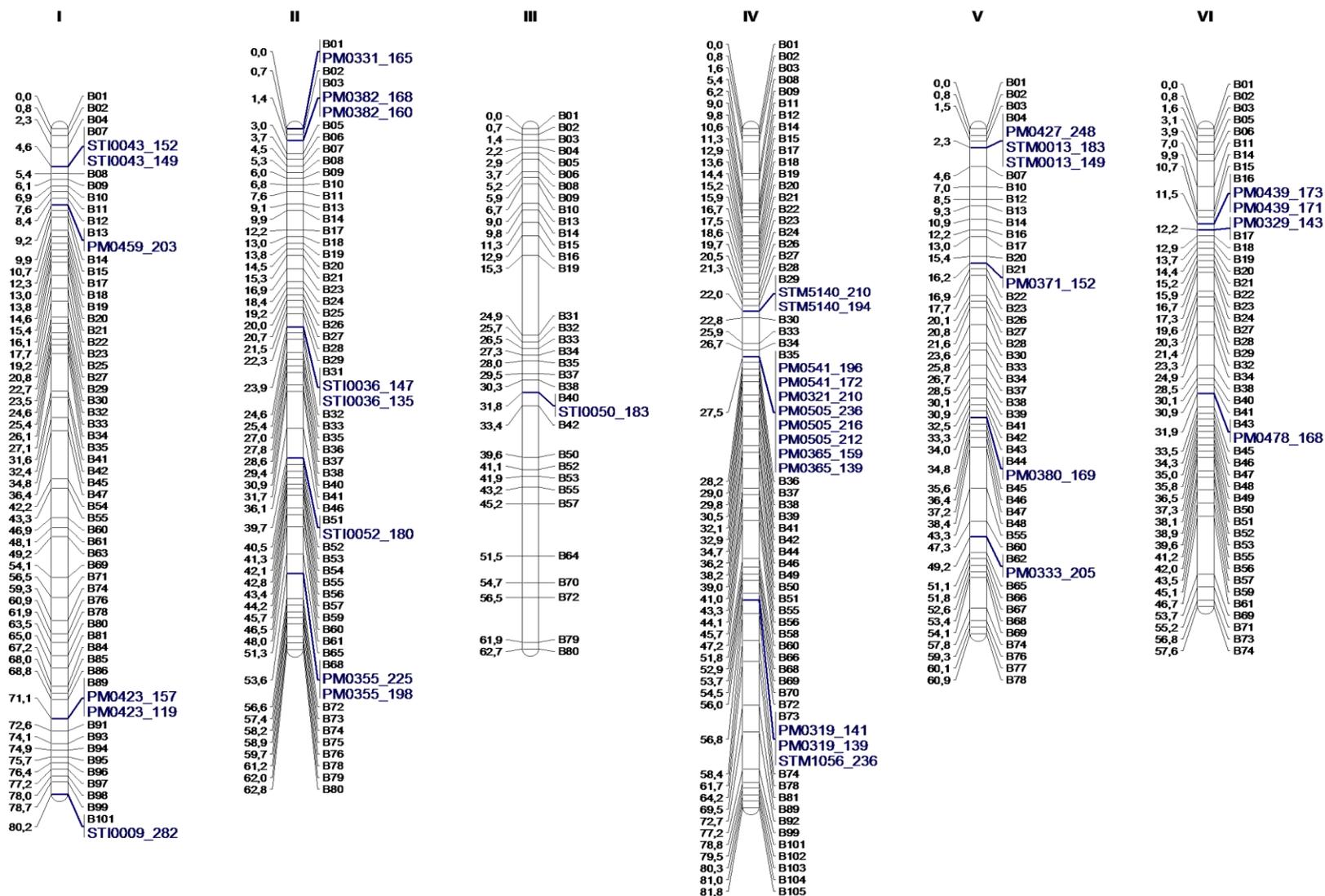
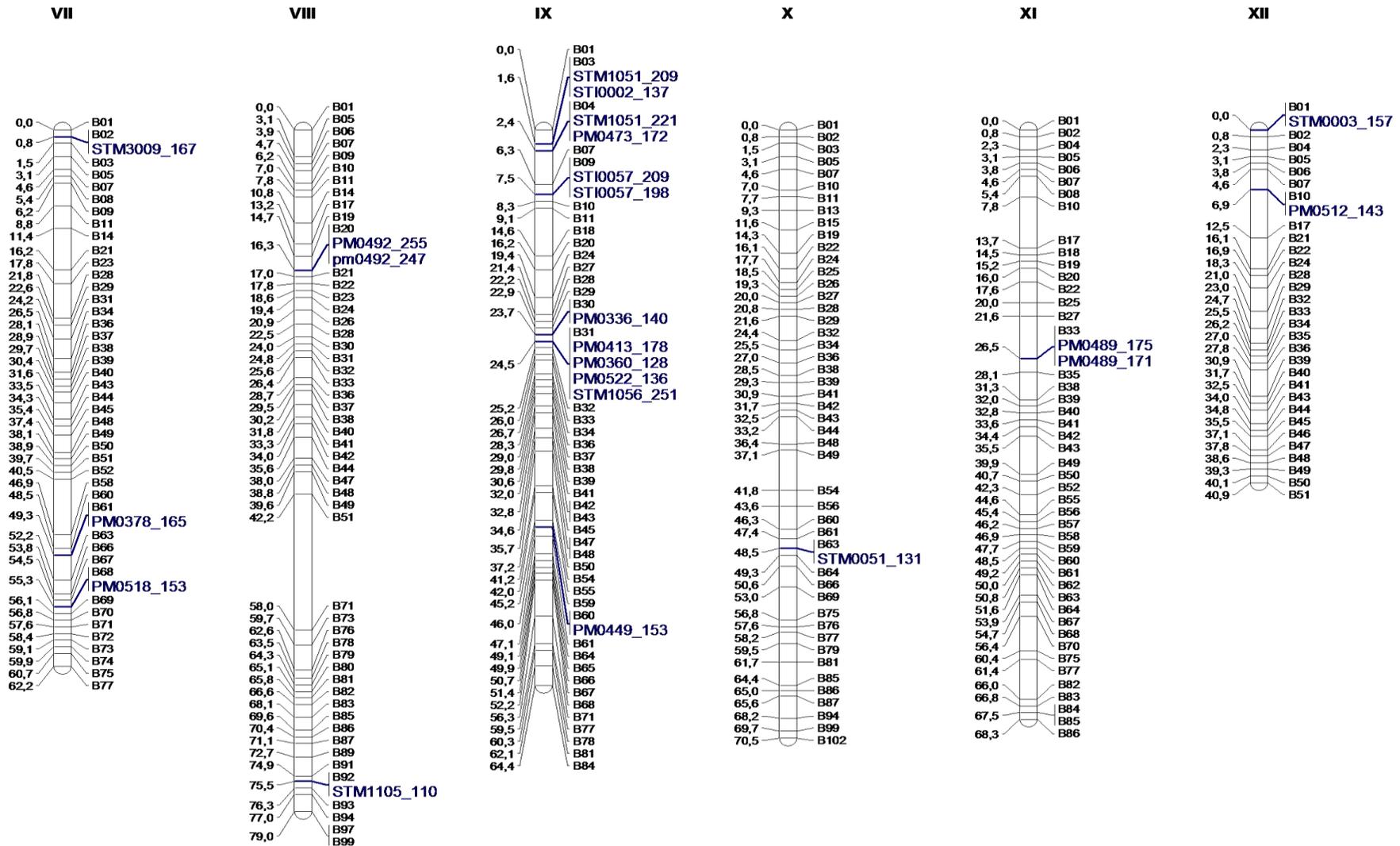


Figura 9. Representación de la posición de los marcadores microsatélites en el mapa UHD (cM), empleando el software MapChart. Al lado izquierdo de las barras la distancia en cM y al lado derecho el bin correspondiente.



Continuación de la figura 9. Representación de la posición de los marcadores microsatélites en el mapa UHD (cM), empleando el software MapChart. Al lado izquierdo de las barras la distancia en cM y al lado derecho el bin correspondiente.

6. Comparación de los mapas genéticos RH89-039-16 (*Solanum tuberosum*) y DM1-3516R44 (*Solanum phureja*)

El análisis de los microsatélites cartografiados en DM1-3516R44 (referida también como DM) para su integración en el mapa UHD de RH89-039-16 (referida también como RH), nos permitió comparar ambos mapas genéticos.

En general, el orden de los marcadores microsatélites en *S. tuberosum* RH89-039-16, fue muy similar al orden observado en *S. phureja* DM1-3516R44, a lo largo de grandes segmentos cromosómicos. Sólo en los cromosomas VII y IX, se ha observado una alteración de la colinealidad de los marcadores, que podría ser el resultado de algún cambio a nivel cromosómico en ambas especies en el transcurso del tiempo.

Cromosoma I: El contenido y orden de tres marcadores se conserva en los cromosomas I de RH89-039-16 y DM1-3516R44, sin embargo en DM1-3516R44 se ha cartografiado el marcador PM0382_164 que además también está cartografiado en el cromosoma II. Además en RH se ha cartografiado un marcador adicional, PM0459.230, el cual en el caso de DM está posicionado en el cromosoma XII.

Cromosoma II: Los cromosomas II de RH y DM resultaron completamente colineales, conservándose el orden y contenido de 5 marcadores: PM0333, PM0382, STI0036, STI0052 y PM0355.

Cromosoma III: Solo se cartografió un marcador microsatélite en RH (STI0050), el cual ha sido también cartografiado en el cromosoma III de DM. La presencia de solo

este marcador, no permite determinar la existencia de colinealidad entre ambas especies a nivel de este cromosoma.

Cromosoma IV: El cromosoma IV de RH es homólogo al cromosoma IV de DM, el contenido y orden de 5 marcadores se ha conservado en ambas especies (STM5140, PM0541, PM0321, PM0365, PM0319). Sin embargo, en el mapa de RH, se han cartografiado dos marcadores adicionales (STM1056 y PM0505), los cuales han sido cartografiados en los cromosomas VIII y X de DM respectivamente.

Cromosoma V: Este resultó completamente homólogo al cromosoma V de DM, conservándose en contenido y orden 5 marcadores microsatélite: PM0427, STM0013, PM0371, PM0380, PM0333.

Cromosoma VI: En este cromosoma de RH se cartografiaron tres marcadores: PM0439, PM0329, PM0478, cuya presencia y orden se conserva en el cromosoma VI de DM.

Cromosoma VII: En el cromosoma VII de RH se han cartografiado tres marcadores: STM3009, PM0378 y PM0518, los cuales también se ubican en el cromosoma VII de DM. El marcador STM3009 comparte la misma posición distal en el brazo corto de los cromosomas de RH y DM, sin embargo el orden que tienen los marcadores PM0378 y PM0518 muestra la ocurrencia de una posible inversión o translocación cromosómica. La posición conservada del marcador STM3009 en ambos mapas, nos asegura que la posible inversión no es producto de un análisis erróneo en el cual se esté tomando al cromosoma entero de modo invertido.

Cromosoma VIII: Dos marcadores se conservan en presencia y posición en ambas especies. Sin embargo, en el mapa genético de DM, el marcador PM0492 tiene una

posición adicional. Otra diferencia es la del marcador STM1056, el cual ha sido cartografiado en DM, pero en RH ha sido posicionado en el “bin” 73 del cromosoma IV.

Cromosoma IX: En este cromosoma de RH se cartografiaron 13 loci, correspondientes a 12 marcadores. La presencia de todos los marcadores, excepto de STM1056_215, se conserva también en el cromosoma IX de DM. En cuanto al orden, todos los marcadores excepto PM0522 son colineales. En el mapa genético de RH, el marcador PM0522 se encuentra más alejado de la parte superior cromosómica (0.0 cM), y en una posición inferior a PM0413 y PM0336, mientras que en el mapa genético de DM se encuentra en una posición superior a PM0413 y PM0336, y por lo tanto más cercano a la parte superior cromosómica.

Cromosoma X: En este cromosoma de RH solo se cartografió un marcador, el STM0051, cuya presencia se conserva en el cromosoma X de DM.

Cromosoma XI: En este cromosoma de RH solo se cartografió un marcador, el PM0489, cuya presencia se conserva en el cromosoma XI de DM.

Cromosoma XII: En este cromosoma de RH se cartografiaron dos marcadores STM0003 y PM0512, la presencia y orden de estos se mantiene en el cromosoma XII de DM. Sin embargo, en DM se ha posicionado el marcador PM0459, que en RH está localizado en el cromosoma I.

DM_Cromosoma I

RH_Cromosoma I

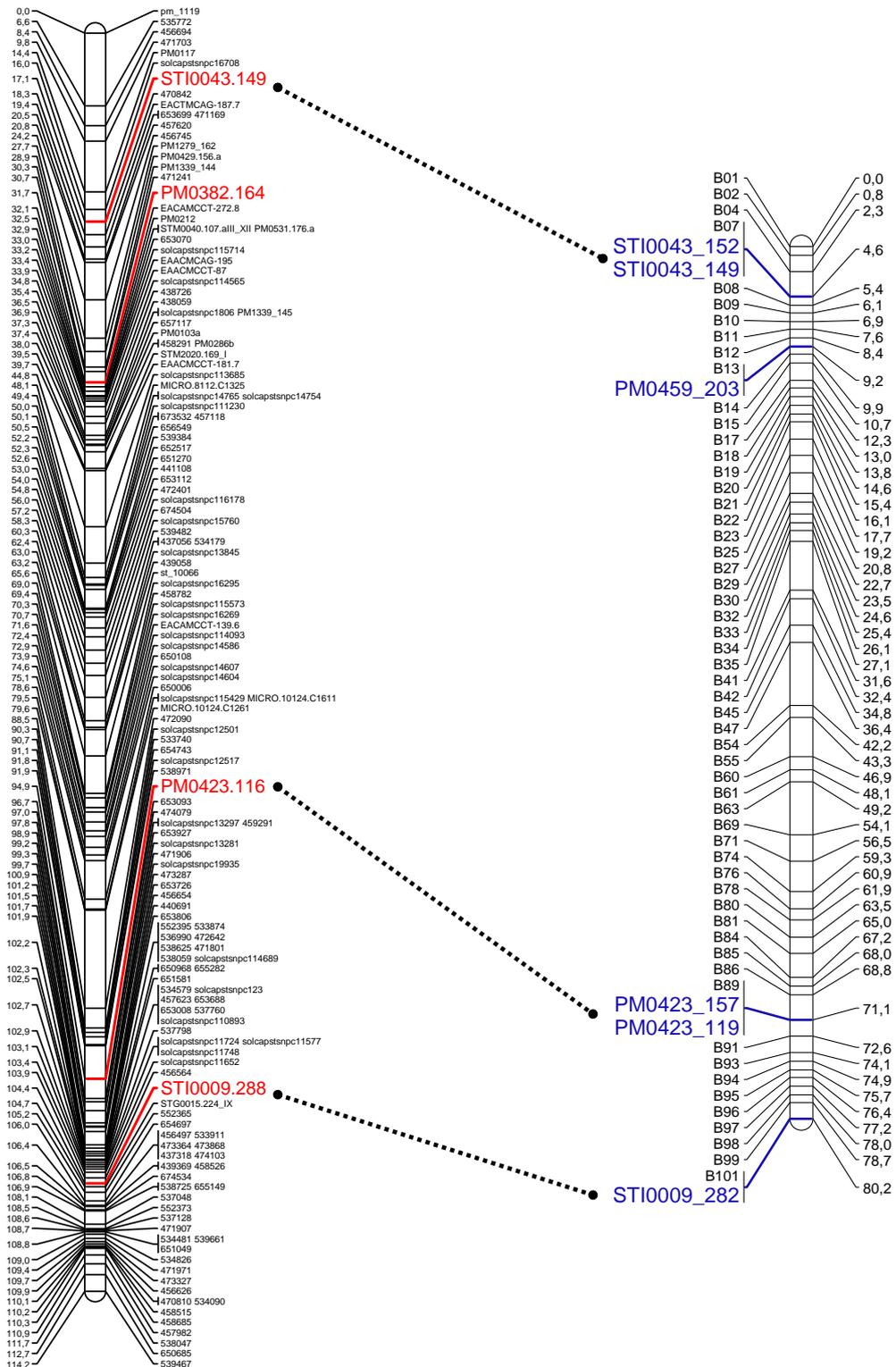
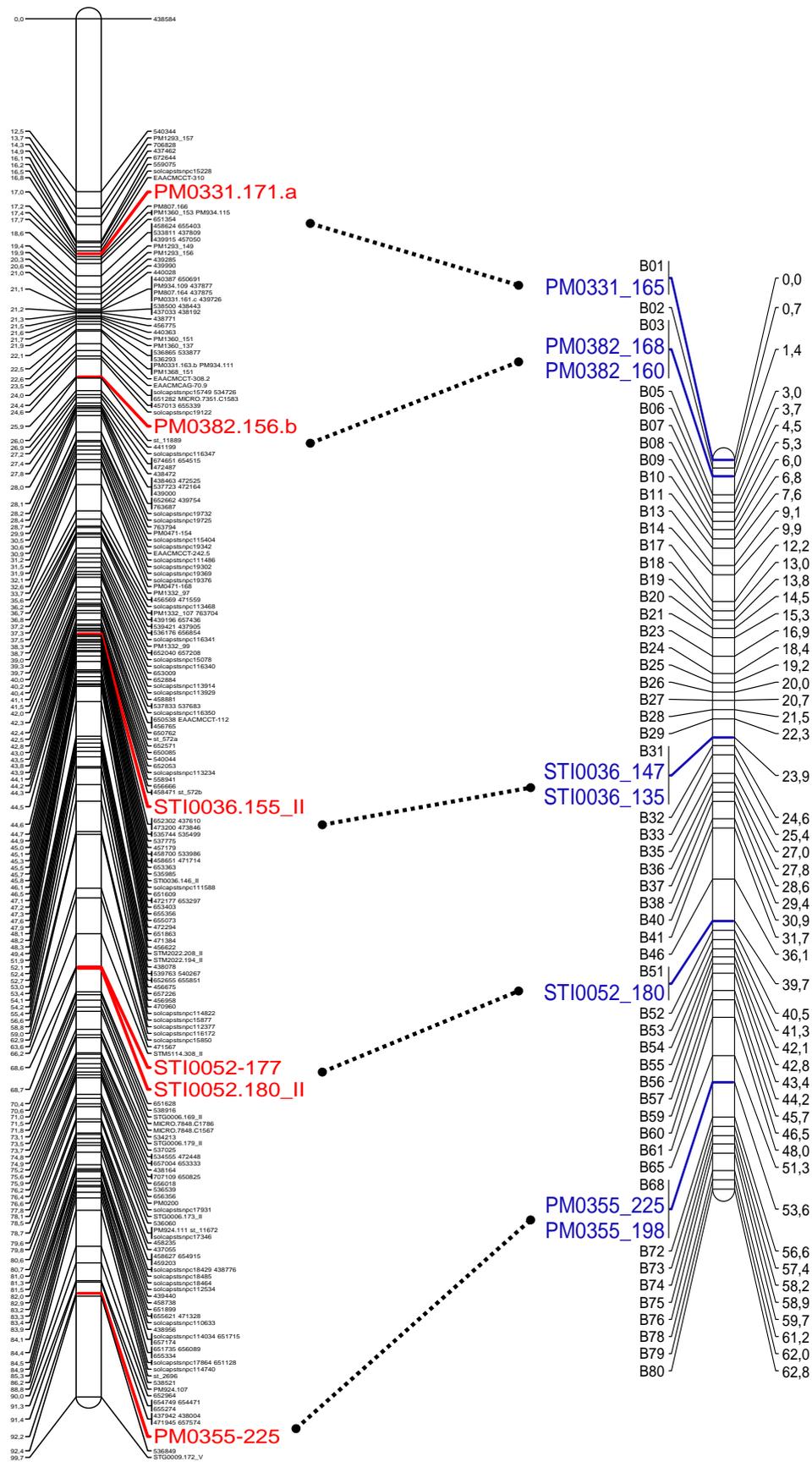


Figura 10. Comparación de los mapas genéticos de *Solanum tuberosum* (RH89-039-16) y *Solanum phureja* (DM1-3516R44).

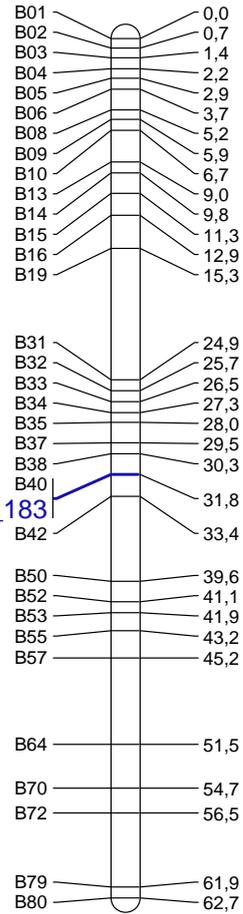
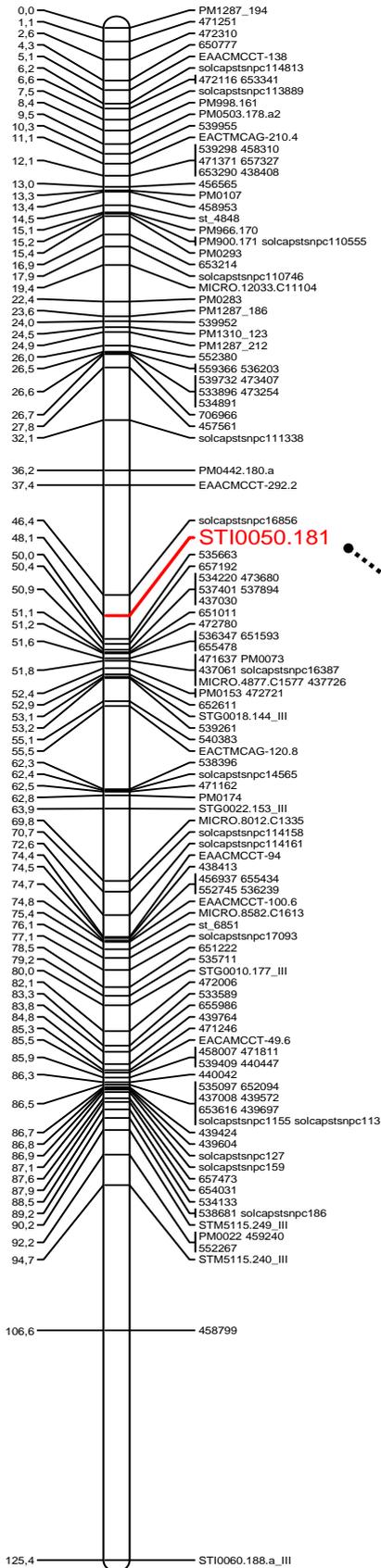
DM_Cromosoma II

RH_Cromosoma II



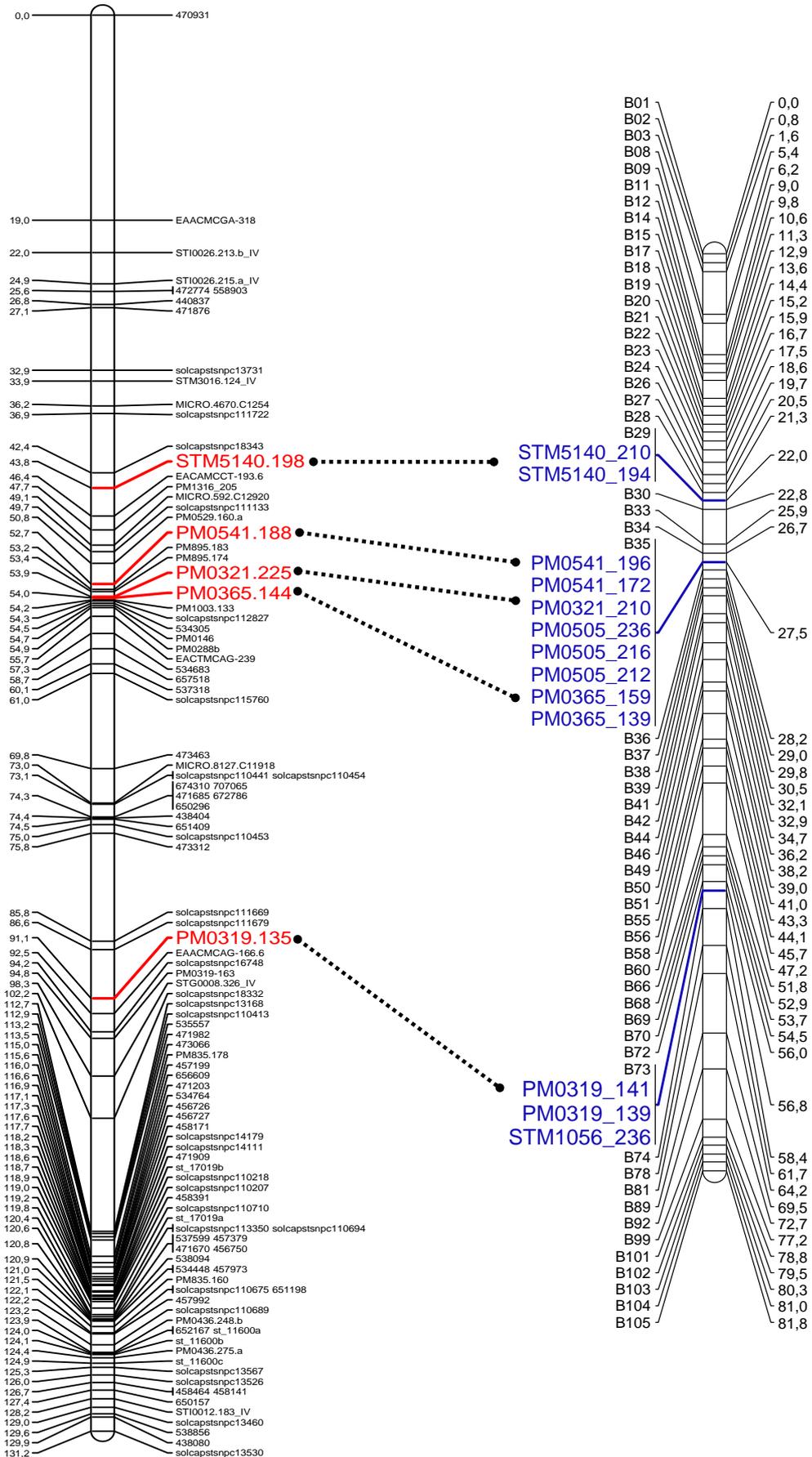
DM_Cromosoma III

RH_Cromosoma III



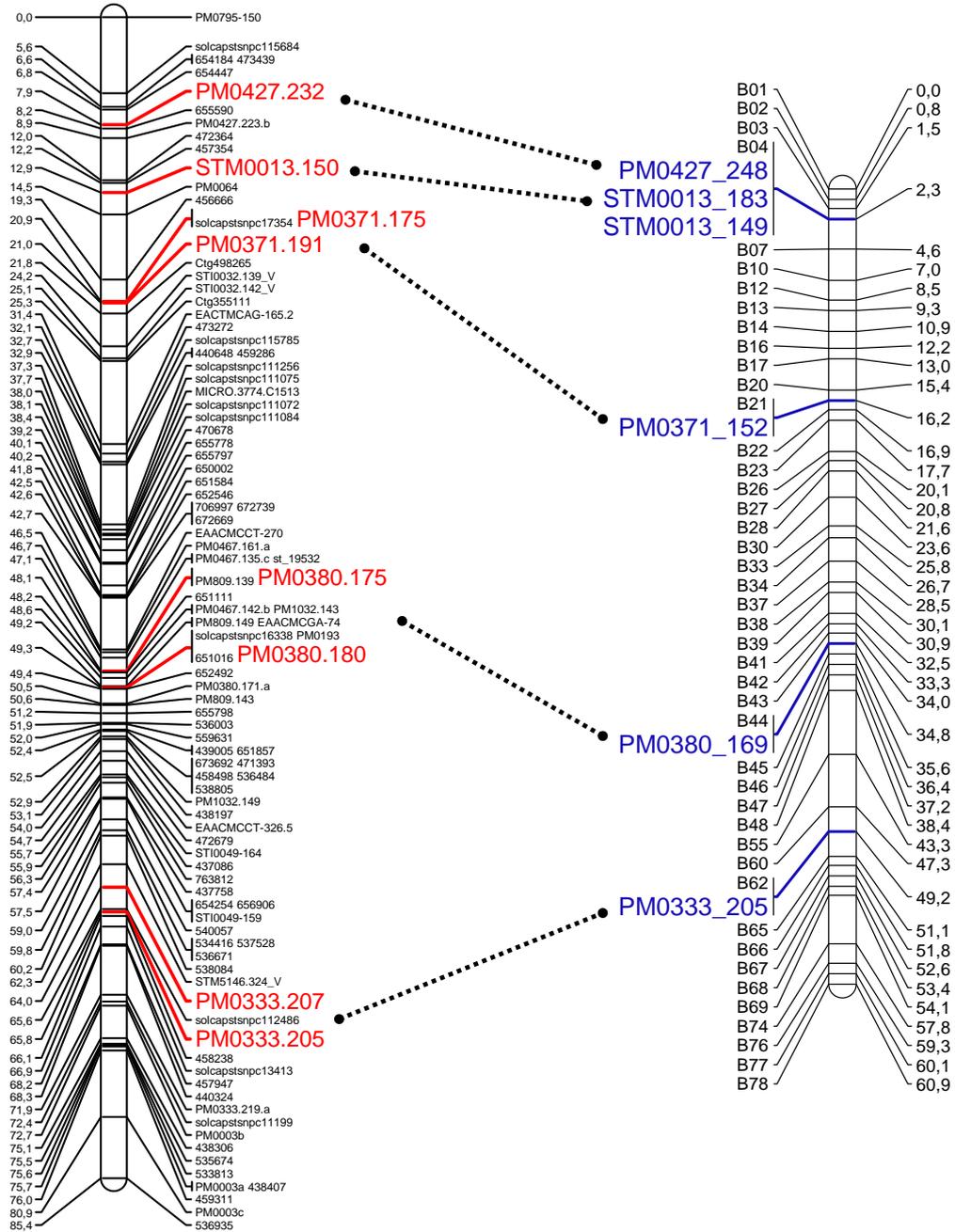
DM_Cromosoma IV

RH_Cromosoma IV



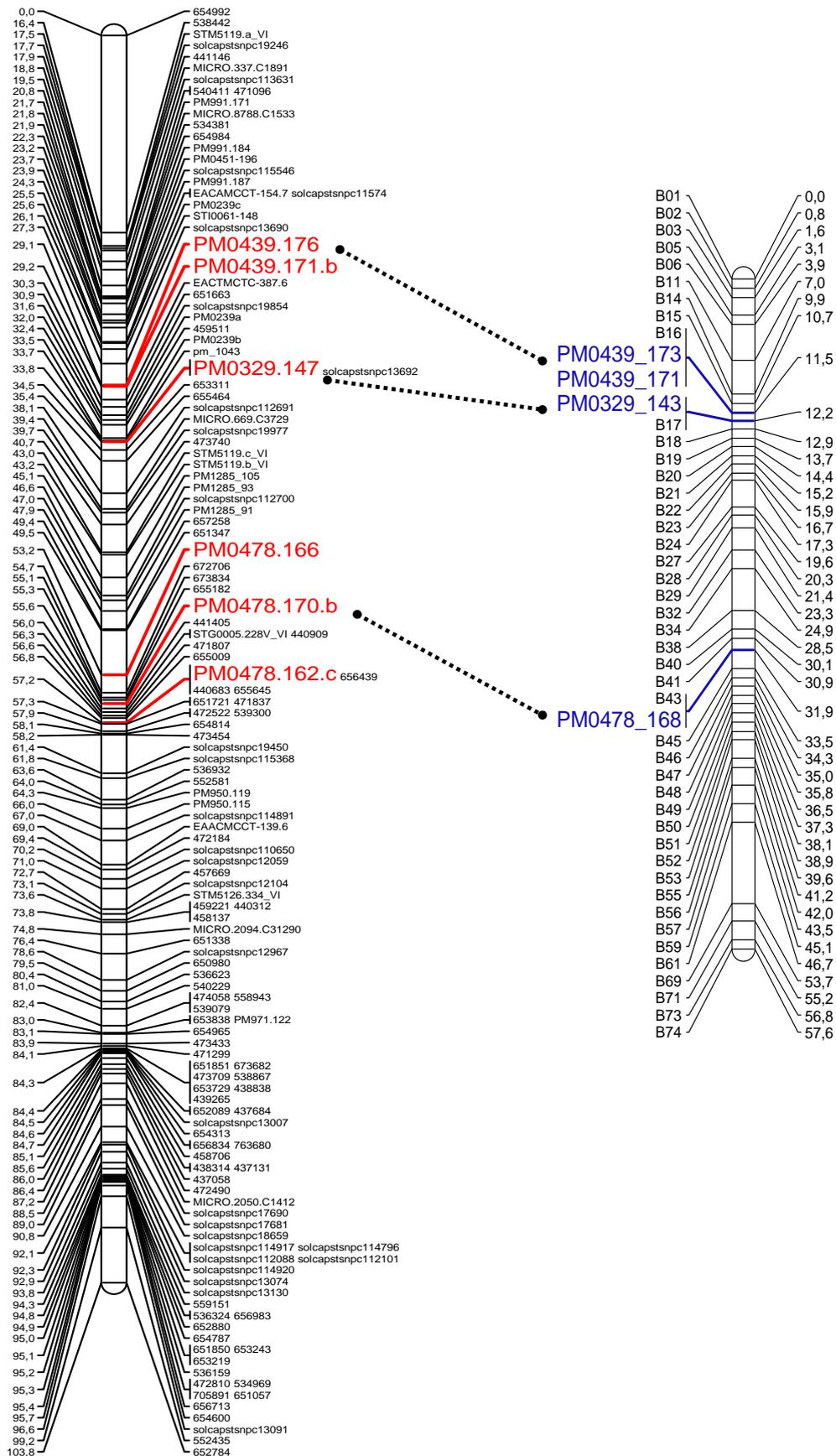
DM_Cromosoma V

RH_Cromosoma V



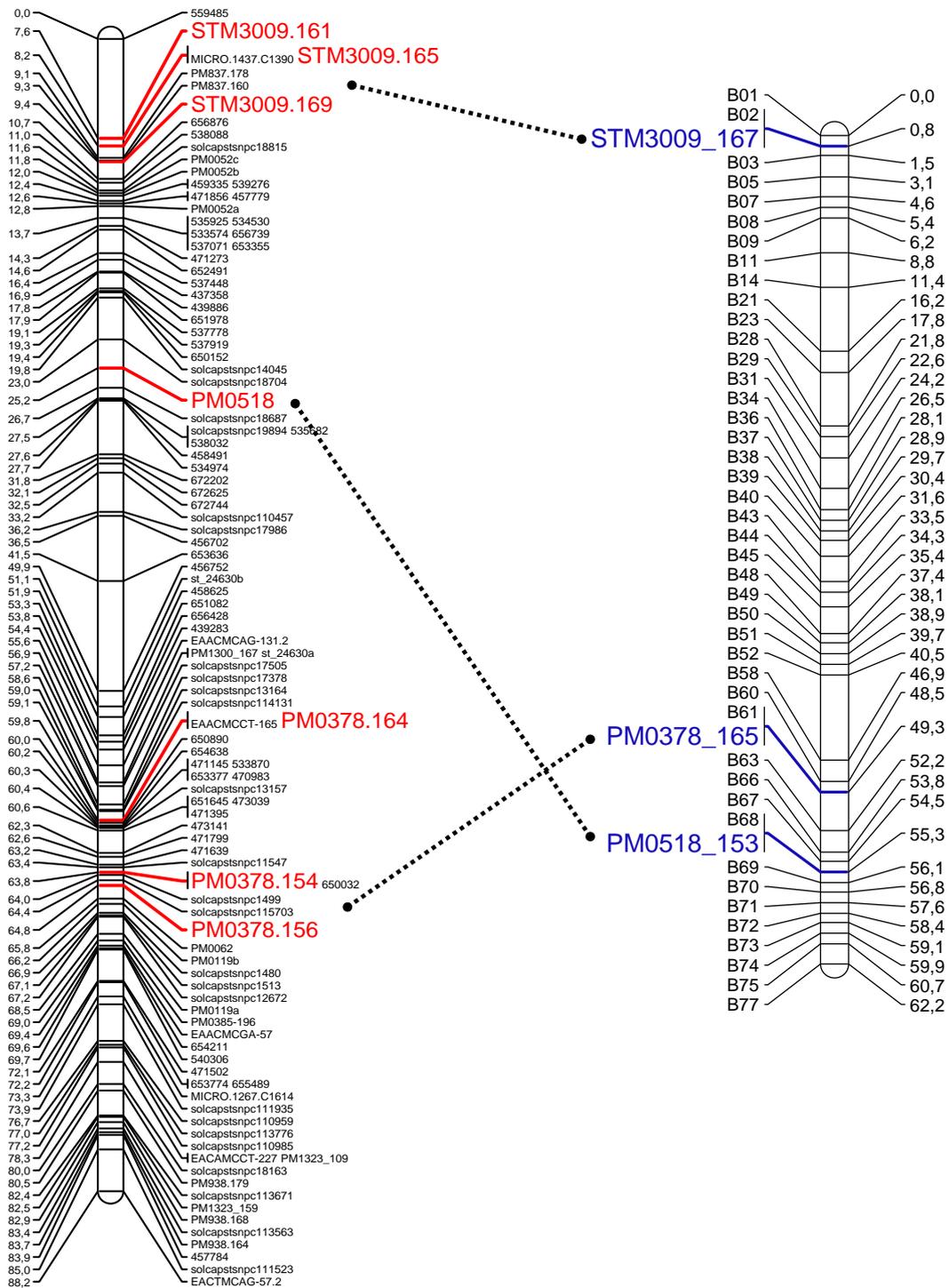
DM_Cromosoma VI

RH_Cromosoma VI



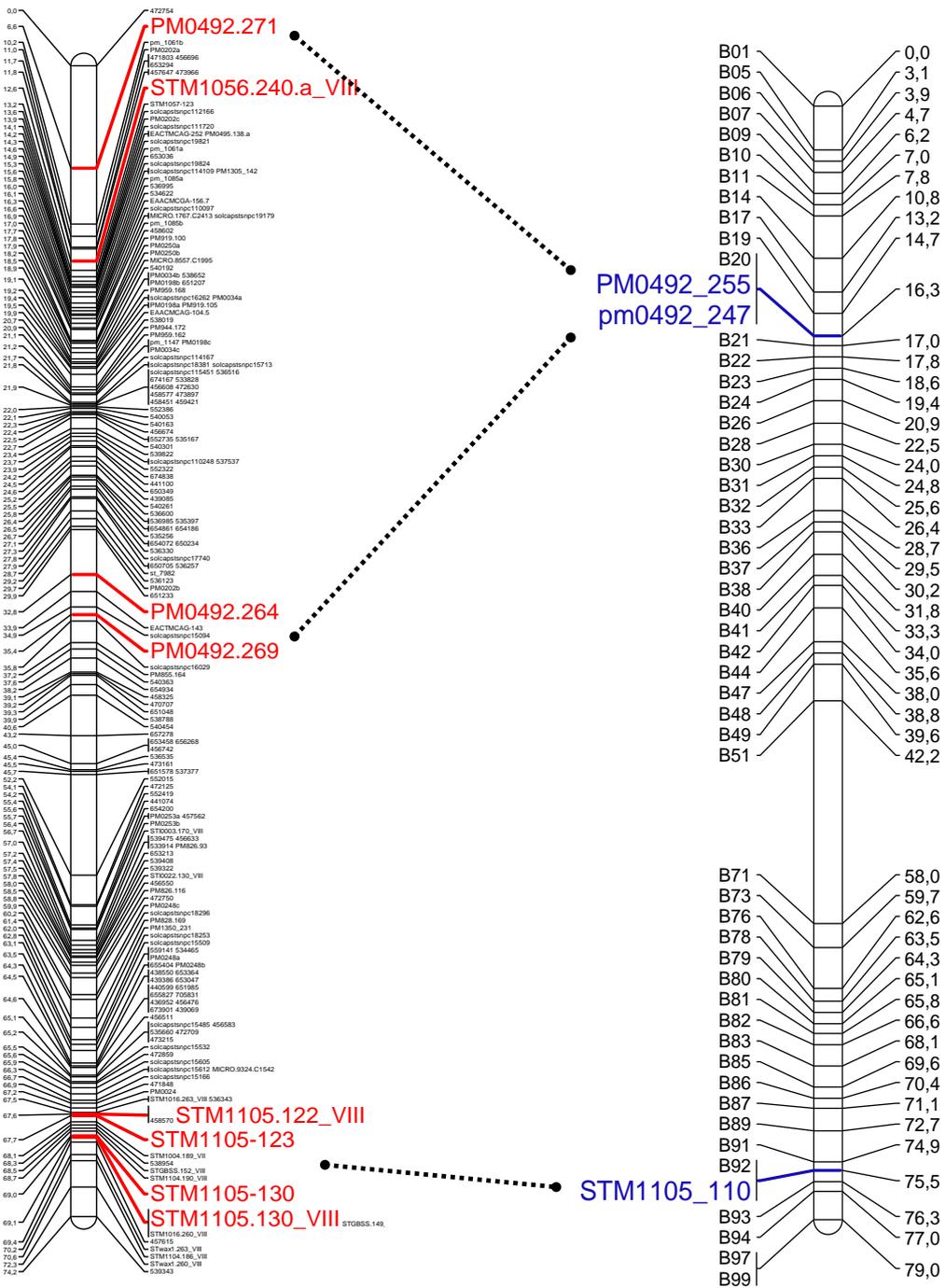
DM_Cromosoma VII

RH_Cromosoma VII



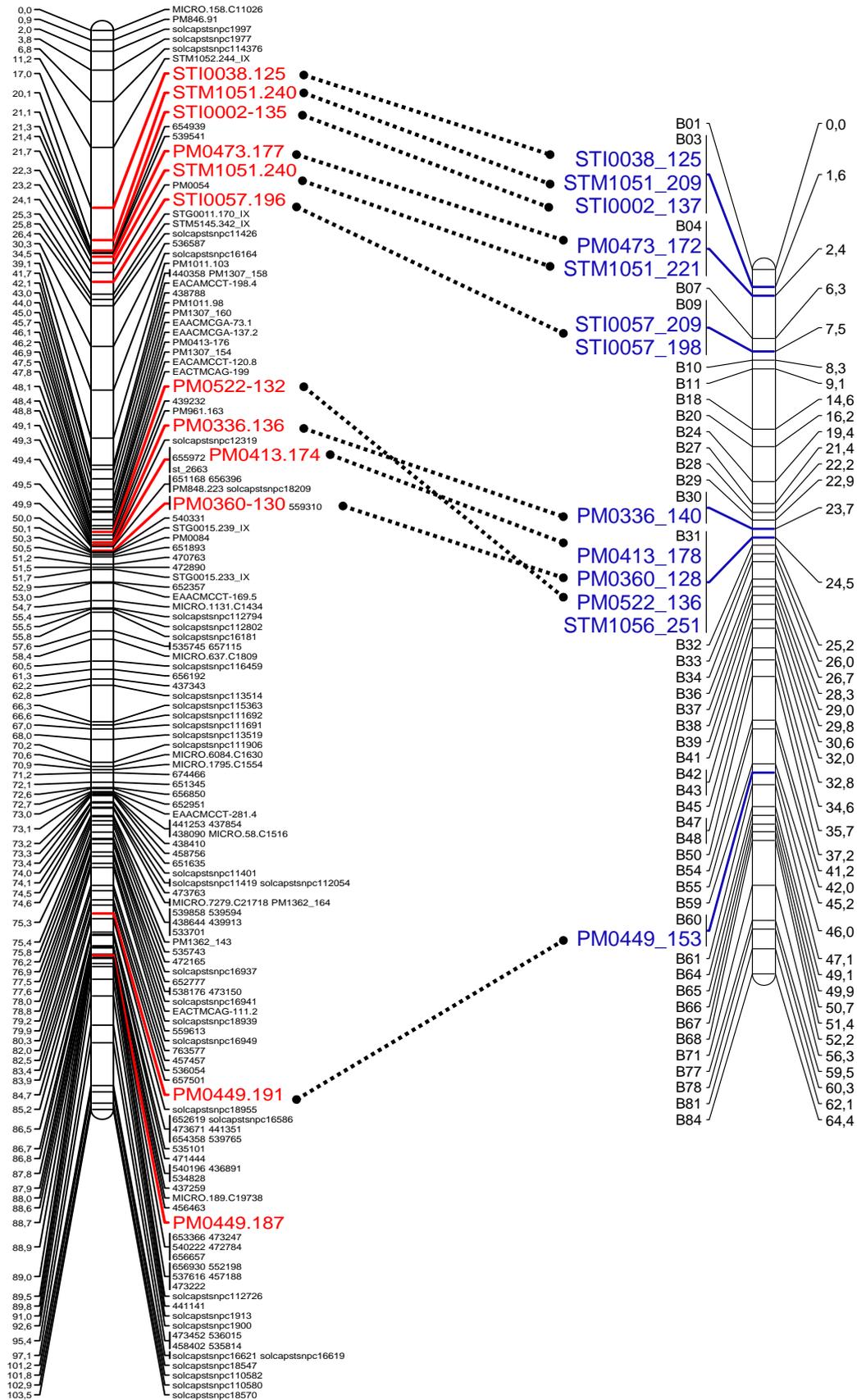
DM_Cromosoma VIII

RH_Cromosoma VIII



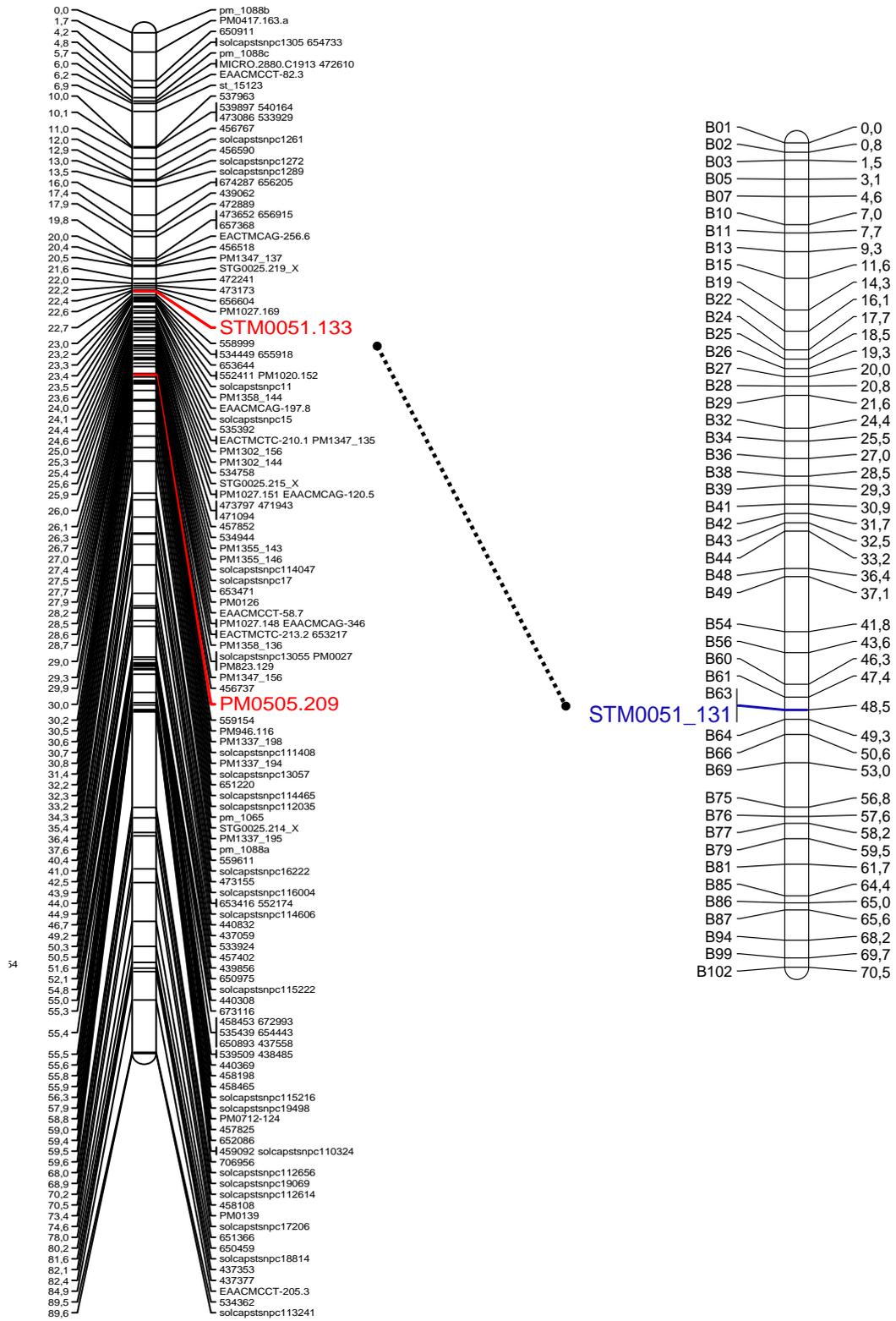
DM_Cromosoma IX

RH_Cromosoma IX



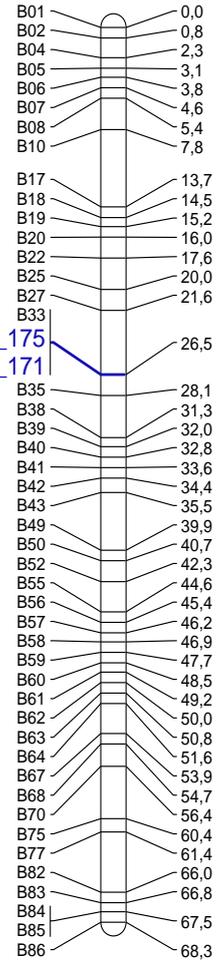
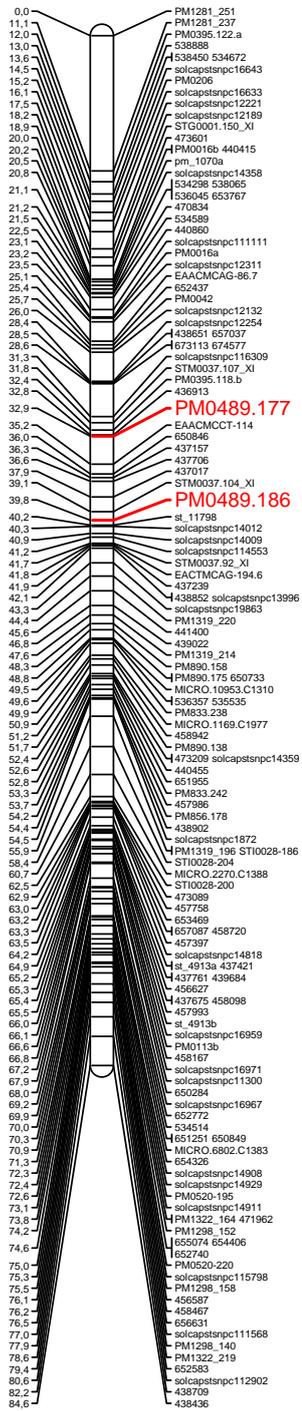
DM_Cromosoma X

RH_Cromosoma X



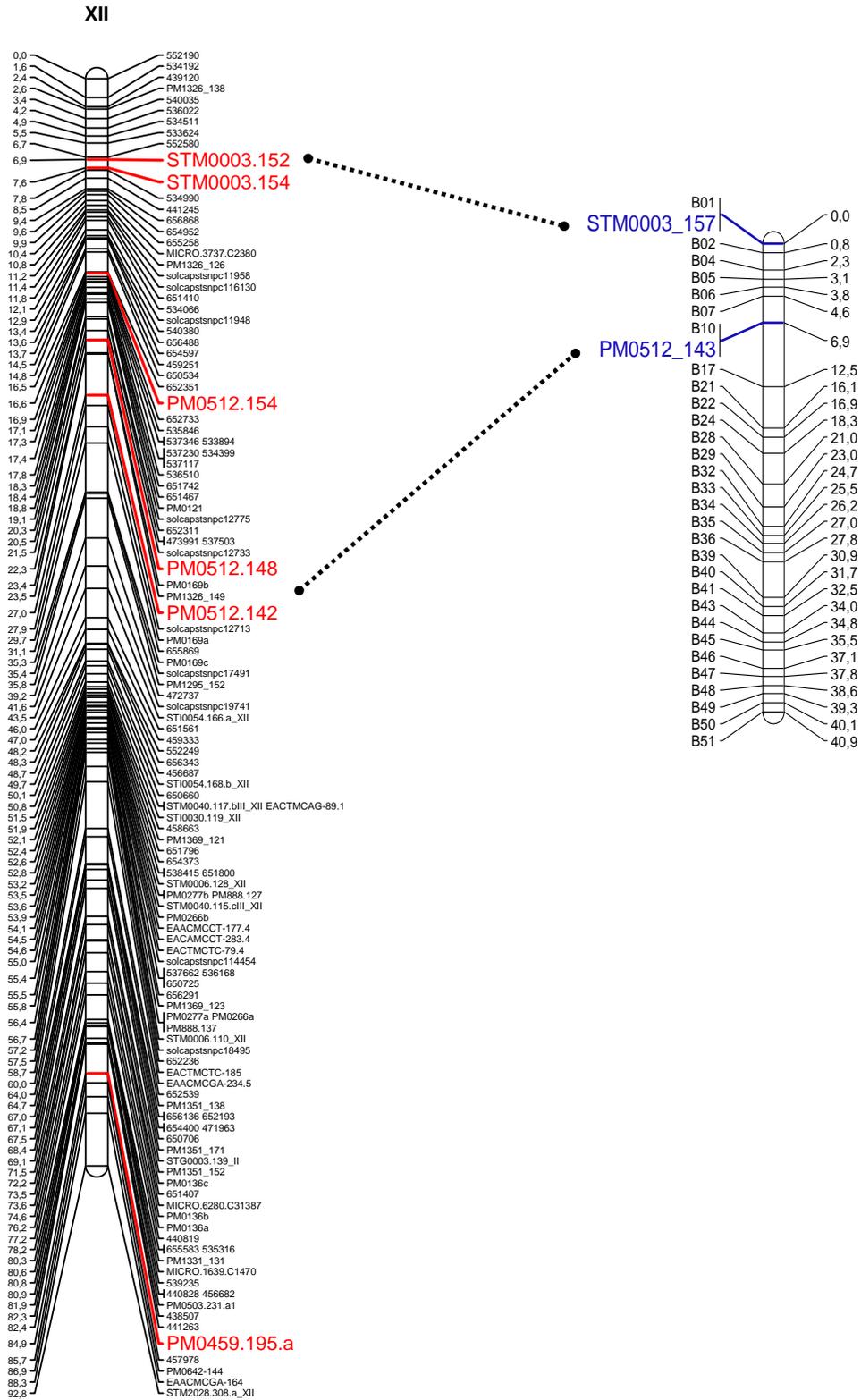
DM_Cromosoma XI

RH_Cromosoma XI



DM_Cromosoma XII

RH_Cromosoma XII



VII. DISCUSIÓN

Los marcadores microsatélite o SSR, representan un tipo ideal de marcador genético para el análisis de genomas vegetales. El análisis de polimorfismo de los microsatélites basado en la PCR, empleando un sistema semiautomatizado de detección (LI-COR 4300) es de alta resolución, esto ha permitido detectar diferencias en tamaño de hasta un nucleótido.

Los marcadores microsatélite son muy polimórficos, registrando altos valores de Índice de contenido polimórfico (PIC) (Liu and Cordes, 2004). De los 74 microsatélites evaluados en este trabajo, 61 marcadores resultaron ser polimórficos (82%), solo 1 marcador no logró amplificarse, mientras que 12 fueron monomórficos. Entre los marcadores más polimórficos, se encuentran: STM1056 que amplificó seis alelos en la población SHxRH, PM0492 con siete alelos y el marcador STI0005 con ocho alelos registrados. Estos marcadores tienen un alto número alélico debido a su carácter multiloci, lo cual ya fue reportado anteriormente para STI005 en la población BCT (*S. phureja* x (*S. tuberosum* x *S. chacoense*) de papa (Feingold *et al.*, 2005) y para STM1056 en la población MPI de *S. tuberosum* (Milbourne *et al.*, 1998).

Muchos estudios previos han reportado la construcción de mapas genéticos en papa, en diferentes poblaciones de mapeo y con diferentes marcadores moleculares (Bonierbale *et al.*, 1988; Milbourne *et al.* 1998; Feingold *et al.*, 2005; Ghislain *et al.*, 2004, 2009; van Os *et al.*, 2006). Sin embargo, para explotar completamente la información de los mapas genéticos es necesario que marcadores moleculares de diversos tipos sean integrados en un solo mapa (Yanamaka *et al.*, 2005), o incluso marcadores clásicos como morfológicos y enzimáticos (Jacobs *et al.*, 1995). Con la integración de mapas genéticos se incrementa la densidad de marcadores, mejora la resolución genética y crea un orden más confiable entre ellos.

El UHD es el mapa más denso desarrollado para papa, sin embargo solo contiene marcadores AFLP, los cuales son muy laboriosos y costosos. En este sentido, se empleó el programa BINMAP para posicionar los loci microsatélite en el mapa UHD de *S. tuberosum*. La integración de marcadores microsatélites (SSR) en el UHD además permite el alineamiento de otros mapas genéticos de papa, en base a los microsatélites comunes. De este modo los marcadores microsatélites trabajados en esta tesis se convierten en marcadores puente (bridge markers) que permitirán integrar el mapa UHD a otros mapas de papa.

Con el programa BINMAP se posicionaron 62 nuevos loci en el mapa UHD de papa. Los resultados del posicionamiento se resumen en el archivo con extensión .bmo. Este archivo da información acerca de la fracción de recombinación entre el marcador analizado y el bin en el cual ha sido posicionado. Se debería esperar una fracción de recombinación igual a 0.000. Para ningún locus analizado se alcanzó un valor de fracción de recombinación igual a cero, esto se debe principalmente a la presencia de abundantes datos perdidos, ya que la población SHxRH en la que se amplificaron los marcadores solo contiene 86 individuos, mientras que la población original cuenta con 130 individuos, esto hace una diferencia de 44 individuos para los cuales no se ha tenido datos en ninguno de los locus.

Otro valor obtenido es el valor de LOD de cartografía, con el que se ha posicionado determinado marcador. Se considera un valor mínimo de LOD igual a 4.0. En todos los casos se obtuvo un valor de LOD superior a 4.0, lo cual indica que los 62 loci se han posicionado en el mapa UHD con una exactitud de $p < 0.001$, indicando la confiabilidad del estudio.

La comparación de los mapas genéticos, en general, revela la colinealidad a lo largo de grandes segmentos cromosómicos entre RH y DM. Sin embargo como se detalla en los resultados, se han encontrado diferencias en la posición de algunos marcadores entre ambos mapas. Se han encontrado marcadores como: STM1056, el cual en RH ha sido posicionado en los cromosomas IV y IX, y en el mapa de DM se lo ubica en el cromosoma VIII. Otros estudios cartografiaron este marcador en los cromosomas VI y VIII (Milbourne *et al.*, 1998). Feingold *et al.* (2005) sostiene que no es conveniente trabajar con este tipo de marcadores multiloci, pues ofrecen información ambigua para la cartografía.

Otro marcador que fue cartografiado en loci duplicados es el PM0382, el cual fue ubicado en el cromosoma II de RH, mientras que en DM fue cartografiado en el cromosoma I y II. Es posible que esto se deba a una duplicación intercromosómica del locus, sin embargo no es posible asegurarlo debido a la ausencia de segregación observada en uno de los alelos de este marcador. Sin embargo, en papa se ha reportado que durante su evolución han ocurrido fenómenos de duplicación intercromosómica en los cromosomas VII y II, IX y X, XI y IX (Gebhardt *et al.*, 1991; Gebhardt *et al.*, 2003).

El marcador PM0459 también mostró diferencias entre ambos mapas, siendo cartografiado en el cromosoma XII de DM, y en el cromosoma I de RH; y el marcador PM0505 ubicado en el cromosoma IV de RH y en el cromosoma X de DM.

En el caso del cromosoma VIII, el marcador PM0492 presentó tres alelos con posiciones diferentes en el mapa de DM (un alelo a 6.6 cM y dos alelos a 32 cM), sin embargo en el mapa de RH los alelos de PM0492 han sido cartografiados en una única posición. Es posible que esto se deba a una duplicación intracromosómica del locus, pues ambos alelos de PM0492 fueron cartografiados en una única posición de

RH, mientras que en DM en dos posiciones distintas. La duplicación intracromosómica ha sido reportada por varios estudios como parte de la evolución del genoma de papa, y ha sido encontrada en los cromosoma II y VI (Gebhardt *et al.*, 2003).

En los cromosomas VII y IX, la alteración del orden de los marcadores entre RH y DM indica la ocurrencia de un cambio cromosómico estructural, sea este una inversión o una translocación. Se ha propuesto que las inversiones son más frecuentes que las translocaciones, debido a que intercambios cromosómicos usualmente tienen efectos negativos en la fertilidad de un organismo. Por lo tanto, la explicación más probable de la alteración del orden de los marcadores en los cromosomas VII y IX podría ser la ocurrencia de una inversión cromosómica en tal región cromosómica.

Es así que en el cromosoma VII, el marcador PM0378 se ubica en el bin 61, mientras que el marcador PM0518 en el bin 68. El centrómero de este cromosoma según van Os *et al.* (2006) tendría una posición putativa en el bin 68, lo cual indica que la inversión ocurrida en *S. tuberosum* sería una inversión paracéntrica con un punto de quiebre en el centrómero. Sin embargo esto no puede ser completamente verificado en este trabajo. Estudios anteriores en otras Solanaceas han reportado la ocurrencia de inversiones paracéntricas sobre las pericéntricas, debido a que tienen el menor efecto negativo sobre el "fitness" y por tanto es la forma más probable de rearrreglo cromosómico durante la evolución (Bonierbale *et al.*, 1988; Tanksley *et al.*, 1992, Doganlar *et al.*, 2002). La infrecuencia de las inversiones pericéntricas en Solanaceas y otras plantas, se relaciona con algunos efectos sobre la fertilidad que podrían tener la recombinación en regiones centroméricas invertidas (Burnham, 1962). Debido a esto, es de esperar que esta posible inversión no involucre la región centromérica y corresponda a una inversión paracéntrica.

Del mismo modo en el cromosoma IX, la posición genética diferente del marcador PM0522 entre RH y DM puede ser explicada por la ocurrencia de una inversión. La región del re-arreglo cromosómico es muy cercana a la posición putativa del centrómero que corresponde al bin 31 (van Os *et al.*, 2006); sin embargo, es probable que haya ocurrido una inversión paracéntrica debido al menor efecto negativo que éstas tienen.

Es necesario cartografiar más microsatélites en las regiones de alteración cromosómica, de esta manera se logrará saturarlas y así entender realmente qué tipo de mutación ha tenido lugar en el transcurso del tiempo en las especies *S. tuberosum* y *S. phureja*.

VIII. CONCLUSIONES

- Los 62 loci microsatélites integrados en el mapa UHD de *S. tuberosum* son marcadores “puente” muy informativos para la cartografía comparativa y la integración de mapas genéticos de diferentes poblaciones.
- La comparación de los mapas genéticos revela que RH (*Solanum tuberosum*) y DM (*Solanum phureja*) conservan en su totalidad la presencia y el orden de marcadores en largos segmentos de los cromosomas II (PM0331, PM00382, STI0036, STI0052, PM0355), V (PM0427, STM0013, PM0371, PM0380, PM0333) y VI (PM0439, PM0329, PM0478).
- Los marcadores PM0459, PM0505 y STM1056 fueron posicionados en los cromosomas I, IV, IV y X de RH respectivamente, localización diferente a la reportada en DM (cromosomas XII, X y VIII respectivamente).
- Los cromosomas VII y IX presentan marcadores no colineales, consecuencia de posibles cambios cromosómicos (inversiones o y translocaciones) a nivel estructural durante la evolución de las especies.
- La localización de los marcadores PM0492 y PM0382 en loci duplicados, indicaría que durante la evolución de estas dos especies ocurrieron fenómenos de duplicación intra e intercromosómica.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N. y PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 2008, vol. 2, p. 617–631.
- AHN, S., y TANKSLEY, S. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1993, vol. 90, p. 7980-7984.
- ARIF, I.; BAKIR, M.; KHAN, H.; FARHAN, A.; HOMAIDAN, A.; BAHKALI, A., ALSADOON, A. y SHOBRAK, M. Application of RAPD for molecular characterization of plant species of medicinal value from an arid environment. *Genetics and Molecular Research*. 2010, vol. 9, n°4, p. 2191-9198.
- ASHKENAZI, V.; CHANI, E.; LAVI, U.; LEVY D.; HILLEL, J. y VEILLEUX, R. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*. 2001, vol. 44, p. 50–62.
- BENNETZEN, J. y DEVOS, K. Plant Synteny, Colinearity and Genome Evolution. UK. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001.
- BERNATZKY, R., y TANKSLEY, S. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics*. 1986, vol. 112, p. 887-898.

-
- BURHAM, C. *Discussions in Cytogenetics*. Burgess Publishing, Xth. 1962.
 - BONIERBALE, M.; PLAISTED, R.; y TANKSLEY, S. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics*. 1988, vol. 120, p. 1095-1103.
 - BOWERS, J.; ABBEY, C.; ANDERSON, S.; CHANG, C.; DRAYE, X.; HOPPE, A.; JESSUP, R.; LEMKE, C.; LENNINGTON, J.; LI, Z.; LIN, Y.; LIU, S.; LUO, L.; MARLER, B.; MING, R.; MITCHELL, S.; QIANG, D.; REISCHMANN, K.; SCHULZE, S.; SKINNER, D.; WANG, D.; KRESOVICH, S.; SCHERTZ, K. y PATERSON, A. A high-density genetic recombination map of sequence tagged sites for sorghum; as a framework for comparative structural and evolutionary genomics. *Genetics*. 2003, vol. 165, p. 367-386 2003
 - BOYKO, E.; KALENDAR, R.; KORZUN, V.; FELLERS, J.; KOROL, A.; SCHULMAN, A. y GILL, B. A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: insights into cereal chromosome structure and function. *Plant Molecular Biology*. 2002, vol.48, n°5-6, p. 767-790.
 - BRADSHAW, J. y BONIERBALE, M. Potatoes. En: BRADSHAW, J. (edit). *Root and Tuber Crops, Handbook of Plant Breeding Vol 7*, New York: Springer, 2010, p. 1-52.
 - CARDLE, L.; RAMSAY, L. y MILBOURNE, D. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*. 2000, vol. 156, p. 847-854.

-
- COGHLAN, A.; EICHLER, E.; OLIVER, S.; PATERSON, A. y STEIN, L. Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends in Genetics*. 2005, vol. 21, n°12, p. 673- 682
 - COLLARD, B.; JAHUFER, M.; BROUWER, J. y PAN, E. An introduction to markers; quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 2005, vol. 142, p. 169–196.
 - DE GORTARI, M.; FREKING, B.; CUTHBERTSON, R.; KAPPES, S.; KEELE, J. A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mammalian Genome*. 1998, vol. 9, p. 204- 209.
 - DOGANLAR, S.; FRARY, A.; DAUNAY. MC.; LESTER, R. y TANKSLEY, S. A Comparative Genetic Linkage Map of Eggplant (*Solanum melongena*) and Its Implications for Genome Evolution in the Solanaceae. *Genetics*. 2002, vol. 161, p. 1697–1711.
 - DURAN, C.; EDWARDS, D. y BATLEY, J. Genetic Maps and the Use of Synteny. *En Plant Genomics: Methods and Protocols*. 2008, vol. 51, p. 41-55.
 - DOYLE J. y DOYLE J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *BRL Focus*. 1990, vol. 12, p. 13–15
 - ELLEGREN H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetic*. 2004, vol. 5, n°6, p. 435-45.
 - EU project FAIR5-PL97-3565. “Ultra Dense Recombination Map of Potato” [en línea]. 2006. Disponible en la Web: www.plantbreeding.wur.nl/potatomap/

-
- FAO. “Año internacional de la papa” [en línea]. 2010, [2010]. Disponible en la Web: <http://www.potato2008.org/es/index.html>
 - FAOSTAT. “Production Crops”, [en línea]. 2009, [17 de Mayo del 2011]. Disponible en la Web: www.faostat.fao.org.
 - FAROOQ, S. y AZAM F. Markers in Plant Breeding-I: Concepts and Characterization Molecular. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2002, vol. 5 n°10, p. 1135-1140.
 - FEINGOLD, S.; LLOYD, J.; NORERO, N.; BONIERBALE, M. y LORENZEN, J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical Applied Genetic*. 2005, vol. 111, p. 456–466.
 - FERREIRA, M. y GRATTAPAGLIA, D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA–CENARGEN, Brasilia, Brasi, 1998.
 - GEBHARDT, C.; RITTER, E.; DEBENER, T.; SCHACHTSCHABEL, U; WALKEMEIER, B.; UHRIG, H. y SALAMINI, F. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theoretical Applied Genetic*. 1989, vol, 78, p. 65-75.
 - GEBHARDT, C., RITTER, E., BARONE, A., DEBENER, T., WALKEMEIER, B., SCHACHTSCHABEL, U., KAUFMANN, H., THOMPSON, R., BONIERBALE, M., GANAL, M., TANKSLEY, S., Y SALAMINI, E. RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theoretical Applied Genetics* .1991, vol. 83, pag. 49-57

-
- GEBHARDT, C., WALKEMEIER, B., HENSELEWSKI, H., BARAKAT, A., DELSENY, M. y STUBER, H. 2003. Comparative mapping between potato (*Solanum tuberosum*) and *Arabidopsis thaliana* reveals structurally conserved domains and ancient duplications in the potato genome. *The Plant Journal*, vol. 34, pag. 529- 541.
 - GHISLAIN, M.; NUÑEZ, J.; HERRERA, M.; GUZMAN, F.; BONIERBALE, M. y SPOONER, D. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*. 2009, vol. 23, p. 377-388.
 - GHISLAIN, M.; RODRÍGUEZ, A.; HIJMANS, R.; SPOONER, D. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theoretical Applied Genetic*. 2006, vol. 113, p.1515–1527.
 - GHISLAIN, M.; SPOONER, D.; RODRIGUEZ, F.; VILLAMON, F.; NUÑEZ, J.; VÁSQUEZ, C.; WAUGH, R. y BONIERBALE, M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theoretical Applied Genetic*. 2004, vol. 108, p. 881–890.
 - GRIFFITHS, A.; MILLER, J.; SUZUKI, D.; LEWONTIN, R. y GELBART W. An Introduction to Genetic Analysis. 7th ed. New York, Freeman and Company Press, 2000. ISBN-10: 0-7167-3520-2.
 - GRODZICKER, T.; WILLIAMS, T.; SHARP, J.; SAMBROOK, P. Physical mapping of temperature sensitive mutants of adenovirus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1975, vol. 39, p. 439-446.

-
- GRUN, P. The evolution of cultivated potatoes. *Economic Botany*. 1990, vol. 44, n°3, p. 39-55.
 - GYAPAY G., MORISSETTE J., VIGNAL A., DIB C., FIZAMES C., MILLASSEAU P., MARC S., BERNADI G., LATHROP M., WEISSENBACH J. The 1993- 94 Généthon human genetic linkage map. *Nature Genetics*. 1994, vol.7, pag. 246-249.
 - HARUSHIMA, Y.; YANO, M.; SHOMURA, A.; SATO, M.; SHIMANO, T. YOSHIHIDE, KUBOKIA Y.; YAMAMOTOA, T.; LINA, S.; ANTONIOA, B.; PARCOB, A.; KAJIYAA ,H.; HUANGB, N.; YAMAMOTO, K.; NAGAMURAA, Y.; KURATAA, N.; KHUSHB, G.; y SASAKIAET, T. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. *Genetics*. 1998, vol. 148, p. 479-494.
 - HAVERKORT, A.; BOONEKAMP, P.; HUTTEN, R.; JACOBSEN, E.; LOTZ, L.; KESSEL, G.; VISSER, R.; van der VOSSSEN, E. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance throught cisgenic modification. *Potato research*. 2008, vol. 51, n°1, p. 47-57.
 - HAWKES, J. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. 1est ed. Washington Oxford England/Smithsonian Institution Press, 1990. 259 p.
 - HUAMÁN, Z. Systematic botany and morphology of the potato. *Technical Information bulletin 6*, International Potato Center, Lima, Peru. 1986.

-
- HUAMÁN, Z. y SPOONER, D. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* section *Petota*). *American Journal of Botany*. 2002, 89:947-965.
 - JACOBS, J.; VAN ECK, H.; VERKERK-BAKKER, P.; HEKKERT, B.; BASTIAANSEN, H.; KHARBOTLY, A.; PEREIRA, A.; JACOBSEN, E. y STIEKEMA, W. A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers; including transposons; and classical markers. *Theoretical Applied Genetic*. 1995, vol 91, p. 289-300.
 - KELLER B. y FEUILLET C. Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends in plant science*. 2000, vol. 5, nº 6.
 - KONG, A.; GUDBJARTSSON, D.; SAINZ, J.; JONSDOTTIR, J.; GUDJONSSON, S.; RICHARDSSON B.; SIGURDARDOTTI S.; BARNARD, J.; HALLBECK, B.; MASSON G.; SHLIEN, A.; PALSSON, S.; FRIGGE M.; THORGEIRSSON, T.; GULCHER, J. y STEFANSSON K. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nature Genetics*. 2002, vol. 31.
 - LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*. 1993, vol. 21, p. 1111-1115.
 - LANDER E., GREEN P., ABRAHAMSON J., BARLOW A., DALY M., LINCOLN S., NEWBURG L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*. 1987, vol1, p. 174–181.

-
- LANGRIDGE, P. y CHALMERS, K. The Principle: Identification and Application of Molecular Markers. En *Molecular Marker Systems In Plant Breeding And Crop Improvement, Biotechnology In Agriculture And Forestry*. Springer Berlin Heidelberg Press. 2005, vol. 55, p. 3-22. ISBN978-3-540-20689-7.
 - LITT, M. y LUTY, J. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. 1989, vol. 44, p. 397-401.
 - LIU, Z. y CORDES, J. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 2004, vol. 238, p. 1 – 3.
 - MARGULIES M., EGHOLM M., ALTMAN W., ATTIYA S., BADER J., BEMBENI L., BERKA J., BRAVERMAN M., CHEN Y., CHEN Z., DEWELL S., DU L., FIERRO J., GOMES X., GODWIN B., HE W., HELGESEN S., HE HO C., IRZYK G., JANDO S., ALENQUER M., JARVIE T., JIRAGE K., KIM J., KNIGHT J., LANZA J., LEAMON J., LEFKOWITZ S., LEI M., LI J., LOHMAN K., LU H., MAKHIJANI V., MCDADE K., MCKENNA M., MYERS E., NICKERSON E., NOBILE J., PLANT R., PUC B., RONAN M., ROTH G., SARKIS G., SIMONS J., SIMPSON J., SRINIVASAN M., TARTARO K., TOMASZ A., VOGT K., VOLKMER G., WANG S., WANG Y., WEINER M., YU P., BEGLEY R. AND ROTHBERG J. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005, 437: 376-380.
 - MCCOUCH, S. Genomics and Synteny. *Plant Physiology*. 2001, vol. 125, p. 152-155

-
- McCLEAN P., 1998. "Mapping Plant Genomes with molecular markers". [en línea]. 1998. Disponible en la Web: <http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc731/mapping/mapping1.htm>
 - MINAG. "Sector Agrario- Papa" [en línea]. 2010, [2010]. Disponible en la Web: www.minag.gob.pe.
 - MILBOURNE, D.; MEYER, R.; COLLINS, A.; RAMSAY, L.; GEBHARDT, C. y WAUGH, R. Isolation; characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular Genomics and Genetics*. 1998, vol. 259, p. 233–246.
 - MIHAVILOVICH, E.; SIMON, R. and BONIERBALE, M. Construction of genetic Linkage maps. En Kole, E.; Chittaranjan A.; Albert, G. (edit.). Principles and practices of Plant Genomic. Sciences Publishers, 2008, Chapter 4.
 - MORGANTE, M.; HANAFEY, M. y POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*. 2002, vol. 30, p. 194-200.
 - MORGANTE, M. y OLIVIEIRI, M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*. 1993, vol. 3 n° 1, p. 175-182.
 - Ochoa, C. The Potatoes of South America: Bolivia. Cambridge, MA: Cambridge University Press. 1990.
 - OWEN, H. Use de Monoploid *Solanum phureja* in cell and tissue culture techniques for potato improvement. Asesor: Richard Villeux. Thesis in Doctor of Philosophy Genetics. Virginia Polytechnic Institute and State University. 1987.

-
- PATERSON, A. y WING, R. Genome Mapping in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 1993, vol. 4, p. 142-147.
 - PROVAN J., POWELL, W. y WAUGH, R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical Applied Genetic*. 1996, vol. 92, p.1078- 1084.
 - ROUPPE VAN DER VOORT R., WOLTERS J., FOLKERTSMA R., HUTTEN R., VAN ZANDVOORT P., VINKE H., KANYUKA K., BENDAHMANE A., JACOBSEN E., JANSSEN R. y BAKKER J. Mapping the cyst nematode locus Gpa2 in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics*. 1997, vol. 95, pag. 874-880.
 - SCHMIDT, R. Synteny: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology*. 2000, vol. 3, p. 97–102
 - SCHNEIDER, K. y DOUCHES, D. Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. *American Journal of Potato Research*. 1997, vol. 74, n° 3, p. 149-160.
 - SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*. 2004, vol. 5, p. 63-69.
 - SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A. y NDJIONDJOP, M. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 5, n°25, p. 2540-2568.

-
- SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A. y NDJIONDJOP, M. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 5 n°25, p. 2569-2587.
 - SINGH, J. y KAUR L. *Advances in Potato Chemistry and Technology*. 1st ed. USA, Elsevier-Academic Press, 2009. 528 p. ISBN 13: 978-0-12-374349-7
 - SPOONER, D. y SALAS, A. Structure, biosystematics, and genetic resources. En: J. GOPAL, J. and KHURANA, P (edit). *Handbook of potato production, improvement, and post-harvest management*. New York: Haworth's Press, 2006, p. 1-39.
 - SPOONER, D.; MCLEAN, K; RAMSAY, G.; WAUGH, R.; BRYAN, G. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2005. vol. 120, p. 14694–14699.
 - SPRITZ, R. Duplication/deletion polymorphism 5'- to the human (3 globin gene). *Nucleic acids Research*. 1981, vol. 9, n° 19, p.1
 - STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. *The Plant Journal*. 1993, vol. 3, n° 5, p. 739-744.
 - TANG, H.; BOWERS, J.; WANG, X.; MING, R.; ALAM, M. y PATERSON, A. Synteny and Collinearity in Plant Genomes. *Science*. 2008, vol. 320. n° 5875, p. 486-488

-
- TANKSLEY, S.; GANAL, M.; PRINCE, J.; DE VICENTE, M.; BONIERBALE, M.; BROWN, P.; FULTON, T.; GIOVANNONI, J.; GRANTILLO, S.; MARTIN, G.; MESSEGEUR, R.; MILLER, J.; MILLER, L.; PATERSON, A.; PINEDA, O.; ROË DER, M.; WING, R.; WU, W.; YOUNG, N. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*. 1992, vol. 132, p. 1141- 1160.
 - TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 1989, vol. 17, p 6463-6471.
 - THE POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 2011, vol. 475, p. 189–195.
 - TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z. y JURKA, J. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*. 2000, vol. 10, n° 7, p. 967–981.
 - VAN BERLOO, Ralph. Use of molecular markers in plant breeding. Asesor. Piet Stam. Thesis Wageningen University, Laboratory of Genetics, The Netherlands. 2000.
 - VAN ECK, H.; ROUPPE VAN DER VOORT, J.; DRAAISTRA, J.; VAN ZANDVOORT, P.; VAN ENCKEVORT, E.; SEGERS, B.; PELEMAN, J.; JACOBSEN, E.; HELDER, J. y BAKKER, J. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding*. 1995; vol. 1; p. 397-410.
 - VAN OOIJEN, J.W. JoinMap ® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands. 2006

-
- VAN OS, H.; ANDRZEJEWSKI, S.; BAKKER, E.; BARRENA, I.; BRYAN, G.; CAROMEL, B.; GHAREEB, B.; ISIDORE, B.; DE JONG, W.; VAN KOERT, P.; LEFEBVRE, V.; MILBOURNE, D.; RITTER, E.; ROUPPE VAN DER VOORT, R.; ROUSSELLE-BOURGEOIS F.; VAN VLIET, J.; WAUGH, R.; VISSER, R.; BAKKER, J. y VAN ECK, H. Construction of a 10; 000- marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genomewide physical map. *Genetics*. 2006, vol. 173, p. 1075–1087.
 - VAN OS, H.; STAM, P.; VISSER, R. y VAN ECK, H. SMOOTH: a statistical method for successful removal of genotyping errors from high-density genetic linkage data. *Theoretical Applied Genetic*. 2005, vol. 112, p. 187–194.
 - VAN OS, H.; STAM, P.; VISSER, R. y VAN ECK, H. RECORD: a novel method for ordering loci on a genetic linkage map. *Theoretical Applied Genetic*. 2005, vol. 112, p. 30–40.
 - VEILLEUX, R.; SHEN, L. y PAZ, M. Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. *Genome*. 1995, vol. 38, n°6, p. 1153–1162.
 - VEILLEUX, R.; BOOZE-DANIELS, J. y PEHU, E. Anther culture of a 2n pollen producing clone of *Solanum phureja* Juz. & Buk. *Genome*. 1985, vol. 27, n°5, p. 559–564.
 - VISSER, R.; BACHEM C.; de BOER, J.; BRYAN, G.; CHAKRABATI, S.; FEINGOLD, S.; GROMADKA, R.; van HAM, R.; HUANG, S.; JACOBS, Jacobs.,

KUZNETSOV, B.; de MELO, P.; MILBOURNE D., ORJEDA, G.; SAGREDO B.; TANG X. Sequencing the Potato Genome: Outline and First Results to Come from the Elucidation of the Sequence of the World's Third Most Important Food Crop. *American Journal of Potato Research*. 2009, vol. 86, p. 417–429.

- Voorrips, R. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity*, 2002, vol. 93, issue 1, pag. 77-78.
- WEBER, J. y MAY, P. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. 1987, vol. 44, p. 388-396.
- WEISSENBACH J., GYAPAY G., DIB C., VIGNAL A., MORISSETTE J., MILLASSEAU P., VAYSSEIX G., LATHROP M. A second- generation linkage map of the human genome. *Nature*. 1992, vol. 359, p.794-801.
- WHITKUS, R.; DOEBLEYT, J. y LEE, M. Comparative Genome Mapping of Sorghum and Maize. *Genetics*. 1992, vol. 132, p. 1119- 1130.
- WU, R.; CASELLA, G. y MA, Ch. Statistical Genetics of Quantitative Traits. Linkage, Maps and QTL. En Gail, M.; Krickeberg, K.; Samet, J.; Tsiatis, A.; Wong, W.(edit.). *Statistics for Biology and Health* New York, Springer Science and Business Media, 2007. Chapter 3.
- YAMANAKA, S.; IKEDA, S.; IMAI, A.; LUAN, Y.; WATANABE, J. y WATANABE K. Construction of integrated genetic Map between various existing DNA markers and newly develop P450- related PBA markers in diploid Potato (*Solanum tuberosum*). *Breeding Science*. 2005, vol. 55, p. 223-230.

-
- ZABEAU, M. y VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. Publication 0534858A1. Munich, Germany: European Patent Office; 1993.
 - ZANE, L.; BARGELLON, L. y PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 2002, vol. 11, p. 1- 16.

ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de extracción de DNA de plantas a pequeña escala (Doyle y Doyle, 1990)

1. Pesar 100g de tejido de hoja, y moler en mortero con nitrógeno líquido, hasta obtener un fino polvo.
2. Transferirlo a un tubo de 2ul. Añadir 700ul de buffer CTAB 2X, 2ul de mercaptoetanol y mezclar en vórtex. Llevarlo a baño maría a 65°C durante 45 minutos, mezclar por inversión los tubos cada 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Añadir 700ul de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Mezclar suavemente, para evitar dañar el DNA. Luego invertir los tubos varias veces.
4. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos. Remover la fase superior acuosa, y transferirla a un tubo nuevo. Ser cuidadoso de no transferir material de interfase.
5. Añadir 50ul de CTAB 10X (in 0.7M NaCl), mezclar suavemente.
6. Repetir pasos 3 y 4.
7. Añadir un igual volumen de isopropanol a 4°C (400- 500ul) a cada tubo, Invertir los tubos varias veces y dejar precipitar a 4°C por 30 minutos o a -20°C durante 15 minutos.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos. Descartar el sobrenadante, siendo cuidadoso de no perder el pellet. Invertir los tubos y dejar secar.
9. Lavar el pellet de DNA con 1ml de EtOH 70% (por 3 minutos) y centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos. Con cuidado descartar el etanol, lavarlo en etanol 90%, centrifugar durante 30 minutos a 14000 rpm, y cuidadosamente descartar el etanol, invertir los tubos y dejar secar toda la noche.
10. Disolver el DNA en 150ul de T10E1 o agua destilada. Añadir de 1-2ul de RNAsa libre de DNAsa (10mg/ml). Incubar a 37°C por una hora.
11. Guardar a 4°C o a -20°C por un largo periodo.

ANEXO 2. Preparación del gel y electroforesis en el sistema LI-COR 4300

1. Escoger las placas de 25cm x 25 cm.
2. Limpiar las placas adecuadamente, con una solución detergente al 2% y enjuagarlas con agua destilada.
3. Limpiar nuevamente con alcohol al 70%, principalmente el lado que contacta con el gel, enjuagarlas con agua destilada varias veces, y secarlas.
4. Colocar los espaciadores entre ambas placas y asegurarlas con las rieles, una a cada lado.
5. Colocar el gel sobre un soporte, que permita luego agregar el gel.
6. Preparar el gel.

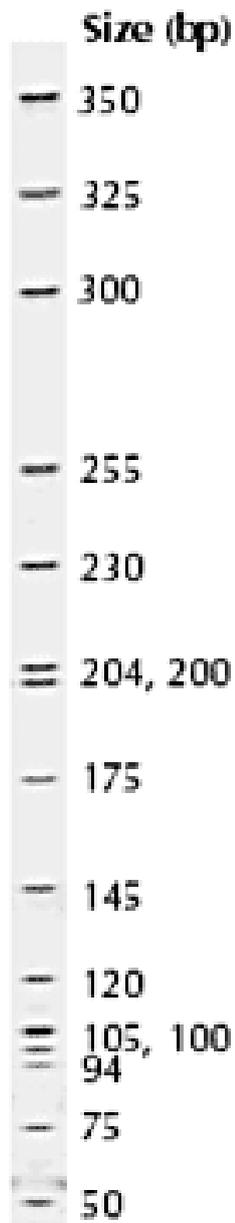
Composición del gel	Para una placa
Gel matrix	20 ml (a temperatura ambiente)
APS 10% (Persulfato de amonio)	150 ul
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	15 ul

7. Agregar el gel lentamente y ayudar a que este se deslice entre las placas longitudinalmente. Al terminar el gel colocarlo en posición horizontal.
8. Con la ayuda de unos delgados ganchos (0.20mm de diámetro) eliminar las burbujas si es que estas se hubiesen generados.
9. Insertar el peine, y colocar el prensador.
10. Dejar secar por 45 minutos aproximadamente.
11. Una vez que este haya polimerizado

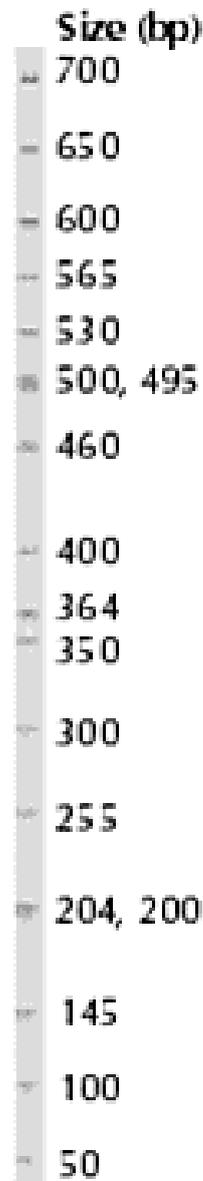
ANEXO 3. Ladder de tamaño LI-COR (Size Standards)

Se pueden usar dos tipos de ladder, uno de 50 a 350 bp, y otro de 50 a 700 bp. El iniciador ladder tiene 15 bandas, y el segundo 14 bandas. En ambos casos las bandas juntas ayudan a determinar el tamaño correcto de la banda.

Ladder Size 50- 350bp

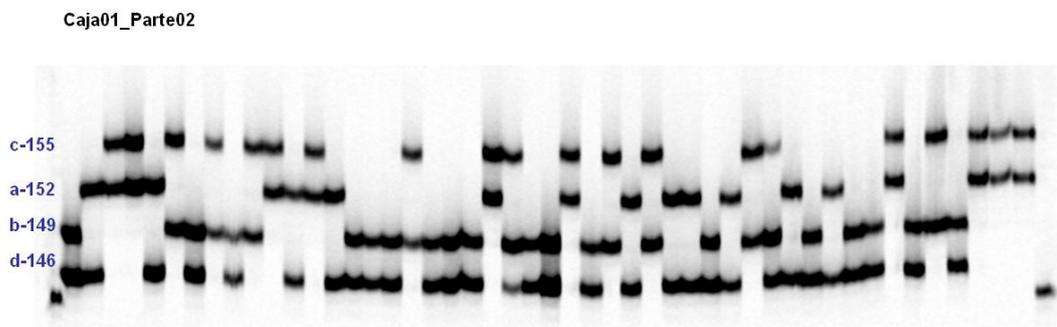
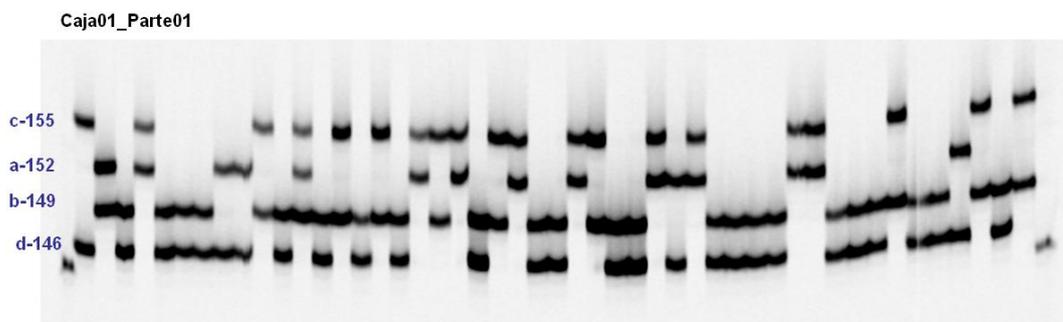


Ladder size 50- 700bp



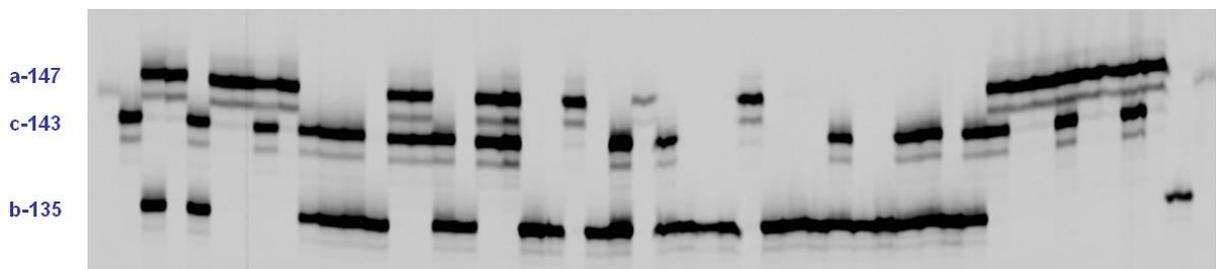
ANEXO 4. Segregación de los marcadores en la población.

Marcador STI0043. Patrón de segregación de los cuatro alelos de STI0043 (a, b, c y d). Los padres corresponden a los dos primeros individuos de la Caja01-Parte01, el resto corresponde a los 86 hijos.

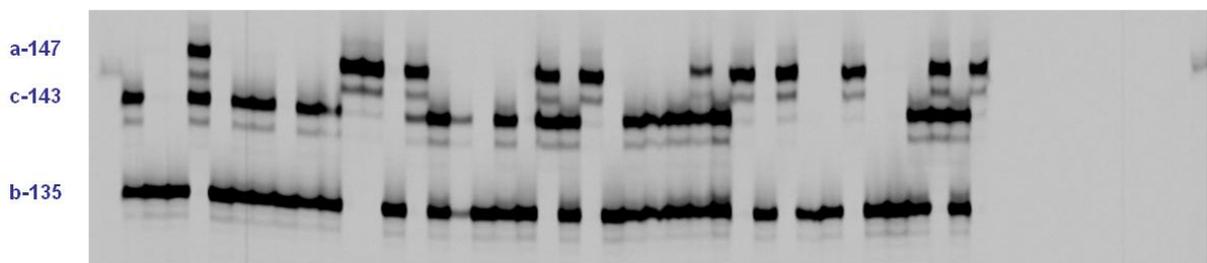


Marcador STI0036. Patrón de segregación de los tres alelos de STI0043 (a, b y c). Los padres corresponden a los dos primeros individuos de la Caja01-Parte01, el resto corresponde a los 86 hijos.

Caja01_Parte01



Caja01_Parte02



← / ≡ ⇒

**ANEXO 5. Parámetros para una corrida estándar de microsatélites en el sistema
LI-COR 4300**

Parámetro	Corrida estándar
Longitud de la placa	25 cm
Grosor de los espaciadores	0.25 mm
Composición del gel	6.5% LI-COR KBplus
Tiempo de corrida	1.5 horas