



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

FECHA DE PRESENTACIÓN: Febrero 2010

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

DEPARTAMENTO/PROGRAMA: Dpto. Biotecnología/Programa de Maíz

PROYECTO: Seguridad alimentaria- Maíz-Biotecnología

ACTIVIDAD: Caracterización molecular de la colección núcleo de maíz de altura del INIAP mediante marcadores moleculares microsatélites

UBICACIÓN: Estación Experimental Santa Catalina

AUTOR: Egda. Ana Dolores Garrido Haro

COAUTORES: Ing. Carlos Yáñez
Dr. Eduardo Morillo

FECHA DE INICIO: 2010-02-03

FECHA DE TERMINACIÓN: 2010-10-30

FUENTE DE FINANCIAMIENTO:

| | |
|---------|------|
| INIAP | 75 % |
| Tesista | 25 % |

PRESUPUESTO: 11.912,77 USD

1.- ANTECEDENTES

El Ecuador es conocido por ser uno de los países con mayor diversidad genética por unidad de superficie. Actualmente, se han reconocido 29 razas de maíz, de las cuales 17 pertenecen a la Sierra. El cultivo de maíz es uno de los más importantes en la Sierra ecuatoriana, debido principalmente a una amplia área dedicada a su producción y por ser un componente básico de la dieta de la población (INIAP, 2000).

El INIAP dispone de una colección de germoplasma de maíces de altura (>2200 msnm), en el banco base del DENAREF, se conservan 1056 accesiones de maíz provenientes de la Costa, Sierra, Oriente y otros países. De estas colecciones 760 corresponden a materiales colectados a lo largo de la Sierra ecuatoriana (Yáñez *et al*, 2003).

Para una mejor utilización de la diversidad del maíz de altura en el año 2003 el Programa de maíz en colaboración con el CIMMYT, estableció una colección núcleo o *core collection*, que se la define como un set limitado de accesiones derivada de una colección de germoplasma, esta sirve para representar la variabilidad genética del total de la colección (Hodgkin *et al*, 1995).

Para la selección de la colección núcleo se tomo en cuenta 13 variables las cuales fueron: nueve continuas, días a la floración femenina, días a la floración masculina, número de hileras de grano en la mazorca, altura de planta, altura de la mazorca más alta, acame de raíz, acame de tallo, longitud de la mazorca, diámetro de la mazorca; y cuatro variables discretas, daño de la mazorca a la cosecha, forma de la mazorca superior, tipo de grano y color de grano. La agrupación de las accesiones se la realizó mediante el método Ward-ML y las accesiones se las seleccionó aleatoriamente. En las agrupaciones obtenidas se observa una clara distribución de acuerdo al tipo y color de grano y origen de colecta. Un total de 140 accesiones, que representa el 20 % de la colección original, forman parte del *core* y mantienen las características de la distribución geográfica, tipo y color de grano, y está representando además, a todas las provincias y razas pertenecientes a la sierra ecuatoriana, cubriendo en su totalidad la variabilidad de la colecta original (Yáñez *et al*, 2003).

El Programa de Maíz y el departamento de Biotecnología han realizado análisis moleculares de 185 materiales de maíz de altura. Las técnicas utilizadas para dichos análisis moleculares fueron: RAPDS y MICROSATELITES, ambas derivadas de la técnica PCR, podemos mencionar: "Caracterización morfológica y molecular, de cuarenta y siete accesiones de maíz duro de altura de la zona andina ecuatoriana" (Vasco, 2000), "Evaluación morfológica y molecular de cuarenta y ocho accesiones de maíz harinoso de altura" (Sánchez, 2002); los mismos que se realizaron con RAPDS como marcadores moleculares. En estos estudios se determinó que usando esta técnica, en general al comparar las agrupaciones obtenidas en la fase de campo con el obtenido en la fase de laboratorio, estas no se relacionan mayormente, esto se aduce a la naturaleza dominante del marcador molecular lo que no muestra en su totalidad la información molecular que se requiere. Otros proyectos realizados son: "Evaluación y caracterización morfológica y molecular por microsatélites de algunos genotipos de maíz de altura" (Morales, 2003) y "La caracterización molecular y análisis químico nutritivo de 27 accesiones de maíz chulpi y 65 accesiones de maíz negro colectados en la serranía del Ecuador" (Jacho, 2008), usando microsatélites como marcadores moleculares, en estos estudios se

determinó que los microsatélites constituyen excelentes marcadores por ser codominantes, lo que permite identificar individuos homo y heterocigotos, por consiguiente la riqueza alélica de las accesiones estudiadas, permitiendo ampliar el conocimiento del maíz de altura y la comprensión más profunda de sus propiedades, semejanzas, diferencias e interrelaciones. (Jacho, 2008).

Los SSRs constituyen excelentes marcadores genéticos por ser codominantes y multialélicos que cubren totalmente el genoma (Karp, A. *et al.*, 1997). La amplificación de las secuencias microsatélites y su posterior resolución, permiten obtener una identificación del individuo para los loci analizados. La identificación del individuo queda descrita por el conjunto total de alelos obtenido para cada uno de ellos, llamado patrón alélico. La comparación de patrones alélicos, permite establecer grupos de individuos con características génicas similares (Moctezuma, E.; Günter Kahl, 2000).

2. JUSTIFICACION

Para la evaluación genética de la colección núcleo de maíz de altura del INIAP, se propone el uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR), por sus características codominantes y su alta capacidad de detectar polimorfismos para discriminar el parentesco genético entre accesiones o variedades.

La caracterización molecular de la colección núcleo de germoplasma de maíz es un complemento a la caracterización morfoagronómica realizada anteriormente y es importante porque permite conocer, depurar y organizar los materiales, sobre todo identificar accesiones valiosas para ser usados directamente, o en los programas de mejoramiento genético. Por lo tanto, un buen sistema de conservación y de caracterización de Bancos de Germoplasma es vital para tener información disponible de cada entrada sobre caracteres cualitativos y cuantitativos de importancia económica actual o futura.

Los resultados obtenidos de la caracterización molecular por microsatélites permitirán estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre las accesiones e identificar material élite para fines de fitomejoramiento. Este conocimiento servirá para la utilización de recursos fitogenéticos en el Programa de Maíz del INIAP.

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar la variabilidad genética de la colección núcleo de maíz de altura del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP a través de marcadores moleculares microsatélites (SSRs).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar la diversidad alélica de 140 accesiones de maíz de la colección núcleo del Banco Nacional de Germoplasma utilizando al menos 10 SSRs polimórficos.

- Estimar el nivel de heterocigosidad y polimorfismo de la colección núcleo nacional de maíz.
- Establecer materiales representativos de la diversidad genética de la colección núcleo de maíz.

4. HIPÓTESIS

Ho: Los marcadores moleculares microsatélites no revelan diversidad genética entre las diferentes accesiones de la colección núcleo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Material vegetal

Se analizarán 140 accesiones de maíz, conservadas en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP de la Estación Experimental Santa Catalina (Anexo 1).

5.1.2. Material de laboratorio, reactivos, equipos

Los materiales de laboratorio, reactivos y equipos que se utilizaran para la desinfección, germinación, extracción, cuantificación de ADN, amplificación y electroforesis se detallan en el (Anexo 2).

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Características del laboratorio

La caracterización molecular se realizará en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, INIAP.

5.2.2 Características del sitio experimental¹

| | |
|-----------|--------------|
| Provincia | : Pichincha |
| Cantón | : Mejía |
| Parroquia | : Cutuglagua |
| Altitud | : 3058m |

¹ Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Izobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), 2007.

5.2.3 Manejo específico del experimento

5.2.3.1 Desinfección de semillas, germinación y emergencia

Se utilizará el protocolo de desinfección utilizado en los laboratorios de cultivos de tejidos para desinfección del DENAREF de semillas, el cuál se detallará a continuación:

1. Lavar las semillas con agua destilada y jabón líquido, y posteriormente enjuagarlas.
2. Introducir las semillas en una solución de hipoclorito de sodio 3%, durante un periodo de 3 a 5 minutos.
3. Sacarlas y enjuagar con alcohol durante 1 minuto.
4. Finalmente lavarlas con agua estéril 5 veces y posteriormente se procede a colocarlas en cajas petri debidamente etiquetadas con la referencia de la accesión y la fecha.

Para los procesos de germinación y emergencia, las semillas una vez tratadas se colocarán en pilones de cien orificios con papel filtro autoclavados y serán regadas diariamente con agua a las siguientes condiciones:

- Temperatura promedio: $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Humedad relativa : 80%

5.2.3.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN de maíz se realizará una vez germinada la semilla y desarrollados los primeros primordios foliares. Para la extracción de ADN se utilizará el protocolo detallado en el anexo 3.

5.2.3.3 Genotipaje de SSR

Se probarán 22 primers microsatélites disponibles en el Laboratorio Biotecnología Molecular, recomendados y probados en estudios de microsatélites (Morales, 2003), de estos serán seleccionados los más informativos en el germoplasma en estudio. Se utilizará la metodología del M13-tailing que consiste en añadir a uno de los *primers* una secuencia M13 para marcar las moléculas por fluorescencia y detectarlas a través de dos canales de detección (en 700 y 800 nm), sistema adaptado al secuenciador LI-COR 4300S (IR2; LI-COR Biosciences. Para la preparación del gel se emplearán 25 ml de 6.5% KB Gel Matrix LI-COR, 187.5 μl de APS 10 % y 18.7 μl de Temmed (NNNN-Tetramethylethylene-diamine 99%). Luego se verterá el gel en placas de vidrio previamente preparadas de acuerdo a los manuales de LI-COR. Se colocará el gel en el LI-COR y se iniciará una pre-corrída de 25 min. a 1500V para realizar el focus del laser a 700 y 800nm. Posteriormente se realizará la carga de 1 μl de productos SSR, previamente denaturados a 94°C por 5 min y diluidos 1:2 con Blue Stop Solution LI-COR, y se iniciará la corrida a 1500V por 2h y media. Finalizada la corrida, LI-COR crea y almacena las imágenes del gel en archivos formato TIF (una para 700nm y otra para 800nm) para su importación al asistente de lectura SagaMX AFLP®. Este software permite

registrar los genotipos minimizando el error de lectura y la ambigüedad de bandas.

5.2.3.4 Análisis estadístico

El software SAGA GT-SSR es un asistente de lectura de las imágenes proporcionadas por el LI-COR. La matriz de datos obtenidos de SAGA es importada a EXCEL para su traslado a varios paquetes estadísticos, entre ellos Genetix, Power Maker, Microsatellite, FSTAT y NTSYS. Entre los parámetros de diversidad a determinarse mencionemos: porcentaje de loci polimórficos, riqueza alélica, número efectivo de alelos, parámetros F (índice de fijación F_{is} y de diferenciación genética entre poblaciones) y diferenciación genética (F_{st}). Adicionalmente se realizarán análisis de agrupamiento o *Cluster analysis* y multivariados: análisis de coordenadas principales (PCO) y análisis factorial de correspondencias (AFC).

6. CRONOGRAMA

| ACTIVIDAD | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 |
|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Revisión Bibliográfica | X | | | | | | | | |
| Germinación de semillas | X | | | | | | | | |
| Extracción y cuantificación de ADN | | X | X | | | | | | |
| Screening y selección de SSR | | | | X | | | | | |
| Estandarización de genotipaje SSR | | | | X | | | | | |
| Genotipaje SSR | | | | | X | X | | | |
| Registro de datos | | | | | | X | X | | |
| Análisis estadístico e interpretación | | | | | | | X | X | |
| Redacción de tesis | | | | | | | X | X | X |

7. PRESUPUESTO

A continuación se presenta cuadro presupuestado por rubro o etapa de trabajo.

RUBRO: Recurso humano

| Técnico | Costo mensual | Meses | Total |
|----------|---------------|-------|--------|
| Egresado | 323.85 | 9 | 2914.5 |

CARACTERIZACION MOLECULAR

| ACTIVIDAD O PROCESO | Costo unitario | Cantidad | Total |
|---|----------------|-----------------|---------|
| Extracción ADN, método convencional (1-18 muestras) | 15 | 8 | 120,00 |
| Cuantificación ADN (1-20 muestras) | 15 | 7 | 105,00 |
| Genotipaje SSR Método M13-Tailing | 2,46 | 2100 Reacciones | 5166,00 |
| Corrida LI-COR 4300s | 56 | 45 | 2520,00 |

| | |
|---|----------------|
| Estandarización Genotipaje SSR Método M13-Tailing | 150 |
| TOTAL | 8061,00 |

ELABORACIÓN DEL DOCUMENTO FINAL

| ACTIVIDAD | Unidad | Cantidad | \$/Unit USD | \$/Total USD |
|-------------------------------|--------|----------|-------------|------------------|
| Fotocopias, impresión y otros | hojas | 500 | 0,5 | \$ 250,00 |
| Empastados. | und | 6 | 20 | \$ 120,00 |
| TOTAL | | | | \$ 370,00 |

RESUMEN DE PRESUPUESTO PARA EL PROYECTO

| RUBRO O ETAPA | COSTO (USD) | APORTE |
|-----------------------------|-----------------|----------------------|
| Recurso humano | 2914.5 | Tesista |
| Caracterización molecular | 8061,00 | Biotecnología y Maíz |
| Elaboración documento final | 370,00 | Biotecnología y Maíz |
| Subtotal | 11345,5 | |
| Imprevistos (5%) | 567.27 | Biotecnología y Maíz |
| COSTO TOTAL | 11912.77 | |

RESUMEN DE FINANCIAMIENTO

| FUENTE DE FINANCIAMIENTO | Aporte |
|---|-------------|
| INIAP (Dpto. de Biotecnología y Programa de maíz) | 75% |
| Tesista | 25% |
| TOTAL | 100% |

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hodgkin, T.; Brown, A.; Hintum, J.; Morales, A. 1995. Core Collections of Plants Genetic Resources. IBPGR. Rome, Italy.
2. Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF) 2007. Protocolos de laboratorio de semillas. Ecuador. s.n.p.
3. INIAP. 2000. manejo Integral de Recursos Genéticos de Maíz en la Sierra del Ecuador. Quito-Ecuador. INIAP-PROMSA. pp 4-8.
4. Jacho A. 2008. Caracterización Molecular y Análisis Químico Nutritivo de 27 accesiones de maíz (*Zea mays l.*) chulpi y 65 accesiones de maíz negro colectados en la serranía del Ecuador, usando microsatélites

- como marcadores moleculares. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias: Universidad Central del Ecuador.
5. Moctezuma, E., & K. Günter. 2000. Huellas de ADN en genomas de Plantas (Teoría y protocolos de Laboratorio). México DF. pp 7-21 99-111.
 6. Morales, K. 2003. Evaluación y Caracterización Morfológica y Molecular por microsatélites de genotipos de maíz (*Zea mays L.*) de altura. INIAP, PICHINCHA, ECUADOR. Tesis de grado. Doctora en Biología. Facultad de Filosofía, Letras y Ciencias de la Educación. Escuela de Biología y Química. Universidad Central del Ecuador.
 7. Morillo, E. 2002. Protocolos de Marcadores Moleculares. Departamento Nacional de Recursos Filogenéticos y Biotecnología (DENAREF). Estación Experimental "Santa Catalina".
 8. Sánchez, V. 2002. Evaluación y Caracterización morfológica y molecular mediante RAPDS de maíz harinoso de altura. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias: Universidad Central del Ecuador.
 9. Vasco, C. 2000. . Evaluación y Caracterización Morfológica y Molecular mediante RAPDS de Maíz Duro de Altura. Tesis de grado. Doctora en Biología. Facultad de Filosofía, Letras y Ciencias de la Educación. Escuela de Biología y Química. Universidad Central del Ecuador.
 10. Yanez, C.; Zambrano, J.; Caicedo, M.; Sánchez, H.; Herediat, J. 2003. Catálogo de Germoplasma de Recursos Genéticos de Maíces de Altura Ecuatorianos. Programa de Maíz. EESC-INIAP. Quito, Ecuador.

ANEXOS

Anexo 1. Datos de la colección núcleo de *Zea mays*.

| Nº | Accesion | Raza |
|----|-----------|----------------------|
| 1 | ECU-8826 | Chaucho |
| 2 | ECU-8828 | Mishca |
| 3 | ECU-8845 | Blanco blandito |
| 4 | ECU-8846 | Blanco blandito |
| 5 | ECU-8851 | No identificada |
| 6 | ECU-11303 | Mishca |
| 7 | ECU-11304 | Cuzco ecuat |
| 8 | ECU-11311 | Sabanero |
| 9 | ECU-11323 | Mishca |
| 10 | ECU-11333 | Chillos |
| 11 | ECU-11338 | Mishca |
| 12 | ECU-11345 | Morochón |
| 13 | ECU-11349 | Chillos |
| 14 | ECU-11359 | Cuzco ecuat. |
| 15 | ECU-11375 | Morochón |
| 16 | ECU-12099 | Montaña |
| 17 | ECU-12128 | Kcello |
| 18 | ECU-12151 | Cuzco ecuat. |
| 19 | ECU-1639 | No identificada |
| 20 | ECU-1690 | Chulpi |
| 21 | ECU-1691 | Morochón |
| 22 | ECU-2495 | Cuzco ecuat. |
| 23 | ECU-8799 | Blanco blandito* |
| 24 | ECU-8808 | Blanco blandito* |
| 25 | ECU-12122 | Sabanero |
| 26 | ECU-12124 | Patillo |
| 27 | ECU-12127 | Blanco blandito |
| 28 | ECU-12149 | Canguil |
| 29 | ECU-12157 | Huandango |
| 30 | ECU-12488 | Chillos |
| 31 | ECU-12501 | Morochón |
| 32 | ECU-12515 | Morochón |
| 33 | ECU-12519 | Sabanero |
| 34 | ECU-12669 | Chaucho |
| 35 | ECU-12695 | No identificada |
| 36 | ECU-12711 | No identificada |
| 37 | ECU-12746 | Blanco blandito |
| 38 | ECU-1669 | Blanco harin dentado |
| 39 | ECU-12135 | Chillos |
| 40 | ECU-12141 | Cónico dentado |
| 41 | ECU-12492 | Sabanero |
| 42 | ECU-12670 | Morochón |
| 43 | ECU-12679 | Cuzco ecuato. |
| 44 | ECU-12681 | Cuzco ecuat. |
| 45 | ECU-12682 | Morochón |
| 46 | ECU-12688 | Cuzco ecuat. |
| 47 | ECU-12697 | Mishca |

| | | |
|----|-----------|----------------------|
| 48 | ECU-12699 | Mishca |
| 49 | ECU-12718 | Cuzco ecuat. |
| 50 | ECU-12739 | Cuzco ecuat. |
| 51 | ECU-12743 | No identificada |
| 52 | ECU-12757 | Cuzco ecuat. |
| 53 | ECU-12759 | No identificada |
| 54 | ECU-12761 | Mishca |
| 55 | ECU-1523 | Canguil |
| 56 | ECU-1533 | Canguil |
| 57 | ECU-1534 | Sabanero |
| 58 | ECU-1537 | Morochón |
| 59 | ECU-1626 | Sabanero |
| 60 | ECU-1627 | Sabanero |
| 61 | ECU-8778 | No identificada |
| 62 | ECU-8785 | No identificada |
| 63 | ECU-8812 | Mishca |
| 64 | ECU-8853 | Mishca |
| 65 | ECU-11028 | No identificada |
| 66 | ECU-11032 | Morochón |
| 67 | ECU-11320 | Chulpi |
| 68 | ECU-11379 | Chulpi |
| 69 | ECU-12518 | No identificada |
| 70 | ECU-12685 | No identificada |
| 71 | ECU-12698 | Canguil |
| 72 | ECU-12729 | Morochón |
| 73 | ECU-1500 | Racimo |
| 74 | ECU-1542 | Uchima |
| 75 | ECU-1570 | Chaucho |
| 76 | ECU-1586 | Blanco harin dentado |
| 77 | ECU-1590 | Cuzco ecuat. |
| 78 | ECU-1599 | Huandango |
| 79 | ECU-1606 | Cónico dentado |
| 80 | ECU-1634 | Huandango |
| 81 | ECU-1673 | No identificada |
| 82 | ECU-1684 | Blanco blandito |
| 83 | ECU-1686 | Blanco blandito |
| 84 | ECU-3566 | Chillos |
| 85 | ECU-7203 | Mishca |
| 86 | ECU-7309 | Huandango |
| 87 | ECU-7311 | No identificada |
| 88 | ECU-11395 | Blanco blandito |
| 89 | ECU-12106 | Sabanero |
| 90 | ECU-12111 | Mishca |
| 91 | ECU-12125 | Patillo |
| 92 | ECU-1496 | Bianco blandito |
| 93 | ECU-1506 | Uchima |
| 94 | ECU-1662 | No identificada |
| 95 | ECU-1688 | No identificada |
| 96 | ECU-2494 | Racimo |
| 97 | ECU-8837 | Mishca |
| 98 | ECU-8840 | Blanco blandito |
| 99 | ECU-11397 | Clavito |

| | | |
|-----|-----------|----------------------|
| 100 | ECU-11014 | Blanco blandito |
| 101 | ECU-11021 | Blanco blandito |
| 102 | ECU-11299 | Mishca |
| 103 | ECU-11322 | Sabanero |
| 104 | ECU-11347 | Blanco blandito |
| 105 | ECU-11348 | Sabanero |
| 106 | ECU-11351 | Mishca |
| 107 | ECU-11352 | Mishca |
| 108 | ECU-11382 | Mishca |
| 109 | ECU-12741 | Cuzco ecuat. |
| 110 | ECU-12744 | Cuzco ecuat. |
| 111 | ECU-1507 | Morochón |
| 112 | ECU-1511 | Canguil |
| 113 | ECU-1514 | Tusilla |
| 114 | ECU-1548 | No identificada |
| 115 | ECU-1602 | Huandango |
| 116 | ECU-1613 | Blanco blandito |
| 117 | ECU-1615 | Uchima |
| 118 | ECU-1637 | Morochón |
| 119 | ECU-1641 | No identificada |
| 120 | ECU-1650 | No identificada |
| 121 | ECU-1652 | No identificada |
| 122 | ECU-1653 | No identificada |
| 123 | ECU-2190 | Huandango |
| 124 | ECU-11386 | Morochón |
| 125 | ECU-1505 | Blanco blandito |
| 126 | ECU-1528 | Mishca |
| 127 | ECU-1604 | Huandango |
| 128 | ECU-1623 | Mishca |
| 129 | ECU-1680 | Mishca |
| 130 | ECU-2209 | Blanco harin dentado |
| 131 | ECU-7204 | No identificada |
| 132 | ECU-7206 | Huandango |
| 133 | ECU-7300 | Chaucho |
| 134 | ECU-7307 | Huandango |
| 135 | ECU-7320 | No identificada |
| 136 | ECU-7333 | Racimo |
| 137 | ECU-8780 | No identificada |
| 138 | ECU-8796 | Blanco blandito * |
| 139 | ECU-8809 | Blanco blandito* |
| 140 | ECU-12121 | Mishca |

* Material de la raza Blanco Blandito del tipo Guagal.

Anexo 2. Reactivos, equipos y materiales necesarios para el presente estudio.

- **Desinfección y germinación de semillas.**

| Reactivos | Equipos e Instalaciones | Materiales |
|---|--------------------------------|---|
| Hipoclorito de sodio al 3% Alcohol 75% Agua estéril | Invernadero | Cajas petri Papel filtro Vasos de precipitación Pinzas Papel aluminio Sustrato Fundas |

- **Extracción de ADN y cuantificación, amplificación, elaboración, corrida y revelado de geles.**

| Reactivos | Equipos e Instalaciones | Materiales |
|--|--|--|
| Tris HCl NaCl EDTA PH8,0,5M PVP CTAB B-mercaptoetanol CIA Etanol Tris/EDTA Bromuro de etidio Blue juice Agarosa TAE MgCl ₂ 10XPCR buffer dNTP's Primers Taq polimerasa Agua ultrapura Aceite mineral Marcador de peso molecular Acrilamida/Bisacrilamida | Baño maría Centrifuga Vórtex Refrigerador Transiluminator UV Termociclador Cámaras electroforéticas Agitador Estufa Sorbona Balanza analítica ADN Analyzer LI-COR 4300S | Papel filtro Tubos eppendorf 1.5 Hielo Maceradores Puntas 1 ml, 200 µl y 1000 µl Papel parafilm Pipetas Papel absorbente Placas de vidrio Separadores, Peines |

| | | |
|---------------------------------|--|--|
| Buffer TBE 10 X APS TEMED | | |
|---------------------------------|--|--|

Anexo 3. Protocolo de extracción, cuantificación de ADN y amplificación

Protocolo de extracción y cuantificación de ADN

Colombo (Morillo, 2002).

- Buffer de extracción CTAB 1X (para 100 ml)

| Reactivo | Concentración | Cantidad |
|-------------------|---------------|----------|
| Tris HCl pH 8, 1M | 200 mM | 20 ml |
| NaCl 5M | 1.7 M | 34 ml |
| EDTA pH 8, 0.5M | 10 mM | 2 ml |
| CTAB | 1 % | 1 g |
| PVP | 1% | 1 g |

- Cloroformo alcohol isoamílico CIA (24:1)
- Para 100 ml
96 ml cloroformo (Triclorometano)
4 ml alcohol isoamílico
- Etanol/10 mM de acetato de amonio
Para 100 ml
79 ml de etanol 96%
8 ml de Acetato de sodio 2.5 M (pH 5)
13 ml de agua

Etanol Acetato de amonio
Para 100 ml
79 ml de etanol 100%
1 ml de acetato de amonio 1M
20 ml de agua

Desarrollo:

1. Precalear el baño maría a 65°C.
2. Agregar 100 µl de buffer de extracción en un tubo eppendorf y colocar la muestra fresca
3. Añadir una pizca de meta bisulfito de sodio y empezar a triturar las muestras con la ayuda de un pistilo hasta obtener una pasta homogénea
4. Añadir 650 µl de buffer de extracción precalentado más 12 µl de mercaptoetanol
5. Incubar a baño maría por 1 hora, agitando cada 30 minutos.
6. Agitar nuevamente en vortex y centrifugar a 13000 rpm por 10 min.
7. Sacar el sobrenadante a un tubo nuevo y aforar las muestras con buffer de extracción a 750 µl, añadir 750 µl de CIA (24:1)
8. Agitar fuertemente y dar un vortex hasta que las dos fases sean homogéneas
9. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, aforar las muestras con buffer de extracción a 750 µl, añadir 750 µl de CIA (24:1)

11. Agitar fuertemente y dar un vortex hasta que las dos fases sean homogéneas
12. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos
13. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 750 µl de Etanol 100% mezclar suavemente. Invertir los tubos para mezclar completamente el contenido. Deberá verse como unos hilos o pelotilla (en caso contrario, se ponen las muestras por 15 a 30 minutos a -20 °C)
14. Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos
15. Eliminar el etanol y añadir 300 µl de etanol acetato de sodio por 5 minutos
16. Eliminar el sobrenadante y añadir 200 µl de etanol acetato de amonio, eliminar rápidamente el sobrenadante
17. Dejar secar boca abajo y colocar en la micro estufa por media hora hasta que se haya eliminado completamente el olor a etanol
18. Resuspender el pellet de DNA dependiendo de su tamaño en 100, 200 o 300 µl de TE 0.1X (Tris – HCl 1mM, EDTA 0.1 mM, pH 8) incubando a 65°C por una hora. Se puede conservar a 4°C por pocos días o a 20°C a largo plazo.
19. Para descartar el RNA existente en la solución de ADN digerir con RNAasa (10 µg/ml) por cada 100 µl de ADN se coloca 1 µl de RNAasa. Dar un vortex y un punto de centrifuga. Colocar en la micro estufa por media hora aproximadamente.
20. Conservar el ADN a 4 °C.
21. Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%

Cuantificación del ADN

La concentración de ADN será analizado por electroforesis en geles de agarosa 1% en tampón TAE 1X y cuantificado comparativamente utilizando el estándar ADN *Low Mass Ladder* y un fluorímetro. La electroforesis se realizará a 100 V por 35 min. Sobre la base de estas determinaciones, la concentración de ADN de cada una de las accesiones se estandarizará en tampón TE 0,1M hasta lograr una concentración final de 5 ng/µl.

Genotipificación mediante microsatélites

El proceso de genotipificación de las muestras incluye los siguientes pasos: amplificación vía PCR utilizando microsatélites, electroforesis en geles de acrilamida, tinción de los geles con nitrato de plata y amplificación de microsatélites vía PCR-IRD.

▪ **Amplificación vía PCR:**

La cuantificación del ADN genómico se la realizará en geles de agarosa al 1% en solución tampón TAE 1X y teñidos con bromuro de etidio. Las muestras serán cuantificadas utilizando el marcador de peso molecular Standard DNA Low Mass Ladder (10068-013 GIBCO BRL). En base a la estimación de la concentración, se realizará la dilución de las muestras de ADN a una concentración de 5 ng/µl para los ensayos de amplificación.

Para la amplificación de ADN se utilizará el cóctel de reacción del siguiente cuadro.

Cuadro 1: Cóctel de reacción para amplificación PCR

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|-----------------------------|----------|---------------------|
| DNA (5 ng/ul) | 4 µl | 20 ng |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0.72 µl | 2 mM |
| 5X PCR buffer | 1.8 µl | 1X |
| Dntp`s (5 mM) | 0.45 µl | 0.25 mM |
| Iniciador F+R (20mM) 1 | 1.8 µl | 4µM |
| Iniciador F+R (20mM) 2 | 1.8 µl | 4µM |
| Taq GoTaq 5 U/µl Promega | 0.054 µl | 0.03 U/µl |
| Agua | - | - |
| Volumen final | 9 µl | |

Las mezclas de reacción se cubrirán con una gota de aceite mineral y se amplificarán en un termociclador M.J. PTC-100. El programa de amplificación consistirá de: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min; 30 ciclos de desnaturalización cíclica a 94°C por 45 seg; 45 seg de anillamiento a 56°C; 1 min de elongación cíclica a 72°C; y un ciclo final de elongación a 10°C por 5 min (Morillo, 2002).

Los productos de amplificación se controlarán en geles de agarosa al 2% y posteriormente serán visualizados en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata.

▪ **Amplificación vía PCR-IRD**

Con los primers seleccionados, se marcarán con fluorescencia, en 700 o 800 nm mediante el método M13 Tailing (Ref. M13-Tailing Foward (-29) IRDye 829-05565), que consiste en incorporar la secuencia del primer M13 (5'CACGACGTTGTAACGAC3') al extremo inicial 5' del primer forward microsatélites para que los productos de amplificación sean detectados por los lectores láser del "Secuenciador Automático de ADN Analycer Li-cor 4300 (Li-cor, Lincoln, NE, USA), donde se realizara el genotipaje de las imágenes obtenidas por el software SAGA GT – microsatélites (Li – Cor Inc; NE, USA, ref. 46539), de aquí se deberá adquirir la matriz "base" con el tamaño de los alelos, en donde se determinará individuos homocigotos, heterocigotos y las tallas de los alelos.

Cuadro 2. Cóctel de reacción para amplificación con microsatélites para LICOR con el método M13 _Tailing SSR

Preparar una solución con los siguientes reactivos de acuerdo al número de muestras:

| Reactivo | Cantidad |
|---------------------------|-----------------|
| DNA (5 ng/μl) | 1 ul |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1 ul |
| 5X PCR buffer | 0,5 ul |
| dNTP's (10 mM) | 0,2 ul |
| M-13 tailing 700/800 | 0,5 ul |
| Primer F- M13 (1 μM) | 0,05 ul |
| Primer R (10 uM) | 0,08 |
| Taq polimerasa 5 u/μl | 0.5 ul |
| Agua | 1,62 ul |
| Total | 5 ul |

2. Dispensar en cada tubo eppendorf 5ul del mix preparado, añadir 10 μl de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.
3. Amplificar las muestras de acuerdo al siguiente protocolo por vía PCR normal.
4. Visualizar los fragmentos amplificados en un gel de agarosa 2% utilizando siempre un marcador de peso molecular.
5. Si se visualiza en el gel de agarosa, se utilizara el marcaje de primers con fluorescencia IRD a 700 y 800nm para la visualización de productos de amplificación en un secuenciador LI-COR modelo 4300S. (Morillo, 2002).