

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A FACTORES
ABIÓTICOS QUE AFECTAN NEGATIVAMENTE EL
RENDIMIENTO DE LOS CULTIVARES DE PAPA
(SOLANUM TUBEROSUM L.)**

FINCYT 120-FINCYT-IA-2013

Informe de marcadores para la selección de variedades
tolerantes o susceptibles

Período: 20 de Abril del 2016 hasta el 19 de Noviembre del 2016

RESUMEN EJECUTIVO

El presente informe pertenece al proyecto de “Identificación de marcadores moleculares relacionados con la resistencia a factores abióticos que afectan negativamente el rendimiento de los cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.)”. El presente informe, forma parte de las actividades ejecutadas en el período de 20 de Abril hasta el 19 de Noviembre del 2016.

OBJETIVO

El objetivo del presente informe es reportar los resultados de los marcadores generados en el presente proyecto para la selección de las variedades de papa nativa tolerantes o susceptibles frente al estrés de helada.

LUGAR DE TRABAJO

Las actividades que involucran tanto el diseño como la amplificación con los marcadores generados para el presente proyecto se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

METODOLOGIA

A continuación se detallará el procedimiento seguido para la generación y amplificación de los marcadores para la selección de las variedades de papa nativa tolerantes o susceptibles frente al estrés de helada.

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó como material biológico las hojas de dos variedades tolerantes (Yana Manwa y Puka Puqya) y una susceptible (Yuraq Kuchillo Paquillo) en dos tiempos: sin estrés (T₀=temperatura ambiental) y estresadas (T₂= - 8°C x una hora). A partir de las hojas se extrajo el ARN para luego hacer la transformación a cDNA.

2. EXTRACCION DE ARN

El ARN fue aislado a partir de 1 - 2 g de hojas por cada planta. El método de extracción de ARN se realizó empleando el reactivo TRIzol® Reagent, según el siguiente protocolo:

a) *Lisis de las muestras (hojas)*

- Triturar las hojas (1-2g. aproximadamente) con nitrógeno líquido, con ayuda del mortero, hasta que queden polvo.
- Colectar la muestra en tubos eppendorf de 2mL y adicionar 1mL del reactivo TriZol (100mM Tris pH 8.5).
- Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4C.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

b) *Separación*

- Agregar 0.2mL de cloroformo, mezclar durante 15 minutos y dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 g durante 15 minutos a 4C.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.

c) *Precipitación del ARN*

- Adicionar 500uL de isopropanol, mezclar y dejar reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 12000 g durante 10 minutos a 4C.
- Lavar el precipitado adicionando 1mL de etanol 75%.
- Centrifugar a 12000 g durante 5 minutos a 4C.
- Secar el precipitado a temperatura ambiente durante 20 minutos.

d) *Solubilización del ARN*

- Adicionar 40uL de agua DEPC.

Luego se hidrolizó con DNAsas utilizando el kit *DNase Treatment and Removal Reagents* (Ambio[®], DNA-free[™]) con la finalidad de eliminar cualquier presencia de ADN:

- a. Agregar 0.1 µl del Buffer DNase 10X y 1µl de rDNase al ARN extraído, mezclando suavemente.
- b. Incubar a 37C por 30 minutos.
- c. Adicionar el Reactivo de Inactivación de DNase (0.1V) y mezclar completamente.
- d. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, mezclando por momentos.
- e. Centrifugar a 10000 g durante 1.5 minutos.
- f. Transferir el ARN tratado a un tubo eppendorf nuevo.

La calidad del material extraído fue evaluada en geles de agarosa al 1%. Se analizó mediante electroforesis a 100V por 45 minutos. Adicionalmente se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf®). Para estimar la pureza del ARN obtenido se calcularon las relaciones A260/A230 y A260/A280. La relación A260/A230 revela la presencia de contaminantes orgánicos. La relación A260/A280 se utiliza para estimar la presencia de proteínas. Valores entre 1.8 y 2.0 indican una alta pureza del ARN extraído. Luego de evaluar la cantidad y calidad del ARN, es necesario realizar un tratamiento al material biológico extraído, para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

El RNA extraído (stock de RNA) se diluyó en alícuotas de 200ng/ul en un volumen final de 30ul de DEPC (Dietilpirocarbonato, el cual es una sustancia química que elimina Ribonucleasas).

Para la obtención del cDNA, fue necesario realizar un tratamiento a las alícuotas del RNA, para lo cual se agregaron los siguientes reactivos de acuerdo al siguiente orden (ver Tabla 1):

Tabla 1. Componentes para el tratamiento del ARN

Reactivo	Para 1 rxn
10X DNase buffer	5ul
rDNase I	1 ul

Luego se incubó la reacción a 37 °C por 5 minutos. Se agregaron 5ul de DNase Inactivation Reagent, se mezcló suavemente y luego se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos.

Finalmente se centrifugó a 10000g por 2 minutos, se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos de 0.6ml. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3. OBTENCIÓN DEL cDNA

Se procedió a obtener el cDNA mediante el método de transcriptasa reversa (RT-PCR) con el kit Transcriptor First Strand cDNA (Roche) a partir de las alícuotas a 200ng/ul del RNA tratado con DNase.

Se siguieron las especificaciones indicadas en el kit, se agregaron los reactivos según este orden (Tabla 2), en un volumen total de 20 ul por reacción:

Tabla 2. Componentes para la síntesis de cDNA

Reactivo	Concentración inicial	Para 1 reacción (vol)	Para control negativo
Random cebadores (Invitrogen)	50 uM	1 ul	1 ul
RNA	200 ng/ul	3 ul	3 ul
dNTP (Promega)	10 mM	1 ul	1 ul
H ₂ O (Promega)		7 ul	7 ul
TOTAL		12 ul	12 ul

La reacción se incubó a 65 °C por 5 minutos, luego a 4 °C por 2 minutos, se centrifugó brevemente.

Luego, se agregaron los reactivos en el siguiente orden (Tabla 3):

Tabla 3. Concentración de reactivos para la síntesis de cDNA

Reactivo	Concentración inicial	Para 1 reacción (vol)	Para control negativo
5X First-strand buffer (Invitrogen)	5X	4 ul	H ₂ O
0.1 DTT	0.1M	2 ul	2 ul
RNAse Out	40U/ul	1 ul	1 ul

La reacción se incubó a 37 °C por 2 minutos. Finalmente se agregó la enzima transcriptasa reversa (M-MLV) (Tabla 4):

Tabla 4. Concentración de reactivos para la síntesis de cDNA

Reactivo	Concentración inicial	Para 1 reacción (vol)	Para control negativo
M-MLV	200U/ul	1 ul	H ₂ O

Se realizó un spin, luego se colocaron en un termociclador Eppendorf con el siguiente patrón térmico (Tabla 5):

Tabla 5. Condiciones de PCR en termociclador

Temperatura	Tiempo
25 °C	10 min
37 °C	50 min
70 °C	15 min
4 °C	Forever

El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4. DISEÑO DE LOS MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares se diseñaron a partir de las secuencias de cDNA de aquellos genes que se encontraron reportados como expresos diferencialmente antes el estrés de bajas temperaturas (datos aún no publicados).

Los marcadores moleculares fueron diseñados usando una licencia libre (por 7 días) del software *Beacon Designer 8* (PREMIER Biosoft Int., Palo Alto, CA, USA) y luego se mandaron a sintetizar en IDT (Integrated DNA Technologies) utilizando como intermediario a MASED PERU.

Los marcadores moleculares fueron diseñados según los siguientes parámetros:

Tamaño del cebador: 18bp -24bp

Temperatura de melting (T_m): 65°C

Tamaño del producto: 100bp - 150bp

5. AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES

Se realizó la amplificación de los cebadores con una PCR convencional (Tabla 6), el volumen de reacción total fue de 10 ul, donde se utilizó 1 ul del cDNA y se realizó una gradiente de temperatura *annealing* (3 Ta=50°C, 55°C y 60°C).

Tabla 6. Componentes de la mezcla de PCR

Reactivo	Concentración inicial	Para 1 reacción (vol)
H2O		5.4 ul
5X Buffer	5X	2.0 ul
MgCl ₂	50 mM	0.8 ul
dNTP	100 mM	0.2 ul
F	100 mM	0.2 ul
R	100 mM	0.2 ul
Taq	1	0.2 ul
cDNA		1 ul

Los marcadores moleculares (Tabla 7) fueron diseñados a partir de genes expresados diferencialmente (datos aún no publicados), luego fueron evaluados en geles de agarosa.

Tabla 7. Lista de secuencias de los marcadores moleculares diseñados

N°	Código del marcador molecular	Gen	Secuencia del cebador
1	ACCR1	ACC Synthase	GTTAGAGGAGATAGAGTCACATT
			CTGGATAATATGGTGTAGGAACTA
2	ASCORRS1	Ascorbate Oxidase	TGTCAGCAGGAATAATACTACTC
			GACTTGATCGCAACTCT
3	ADR1	Aromatic deshydrogenase	CGAAGATTGTTCCGAATGTG
			ACCAAGATAGTGCCAGAGA
4	CBPR-21	Calmodulin binding	CACTGCTGCTGGTAGACT
			ACGCTATGCTCCTCAAGG
5	CBPR-2b1	Calmodulin binding	GGAAGCAATGAAGGCGAAT
			GCTAATGAACGACATGAATAACG
6	CRTR2	CRT binding factor 2	GCCGTTCTGCTTGCTTGA
			TCCGACTCTTCTAATGATGATGGT
7	DREBR1	Dehydration-responsive element binding protein	ATTCCTCTGTTGATGCTAAGTT
			GCTCTCCTCTCCTCCAT
8	ENDR1	Zinc finger protein	GATTGTTCCCATCTGGATCAAAT
			AGTCTATTCTCCTCCTCAATGTTA
9	ETHR-21	Ethylene response factor 5	CGAGCGGTATGAGTAGTA

			CAACAGAAGACGATGAGT
10	LEAR1	Late embryogenesis abundant protein 5	GGCTCGTTATTTCTCCAACCTG
			TTCCATCACATTGCTTCTAACAG
11	NDPR1	NAC domain protein	CTCAGAGCATGTCTTGTC
			TGGGTTTCAAATGGTTCA
12	NQOR1	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 1	AGTTGAAGGCGTAGGCATTA
			GCCAATCAAATTCGTCGTAAGA
13	PAR1	Phenylalanine ammonia-lyase	AGAAGTGTGACAGGTGAA
			AGCAGATTGGAAGAGGAG
14	VQR1	VQ	AGCACCAGAGATTATCAA
			TCTTCTTGTTGTTGTTGT
15	WRR1	WRKY transcription factor-30	GGCTCTCTATCAGTAAGTCA
			ATATCAATGTCGCTTGTTGTT
16	WRR-21	WRKY transcription factor-30	TCTTCTTATGAGCAATCTCTGTT
			CACTCTTAGGACTTCCATCAAT

Los marcadores desarrollados, fueron previamente identificados con relación a la resistencia en heladas (datos aún no publicados, Tabla 10). Estos marcadores se evaluaron en las variedades del presente proyecto.

Tabla 10. Genes diferencialmente expresados en una variedad tolerante a heladas durante el estrés de baja temperatura

gene	Ubicación en PGSC-DMC	value_1 (T0)	value_2 (T2)	log2(fold_change)
ACC Synthase	PGSC0003DMC400010333	22.0536	264.629	3.58489
Ascorbate Oxidase	PGSC0003DMC400048540	0.829503	4.94705	2.57625
Aromatic deshydrogenase	PGSC0003DMC400050606	0.775897	13.1783	4.08616
Calmodulin binding	PGSC0003DMC400000650	2.52318	26.732	3.40526
CRT binding factor 2	PGSC0003DMC400025208	0.202766	12.1026	5.89936
Dehydration-responsive element binding protein	PGSC0003DMC400016762	30.5519	146.81	2.26461
Zinc finger protein	PGSC0003DMC400037731	2.34486	120.233	5.68018
Ethylene response factor 5	PGSC0003DMC400062150	12.509	172.315	3.78401
Late embryogenesis	PGSC0003DMC400031282	53.3139	508.552	3.25381

abundant protein 5				
NAC domain protein	PGSC0003DMC400055617	14.1885	122.63	3.11152
NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 1	PGSC0003DMC400015430	7.74266	100.056	3.69184
Phenylalanine ammonia-lyase	PGSC0003DMC400037387	25.6453	412.544	4.00778
VQ	PGSC0003DMC400050505	20.8698	106.206	2.34738
WRKY transcription factor-30	PGSC0003DMC400010347	6.74954	139.671	4.3711

Value 1: nivel de expresión (fpkm) en la planta control, value 2: nivel de expresión (fpkm) en el tiempo de estrés a baja temperatura. log2 (fold change): valor de expresión diferencial

Se realizó la PCR en el termociclador Eppendorf MTC-200 con el siguiente protocolo: 25 °C por 10 min, 37 °C por 30 min, 60°C por 5 minutos (Ta: temperatura de *annealing*), 85 °C por 5 min y 4 °C indefinidamente para mantener los productos.

La amplificación de los cebadores diseñados se evaluó a través una corrida de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Las muestras se distribuyeron en una placa de 96 pocillos, por cada placa se evaluó 1 tiempo (T0=temperatura ambiental y T1= -8°C) y 4 pares de cebadores, la distribución se realizó de la siguiente manera (Figura 1):

Distribución en placa:

Figura 1. Diseño del sembrado de las muestras en las placas de 96 pocillos en Termociclador Eppendorf

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T#R1	T#R1				T#R1	T#R1				T#R1	T#R1
	P1	P2				P1	P2				P1	P2
B	T#R1	T#R1				T#R1	T#R1				T#R1	T#R1
	P3	P4				P3	P4				P3	P4
C	T#R2	T#R2				T#R2	T#R2				T#R2	T#R2
	P1	P2				P1	P2				P1	P2

D	T#R2 P3	T#R2 P4				T#R2 P3	T#R2 P4				T#R2 P3	T#R2 P4
E	T#S1 P1	T#S1 P2				T#S1 P1	T#S1 P2				T#S1 P1	T#S1 P2
F	T#S1 P3	T#S1 P4				T#S1 P3	T#S1 P4				T#S1 P3	T#S1 P4
G												
H												

T#R1: tiempo # variedad tolerante 1 (Yana Manwa), T#S1: tiempo # variedad susceptible (Yuraq Kuchillo Paqui),
#: Temperatura ambiente o estrés P1: primer 1, P2: primer 2, P3: primer 3, P4: primer 4

RESULTADOS y DISCUSION

1. EXTRACCIÓN DE ARN

El tratamiento del ARN con el kit DNase free disminuyó la concentración inicial de las muestras de ARN extraídos (Ver Tabla 11), sin embargo la concentración y las absorbancias (260/230) se mantuvieron.

Tabla 11. Cuantificación de concentración de ARN

Variedad	Tiempo	Código	Concentración inicial (ng/ul)	260/230	Concentración después de DNase free (ng/ul)	230/260
Yana Manwa	T0	T0R1	740.2	1.82	540.4	1.81
	T1	T1R1	480.2	1.94	440.3	1.94
Puka Puqya	T0	T0R2	492.6	1.98	482.6	1.92
	T1	T1R2	481.8	2.01	478.7	1.98
Yuraq Kuchillo Paqui	T0	T0S1	632.3	2.02	601.6	2.0
	T1	T1S1	642.7	1.87	612.3	1.78

T0: temperatura ambiente, T1: temperatura estrés (-8 °C)

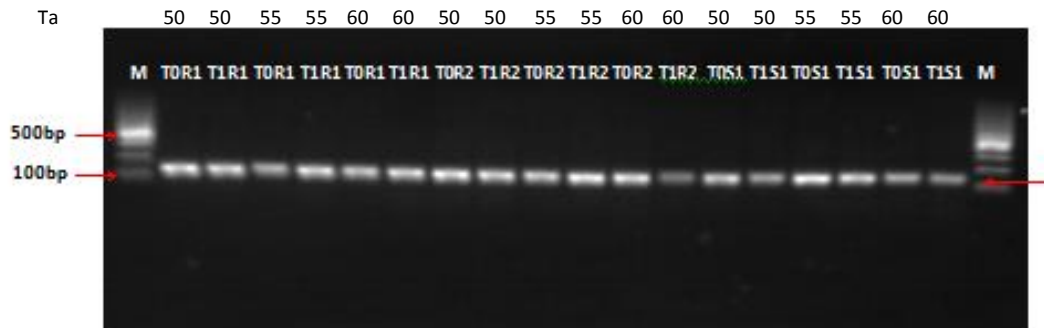
En cuanto a los índices de absorbancia, se puede observar (Tabla 11) que se obtuvo ARN de alta pureza con índices de A260/A230 igual a 2.

Para la comprobación de la amplificación de los cebadores diseñados se utilizaron los cDNA obtenidos, se realizó una electroforesis y luego se visualizaron los resultados en gel de agarosa al 1%.

A continuación los resultados de la amplificación por cada cebador evaluado:

2. AMPLIFICACION DE MARCADORES MOLECULARES

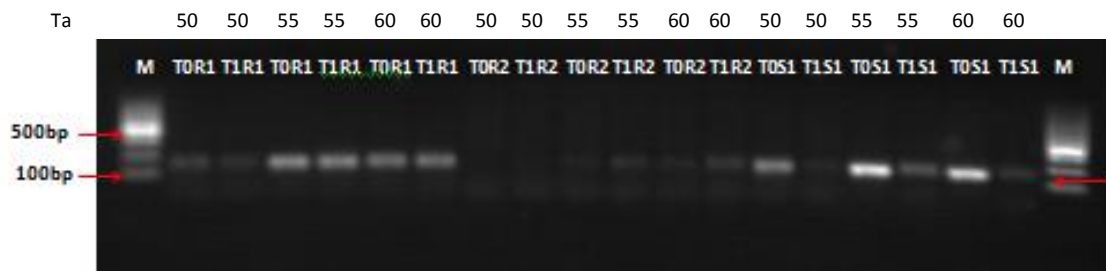
1. Amplificación con marcador ACCR1:



Con el marcador ACCR1, se observa amplificación de 1 sola banda en todos los individuos evaluados (tolerantes y susceptibles) y en ambos tiempos (temperatura de ambiente y temperatura de estrés). No se reporta variación entre los tiempos evaluados.

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 55°C, ya que se pueden observar bandas bien definidas en esa temperatura.

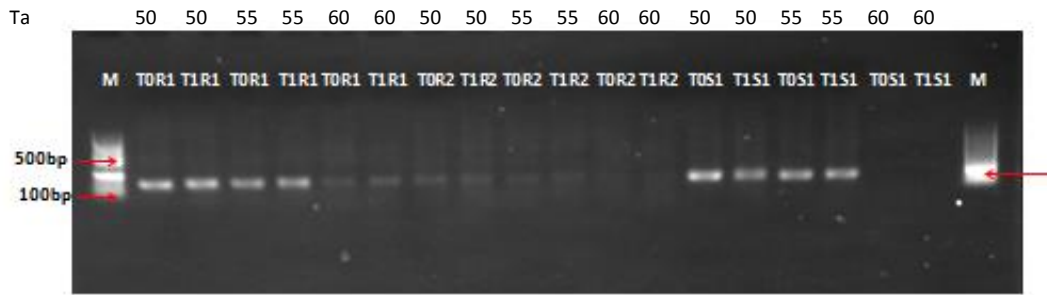
2. Amplificación con marcador ASCORRS1:



Con el marcador ASCORRS1, se observa amplificación de 1 sola banda en los individuos evaluados. En cuanto a los tolerantes, no presentan variación en la intensidad de las bandas tanto en el tiempo control como el tiempo tras el estrés. Sin embargo, en la variedad susceptible se puede observar una mayor intensidad en las bandas de las muestras en el tiempo control y una disminución en la banda correspondiente a las muestras estresadas.

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 60°C, ya que se pueden observar bandas bien definidas a la temperatura mencionada.

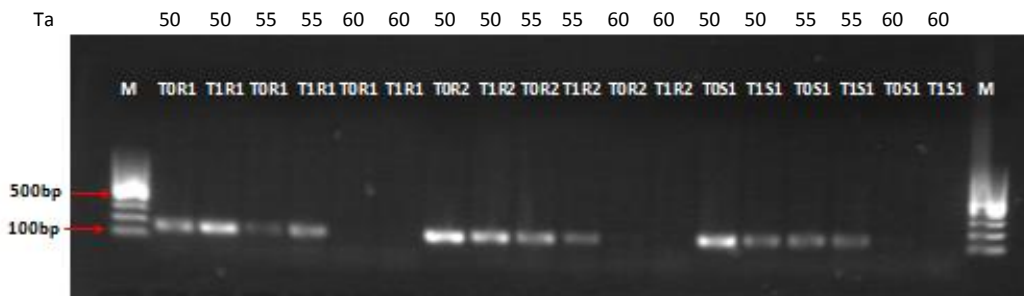
3. Amplificación con ADR1



Con el marcador ADR1, se observa amplificación de 1 sola banda en los individuos evaluados. No se reporta variación entre las muestras del tiempo control y tras el estrés en las variedades tolerantes, sin embargo en la variedad susceptible se observa un comportamiento muy similar al marcador ASCORRS1, mayor intensidad en el tiempo control a comparación de las muestras tras el estrés.

La temperatura de annealing para este marcador será la temperatura de 50°C, ya que a esa temperatura se amplificaron bandas nítidas.

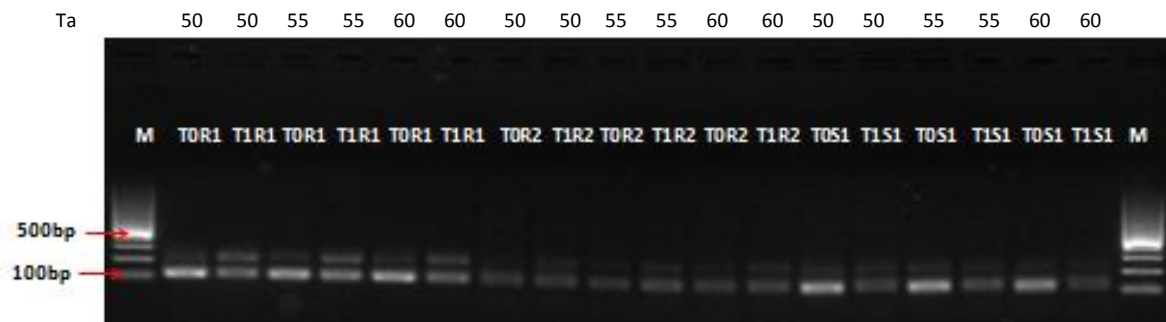
4. Amplificación con CBPR-21



Con el marcador CBPR-21, se observó amplificación de 1 sola banda en los 3 individuos. En la variedad tolerante Yana Manwa (T1) se reporta una mayor intensidad de banda en las muestras estresadas que en las muestras control, comportamiento similar en la variedad susceptible. En la segunda variedad tolerante Puka Puqya se reporta un comportamiento opuesto.

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elegiría la temperatura de 50°C, ya que a esa temperatura en todos los individuos amplifica bandas nítidas.

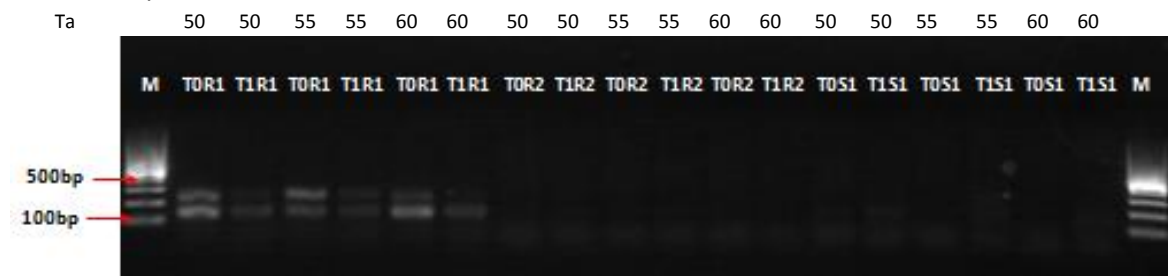
5. Amplificación con CBPR-2b1



Con el marcador CBPR-2b1, se observa amplificación de 2 bandas (100 pb y 140 pb) en todos los individuos evaluados. Cabe resaltar que la banda de menor tamaño (100 pb) es de mayor intensidad y mayor en el tiempo control.

La temperatura de annealing para este marcador será 55°C, debido a la nitidez de las bandas.

6. Amplificación con CRTR2



Con el marcador CRTR2, se observa amplificación 2 bandas en los individuos de Yana Manwa pero en ninguno de los otros individuos evaluados, en cuanto a las intensidades de las bandas, se reporta una mayor intensidad en las bandas pertenecientes al tiempo control.

Para este marcador, se escogerá una temperatura de annealing de 50°C.

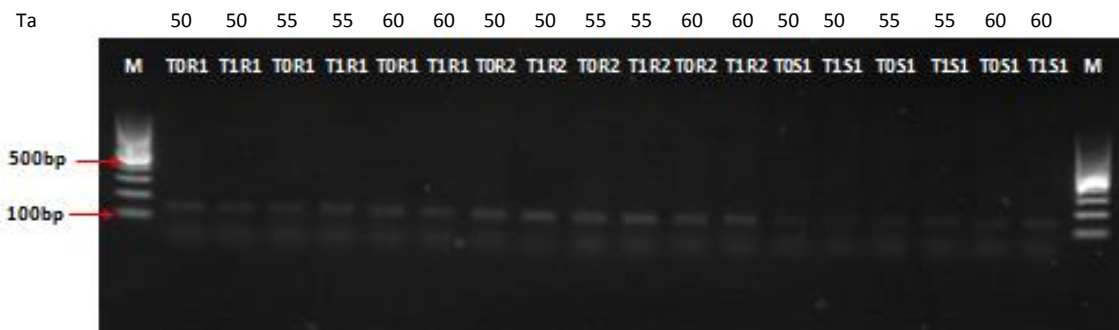
7. Amplificación con DREBR1:



Con el marcador DREBR1, se observa amplificación de 1 sola banda en casi todos los individuos. Las intensidades de las bandas son similares entre los tiempos y las variedades evaluadas.

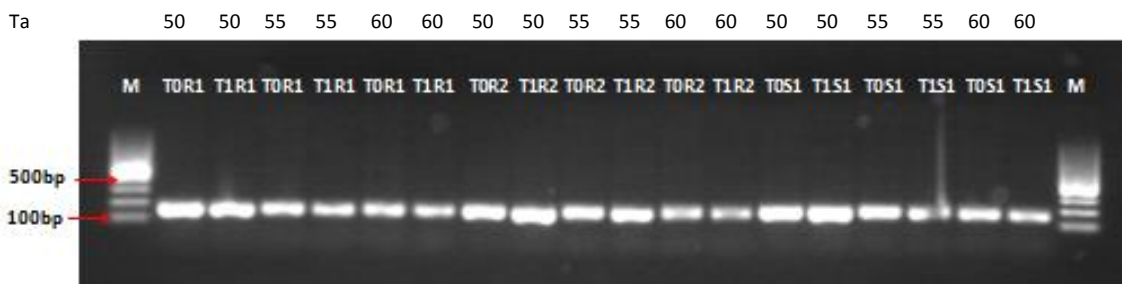
En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 55°C, ya que a esa temperatura los individuos amplifican bandas nítidas.

8. Amplificación con ENDR1:



Con el marcador ENDR1, se observa amplificación de 1 sola banda, pero en muy baja intensidad. Sería recomendable aumentar los ciclos de amplificación para tener bandas más nítidas. Sin embargo, se puede observar que las intensidades de las bandas difieren entre variedades tolerantes y susceptible.

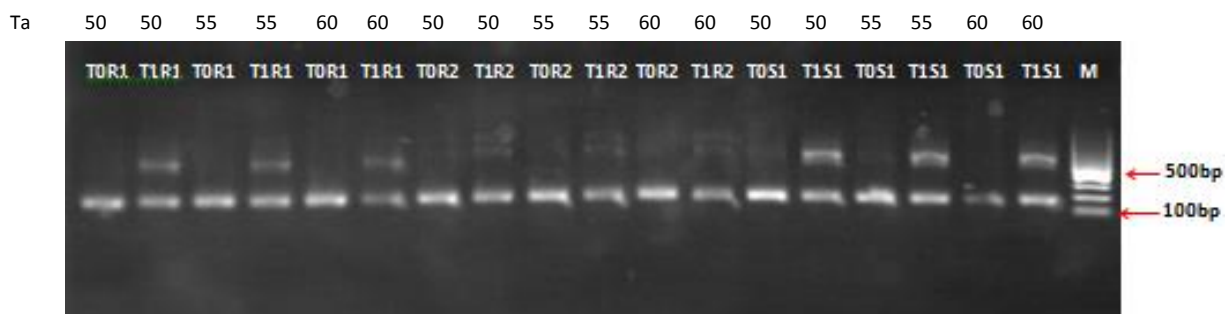
9. Amplificación con ETHR-21



Con el marcador ETHR-21, se observa amplificación de 1 sola banda en todos los individuos evaluados. Se puede observar una ligera mayor intensidad de las bandas entre la variedad susceptible vs variedades tolerantes en ambos tiempos (control y estrés).

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 55°C, ya que a esa temperatura los individuos amplifican bandas nítidas.

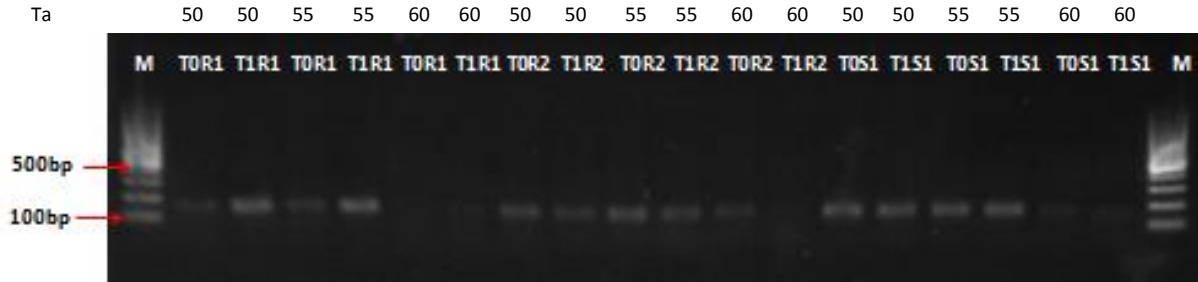
10. Amplificación con LEAR1:



Con el marcador LEAR1, se observa amplificación de 1 banda en todos los individuos evaluados en el tiempo control (T0) mientras que se observan 2 bandas en todos los individuos tras el estrés (T1).

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 50°C, ya que a esa temperatura los individuos amplifican bandas nítidas.

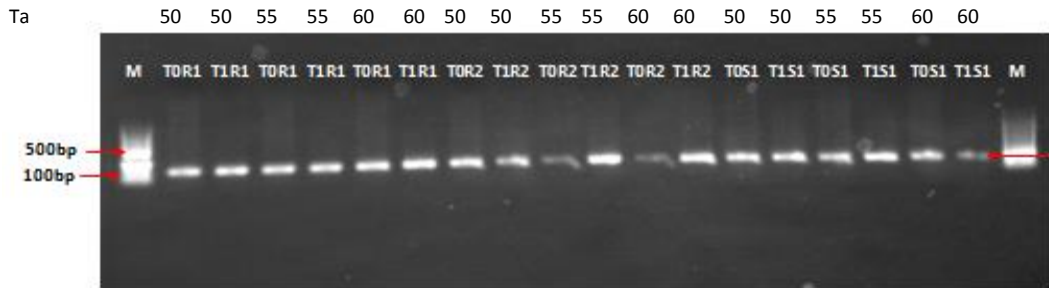
11. Amplificación con NDPR1:



Con el marcador NDPR1, se observa amplificación de 1 sola banda en todos los individuos evaluados. Se reporta variaciones de las intensidades de las bandas en las muestras estresadas de las variedades tolerantes, mientras que en la variedad susceptible no se observa variación entre los tiempos evaluados.

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elegiría la temperatura de 50°C, ya que a esa temperatura los individuos amplifican bandas nítidas.

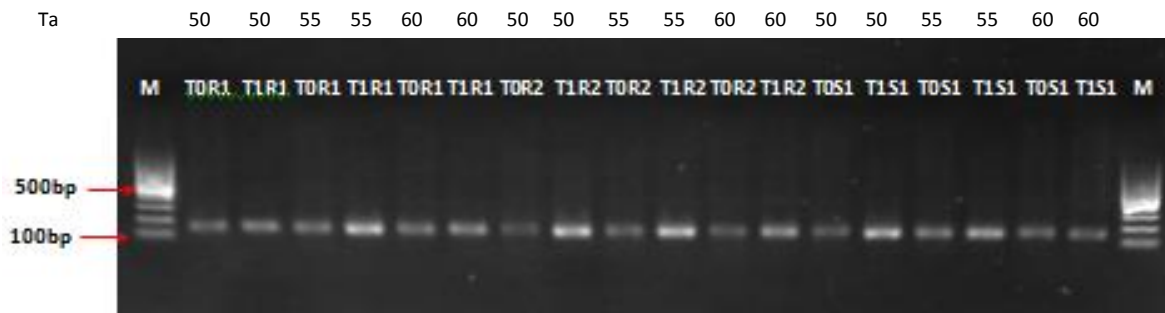
12. Amplificación con NQOR



Con el marcador NQOR, se observa amplificación de 1 sola banda en todos los individuos evaluados. En la variedad Yana Manwa (tolerante) y Yuraq Kuchillo (susceptible) no se observa variación entre los tiempos evaluados, sin embargo, en la variedad Puka Puqya (tolerante) se observa una mayor intensidad en las muestras estresadas.

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 50°C, ya que a esa temperatura los individuos amplifican bandas nítidas.

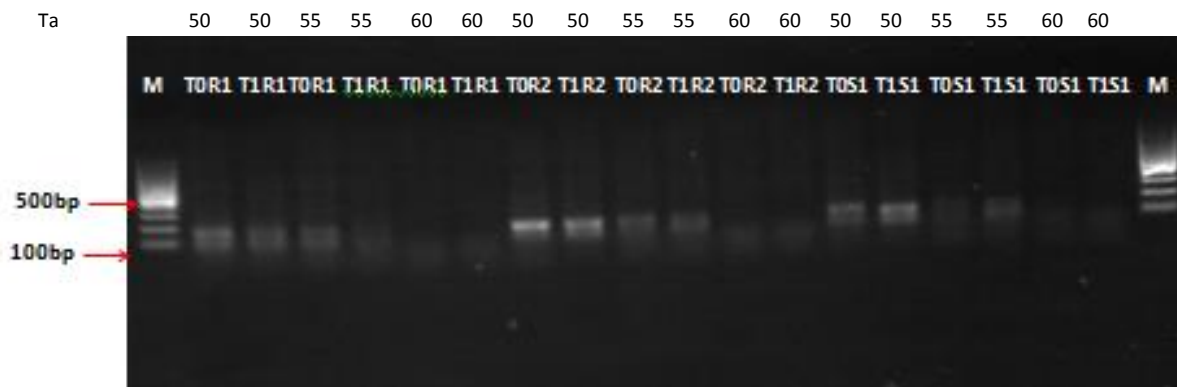
13. Amplificación con PAR1:



Con el marcador PAR1, se observa amplificación de 1 sola banda en todos los individuos evaluados. En cuanto a la diferencia de las intensidades de las bandas, se observa mayor intensidad de bandas en las muestras estresadas vs muestras control.

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 55°C, ya que a esa temperatura los individuos amplifican bandas nítidas.

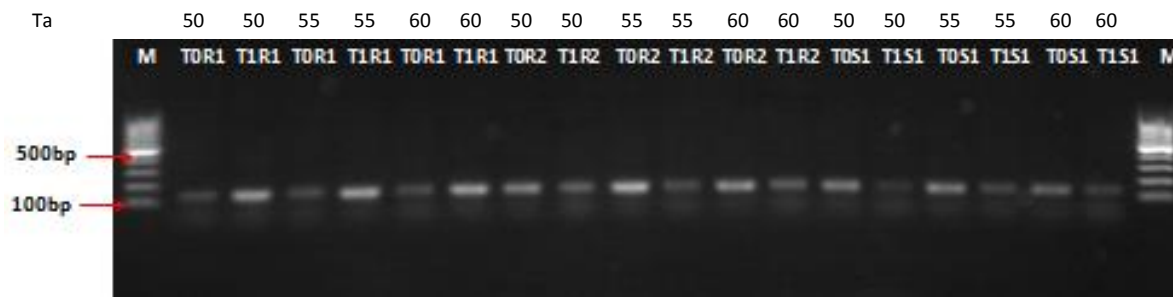
14. Amplificación con VQR1:



Con el marcador VQR1, se observa amplificación de 2 bandas en todos los individuos evaluados. En ambas variedades tolerantes se reporta mayor intensidad en las muestras control vs muestras estresadas, comportamiento contrario se observa en las variedades susceptibles.

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 50°C, se muestran bandas nítidas a esta temperatura.

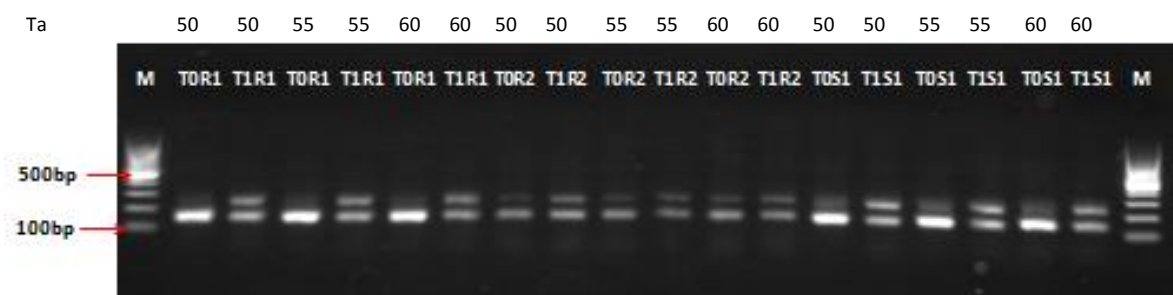
15. Amplificación con WRR:



Con el marcador WRR, se observa amplificación de 1 sola banda en todos los individuos evaluados. Además se evidencia diferencias en la intensidad de bandas entre los tiempos evaluados, la intensidad es mayor en la temperatura de estrés en la primera variedad evaluada (Yana Manwa, tolerante), sin embargo en las otros dos individuos se puede observar un comportamiento contrario.

En cuanto a la temperatura de annealing, para este marcador se elige la temperatura de 55°C, ya que a esa temperatura los individuos amplifican bandas nítidas.

16. Amplificación con WWR:



Con el marcador WWR, se observa amplificación en todos los individuos evaluados, sin embargo, se observa un comportamiento similar que con el marcador LEAR1, presencia de dos bandas en el tiempo de estrés para todos los individuos evaluados.

CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un set de marcadores partiendo de datos previos evaluadas en las muestras biológicas del presente proyecto.
- Se reportan marcadores moleculares que amplificaron más de una banda, lo cual podría deberse a eventos de *splicing* alternativo.
- De todos los marcadores desarrollados, los que presentaron mejor comportamiento fueron los siguientes: LEAR1, NDPR1, PAR1 y WWR1, debido a la fácil la detección de las diferencias de expresión entre las variedades tolerantes y susceptible, tan sólo con la visualización en los geles de agarosa.

RECOMENDACIONES

- Se requiere una colección grande de variedades de papa correctamente fenotipadas, en las cuales se pueda replicar la exposición al frío y así conocer el intervalo de confianza para la identificación de la expresión diferencial entre las variedades tolerantes y la susceptible.
- Se recomienda secuenciar las regiones no codificantes de los genes seleccionados, con el fin de comprobar la existencia de las diferencias entre las regiones promotoras para desarrollar marcadores de ausencia y presencia y ya no usar marcadores cuantitativos.