

Marcadores tipo KASP para la asistencia al mejoramiento genético vegetal

Comparación de KASP con otras metodologías y análisis de datos

Trabajo final presentado para optar al título de Especialista en Biotecnología Agrícola

María Daniela Tejedor
Licenciada en Nutrición - USAL - 2008
Doctora en química biológica - UBA - 2017

Lugar de trabajo: INBA - CONICET - FAUBA



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires



Tutor
María Florencia Kronberg
Licenciada en biotecnología (UNSAM)
Doctora en biología molecular y biotecnología (UNSAM)

JURADO DE TRABAJO FINAL

Tutor
Ma. Florencia kronberg
Lic. en Biotecnología (UNSAM)
Dra. En Biología Molecular y Biotecnología (UNSAM)

Jurado
Marcelo Soria
Lic. en Cs. Biológicas (UBA)
Dr. En Cs Biológicas (UBA)

Jurado
Andrés Zambelli
Bioquímico (UN La Plata)
Dr. En Bioquímica (UN La Plata)

Jurado
Natalia Ilina
Lic. en Biología (UN San Petesburgo)
Dra en Cs Agropecuarias (UBA)

Fecha de defensa del Trabajo Final: 26 de agosto de 2025

AGRADECIMIENTOS

Al Jurado: Dra. Natalia Ilina, Dr Andrés Zambelli y Dr. Marcelo Soria por el tiempo dedicado a este trabajo y los saberes compartidos en los cursos de la especialización.

A la Dra. Florencia kronberg por su guía y ayuda en este trabajo final.

A la Dra. Catalina Molina por su ayuda en el análisis bioinformático de los datos.

A los directivos del INBA por brindarme el espacio para realizar este trabajo final.

Al personal del LGMM que me ha brindado la información de los datos de genotipado para el análisis de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Pagano por realizar la especialización, y facilitar los medios para que pueda realizarla. Siempre impulsando el perfeccionamiento y crecimiento laboral de los miembros de la cátedra de Bioquímica de la FAUBA. ¡¡Muchas gracias!!

Tabla de contenido

Resumen	5
Introducción	7
OBJETIVO	8
1. Marcadores moleculares:.....	9
Marcadores Clásicos:	9
Marcadores de ADN/ marcadores moleculares	10
-Marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	13
-Marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA)	14
-Marcadores AFLP (Amplified fragment length polymorphism),	14
-Marcadores SSR (simple sequence repeat)	15
2. Marcadores SNP (single nucleotide polymorphism).....	15
3. Metodología para el genotipado de SNPs en SAM	18
TaqMan.....	20
Amplifluor.....	21
rhAmp.....	23
ASQ (Allele-Specific qPCR)	26
KASP.....	27
4. Métodos para el análisis e interpretación de datos de marcadores tipo KASP.....	29
Transformación Arctan	30
Transformación Delta.....	32
Comparación de ambos métodos (Arctan y Delta) para la visualización y análisis de datos de diferentes tipos de ensayos.	33
Consideraciones finales	42
Bibliografía	44

Resumen

El mejoramiento genético vegetal es una disciplina esencial para satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos en un contexto de cambios ambientales y aumento poblacional. Tradicionalmente, el fitomejoramiento se ha basado en la selección fenotípica, un enfoque que, aunque efectivo, es limitado en términos de precisión, duración y susceptibilidad a factores ambientales. Este trabajo se centra en la selección asistida por marcadores (SAM), una metodología moderna que combina el uso de marcadores moleculares con técnicas avanzadas para acelerar y optimizar el desarrollo de variedades agrícolas mejoradas. En particular, se analiza el uso de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y la tecnología de PCR alelo específica conocida como KASP.

Los SNPs, que representan cambios de un solo nucleótido en el ADN, destacan por su abundancia y estabilidad en el genoma, lo que los convierte en marcadores moleculares ideales para programas de mejoramiento. La tecnología KASP, diseñada para detectar SNPs e InDels (inserciones y deleciones), es una herramienta de alta precisión y costo-eficiencia que utiliza cebadores alelo específicos y sondas fluorescentes para identificar variaciones genéticas en grandes poblaciones de forma automatizada.

Los marcadores KASP ofrecen múltiples ventajas: son altamente específicos, reproducibles, escalables y capaces de manejar diversidad genética significativa. Estas características los hacen ideales para aplicaciones como la selección genómica, el análisis de diversidad genética, la mejora de tolerancia a estreses bióticos y abióticos, y el control de pureza varietal. Además, el análisis visual y matemático de los datos de fluorescencia permite identificar genotipos con precisión. Los métodos analíticos evaluados en este trabajo —transformaciones matemáticas Arctan y Delta— ofrecen enfoques complementarios: mientras que Arctan es más efectivo en poblaciones homocigotas homogéneas, Delta se adapta mejor para el estudio de poblaciones heterocigotas y con alta dispersión de datos.

Las aplicaciones prácticas de los marcadores KASP en programas de mejora incluyen la selección genómica para predecir el rendimiento antes del desarrollo completo de las plantas, el mapeo de QTL para identificar regiones genómicas asociadas con rasgos agronómicos, y el análisis de diversidad genética para diseñar cruces estratégicos. Asimismo, su uso en la mejora de cultivos resistentes al cambio climático y en la autenticidad varietal garantiza mayor estabilidad en la producción agrícola y contribuye a la protección de la propiedad intelectual.

Este trabajo concluye que el genotipado basado en la tecnología KASP es una herramienta robusta y versátil para la detección de SNPs en programas de mejoramiento genético vegetal. Su capacidad para combinar precisión, automatización y eficiencia la posiciona como una herramienta de alta calidad para la investigación genómica aplicada a la agricultura. No obstante, el éxito de su implementación depende de la calidad del ADN, la estandarización de protocolos y la selección adecuada de métodos analíticos según las condiciones experimentales. Con el avance continuo de las tecnologías de genotipado y la reducción de costos, se espera una mayor accesibilidad al sistema KASP, ampliando su uso a cultivos de menor importancia económica y a programas de mejora en países en desarrollo.

Palabras claves: Marcadores moleculares, SNPs, KASP, Arctan, Delta.

Marcadores tipo KASP para la asistencia al mejoramiento genético vegetal

Introducción

El mejoramiento genético vegetal ha sido fundamental para incrementar la productividad y calidad de los cultivos agrícolas, como estrategia para satisfacer la demanda de alimentos e insumos industriales en un contexto de crecimiento poblacional y cambios ambientales. El fitomejoramiento convencional se basa en la selección fenotípica de individuos superiores resultantes las progenies segregantes obtenidos mediante de cruzamientos dirigidos. No obstante, esta metodología presenta limitaciones en términos de precisión y tiempo demandado, además de depender en gran medida de la influencia de factores ambientales sobre los rasgos fenotípicos de interés. En promedio, desarrollo de una variedad comercial mejorada por métodos convencionales requiere la evaluación del rendimiento agronómico de grandes poblaciones a lo través de varias generaciones lo que, dependiendo del cultivo, demanda entre 8 y 12 años.

Para superar estas limitaciones, la selección asistida por marcadores (SAM) surge como una alternativa moderna que no solo acorta el periodo necesario para obtener una variedad mejorada, sino que también optimiza el uso de recursos. Los marcadores genéticos son características biológicas determinadas por variantes alélicas de genes o loci genéticos que se transmiten de una generación a otra, lo cual permite utilizarlos como “etiquetas” genéticas para rastrear individuos, tejidos, células o genes específicos. En el contexto del mejoramiento convencional, los marcadores genéticos se dividen en dos categorías: los clásicos (basados en caracteres fenotípicos morfológicos, citológicos y bioquímicos) y los basados en el ADN (genotipo).

Entre estos marcadores moleculares, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se destacan por su abundancia y estabilidad en el genoma, lo cual facilita

su uso en programas de mejoramiento vegetal. Una de las tecnologías más avanzadas para detectar SNPs es el sistema KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*), que permite identificar alelos específicos con alta precisión. Esto facilita el desarrollo de programas de selección asistida por marcadores moleculares (mejoramiento molecular), acelerando así la identificación de variedades con características óptimas para la producción agrícola (Alexandratos et al. 2012; Bharadwaj 2018; Ghosh et al. 2022; Martinez et al. 2010).

En este trabajo se abordarán las características y aplicaciones del mejoramiento genético vegetal asistido por marcadores moleculares. También se profundizará en el uso de los marcadores SNP y, en particular, en la tecnología KASP, exponiendo sus ventajas y limitaciones, ilustrando cómo estas herramientas contribuyen a la optimización de los programas de mejora vegetal.

OBJETIVO

Este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión exhaustiva sobre el uso de marcadores moleculares tipo SNP en el mejoramiento genético vegetal, con un enfoque en los métodos de análisis de datos y sus aplicaciones prácticas. La revisión se organiza en cuatro secciones clave con objetivos específicos:

1. Marcadores moleculares: Introducir al lector en el concepto de marcadores moleculares y proporcionar una descripción general de los tipos de marcadores, sus características y aplicaciones en el mejoramiento vegetal.
2. Marcadores tipo SNP: Presentar las características específicas de los SNPs, sus usos, así como sus ventajas y desventajas en el contexto del mejoramiento asistido.
3. Metodologías para el genotipado de SNPs: Detallar las principales estrategias empleadas para detectar SNPs.

4. Métodos para el análisis e interpretación de datos de marcadores tipo KASP: Describir los métodos existentes para el análisis e interpretación de datos, especialmente en ensayos basados en tecnología KASP, herramienta ampliamente utilizada para el análisis de SNPs debido a su precisión, eficacia y eficiencia.

A través de esta revisión, se busca proporcionar una visión integral sobre la utilización de SNPs y sus aplicaciones en la optimización de programas de mejoramiento vegetal asistido por marcadores, aportando un conocimiento más profundo sobre los usos y una comprensión integral de su funcionamiento.

1. Marcadores moleculares:

Previo al uso de marcadores moleculares, los marcadores clásicos o fenotípicos eran la única herramienta para el mejoramiento vegetal. Si bien el uso de marcadores moleculares ha generado un salto de innovación y tecnología en el área, los marcadores fenotípicos aún se usan en conjunto con los moleculares.

Marcadores Fenotípicos Clásicos:

Marcadores morfológicos: Representan generalmente polimorfismos genéticos fácilmente identificables y manipulables. Son principalmente rasgos visibles como la forma de la hoja, el color de la flor, el color de la vaina, el color de la semilla, la forma de la semilla, el color del hilio, el tipo y la longitud del césped, la forma del fruto, el color y la raya de la corteza (exocarpo), el color de la pulpa, la longitud del tallo, etc.

Marcadores citológicos: las características estructurales de los cromosomas pueden estudiarse mediante el cariotipo y las técnicas citogenéticas de bandeos cromosómicos. Los patrones de bandas, a través de su intensidad, orden y

posición, revelan las diferencias en la distribución de la eucromatina y la heterocromatina a lo largo de los distintos cromosomas de la especie de interés.

Marcadores bioquímicos/proteínicos: Se trata principalmente de formas alternativas o variantes estructurales de una enzima (isoenzimas) que tienen la misma actividad/función catalítica pero diferente peso molecular y movilidad electroforética.

Marcadores de ADN/ marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son fragmentos específicos de ADN que están asociados a una región particular del genoma y que se utilizan como "señales" o "indicadores" para identificar una secuencia genética específica en un organismo. Estos marcadores permiten rastrear la herencia de genes o características de interés en una población de plantas o animales. En el contexto del mejoramiento vegetal, los marcadores moleculares son herramientas esenciales para estudiar y seleccionar genes que influyen en características agronómicas importantes. La selección asistida por marcadores ha proporcionado un método rápido para examinar el germoplasma parental en busca de variación genética, desarrollar mapas de ligamiento genético y “etiquetar” genes que controlan rasgos importantes. Tanto los mapas de alta densidad como los marcadores ligados a rasgos pueden ayudar a seleccionar la progenie reproductora portadora de alelos deseables. Así pues, los marcadores moleculares aportaron una base sistemática a la mejora tradicional, aumentando su precisión y agilizando el proceso.

El desarrollo y el uso de la selección asistida por marcadores en el Mejoramiento se dividen en cuatro grandes áreas que son pertinentes para casi todos los cultivos objetivo:

- a. Rasgos difíciles de gestionar mediante la selección fenotípica convencional, ya sea porque su medición es costosa o lenta, o porque tienen una baja penetrancia o una herencia compleja;

- b. rasgos cuya selección depende de entornos o etapas de desarrollo específicos que influyen en la expresión del fenotipo objetivo;
- c. mantenimiento de alelos recesivos durante el retrocruzamiento o para acelerar el retrocruzamiento en general;
- d. pirimidación de múltiples rasgos monogénicos (como la resistencia a plagas y enfermedades, o los rasgos de calidad) o varios QTL para un único rasgo objetivo con herencia compleja (como la tolerancia a la sequía u otros rasgos adaptativos).

Existen numerosos estudios de modelización y simulación sobre el poder de los marcadores para mejorar el ritmo y la precisión de los retrocruzamientos. Para la mayoría de los cultivos, más del 90% del genotipo parental recurrente puede recuperarse en dos generaciones cuando se utiliza un número adecuado de marcadores (por ejemplo, un marcador cada 10 cM) y un número adecuado de progenie para asegurar la recuperación del fondo genético recurrente (Tanksley et al., 1989). Esto representa un ahorro sustancial de tiempo en comparación con el retrocruzamiento convencional.

Los marcadores moleculares destinados a la SAM pueden seleccionarse en función de su distribución genómica, de la diversidad de haplotipos y/o de los índices de contenido de información polimórfica, y de su asociación con genes candidatos y otros rasgos agronómicos (Xu, 2003; Varshney et al., 2005). La introgresión y pirimidación de múltiples genes que afectan al mismo rasgo es un gran reto para los programas de mejora. La SAM ha demostrado ser valiosa cuando hay muchas variedades de interés que necesitan ser mejoradas para un único rasgo heredado, como ciertas resistencias a plagas o enfermedades o un rasgo componente para mejorar la adaptación o la tolerancia al estrés (Johnson, 2004; Miklas et al., 2006; Dwivedi et al., 2007; Ragot y Lee, 2007). Los cultivo objetivo de muchos programas de mejoramiento requieren una combinación de diversos perfiles de rasgos de resistencia al estrés biótico, agronómicos y de calidad, además de tolerancias al estrés abiótico para mejorar el rendimiento y la estabilidad de la producción.

La SAM resultó enormemente atractiva para los fitomejoradores ya que tiene como ventaja la posibilidad de analizar las plantas en etapas iniciales del desarrollo,

seleccionar múltiples características, minimizar el arrastre de ligamiento y recuperar en menos generaciones de cruzamiento el genotipo del progenitor recurrente (Tanksley et al., 1989).

Existen 3 métodos básicos para detectar polimorfismo en el ADN en la SAM: Secuenciación, hibridación de ácidos nucleicos y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante la PCR y/o la hibridación molecular, seguidas de electroforesis, se pueden identificar las variaciones alélicas en las muestras de ADN de distintos individuos o el polimorfismo de una región específica de la secuencia de ADN basándose en las características del producto de amplificación, como el tamaño y la movilidad electroforética de la banda. Se han desarrollado varias técnicas nuevas de microarreglos (*microarrays* o *chips*) que utilizan la hibridación del ADN combinada con nucleótidos marcados. Sea cual sea el método de detección, un sistema de marcadores ideal debe tener estas propiedades:

- a. Alto nivel de polimorfismo
- b. Distribución uniforme en todo el genoma (no agrupada en determinadas regiones).
- c. Codominancia en la detección de los alelos (para poder distinguir a los heterocigotas de los homocigotas).
- d. Características alélicas claramente diferenciadas (para que los distintos alelos puedan ser identificados unívocamente).
- e. Copia única y sin efecto pleiotrópico.
- f. Bajo costo de utilización (o desarrollo de marcadores y genotipado rentables).
- g. Facilidad de ensayo/detección y automatización.
- h. Posibilidad de estandarización de modo que los datos puedan acumularse y compartirse entre laboratorios.
- i. Genoma específico por naturaleza (especialmente con poliploides).
- j. Ningún efecto perjudicial sobre el fenotipo.

Las técnicas más utilizadas para el fitomejoramiento son RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), RAPD (Random amplified polymorphic DNA), microsatélites o SSR (simple

sequence repeat) y SNP (Single nucleotide polymorphism). Las técnicas de marcadores ayudan a seleccionar simultáneamente múltiples características deseadas utilizando poblaciones F2, poblaciones de backcross, líneas casi isogénicas (NIL), dobles haploides y líneas endógamas recombinantes (RIL).

-Marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Son la primera generación de marcadores de ADN y fueron una de las herramientas más importantes para la cartografía del genoma vegetal. En los organismos vivos, las mutaciones (delección e inserción) pueden producirse en sitios de restricción o entre sitios de restricción adyacentes en el genoma. Los RFLP se detectan cortando el ADN genómico con enzimas de restricción. Cada una de estas enzimas tiene una secuencia de reconocimiento específica que suele ser palindrómica y que da lugar a fragmentos de restricción de cierta longitud cuando se digiere el ADN. Los cambios en estas secuencias, que pueden estar causados por mutaciones puntuales, inserciones o deleciones, modifican el reconocimiento enzimático dando lugar a fragmentos de ADN de diferente longitud y peso molecular entre alelos polimórficos. Estos fragmentos se separan por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa y se analizan mediante Southern blot utilizando sondas específicas de locus o multilocus. La mayoría de los marcadores RFLP son codominantes y específicos de locus.

Debido a que la técnica RFLP es muy laboriosa, esta técnica fue mejorada y reemplazada por CAPS (por sus siglas en inglés, Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), también conocida como PCR-RFLP, que incluye un paso de PCR. La técnica CAPS consiste en digerir un fragmento amplificado por PCR y detectar el polimorfismo por la presencia/ausencia de sitios de restricción en él (Konieczny y Ausubel, 1993). Esta mejora permite desarrollar marcadores de alto rendimiento ya que reduce el requisito de cantidades relativamente grandes de ADN puro e intacto y el tedioso procedimiento experimental del revelado por Southern blot.

-Marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA)

El RAPD es un sistema de marcadores basado en la PCR que detecta el polimorfismo de la secuencia de nucleótidos en el ADN amplificando con un único cebador o primer de tamaño corto (10 bases aproximadamente). Este método se basa en que el cebador hibrida en el ADN genómico en varios sitios diferentes de cadenas complementarias y permite la amplificación de distintos fragmentos al azar, generando un patrón de fragmentos que depende de la cantidad de sitios complementarios que tenga el individuo. RAPD proporciona predominantemente marcadores dominantes. Este sistema produce altos niveles de polimorfismo y es sencillo y fácil de llevar a cabo.

No obstante, esta técnica presenta varias limitaciones: (i) sus polimorfismos se heredan como características dominantes o recesivas, lo que provoca una pérdida de información en relación con los marcadores que muestran codominancia, (ii) los cebadores son relativamente cortos, y un desajuste de incluso un solo nucleótido puede impedir el reconocimiento del cebador, provocando una pérdida de banda, y (iii) la baja reproducibilidad.

-Marcadores AFLP (Amplified fragment length polymorphism),

Los AFLP son simplemente fragmentos de ADN que se amplifican utilizando cebadores dirigidos a un sitio de restricción del ADN genómico. Es una combinación de RFLP y los métodos RAPD. El ADN se corta enzimáticamente en pequeños fragmentos (como en el análisis RFLP), pero sólo se estudia una fracción de los fragmentos tras la amplificación selectiva por PCR (Liu et al., 1994). AFLP es una técnica extremadamente sensible que además ha sido automatizado por el uso de cebadores fluorescentes para el sistema automatizado de análisis de fragmentos y paquetes de software para analizar los datos bialélicos, permitiendo el análisis de alto rendimiento. Las principales ventajas de las técnicas AFLP son: (i) no se requiere información sobre la secuencia, (ii) generación de un gran número de polimorfismos.

-Marcadores SSR (simple sequence repeat)

Los SSR, también denominados microsatélites, son repeticiones cortas en tándem (STR) o microsatélites de secuencia marcada (STMS), que son analizados por PCR. Consisten en unidades de 2-7 pares de bases repetidas en tándem y dispuestas en repeticiones de mono-, di-, tri-, tetra y penta-nucleótidos (A, T, AT, GA, AGG, AAAG, etc.) con motivos que surgen de distinta cantidad de repeticiones. Estas repeticiones están ampliamente distribuidas por los genomas de plantas y animales, que muestran un alto nivel de variación genética basada en las diferencias en el número de unidades de repetición en tándem de un locus. La variación en el número de unidades repetidas en tándem da lugar a patrones de bandas altamente polimórficas que se detectan mediante PCR utilizando cebadores de la región flanqueante específicos del locus donde están ubicados. Estos tipos de marcadores se caracterizan por su hipervariabilidad, reproducibilidad, naturaleza codominante, especificidad de locus y distribución aleatoria en todo el genoma en la mayoría de los casos, lo que los convierte en valiosos marcadores genéticos. Además, el análisis por microsatélites requiere muestras de ADN muy pequeñas (~100 ng por individuo) y bajos costos de puesta a punto y ejecución.

2. Marcadores SNP (single nucleotide polymorphism)

Los polimorfismos de un solo nucleótido, denominados SNP por sus siglas en inglés, son el tipo más común de variación genética entre los individuos de una especie. Cada SNP representa una diferencia en un único nucleótido en una posición particular del genoma (locus). Los SNP pueden estar presentes en las secuencias codificantes de los genes, en las regiones no codificantes de los genes o en las regiones intergénicas. Los SNP proporcionan la forma más sencilla de marcadores moleculares, ya que una sola base nucleotídica es la unidad más pequeña de herencia y, por tanto, pueden proporcionar el máximo de marcadores.

Los SNP pueden clasificarse según las sustituciones de nucleótidos: transiciones (C/T o G/A) o transversiones (C/G, A/T, C/A o T/G). En plantas, normalmente, las frecuencias en las que se encuentran los SNP están en un rango de uno cada 100-300 pb (Edwards et al., 2007; Xu, 2010). Las ventajas de estos marcadores son: (i) son codominantes, por lo que se han convertido en marcadores genéticos muy atractivos en el estudio y el mejoramiento genéticos, (ii) alta automatización y rapidez de detección, con una gran eficacia para la detección de polimorfismos. Las utilidades de los SNP en el SAM son:

Selección Genómica: Los SNPs son esenciales para la selección genómica, un método que permite predecir el rendimiento y otras características de interés en plantas antes de que estas se desarrollen completamente. Mediante modelos estadísticos complejos que integran datos genómicos, la selección genómica puede identificar plantas con alto potencial de rendimiento o resistencia a enfermedades, optimizando así los programas de selección y reduciendo considerablemente el tiempo necesario para obtener variedades mejoradas.

Mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci): Los SNPs permiten identificar regiones específicas del genoma tipo QTL que están asociadas con rasgos cuantitativos de importancia agronómica, como el rendimiento, la resistencia a enfermedades o la tolerancia a condiciones ambientales adversas. El mapeo de QTL facilita la SAM, que se enfoca en elegir plantas que portan combinaciones de SNPs asociados con estos rasgos de interés.

Caracterización de Diversidad Genética y Estudios de Asociación: Los SNPs permiten explorar y analizar la diversidad genética entre diferentes especies o variedades, lo que es fundamental para comprender la variabilidad existente y para diseñar programas de hibridación más efectivos. Además, en los estudios de asociación, los SNPs se utilizan para correlacionar variantes genéticas específicas con características fenotípicas, lo cual es especialmente útil para identificar genes de interés en poblaciones naturales o en bancos de germoplasma.

Mejora de Tolerancia a Estrés Biótico y Abiótico: Los SNPs son herramientas valiosas para identificar variantes genéticas que confieren resistencia

a patógenos (bacterias, hongos, virus) y a condiciones ambientales adversas, como sequía, salinidad o temperaturas extremas. Esto permite desarrollar cultivos más resistentes a los cambios ambientales, lo cual es cada vez más relevante en un contexto de cambio climático.

Análisis de Pureza Varietal y Autenticidad: Los SNPs también se utilizan para verificar la pureza varietal y la autenticidad de las variedades vegetales. Esta aplicación es importante tanto para el control de calidad en programas de mejoramiento como para proteger los derechos de propiedad intelectual asociados a nuevas variedades.

Los SNPs pueden detectarse de varias maneras. Un método conveniente es el RFLP (SNP-RFLP) o CAPS que se explicó anteriormente. Si un alelo contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción mientras que el otro no, la digestión de los dos alelos producirá fragmentos de longitud diferente. Para esto, los SNPs puede identificarse mediante el análisis de los datos de secuencia almacenados en las principales bases de datos de secuencias. Existen otros ensayos para la detección o genotipado de SNP que permiten analizar muchos polimorfismos a la vez, como la hibridación alelo-específica o la extensión de cebadores, seguida de electroforesis en gel, la espectrofotometría de masas, la cromatografía, la polarización de fluorescencia, los arrays o chips, etc. (Sobrino et al., 2005).

En la **Tabla 1** se comparan las características de los marcadores de ADN más utilizados que se han comentado hasta aquí. Las ventajas o desventajas de un sistema de marcadores dependen en gran medida de la finalidad de la investigación, los recursos genéticos o las bases de datos disponibles, el , la financiación y los recursos de personal, etc.

Características y descripción	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Abundancia genómica	Alta	Alta	Alta	Moderado a Alto	Muy alta
cobertura genómica	Región de codificación de bajas copias	genoma completo	genoma completo	genoma completo	genoma completo
Expresión/herencia	Codominante	dominante	codominante/dominante	Codominante	Codominante
Nº de Loci	<1.000	<1.000	1.000s	1.000 - 10.000	<100.000
Nivel de polimorfismo	Moderado	Alto	Alto	Alto	Alto
Tipo de polimorfismo	Cambios de una sola base, Indels	Cambios de una sola base, Indels	Cambios de una sola base, Indels	Cambios en la longitud de las repeticiones	Cambios de una sola base, Indels
Tipo de sondas/cebadores	Clones de ADN o ADNc de baja copia	10pb de nucleótido aleatorio	secuencia específica	secuencia específica	cebadores PCR alelo específico
Clonación y/o secuenciación	SI	NO	NO	SI	SI
Basado en PCR	Normalmente No	SI	SI	SI	SI
Detección radioactiva	Normalmente SI	NO	SI o NO	Normalmente No	NO
Reproducibilidad/fiabilidad	Alta	Bajo	Alta	Alta	Alta
proporción multiplex efectiva	Bajo	Moderado	Alta	Alta	Moderado a alto
Índice del marcador	Bajo	Moderado	Moderado a alto	Alto	Moderado a alto
Rendimiento del genotipado	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Alto
Cantidad de ADN necesaria	5 - 50 µg	0,01-0,1 µg	0.5-1.0 µg	0,05-0,12 µg	≥ 0,05 µg
Calidad del ADN requerido	Alta	Moderado	Alta	Moderado a alto	Alta
Técnicamente exigente	Moderado	Bajo	Moderado	Bajo	Alto
Exigente en tiempo	Alto	Bajo	Moderado	Bajo	Bajo
Fácil de usar	Difícil	Fácil	Moderado	Fácil	Fácil
Fácil de automatizar	Bajo	Moderado	Moderado a alto	alto	alto
Costo del desarrollo	Moderado a alto	bajo	moderado	moderado a alto	alto
costo de análisis	alto	bajo	moderado	bajo	bajo
Nº de loci polimórfico por análisis	1.0-3.0	1.5-5.0	20-100	1.0-3.0	1.
Aplicación primaria	genética	diversidad	diversidad y genética	todas las aplicaciones	todas las aplicaciones

Tabla 1: Marcadores moleculares más utilizados para el SAM.

3. Metodología para el genotipado de SNPs en SAM

Cuando se utilizan para SAM, los SNPs suelen detectarse por metodologías basadas en PCR por fluorescencia FRET. La Tabla 2 enumera las metodologías más utilizadas para detectar SNPs, las cuales serán brevemente explicadas en los siguientes apartados. Por lo general, estos sistemas tienen dos componentes esenciales: (1) cebadores alelos específicos y (2) un sistema de sondas y quenchers que producen una señal fluorescente que puede asociarse a cada alelo (Chen y Sullivan, 2003; Giancola et al., 2006; Mamotte, 2006). Algunos métodos, como Scorpions (Thelwell et al., 2000; Solinas et al., 2001), TaqMan (Schena et al., 2006; Jawhari et al., 2015) y Molecular Beacons (Hardinge y Murray, 2019), las sondas son específicas para cada alelo y marcador. En cambio, en otros métodos, como Amplifluor, KASP y ASQ, los cebadores son los alelo-específicos para cada alelo y las sondas marcadas con fluoróforos y quencher son universales (UPs) y pueden utilizarse para cualquier marcador.

KASP y Amplifluor produjeron un impacto revolucionario en el desarrollo posterior de la tecnología SNP. Los cebadores alelo-específicos (ASP), sencillos y baratos, pueden diseñarse y pedirse para cada SNP por separado, mientras que las sondas portadoras de fluoróforos y quenchers relativamente caros, se adquieren una sola vez en un stock que puede utilizarse durante mucho tiempo en muchos diferentes SNP diana. El principio de ASP-UP es similar al de las balizas moleculares con la adición de «etiquetas» especializadas en el extremo 5' de la ASP y en el extremo 3' de la UP (Myakishev et al., 2001). En estos métodos, un juego de ASP incluye dos cebadores directos, que actúan de forma competitiva sobre el sitio del SNP, y un cebador reverso común. Las dos UP correspondientes, terminan con fluoróforos FAM o HEX/VIC y generan una señal fluorescente particular en presencia del alelo específico. Este enfoque permite una gran flexibilidad en el diseño del ensayo, lo que se traduce en una mayor tasa de éxito global para el genotipado de SNP y detección de InDels (Inserción/Delección).

Nombre	Componente Alelo específico (AS)	Componentes con Fluoróforos (F) y Quenchers (Q)	
		Cebador universal o no (separado de sonda)	Forma de la sonda y posiciones de F y Q
Taqman	El SNP objetivo se ubica en el medio de la sonda	Una sola sonda contiene AS, F y Q todo junto.	Forma lineal. F y Q están en 5'- y 3', respectivamente
Amplifluor	2 cebadores alelo específicos sin marcar y 1 cebador común.	2 sondas universales con la misma "etiqueta"	Forma de horquilla. F y Q están en el extremo 5' y el centro de la sonda, respectivamente
rhAmp	2 cebadores alelo específicos sin marcar y 1 cebador común.	Posibilidad de 2 sondas universales	Parece ser lineal, donde F y Q están situados en los extremos
KASP	2 cebadores alelo específicos sin marcar y 1 cebador común.	Posibilidad de 4 sondas universales	Parecen ser cuatro sondas universales lineales. F y Q están en los extremos 5'- y 3'- de distintas sondas, respectivamente
ASQ PCR	2 cebadores alelo específicos sin marcar y 1 cebador común.	Dos sondas universales con fluoróforos específicos y sus correspondientes "colas" y dos sondas universales con sus quencher y barcodes	Las cuatro sondas universales lineales. F y Q están en los extremos 5' y 3' de sondas separadas, respectivamente

Tabla 2: Principales métodos utilizados para detectar SNPs.

TaqMan

TaqMan(R) es un ensayo de PCR de tubo único que explota la actividad 5' exonucleasa de la Taq DNA Polimerasa desarrollado por Thermo Fisher Scientific Inc. El ensayo incluye dos cebadores PCR específicos de locus que flanquean el SNP de interés, y dos sondas TaqMan alelo específico. Cada sonda tiene un fluoróforo reportero (FAM o VIC) en el extremo 5' que emite señal a una longitud de onda diferente, y un quencher no fluorescente en el extremo 3' que bloquea la señal.

La Figura 1 muestra el proceso del ensayo de genotipado SNP TaqMan, el cual puede resumirse en los siguientes pasos:

El ADN genómico se introduce en una mezcla de reacción compuesta por TaqMan® Genotyping Máster Mix, cebadores directo y reverso, y dos sondas TaqMan®.

Cada sonda TaqMan se adhiere específicamente a una secuencia complementaria, si está presente, entre los sitios de los cebadores directo e inverso. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del quencher al colorante reportero suprime la fluorescencia del reportero.

La actividad exonucleasa de la Taq ADN polimerasa escinde únicamente las sondas hibridadas con la la secuencia del SNP. La escisión separa el colorante reportero del quencher, aumentando la fluorescencia del reportero. El aumento de la fluorescencia sólo se produce si la secuencia diana amplificada es complementaria a la sonda. Así, la señal de fluorescencia generada por la amplificación PCR indica qué alelos hay en la muestra.

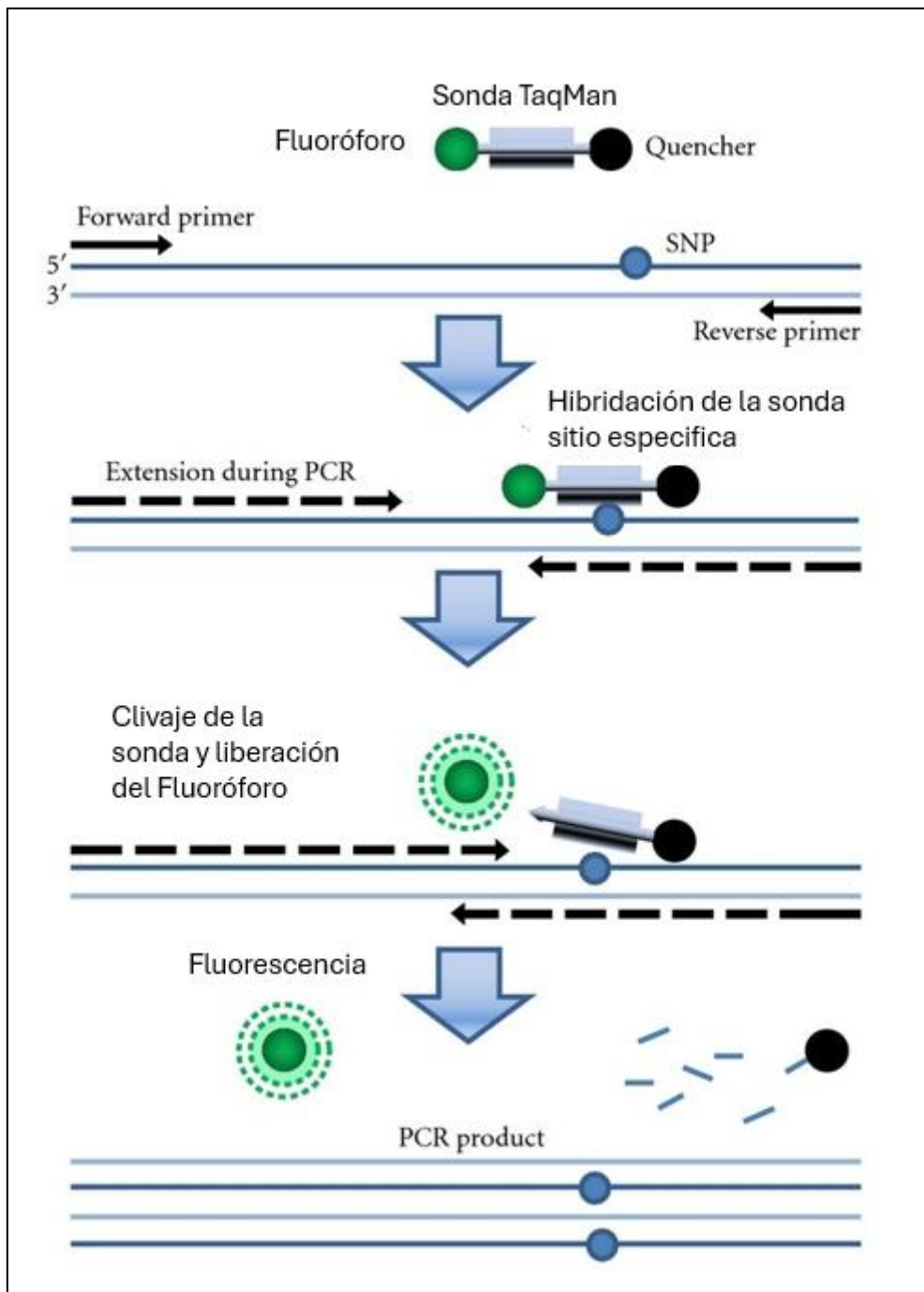


Figura 1: Funcionamiento de detección de SNP mediante sondas TaqMan.

Amplifluor

El sistema de detección universal Amplifluor(R), registrado por Millipore(R), también se basa en la presencia de fluoróforos (FAM o JOE) y un quencher (DABSYL). El cebador que contiene la señal fluorescente y el quencher se denomina UniPrime y proporciona al usuario un formato universal para detectar productos de

PCR mediante transferencia de energía de fluorescencia. El diseño único de UniPrime es tal que emite una señal de fluorescencia sólo al incorporarse a los productos de amplificación producidos durante cada ciclo de PCR (Fig. 2). Los niveles de productos de amplificación pueden detectarse y cuantificarse directamente en equipos de fluorescencia de punto final o en tiempo real.

UniPrime consta de una cola de oligonucleótido de 3' de 18 bases (secuencia Z) y una secuencia intracomplementaria 5' marcada con un par de moléculas de transferencia de energía. La «secuencia Z» actúa como cebador universal de PCR y está específicamente diseñada para reducir el fondo de PCR debido a la formación de heterodímeros. Para utilizar el UniPrime en la PCR, la secuencia Z se añade al extremo 5' de uno de los cebadores específicos de la diana al ser diseñados. Como se muestra en la Figura 2, al generarse en los primeros ciclos de la reacción de PCR el amplicon específico de cada alelo, el UniPrime complementa la secuencia Z contenido en él y actúa como cebador. A medida que se incorpora el UniPrime y se despliega la horquilla, ya no es posible el bloqueo de la señal fluorescente debido al aumento de la distancia entre los fluoróforos y DABSYL. La señal de fluorescencia producida con cada ciclo de PCR se correlaciona directamente con la cantidad de ADN amplificado generado para cada alelo, lo que permite su cuantificación.

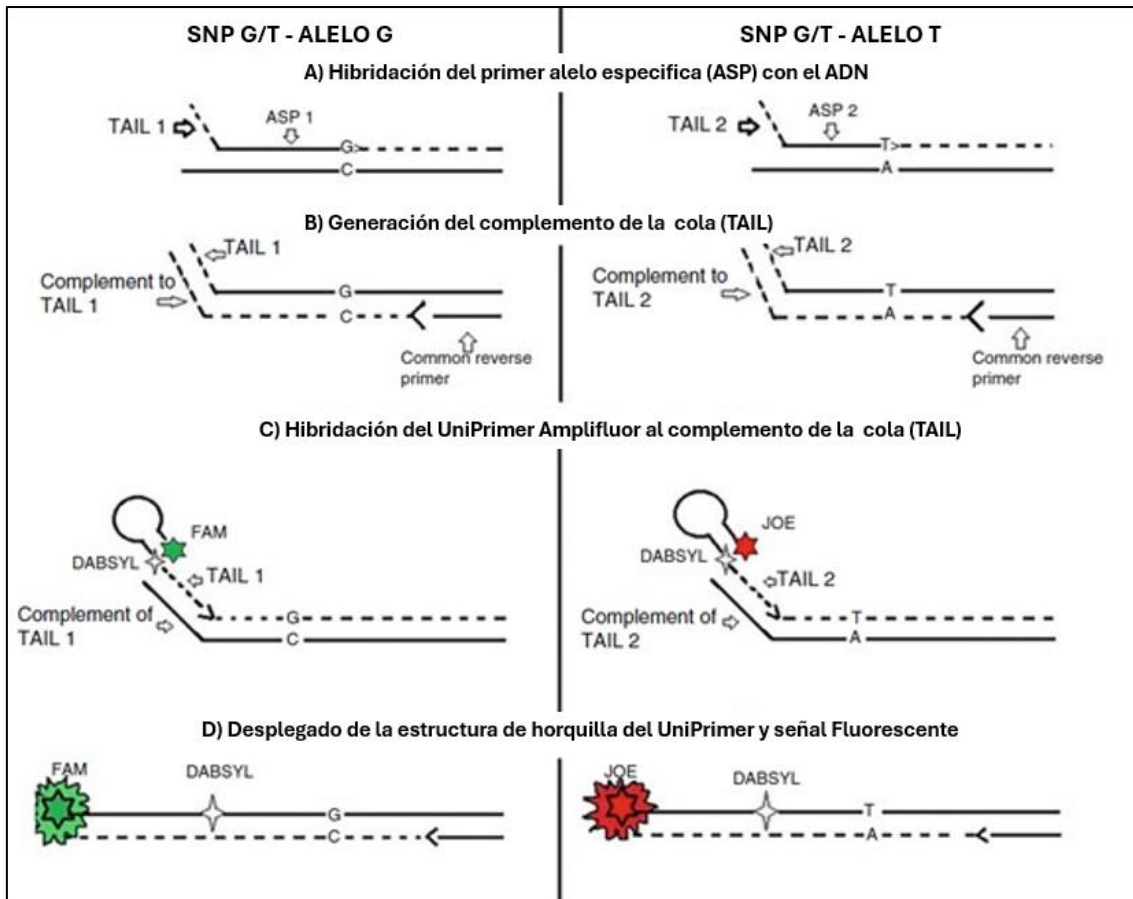


Figura 2: Funcionamiento de detección de SNP mediante sondas Amplifluor.

rhAmp

El sistema de genotipificación de SNPs rhAmp(R) de IDT(R) combina la hibridación alelo-específica y la extensión en un único ensayo. Se basa en el uso de dos enzimas, la RNasa H2 (una endorribonucleasa) y una ADN polimerasa Taq mutante con discriminación alélica mejorada. Los cebadores de genotipado SNP de rhAmp contienen una única base de ARN y están bloqueados en el extremo 3'. Además, cada uno de los cebadores alelo-específicos tiene una cola universal única que incorpora al amplicón una secuencia complementaria a las secuencias reporteras. El rápido desbloqueo de los cebadores por la RNasa H2 sólo se produce tras la formación de un heterodúplex perfectamente emparejado entre el cebador que contiene ARN bloqueado y la diana de ADN. Una vez desbloqueado por la RNasa

H2, el extremo 3' del cebador recién activado se sitúa sobre el sitio SNP, y es polimerizado por la Taq ADN polimerasa mutante para la PCR alelo-específica. Como resultado de la utilización de las 2 enzimas se obtiene una mejor discriminación alélica.

En la Figura 3 se esquematiza el funcionamiento de rhAmp, el cual consta de los siguientes pasos:

Un ASP contiene la base de ADN complementaria al alelo de referencia del SNP diana, y el otro ASP contiene la base de ADN complementaria al alelo alternativo, cada uno con la base de ARN y el extremo 3' bloqueado. Estos ASP se unen específicamente al ADN molde complementario.

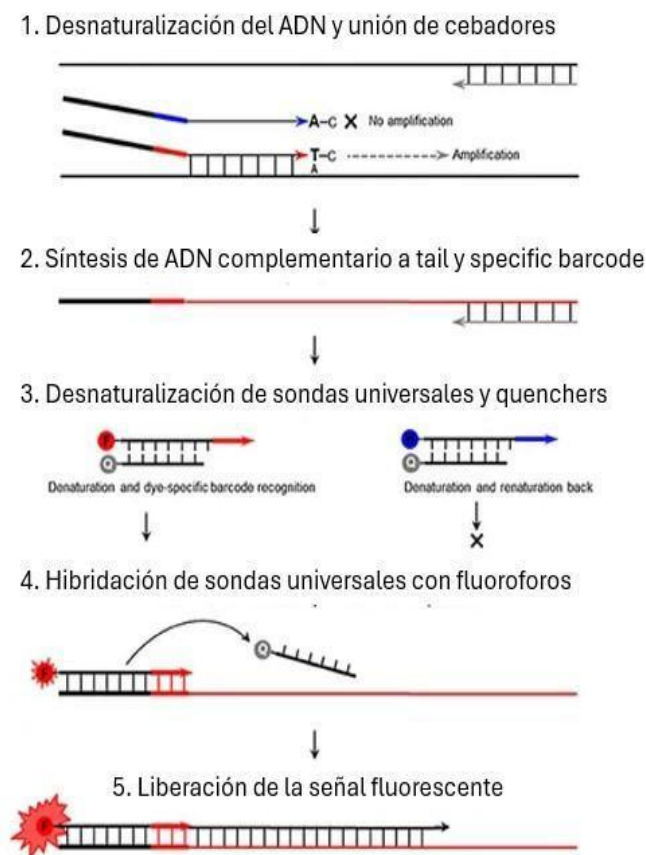
La RNasa H2 reconoce el heterodúplex ARN-ADN y escinde los cebadores para liberar el extremo 3' bloqueado, activando así los cebadores para la PCR, mientras que el ASP no emparejado permanece bloqueado.

La extensión de la ASP incorpora la secuencia de cola específica del alelo en el amplicón, seguida de la extensión de la LSP para formar la cadena complementaria. La sonda y el cebador universal se unen a la cadena complementaria a la secuencia de cola del alelo incorporado. Durante la PCR, la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa degrada la sonda, liberando el fluoróforo y generando la señal de fluorescencia.

ASQ (Allele-Specific qPCR)

El método ASQ para el genotipado de SNPs requiere tres componentes separados: (1) dos o más cebadores ASP dirigidos al SNP con identidad en las penúltimas posiciones del extremo 3' y etiquetas específicas en el extremo 5'; (2) dos o más sondas universales (UPs) con etiquetas correspondientes y diferentes colorantes fluorescentes en el extremo 5', y (3) una única sonda universal común con un quencher en los extremos 3' (Uni-Q), complementaria a todas las etiquetas UP.

Este método puede utilizarse potencialmente para cualquier SNP o InDel, así como para PCR multiplex para diferentes dianas de ADN o ambos casos simultáneamente. La flexibilidad del método se debe a la parte universal, que son las UPs independientes de la tarea con una única Uni-Q. Cada UP puede utilizarse potencialmente para cualquier tarea en la que se requiera el análisis diferencial y multiplex de dos o más dianas. En la Figura 4 se esquematiza el funcionamiento del método.



Referencias

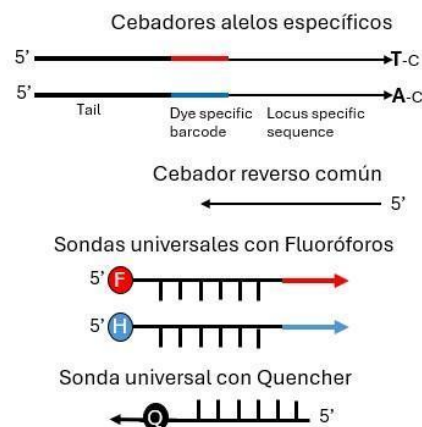


Figura 4: Funcionamiento de detección de SNP mediante sondas ASQ

KASP

Similarmente al ASQ, los ensayos de genotipado KASP se basan en la PCR alelo específica competitiva y permiten la detección bialélica de SNPs e InDels en loci específicos. Los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la reacción son: (1) dos cebadores alelo específicos (uno para cada SNP) cuyo extremo 5' posee una cola de secuencia específica idéntica a cada oligo 3; (2) un cebador común (reverse); (3) dos oligos marcados con un fluoróforo en el extremo 5', uno marcado con el fluoróforo FAM (F) y otro con fluoróforo HEX (H); y (4) dos oligos complementarios a estos últimos unidos a un quencher (Q), que al estar apareados apagan la señal fluorescente. Los oligonucleótidos 1 y 2 se incluyen en la mezcla de cebadores (Primer mix), mientras que los oligonucleótidos 3 y 4 están contenidos en la mezcla maestra (Master mix). Ambas mezclas junto con la muestra de ADN conforman los componentes necesarios para el ensayo KASP (Figura 5).

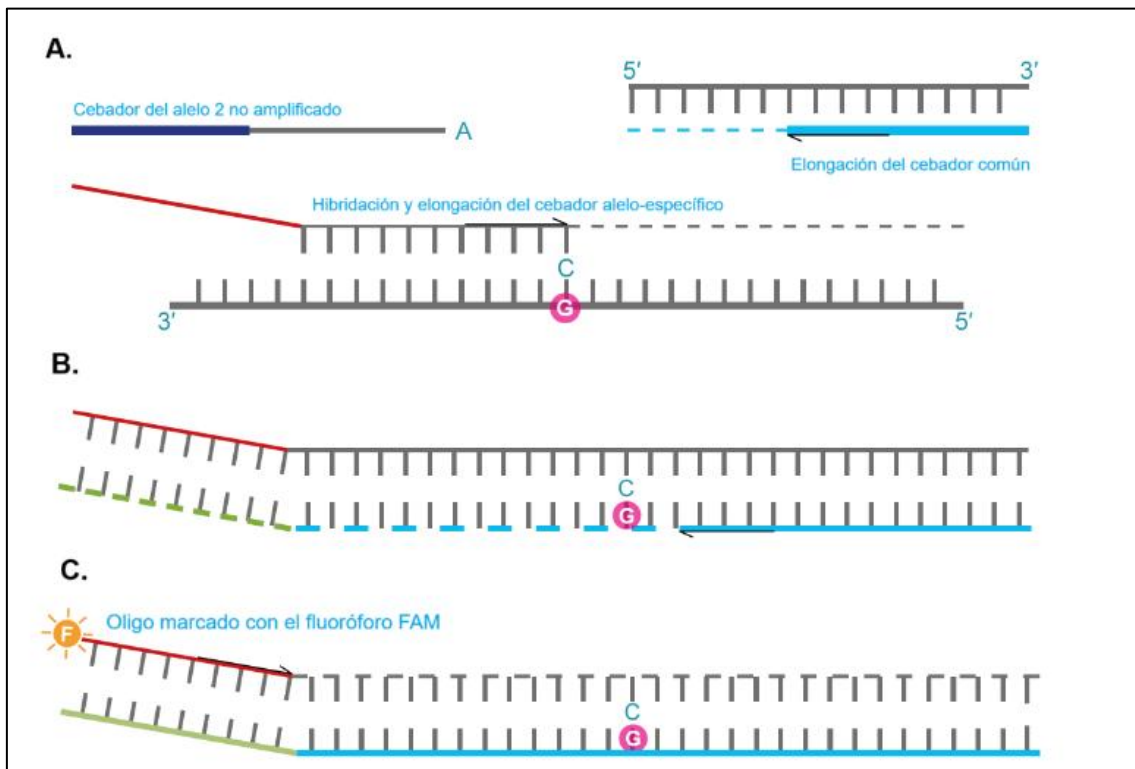
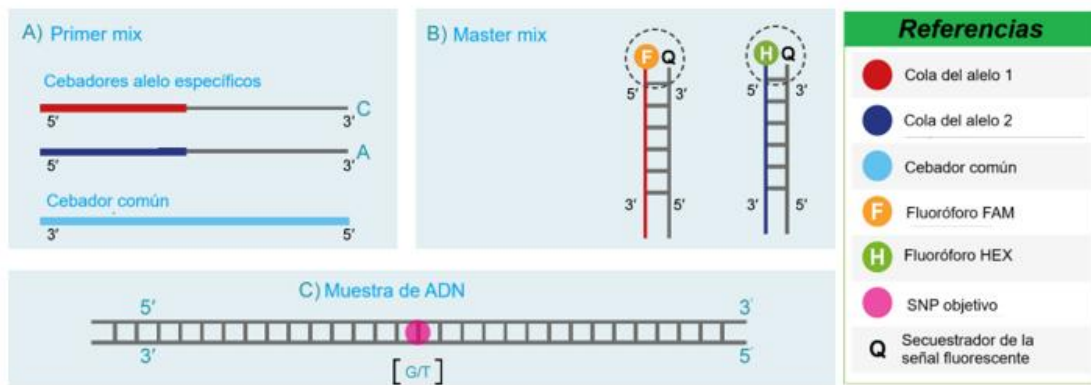


Figura 5: Descripción general del mecanismo de acción del ensayo KASP. (A) Desnaturalización del ADN e hibridación del cebador alelo específico (en este ejemplo del alelo 1); (B) generación de una secuencia complementaria a la cola del alelo 1; (C) generación de la señal fluorescente (en este caso FAM).

En el primer paso de la PCR (A), las hebras de ADN se separan y el cebador alelo específico apropiado se une a su región complementaria aguas arriba del SNP, mientras que el otro cebador alelo específico no se une debido a que no presenta la base complementaria al SNP. El cebador común se une a su región complementaria en la hebra opuesta y la PCR continúa. Durante este paso, los

oligos marcados con los fluoróforos FAM/HEX permanecen unidos a sus quenchers bloqueando la señal fluorescente. En el siguiente paso (B), el cebador común genera una copia complementaria a la cola del alelo 1 o 2. Uno de los oligos marcados será complementario a esta nueva secuencia, uniéndose a ella y liberando el oligo secuestrador de su señal (C). Con las sucesivas rondas de PCR, aumentan los niveles de fluoróforo unido al fragmento amplificado dando lugar a la señal fluorescente correspondiente. Si el genotipo es homocigota para una de las variantes de SNP, sólo se generará una u otra de las posibles señales fluorescentes, en cambio, si el individuo es heterocigota, el resultado será una señal fluorescente mixta.

4. Métodos para el análisis e interpretación de datos de marcadores tipo KASP

Cuando se realizan el genotipado de SNPs por PCR siguiendo la metodología KASP, se obtienen datos de fluorescencia de dos longitudes de onda. A partir de estos datos se puede generar un gráfico de discriminación alélica como el que se muestra en la Figura 6, donde cada eje representa el valor de fluorescencia de cada fluoróforo. Los puntos azules son la señal aportada por el alelo A con fluorescencia FAM, los puntos rojos son la señal aportada por el alelo B con fluorescencia HEX y los puntos verdes corresponden a los individuos heterocigotas que aportan ambas señales. A partir de la interpretación visual de un gráfico de discriminación alélica, donde se comparan las posiciones relativas de cada muestra frente a controles conocidos, se puede discriminar qué alelos posee cada individuo de una población. Para trabajar con poblaciones de muchos individuos, donde la interpretación visual resulta tediosa y laboriosa, existen abordajes matemáticos y criterios numéricos que permiten automatizar la interpretación de los datos de fluorescencia e inferir la composición alélica de cada muestra en la población. A continuación, se desarrollarán dos de estos abordajes y se aplicarán a tres aplicaciones comunes del mejoramiento genético vegetal.

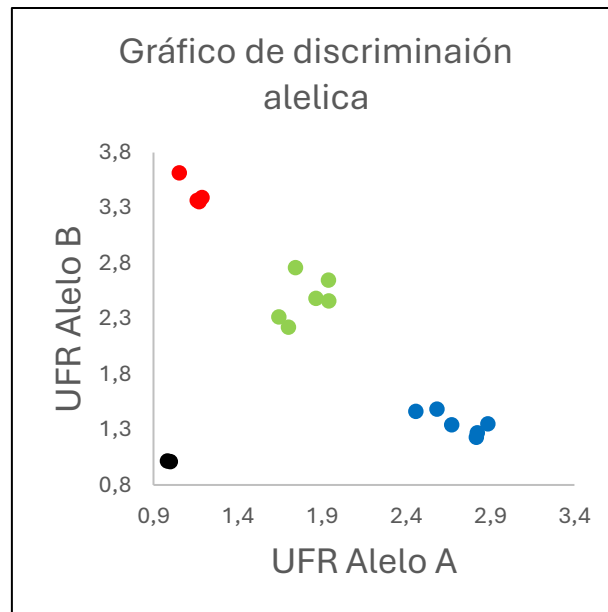


Figura 6: Gráfico de discriminación alélica. Los puntos azules corresponden al alelo A (fluoróforo FAM). Los puntos rojos corresponden al alelo B (fluoróforo HEX). Los puntos verdes corresponden a las muestras con ambos alelos (fluoróforos FAM y HEX). Los puntos negros corresponden a los controles sin ADN.

Transformación Arctan: El primer enfoque matemático consta de transformar las coordenadas (FAM, HEX) del gráfico de discriminación alélica en un único valor. Para esto se utiliza el ángulo entre la línea del eje de las ordenadas y la línea que conecta el punto de inicio (0,0) con las coordenadas de la muestra después de la amplificación (Fig. 7). Este valor recibe el nombre de ángulo de amplificación, θ . El valor de θ indica la proporción del alelo A (etiquetado con FAM) con respecto al alelo B (etiquetado con HEX). Los valores de 0° , 45° y 90° corresponden a proporciones de solo B, A:B = 1:1, y solo A, respectivamente (θ_1 , θ_2 , θ_3 en la Fig. 7). Siguiendo esta idea, los criterios numéricos serían: cuando $0^\circ < \theta < 45^\circ$, hay más B presente que A, cuando $45^\circ < \theta < 90^\circ$, hay más A que B.

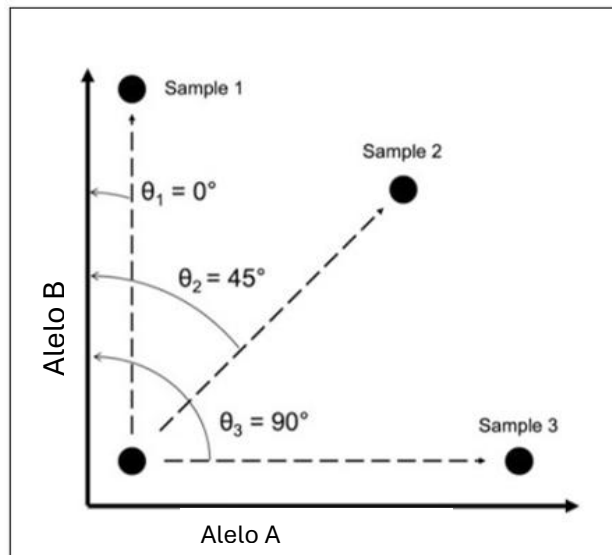


Figura 7: Ejemplo de gráfica de las muestras utilizando ángulo de amplificación.

Brevemente, la secuencia de pasos para la interpretación de los datos a partir de los datos crudos de fluorescencia sería:

1. Exportar los valores de Unidades de fluorescencia relativa (RFUs) para FAM (465-510nm) y HEX (533-580nm) del software del lector de fluorescencia como archivo .csv.
2. Importar en el software estadístico de su elección estos datos (R, SPSS, SAS, Mathematica, etc).
3. Para cada reacción, calcular la transformación Arctan de la relación de RFU FAM a HEX para calcular el ángulo de amplificación (θ) según:

$$\theta = \arctan \frac{HEX}{FAM}$$

4. Descartar las lecturas que se encuentren en el 20% inferior del gráfico.
5. Generar un gráfico con el valor de θ .
6. Asignar la composición genética según el ángulo.

Transformación Delta: El segundo método simplemente encuentra la diferencia de fluorescencia de HEX y FAM, o Delta (HEX – FAM). Para mejorar la interpretación, este método primero reescala los valores de HEX y FAM como porcentajes, y luego calcula el Delta. Así, los criterios para asignar la composición genética serían: para el alelo A (etiquetado con FAM), Delta <0; para el alelo B (etiquetado con HEX), Delta >0, y para los heterocigotos, sería Delta = 0. Si bien es posible un rango continuo de valores de Delta, basado en la dosis de alelos a partir de la variación del número de copias del gen o la concentración de ADN, los heterocigotos tienen valores de Delta confiablemente cercanos a 0 independientemente de la concentración de ADN. Los valores Delta por encima o por debajo de los cuales una muestra se considera homocigótica se pueden establecer de forma independiente para cada ensayo (placa de 96 pocillos) y para cada alelo. El método Delta es particularmente útil para situaciones en las que los genotipos se resuelven de forma deficiente en el diagrama de discriminación alélica, lo que puede ocurrir por sobreamplificación, dimerización de cebadores u otras limitaciones técnicas.

Para obtener el valor de Delta, debe relacionarse ambas fluorescencias y normalizarse en función de los mínimos y máximos del conjunto de muestras siguiendo los siguientes pasos:

1. Exportar las Unidades de fluorescencia relativa (RFUs) FAM (465-510nm) y HEX (533-580nm) del software del lector de fluorescencia como archivo .csv. Importar en el software estadístico de su elección (R, SPSS, SAS, Mathematica, etc).
2. Para cada muestra de una placa de 96 pocillos, reescalar los valores de fluorescencia de 0 a 100%: donde FAM% y HEX% son los valores reescalados, x es el valor FAM RFU bruto de la muestra, minFAM es el valor FAM RFU más pequeño de la placa, maxFAM es el valor FAM RFU más grande de la placa, y es el valor HEX RFU bruto de la muestra, minHEX es el valor HEX RFU más pequeño de la placa y maxHEX es el valor HEX RFU más grande de la placa.

$$\%FAM = 100 \times \frac{x - \min_{FAM}}{\max_{FAM} - \min_{FAM}}$$

$$\%HEX = 100 \times \frac{y - \min_{HEX}}{\max_{HEX} - \min_{HEX}}$$

3. Realizar un gráfico de dispersión con % FAM y % HEX en los ejes X e Y respectivamente
4. Las lecturas que se encuentren en % FAM < 20 y % HEX < 20 se descartan asegurándose que ningún NTC u otro control queden dentro de este rango
5. Para cada muestra, se calcula el Delta:

$$\Delta = \text{HEX} - \text{FAM}$$

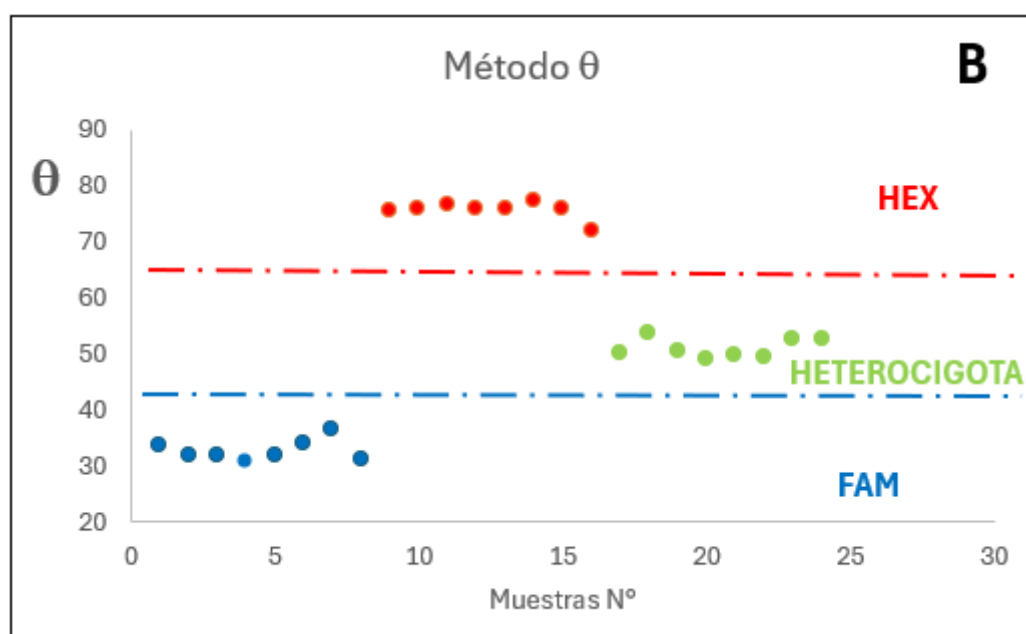
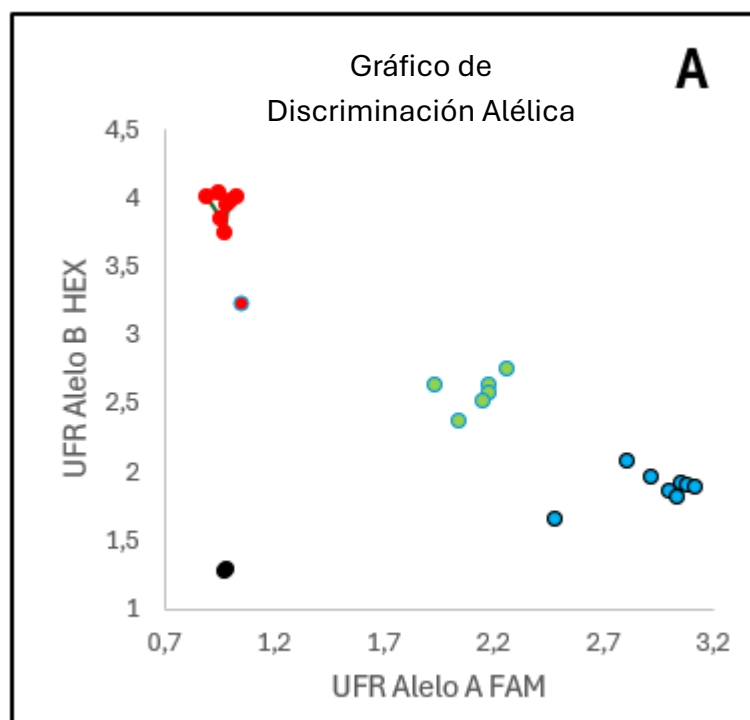
6. Se realiza un gráfico donde los valores Delta para cada muestra queden asignados en el eje Y mientras que las muestras se ordenan en el eje X.
7. Comparar el grafico Delta con el grafico de discriminación alélica para establecer los límites de corte entre los genotipos: Para alelos heterocigotas Delta cercano a 0. Para los homocigotas HEX Delta (Alelo B) > 0. Para los homocigotas FAM (alelo A) Delta < 0.
8. Hay que considerar que las variaciones en la concentración de ADN modifican la relación del Delta. Lo mismo ocurre con los organismos que no son diploides.

Comparación de ambos métodos (Arctan y Delta) para la visualización y análisis de datos de diferentes tipos de ensayos.

Con el fin de evaluar cuál de estos abordajes resulta más adecuado para analizar datos de marcadores tipo KASP, se comparó su utilización a tres situaciones o aplicaciones comunes de marcadores moleculares en el área del mejoramiento genético vegetal. Los datos analizados fueron brindados por el Laboratorio de Genómica y Marcadores moleculares de la FAUBA.

-Puesta a punto y validación de marcadores basados en SNP.

Cuando se cuenta con la secuencia de un SNP que se quiere utilizar para desarrollar un marcador para ser detectado por PCR, se deben diseñar, sintetizar y validar las sondas específicas para su detección. El diseño se suele hacer utilizando programas informáticos específicos como PRIMER3, WASP, FASTPCR, entre otros. La síntesis se realiza químicamente utilizando bloques de construcción, fosforamiditos protegidos de nucleósidos naturales o modificados químicamente o, en menor medida, de compuestos no nucleosídicos. La síntesis suele solicitarse a proveedores que cuentan con el equipamiento automatizado para este fin. Una vez que se cuenta con las sondas, el siguiente paso es su validación, el cual consta de una corrida de PCR con ADN extraído de genotipos contrastantes para el marcador y heterocigotas. A partir de esta corrida se obtienen valores de fluorescencia para FAM y HEX que pueden representarse en un gráfico de discriminación alélica. En la Figura 8A, se muestra la validación de un marcador utilizando 24 muestras, 7 de ellas homocigotas para el alelo A (FAM), 7 homocigotas para el alelo B (HEX), 6 muestras heterocigotas y 2 NTC (control negativo). Las Figuras 8B y C muestran la aplicación del método de Arctan y Delta, respectivamente. Como se esperaba dado que el grupo de muestras era claramente contrastante y su número reducido, no se observan diferencias en cuanto a la visualización e interpretación de datos utilizando ambos métodos de análisis.



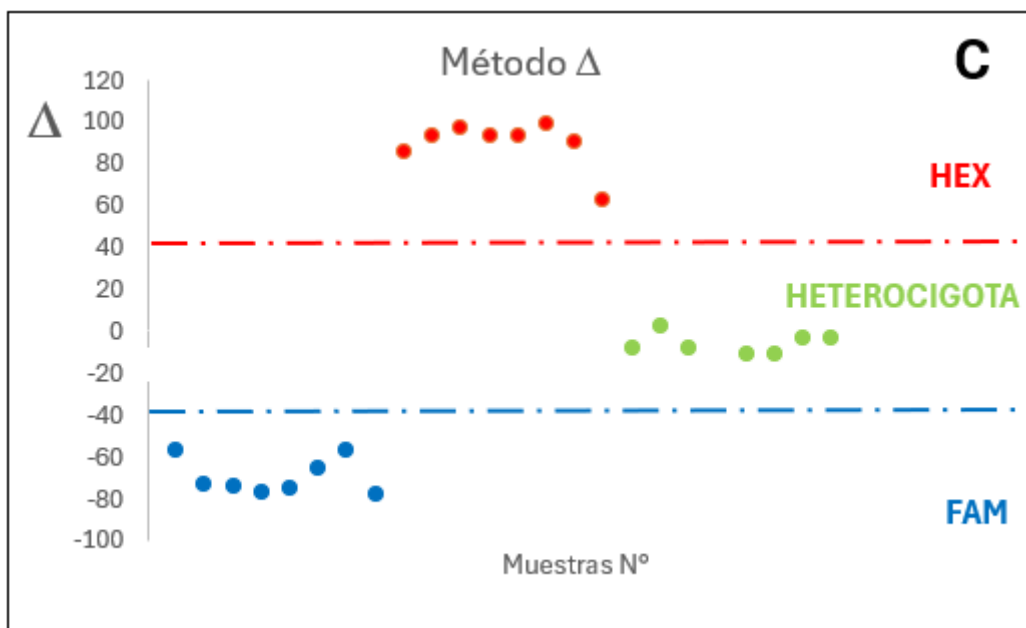
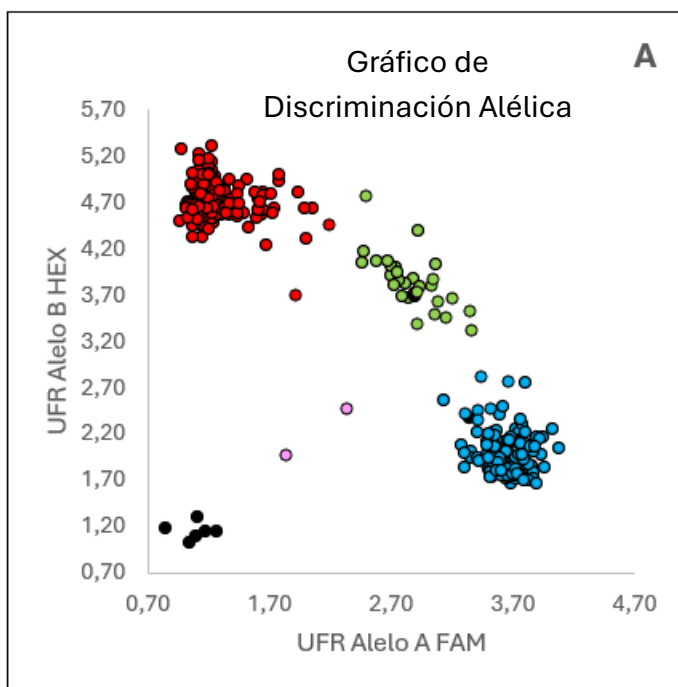


Figura 8: Gráficos de discriminación alélica de ensayo de validación. A- Gráfico de dispersión de fluorescencias FAM y HEX. B- Gráfico de método Arctan. C- Gráfico de método Delta.

-Identificación varietal

El uso de marcadores moleculares para la identificación genética en plantas ha demostrado ser una herramienta poderosa y precisa, ya sea para conservar y mejorar colecciones de germoplasma o para la correcta identificación de variedades de interés o bajo protección de la propiedad intelectual. Una vez establecido el genotipo de una variedad concreta, éste es invariable para todos los individuos de esa variedad, y puede extraerse a partir de material vegetal de cualquier parte de la planta. Este tipo de ensayos consta de 384 o 1536 muestras que se analizan juntas equitativamente y que pueden arrojar resultados homocigotas para cada uno de los alelos y en menor proporción heterocigotas. En este caso, donde se analizan muchas muestras a la vez, es fundamental contar con un método para el análisis e interpretación de datos KASP confiable. La Figura 9A muestra un gráfico de discriminación alélica generado a partir de los resultados para un marcador tipo KASP que se utiliza en la identificación varietal. Las Figuras 9B y C muestran la aplicación del método de Arctan y Delta, respectivamente. La

comparación de la discriminación obtenida por cada método permite suponer que el método Delta agrupa mejor los datos más dispersos (heterocigotas y sin amplificaciones). El porcentaje de discrepancia entre ambos métodos fue del 1,8% y correspondió a muestras que se encontraban cerca de los límites de corte. Estas discrepancias pueden mejorarse cambiando los umbrales de corte considerando el tipo de ensayo y cultivo del que se trata. De cualquier manera, estas pocas muestras pueden analizarse manualmente y considerar repetir su ensayo para mayor seguridad.



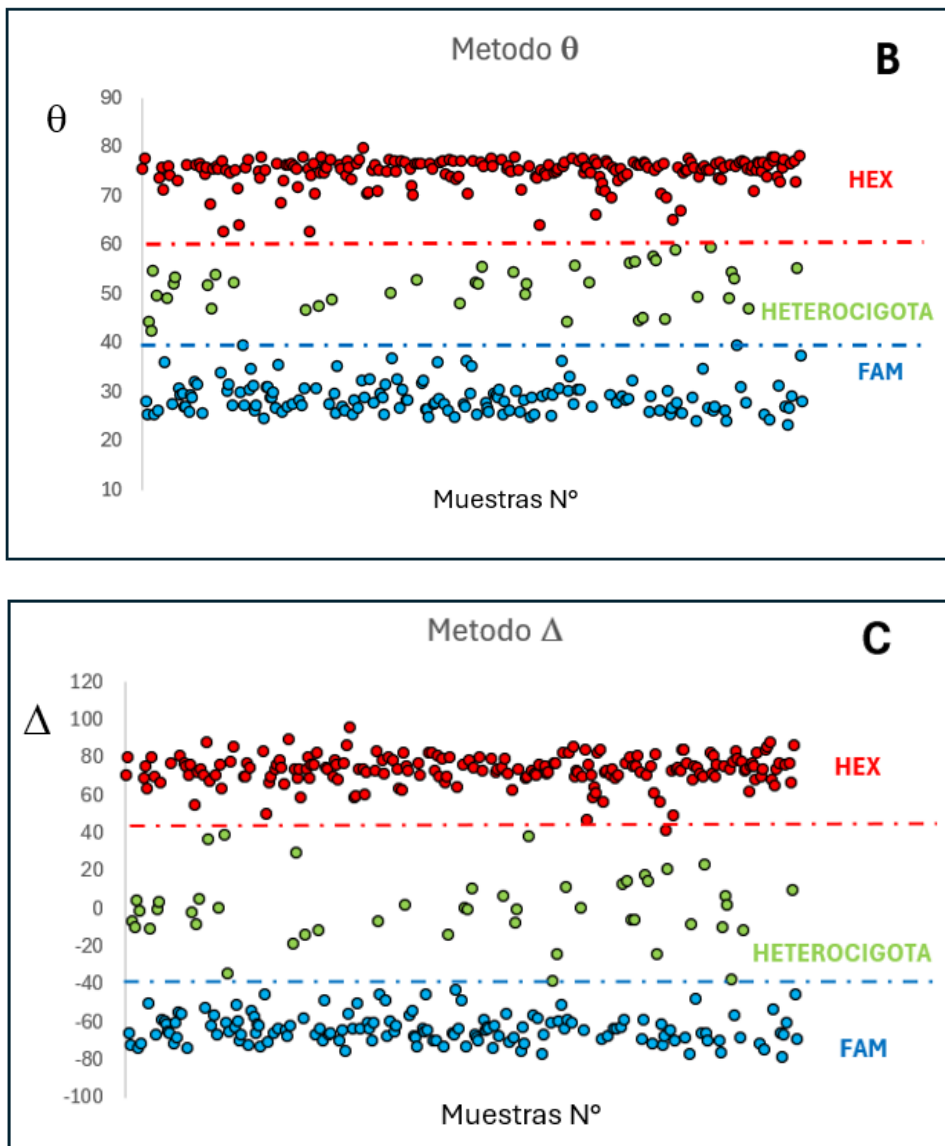


Figura 9: Gráficos de discriminación alélica de identificación varietal. A- Gráfico de dispersión de fluorescencias FAM y HEX. B- Gráfico de método Arctan. C- Gráfico de método Delta.

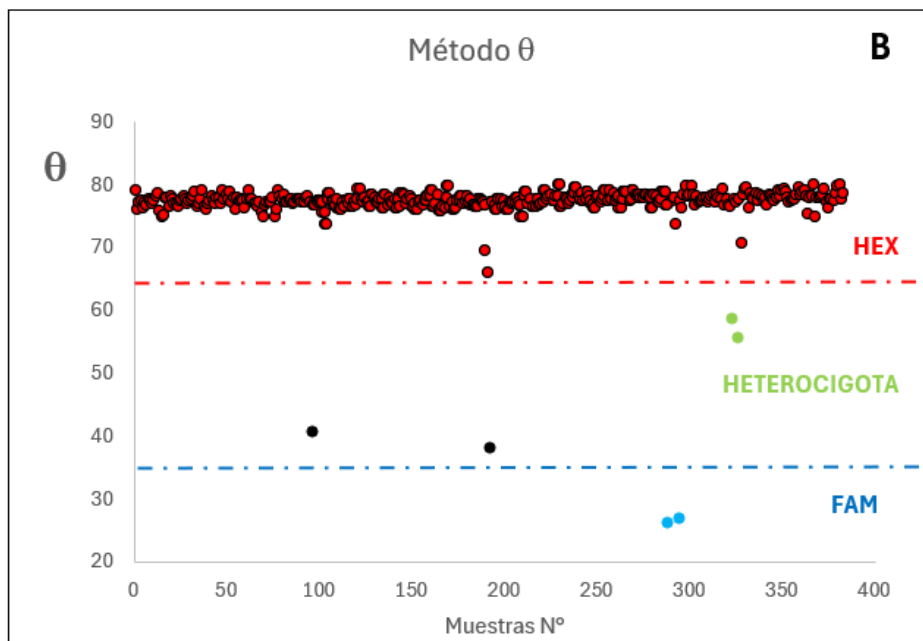
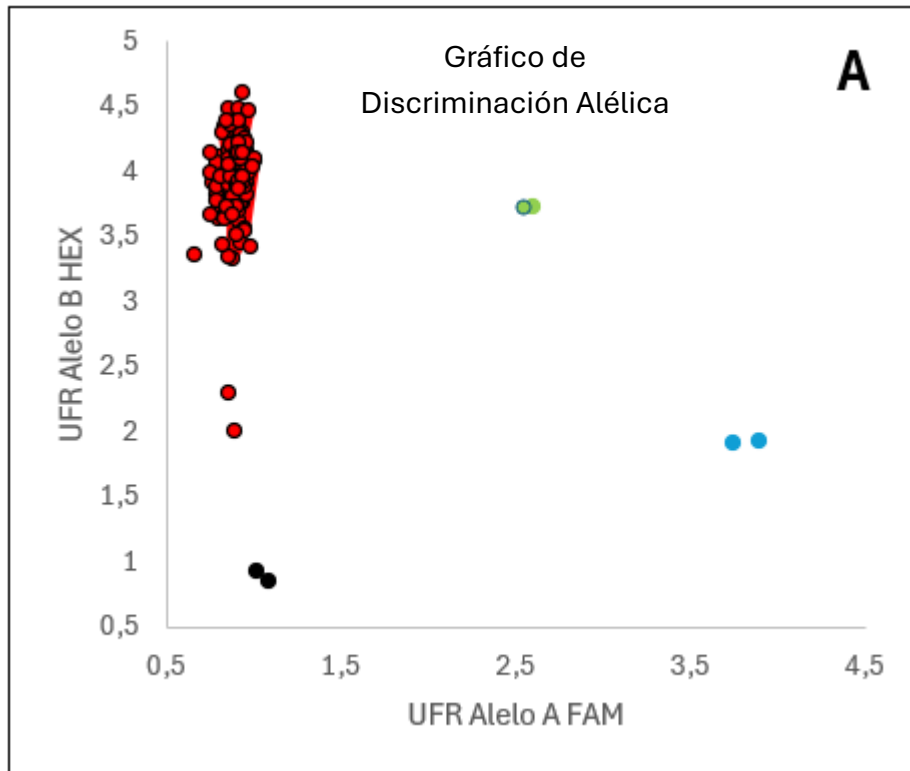
-Control de Híbridos “Grow out”

En los cultivos híbridos, como el girasol, un paso importante en la producción es el control de la uniformidad de los híbridos y el control de la fecundación. Estos ensayos son los llamados “Grow out” y consisten en plantar en el campo una muestra significativa de plantas de cada lote de semilla producida, crecerlos y leer los fenotipos completamente. En base a las características genéticas previamente determinadas y los fenotipos observados, un especialista establece la pureza y la

uniformidad de cada híbrido. Una alternativa al procedimiento de crecer y leer los fenotipos de una muestra de cada lote es usar marcadores moleculares para realizar el chequeo de los híbridos. Este procedimiento se realiza en etapas de plántula, cuando se toma la muestra para la extracción de ADN, reduciendo considerablemente el tiempo y el espacio necesario para la siembra, puesto que puede hacerse en macetas en invernadero.

En este tipo de ensayos consta de 368 o 1536 muestras de uno o varios lotes de un híbrido, para las cuales se analizan unos pocos marcadores. Dentro del set de análisis, se incluyen marcadores que permitan diferenciar los progenitores del híbrido (marcadores polimórficos) y se espera que, exceptuando los controles (que suelen proceder de los dos parentales), todas las muestras sean heterocigotas en estos marcadores, descartando de esta manera la autopolinización. Además, se suelen pasar otros marcadores, específicos del híbrido, que permitan descartar polinizaciones cruzadas con otros materiales que puedan estar presentes en el área de producción. Para estos últimos marcadores, se espera que las muestras sean en su mayoría homocigotas, y solo las contaminaciones, heterocigotas. En la Fig. 10A se muestra un gráfico de discriminación alélica para un marcador tipo KASP específico del híbrido. En el gráfico se ve claramente como la mayor proporción de muestras es homocigota para el marcador (puntos rojos), y solo 2 heterocigotas (puntos verdes). Cabe destacar que los puntos azules corresponden a los controles contrastantes necesarios para validar el ensayo.

Las Figuras 10B y C muestran la aplicación del método de Arctan y Delta al análisis de los resultados del marcador específico del híbrido, respectivamente. El método ángulo de amplificación (Arctan) agrupa mejor los datos en este tipo de ensayos que el segundo método. Esto posiblemente se deba a que los resultados no arrojaron mediciones parejas para ambas fluorescencias, lo que no permite el correcto escalado de los porcentuales y corrección de los valores por los máximos y mínimos que necesita el método Delta.



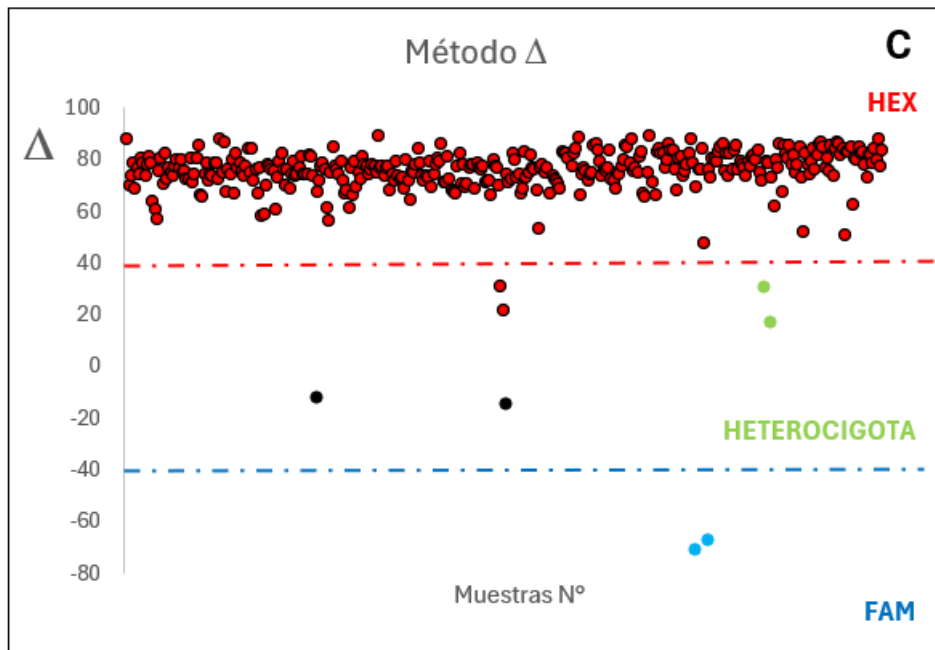


Figura 10: Gráficos de discriminación alélica de control de híbridos. A- Gráfico de dispersión de fluorescencias FAM y HEX. B- Gráfico de método Arctan. C- Gráfico de método Delta.

Consideraciones finales

Los SNPs, como marcadores moleculares, se destacan por su abundancia y estabilidad en el genoma, lo que los convierte en una opción preferida para el genotipado aplicado a la SAM, la selección genómica y el mapeo de QTL en cultivos agrícolas.

Los marcadores tipo KASP han demostrado ser una herramienta eficiente para mejorar la precisión y velocidad en la selección asistida por marcadores, permitiendo una integración más rápida de rasgos deseables en variedades vegetales.

Aunque el sistema KASP ofrece alta precisión y automatización, su éxito depende de la calidad del ADN y la correcta estandarización de las metodologías. Se recomienda realizar validaciones previas en los laboratorios para ajustar las condiciones específicas de cada cultivo y cada marcador. Es importante destacar que tanto las concentraciones de ADN iniciales como el tipo de cultivos, diploides o poliploides arrojarán gráficos diferentes y por lo tanto la interpretación de los datos no puede ser ajena a estas características.

El sistema tipo KASP se posiciona como una de las herramientas más robustas para la detección de SNPs debido a su alta sensibilidad, especificidad y facilidad de implementación en laboratorios de mejora genética. Además, su costo es competitivo y permite su ejecución en sistema de alto flujo de muestras.

El continuo avance en las tecnologías de genotipado y la reducción de costos aumentarán la accesibilidad del sistema KASP, expandiendo su uso a cultivos menores y programas de mejora en países en desarrollo.

Tanto los métodos basados en la transformación Arctan como los basados en Delta ofrecen resultados precisos y confiables para interpretar datos de fluorescencia en ensayos KASP. Sin embargo, el método Delta mostró una mejor agrupación en muestras heterocigotas y aquellas sin amplificaciones claras, mientras que el método Arctan destacó en ensayos homogéneos, como en el control de híbridos.

Los gráficos de discriminación alélica y los métodos analíticos empleados permitieron diferenciar con claridad las poblaciones genéticas analizadas, demostrando la capacidad del sistema KASP para manejar diversidad genética significativa en programas de mejoramiento vegetal.

Los gráficos demuestran que la tecnología KASP, combinada con análisis visual y matemático (Arctan y Delta), permite interpretar con precisión los datos de fluorescencia, identificar genotipos y validar la pureza varietal o la homogeneidad genética en programas de mejora vegetal.

Los métodos analíticos son complementarios y su selección depende del diseño experimental y de las características de la población estudiada.

La estandarización de los ensayos de fluorescencia permite maximizar el aprovechamiento del equipo disponible, minimizando variaciones derivadas de la calidad del ADN o de las condiciones de PCR. Se sugiere un análisis comparativo previo entre ambos métodos para seleccionar el más adecuado según la naturaleza del experimento y las características del cultivo y la población de estudio.

Bibliografía

Applied Biosystems™ TaqMan® real-time PCR assays consist of target-specific primers and one or more probes optimized for specific types of measurements.

Alejos-Velázquez L. P, Aragón-Martínez M. C., & Cornejo-Romero A. (2014). Extracción y purificación de ADN en Cornejo-Romero A., Serrato-Díaz A., Rendón-Aguilar B., & Rocha Munive M. G. (Eds), Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Capítulo 1, pp 1–20.

Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/ 2050: The 2012 revision. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ayalew H, Tsang PW, Chu C, Wang J, Liu S, Chen C, Ma XF. Comparison of TaqMan, KASP and rhAmp SNP genotyping platforms in hexaploid wheat (2019) PLoS One. May 22;14(5):e0217222. doi: 10.1371/journal.pone.0217222. PMID: 31116793; PMCID: PMC6530864.

Batley, J., & Edwards, D. (2007). SNP Applications in Plants. En: Oraguzie N. C., Rikkerink E. H. A., Gardiner S. E., De Silva H.N. (Eds), Association Mapping in Plants. Springer, Nueva York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-36011-9_6.

Benchling. (2022). How To Design Primers Benchling. <https://www.benchling.com>

Bharadwaj, D. N. (2018). Applications of Molecular Marker-Assisted Breeding in Plants. En: Bharadwaj D. N. (Ed), Advanced Molecular Plant Breeding: Meeting the Challenge of Food Security (1ra ed.), Capítulo 7, pp 235–267.

Boopathi N. M. (2020). Marker-Assisted Selection (MAS). En: Boopathi N. M. (Ed.), Genetic Mapping and Marker Assisted Selection. (2da ed.), Capítulo 9, pp 343–388.

Brusa A., Patterson E., & Fleming M. (2023). Modifications of Kompetitive Allele-Specific PCR (KASP) Genotyping for Detection of Rare Alleles. En: Shavrukov Y. (Ed.), Plant Genotyping, Methods in Molecular Biology, 2638, pp 173–189.

Chhandak Basu (2022) PCR primer design. methods in molecular biology Vol 2392. Springer protocols.

Collard B. C. Y., & Mackill D. J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 363, pp 557–572.

Collard B. C. Y., Jahufer M. Z.Z., Brouwer J.B., & Pang E.C.K. (2005). An Introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142, pp 169–196.
<https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>.

Edwards D., Forster J. W, Chagné D. & Batley J. (2007). What Are SNPs? En: Oraguzie N. C., Rikkerink E. H. A., Gardiner S. E. & Silva H. N (Ed.), *Association Mapping in Plants*, pp 41–52. https://doi.org/10.1007/978-0-387-36011-9_3.

Garafutdinov, R. R., Galimova, A. A., & Sakhabutdinova, A. R. (2020). The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 39(9), pp 1251–1269.
<https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1803354>

Ghosh R. K., Otto I. M., & Rommel J. (2022). Editorial: Food Security, Agricultural Productivity, and the Environment: Economic, Sustainability, and Policy Perspectives. *Frontiers in Environmental Science*. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.916272>.

Godbey W T. (2022). The polymerase chain reaction (PCR). En: Godbey W T. (Ed), *Biotechnology and its Applications (Second Edition)*. pp 219-246.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817726-6.00010-1>.

Holme J. & Anthony J. (2014) SNP Genotyping: The KASP Assay. En: Fleury D., & Whitford R. *Crop Breeding. Methods and Protocols*, vol 1145. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0446-4_7.

Kristin Beltz et al, (2018) A High-Performing and Cost-Effective SNP Genotyping Method Using rhPCR and Universal Reporters. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 9, 497-512.

LGC Biosearch Technologies (2013), KASP - User guide and manual.

LGC Biosearch Technologies (2014b), A guide to the analysis of KASP genotyping data using cluster plots.

Martinez M. C., Helguera M. & Carrera A. (2010). Marcadores moleculares. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte I. Capítulo. 5*, pp 70–85.

Mohanrao MD, Senthilvel S, Reddy YR, Kumar CA, Kadirvel P. (2023) Amplifluor-Based SNP Genotyping. *Methods Mol Biol.* 2638:191-200. doi: 10.1007/978-1-0716-3024-2_13. PMID: 36781643.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, pp 263–73.
<https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.

Pandey S. & Pandey V. (2018). Applications of Molecular Marker-Assisted Breeding in Plants. <https://doi.org/10.1201/b22473-7>.

Picca, A., Helguera, M., Salomón, N., Carrera, A. (2004). Marcadores moleculares. En: Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E. & Mroginski L. (Ed.), *Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Ediciones INTA: Parte II. Capítulo 4*, pp 61–68.

Prediger E. (2013). How to design primers and probes for PCR and qPCR. <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes>.

Rafalski, J.A. (2002). Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science*, 162, pp. 329–333.

Ruslan Kalendar, Akmaral Baidyussen, Dauren Serikbay, Lyudmila Zotova, Gulmira Khassanova, Marzhan Kuzbakova, Satyvaldy Jatayev, Yin-Gang Hu, Carly Schramm, Peter A. Anderson, Colin L. D. Jenkins, Kathleen L. Soole and Yuri Shavrukov (2022) Modified “Allele-Specific qPCR” Method for SNP Genotyping Based on FRET. *Frontiers in plant science*.

Saito Y., Tada F., Takashina T., & Ikegami H. (2023). Allele-Specific Mutation Genotyping with Mismatches in Primer Design. En: Shavrukov Y. (Ed.), *Plant Genotyping, Methods in Molecular Biology*, 2638, pp. 249-262. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3024-2_17.

Semagn, K., Bjornstad A., and Ndjioudjop M.N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25), pp 2540–2568.

Southern E. M. (1975). Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), pp 503–508. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80083-0).

S. Pandey y V. C. Pandey. (2018) Applications of molecular Marker-assisted breeding in plants. Cap 7 *Advanced Molecular Plant Breeding*. Apple Academic Press.

Thermo Fisher Scientific (2009). 260/280 and 260/230 Ratios. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers.

Voss-Fels K. P., Stahl A., & Hickey L. T. (2019). Q&A: modern crop breeding for future food security. *BMC Biology*, 17(18). <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0638-4>.

Weed Science Society of America (1998). Technology Notes. *Weed Technology*, 12, pp 789–790.

Yuri Shavrukov (2023) *Plant Genotyping. Methods in molecular biology* Vol 2638. Springer protocols.