

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)
Estación Experimental Santa Catalina
Departamento Nacional de Biotecnología

“MARCADORES MOLECULARES EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA: MANUAL DE TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EN INIAP”



AUTORES:
Eduardo Morillo Velasteguí
Gabriela Miño Castro

Sobre los autores:

Luis Eduardo Morillo Velasteguí

Biólogo de la Pontificia Universidad Católica de Quito con maestría y doctorado de la Escuela de Biología Integrativa de Montpellier, Francia. Investigador especializado en técnicas moleculares con más 15 años de experiencia en temas de caracterización de recursos genéticos. Implementó procesos de genotipificación semiautomatizado de ADN con marcadores SSRs y AFLPs en el laboratorio de Biología Molecular de la Estación Experimental Santa Catalina, y actualmente es líder del Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Gabriela Margarita Miño Castro

Ingeniera en Biotecnología de la Escuela Politécnica Superior del Ejército (ESPE). Técnico de laboratorio de Biología Molecular del Dpto. Nacional de Biotecnología en el período 2008 al 2011. Trabajó con genotipificación de ADN con marcadores microsatélites y AFLPs en el LI-COR 4300 S.



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Estación Experimental Santa Catalina

Departamento Nacional de Biotecnología

“MARCADORES MOLECULARES EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA: MANUAL DE TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EN INIAP”

2011



“MARCADORES MOLECULARES EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA: MANUAL DE TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EN INIAP”

Autores:

Eduardo Morillo Velasteguí
Gabriela Miño Castro

Los autores dejan expresado su agradecimiento a los diferentes operadores que han contribuido en la validación, estandarización y compilación de procedimientos en el laboratorio de Biología Molecular de la Estación Experimental Santa Catalina, así como en la revisión y edición de este manual. Un particular reconocimiento a las Dras. Susana Espín, Soraya Alvarado y la Ing. Elena Villacrés, miembros del Comité Técnico de la Estación por sus valiosas sugerencias y observaciones para el mejoramiento de la calidad de la presente publicación. Un especial reconocimiento a la Ing. Johanna Buitrón por su aporte en la revisión y corrección del manual.

Impresión y diseño realizado por IDEAZ

© Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, 2011
Estación Experimental Santa Catalina
Departamento Nacional de Biotecnología
Panamericana Sur Km 1, Cutuglagua, Quito, Ecuador
Teléfono: (593) 3006284
Correo electrónico: biotecnologia.eesc@iniap.gob.ec
Página web: www.iniap.gob.ec

Publicación aprobada en Octubre del 2011

Todos los derechos reservados. Se autoriza la reproducción y difusión de este material contenido en este producto informativo para fines educativos u otros fines no comerciales sin previa autorización escrita de los titulares, de los derechos de los autores, siempre que se especifique claramente la fuente.

Citación correcta de esta publicación:

Morillo E. & Miño G. 2011. "Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP". Manual No. 91 Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina. Quito. 121 p.

ÍNDICE

Página

Presentación.....	VII
SECCIÓN 1: Preparación de muestras	1
1.1 Toma de muestras	3
1.2 Extracción de ADN genómico total de plantas	3
1.2.1 Extracción convencional con agentes químicos	4
1.2.2 Extracción con kit comercial de columnas de purificación	4
1.3 Cuantificación de ADN	5
1.3.1 Cuantificación por fluorescencia.....	5
1.3.2 Cuantificación en fluorómetro	6
SECCIÓN 2: Procedimientos específicos	7
CAPs	11
RAPDs	17
ISSRs	23
SSRs	27
AFLPs	35
Secuenciación de ADN	43
SECCIÓN 3: Interpretación de Resultados	51
ANEXOS	61
GLOSARIO	67
FICHAS TÉCNICAS.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

PRESENTACIÓN

Las aplicaciones de los marcadores moleculares en Biotecnología agrícola son múltiples: estudios de diversidad y variabilidad genética de germoplasma (vegetal, animal o de microorganismos), identificación molecular de especies o variedades, detección y validación de marcadores específicos, diagnóstico molecular, entre otras. La posibilidad de amplificar la tecnología de los marcadores moleculares en cualquier organismo biológico depende inicialmente de la capacidad de extraer su ADN (o ARN) en calidad y cantidad adecuadas de forma rápida y eficiente. En el caso del ADN, existen varios procedimientos de extracción aplicados a plantas y microorganismos; sin embargo, en general estos son adaptados con algunas modificaciones con fines de resolver problemas específicos de la especie en estudio.

El presente documento es una compilación de gran parte de los protocolos que se han probado y validado en los Laboratorios de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB), sede Estación Santa Catalina, para el análisis del polimorfismo del ADN a través del uso de diversas técnicas moleculares como los RAPDs, los ISSRs, los microsatélites (SSRs), los AFLPs y otras técnicas empleadas en rutina.

Este documento busca compilar técnicas y procedimientos del laboratorio como guía para otros laboratorios, técnicos, investigadores y estudiantes interesados en este campo de la biotecnología agrícola.

SECCIÓN 1

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios de polimorfismos genéticos a nivel de ADN, comprenden el análisis de un gran número de individuos. La preparación de la muestra en laboratorio es trascendental para obtener resultados analíticos confiables, por lo tanto, se debe seguir procedimientos adecuados para su procesamiento y almacenamiento. La posibilidad de analizar un gran número de individuos depende inicialmente de la capacidad de extraer su ADN en calidad y cantidad adecuadas de forma rápida y eficiente (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La muestra es una porción de material biológico; en el caso de vegetales pueden ser muestras frescas y secas, mientras que para muestras microbianas en general se aíslan previamente en medios de cultivos específicos, para su crecimiento y posterior procesamiento con liofilización.

1.1 Toma de muestras

Una de las consideraciones más importantes en cualquier procedimiento de extracción de ADN de plantas es la técnica utilizada para coleccionar y preservar el tejido vegetal. Esto se debe tomar en cuenta porque muchos de los tejidos producen metabolitos secundarios o aceites que en general interfieren con la extracción de ADN. Es indispensable que este procedimiento se realice de manera correcta ya que se puede evitar la degradación del tejido vegetal.

El procedimiento a seguir se encuentra detallado en la ficha técnica N° 1.

1.2 Extracción de ADN genómico total de plantas

La extracción del ADN se basa en el uso de agentes químicos que destruyen las membranas nucleares, liberando a la solución los ácidos nucleicos. El paso siguiente consiste en la precipitación de los ácidos nucleicos, y la liberación de éstos en un tampón amortiguador. La extracción del ADN vegetal se

realiza a partir de muestras de tejido, tales como hojas, brotes, primordios foliares, frutos o semillas germinadas, material del que se obtiene una buena cantidad y calidad de ADN (Velasco, 2004).

Para la extracción de ADN en el laboratorio se emplean dos métodos:

- Extracción con protocolos convencionales y agentes químicos
- Extracción mediante el empleo de kits comerciales

1.2.1 Extracción convencional con agentes químicos

La extracción de ADN requiere una serie de etapas básicas: en primer lugar se debe romper la pared celular y la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula. A continuación debe romperse la membrana nuclear para liberar el ADN, para lo cual se emplean diversos reactivos como agentes de extracción en la solución tampón, tales como *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), sorbitol, Potassium Ethil Xantogenato (PEX), y otros, que combinados a la acción de detergentes y antioxidantes, emulsionan los lípidos de las membranas celulares y las rompen permitiendo liberar el ADN de la célula. Entre los agentes de extracción más comunes esta el CTAB, que es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran magnitud molecular, y tiene propiedades detergentes debido a su actividad superficial por la presencia de un ion positivo.

La extracción comprende en general cinco etapas

básicas. En la primera etapa se utiliza una maceración mecánica para romper las paredes y membranas celulares del tejido vegetal. Posteriormente el tejido es resuspendido en un tampón de extracción, que contenga algún detergente y antioxidante, con la finalidad de solubilizar las membranas lipoproteicas y desnaturalizar las proteínas preservando el ADN. Esta suspensión se somete a temperaturas entre 50 y 60 °C durante 20 a 60 minutos para facilitar su solubilización y homogenización. A continuación se somete a una extracción con solventes orgánicos como cloroformo, alcohol isoamílico o fenol. Se observan dos fases, orgánica y acuosa y entre ellas una interfase, en esta son retenidos los lípidos, proteínas y polisacáridos. El ADN es soluble en agua, pero cuando este se encuentra en alcohol, se enrolla y precipita en forma de pequeños hilos. Después de este proceso, se obtiene mediante centrifugación una pastilla blanquecina o *pellet* de ADN, el cual es suspendido en agua estéril o un tampón de dilución para su conservación (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Existen varios protocolos de extracción de ADN genómico, que se encuentran detallados en las fichas técnicas N° 2 - N° 14.

1.2.2 Extracción con kit comercial de columnas de purificación

La extracción con kit comercial es un método rápido para aislar ADN a partir de tejidos vegetales. En el laboratorio se emplea un kit de INVITROGEN® que usa una tecnología avanzada de membranas de silicato para purificar rápidamente ADN celular total sin usar extracciones orgánicas ni precipitación con etanol. El sistema permite una lisis directa

seguida de fijación selectiva de ADN a la membrana. Los contaminantes e inhibidores enzimáticos son removidos por centrifugación. Luego de la lisis, el procedimiento toma unos 20 minutos. Es necesario que se ajuste el pH con amortiguadores para lograr máxima fijación de ADN a la membrana, durante una corta centrifugación. Los contaminantes restantes son removidos en dos lavados y el ADN es diluido en agua ó en tampón amortiguador (PureLink™ Genomic DNA Kits, 2007).

El protocolo de extracción con kit se describe en la ficha técnica N° 15.

1.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN consiste en realizar una estimación de la concentración de los ácidos nucleicos en una solución ó tampón amortiguador. En el laboratorio se emplea de manera rutinaria el método de fluorescencia detectado por electroforesis horizontal. Esta técnica proporciona de una manera rápida y económica una estimación de la cantidad de ADN. Otro método empleado en el laboratorio para cuantificar una muestra de ADN consiste en el uso del fluorómetro, este proporciona un valor más exacto de la concentración de las muestras.

A continuación se detallan los métodos empleados en el laboratorio para la cuantificación de ADN:

1.3.1 Cuantificación por fluorescencia

Este método de cuantificación tiene como base una corrida electroforética horizontal empleando geles

de agarosa complementado con el uso de sustancias intercalantes de ADN, que permiten la visualización del ácido. La estimación de la concentración se realiza mediante la comparación de la fluorescencia de la muestra con un marcador de concentración conocida, adicionalmente, este método permite ver la calidad de la muestra (ADN degradado) y la presencia de impurezas. Otras de las ventajas que se obtiene con este método es la cuantificación de gran cantidad de muestras a un costo relativamente bajo y en cortos periodos de tiempo.

Para este tipo de cuantificación existen diferentes sustancias intercalantes de ADN, a continuación se detallan las empleadas en el laboratorio:

a) Cuantificación de la cantidad de ADN (Doble cadena) mediante fluorescencia con bromuro de etidio

Una rápida forma de evaluar la cantidad y calidad de ADN es utilizando la inducción por luz ultravioleta emitida por las moléculas de bromuro de etidio que se intercalan en el ADN. Esto se debe a que la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN en una muestra, por lo que se compara con marcadores de talla y concentración conocidos permitiendo estimar la concentración. Dependiendo del marcador de referencia se puede detectar mediante este método desde 1 ng/μL de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998). El procedimiento se encuentra detallado en la ficha técnica N° 16.



Precauciones: El bromuro de etidio es un reactivo altamente mutagénico y moderadamente tóxico. Siempre se debe usar doble guante cuando se prepara el stock. Estos guantes se deben eliminar en la basura designada a residuos tóxicos. Después de su uso las soluciones se deben neutralizar con una solución al 50% de cloro. La

radiación ultravioleta es peligrosa, particularmente en los ojos. Para minimizar su exposición fijarse que la placa de protección este bien ubicado y evitar el contacto directo con la luz ultravioleta. Vestirse de forma adecuada con guantes y gafas de protección.

b) Cuantificación por el Método de Syber

Las sondas moleculares de Syber® (Cat. S33102 INVITROGEN) florecen el ácido nucleico, siendo esta una de las técnicas más sensibles para la detección

de ADN de doble cadena en geles de agarosa.

El procedimiento se encuentra detallado en la ficha técnica N° 18.

1.3.2 Cuantificación con fluorómetro

El proceso de cuantificación con fluorómetro consiste en un fluorómetro Qubit (Cat. Q32857 INVITROGEN®) y kits de tecnología Quant-iT. Dichos kits emplean colorantes selectivos que se tornan fluorescentes cuando se unen al ADN, ARN ó proteínas. Estos colorantes son específicos para sus targets y no se acoplan a contaminantes como fenol, sales, cloroformo y/o nucleótidos libres. El resultado es una lectura de fluorescencia que refleja exactamente la cantidad de producto de interés en cuantificar (Qubit® Fluorometer, INVITROGEN).

El procedimiento se encuentra detallado en la ficha técnica N° 17.

SECCIÓN 2

PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS

INTRODUCCIÓN

Un marcador molecular es un fragmento específico de ADN que puede ser identificado en el genoma. Los marcadores moleculares están localizados en lugares específicos del genoma y se usan para “marcar” la posición de un gen en concreto o la herencia de una característica particular. En un cruzamiento genético, las características de interés podrán ser monitoreadas por marcadores moleculares, si estos se encuentran ligados genéticamente a las mismas. Por lo tanto, se pueden seleccionar individuos en los que el marcador molecular esté presente, ya que la presencia del marcador es un indicador de la característica deseada (Velasco, 2004).

En este manual se detallan los procedimientos para el análisis de los siguientes marcadores; y se incluye el proceso para la secuenciación de ADN en ABI-310:

- CAPs
- RAPDs
- ISSRs
- SSRs
- AFLPs

CAPs

(*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*)

1. OBJETIVO

Desarrollar un procedimiento específico para el análisis molecular mediante la técnica de CAPs.

2. ALCANCE

Este procedimiento se basa en la posibilidad de comparar patrones de bandas (polimorfismos) generados mediante la digestión con enzimas de restricción de un fragmento de ADN vegetal o de microorganismos. Los procedimientos detallados para las técnicas de cada marcador molecular indicado son aplicables a cualquier entidad que conforma un Laboratorio de Biología Molecular.

3. GENERALIDADES

Las variaciones en la secuencia nucleotídica del ADN entre individuos de una misma especie se conocen como polimorfismos. La forma más sencilla de evidenciarlo es mediante el uso de enzimas o endonucleasas de restricción. Los RFLPs son variaciones de la longitud de fragmentos de ADN generados por estas enzimas. Las enzimas o endonucleasas de restricción reconocen una secuencia nucleotídica específica de la molécula de ADN y la cortan en ese punto. Estas enzimas fueron descubiertas a mediados de los años setenta y constituyen las llamadas tijeras de la ingeniería genética, hito en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante. Son producidas por las bacterias como forma de defensa frente a la invasión por bacteriófagos. Las más utilizadas en genética molecular reconocen 4 o 6 bases aunque en el genoma es más frecuente encontrar sitios con 4 bases de reconocimiento. El nombre de la enzima proviene de la bacteria de donde fue aislada, por ejemplo: *EcoRI* fue aislada de *Escherichia coli*.

Cuando el ADN es digerido por la endonucleasa de restricción, genera cientos de miles de fragmentos, y su

separación en un campo eléctrico (electroforesis en gel de agarosa. Se obtiene una imagen continua degradada desde el punto de siembra hasta el frente de corrida. Mediante la técnica de *Southern Blot*, se transfieren los fragmentos de restricción de ADN desde el gel a una membrana de nitrocelulosa o *nylon*, y éstos se hibridan con sondas marcadas para identificar el gen de interés y visualizar las bandas polimórficas.

3.1 ABREVIATURAS

RFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
<i>EcoRI</i>	Enzima de restricción del tipo I procedente de <i>Escherichia coli</i>
<i>Taq I</i>	Enzima de restricción del tipo I procedente de <i>Thermus aquaticus</i>
mL	mililitros
µL	microlitros
ng	nanogramos
ppm	partes por millón
BSA	Albumina de suero Bovino
dNTP's	Deoxinucleótidos trifosfatos
27F	Cebador " <i>Forward</i> " llamado: 27
1492R	Cebador " <i>Reverse</i> " llamado: 1492
pb	Pares de bases

3.2 INTERFERENCIAS

No se registran interferencias debido a que el ADN empleado es purificado en columnas de membranas de silicato; además, se realiza una validación previa de la calidad del ADN mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa.

4. DESCRIPCIÓN

4.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

4.1.1 Equipos

Micropipetas
Tubos PCR
Vórtex
Micro centrífuga
Termociclador
Cámara de flujo laminar
Cámara de electroforesis horizontal
Fotodocumentador

4.1.2 Reactivos

Hielo
Tampón 5X (sin cloruro de magnesio)
Agua ultra pura
Cebadores (10 µM)
Taq polimerasa (5 U/µL)
Cloruro de magnesio (25 mM)
dNTP's (5 mM)
Aceite mineral
Albumina de suero bovino (7,5%)
Enzimas de restricción
Azul de parada (*Blue stop*)
Marcador molecular de talla

4.2 PROCEDIMIENTO

4.2.1 CONDICIÓN AMBIENTAL

Los reactivos y muestras de ADN deberán permanecer almacenados a una temperatura de -20 °C y durante todo el procedimiento deben ser mantenidos en hielo. La enzima Taq debe ser mantenida a -20 °C el

mayor tiempo posible, mientras es usada se la debe colocar en hielo e inmediatamente luego de utilizarla es conveniente colocarla nuevamente a - 20°C.

Todo el trabajo debe ser realizado en una cámara de flujo laminar, previamente esterilizada mediante luz UV por 10 minutos, con el objetivo de evitar contaminación.

4.2.2 PREPARACIÓN PCR- RFLP DE ADN BACTERIANO

4.2.2.1 Amplificación del gen 16Sr bacteriano

Los cebadores a emplear pueden ser cebadores universales o diseñados. Para amplificar el gen 16S ribosomal se debe aplicar los cebadores: 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1492R (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') que amplifican una región de aproximadamente 1500 pb del ADN bacteriano (Benítez *et al.*, 2009). Para preparar el coctel de reacción mezclar en microtubos los siguientes reactivos con las siguientes concentraciones finales de: Tampón 1X PCR libre de Magnesio (INVITROGEN®), 1,8 mM de MgCl₂ (INVITROGEN®), 0,8 pmol/μL por cada cebador y 0,06 U/μL de ADN Taq Polimerasa (INVITROGEN®). Adicionar al cóctel el coadyuvante suero de albúmina bovina (BSA) a una concentración final de 1 mg/mL y de muestra de ADN 40 ng. El volumen final de cada reacción es de 25 μL. El programa de amplificación en el termociclador presenta las siguientes temperaturas y ciclos de amplificación: un ciclo inicial de denaturación a 95 °C por 5 minutos, seguidos por: denaturación cíclica a 94 °C por 1 minuto, 45 s de anillamiento a 54 °C y 1 minuto de elongación cíclica a 70 °C (34 ciclos),

seguidos de una extensión final de ocho minutos a 70 °C y un enfriamiento de cinco minutos a 4 °C.

4.2.2.2 Visualización de productos amplificados

Para visualizar los productos amplificados se debe realizar la técnica de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5%. Preparar las muestras mezclando 1 μL de azul de parada (*Blue Stop*) con 4 μL de la muestra amplificada y cargar en cada pocillo del gel 5 μL de esta mezcla. Incluir un marcador molecular de talla (*Track-it* 100 bp *DNA Ladder* INVITROGEN®). Migrar a 100 V durante 35 minutos. Transcurrido el tiempo, teñir el gel en una solución de bromuro de etidio de 15 ppm por un período de 30 minutos y visualizar los productos amplificados en el fotodocumentador con luz UV (Figura 1).

4.2.2.3 Digestión enzimática de los productos amplificados

Los productos PCR al ser sometidos a la digestión con una o varias enzimas de restricción, el ADN de individuos genéticamente distintos es cortado generando fragmentos de diferentes tamaños. El empleo de las enzimas depende del ADN en estudio, así como su temperatura y tiempo de incubación.

Digestión con la enzima *Taq I*

En un microtubo estéril preparar un coctel de reacción mezclando: 0,5 μL de tampón E, 0,1 μL de suero de albúmina bovina (BSA), 0,3 μL de enzima *Taq I* (Promega) y 4 μL del producto amplificado. El volumen final de cada reacción es 10 μL. Incubar las muestras por tres horas a la temperatura óptima

de la enzima (65 °C) y dejar por un periodo de 15 minutos a 70 °C para la desactivación enzimática.

4.2.2.4 Visualización de fragmentos de digestión enzimática

Para visualizar los productos de la restricción enzimática emplear la técnica de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%. Preparar las muestras mezclando 1 µL de azul de parada 1X más 4 µL del producto digerido. Cargar en cada pocillo del

gel 5 µL de esta mezcla. Incluir un marcador molecular de talla (*Track-it* 100 pb *DNA Ladder* INVITROGEN®). Migrar a 100 V por 1 hora 20 minutos. Tefir los geles en una solución de bromuro de etidio de 15 ppm por 30 minutos para luego visualizar las bandas en el fotodocumentador con luz UV (Figura 2).

5. RESULTADOS

La interpretación de los resultados se detalla en la sección 4.

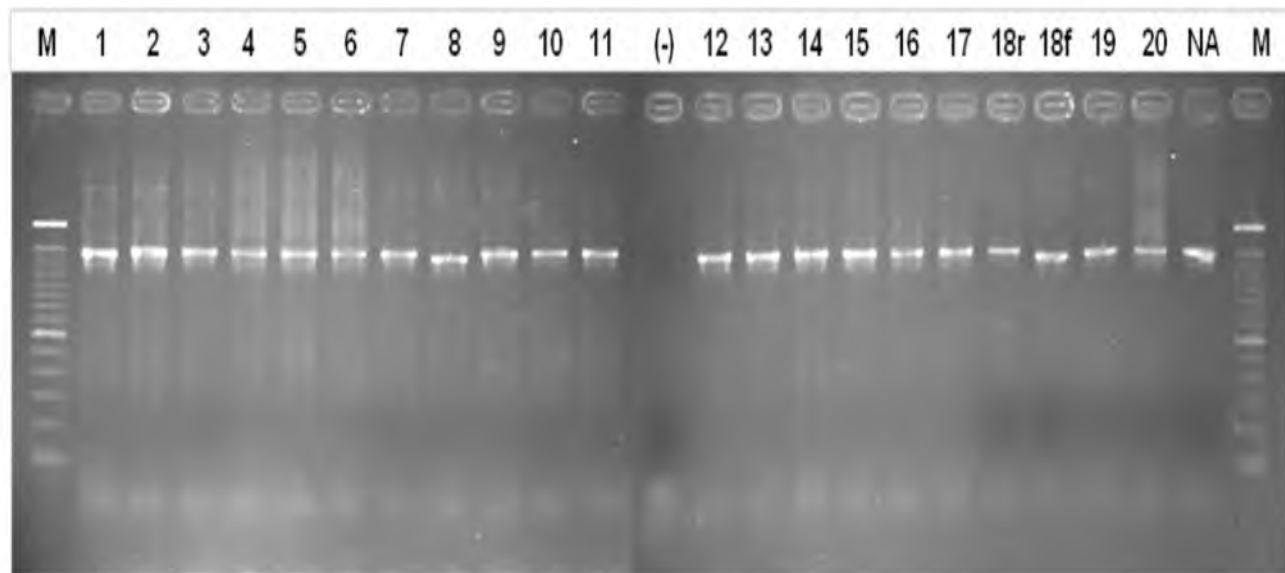


Figura 1. Visualización de la amplificación del Gen 16Sr (1500 pb). Carriles 1-20: amplicones del gen 16Sr de *Azospirillum*; (-): control negativo de la reacción de PCR; carril M: marcador de talla molecular (100 pb *DNA Ladder* INVITROGEN®).

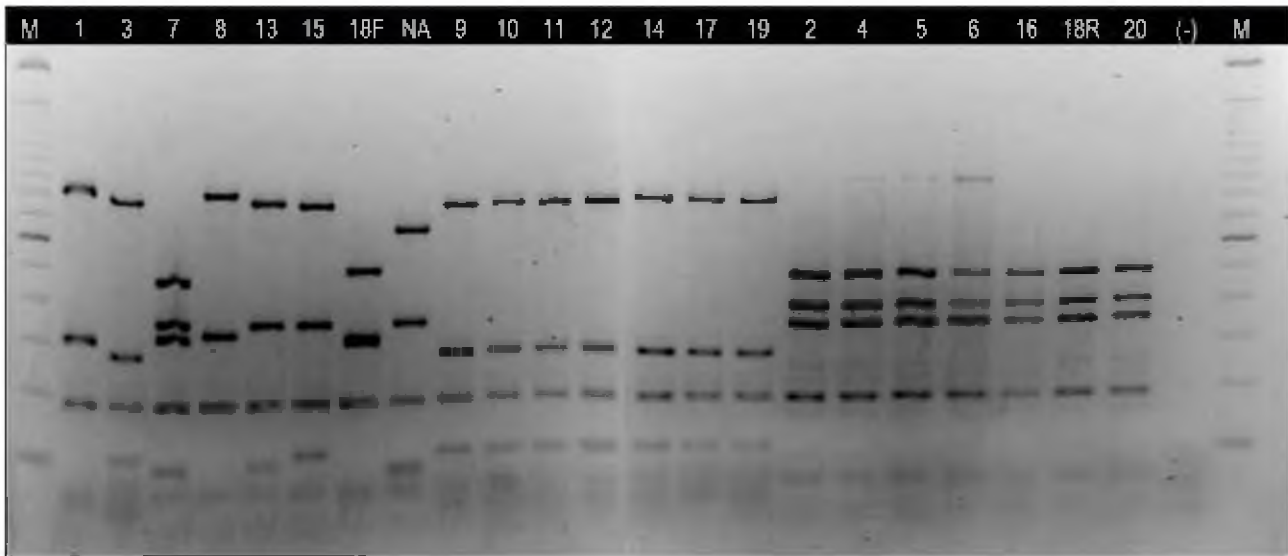


Figura 2. Visualización de la digestión enzimática del gen 16S ribosomal con la enzima Taq I. Carriles 1-20: muestras del gen 16Sr digerido; carril (-): control negativo de la reacción enzimática; carril M: marcador de talla molecular (100 pb DNA *Ladder* INVITROGEN®).

RAPDs

(ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR)

1. OBJETIVO

Desarrollar un procedimiento específico para el análisis molecular mediante la técnica de RAPDs.

2. ALCANCE

Los marcadores moleculares RAPDs son ampliamente utilizados, se los puede emplear en reconstrucción filogenética de especies; así como en caracteres diagnóstico de especies y linajes de subespecies, también pueden ser aprovechados en investigaciones de problemas genéticos y evolutivos; sin embargo, uno de los campos en los que estos marcadores moleculares se han destacado es la genética de poblaciones en donde se puede estudiar identidad individual y relaciones taxonómicas. Esta técnica permite detectar el gran polimorfismo de ADN distribuido por todo el genoma de un organismo.

3. GENERALIDADES

El genoma de los diferentes organismos contiene una enorme cantidad de información, en regiones codificantes de proteínas, reguladores de expresión y otros, en los que lleva intrínsecamente la historia evolutiva del organismo. De ahí se pueden extraer gran cantidad de datos moleculares lo que representa una ventaja, para esto se ha desarrollado diferentes clases de marcadores moleculares los cuales constituyen una herramienta útil en diferentes campos de la investigación, agropecuaria, salud, producción, etc (Sánchez, 2004).

Los Polimorfismos de ADN amplificados al azar RAPD (*Random Amplified Polymorphism of DNA*) son parte de la categoría de marcadores establecidos en la PCR usando cebadores arbitrarios. Esta técnica está basada en la amplificación de segmentos con cebador inespecíficos (10 bases de longitud) siendo una técnica relativamente sencilla. En el laboratorio requiere del aislamiento de ADN seguido de una PCR con un cebador finalizando con la separación de los fragmentos mediante

electroforesis para ser visualizados (Bardakci, 2000).

Esta técnica tiene un sinnúmero de beneficios: no es necesario tener un conocimiento previo de la secuencia de ADN; tampoco requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica y el número de loci que puede ser examinado es ilimitado. Otro beneficio de los RAPD es que amplifican regiones codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos comparándolo con otros marcadores (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

3.1 ABREVIATURAS

RAPD	Polimorfismo de ADN amplificados al azar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Trifosfatos de deoxinucleósidos
ng	Nanogramo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
μL	Microlitro

3.2 INTERFERENCIAS

Esta técnica no presenta interferencias, la calidad del ADN empleado no requiere ser de alta calidad, además es importante mencionar que es una técnica relativamente sencilla.

Es preciso indicar que posiblemente los patrones de amplificación obtenidos en un laboratorio no sean reproducibles en otros, pues la técnica RAPD es muy sensible y muchas veces se han detectado resultados diferentes entre laboratorios debido a la utilización de distintas marcas de Taq Polimerasa.

4. DESCRIPCIÓN

4.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

4.1.1 Equipos

Micropipetas
Tubos PCR
Hileras o placas PCR
Vórtex
Micro centrífuga
Termociclador
Cámara de flujo laminar vertical

4.1.2 Reactivos

Hielo
Tampón 5X RAPD (ver Anexo 1)
Agua ultra pura
Cebadores (10 μM)
Taq Polimerasa (5 U/μL)
dNTP's (5 mM)
Aceite Mineral
Marcador molecular de talla

4.2 PROCEDIMIENTO

4.2.1 CONDICIÓN AMBIENTAL

Los reactivos y muestras de ADN deberán permanecer almacenados a una temperatura de -20 °C y durante todo el procedimiento deben ser mantenidos en hielo. La enzima Taq debe ser mantenida a -20 °C el mayor tiempo posible, mientras es usada se la debe colar en hielo e inmediatamente luego de utilizarla es conveniente colocarla nuevamente a -20°C.

Todo el trabajo debe ser realizado en una cámara

de flujo laminar, previamente esterilizada mediante luz UV por 10 minutos, con el objetivo de evitar contaminación.

4.2.2 PREPARACIÓN

La reacción de amplificación RAPD se basan en el protocolo descrito por Williams *et al.* (1990). Se realiza en volúmenes de 7,5 µL con las siguientes concentraciones finales: ADN genómico (5 ng), 1 µM cebador *OPERON*, 1µM dNTP's, 0,6 unidades de Taq ADN Polimerasa (5 U/µL), tampón PCR 5X (50 mM Tris pH 8,5; 10 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 500 µg/mL BSA; 0,01% *Xilene cyanole*; y, 1,5% *Ficoll* 400). Las reacciones son cubiertas con una gota de aceite mineral y amplificadas en un termociclador usando el siguiente programa de amplificación: ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguidos por: desnaturalización cíclica a 94 °C por 30 s, 1 minuto de anillamiento a 42 °C, 2 minutos de elongación cíclica a 72 °C (40 ciclos), y un ciclo final de elongación a 72 °C por 7 minutos.

Para realizar el cóctel se debe calcular el volumen de cada reactivo anteriormente descrito (Tabla 1), este valor corresponde al necesario para la amplificación

de un ADN. Una vez establecido el número de reacciones se debe seguir de la siguiente manera:

- a) Trabajar en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar vertical
- b) Dispensar 1,5 µL de ADN (5 ng/µL)
- c) En un tubo de 1,5 mL colocar la cantidad de agua ultra pura
- d) Añadir tampón 5X, dNTP's, cebador
- e) Añadir al final la Taq polimerasa. Esta debe estar siempre en hielo
- f) Agitar el cóctel y distribuir las cantidades en cada ADN
- g) Agitar en un vórtex y centrifugar para la placa o hileras PCR
- h) Añadir una gota de aceite Mineral en cada muestra para evitar la evaporación de las muestras
- i) Llevar las muestras al termociclador y correr el programa establecido

Tabla 1. Cantidades de cada componente del cóctel RAPD. Concentraciones iniciales de los reactivos de trabajo: 5 ng/μL de ADN, 5 U/μL Taq polimerasa, 5 mM de dNTP's, tampón 5X RAPD.

Rx	Agua (μL)	Tampón 5X (μL)	Cebador (μL)	dNTP's (μL)	Taq (μL)
100	228.8	220.0	44.0	44.0	13.20
90	205.9	198.0	39.6	39.6	11.88
80	183.0	176.0	35.2	35.2	10.56
70	160.2	154.0	30.8	30.8	9.24
60	137.3	132.0	26.4	26.4	7.92
50	114.4	110.0	22.0	22.0	6.60
40	91.5	88.0	17.6	17.6	5.28
30	68.6	66.0	13.2	13.2	3.96
20	45.8	44.0	8.8	8.8	2.64
10	22.9	22.2	4.4	4.4	1.32
9	20.6	19.8	4.0	4.0	1.19
8	18.3	17.6	3.5	3.5	1.06
7	16.0	15.4	3.1	3.1	0.92
6	13.7	13.2	2.6	2.6	0.79
5	11.4	11.0	2.2	2.2	0.66
4	9.2	8.8	1.8	1.8	0.53
3	6.9	6.6	1.3	1.3	0.40
2	4.6	4.4	0.9	0.9	0.26
1	2.3	2.2	0.4	0.4	0.13

4.2.3 Visualización de productos amplificados

Los productos de amplificación se separaran por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% empleando una solución de TAE 1X para la corrida; además se utilizará un marcador de talla para contar con una referencia de los amplicones generados

(100 pb *DNA Ladder*, INVITROGEN® Cat. No. 15628-019), finalmente se realizará la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 15 ppm. La visualización e impresión digital deberá ser realizada en un sistema de fotodocumentación UV (Figura 3).

5. RESULTADOS

La interpretación de los resultados se detalla en la sección 4.

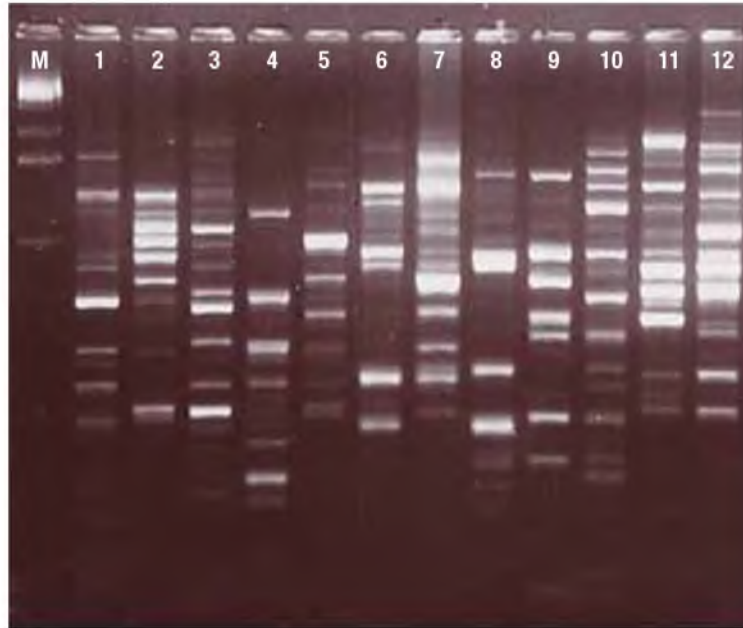


Figura 3. Visualización de patrones de amplificación RAPDs obtenidos con el OPERON OPAC – 19 en Ají (*Capsicum* spp.). Carriles 1-12: muestras de capsicum; carril M: marcador de talla molecular (1 Kb DNA *Ladder* INVITROGEN®).

ISSR (MARCADORES INTER- MICROSATÉLITES)

1. OBJETIVO

Desarrollar un procedimiento específico para el análisis molecular mediante la técnica de ISSR.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para el análisis molecular de los niveles de variación genética en muestras de ADN vegetal mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

3. GENERALIDADES

Los ISSR (*Interspread single sequence repeats*) son regiones ubicadas entre microsatélites (González *et al.*, 2004), son marcadores semiarbitrarios debido a que se utiliza un solo cebador de 14 pb o más, complementario a dos microsatélites cercanos presentes en el genoma (Chia, 2009). Algunas de la ventajas de estos marcadores son que no necesitan información previa sobre las secuencia siendo técnicamente simples con una reproducibilidad aceptable (Chia, 2009) y son útiles para encontrar variación dentro de regiones únicas del genoma en varios loci simultáneamente. Los ISSR permiten evaluar niveles de variación genética en regiones internas de los microsatélites (González *et al.*, 2004). Sin embargo, son marcadores de tipo dominante proporcionando baja información genética por locus.

3.1 ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's	Deoxinucleotidos trifosfatos
g	Gramos
ISSR	Interspread single sequence repeats
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ppm	Partes por millón
µg	Microgramos
µL	Microlitros

3.2 INTERFERENCIAS

Es preciso indicar que posiblemente los patrones de amplificación obtenidos en nuestro laboratorio no sean reproducibles en otros, pues la técnica ISSR es muy sensible y muchas veces se han detectado resultados diferentes entre laboratorios debido a la utilización de distintas marcas de Taq DNA Polimerasa.

4. DESCRIPCIÓN

4.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

4.1.1 Equipos

Micropipetas
Tubos PCR
Hileras o placas PCR
Vórtex
Micro centrífuga
Termociclador
Cámara de flujo laminar vertical

4.1.2 Reactivos

Hielo
Tampón 10X ISSR (ver Anexo 1)
Agua ultra pura
Cebadores (10 μ M)
Taq Polimerasa (5 U/ μ L)
dNTP's (10 mM)
Aceite Mineral
Marcador molecular de talla

4.2 PROCEDIMIENTO

4.2.1 CONDICIÓN AMBIENTAL

Los reactivos y muestras de ADN deberán permanecer

almacenados a una temperatura de -20 °C y durante todo el procedimiento deben ser mantenidos en hielo. La enzima Taq debe ser mantenida a -20 °C el mayor tiempo posible, mientras es usada se la debe colar en hielo e inmediatamente luego de utilizarla es conveniente colocarla nuevamente a -20 °C.

Todo el trabajo debe ser realizado en una cámara de flujo laminar, previamente esterilizada mediante luz UV por 10 minutos, con el objetivo de evitar contaminación.

4.2.2 PREPARACIÓN

La reacción de amplificación ISSR se realiza en volúmenes de 12,5 μ L con las siguientes concentraciones finales: ADN genómico (5 ng), 1 μ M cebador ISSR, 0,4 μ M dNTP's, 0,02 unidades de Taq ADN Polimerasa (5 U/ μ L), tampón PCR 1X ISSR, 2 mM MgCl₂. Las reacciones son cubiertas con una gota de aceite mineral y amplificadas en un termociclador usando el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, una desnaturalización cíclica a 94 °C por 30 s, 1 minuto de anillamiento a 42 °C, 2 minutos de elongación cíclica a 72 °C (40 ciclos), y un ciclo final de elongación a 72 °C por 7 minutos.

Para realizar el cóctel se debe calcular el volumen de cada reactivo anteriormente descrito (Tabla 2), este valor corresponde al necesario para la amplificación de un ADN. Una vez establecido el número de reacciones se debe seguir de la siguiente manera:

- a) Trabajar en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar vertical

- b) Dispensar 1,5 μL de ADN (5 ng/ μL)
- c) En un tubo de 1,5 mL colocar la cantidad de agua ultra pura
- d) Añadir tampón 10X, dNTP's, cebador
- e) Añadir al final la Taq polimerasa. Esta debe estar siempre en hielo
- f) Agitar el cóctel y distribuir las cantidades en cada ADN
- g) Dar vórtex y punto de centrifuga para la placa o hileras PCR
- h) Añadir una gota de aceite mineral en cada muestra para evitar la evaporación de las muestras
- i) Llevar las muestras al termociclador y correr el programa establecido

Tabla 2. Cantidades de cada componente del cóctel ISSR. Concentraciones iniciales de los reactivos de trabajo: 5 ng/ μL de ADN, 5 U/ μL Taq polimerasa, 10 mM de dNTP's, tampón 10X ISSR y agua ultrapura.

Rx	Agua (μL)	Tampón 10X (μL)	Cebador (μL)	MgCl ₂ (μL)	dNTP's (μL)	Taq (μL)
100	800,00	125,00	20,00	100,00	50,00	5,00
90	720,00	112,50	18,00	90,00	45,00	4,50
80	640,00	100,00	16,00	80,00	40,00	4,00
70	560,00	87,50	14,00	70,00	35,00	3,50
60	480,00	75,00	12,00	60,00	30,00	3,00
50	400,00	62,50	10,00	50,00	25,00	2,50
40	320,00	50,00	8,00	40,00	20,00	2,00
30	240,00	37,50	6,00	30,00	15,00	1,50
20	160,00	25,00	4,00	20,00	10,00	1,00
10	80,00	12,50	2,00	10,00	5,00	0,50
9	72,00	11,25	1,80	9,00	4,50	0,45
8	64,00	10,00	1,60	8,00	4,00	0,40
7	56,00	8,75	1,40	7,00	3,50	0,35
6	48,00	7,50	1,20	6,00	3,00	0,30
5	40,00	6,25	1,00	5,00	2,50	0,25
4	32,00	5,00	0,80	4,00	2,00	0,20
3	24,00	3,75	0,60	3,00	1,50	0,15
2	16,00	2,50	0,40	2,00	1,00	0,10
1	8,00	1,25	0,20	1,00	0,50	0,05

4.2.2.1 Visualización de productos amplificados

Los productos de amplificación se separan por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% empleando una solución de TAE 1X para la corrida (100 V por 30 - 35 minutos). Además se utiliza un marcador de talla para contar con una referencia de los amplicones generados (100 pb *DNA Ladder*, INVITROGEN® Cat. No. 15628-019), finalmente se

realiza la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 15 ppm. La visualización e impresión digital deberá ser realizada en un sistema de fotodocumentación UV (Figura 4).

5. RESULTADOS

La interpretación de los resultados se detalla en la sección 4.

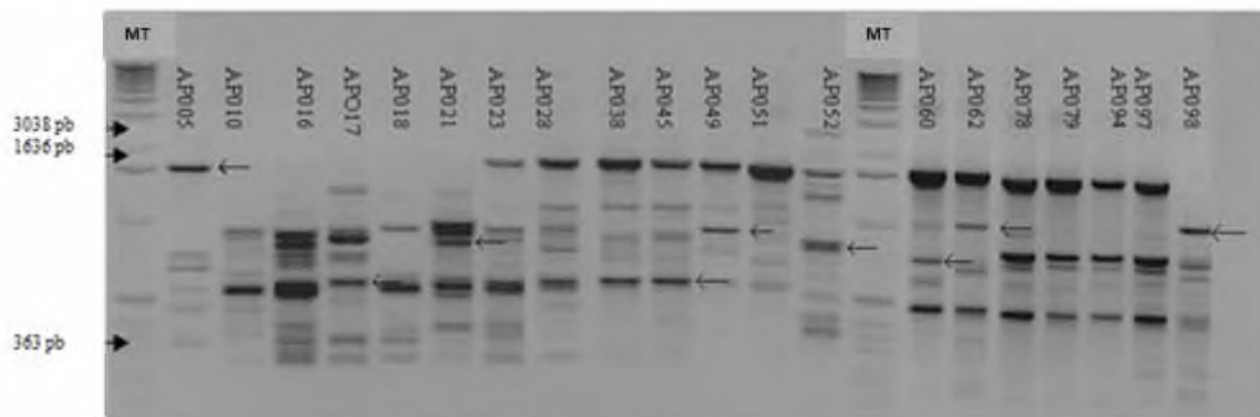


Figura 4. Visualización de patrones de amplificación ISSR obtenidos con el primer ISSR-872. Carriles AP0: muestras de *R. glaucus* y especies afines; carril MT: marcador de talla molecular (1 Kb *DNA Ladder* INVITROGEN®).

SSR

(MARCADORES MICROSATÉLITES)

1. OBJETIVO

Desarrollar un procedimiento específico para el análisis molecular mediante la técnica de SSR.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para el análisis molecular de polimorfismos y en programas de mejoramiento por selección asistida por marcadores (MAS) de muestras de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los marcadores SSR son los que poseen el más elevado contenido de información de polimorfismo. Son frecuentes y distribuidos al azar, permitiendo la más completa cobertura de cualquier genoma.

3. GENERALIDADES

Los SSR son secuencias cortas y repetidas en tándem, denominadas “*motifs*” de dos, tres o más nucleótidos, cuyo polimorfismo se basa en el número de repeticiones de la secuencia *motif* lo cual origina variación en la talla de la secuencia, la misma que es detectada por PCR al utilizar cebadores o iniciadores que amplifican las secuencias colindantes (Tautz y Renz, 1984).

Son considerados en la actualidad como marcadores muy polimórficos y distribuidos ampliamente en las plantas (Ferreira y Grattapaglia, 1998), lo cual sugiere una ventaja sobre otros marcadores moleculares y permite una discriminación más precisa entre individuos altamente emparentados. Adicionalmente, estos marcadores son de uso simple y fácilmente reproducibles, permiten utilizar cantidades bajas de ADN no necesariamente de excelente calidad y muestran alta precisión en la determinación de alelos (Weising *et al.*, 2005).

Presentan amplia utilidad en análisis forenses, diagnóstico e identificación de enfermedades, estudios demográficos, estudios de estructura poblacional, estudios en genética de la conservación, mapeo genético, análisis de parentesco, caracterización molecular, mejoramiento asistido (MAS), entre otros (Mathias *et al.*, 2007).

Existen varias técnicas de detección del polimorfismo de los SSR. Entre ellas, el marcaje fluorescente es una de las más eficientes y prácticas. El método M13-tailing adaptado al secuenciador DNA Analyzer LI-COR 4300s, equipo con el que cuenta el laboratorio, consiste en marcar uno de los cebadores de la reacción de amplificación del SSR, con la molécula fluorescente IRDye en dos longitudes de onda, a 685 nm ("IRD 700") o a 785 nm ("IRD 800"), de manera que los productos de amplificación son detectados y visualizados por electroforesis en el LI-COR. Las imágenes son analizadas con el software SAGA-GT, el cual facilita el registro de información y minimiza el error de lectura de manera significativa, aportando gran confiabilidad a los resultados (LI-COR, 2004).

Otra metodología de detección de SSR con la que cuenta el laboratorio es con el ABI-310. Este secuenciador permite determinar el tamaño de un fragmento y su cuantificación relativo (ABI,2000).

La determinación del tamaño del fragmento se la realiza mediante la comparación del fragmento con un marcador de talla interno que se agrega a cada muestra. A la vez cada muestra proviene de la amplificación con cebadores que tienen marcajes o *dyes* fluoromarcados. En una sola corrida se pueden analizar hasta tres muestras cada una con un marcaje o *dye* de distinto color, o una sola muestra amplificada con tres *dyes* diferentes. Cuando los fragmentos de ADN pasan por la ventana del capilar son detectados en la ventana de detección por el láser que excita los *dyes* fluorescentes. La fluorescencia emitida por lo *dyes* es colectada por la cámara CCD. El software interpreta el resultado calculando el tamaño y la

cantidad de fragmentos medidos por la intensidad de fluorescencia en cada dato (ABI, 2003).

3.1 ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
g	Gramos
MAS	Selección Asistida por Marcadores moleculares
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ppm	Partes por millón
SSR	Repeticiones de Secuencia Simple (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar

3.2 INTERFERENCIAS

No aplica para este marcador molecular, debido a la ventaja de poder utilizar ADN de baja calidad y concentraciones de hasta 1 ng/µL, en la amplificación PCR.

4. DESCRIPCIÓN

4.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

4.1.1 Equipos

Micropipetas
Tubos PCR

Hileras o placas PCR
 Vórtex
 Micro centrífuga
 Termociclador
 Cámara de flujo laminar vertical
 DNA Analyzer 4300S LI-COR
 Secuenciador ABI-PRISM 310

4.1.2 Reactivos

Hielo
 Tampón 5X SSR (ver Anexo 1)
 Agua ultra pura
 Cebador *Forward*-M13 (10 µM)
 Cebador *Reverse* (10 µM)
 Taq Polimerasa (5 U/µL)
 dNTP's (5 mM)
 MgCl₂ (25 mM)
 Aceite Mineral
 Marcaje IRDye 700 u 800 (SSR - M13)
 Cebadores marcados con fluorocromos
 Marcador molecular de talla

4.2 PROCEDIMIENTO

4.2.1 CONDICIÓN AMBIENTAL

Los reactivos y muestras de ADN deberán permanecer almacenados a una temperatura de -20 °C y durante todo el procedimiento deben ser mantenidos en hielo. La enzima Taq debe ser mantenida a -20 °C el mayor tiempo posible, mientras es usada se la debe colar en hielo e inmediatamente luego de utilizarla es conveniente colocarla nuevamente a - 20°C.

Todo el trabajo debe ser realizado en una cámara de flujo laminar, previamente esterilizada mediante luz UV por 10 minutos, con el objetivo de evitar contaminación.

Si se realiza la amplificación PCR mediante tecnología M13-*tailing* y SSR-ABI, trabajar en la oscuridad para evitar la degradación de los compuestos fluorescentes.

4.2.2 PREPARACIÓN

La reacción de amplificación se realiza en un volumen final de 7,5 µl con una concentración final de: tampón 1X PCR SSR, 0,3 µM de dNTP's, 2 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cebador *Forward*, 0,5 µM de cebador *Reverse*, 0,06 U de Taq (5 U/µl) y 30 ng de ADN.

La amplificación se realiza en un termociclador empleando un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, una desnaturalización cíclica a 94 °C por 20 s, 30 s de anillamiento (50 a 60 °C)*, 30 s de elongación cíclica a 72 °C (25 ciclos), y un ciclo final de elongación a 72 °C por 3 minutos. Los productos de amplificación son diluidos con 5 µl de azul de parada. Se cargan 4 µl de muestra en un gel de agarosa al 2%. La electroforesis se la realiza a 100 V durante 90 minutos. Para optimizar recursos se puede realizar pruebas de estandarización con los cebadores SSR con el fin de determinar combinaciones (dúplex PCR) que se amplifiquen simultáneamente en la reacción de PCR.

Para realizar el cóctel se debe calcular el volumen de cada reactivo anteriormente descrito (Tabla 3), este

*La temperatura de alineamiento depende de cada cebador

valor corresponde al necesario para la amplificación de un ADN (Concentraciones iniciales de los reactivos de trabajo son: 5 ng/μL de ADN, 5 U/μL Taq polimerasa, 5 mM de dNTP's, tampón 5X SSR, 25 mM de MgCl₂, 10 μM de Cebador *Forward*, 10 μM de cebador *Reverse*). Una vez establecido el número de reacciones se deber seguir de la siguiente manera:

- Trabajar en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar vertical
- Dispensar 1,5 μL de ADN (5 ng/μL)
- En un tubo de 1,5 mL colocar la cantidad de agua ultra pura
- Añadir tampón 5X, dNTP's, cebadores
- Añadir al final la Taq polimerasa. Esta debe estar siempre en hielo
- Agitar el cóctel y distribuir las cantidades en cada ADN
- Agitar en un vórtex y centrifugar para la placa o hileras PCR
- Añadir una gota de aceite Mineral en cada muestra para evitar la evaporación de las muestras
- Llevar las muestras al termociclador y correr el programa establecido

Tabla 3. Cantidades de cada componente del cóctel SSR.

Reactivo	1 Rx
ADN (5 ng/μL)	2,00 μL
MgCl ₂ (25 mM)	0,60 μL
Tampón 5X	1,50 μL
dNTP's (5 mM)	0,38 μL
Cebador <i>Forward</i> (10 μM)	0,40 μL
Cebador <i>Reverse</i> (10 μM)	0,40 μL
Taq (5 U/μL)	0,10 μL
Agua ultrapura	2,12 μL
Volumen final	7,50 μL

4.2.2.1 SSR-M13 *tailing*

Para realizar el cóctel se debe calcular el volúmen de cada reactivo (Tabla 4), este valor corresponde al necesario para la amplificación de un ADN (Concentraciones iniciales de los reactivos de trabajo son: 5 ng/μL de ADN, 5 U/μL Taq polimerasa, 5 mM de dNTP's, tampón 5X SSR, 25 mM de MgCl₂, 1 μM de Cebador *Forward* - M13, 10 μM de cebador *Reverse*, 1 μM IRDye (700 - 800 nm) agua ultrapura). Una vez establecido el número de reacciones se deber seguir de la siguiente manera:

- Trabajar en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar vertical y en oscuridad, los tubos cubrirlos con papel aluminio
- Dispensar 1,5 μL de ADN (5 ng/μL)
- En un tubo de 1,5 mL colocar la cantidad de agua ultra pura
- Añadir tampón 5X, dNTP's, cebadores, marcaje IRDye (700 u 800 nm)
- Añadir al final la Taq polimerasa. Esta debe estar siempre en hielo
- Agitar el cóctel y distribuir las cantidades en cada ADN
- Agitar en un vórtex y centrifugar para la placa o hileras PCR
- Añadir una gota de aceite mineral en cada muestra para evitar la evaporación de las muestras
- Llevar las muestras al termociclador y correr el programa establecido
- Cuando se termine el programa, sacar las muestras y protegerlas de la luz
- Colocar 5 μL de azul de parada LI - COR (Ver Anexo 1) en cada tubo, centrifugar por 30 s y denaturar por 3 minutos a 95 °C. Luego colocar

inmediatamente en hielo para su posterior visualización

La amplificación se realiza en un termociclador empleando un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, una desnaturalización cíclica a 95°C por 20 s, 20 s de anillamiento (50 a 60 °C)*, 30 s de elongación cíclica a 72 °C (29 ciclos), y un ciclo final de elongación a 72 °C por 3 minutos.

Tabla 4. Cantidades de cada componente del cóctel SSR-M13.

Reactivo	1 Rx
ADN (5 ng/μL)	1,00 μL
Tampón 5X	1,00 μL
MgCl ₂ (25 mM)	0,50 μL
dNTP's (5mM)	0,20 μL
M13 700- 800(1μM)	0,50 μL
Cebador <i>Forward</i> -M13 (1μM)	0,05 μL
Cebador <i>Reverse</i> (10 μM)	0,08 μL
Taq polimerasa (5U/μL)	0,05 μL
Agua ultrapura	1,62 μL
Volumen final	5,00 μL

Con la metodología SSR-M13 es necesario realizar pruebas de estandarización con todos los cebadores disponibles tanto para el marcaje en IRDye 700 e IRDye 800. Una vez identificado el marcaje del cebador se pueden determinar combinaciones (dúplex PCR) que amplifiquen simultáneamente en la reacción. Para esto se debe cumplir con las siguientes normas:

Similar temperatura de anileamiento
Igual marcaje IRDye
Diferencia en tamaño superior a 30 pb

4.2.2.3 SSR-ABI PRISM

Para la amplificación de marcadores microsatélites con la metodología SSR usando el ABI PRISM 310, se debe realizar un cálculo de las cantidades del cóctel (Tabla 5), una reacción corresponde a una amplificación de un ADN.

Para el análisis de fragmentos con SSR, cada cebador SSR de secuencia *forward* debe estar marcado con fluorocromos compatibles con el filtro virtual del secuenciador. En el caso del ABI 310 el filtro virtual es el F y los marcajes o *dyes* que se pueden utilizar se describen a continuación (Tabla 5).

Tabla 5. Color del marcaje según Filtro F

Color del marcaje o <i>dye</i>	Filtro F DS-32
Azul	5-FAM
Verde	JOE
Amarillo	NED
Rojo	ROX

En la reacción PCR con SSR-ABI es recomendable utilizar la modalidad de multiplex PCR para la optimización de recursos puesto por cada corrida se pueden analizar hasta tres cebadores marcados con diferentes marcaje (Tabla 6)

*La temperatura de alineamiento depende de cada cebador

Tabla 6. Cantidades de cada componente del cóctel SSR - ABI. Concentraciones iniciales de los reactivos de trabajo son: 5 ng/μL de ADN, 5 U/μL Taq polimerasa, 10 mM de dNTP's, tampón 5X SSR, 25 mM de MgCl₂, 20 μM de Cebador *Forward*, 10 μM de cebador *Reverse*.

Reactivo	Monoplex	Dúplex	Tríplex
ADN (5 ng/μL)	2,00 μL	2,00 μL	2,00 μL
Tampón PCR (5X)	1,50 μL	1,50 μL	1,50 μL
MgCl ₂ (25 mM)	0,60 μL	0,60 μL	0,60 μL
dNTP's (10 mM)	0,15 μL	0,15 μL	0,15 μL
Cebador 1 <i>Forward</i> (20 mM)	0,23 μL	0,23 μL	0,23 μL
Cebador 1 <i>Reverse</i> (20 mM)	0,23 μL	0,23 μL	0,23 μL
Cebador 2 <i>Forward</i> (20 mM)		0,23 μL	0,23 μL
Cebador 2 <i>Reverse</i> (20 mM)		0,23 μL	0,23 μL
Cebador 3 <i>Forward</i> (20 mM)			0,23 μL
Cebador 3 <i>Reverse</i> (20 mM)			0,23 μL
Agua ultrapura	2,67 μL	1,75 μL	1,29 μL
Taq (5 U/μL)	0,13 μL	0,13 μL	0,13 μL
Volumen final	7,5 μL		

La amplificación se realiza en un termociclador empleando un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 4 minutos, una desnaturalización cíclica a 94 °C por 45 s, 1 minuto de anillamiento (50 a 60 °C)*, 2 minutos de elongación cíclica a 72 °C (30 ciclos), y un ciclo final de elongación a 72 °C por 7 minutos. Los productos de amplificación se pueden verificar en gel de agarosa al 2%.

Un factor de dilución que ha mostrado buenos resultados en estudios previos (García, 2010) es 1:33, para lo cual se deben tomar 3 μL de producto amplificado y diluirlos en 96 μL de agua. Para el montaje de muestras es necesario realizar lo

siguiente (Tabla 7).

- Diluir los productos amplificados con el factor descrito anteriormente
- Preparar el siguiente cóctel de reacción y multiplicarlo por el número de muestras a correr
- Centrifugar durante 1 minuto

Tabla 7. Cantidades de cada componente del cóctel SSR - ABI para ser cargados en el secuenciador

Reactivo	Cantidad
FORMAMIDA HI-Di	10 μL
ROX	0,15 μL

*La temperatura de alineamiento depende de cada cebador

5. RESULTADOS

La interpretación de los resultados se detalla en la sección 4.

5.1 SSR

La visualización del producto SSR se realiza en un gel de agarosa al 2% mediante electroforesis horizontal a 100 V por 30 minutos y tinción del gel en bromuro de etidio (15 ppm) por 30 minutos y fotodocumentado (Figura 5).

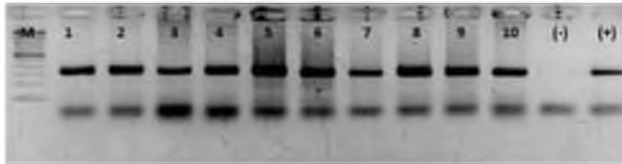


Figura 5. Visualización de productos SSR en trigo, cebador BARC-10. Carriles 1-10: muestras de trigo; carril (-): control negativo de la reacción PCR; carril (+): control positivo; carril M: marcador de talla molecular (100 bp DNA Ladder INVITROGEN®).

Para detectar las diferencias entre los SSR y todos los alelos posibles, la visualización se realiza en geles denaturantes de poliacrilamida mediante

electroforesis vertical (Figura 6) y teñidos con nitrato de plata (Ver Ficha Técnica N° 22)

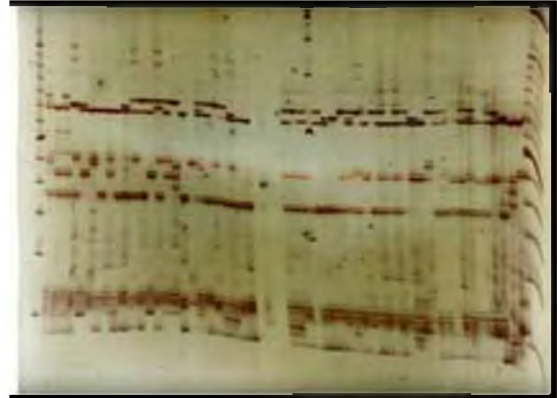


Figura 6. Microsatélites amplificados en chirimoya, cebadores utilizados: L - 139 y L-144. Dúplex en cargada en el gel de poliacrilamida.

5.2 SSR-M13

Los productos de amplificación obtenidos con metodología SSR - M13 son visualizados en el secuenciador LI - COR 4300s (Figura 7), que utiliza electroforesis vertical en geles de acrilamida. El análisis es efectuado mediante el software SAGA_{GT} versión 3.3

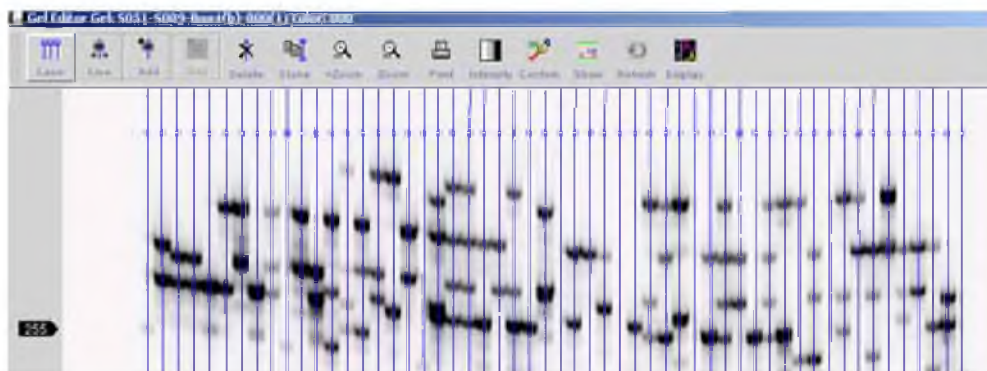


Figura 7. Microsatélites amplificados en papa, el cebador utilizado STM - 1042 en el gel de acrilamida en el secuenciador LI-COR 4300s.

5.3 SSR-ABI

Antes del montaje de muestras en el secuenciador se debe verificar los productos de amplificación en geles de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. Este resultado brinda información referente a la calidad

de la PCR, la cantidad de producto amplificado, la especificidad de la reacción, y el posible factor de dilución. Si se observan productos amplificados débiles, entonces el factor de dilución posterior será bajo, de la misma forma este factor aumentará si el producto PCR tiene más fluorescencia (Figura 8).

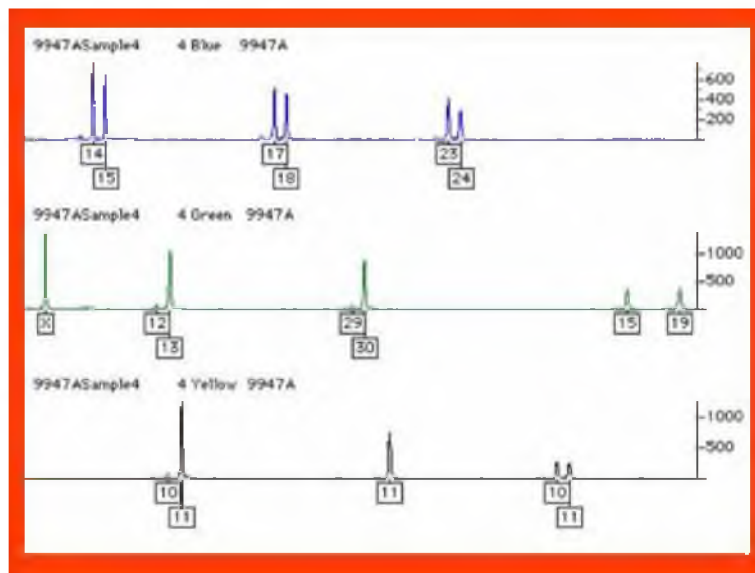


Figura 8. Microsatélites amplificados en papa, el cebador utilizado es STG - 0001 en el secuenciador ABI PRISM 310.

AFLPs

(POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS)

1. OBJETIVO

Desarrollar un procedimiento específico para el análisis molecular mediante la técnica de AFLPs.

2. ALCANCE

El alcance que poseen estos marcadores moleculares es sumamente amplio desde la detección de múltiples loci polimórficos, construcción de mapas genéticos y localización de marcadores que permiten discriminar entre individuos cercanamente relacionados, y localizar genes específicos en genomas complejos, para la caracterización de germoplasma en plantas, bacterias y hongos.

3. GENERALIDADES

Los AFLPs (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados por sus siglas en inglés) surgen a partir de polimorfismos en los sitios de restricción; polimorfismos en la longitud de la secuencia y de cambios en los pares de bases de ADN no asociados con sitios de restricción (Valadez y Kahl, 2000).

La técnica empieza cortando el ADN con dos enzimas de restricción, una de corte muy frecuente, y otra de corte raro. Es necesario agregar adaptadores para que éstos se peguen en los bordes de los fragmentos recién formados y de esta manera proveer una secuencia conocida para poder amplificar mediante PCR (Delgado, 2006).

Teniendo en cuenta que tras un corte enzimático se forman un gran número de fragmentos y con el objeto de discriminar, se diseñan los iniciadores de tal manera que incorporen el adaptador de secuencia conocida más uno, dos o tres pares. La amplificación mediante PCR solo ocurrirá en aquellos fragmentos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para los

pares de base adicionales. En este caso, los pares de bases adicionales actúan como nucleótidos selectivos (Russell *et al.*, 1997).

En el transcurso de la PCR se realizan dos ciclos térmicos selectivos. En el primero se utiliza un único nucleótido selectivo, en el segundo ciclo térmico, se utiliza el anterior nucleótido más uno o dos nucleótidos selectivos adicionales. Los fragmentos amplificados de esta forma pueden ser luego separados en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis y los productos de la amplificación pueden así ser visualizados (Simpson, 1997).

El análisis AFLP se basa en el protocolo originalmente descrito por Vos *et al.*, (1995), pero la detección de productos es basado en el método M13-*tailing* en un genotipador LI-COR 4300s (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Este equipo analiza automáticamente las moléculas de ADN, marcadas con una molécula fluorescente (IRD) en 700 u 800 nm que se añade a la mezcla de amplificación durante la PCR (método M13-*tailing*). Durante la amplificación selectiva (PCR+3), los cebadores E son marcados con fluorescencia, en 700 o 800 nm y por lo tanto los productos de amplificación generados, de manera que puedan ser detectados por los lectores láser del LI-COR 4300s. Este marcaje permite la posterior detección y visualización de los fragmentos mediante un sistema de electroforesis vertical en geles denaturantes de poliacrilamida. El genotipaje es realizado con un lector de imágenes y un software analizador de datos SAGA-GT ver 3.3 (LI-COR Inc., NE, USA, Ref. 46539).

Los polimorfismos AFLPs codifican en una matriz binaria de ausencia o presencia. La presencia de un polimorfismo se codifica con “1”, la ausencia con “0”. No se registran bandas ambiguas o de codificación dudosa. Se considera a un polimorfismo, a una banda presente o ausente en una muestra de ADN amplificada en PCR+3. SAGA realiza una asignación del peso molecular de los polimorfismos AFLPs utilizando como referencia el marcador IRDye *size standard* (829-05343 IRDye 700 y 829-05344 IRDye 800).

3.1 ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dNTP's	Trifosfatos de deoxinucleósidos
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar

3.2 INTERFERENCIAS

Requiere de ADN de alta calidad y en cantidades mayores comparado con otros marcadores, la información que se genera tras el estudio requiere un análisis automatizado y, por consiguiente, tecnología informática adecuada.

4. DESCRIPCIÓN

4.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

4.1.1 Equipos

Micropipetas

Tubos PCR

Hileras o placas PCR

Vórtex

Micro centrífuga

Termociclador

Cámara de flujo laminar vertical

DNA Analyzer 4300s LI-COR

4.1.2 Reactivos

Tampón 5X SSR (ver Anexo 1)

Agua ultra pura

Cebador *Forward* - M13 (10 μ M)

Cebador *Reverse* (10 μ M)

Taq Polimerasa (5 U/ μ L)

dNTP's (5 mM)

MgCl₂ (25 mM)

Aceite Mineral

4.2 PROCEDIMIENTO

4.2.1 CONDICIÓN AMBIENTAL

Los reactivos para la técnica de AFLP deben estar a una temperatura de 4 °C. Se debe trabajar en hielo, además todo el proceso se lo debe hacer en una cámara de flujo laminar para evitar

cualquier tipo de contaminación. Las enzimas deben ser almacenadas a una temperatura de -20 °C. Las enzimas por ningún motivo deben ser homogenizadas en un vórtex debido a que esto degrada la estructura enzimática.

4.2.2 PREPARACIÓN

4.2.2.1 AFLP M13 tailing con kit LI-COR

El análisis de AFLP-M13 *tailing* consta esencialmente de cuatro etapas. El procedimiento a seguir es el protocolo LI-COR (*AFLP Analysis Using LI-COR IR2 Automated Sequencers*). Los reactivos usados en la amplificación selectiva no están incluidos en el kit, con excepción del cebador IRDye (700 o 800) marcado *Eco RI* (1 μ M).

a) Digestión M13 Tailing

El ADN genómico se digiere con dos enzimas de restricción, una de corte raro (*Eco RI*) y otra de corte frecuente (*Mse I*). La enzima *Eco RI* reconoce un sitio de corte de seis nucleótidos (GAATTC) mientras que la enzima *Mse I* reconoce el corte en cuatro pares de bases (TTAA). Los productos de digestión se controlan en agarosa 2% para verificación de que el ADN se haya digerido totalmente. La reacción de digestión de ADN se realiza en un tubo PCR de 0.2 mL, sin autoclavar (Tabla 8). Incubar por 2 horas a 37 °C posteriormente a 70 °C por 15 minutos para inhibir la restricción. Controlar la digestión en gel de agarosa 1.5% (3 μ L de ADN digerido + 1 μ L de azul de parada) sin olvidar incluir un control negativo de digestión (ADN genómico sin digerir). Mezclar suavemente ya que las enzimas son delicadas.

Tabla 8. Cantidades de cada componente del cóctel digestión

Reactivos	1 Rx
Tampón 5x (LI-COR)	2,00 µL
ADN genómico (300 ng en ≤ 9 µL)	≤ 9,00 µL
Eco RI/MseI (LI-COR)	1.00 µL
Agua desionizada (LI-COR)	a 12,5 µL
Volumen total	12.5 µL

b) Ligación M13 Tailing

Una vez controlada la digestión, el ADN digerido se utiliza para la reacción de ligación. La reacción se incuba durante dos horas a 20 °C. Añadir al ADN ya digerido lo siguiente en hielo (Tabla 9).

Tabla 9. Cantidades de cada componente del cóctel ligación

Reactivos	1 Rx
Coctel de digestión	12,50 µL
Cóctel Adaptador (LI - COR)	12,00 µL
T4 ADN ligase (5 U/µL) (LI - COR)	0,50 µL
Volumen combinado	25,00 µL

Después de la incubación realizar una dilución 1:10 de la mezcla de ligación (10 µL del producto de ligación con 90 µL de tampón TE LI-COR) y mezclar bien. Almacenar el producto restante a - 20 °C.

c) Preamplificación (PCR+1)

Para la PCR+1, se debe realizar en un tubo autoclavado. Preparar el cóctel (Ver Tabla 10).

Tabla 10. Cantidades de cada componente del cóctel PCR+1

Reactivos	1 Rx
Templado ligado de ADN	2,50 µL
Cóctel AFLP Pre-amp (LI-COR)	20,00 µL
Tampón PCR 10X (LI-COR)	2,50 µL
Taq polimerasa (5U/ µL) INVITROGEN	0,50 µL
Volumen total	25,50 µL

La amplificación se realiza en un termociclador empleando un ciclo inicial de 94°C por 1 minuto seguidos por 20 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 s, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto y una extensión final de 74°C por 1 minuto. Los productos de amplificación se pueden verificar en gel de agarosa al 2%.

d) Amplificación Selectiva (PCR + 3)

Para la amplificación selectiva, el producto preamplificado se diluye en relación 1:5. Preparar el cóctel (Tabla 11).

Tabla 11. Cantidades de cada componente del cóctel PCR+3

Reactivos	1 Rx
ADN pre-amplificado 1:5	1,30 µL
Agua destilada (LI-COR)	1,80 µL
Tampón 10X sin Mg (INVITROGEN)	1,00 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,30 µL
dNTP's (5 µM)	0,40 µL
IRDye (700 o 800) marcado <i>Eco RI</i> (1 µM) (LI - COR)	0,40 µL
<i>MseI</i> (6.7 ng/µL) INVITROGEN	2,20 µL
Taq ADN polimerasa (5 U/µL) INVITROGEN	0,10 µL
Volumen Total	7,50 µL

La amplificación se realiza en un termociclador empleando una denaturación inicial de 30 s, seguido por 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 minuto, luego 12 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 s, (65 °C - 0,7 °C por cada ciclo) por 30 s, 72 °C por 1 minuto, seguido de 23 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 minutos. Los productos de amplificación se pueden verificar en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio, previo a su visualización en el LI-COR 4300s. Los productos PCR+3 se denaturan a 94 °C por 3 minutos previa su visualización usando la tecnología semiautomática de luz infrarroja para el secuenciador LI-COR. Los productos denaturados se cargan en geles denurantes de acrilamida 6.5%, para una migración de 2 horas a 1500 V. La adquisición de imágenes se efectúa a través del asistente de lectura SAGA MX AFLP®.

4.2.2.2 AFLP M13-Tailing (protocolo casero)

a) Digestión

El ADN genómico se digiere con dos enzimas de restricción por separado. La reacción de digestión de ADN se realiza en un tubo PCR de 0,2 mL, sin autoclavar (Tabla 12). Incubar *Eco RI* por 3 horas a 37 °C.

Tabla 12. Cantidades de cada componente del cóctel digestión *Eco RI*

Reactivos	1 Rx
Tampón 10x <i>Eco RI</i>	4,00 µL
ADN genómico (300 ng en ≤ 9 µL)	9,00 µL
<i>Eco RI</i> 10 U/µL	1,00 µL
Agua ultrapura	26,00 µL
Volumen total	40,00 µL

Al ADN digerido por *Eco RI* añadir la enzima Msel 5 U/µL (Tabla 13). La reacción se incuba durante 3 horas a 65 °C, 70 °C por 15 minutos y 4 °C por 5 minutos. Trabajar en hielo.

Tabla 13. Cantidades de cada componente del cóctel digestión Msel

Reactivos	1 Rx
ADN digerido con <i>Eco RI</i>	40,00 µL
Tampón 10x Msel	5,00 µL
Msel 5 U/µL	1,00 µL
Agua ultrapura	4,00 µL
Volumen total	50,00 µL

Controlar la digestión en gel de agarosa 1.5% (3 µl de ADN digerido + 1 µl de azul de parada) sin olvidar incluir un control negativo de digestión (ADN genómico sin digerir). Mezclar gentilmente ya que las enzimas son delicadas.

b) Ligación

Una vez controlada la digestión, el ADN digerido se utilizan para la reacción de ligación. La reacción se incuba durante tres horas a 37 °C seguido de 60 °C por 10 minutos. En esta etapa de ligación se necesita preparar los adaptadores E y M en un tubo de 0,5 mL no autoclavado (Tabla 14 y 15).

Tabla 14. Preparación de adaptadores E

Reactivos	1 Rx
Adaptador E-L (100 ng/µL)	0,28 µL
Adaptador E-s (100 ng/µL)	0,25 µL
Tampón Ligasa T4 5X	0,20 µL
Agua ultrapura	0,27 µL
Volumen Total	1,00 µL

Tabla 15. Preparación de adaptadores M

Reactivos	1 Rx
Adaptador M-L (100 ng/μL)	0,26 μL
Adaptador M-S (100 ng/μL)	0,23 μL
Tampón Ligasa T4 5X	0,20 μL
Agua ultrapura	0,31 μL
Volumen Total	1,00 μL

Incubar los dos adaptadores a 95 °C durante 1 minuto y dejar enfriar a temperatura ambiente. Para hacer la reacción de ligación, seguir el siguiente protocolo (Tabla 16).

Tabla 16. Cantidades de cada componente del cóctel ligación

Reactivos	1 Rx
Adaptador E	1,00 μL
Adaptador M	1,00 μL
Tampón Ligasa T4 10X	2,50 μL
T4 ADN ligasa (1 U/ μL)	0,2 μL
Agua ultrapura	20,30 μL
Volumen total	25,00 μL

Adicionar 25 μL de la ligación + 25 μL de ADN digerido (tubo no estéril). Almacenar el producto restante a -20 °C.

c) Preamplificación (PCR+1)

Para la PCR+1, se debe realizar en un tubo autoclavado. Preparar el cóctel (Tabla 17). Es necesario preparar stock a 150 ng/μL de cada uno de los cebadores Pre Amp (Pre-E+1, Pre-M+1)

Tabla 17. Cantidades de cada componente del cóctel PCR+1

Reactivos	1 Rx
Templado ligado de ADN	5,00 μL
Pre - amp E+1	0,75 μL
Pre - amp M+1	0,75 μL
Tampón PCR 10X INVITROGEN	5,00 μL
MgCl ₂ (50 mM)	2,50 μL
Taq polimerasa (5 U/μL) INVITROGEN	0,20 μL
dNTP's (5 μM)	2,00 μL
Agua ultrapura	33,80 μL
Volumen total	50,00 μL

La amplificación se realiza en un termociclador empleando un ciclo de inicial de 20 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 s, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto. Los productos de amplificación se pueden verificar en gel de agarosa al 2%.

d) Amplificación Selectiva (PCR + 3)

Para la amplificación selectiva, el producto preamplificado se diluye en relación 1:10. Preparar el cóctel (Tabla 18)

Tabla 18. Cantidades de cada componente del cóctel PCR+3

Reactivos	1 Rx
ADN pre - amplificado 1:10	2,50 μL
Agua destilada	5,02 μL
Tampón 10X sin Mg (INVITROGEN)	1,00 μL
MgCl ₂ (50 mM)	0,50 μL
dNTP's (5 μM)	0,40 μL
IRDye (700 o 800)marcado Eco RI (1 μM) (LI - COR)	0,50 μL
<i>MseI</i> (580 ng/μL) INVITROGEN	0,03 μL
Taq ADN polimerasa (5 U/μL)	0,05 μL
Volumen Total	10,00 μL

La amplificación se realiza en un termociclador empleando una denaturación inicial de 30 s, seguido por 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 minuto, seguido de 12 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 s, (65 °C - 0,7 °C por cada ciclo) por 30 s, 72 °C por 1 minuto, seguido de 23 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 1 minuto. Los productos de amplificación se pueden verificar en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio, previo a su visualización en el LI - COR 4300s.

Los productos PCR+3 se añaden 5 µL de azul de parada (LI-COR) y se denaturan a 94 °C por 3 minutos previa su visualización usando la tecnología semiautomática de luz infrarroja para el secuenciador LI-COR. Los productos denaturados se cargan en geles denurantes de acrilamida 6.5%, para una migración de 2 horas a 1500 V. La adquisición de imágenes fue efectúa a través del asistente de lectura SAGA MX AFLP®.

4.2.2.3 Detección de cebadores AFLP M13

El kit de AFLP (LI-COR) permite probar 64 combinaciones posibles de cebadores con tres

nucleótidos selectivos tanto para el adaptador *Eco RI* como para *Mse I*.

4.2.2.4 Registro de polimorfismos AFLP

Los polimorfismos AFLP se codifican en una matriz binaria de ausencia o presencia. La presencia de un polimorfismo se codifica con “1”, la ausencia con “0”. No se deben registrar bandas ambiguas o de codificación dudosa. Se debe considerar a un polimorfismo, a una banda presente o ausente en una muestra de ADN amplificada en PCR+3. SAGA realiza una asignación del peso molecular de los polimorfismos AFLP utilizando como referencia el marcador IRDye *size standard* (829-05343 IRDye 700 y 829-05344 IRDye 800).

5. RESULTADOS

La interpretación de los resultados se detalla en la sección 4.

Dentro del rango esperado, los productos generados varían en un rango de 100 pb a 400 - 500 pb, existiendo combinaciones con mejor rendimiento de ADN (Figura 9). La Figura 10 muestra los mismos productos pero visualizados en el LI-COR 4300s.

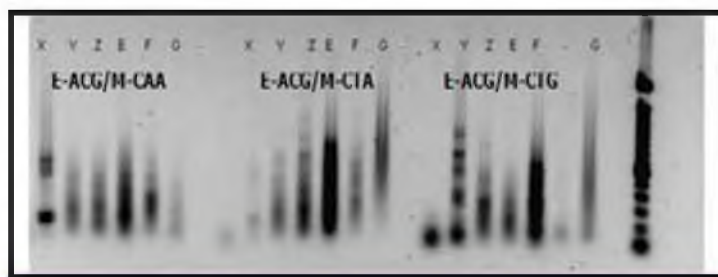


Figura 9. Control en agarosa de productos PCR+3, combinaciones AFLPs. Carriles x, y, z, e, f, y g: muestras de *Hypericum*; (-): control negativo de la reacción PCR; M: marcador de talla molecular (100 bp DNA Ladder INVITROGEN®).

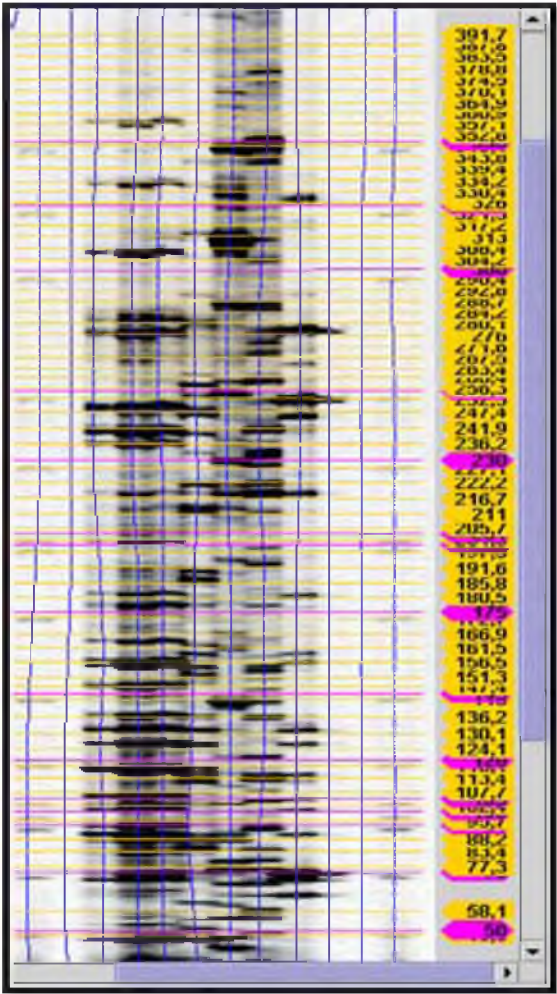


Figura 10. Bandas AFLPs polimórficas registradas con la combinación E-ACG/M-CAA en las seis muestras de *Hypericum* analizadas en el LI-COR 4300s.

SECUENCIACIÓN DE ADN

1. OBJETIVO

Desarrollar un procedimiento específico para la técnica de Secuenciación de ADN por electroforesis capilar en ABI-310.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para dar a conocer la secuencia de nucleótidos de uno o varios genes y para identificar taxonómicamente especies de interés, para lo cual se emplea fragmentos de ADN vegetal o de microorganismos obtenidos mediante técnicas de PCR y clonaje (ver ficha técnica N°23).

3. GENERAL

Secuenciar significa descifrar el ordenamiento de los nucleótidos en una cadena de ADN. Es un método clásico utilizado para el análisis del material genético gracias al desarrollo de los secuenciadores automáticos que permiten el análisis de grandes fragmentos de ADN con alta precisión y reproducibilidad. La tecnología de secuenciación del ADN, fue desarrollada por Sanger y Coulson y por Maxam y Gilbert (Fares, 2008).

El método de Sanger y Coulson o de terminación de cadena es el más empleado actualmente. Consiste en la utilización de dideoxinucleótidos que son incorporados en la reacción química. La reacción química comprende: el ADN que se quiere secuenciar, un cebador, una ADN polimerasa y los cuatro deoxinucleótidos. Esta mezcla se divide luego en cuatro tubos y a cada uno se le agrega un dideoxinucleótido diferente, ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP. El agregado es en una concentración tal que permite que se sinteticen y generen moléculas de ADN de longitud variable terminadas por dideoxinucleótidos, existiendo en cada tubo tantos fragmentos como deoxinucleótidos existentes en la secuencia

del ADN, del mismo signo al dideoxinucleótido agregado como terminador. Luego los fragmentos generados se separan en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y una alícuota de los cuatro tubos se siembra en forma independiente en el gel. La capacidad de separación del gel permite diferenciar fragmentos que difieran en una sola base. No existe en las cuatro alícuotas dos fragmentos con la misma longitud y todos los fragmentos terminan con el dideoxinucleótido correspondiente (in Cifuentes, 2008).

3.1 ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
mL	mililitros
µL	micro litros
ng	nano gramos
ppm	partes por millón
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatos
A	Adenina
G	Guanina
C	Citocina
T	Timinutosa
ddATP	dideoxiadenosina 5'–trifosfato
ddGTP	dideoxiguanosintrifosfato
ddCTP	dideoxicitosintrifosfato
ddTTP	dideoxitiminutostrifosfato

3.2 INTERFERENCIAS

No se registra interferencias debido a que el ADN empleado es purificado en columnas de membranas de silicato; además, se realiza una validación previa de la calidad del ADN mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa.

4. DESCRIPCIÓN

4.1 EQUIPOS REACTIVOS

4.1.1 Equipos

Micropipetas
Tubos PCR
Hileras o placas PCR
Vórtex
Micro centrífuga
Termociclador
Cámara de flujo laminar vertical
Secuenciador ABI PRISM 310

4.1.2 Reactivos

Hielo
Kit de secuenciación
Cebadores
Tampón 5X SSR
Agua ultra pura
Taq Polimerasa (5U/µL)
dNTP's (5 mM)
Formamida

4.2 PROCEDIMIENTO

4.2.1 CONDICIÓN AMBIENTAL

Todos los reactivos empleados para esta técnica molecular deben estar a una temperatura de 4°C o en hielo al momento de su uso. El procedimiento debe realizarse en una cámara de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación. El kit de clonaje siempre debe ser almacenado a una temperatura de -80°C si no se conserva a dicha temperatura las bacterias usadas para la transformación pierden viabilidad.

4.3 PREPARACIÓN

4.3.1 Tipos de Molde para Secuenciación

El protocolo que se describe a continuación fue validado en el laboratorio por Karina García (com. pers.).

Los tipos de ADN que pueden ser usados como moldes para su secuenciación son los siguientes:

a) Vectores de clonación

Vectores de cadena simple: casi todos basados en el bacteriófago M13. Son muy útiles y generan muy buenas secuencias, pero tienen el inconveniente que sólo permiten la secuenciación en una única dirección.

Vectores plasmídicos de doble cadena: son los más utilizados.

Vectores fagémidos: Son vectores híbridos,

plásmidos de doble cadena que contienen un origen de replicación de un bacteriófago de cadena simple. Si es necesario, vectores del tipo *pBluescript* y pGEM 18/19 pueden funcionar como fagémidos. Dependiendo de la forma del fago se utilizarán como vectores de doble cadena o cadena sencilla.

Cósmidos, YACs, PACs) BACs: son vectores capaces de replicar grandes fragmentos de ADN. Son ideales para estrategias de “*primer walking*”.

b) Fragmentos de PCR

Productos de PCR de cadena sencilla: producidos a partir de reacciones de PCR que contienen un exceso de un cebador.

Productos de PCR de doble cadena: Obtenidos a partir de reacciones de PCR contienen cantidades iguales de cada cebador.

Se pueden amplificar por PCR fragmentos de ADN a partir de tejidos ó amplificar insertos directamente de colonias. Cuando los fragmentos de PCR se clonan pueden producirse problemas de errores en la secuencia, que pueden ser evitados si se realiza la secuenciación directamente del producto de PCR, puesto que la tasa de error para cada nucleótido es muy baja y no es detectable en una población grande del fragmento.

Cuando se secuencian fragmentos de PCR es muy importante que los cebadores utilizados para amplificar el fragmento sean eliminados eficientemente antes de la secuenciación.

4.3.2 Obtención del ADN Molde

La calidad del ADN molde es el factor más importante para una secuenciación exitosa. Cualquier resto de proteínas,ARN,sales,carbohidratos, fenol, cloroformo, etanol, detergentes, PEG, EDTA, va a contribuir a la obtención de una mala secuencia. A continuación se detallan una serie de recomendaciones para obtener un ADN molde de buena calidad.

Productos PCR:

Los productos de PCR deben verse como una única banda en un gel de agarosa.

Para el caso de la secuenciación de productos PCR de microsatélites, un protocolo eficiente de amplificación (Tabla 19).

Tabla 19. Cantidades de cada componente para la secuenciación de productos PCR

Reactivo	1 Rx
ADN (5 ng/μL)	2,00 μL
MgCl ₂ (25 mM)	0,60 μL
Tampón 5X	1,50 μL
dNTP's (10 μM)	0,15 μL
Cebador 1 (20 mM)	0,75 μL
Cebador 2 (20 mM)	0,75 μL
Taq ADN polimerasa 5 U/μL (Promega)	0,13 μL
Agua ultrapura	1,62 μL
Volumen final	7,50 μL

El programa de amplificación consiste de un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos,

desnaturalización cíclica a 94 °C por 45 seg, 45 seg de anillamiento a 56°C*, 1 minutos de elongación cíclica a 72°C (30 ciclos), y un ciclo final de elongación a 72°C por 7 minutos.

*La temperatura de alineamiento depende de cada cebador

La secuenciación de fragmentos de tamaño pequeño es algo problemática por lo que se recomienda que los productos sean al menos de 150 pb. Los fragmentos más pequeños se pueden comportar como cebadores y son difíciles de purificar con buen rendimiento.

Los productos de PCR contienen restos de nucleótidos, cebador, dNTP's y enzimas procedentes de la amplificación que pueden interferir en la reacción de secuenciación. Por este motivo es necesario incluir un paso purificación del producto previo a la secuenciación.

Algunos métodos de purificación son:

Kits de purificación directa del producto: Son kits de filtración o mini columnas. Se pueden utilizar solo cuando el resultado de la amplificación es una única banda. Los kits de purificación PCR *Purification Kit* de Invitrogen ha mostrado ser un método simple, rápido y efectivo de purificación de fragmentos.

Purificación del producto PCR de un gel de agarosa: Se trata de correr el producto de PCR en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, cortar la banda correspondiente y extraer el ADN con un kit comercial.

Tratamiento del producto, de PCR con Exonucleasa 1 y SAP.

El tratamiento con exonucleasa I degrada los cebadores de PCR residuales mientras que la SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) defosforila los dNTP's restantes. Tras la inactivación por calor de ambas enzimas puede utilizarse el producto de PCR para su secuenciación automática. Evidentemente, este método no puede aplicarse en el caso de productos de PCR contaminados con subproductos secundarios.

Dilución directa del producto de PCR: Este método implica la dilución del producto de PCR entre 5 y 10 veces en agua y utilizado directamente en la reacción de secuenciación. Para que este método sea efectivo, es necesario emplear bajas concentraciones de dNTP's y cebadores en la reacción de PCR (concentración final de los cebador 0,2 µM y de los dNTP's 100 µM o menos). La principal desventaja de este método es que requiere una optimización individual de las condiciones para cada producto de PCR.

Al final de la purificación los productos de PCR deben ser resuspendidos en agua; por el mismo motivo que con ADN plasmídico debe evitarse el uso de TE.

4.3.3 Cuantificación del ADN Molde

La obtención de unos buenos resultados de secuenciación está condicionada a una cuantificación precisa del ADN molde. Poca cantidad de ADN en la reacción de secuenciación produce datos de secuencias con baja señal, ruido de fondo, errores y ambigüedades, demasiado ADN molde también puede producir efectos similares.

Por lo tanto, la cuantificación de la muestra es un paso previo muy importante para la secuenciación.

Existen diversos métodos de cuantificación ya sea por fluorescencia o en geles de agarosa por comparación de fluorescencia con un marcador de talla (*Low Mass Ladder*).

Este gel nos permitirá además detectar otros posibles problemas presentes en las muestras como la presencia de más de un amplificado en el caso de fragmentos de PCR o la detección de dímeros de los oligos utilizados en la amplificación (Tabla 20).

Tabla 20. Cantidades de ADN necesarias para cada tipo de molde

TEMPLADO		CANTIDAD ADN
Producto de PCR	100-200 pb	1-3 ng
	200 – 500 pb	3-10 ng
	500 – 1000 pb	5-20 ng
	1000 – 2000 pb	10 – 40 ng
	Más de 2000 pb	40 – 100 ng
ADN de hebra sencilla		50 – 100 ng
ADN hebra doble		200 – 500 nm
Cósmido/BAC		0.5 – 1 µg
ADN genómico bacteriano		2 – 3 µg

4.3.4 Reacción de Secuenciación:

Durante este paso se lleva a cabo una reacción de elongación mediante la ADN polimerasa la cual va a integrar tanto desoxinucleotidos como didesoxinucleotidos, en este último caso la reacción se detendrá generando un oligonucleótido al azar con un dNTP marcado.

En la tabla 21 se describe el protocolo de secuenciación utilizando el kit *Big Dye Terminator*,

todos los reactivos necesarios para la secuenciación vienen incluidos en el kit. En el coctel de reacción es recomendable utilizar un control positivo que corresponde al ADN de plásmido PGEM junto con el cebador universal M13 y un control negativo.

Tabla 21. Cóctel de secuenciación utilizando el kit *Big Dye Terminator*

Reactivo	1 Rx	Control +
Cóctel Master	8,00 µL	8,00 µL
Agua ultrapura	4,80 µL	6,00 µL
Cebador (1µM)	3,20 µL	4,00 µL
ADN (5 ng/µL)	4,00 µL	2,00 µL
Volumen total	20,00 µL	20,00 µL

4.3.5 Purificación de la reacción de secuenciación:

Un protocolo eficiente de purificación es mediante la purificación con columnas *Centrisept*. Se debe usar una columna para cada muestra. Realizar el protocolo sin interrupciones para asegurar resultados óptimos. No deje secar la columna en ningún momento. No procesar más columnas de las que se puedan manejar convenientemente.

1. Hidratar la columna con 800 µL de agua al menos 2 horas antes de utilizarla
2. A cada columna se le quita la tapa inferior y se coloca en los tubos colectores. Si el flujo no comienza de inmediato, puede aplicarse una ligera presión a la columna. Deseche el agua recolectada en el tubo
3. Centrifugar la columna a 750 g (3500 rpm)

por dos minutos. Es importante observar la posición de la columna para que en la siguiente centrifugación se coloque en la misma posición

4. A los tubos que contienen la reacción de secuencia se les agregan 10µL de agua desionizada o inyectable (en caso de haber utilizado la mitad del volumen de reacción)
5. Quitar la columna del tubo de lavado y colocar dentro de un microtubo de 1,5 mL, previamente rotulado
6. Con una micropipeta tomar toda la muestra que contiene la reacción de secuencia, y depositarla en el centro de la columna
7. Centrifugar la columna en el microtubo de 1,5 mL a 730 rpm por tres minutos. Ponga la columna en la misma orientación que la puso en la primera centrifugación
8. Desechar la columna. La muestra queda en el microtubo de 1,5 mL
9. Secar la muestra en un concentrador (*speed vac*) por 20 minutos, o hasta que se seque

4.3.6 Electroforesis Capilar

Después de la purificación de la reacción de secuenciación, resuspenda el material en 15 µL de formamida HI-Di. La formamida impide la formación de los enlaces por puentes de hidrógeno en el ADN y por lo tanto el reordenamiento de ADN. Las muestras son estables en la formamida hasta por 48 horas (Figura 11).

5. RESULTADOS

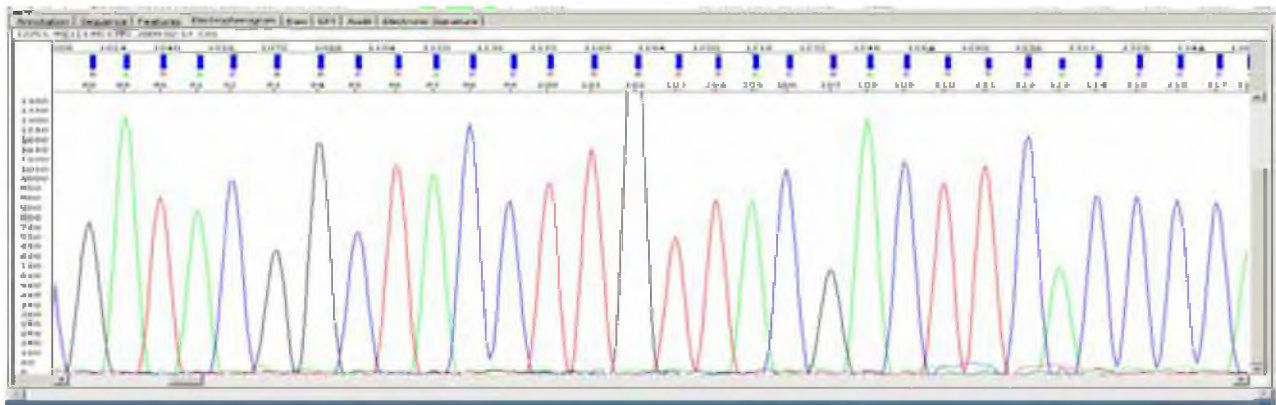


Figura 11. Cromatograma de la secuencia de ADN de cloroplasto obtenido en el secuenciador ABI-310 en el laboratorio.

SECCIÓN 3

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1 Cuantificación de la cantidad de ADN mediante fluorescencia con bromuro de etidio

a) Cuantificación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

Una rápida forma de estimar la cantidad de ADN y ver su calidad es utilizando la inducción por luz ultravioleta emitida por las moléculas de bromuro de etidio que se intercala en el ADN. Esto se debe a que la cantidad de fluorescencia es proporcional a la masa de ADN, la cantidad de ADN en una muestra es comparado con marcadores de talla y concentración conocidos, como se observa en la Figura 12.

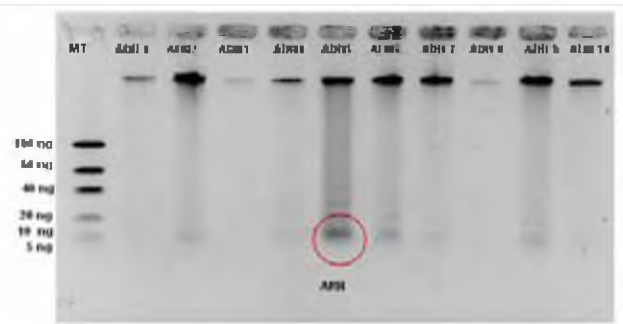


Figura 12. Visualización de la cuantificación en geles de agarosa 1%. Carriles ADN1- ADN-10: muestras de ADN genómico; carril MT: marcador de talla molecular (*Low mass Ladder* INVITROGEN®).

Para eliminar ARN se coloca ARNsA (20 ng/μL) y se incuba durante 30 minutos a 65°C.

Para determinar la concentración de ADN, debemos comparar la intensidad del mismo con el marcador de talla (Tabla 22).

Tabla 22. Cuantificación de la concentración de ADN mediante la comparación con el marcador de talla Low mass Ladder

ADN	CONCENTRACIÓN ESTIMADA ADN
ADN 1	30 ng/μL
ADN 2	100 ng/μL
ADN 3	10 ng/μL
ADN 4	30 ng/μL
ADN 5	100 ng/μL
ADN 6	100 ng/μL
ADN 7	100 ng/μL
ADN 8	10 ng/μL
ADN 9	100 ng/μL
ADN 10	90 ng/l

Después de estimar la concentración de ADN, se debe preparar una dilución a una concentración estándar para trabajar con marcadores moleculares, para ellos se utiliza la fórmula:

Donde: $C1.V1 = C2.V2$

- C1 → Concentración estimada por fluorescencia
- V1 → Volumen (*Stock*) ADN
- C2 → Concentración de ADN a la cual vamos a diluir
- V2 → Volumen del diluido

Ejemplo:

En el ADN 1 tenemos una concentración de 30 ng/μL, y se va a preparar una dilución de 100 μL con una concentración de 5 ng/μL:

$$C1.V1 = C2.V2$$

C1 → Concentración estimada por fluorescencia
 V1 → Volumen (*Stock*) ADN
 C2 → Concentración de ADN a la cual vamos a diluir
 V2 → Volumen del diluido

$$V1 = \frac{C2.V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{(5ng / \mu l).(100\mu l)}{30ng / \mu l}$$

$$V1 = 16.6\mu l$$

Es decir que del *stock* de ADN debemos tomar 16,6 μ L y aforar 83,4 μ L de agua ultra pura o tampón de tartrazine 1X.

Como resultado final tenemos una dilución de 100 μ L a 5 ng/ μ L

Adicionalmente, mediante la cuantificación de ADN con bromuro de etidio se puede observar la integridad del ADN, observando si se encuentra degradado o contaminado por proteínas como se puede observar en la Figura 13.

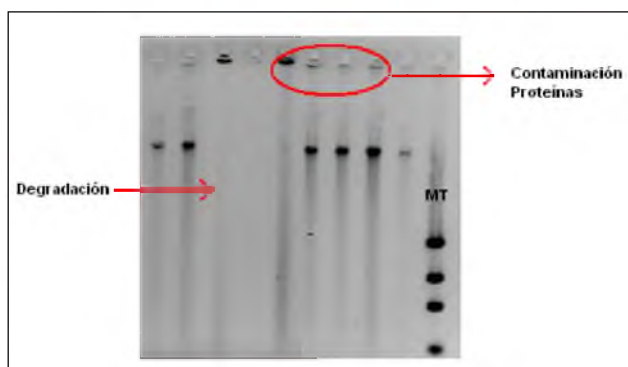


Figura 13. Visualización de ADN degradados y contaminados con proteínas; carril MT: marcador de talla molecular (Low mass Ladder INVITROGEN®).

Si el ADN se encuentra contaminado, se puede realizar una purificación del mismo, mientras que si se encuentra degradado, se debe repetir la extracción. Las proteínas pueden interferir en el proceso de amplificación.

b) Cuantificación de ADN por fluorómetro

El fluorómetro Qubit® 2.0 proporciona valores para cada ensayo. Este valor corresponde a la concentración.

Para calcular la concentración de las muestras, se usa la siguiente ecuación:

Donde: $[ADN] = QF \cdot \frac{200}{X}$

Valor QF = El valor dado por el fluorómetro
 X = El volumen final de la muestra a cuantificar
 200 = Constante

Esta ecuación genera un resultado con las mismas unidades que son dadas por el fluorómetro, es decir que dependiendo del kit a usarse dependerá las unidades finales de la concentración de ADN.

Esta metodología da el valor exacto de concentración de ADN; sin embargo, no podemos utilizarlo para determinar la calidad del mismo.

Ejemplo:

Kit dsADN HS Assay Kits. Concentración mg/mL

X = El volumen final de la muestra a cuantificar (5 μ L)

En el ADN 4 tenemos una lectura de concentración de 1520

$$[ADN] = QF \cdot \frac{200}{X}$$

$$[ADN] = 1520 \cdot \frac{200}{5}$$

$$[ADN] = 38 \text{ mg / ml}$$

La concentración final del ADN 4 es 38 mg/ mL

3.2 MARCADORES RAPD

La secuencia del oligonucleótido obtenida mediante RAPD, es aleatoria al igual que los sitios de hibridación, por lo que la secuencia amplificada es desconocida. Para que se genere un fragmento RAPD es necesario que las dos hebras del ADN en estudio, presenten sitios de hibridación con el oligonucleótido en orientaciones opuestas suficientemente cercanas (menos de 3000 pb). El polimorfismo que se observa entre distintos individuos consiste en la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado, dada por el polimorfismo en los sitios de hibridación del cebador, como se puede observar en la Figura 14.

Ejemplo:

Genotipaje de muestras de Amarillo de Guayaquil con el cebador *OPERON* OPAA-11

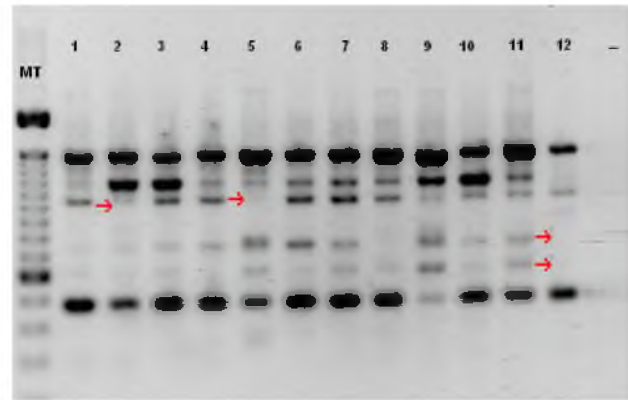


Figura 14. Patrones de amplificación de muestras de Amarillo de Guayaquil con el cebador *OPERON* OPAA-11. Carriles 1-12: amplificaciones de muestras de Amarillo; carril (-): control negativo de la reacción PCR; carril MT: marcador de talla molecular (100 pb DNA *Ladder* INVITROGEN®).

En este gel podemos ver el polimorfismo de las muestras 2, 5, y 12, debido a la ausencia de las bandas en los tamaños 1050 pb, 700 pb y 600 pb.

De esta forma se realiza el análisis de los patrones amplificados y se obtiene una matriz, con todas las muestras analizadas y con todos los cebadores que demuestren polimorfismos. Para la presencia de polimorfismo se designa 1 y para la ausencia 0, como se puede observar en la Figura 15.

El control negativo no debe mostrar patrones de amplificación, caso contrario la información obtenida es nula.

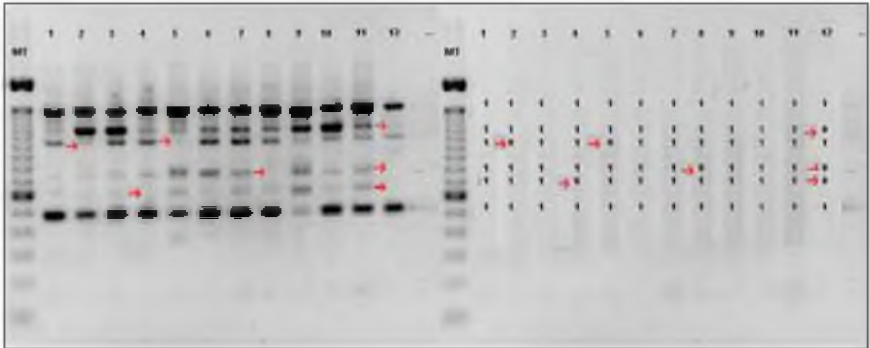


Figura 15. Determinación de datos de Amarillo con el cebador OPERON OPAA-11. a) Carriles 1-12: amplificaciones de muestras de Amarillo; carril (-): control negativo de la reacción PCR; carril MT: marcador de talla molecular (100 pb DNA *Ladder* INVITROGEN®). b) Matriz de datos generada.

Una vez que se realiza la lectura de datos, se procede a realizar los análisis estadísticos correspondientes. Es necesario determinar el tamaño aproximado de

los fragmentos en el programa FRAG-LENGTH III (Templeton y Lawrence, 1988) como se detalla en la Tabla 23.

Tabla 23. Determinación del peso en pares de bases de los amplicones generados con el marcador OPERON OPAA-11

MT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2072												
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1400												
1300												
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1100	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1000												
900												
800												
700	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
600	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400												
300												
200												
100												

Para realizar una caracterización molecular, es necesario realizar un tamizaje o *screening* de varios cebadores para determinar cuáles son informativos y presentan buenos patrones de amplificación,

como se puede observar en la Figura 16. Una vez seleccionado los cebadores, se realiza el genotipaje con todas las muestras en estudio.

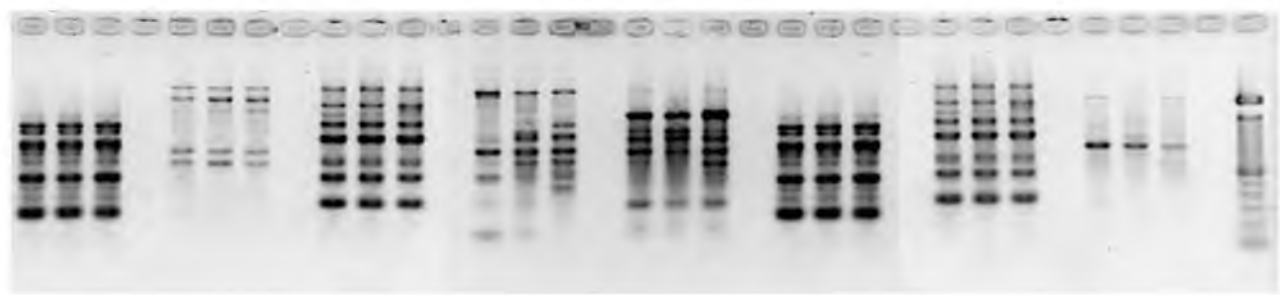


Figura 16. Visualización de tamizaje de cebadores RAPD

3.3 MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR-M13)

Se deben realizar pruebas de estandarización con los cebadores SSR (Figura 17 a y b), con el

fin de determinar combinaciones (dúplex) que se amplifiquen simultáneamente en la reacción de PCR (Figura 17). Se identifican las combinaciones dúplex, para 700 nm y para 800 nm (Tabla 24).

Tabla 22. Combinaciones de cebadores SSR-M13

Combinación	Cebadores	Producto PCR (pb)	T. Anillamiento (°C)	Marcaje IRDye (nm)
1	PAM 1	130	53.5	700
	PAM 8	185		
2	PAM 3	175	53	800
	PAM 4	210		

Debe coincidir la temperatura de anillamiento y el marcaje IRDye, mientras que el producto de amplificación debe ser distinto para que las muestras no se solapen.

Los datos se analizan en el software SAGA GT (Microsatélites) que proporciona el tamaño exacto de los alelos del SSR.

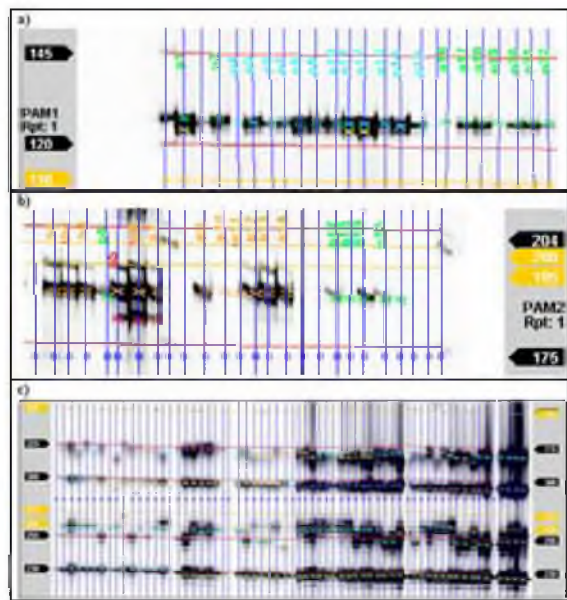


Figura 17. Fotodocumentación de los patrones de amplificación SSR obtenidos con el LICOR 4300s. a) Amplificación con el marcador PAM 1, (PCR monoplex); b) Amplificación con el marcador PAM 2, (PCR monoplex); c) Amplificación con los marcadores SSRY68 y SSRY40, (PCR dúplex).

3.4 MARCADORES AFLP

3.4.1 RESULTADOS DEL CONTROL SISTEMÁTICO DEL PROCESO AFLP

Existen varios procesos dentro de la amplificación con AFLP que deben ser controlados. Dependiendo de la información obtenida se continúa con el proceso.

Digestión: si se observa un barrido completo desde el inicio hasta el final se obtiene una digestión completa del ADN genómico. Se debe comparar el ADN genómico con sus digestiones, para lo cual se cargan en el gel la muestra y su digerido (Figura 18).

Es necesario manejar un control positivo y negativo durante todo el proceso de AFLP.



Figura 18. Control de la digestión del ADN genómico de muestras de *Hypericum*. Carriles x, y, z, e, f, y: muestras de ADN sin digestión; carriles yd, xd, yd, zd, ed, fd, gd: muestras digeridas de ADN; carril MT: marcador de talla molecular (100 pb DNA Ladder INVITROGEN®).

Los carriles x, y, z, e, f, y g son las muestras de ADN sin digestión yd, xd, yd, zd, ed, fd, gd son las muestras digeridas de ADN. El marcador de Talla es de 100 pb (MT)

Preamplificación (PCR+1): se deben observar productos indefinidos dentro del rango esperado (hasta de 1 Kb) como para el control positivo del kit (Figura 19).

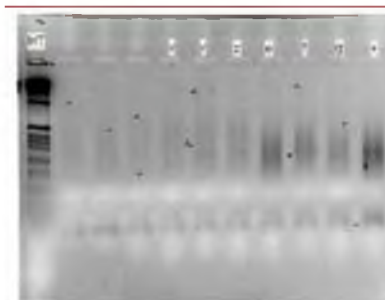


Figura 19. Control de la PCR+1 de las muestras de *Hypericum*. Carriles x, y, z, e, f, g: muestras de *Hypericum*; carril (+): control positivo de la reacción PCR; carril MT: marcador de talla molecular (100 pb DNA Ladder INVITROGEN®).

Amplificación selectiva (PCR+3): se deben observar productos definidos dentro del rango esperado, los productos generados varían en un rango de 100 pb a 400 - 500 pb, existiendo combinaciones con mejor rendimiento de ADN (Figura 20). Las Figuras 21 y 22 muestran los mismos productos PCR+3 pero visualizados en el LI-COR 4300s.

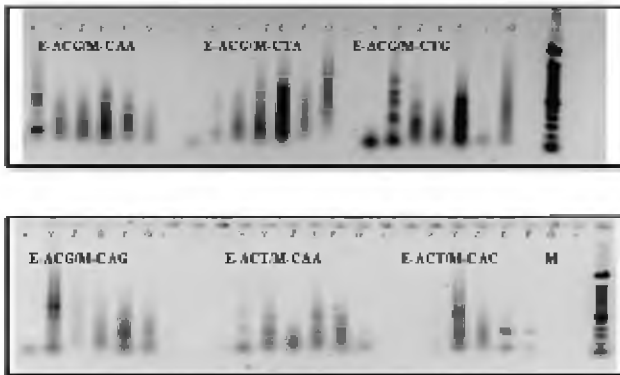


Figura 20. Control en agarosa de productos PCR+3, a) y b) combinaciones AFLPs. Carriles x, y, z, e, f, y g: muestras de *Hypericum*; (-): control negativo de la reacción PCR; M: marcador de talla molecular (100 pb DNA Ladder INVITROGEN®).

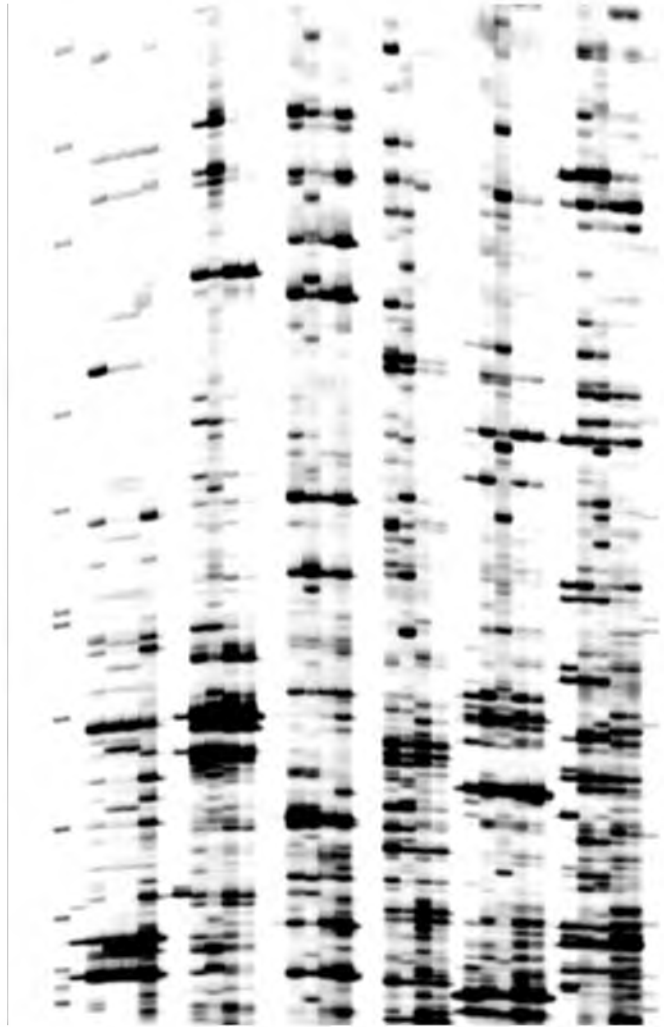


Figura 21. Productos AFLP visualizados en LI-COR 4300s en canal de detección de 800 nm para las muestras de *Hypericum* (x, y, z, e, f, y g); primer carril marcador de talla (50-350 pb).

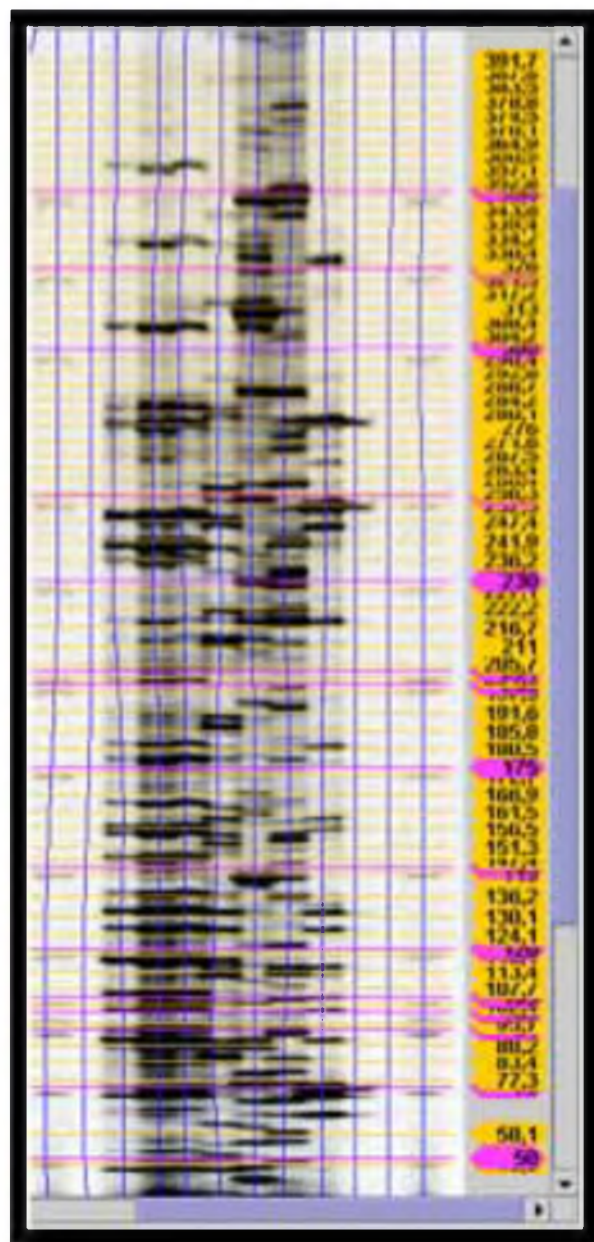


Figura 22. Productos AFLP visualizados en LI-COR 4300s en canal de detección de 800 nm para las muestras de *Hypericum* (x, y, z, e, f, y g); primer carril marcador de talla (50-350 pb).

ANEXOS

ANEXO 1: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

CLOROFORMO ALCOHOL ISOAMÍLICO CIA (24:1)

Para 100 mL

96 mL cloroformo (Triclorometano)
4 mL alcohol isoamílico

10N NaOH

NaOH (pellets) 4 g
Agua destilada aforar a 100 mL

SOLUCIÓN DE BROMURO 7.5 ppm

Añadir 7.5µL de Bromuro de Etidio 10 X a 500 mL de agua destilada

0.1M TE (Diluir cebadores)

0.5 M TRIS.Cl pH 8.0 1 mL
0.5 M EDTA 100 µL

Aforar a 200 mL utilizando agua destilada autoclavada. Autoclavar

10X TAE

Trizma base 48,4 g
0.5 M EDTA pH 8 20 mL
Ácido acético glacial 11,42 mL

Aforar a 1000 mL usando agua destilada estéril, autoclavar y mantener a almacenado a 4°C

0.01M TRIS (SOLUCIÓN PARA CEBADORES)

4 mL de TRIS.Cl, 2M
Aforar a 200 mL usando agua destilada autoclavada, y autoclavar.

Nota: Dilución de cebadores stock concentración final de 100 µM:

1X TAE

100 mL de 10 x TAE en 900 mL de agua destilada.

$\mu\text{M} = \mu\text{moles} / \text{L} = \text{pmoles} / \mu\text{L}$
1 nmol (concentración cebador) = 1000 pmoles

0.5 M EDTA pH 8.0

Añadir 186,1 g de EDTA a 1000 mL de agua. Mezclar vigorosamente con un agitador magnético. Ajustar El pH con NaOH (~20 g de NaOH pellets). Dispensar en alícuotas

Ejemplo:

nmoles = 31,4
31.4 nmoles = 31400 pmoles
100 µM = (31400 pmoles / 100 pmoles/µL) = 314 µL de TE

dNTP's (5 mM) 1000 µL

En un tubo de a 1,5 mL:
 50 µL de cada uno de los nucleótidos A, T, C, G
 800 µL de agua ultra pura
Almacenar a – 20 °C.

5X PCR RAPD

25 mL 1 M TRIS (pH 8.5)
 10 mL 1 M KCl
 500 µL 1 M MgCl₂·6H₂O
 0,25 g BSA
 0,75 g Ficoll 400
 0,05 g Xylene Cyanole

Mezclar en este orden TRIS, KCl, BSA, *Xylene Cyanole*, MgCl₂, después añadir el Ficoll 400. Mezclar hasta que se disuelva el Ficoll. Añadir agua destilada hasta 100 mL. Alicuotar en tubos de 1.5 mL. Almacenar a – 20°C.

TE CONCENTRADO pH 8

2 M Tris HCl (50 mM) 25 mL
 0.5 M EDTA (20 mM) 40 mL
 Agua destilada aforar a 1000 mL

5 M ACETATO DE POTASIO

Acetato de Potasio 29,442 g
 Ácido Acético Glacial 11,5 mL
 Agua destilada aforar a 1000 mL
 Autoclavar y almacenar a 4°C.

0.5 M K₂HPO₄

K₂HPO₄ 57 g
 Agua destilada Aforar a 500 mL
Autoclavar

2X CTAB (AÑADIR EN ORDEN)

1 M Tris pH 8 50 mL
 2M NaCl 350 mL
 0.5 M EDTA 20 mL
 CTAB 10 g
 BME (nombre) 1 mL
 Agua destilada Aforar a 500 mL

GEL-LOADING TAMPÓN (BLUE JUICE) TYPE 10 X (10 ML)

Bromophenol blue 25 mg
 Xylene cyanol 25 mg
 Ficoll (Type 400) 2,5 g
 Agua destilada Aforar a 10 mL

7.5 M ACETATO DE AMONIO

Acetato de Amonio 289,05 g
 Agua destilada Aforar a 500 mL
Filtrar

TAMPÓN TBE 10X

Para 1000 mL

Trizma Base 108 g
 Ácido Bórico 55 g
 EDTA 0.5 M 40 mL
Ajustar volumen con agua destilada

STOCK ACRILAMIDA 30% (Acrilamida: bis-Acrilamida 19:1)

La acrilamida es un agente altamente neurotóxico. Por favor use guantes y tapabocas. Además, trabaje en cámara de extracción cuando manipule el reactivo puro. Las soluciones deben manipularse con guantes.

Acrilamida 28,5 g
Bis-acrilamida 1,5 g
Llevar a 100 mL con agua destilada y almacenar en botella oscura a 4 °C.

STOCK ACETATO DE POTASIO 5 M

En 900 mL de agua destilada disolver 490,75 g de acetato de potasio. Ajustar el volumen a 1000 mL. Autoclavar.

STOCK BLUE JUICE

Preparar una solución con azul de bromofenol al 0,25% y glicerol en agua al 30%. Almacenar a 4 °C.

STOCK NaCl 5 M

Para 1000 mL

Disolver 292,2 g de NaCl (PM 58,44). Autoclavar.

STOCK ARN'sa 10 mg/mL

Disolver ARN'sa pancreática (ARNasa A) a una concentración de 10 mg/mL en 10 mM de Tris HCl pH 7.5 y 15 mM de NaCl. Calentar a

100 °C durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Dispensar en alícuotas y almacenar a -20° C.

STOCK Tris-HCl 1M

PRECAUCIÓN: El HCl es un ácido fuerte. Debe trabajarse en cámara de extracción, con guantes, evite respirar los vapores.

En 800 mL de agua destilada estéril disolver 121,1 g de Trizma base. Ajustar al pH deseado adicionando HCl concentrado.

pH	Vol. HCl
7.45	70 mL
7.6	60 mL
8.0	42 mL
Ajustar volumen a 1000 mL.	
<i>Autoclavar</i>	

10 M ACETATO DE AMONIO

Disolver 779 g de Acetato de Amonio en 800 mL de agua. Ajustar el volumen a 1 litro con agua esterilizada.

GELES DENATURANTES**Solución fijadora para tinción (Fix-stop)**

100 mL de ácido acético glacial + 900 mL de agua ultra pura.

Sol. Madre de nitrato de plata 25% (25 geles)

25 g de AgNO₃ en 100 mL de agua ultra pura.
Consevar a 4 °C en botella oscura.

Carbonato de sodio 30% (1 gel)

60 g de NaCO_3 en 2000 mL de agua ultra pura.
Conservar a 4 °C.

Tiosulfato de sodio 1.5%

1.5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua ultra pura.
Conservar a 4 °C.

Solución fijadora de gel PAGE:

Para 1 placa grande: 1 mL de etanol
3 μL de bind silane
5 μL de ác. Acético glacial

Sol. Archilamida/Bisac 40% (37.5: 1)

Para 100 mL (8 geles)

Acrilamida 40 g
Biacrilamida 1.06 g
Agua ultra pura aforar a 100 mL
Guardar en botella oscura a 4 °C.

Solución Acrilamida 6%

	1 gel	12 geles
Úrea	40 g	500 g
TBE 10X	8 mL	100 mL
Sol acri/bis 40%	12 mL	150 mL
Agua ultra pura	28 mL	350 mL
Vol. Total	80 mL	1000 mL

Dejar agitando toda la noche y conservar a 4 °C en oscuridad.

GEL ACRILAMIDA AL 6%

Acrilamida 6%	80 mL
Persulfato de amonio 10% (APS)	300 μL
TEMED	30 μL

SILICA DESHIDRATADA

Calentar la sílica gel en un horno esterilizador durante 20 minutos a 180°C. Esperar que se enfríe y guardar en los frascos de plástico

AZUL DE PARADA 1X

98%	Formamida	49 mL
10 mM	EDTA	196 mg
0.3%	Bromophenol	150 mg
1 punta espátula	Xilene cyanol	
Agua destilada		1 mL

Poner 3 μL 10 μL ADN

PROTOCOLO DE Mariac *et al.* 1999, modificado por Morillo (2002)

Tampón de extracción:

Componentes	Cantidad (50 mL)
Sorbitol	3,18 g
Trizma base	0,60 g
EDTA	0,009 g
Bisulfito de sodio	0,25 g

Tampón de lisis (CTAB 4%)

Componentes	Cantidad (100 mL)
Trizma base	1,2 g
NaCl	7,2 g
EDTA	0,74 g
CTAB	4 g

Protocolo de Extracción de ADN de Jhingan (1992)**PEX tampón**

16,4 g	NaCl
40g	PEX
40 mL	Tris HCl 1 M pH 7.5
8 mL	EDTA 0.5 M

Completar a un volumen final de 400 con agua destilada

- 1X TE tampón (10 mL 1 M Tris pH 7.5; 2 mL 0.5 M EDTA pH 8.0, aforar a 1 L con agua)

Protocolo de Extracción de ADN de Jhingan (1992) Modificado por E. Morillo (2002)**Tampón de extracción (maíz)**

PEX	20 % (P/V)
NaCl	1,7 M
EDTA (pH 8.0)	10 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	200 Mm

Protocolo de Extracción de ADN de Jhingan (1992) v Dellaporta (1983)**CTAB 2X (Para 100 mL)**

Sorbitol 140 mM	2,55g
Tris-HCl 220 mM, pH 8.0	2,66 mL
EDTA 22 mM	0,81 g
NaCl 800 mM	4,67 g
CTAB 1,6%	1,6 g
Sarkosyl 1%	1 g

Protocolo de Extracción de ADN de (Viruel y Hormaza 2002)**CTAB 2X (Para 100 mL)**

Componentes	Cantidad (100 mL)	Concentración
Tris HCl 1M pH 8	10 mL	100 mM
NaCl	8,18 g	
EDTA 0.5M pH 8	4 mL	0,02 mM
CTAB	2 g	2%
PVP	1 g	1%
Bisulfito sódico	0,1 g	0,1%

Tampón de lavado ADN

Para 100 mL

76 mL etanol 100%
24 mL agua destilada

Protocolo de Extracción de Colombo (1998)**Tampón de extracción (CTAB 4X)**

Tris HCl 1M pH 8	50 mL
NaCl 5M	125 mL
EDTA 0.5 M pH 8	20 mL
Agua destilada estéril	300 mL

Protocolo de Extracción de Colombo (1998) modificado por Piedra G. 2004**Tampón de extracción CTAB 1X:**

Componentes	Cantidad (100 mL)	Concentración final
Tris HCl 1M pH 8	5 mL	50 mM
NaCl 5M	20 mL	1 M
EDTA 0.5M pH 8	4 mL	20 mM
CTAB	1 g	1 %
PVP	1 g	1 %

Etanol Acetato de sodio*Para 100 mL*

79 mL de etanol 100 %
 8 mL de acetato de sodio 2,5M (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

Protocolo de Extracción de Ferreira y Grattapaglia (1998)**Tampón de extracción 2X CTAB***Para 100 mL:*

Componentes	Cantidad (100 mL)	Concentración final
CTAB	2 g	2 %
Tris HCl 1M pH 8	10 mL	100 mM
NaCl	8,12 g	1,4 M
EDTA 0.5 M	4 mL	20 mM
PVP	1 g	1 %
Agua destilada estéril	Hasta aforar a 100 mL	
2-mercaptoetanol*	200 µl	

* Adicionar antes de uso

GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (o ADN)

Ácido nucleico formado por desoxirribonucleótidos, en los que el azúcar es desoxirribosa y las bases nitrogenadas son adenina, timinutosa, citosina y guanina. Excepto en ciertos virus a ARN, el ADN constituye la información genética. En su forma nativa, el ADN es una hélice doble.

Ácido ribonucleico (o ARN)

Ácido nucleico formado por ribonucleótidos, en los que el azúcar es ribosa y las bases nitrogenadas son adenina, uracilo, citosina y guanina. Generalmente es un polímero de cadena simple. Existen varios tipos diferentes de ARN que cumplen funciones específicas en la síntesis de proteínas: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr) y ARN de transferencia (ARNt).

ADN polimerasa

Complejo enzimático que cataliza la síntesis de ADN usando ADN como molde (replicación).

AFLP (*Amplified Fragment-Length Polymorphism*)

Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. Método muy sensible de detección de polimorfismos en el que el ADN se digiere con enzimas de restricción, los fragmentos se ligan a adaptadores y se amplifican selectivamente por PCR usando cebadores específicos. Los perfiles se analizan en geles de poliacrilamida.

Agarosa

Fracción extraída del agar y responsable del poder gelificante de éste. Por sus propiedades, forma una

matriz inerte que sirve para separar moléculas por electroforesis y cromatografía.

Alcohol

Nombre que recibe una familia de compuestos químicos orgánicos que incluye al metanol, etanol, isopropanol, y otros que contienen un grupo hidroxilo en su molécula.

Alelo

Cada una de las dos (o más) formas alternativas que puede tener un gen y que se localizan en el mismo lugar (locus) del par de cromosomas homólogos.

Ampicilina

Antibiótico derivado de la penicilina que interfiere en la síntesis de la pared celular, impidiendo el crecimiento bacteriano. El gen asociado con la resistencia a la ampicilina es muy usado en ingeniería genética como marcador de selección.

Amplificación génica

Aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular.

ARN'sa (ARN'sa o ribonucleasa)

Enzima que hidroliza ARN.

Bacteria

Microorganismo procarionte (es decir, sin núcleo), generalmente recubierto por una pared celular rígida.

Biotechnología

Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas

biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos. O bien: empleo de organismos vivos para la obtención de un producto o servicio útil para el hombre.

BLAST

Programa de computación que sirve para identificar secuencias genéticas similares en diferentes organismos.

Bromuro de etidio

Colorante que se intercala entre los pares de bases del ADN, y que florece a la luz UV. Empleado de rutina para visualizar ADN en geles de agarosa.

Cebador (iniciador)

Segmento corto de ADN o ARN que se aparea a una cadena simple de ADN y sirve de punto de partida para la síntesis de una cadena complementaria, en presencia de nucleótidos y de la enzima ADN-polimerasa. En inglés, *primer*.

Clonación de células u organismos

Proceso de multiplicación de células genéticamente idénticas, a partir de una única célula. Cuando se refiere a organismos, significa obtener uno o varios individuos a partir de una célula somática o de un núcleo de otro individuo, de modo que los individuos clonados son iguales al original (dador del núcleo con material genético).

Clonación de genes o fragmentos de ADN

Metodología que permite multiplicar un gen o fragmento de ADN en una bacteria (generalmente *Escherichia coli*). Para clonar un gen o un fragmento

de ADN se emplean vectores de clonado (plásmidos), que sirven para introducir el fragmento de ADN en las bacterias.

Digestión

Conversión de alimentos complejos en formas simples, mediante reacciones enzimáticas.

Dímero

Molécula formada por la unión de dos monómeros

Diploide

Organismo o célula que posee dos juegos completos de cromosomas homólogos y por lo tanto dos copias (alelos) de cada gen.

Electroforesis

Técnica por la cual las moléculas (proteínas, ADN, ARN) se separan en un gel a través de un campo eléctrico, de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica.

Enzimas de restricción

Enzimas que reconocen y cortan en secuencias específicas de ADN de cadena doble. Son comunes en bacterias, y herramientas fundamentales de la ingeniería genética.

Extracción

Empleo de un solvente para remover uno o más componentes de una mezcla

Fingerprint de ADN

Patrón único de fragmentos de ADN identificados por *Southern blotting* (utilizando una sonda complementaria a una región polimórfica) o por PCR (utilizando cebadores-cebadores que flanquean la región polimórfica).

Flujo génico

Dispersión o migración de genes de una población a otra.

Gel

Material de consistencia gelatinosa, usado para solidificar medios de cultivo, para encapsular células, y como matriz de la electroforesis. En este caso, se emplean generalmente geles de agarosa y de poliacrilamida.

Gen

Unidad física y funcional del material hereditario que se transmite de generación en generación. Desde el punto de vista molecular, es la secuencia de ADN completa necesaria para la producción de una proteína o un ARN funcional.

Gen marcador (marcador genético)

Segmento de ADN cuya herencia se puede rastrear. Puede ser un gen o un segmento sin función conocida. Dado que las secuencias de ADN que se encuentran contiguas en un cromosoma tienden a heredarse juntas, los marcadores se usan como herramientas para rastrear el patrón hereditario de genes que aún no han sido identificados, pero cuyas ubicaciones aproximadas se conocen.

Genotipo

Constitución genética completa de una célula u organismo. También suele referirse a la combinación de los alelos de uno o más loci específicos.

Haploide

Célula u organismo que tiene un solo miembro de cada par de cromosomas homólogos y por lo tanto

una copia (alelo) de cada gen. Los gametos son haploides.

Heterocigoto

Célula u organismo diploide que tiene dos alelos diferentes de un gen particular.

Homocigoto

Célula u organismo diploide que tiene dos alelos idénticos de un gen particular.

Ligasa

Enzima capaz de unir dos moléculas de ácidos nucleicos para formar una cadena continua. El ADN ligasa une dos moléculas de ADN entre sí.

Liofilización

Proceso por el cual se elimina el agua, a través de la desecación al vacío y a muy bajas temperaturas.

Loci

En latín, plural de locus.

Locus

En genética, sitio específico del cromosoma donde se encuentra un determinado gen.

Microsatélite

Segmento de ADN que se caracteriza por contener un número variable de copias (generalmente entre 5 y 50) de una secuencia de 5 o menos bases (llamada unidad de repetición).

Mutación

Cambio permanente y heredable en la secuencia de nucleótidos de un cromosoma, generalmente en un único gen. Puede originar, o no, cambios en el fenotipo.

PCR

Siglas en inglés para Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*). Reacción *in vitro* de amplificación del ADN por acción de la enzima ADN-polimerasa en presencia de iniciadores y un molde de ADN.

PCR en tiempo real (*Real Time PCR*)

Tipo de PCR cuantitativa en la que se usa una sonda fluorescente que se va acumulando durante la amplificación, permitiendo seguir la cinética de aparición del ADN amplificado. Esto, a su vez, permite cuantificar la cantidad de material (ADN molde) de partida.

Peso molecular

Suma de los pesos relativos de los átomos de una molécula.

Plásmido

Porción de ADN circular que puede mantenerse como elemento extracromosomal en bacterias u otras células. Lleva pocos genes y no es indispensable para el crecimiento y supervivencia de la célula hospedadora. Los plásmidos pueden transferirse de un organismo a otro, por eso se usan en ingeniería genética como vectores de clonado y expresión.

Polimorfismo cromosómico

Variación en la estructura de un determinado cromosoma. Se visualiza en el cariotipo, y en los eucariontes inferiores, por electroforesis de campo pulsado.

Polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD)

Método de detección de polimorfismos por

amplificación por PCR usando cebadores diseñados al azar.

Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Método para detectar polimorfismo en el ADN, basado en la generación de fragmentos de diferentes tamaños producidos por digestión con enzimas de restricción.

Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

Marcador genético del inglés *Single Nucleotide Polymorphism* resultante de la variación en una secuencia situada en una determinada posición dentro de una secuencia de ADN.

Precipitación

Separación de una sustancia (como sólido) de la solución de la que formaba parte.

Proteína

Macromolécula formada por muchos aminoácidos unidos por uniones peptídicas.

Protocolo

Documento de normalización que establece su justificación, los objetivos, el diseño, la metodología y el análisis previsto de los resultados, así como las condiciones bajo las que se realizará y desarrollará.

QTL (*Quantitative Trait Locus*)

Locus de un carácter cuantitativo, cuya variación alélica está relacionada con la variación de un carácter cuantitativo.

Restricción (de ADN)

Degradación del ADN con enzimas de restricción.

RT-PCR

Variación de la PCR en la que primero se obtiene un ADN complementario o copia a partir del ARN, a través de la acción de la enzima transcriptasa reversa. El ADN copia es luego amplificado siguiendo el protocolo de PCR estándar.

SDS

Del inglés, *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sodio). Detergente iónico que se une a las proteínas desnaturalizándolas y otorgándoles carga negativa. Como esta unión es proporcional al tamaño de las proteínas, se lo emplea en métodos analíticos de separación.

Secuencia

Orden preciso de bases en un ácido nucleico o de aminoácidos en una proteína.

Secuenciación del ADN

Técnica que permite conocer la secuencia exacta de un fragmento de ADN.

Sitio de restricción

Secuencia del ADN donde se une y corta una enzima de restricción.

Sobrenadante

Fase líquida que queda luego de la centrifugación de una mezcla. El material concentrado en el fondo se denomina pellet o sedimentado.

T4-ligasa

Enzima ligasa del bacteriófago T4, la más usada en ingeniería genética para construir moléculas de ADN recombinante.

Transgénico

Se refiere a una planta o animal que porta uno o más transgenes.

Ultracentrifugación

Tipo de centrifugación que ocurre en una ultracentrífuga, en la que el rotor alcanza velocidades muy altas. Se emplea con fines preparativos (para separar y purificar virus, organelas y otros componentes celulares) o analíticos (para caracterizar macromoléculas).

Variación genética

Cambios atribuidos a variaciones en el genotipo.

Viroide

Partícula infecciosa similar a un virus, pero mucho más pequeña, que consiste sólo de un ARN de cadena simple y puede causar enfermedad en plantas.

Virus

Pequeña partícula que consiste en ARN o ADN encerrado en una cubierta proteica. Sólo puede multiplicarse en la célula hospedadora adecuada.

FICHAS TÉCNICAS

	Ficha técnica	N° 1
Principio del método	Toma de muestras vegetales y microbianas	
Campo de aplicación	Muestras vegetales secas y frescas Muestras microbianas	
Reactivos	Sílica Gel deshidratada Hielo	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Tijeras de podar Fundas ziploc etiquetadas Mascarilla Hielera Incubadora	
Procedimiento detallado	<i>Muestras secas:</i> - Llenar las fundas ziploc con 100 g de sílica gel y eliminar el aire de la funda. - Cortar 20 g de tejido foliar de la parte apical de cada planta, o primordios foliares y colocar inmediatamente en la sílica gel para su secado y conservación. - Refrescar la sílica gel después de 48 horas. - Verificar que la muestra esté completamente seca y eliminar la sílica de la funda para su procesamiento posterior. <i>Muestras frescas:</i> - Cortar 2 g de tejido foliar de la parte apical de cada planta, o primordios foliares. - Colocar inmediatamente en tubos eppendorf, codificarlos y sumergirlos en el hielo hasta su procesamiento. <i>Muestras microbianas:</i> - Aislar la muestra y sembrarla en un medio de crecimiento. - Incubar el cultivo.	
Observaciones	El proceso de aislamiento e incubación dependerá del tipo de muestra microbiana.	
Referencias bibliográficas	Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1998. Introducción a uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Brasilia. EMBRAPA-CENARGEN, pp 220	

	Ficha técnica	N° 2
Descripción del método	Protocolo de Extracción de ADN vegetal mediante el agente químico Potassium Ethil Xantogenato (PEX)	
Campo de aplicación	Extracción de ADN de maíz, quinua, papa, chocho, banano, platano, piña	
Reactivos	Tampón Potassium Ethil Xantogenato (PEX) Acetato de Amonio 7.5 M Solución acetato de amonio y etanol (1:6 v/v) Isopropanol Etanol 95% β-Mercaptoetanol Tampón 0,1 X TE	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Pistilo para maceración Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	<i>DIA 1:</i> 1. Cortar hojas frescas (1 - 3 g) o secas (0,1 – 0,3 g) y poner en tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales deben estar sumergidos en hielo picado; colocar 50 µL tampón PEX y antioxidante (se puede usar una punta de espátula o 10 µL de β-Mercaptoetanol). Moler las hojas en este tampón usando un pistilo, añadir 450 µL de PEX y homogenizar la muestra. Poner los tubos en baño de agua a 65°C por una hora. Se puede guardar congelado a -20 °C. 2. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos.	

Procedimiento detallado	3. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo que contenga 500 μL de acetato de amonio 7.5 M y etanol en relación 1:6 v/v (otros laboratorios usan 1:20). Agitar un poco y centrifugar por 1 - 3 minutos a 13000 rpm (o 5 minutos a 10000 rpm). Eliminar el sobrenadante, colocar etanol al 95%, en una relación 3:1 y agitar. Centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm, eliminar el alcohol y dejar secar los tubos invertidos sobre papel toalla toda la noche o en la microestufa a 37 °C por 30 minutos. 4. Luego añadir 100 μL TE para disolver la pastilla de ADN. Incubar a baño de agua a 65°C, durante 15 minutos, agregar 200 - 350 μL de acetato de amonio 7.5 M. Agitar los tubos en vórtex y centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm. 5. Poner en tubos nuevos el sobrenadante con 300 μL de isopropanol en relación 1:1 (isopropanol y μL muestra). Agitar suavemente y almacenar a -20° C. <i>DIA 2:</i> 6. Agitar suavemente el tubo y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto, eliminar el sobrenadante, el ADN habrá precipitado como una mancha blanquecina. 7. Enjuagar el pellet de ADN con etanol al 70%, agitar con cuidado y centrifugar los tubos 1 minuto a 13000 rpm. Descartar el sobrenadante y poner los tubos en posición invertida sobre papel toalla por lo menos una hora (2 días en refrigeración precipita mejor la proteína). Añadir 200 ml de TE tampón. 8. Disolver el pellet ADN en TE tampón y colocar los tubos en baño agua por una hora. Luego dejar a temperatura ambiente por 30 minutos y guardar a -20 °C.
Observaciones	El etanol e isopropanol deben estar fríos, para lavar y precipitar el ADN. La adición de acetato de amonio 7,5 M sirve para precipitar proteínas. Cuantificar el ADN en un gel de agarosa al 1%.
Referencias bibliográficas	Jhingan, A. 1992. A novel techonology for DNA isolation. Methods Mol. Cell. Biol. 3:15-22

	Ficha técnica	N° 3
Descripción del método	Protocolo de Extracción de ADN mediante el agente químico CTAB (CIP, 1998)	
Campo de aplicación	Extracción de ADN de oca, papa	
Reactivos	Tampón de extracción: CTAB 1 X Solución cloroformo: alcohol isoamílico 20:1 (CIA) Solución acetato de potasio 5 M Solución acetato de sodio 3 M Isopropanol Etanol 70% TE 0,1 X Etanol 100% ARNsa Nitrógeno líquido	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	1. Macerar las hojas con nitrógeno líquido y 300 ml tampón de extracción (CTAB). 2. Incubar a 65 °C por 30 minutos. 3. Adicionar de 200 ml acetato de potasio 5 M, e incubar a 0°C por 15 minutos. 4. Adicionar en relación 1:1 la solución Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1), mezclar bien. 5. Centrifugar a 5000 rpm por 25 minutos. 6. Colectar el sobrenadante y añadir isopropanol (1:1) dejar por 2 minutos y mezclar suavemente. 7. Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos. 8. Eliminar el sobrenadante y enjuagar el <i>pellet</i> con etanol al 70%.	

Procedimiento detallado	9. Secar el pellet al ambiente o en la microestufa. 10. Disolver el pellet con 200 ml de tampón TE o dependiendo del tamaño del <i>pellet</i>. 11. Adicionar 200 ml de acetato de sodio 3 M, mezclar bien. 12. Adicionar 200 ml de Etanol 100%. Mezclar suavemente. 13. Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el <i>pellet</i> a temperatura ambiente. 14. Disolver en 100 µL de tampón TE. Añadir ARN'sa.
Observaciones	Cuantificar el ADN en un gel de agarosa al 1%.
Referencias bibliográficas	Comunicación CIP-Lima, 1998

	Ficha técnica	N° 4
Descripción del método	Protocolo de Extracción de ADN vegetal mediante el agente químico PEX. Modificado por Morillo (INIAP, 2002) del método original de Jhingan (1992)	
Campo de aplicación	Extracción de ADN de maíz, quinua, trigo	
Reactivos	Tampón de extracción PEX 20 % (P/V) Solución cloroformo alcohol isoamílico 20:1 (CIA) Solución etanol 95% - acetato de amonio 10 M (8:1) Etanol 70% TE 0.1 X Tris-HCl 1 mM EDTA 0,1 mM pH 8.0 ARNsa	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	<i>DIA 1:</i> 1. Pesar 1 – 3 g de hojas jóvenes. 2. Colocar el tejido triturado en un tubo eppendorf (1,5 mL) esterilizado. 3. Adicionar 50 µL del tampón de extracción PEX y proceder a moler el tejido con una varilla de plástico con la punta aguzada (de la misma forma del tubo) hasta obtener una pasta espesa. 4. Llenar el tubo con 450 µL del mismo tampón y agitarlo por 20 a 30 s. 5. Incubar esta mezcla a 65 °C por 45 minutos (Este tiempo puede variar hasta una hora dependiendo de los resultados). 6. Agitar nuevamente en vórtex y centrifugar a máxima velocidad por 5 a 10 min. 7. Tomar el sobrenadante (aprox. 400 µL) y añadir igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (20:1) en otro tubo. 8. Agitar y centrifugar a 10 000 rpm por un min. 9. Tomar el sobrenadante y precipitarlo con 2 a 3 volúmenes de etanol al 95%, acetato de amonio 10 M (8:1) para mantenerlo a –20 °C por una noche.	

Procedimiento detallado	<i>DIA 2:</i> - Centrifugar a 10 000 rpm por 20 min. - Descartar el sobrenadante directamente cuidando de no romper la pastilla de ADN formada después de la centrifugación. - Al ADN precipitado agregar aproximadamente 500 µL de etanol al 70%. Centrifugar y descartar directamente el sobrenadante. - Dejar evaporar el etanol restante en la microestufa a 37 °C por 30 minutos aproximadamente. - Resuspender el pellet de ADN dependiendo de su tamaño en 100, 200 o 300 µL de TE 0.1 X (Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8.0) incubando a 65 °C por una hora. Se puede conservar a 4 °C por pocos días ó a -20 °C a largo plazo. <i>OPCIONAL:</i> - Para descartar el ARN existente en la solución de ADN digerir con ARN'sa a (10 µg/mL) incubando a 37 °C por 30 minutos a 4 °C durante toda la noche. Según el volumen de la solución de ADN (100, 200 o 300µL) se añade 1, 2 o 3µL de ARN'sa respectivamente. - Para separar el material particulado que aparece en esta etapa, centrifugar brevemente y transferirlo a un nuevo tubo. - Precipitar el ADN agregando aproximadamente 6 volúmenes de etanol 9%, acetato de sodio 3 M (20:1) y mantener a -20 °C por 30 min. - Centrifugar por 10 minutos a máxima velocidad. - Decantar el sobrenadante y secar el precipitado de ADN. - Resuspender el pellet en 100 µL de TE 0.1 X y calentar a 65 °C hasta observar la completa homogenización del medio. - Conservar a 4 °C las preparaciones de ADN. - Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.
Observaciones	Colocar el tejido directamente en el tampón de extracción puede evitar degradación del ADN cuando las muestras vienen directamente del campo.
Referencias bibliográficas	Jhingan, A. 1992. A novel techonology for DNA isolation. Methods Mol. Cell. Biol. 3:15-22. INIAP, 2002. Informe Anual Dpto. Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología. EESC. Quito

	Ficha técnica	N° 5
Descripción del método	Protocolo de Extracción de ADN mediante el agente químico CTAB (modificado por Jarrín y Velasco, 1997, com. pers.)	
Campo de aplicación	Extracción de ADN de plantas y hongos	
Reactivos	Tampón CTAB 1 X Etanol 70% Cloroformo Acetato de amonio 10 mM Acetato de sodio 0,2 M ARN'sa	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	1. En un tubo, combinar: 1 g de tejido vegetal y 5 mL de tampón de extracción (CTAB). 2. Incubar a 65 °C por 1 hora. 3. Añadir un volumen (5 mL) de cloroformo (no afecta los resultados si se añade en exceso). 4. Centrifugar a 3000 rpm por 20 min. 5. Inmediatamente transferir la fase acuosa (o sobrenadante) a un tubo nuevo. 6. Añadir un volumen de acetato de sodio 0,2 M en etanol al 70% (v/v). 7. Agitar suavemente por 30 minutos a 4°C. 8. Precipitar el ADN con un volumen de etanol (Si el etanol ha sido enfriado previamente a -20°C, mejora la precipitación). 9. Centrifugar a 3000 rpm por 25 min.	

Procedimiento detallado	10. Descartar el sobrenadante. 11. Enjuagar el sedimento con 0,7 mL de acetato de amonio 10 mM para eliminar el CTAB residual. 12. Enjuagar con etanol al 70% (v/v) para eliminar sales. 13. Decantar el etanol. 14. Secar a 40 °C por 1 hora, o 90 minutos al vacío, o 3 horas a temperatura ambiente. 15. Resuspender en 100 µL de TE con 2µL de ARN'sa. Este paso se puede efectuar a 65 °C por 1 hora, o a temperatura ambiente por una noche.
Observaciones	Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.
Referencias bibliográficas	Jarrín, F. y Velasco, M. 1997. Informe Anual. CIP-Quito. Ecuador

	Ficha técnica	N° 6
Descripción del método	Extracción de ADN vegetal mediante el agente químico CTAB. Modificado por Morillo (INIAP, 1999) del método original de Jhingan (1992) y Dellaporta (1983)	
Campo de aplicación	Extracción	
Reactivos	CTAB 2 X Etanol 70% Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) Tampón TE (0.1 M) β-Mercaptoetanol (se agrega justo antes de usar el tampón) Isopropanol ARNs _a	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrifuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	1. Sembrar esquejes de cada clon en invernadero. A los 15 días tomar entre 4 y 6 g de hojas y colocarlas en fundas plásticas con 50-60 g de sílica gel por una semana. 2. Combinar en un tubo de 1.5 mL, 100 mg de tejido seco macerado con 1 mL de CTAB 2 X y 10 mL de β-Mercaptoetanol. 3. Incubar la muestra homogenizada a 55 °C por 20 minutos y centrifugarla a 13000 rpm por 20 minutos. 4. Transferir el sobrenadante (aprox. 400 µL) a un nuevo tubo conteniendo igual volumen de cloroformo alcohol isoamílico 24:1 (CIA), agitar y centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos.	

Procedimiento detallado	5. Pipetear el sobrenadante teniendo cuidado de separar la interfase formada y combinarla en un nuevo tubo con un volumen de isopropanol. 6. Dejar precipitar el ADN por una noche a -20° C, y centrifugar a velocidad tope por 3 min. 7. Lavar dos veces el ADN con etanol 70%, y secar el <i>pellet</i> a 37 °C en una microestufa por 30 minutos o a temperatura ambiente por una hora. 8. Incubar el <i>pellet</i> por una hora a 65 °C en 100 µl de tampón TE con 1 µl de ARN'sa. 9. Almacenar a -20 °C la solución de ADN hasta su cuantificación.
Observaciones	Antes de cuantificar las soluciones, es conveniente centrifugarlas a 13000 rpm por 1 minuto. En este punto se puede observar precipitación de soluciones contaminantes como proteínas, si esto sucede retirar la solución de ADN a un nuevo tubo. Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.
Referencias bibliográficas	Jhingan, A. 1992. A novel techonology for DNA isolation. Methods Mol. Cell. Biol. 3:15-22 Dellaporta, S.L., J. Wood y J.B. Hicks. 1983. A plant DAN minipreparation: Versión II. Plant Molecular Biology Reporter 1 (14): 19-21 INIAP. 1999. Informe Anual Dpto. Nacional de Recursos Fitogeneticos y Biotecnologia. EESC - Quito

	Ficha técnica	N° 7
Descripción del método	Extracción de ADN vegetal mediante el agente químico CTAB (Viruel y Hormaza, 2002)	
Campo de aplicación	Extracción de ADN vegetal de chirimoya, guanábana, camote	
Reactivos	Tampón de extracción CTAB 2X Cloroformo: Alcohol Isoamílico CIA (24:1) Tampón de lavado ADN (76 mL etanol al 100% y 24 mL agua) Isopropanol Etanol 70% Metabisulfito de sodio β-Mercaptoetanol ARNsa	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María	
Procedimiento detallado	1. Calentar un baño María a 65°C. (Poner el isopropanol y etanol al 70% en el congelador). 2. Marcar debidamente los tubos eppendorf. 3. Pesar aproximadamente 0.5 g de hojas sin nervaduras y ponerlas en un mortero, adicionar una pizca de meta bisulfito de sodio y triturar hasta obtener un polvo homogéneo. 4. Introducir el polvo obtenido en un tubo eppendorf y añadir 750 µL de tampón de extracción CTAB y homogeneizar bien hasta obtener una papilla. 5. Añadir 2 µL de mercaptoetanol en la campana de extracción de olores y mezclar en el vórtex. 6. Incubar en el baño maría a 65°C durante ½ hora mezclando de vez en cuando por inversión (cada 10 minutos). 7. Luego de la incubación, agregar 750 µL de CIA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). Mezclar por inversión hasta que las dos fases sean homogéneas, y una vez conseguido, mezclar en el vórtex durante 2 minutos aproximadamente.	

Procedimiento detallado	8. Centrifugar las muestras durante 15 minutos a 10000 rpm, de preferencia a 4°C. 9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio, aforar la muestra con tampón de extracción a 750 µL y añadir nuevamente 750 µL de CIA. 10. Homogeneizar las muestras por inversión y mezclar en el vórtex durante 2 minutos aproximadamente. 11. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir lentamente 750 µL de isopropanol y mezclar suavemente. Invertir los tubos para mezclar completamente el contenido. Se observará como unos hilos o una pelotilla (en caso contrario, se ponen las muestras a – 20°C durante 30 minutos). 12. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C (en el fondo del tubo aparecerá un <i>pellet</i> de ADN). Quitar el sobrenadante y añadir 800 µL de tampón de lavado. 13. Dejar durante 20 minutos por lo menos en la nevera. 14. Centrifugar 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante y añadir 100 µL de etanol al 70% a cada tubo y centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos. 15. Eliminar el sobrenadante rápidamente y dejar secar boca abajo. Colocar las muestras en la micro estufa a 37°C por media hora o hasta que se haya eliminado completamente el olor a etanol. 16. Resuspender el <i>pellet</i> en 100 µL TE (volumen depende del tamaño del <i>pellet</i>). Dejar en el frigorífico a 4°C hasta el siguiente día, o si se procesa el mismo día, disolverlo en el baño maría a 65°C durante 15 minutos, para posteriormente incubarlo a 4°C durante 5 minutos. 17. Tratar con ARN'sa por cada 100 µL de ADN, colocar 1 µL de ARN'sa. Agitar en un vórtex y centrifugar. Colocar en la microestufa por ½ hora aproximadamente. Conservar el ADN a 4°C.
Observaciones	De acuerdo a la cantidad de muestras, vigilar durante el proceso que no se borren la codificación con los alcoholes utilizados. Se pueden conservar las muestras hasta el siguiente día a 4°C. Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.
Referencias bibliográficas	Viruel y Hormanza, 2002. Characterization and cross – species amplification of microsatellites markers in cherimoya. Mol. Ecol. Notes 4. 746-748

	Ficha técnica	N° 8
Descripción del método	Protocolo de extracción de ADN vegetal mediante el agente químico CTAB (Colombo <i>et al.</i> , 1998)	
Campo de aplicación	Extracción de ADN vegetal de yuca, palma africana,	
Reactivos	Tampón de extracción (CTAB 4X) CIA (24:1) Isopropanol Tampón TE (0,1 M) Mercaptoetanol Etanol 70%	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	1. Precalentar la solución madre en microondas por 45 s y añadir 20 g de CTAB. Aforar a 500 mL con agua destilada. 2. Añadir 1 mL de tampón precalentado más 25.0 µl de mercaptoetanol a 0.05 g de tejido seco de cada accesión. 3. Incubar a 65°C por 2 horas agitando cada 30 minutos. 4. Centrifugar a velocidad máxima por 10 minutos. Tomar el sobrenadante y aforar los tubos a 1 mL con el tampón de extracción. 5. Adicionar 1 mL de CIA (24:1) y agitar manualmente. 6. Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos. 7. Capturar el sobrenadante sin contaminar con la interfase y repetir el paso 4. 8. Adicionar 800 µl de isopropanol (igual volumen de sobrenadante). 9. Centrifugar de inmediato por 15 minutos a 12000 rpm. 10. Retirar el isopropanol y lavar con 1 mL de etanol al 70% la pastilla de ADN formada. 11. Secar a temperatura ambiente ó en la microestufa por 30 minutos a 37°C. 12. Resuspender el ADN en 100 ml de TE a temperatura ambiente por toda la noche.	
Observaciones	Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.	
Referencias bibliográficas	Colombo, C.; Second, G.; Losada Valle, T. and Charrier, A. 1998. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (<i>Manihot esculenta</i> Crantz). I) RAPD markers. Genetics and Molecular Biology 21, 11 105-113	

	Ficha técnica	N° 9
Principio del método	Protocolo de extracción de ADN vegetal mediante el agente químico CTAB. Adaptado por Piedra (INIAP, 2004) del método original de Colombo (1998)	
Campo de aplicación	Extracción de ADN de aguacate, maíz, fréjol, tomate	
Reactivos	Tampón de extracción CTAB 1 X Cloroformo Alcohol Isoamílico CIA (24:1) Etanol Acetato de sodio Etanol Acetato de amonio Meta bisulfito de sodio Mercaptoetanol Etanol al 100% ARNsa	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	1. Precalentar el baño maría a 65°C. 2. Colectar 100 µL de tampón 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 tampón de extracción precalentado más 12 µL de mercaptoetanol. 5. Incubar en baño maría por 1 hora, agitando cada 30 minutos. 6. Centrifugar las muestras a 13000 rpm por 10 minutos. 7. Sacar el sobrenadante a un tubo nuevo y aforar las muestras con tampón de extracción a 750 µL, añadir 750 µL de CIA (24:1). 8. Agitar fuertemente en un vórtex 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 tampón de extracción a 750 µL, añadir 750 µL de CIA (24:1).	

Procedimiento detallado	11. Agitar fuertemente en un vórtex 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. Se observará la formación de unos hilitos o pelotilla (en caso contrario, se ponen las muestras por 15°C a 30 minutos a – 20°C). 14. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm. 15. Eliminar el etanol y añadir 300 µL de etanol acetato de sodio por 5 minutos. 16. Eliminar el sobrenadante y añadir 100 µL de etanol acetato de amonio, eliminar rápidamente el sobrenadante. 17. Dejar secar boca abajo y colocar en la micro estufa por media hora o hasta que se haya eliminado completamente el olor a etanol. 18. Resuspender el <i>pellet</i> en 100 µL TE (volumen depende del tamaño del <i>pellet</i>). Dejar en el frigorífico a 4°C hasta el siguiente día, o si se hace en el mismo día, disolverlo en el baño maría a 65°C durante 15 minutos, para posteriormente incubarlo a 4°C durante 5 minutos. 19. Tratamiento con ARN'sa por cada 100 µL de ADN se coloca 1 µL de ARN'sa. Agitar en un vórtex y centrifugar. Colocar en la micro estufa por 30 minutos aproximadamente. 20. Conservar el ADN a 4°C.
Observaciones	Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.
Referencias bibliográficas	Colombo, C.; Second, G.; Losada Valle, T. and Charrier A. 1998. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (<i>Manihot esculenta</i> Crantz). I) RAPD markers. Genetics and Molecular Biology 21, 11 105-113. INIAP. 2004. Informe Anual Dpto. Nacional de Recursos Fitogeneticos y Biotecnologia. EESC, Quito

	Ficha técnica	N° 10
Descripción del método	Protocolo de extracción de ADN vegetal mediante el agente químico CTAB (Ferreira y Grattapaglia, 1998)	
Campo de aplicación	Extracción de ADN de chirimoya, camote y yuca	
Reactivos	Tampón de extracción CTAB 2X CIA (24:1) Isopropanol TE (0.1 M)	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrifuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	1. Añadir 700 µl de tampón a 0,05 g de tejido seco de cada material. 2. Incubar a 65 °C por 1 hora agitando cada 30 min. 3. Centrifugar a velocidad tope máxima por 15 min. 4. Tomar el sobrenadante y añadir 600 ml de CIA (24:1). Homogeneizar. 5. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min. 6. Repetir el paso 4 y 5. 7. Adicionar 400 µl de isopropanol (2/3 volumen de sobrenadante). 8. Centrifugar por 4 minutos a 13000 rpm. Si el <i>pellet</i> no es visible colocar el tubo a -20 °C durante 30 minutos y centrifugar nuevamente. 9. Retirar el isopropanol y lavar dos veces con 1 mL de etanol al 70% la pastilla de ADN formada. 10. Secar en la microestufa por 30 minutos a 37°C. 11. Resuspender el ADN en 100 µl de TE a temperatura ambiente por toda la noche.	
Observaciones	Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.	
Referencias bibliográficas	Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción a uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Brasilia. EMBRAPA-CENARGEN. pp 220	

	Ficha técnica	N° 11
Descripción del método	Protocolo de extracción de ADN vegetal mediante el agente químico Sorbitol y CTAB. Modificado por Morillo (INIAP, 2002) del método original de Mariac <i>et al.</i> , (1999)	
Campo de aplicación	Extracción de zanahoria, yuca	
Reactivos	Tampón de extracción: Sorbitol Tampón de lisis (CTAB 4%) Cloroformo: Alcohol Isoamílico CIA (24:1) Tampón TE (0,1 M) Metabisulfito de sodio Isopropanol, Etanol 70% ARNsa	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	1. Poner el baño maría a 65°C. 2. Macerar en un mortero 10 mg de tejido seco y añadir una pizca de metabisulfito de sodio. 3. Colocar la muestra macerada en un tubo eppendorf y añadir 1 mL de tampón de extracción. Homogeneizar hasta obtener una sola papilla. 4. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm. 5. Eliminar el sobrenadante y añadir 700 µL de tampón de lisis (CTAB 4%). Homogeneizar bien hasta obtener una sola papilla. 6. Incubar en baño maría por 2 horas a 65°C, agitando cada 30 min. 7. Dejar enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente. 8. Añadir 700 µL de CIA (24:1), mezclar en un vórtex hasta que las dos fases queden completamente homogeneizadas y centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm.	

Procedimiento detallado	9. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, y aforar a 700 µL con el tampón de lisis y añadir 700 µL de CIA. 10. Homogeneizar completamente las dos fases y centrifugar nuevamente por 5 minutos a 13000 rpm. 11. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y añadir lentamente 700 µL de isopropanol, mezclar suavemente. Invertir los tubos para mezclar completamente el contenido. Debe verse como unos hilitos o una pelotilla (en caso contrario, se ponen las muestras a -20 °C durante 30 min). 12. Centrifugar por 3 minutos a 10000 rpm para recuperar el <i>pellet</i> de ADN. 13. Eliminar el sobrenadante. 14. Lavar el <i>pellet</i> de ADN con 250 µL de etanol 70% y eliminar enseguida el sobrenadante. 15. Dejar secar boca abajo y colocar en la micro estufa por media hora o hasta que se haya eliminado completamente el olor a etanol. 16. Resuspender el <i>pellet</i> en 100 µL TE (el volumen depende del tamaño del <i>pellet</i>). Dejar en el frigorífico a 4 °C hasta el siguiente día, ó si se hace en el mismo día, disolverlo en el baño maría a 65°C durante 15 min, para posteriormente incubarlo a 4°C durante 5 min. 17. Tratamiento con ARN'sa por cada 100 µL de ADN se coloca 1 µL de ARN'sa. Agitar en un vórtex y centrifugar. Conservar el ADN a 4 oC.
Observaciones	Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.
Referencias bibliográficas	INIAP. 2002. Informe Anual Dpto. Nacional de Recursos Fitogeneticos y Biotecnología. EESC, Quito Mariac, C.; Trouslot, P.; Poteaux, C.; Bezancon, G. and Renno, J.F. 1999. Chloroplast ADN Extracction from herbaceous and Woody Plants for direct Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. In Biotechniques 28:110-113

	Ficha técnica	N° 12
Descripción del método	Extracción de ADN de hojas de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) mediante el agente químico CTAB y TRIS-HCl (Faleiro, 2002)	
Campo de aplicación	Muestras vegetales frescas	
Reactivos	Nitrógeno líquido CTAB 7% NaCl 5M EDTA (0,5M) TRIS-HCl (Ph 8.0) 1M PVP 40 (sólido) Mercaptoetanol Agua MILLI-Q Proteinasa K Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) Isopropanol Alcohol etílico al 99 % Tampón TE	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Vaso de precipitación Tijeras Espátula Macerador Microtubos Gradilla Vórtex Sorbona Pipetas Baño maría Refrigeradora	

Procedimiento detallado	<i>Muestras frescas:</i> 1. Preparar, en un vaso de precipitación, el tampón de extracción. Se prepara 1 mL de tampón para cada muestra a extraer. Calentar el tampón, en un baño maría a 65°C. 2. Macerar 1 hoja en nitrógeno líquido, utilizando mortero hasta que el tejido se convierta en polvo y transferir una pequeña cantidad de la maceración (hasta la marca de 0,5 a microtubos de 1,5 mL, debidamente identificados. Hacer este paso lo antes posible para evitar la oxidación del material. 3. Añadir 800 µL de tampón por muestra. 4. Mezclar en vórtex y añadir 5 µL de proteínas K concentración 20 mg/µL y colocar en baño maría a 65°C durante 1 hora, revolviendo continuamente cada 10 minutos. 5. Retirar del baño maría y dejar enfriar a temperatura ambiente. 6. Adicionar 800 µL de una mezcla de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y agitar el tubo con suaves inversiones por 10 minutos hasta que este turbio. Centrifugar durante 10 minutos a 14.000 rpm en microcentrífuga a 4°C. 7. Extraer el sobrenadante a nuevos tubos, debidamente identificados, adicionar 55 µL de CTAB al 7%, mezclar durante 5 minutos y repetir el paso 6. 8. Recuperar el sobrenadante, añadir 700 µL de isopropanol frío, mezclar por inversión durante 5 minutos y poner a - 20°C durante 30 minutos ó a 4°C durante toda la noche. 9. Centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm. Un precipitado blanco se formará en el fondo del tubo. Eliminar el sobrenadante. 10. Lavar este precipitado de 1 a 2 veces con etanol al 70%. Secar el precipitado (<i>pellet</i>) a temperatura ambiente durante 15 - 20 minutos. 11. Resuspender el ADN en 100 µL de agua con RNasa a una concentración final de 40 mg/mL y colocar en baño maría a 37°C para disolver el precipitado. 12. Añadir NaCl concentración 5M en una proporción de 1:10 (NaCl: ADN resuspendido). 13. Añadir 2/3 del volumen de isopropanol frío para precipitar el ADN otra vez. 14. Incubar en el refrigerador a 4°C durante la noche ó a - 20°C durante 3 horas. 15. Repetir el paso 9 y resuspender el precipitado final en 200 µL de TE.
Observaciones	El ADN aislado debe ser mantenido a -20°C hasta cuando se vaya a usar. Realizar alícuotas de tubo madre para evitar degradación.
Referencias bibliográficas	Faleiro, FG.; Araújo, IS.; Bahia, R.; Santos, RF.; Yamada, MM.; and Anher, D. 2002. Otimização da extração e amplificação de dna de <i>Theobroma cacao</i> L. visando obtenção de marcadores RAPD (en línea).

	Ficha técnica	N° 13
Descripción del método	Aislamiento ADN genómico mediante el agente químico SDS (Plaza et al, 2004)	
Campo de aplicación	Aislamiento de ADN de <i>Botritis cinerea</i>	
Reactivos	Cloroformo Alcohol isoamílico Buffer de extracción (0.1M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH 8, 5% SDS) Etanol Isopropanol	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Puntas (0.1-10 µL, 2-200 µL y 100-1000 µL) Tubos eppendorf 1.7 mL Micropipetas Gradilla Hielo Centrifuga Vórtex Pistilos Papel absorbente	
Procedimiento detallado	- Colectar entre 200-500 mg de micelio en un tubo eppendorf de 1,7 mL. - Añadir 500 µL de Buffer de extracción (0,1M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH 8, 5% SDS). - Colocar una pequeña cantidad de arena de cuarzo y macerar manualmente con ayuda de un pistilo. - Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm. - Recoger el sobrenadante y colocar en hielo. - Repetir la maceración con el pellet obtenido, colocar nuevamente 500 µL de Buffer de extracción, macerar y centrifugar 10 minutos a 13000 rpm, recoger el sobrenadante. - Unir los sobrenadantes obtenidos y añadir igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (24:25:24:1).	

Procedimiento detallado	- Mezclar vigorosamente en un vórtex. - Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm. - Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf y colocar igual volumen de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). - Mezclar vigorosamente en un vórtex. - Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm. - Recoger el sobrenadante y añadir el doble en volumen de isopropanol frío, dejar precipitar el ADN por 1 hora a -20°C. - Centrifugar por 10 minutos a máxima velocidad. - Lavar el pellet de ADN con etanol al 75% dos veces. - Secar bien el pellet y diluir en 50 µL de agua ultra pura. - Almacenar a -20°C.
Observaciones	Los materiales y reactivos empleados en la extracción tienen que estar libre de nucleasas.
Referencias bibliográficas	Plaza G., R. Upchurch R., Brigmon R., Whitman W. y K. Ulfing K. 2004. Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification. Polish Journal of Environmental Studies. 3: 315-318

	Ficha técnica	N° 14
Descripción del método	Aislamiento de ADN genómico con Sorbitol (adaptado de Weising et al, 2005)	
Campo de aplicación	Aislamiento de ADN de <i>Rashtonia solanacearum</i>	
Reactivos	Cloroformo Alcohol isoamílico Buffer de extracción (140 mM Sorbitol, 220 mM Tris HCl pH 8, 22 mM EDTA, 1% de sarkosyl) Etanol Isopropanol	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Puntas (0.1-10 µL, 2-200 µL y 100-1000 µL) Tubos eppendorf 1.7 mL Micropipetas Gradilla Hielo Centrifuga Vórtex Pistilos Papel absorbente	
Procedimiento detallado	- Realizar un cultivo líquido para la bacteria de 30 mL. - Incubar por un periodo de 48 horas. - Centrifugar por 8 minutos a 14000 rpm las veces que sean necesarias hasta tener suficiente biomasa. - Luego colocar en el eppendorff una pequeña cantidad de arena de cuarzo, y con ayuda de un pistilo, pulverizar al <i>pellet</i>. - Añadir 0,5 mL de tampón de extracción (140 mM Sorbitol, 220 mM Tris HCl pH 8, 22 mM EDTA, 1% de sarkosyl) sobre el macerado, y luego añadir 300 µL de cloroformo y/o cloroformo: isoamil alcohol 24:1. Nuevamente macerar ligeramente para mezclar el tampón y el solvente.	

Procedimiento detallado	- Invertir los tubo varias veces, y luego incube las muestras a 55°C de 20 a 30 minutos. Invertir los tubos manualmente unas cinco veces cada 10 minutos. - Dejar que los tubos tomen la temperatura ambiente por unos cinco minutos y centrifugue a 14000 rpm en la centrífuga por 10 minutos. - Transferir el sobrenadante sin topar la interfase a un tubo nuevo, limpio y estéril. - Añadir de 1 a 1,5 volúmenes de Isopropanol, y déjelos durante 5 minutos en hielo o en un congelador para que precipiten los ácidos nucleicos. - Centrifugar los tubos por 3 minutos a 14000rpm en una microcentrífuga. Si el pellet de DNA no está firme centrifugue por tres minutos más. - Descartar el sobrenadante, y lave el <i>pellet</i> de DNA con etanol al 70% por una o dos veces. - Secar el <i>pellet</i> de DNA por 20 a 25 minutos, y posteriormente disuélvalo en 100ul tampón TE con 1ul de RNAsa (10mg/mL). Dejar que la RNAsa actúe por 10 minutos.
Observaciones	Los materiales y reactivos empleados en la extracción tienen que estar libre de nucleasas.
Referencias bibliográficas	Weising, K. 2005. DNA fingerprinting in plants and fungi; Principles, methods, and applications pag 55-56

	Ficha técnica	N° 15
Descripción del método	Kit de columna <i>PURELINK PLANT TOTAL ADN PURIFICATION KIT</i> (INVITROGEN)	
Campo de aplicación	ADN vegetal	
Reactivos	<i>Resuspension</i> Tampón (R2) <i>Precipitation</i> Tampón (N2) <i>Binding</i> Tampón (B4) * <i>Wash</i> Tampón (W4) <i>Wash</i> Tampón (W5) ** <i>Elution</i> Tampón ; 10 mM Tris-HCl-pH 8.5 (E1) 20% SDS <i>RNase A</i> (20 mg/mL RNase A in 50 mM Tris-HCl-pH 8.0, 10 mM EDTA) <i>Pure Link spin Cartridges with Collection Tubes</i> <i>PureLink Wash Tubes</i> (2.0 mL)	
Preparación de reactivos	* <i>Binding</i> Tampón (B4) Añadir 11.5 mL 96-100% de etanol en los 7.5 mL de <i>Binding</i> Tampón (B4). Mezclar bien y mantener a temperatura ambiente. ** <i>Wash</i> Tampón (W5) Añadir 40 mL 96 -100% de etanol en los 10 mL de <i>Wash</i> tampón (W5). Almacenar el tampón a temperatura ambiente.	
Equipos y materiales	Pistilo para maceración Centrífuga de tubos eppendorf Vórtex Baño María Microestufa	
Procedimiento detallado	PASO 1: El tejido vegetal necesario para la extracción es de 100 mg. para tejido vegetal duro, se debe congelar el tejido en nitrógeno líquido y pulverizarlo. Para tejido vegetal blando, no fibrosos, se corta el tejido en pequeños pedazos. Con tejido liofilizado o fresco (100 mg) se añade 250 µL del buffer R2 y se homogeniza con vórtex. LISIS: Procedimiento para preparar la lisis en 100 mg de tejido vegetal: 1. Tener el tejido vegetal listo para la extracción PASO 1. 2. Añadir 250 µL de <i>Resuspension</i> Tampón (R2).	

Procedimiento detallado	3. Homogenizar la muestra, dar vórtex. 4. Añadir 15 µL de 20% SDS y 15 µL <i>RNase A</i> (20 mg/mL). 5. Incubar el lisado a 55°C por 15 minutos. 6. Centrifugar el lisado a la máxima velocidad (13000 rpm) para remover material insoluble. 7. Transferir el supernadante claro a un tubo estéril de 1,5 mL, sin alterar el pellet. 8. Añadir 100 µL de <i>Precipitation</i> Tampón (N2), dar vórtex e incubar en hielo por 5 minutos. 9. Centrifugar a máxima velocidad (13000 rpm) por 5 minutos a temperatura ambiente para proceder a limpiar el lisado. El supernadante debería ser claro y no viscoso después de la precipitación. 10. Transferir 250 µL del lisado claro a un nuevo tubo y añadir 375 µL de <i>Binding</i> Tampón (B4) con Etanol. Mezclar bien. 11. Proceder con el proceso de <i>binding</i> DNA. PASO 2: 1. Remover un <i>PureLink spin Cartridge</i> (Tubo de Columna) en un <i>Collection Tube</i>. 2. Añadir la muestra obtenida del paso 10 del proceso de lisado en el <i>Purelink spin Cartridge</i> (Tubo Columna). 3. Centrifugar la columna a 10000 g por 30 s a temperatura ambiente. 4. Descartar el sobrenadante y colocar la columna en el <i>Wash Tube</i> (tubo de lavado). 5. Proceder con el proceso de <i>Washing</i> DNA. PASO 3: 1. Añadir 500 µL del <i>Wash</i> Tampón (W4) en el tubo de columna. 2. Centrifugar las columnas a 10000 x g por 30 s a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante del tubo de lavado. 3. Añadir 500 µL de <i>Wash</i> Tampón (W5) con etanol en la columna. 4. Centrifugar el tubo a 10000 g por 30 s a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante. 5. Repetir los pasos 3 y 4 una vez más. 6. Centrifugar el tubo con la columna a máxima velocidad (13000 rpm) por 2 minutos a temperatura ambiente para remover cualquier residuo de <i>Wash</i> Tampón (W5). Descartar el tubo de <i>Wash Tube</i>. 7. Proceder al proceso de <i>Eluting</i> DNA.
---------------------------------------	---

Procedimiento detallado	PASO 4: 1. Colocar la columna en un tubo estéril de 1.5 mL. 2. Añadir 100 µL de <i>Elution</i> Tampón (E1) ó agua destilada estéril (pH 7.0). 3. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar el tubo a máxima velocidad (13000 rpm) por 1 minuto. 4. Para recuperar más ADN, se puede realizar una segunda elusión usando 100 µL <i>Elution</i> Tampón (E1) ó agua estéril. 5. Centrifugar la columna a temperatura ambiente a máxima velocidad por 1 minuto. El tubo de elución contiene el ADN purificado. Remueva y descarte la columna.
Observaciones	Cuantificar el ADN en un gel de agarosa 1%.
Referencias bibliográficas	PureLink™ Genomic DNA Kits (2007)

	Ficha técnica	N° 16																				
Descripción del método	Cuantificación de ADN mediante electroforesis horizontal con agarosa, tinción con bromuro de etidio.																					
Campo de aplicación	ADN vegetal, microbiano, productos PCR																					
Reactivos	Agarosa TAE 1X Blue juice 1X ADN Low Mass Ladder																					
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1																					
Equipos y materiales	Cubeta de Electroforesis Fuente de poder Micropipetas Erlenmeyer Probeta Microondas Parafilm Fotodocumentador Papel térmico																					
Procedimiento detallado	1. Ensamblar la cubeta de electroforesis. 2. Preparar el gel de agarosa de acuerdo a la concentración y tamaño deseado (Cuadro 1). Cuadro 1. Preparación de geles de agarosa <table><tr><th rowspan="2">Componentes</th><th colspan="2">Gel pequeño 40 mL</th><th colspan="2">Gel Grande 80 mL</th></tr><tr><th>1 %</th><th>2 %</th><th>1 %</th><th>2 %</th></tr><tr><td>Agarosa</td><td>0,4 g</td><td>0,8 g</td><td>0,8 g</td><td>1,6 g</td></tr><tr><td>TAE 1X para la cubeta de electroforesis</td><td colspan="2">200 mL</td><td colspan="2">200 mL</td></tr></table>			Componentes	Gel pequeño 40 mL		Gel Grande 80 mL		1 %	2 %	1 %	2 %	Agarosa	0,4 g	0,8 g	0,8 g	1,6 g	TAE 1X para la cubeta de electroforesis	200 mL		200 mL	
Componentes	Gel pequeño 40 mL		Gel Grande 80 mL																			
	1 %	2 %	1 %	2 %																		
Agarosa	0,4 g	0,8 g	0,8 g	1,6 g																		
TAE 1X para la cubeta de electroforesis	200 mL		200 mL																			

Procedimiento detallado	3. Preparar las muestras a cuantificar en un pedazo de parafilm: 4 μL de ADN a cuantificar + 1 μL de azul <i>blue juice</i> 1X, mezclar bien y cargar 2 μL de esta mezcla en los pozos del gel. 4. Cargar en el primer pozo del gel 2 μL de ADN <i>Low Mass Ladder</i>. 5. Correr a 50-100 V o 60 mA por 10-25 min. 6. Sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 15 ppm, por un periodo de 20 minutos. 7. Llevar al fotodocumentador, focalizar bien la imagen (intensidad de luz y tiempo de exposición) e imprimir en papel térmico (tamaño 5c es suficiente para la cuantificación). 8. Cuantificar la concentración de ADN en ng/μL comparando la intensidad de sus bandas con respecto a las del marcador.
Observaciones	No llevar a ebullición la agarosa. Enfriar la agarosa antes de verter en las bandejas.

	Ficha técnica	N° 17
Descripción del método	Cuantificación de ADN por fluorometría	
Campo de aplicación	ADN vegetal, microbiano, productos PCR	
Reactivos	Quant-it Reagent Quant-it Tampón	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Tubos eppendorf Fluorómetro Vórtex Micropipetas	
Procedimiento detallado	- Preparar el tampón de cuantificación, utilizando el siguiente cóctel: $1 \quad \times \quad n \text{ } \mu\text{L de Quant-it Reagent}$ $199 \quad \times \quad n \text{ } \mu\text{L de Quant-it Tampón}$ *n es el número de muestras que se va a cuantificar en el fluorómetro. - Mezclar bien el cóctel de cuantificación. - En tubos eppendorf de 60 μL colocar 10 μL de los estándares 0 ng/μL y 100 ng/μL, así como el ADN de las muestras a cuantificar, con las respectivas etiquetas. - Adicionar 190 μL del tampón de cuantificación a cada muestra, agitar, centrifugar y esperar 2 minutos antes de empezar a cuantificar. Las muestras deben permanecer siempre bajo la oscuridad. - Una vez transcurrido el tiempo, empezar primero por la calibración del fluorómetro con los estándares 0 ng/μL y 100 ng/μL, seguidamente cuantificar las muestras de ADN. - El fluorómetro presenta dos tipos de lectura, la HS (ng/mL) y la BR ($\mu\text{g/mL}$).	

Procedimiento detallado	7. Para calcular la concentración de las muestras, se usa la siguiente ecuación: $\text{Concentración de la muestras} = \text{Valor QF} \times (200 / X)$ Donde: Valor QF= El valor dado por el fluorómetro X= El volumen final de la muestra a cuantificar Esta ecuación genera un resultado con las mismas unidades que son dadas por el fluorómetro.
Observaciones	Recomendable manejar con guantes de nitrilo.

	Ficha técnica	N° 18
Descripción del método	Cuantificación de ADN usando SYBR <i>gold, green, safe</i>	
Campo de aplicación	ADN vegetal, microbiano, productos PCR	
Reactivos	SYBR gold Blue juice Agua ultrapura Agarosa TAE 1X ADN Low <i>Mass Ladder</i>	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Cubeta de Electroforesis Fuente de poder Micropipetas Erlenmeyer Probeta Microondas Parafilm Fotodocumentador Papel térmico	
Procedimiento detallado	<i>Preparación de muestras:</i> • 1 μL de Blue Juice + 1 μL de SYBR (1:200) + 4 μL de ADN a ser cuantificado. • Mezclar bien y cargar 2 μL en el gel de agarosa.	

Procedimiento detallado	<i>Preparación del marcador:</i> - 0.5 µL de SYBR (1:200) + 2 µL de Marcador <i>Voltaje de corrida:</i> - Hacer correr a baja velocidad entre 40 y 45 mA y en oscuridad.
Observaciones	Dilución de SYBR 1:200 µl = 1 µl de stock SYBR Gold + 199 µl de agua ultra pura. Tener cuidado de no exponer por mucho tiempo a la luz, ya que es un producto fotosensible.

	Ficha técnica	N° 19
Descripción del método	Amplificación de ADN con marcadores específicos	
Campo de aplicación	E.J. Detección de <i>Botrytis cinérea</i>	
Reactivos	Buffer PCR 10 X MgCl ₂ 50 mM BSA 7.5 % dNTP's 100 mM Taq Polimerasa 5 U/ µL	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Termociclador Puntas (0.1-10 µL, 2-200 µL y 100-1000 µL) Tubos PCR Pipetas Gradilla Hielo Microcentrífuga Vórtex	
Procedimiento detallado	El coctel de amplificación consta de 2 g de ADN en un volumen de 10 µL de reacción, buffer PCR 1x, 4,5 mM de MgCl ₂ , 0,2 mM de cada dNTP's, 0.1 % de BSA, 0,8 µM de cada cebador (729+/729) y 1U de taq polimerasa (5U/ µL). El programa de amplificación consiste en un ciclo de 94°C por 2 minutos, treinta y cinco ciclos de 94°C por 30 s, 55.6°C por 30 s y 72°C por 45 s finalizando con un ciclo de 72°C por 10 minutos. El amplicón de detección se sitúa en 750 pb y este es el referente para verificar si la muestra es positiva.	
Observaciones	Cebador directo C 729 + 5': agc tcg aga gag atc tct ga 3'. Cebador reverso C 729- 5': ctg caa tgt tct gcg tgg aa 3'.	
Referencias bibliográficas	Rigotti, S.; Gindro, K.; Richter, H. y Viret, O. 2002. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of <i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr. in strawberry using PCR. FEMS Microbiology Letters 209:169:174	

	Ficha técnica	N° 20
Descripción del método	Retrotranscriptasa PCR	
Campo de aplicación	Detección de <i>CMV</i>	
Reactivos	Buffer PCR 10 X MgCl ₂ 50 mM dNTP's 100 mM Taq Polimerasa 5U/ µL 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Termociclador Puntas (0.1-10 µL, 2-200 µL y 100-1000 µL) Tubos PCR Pipetas Gradilla Hielo Microcentrifuga Vórtex	
Procedimiento detallado	El coctel RT consta de 5 µL de ARN previamente denaturado, Buffer RT 1X, 5mM MgCl₂, 1 mM, dNTP's, 0,8 mM de cebador PC1-RD1, 2,5 U/ µL RNA inhibitor, 0,5 U/ µL de transcriptasa, el volumen de reacción es de 20 µL. El programa RT para la detección de <i>CMV</i> consiste en una hora a 42°C seguido de la desactivación de la enzima por 5 minutos a 99°C. El coctel PCR posee Buffer PCR 1X, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,5 mM de cada cebador (K-F y PC1-RD1), 0,04 U/ µL de Taq polimerasa y 2 µL de cDNA, en una reacción de 25 µL. El programa de amplificación comienza con una denaturalización por 4 minutos a 94°C seguido de treinta ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 45 s, 72°C por 45 s finalizando con una extensión de 72°C por 4 minutos.	

Procedimiento detallado	Para continuar con la detección se realiza una semi NESTED-PCR, empleando los cebadores PC1- F1 y PC1-RD1 en una concentración de 0,48 mM y 1 µL de producto PCR, el coctel y el programa de amplificación es similar al de la primera PCR , el número de ciclos se aumenta a treinta y cinco. El amplicón de detección se sitúa en 349 pb para la primera PCR y para la semi NESTED se visualiza en 222 pb.
Observaciones	PC1-RD1: 5'caa att tcg gca arg gat ta 3'. PC1- F1: 5' aga cgt tag cag ctg gtc gt 3'. K-F: 5'atg gac aaa tct gaa tca acc 3'.
Referencias bibliográficas	Khan, S.; Tasleem, A.; Aquil, B.; Mohd, Q. y Haq, R. 2011. Coat Protein Gene Based Characterization of Cucumber Mosaic Virus Isolates Infecting banana In India. Phytopathology Available Online: www.journal-phytology.com. 2: 2075-6240.

	Ficha técnica	N° 21
Descripción del método	Amplificación de ADN con marcadores específicos	
Campo de aplicación	Ej: Detección de <i>Ralstonia solanacearum</i>	
Reactivos	Buffer PCR 10 X MgCl ₂ 50 mM BSA 7.5 % dNTP's 100 mM Taq Polimerasa 5U/ µL	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Termociclador Puntas (0.1-10 µL, 2-200 µL y 100-1000 µL) Tubos PCR Pipetas Gradilla Hielo Microcentrifuga Vórtex	
Procedimiento detallado	El coctel de la amplificación consta de 1ng/µL de ADN, buffer PCR 1x, 1,5 mM de MgCl ₂ , 0,2 mM de cada dNTP's, 0,1 % de BSA, 0,2 µM de cada cebador (Ps1-Ps2) y 0,5 U de Taq polimerasa (5U/ µL). El programa de amplificación consiste en un ciclo de 95°C por 5 minutos, treinta y cinco ciclos de 95°C por 30 s, 55.2°C por 30 s y 72°C por 45 s finalizando con un ciclo de 72°C por 5 minutos. El amplicón de detección se sitúa en 553 pb y este es el referente para verificar si la muestra es positiva para la presencia de <i>R. solanacearum</i> .	
Observaciones	Cebador directo Ps-1: 5'agt cga acg gca gcg ggg g 3'. Cebador reverse Ps-2: 5'ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca 3'.	
Referencias bibliográficas	Official Journal of the European Union (OJEU). 2006. Council Directive 98/57/EC on the control of <i>Ralstonia solanacearum</i> . 206/36 p. 206-106	

	Ficha técnica	N° 22
Descripción del método	Electroforesis vertical en geles denaturantes de acrilamida	
Campo de aplicación	Marcadores SSRs, AFLPs	
Reactivos	Hidroxido de sodio 1% Agua destilada Alcohol Cloroformo Bind Silane Acido acético glacial Etanol 100% Solución “antilluvia” Acrilamida/Bis-Acrilamida TEMED Persulfato de Amonio 10% TBE 1X Blue stop (Azul de parada) Marcadores de talla Nitrato de Plata Acido nítrico Formaldehído 37% Carbonato de Sodio Tiosulfato de Sodio 0,01% Hidroxido de Sodio	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	
Equipos y materiales	Cámara de electroforesis vertical Placas de Vidrio Fuente de poder Bandejas Agitador Micropipetas	

Procedimiento detallado	<i>Elaboración del gel y corrida electroforética:</i> 1. Preparación de placas: - Lavar los vidrios en una solución de hidróxido de Sodio al 1% (10 g en 1 L de AGUA destilada) posteriormente enjuagarlo con agua destilada. - Realizar un enjuague final con 1l de agua destilada caliente (aproximadamente a 45°C) sin tocar el vidrio. - Secar el vidrio con un pedazo de papel toalla, teniendo cuidado de no tocar con el guante la superficie del vidrio. - Limpiar con alcohol el vidrio. <i>Placa grande:</i> - Colocar 1 mL de cloroformo sobre el vidrio y distribuirlo uniformemente con un pedazo de papel toalla, con movimientos horizontales y verticales. Este paso se repite tres veces, utilizando un papel nuevo para cada aplicación. - Preparar la solución adherente: 3 µL de bind silane, 5 µL de ácido acético glacial 1 mL de etanol 100%. - Colocar 500 µL de la solución adherente sobre el vidrio y distribuirlo uniformemente con un pedazo de papel toalla, en movimiento horizontal. Repetir este paso pero distribuyendo la solución con movimientos verticales, utilizando un papel nuevo para cada aplicación. <i>Placa pequeña:</i> - Utilizar guantes nuevos para evitar la contaminación con la solución adherente. - Colocar 1 mL de cloroformo sobre el vidrio y distribuirlo uniformemente con un pedazo de papel toalla, con movimientos horizontales y verticales. Este paso se repite tres veces, utilizando un papel nuevo para cada aplicación. - Esparcir 400 µL de la solución repelente (Glasscote o Auri glass solución comercial “antilluvia”) sobre el vidrio y distribuirlo uniformemente con un pedazo de papel toalla, en movimiento horizontal. Repetir este paso pero distribuyendo la solución con movimientos verticales, utilizando un papel nuevo para cada aplicación. 2. Preparación del gel de secuenciación: - Ensamblar las dos placas de vidrio y colocar el conjunto de forma horizontal sobre el mesón (nivelar el gel). - En la sorbona, medir 70 mL de la solución de Acrilamida/Bis-Acrilamida y añadir 50 µL TEMED y 500 µL de persulfato de amonio al 10 % a la solución y mezclar suavemente. - Cargar cuidadosamente el gel para evitar la formación de burbujas, colocar el peine en la parte superior y dejar polimerizar durante 1 ó 2 horas. - Una vez que el gel ha polimerizado, armar la cubeta de electroforesis, y llenar la cámara superior e inferior con tampón de corrida TBE 1X (1 ó 2 litros).
---------------------------------------	---

Procedimiento detallado

- Pre-correr el gel a una potencia de 1500 W hasta que alcance la temperatura de 45 - 55°C.

Solución de Acrilamida/Bis-Acrilamida (Ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Cantidades para la solución de acrilamida/bisacrilamida

Reactivos \ Volumen mL	1000	500	350	80	70
Urea (g)	500	250	175	40	35
Acrilamida (g)	57	28.5	19.95	4.56	3.99
Bis -acrilamida (g)	3	1.5	1.05	0.24	0.21
TBE 10X (mL)	50	25	17.5	4	3.5

Persulfato de Amonio (APS): 0.1 g en 1 mL de AGUA dd

3. Preparación de las muestras:

- Añadir el tampón de cargado (azul de parada) al producto de amplificación PCR (el azul de parada tiene que ser la mitad del volumen final de amplificación).
- Incubar la solución resultante a 94°C durante 5 min. Luego enfriarlas bruscamente en hielo.
- Cargar aproximadamente 4 µL en el gel de poliacrilamida junto a los marcadores de peso molecular.
- Realizar la corrida electroforética durante 3 horas a 2000 V dependiendo el tamaño de los fragmentos, o se puede dejar a migrar en la noche a 700 V durante 10 horas aproximadamente.
- Visualizar los fragmentos mediante coloración con nitrato de plata.

4. Tinción de los geles con nitrato de plata

Solución de fijación:

- 900 mL de agua destilada + 100 mL de ácido glacial acético.

Solución de pretratamiento:

- 990 mL de agua de agua destilada + 10 mL de ácido nítrico.

Solución de tinción:

- 1000 mL de agua destilada + 1 g de nitrato de plata.
- 5 minutos antes de usar se añade 1500 µL de Formaldehído 37%.

Procedimiento detallado	<u>Solución de revelado:</u> - 1000 mL de agua destilada + 32,4 g de carbonato de sodio. - La solución debe permanecer en la refrigeradora y 5 minutos antes de utilizar se adiciona 500 µL de Tiosulfato de Sodio 0.01% (0.01 g en 1 mL de agua) + 1500 µL de Formaldehído 37%. <u>Solución de parada:</u> - 900 mL de agua destilada + 100 mL de ácido glacial acético. <u>Separación de placas:</u> - Luego de la electroforesis, separar cuidadosamente las placas de vidrio. El gel queda pegado a la placa grande. <i>Protocolo de revelado (Ver cuadro 3).</i> Cuadro 3. Proceso de revelado		
	Solución	Tiempo	Observaciones
	Fijación	30 minutos	La solución se puede reciclar hasta 10 veces
	3 Lavados	2 minutos c/u	Con agua ultra pura y fría
	Pretratamiento	<u>1 hora 30 s</u>	Solución se recicla dos veces
	3 Lavados	2 minutos c/u	Con agua ultra pura y fría
	Tinción	40 minutos	En completa oscuridad, la solución se puede reciclar hasta 5 veces
	1 Lavado	8 s	Con agua ultra pura y fría
	Revelado	5 - 15 minutos	La solución debe estar fría
	Parada	3 minutos	La solución se puede reciclar hasta 10 veces.
	Lavado	Hasta eliminar residuos de la solución de parada.	
	Nota: En cada reciclada de la solución de tinción adicionar 0,1 g de Nitrato de Plata y 750 µL de Formaldehído 37%. - Dejar el gel en posición vertical para que seque. - Fotografiar e interpretar los resultados.		

Procedimiento detallado	5. <i>Tinción de los geles con hidróxido de Sodio.</i> - Separar las placas (finalizada la corrida electroforética), el gel se quedará adherido a la placa adherente. Posteriormente, sumergir en la solución de tinción (10% etanol, 0,5% ácido acético y 0,2 % de nitrato de plata) durante 15 minutos cubriéndola de la luz. Inmediatamente, realizar un lavado con agua mili-Q por 1 minuto. La solución de tinción se puede reciclar hasta diez veces. - Previamente se calienta la solución de revelado (30 % de hidróxido de sodio) a 55°C en baño maría. En cada uso y posterior a calentar esta solución, se añade un volumen de 1000µL de formaldehído. Es conveniente que posterior a calentarla, se agite bien y una vez en la bandeja, sin el gel, se añade el formaldehído, esperar un minuto a que se mezcle bien, de lo contrario se puede quemar el gel. Al poner el gel hay que controlarlo constantemente. En la placa sumergida en esta solución ya se puede observar claramente las bandas de las muestras. Esta solución se puede reciclar hasta 8 veces. Si después de 10 minutos no existe tinción de las muestras, volver a colocar formaldehído. - Inmediatamente se sumerge el gel en la solución de parada (10 % etanol, 0.5 % de ácido acético) hasta que las bandas se tornan más oscuras. La solución se puede reciclar hasta cinco veces.
--------------------------------	--

	Ficha técnica	N° 23
Principio del método	Clonación de productos de PCR mediante kit TOPO TA	
Campo de aplicación	Productos PCR	
Reactivos	Kit de clonaje: TOPO TA <i>Cloning Kit</i> de Invitrogen. Este kit incluye: - Caja 1: TOPO TA <i>Cloning reagents</i>. Almacenar esta caja a -20°C. - pCR 2.1-TOPO 10X PCR Tampón - Solución salina - Mix DNTPs - Cebador M13 Forward (0,1 µg/µL en tampón TE) - Cebador M13 Reverse (0,1 µg/µL en tampón TE) - Templado control (0,1 µg/µL en tampón TE) - Cebadores PCR control (0,1 µg/µL en tampón TE) - Agua - Caja 2: <i>One shot competent cell kit</i>. Almacenar esta caja a -80°C - Medio SOC. - Bacterias competentes: cepas de E. coli TOP 10. - Caja 3: <i>PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit</i>. Almacenar esta caja a temperatura ambiente. - Ampicilina - X-gal 40 mg/mL en dimetilformamida - Medio sólido LB. - Reactivos PCR: Tampón PCR 5X, Go Taq ADN Polimerasa (5U/µL), MgCl₂ (25mM), dNTPs, agua ultrapura	
Preparación de reactivos	Ver Anexo 1	

Equipos y materiales	Vórtex Centrífuga Incubadora con agitación Baño maría. Congelador (-20°C), Ultracongeladora (-80°C) Refrigeradora (5°C) Incubadora Termociclador Cámara de flujo laminar Mechero Esparcidores Cajas petri Palillos Agua destilada autoclavada.												
Procedimiento detallado	<i>I. Obtención de productos PCR:</i> 1. Realice una amplificación del fragmento que desee clonar. <i>II. Reacción de clonaje (TOPO Cloning reaction):</i> 1. Realice el siguiente mix: <table border="1" data-bbox="611 1112 1382 1380"> <thead> <tr> <th>Reactivo</th><th>Cantidad</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Producto PCR fresco</td><td>0,5 a 4 µL</td></tr> <tr> <td>Solución salina</td><td>1 µL</td></tr> <tr> <td>Vector TOPO</td><td>1 µL</td></tr> <tr> <td>Agua</td><td>Hasta un volumen de 6 µL</td></tr> <tr> <td>Volumen final</td><td>6 µL</td></tr> </tbody> </table> <i>III. Incubación:</i> 1. Incube el mix obtenido por 5 minutos a temperatura ambiente (22-23°C). Este tiempo puede incrementarse hasta 30 minutos si los productos a clonar son mayores a 1 kb, o si se desea obtener un mayor número de colonias transformadas.	Reactivo	Cantidad	Producto PCR fresco	0,5 a 4 µL	Solución salina	1 µL	Vector TOPO	1 µL	Agua	Hasta un volumen de 6 µL	Volumen final	6 µL
Reactivo	Cantidad												
Producto PCR fresco	0,5 a 4 µL												
Solución salina	1 µL												
Vector TOPO	1 µL												
Agua	Hasta un volumen de 6 µL												
Volumen final	6 µL												

Procedimiento detallado	<i>IV. Transformación de células competentes</i> Antes de comenzar el baño maría debe estar a 42°C, el medio SOC a temperatura ambiente, las cajas petri con el medio LB + ampicilina a 37°C, y se debe tener listo hielo picado. Este protocolo es recomendado para una transformación rápida de bacterias competentes de <i>E. coli</i> cuando se utiliza solo ampicilina como indicador de transformación. 1. Ubique en el hielo picado 1 vial de bacterias <i>One Shot</i> para cada transformación. 2. Añada 4 µL del producto de clonaje TOPO <i>cloning reaction</i> previamente obtenido en un vial de bacterias <i>One Shot</i> mezcle gentilmente. No mezcle este producto por pipeteo. 3. Incube las bacterias transformadas en hielo por cinco minutos. 4. Provocar un choque térmico de las bacterias a 42°C sin agitación por 30 s. 5. Ubique las bacterias en hielo picado. 6. Siembre las bacterias en las cajas petri con medio LB utilizando dos densidades: 50 µL y 20 µL de células transformadas. Esparza estas cantidades en toda la superficie de la cada caja petri hasta que todo se absorba. Etiquete cada caja con la fecha y densidad de siembra. 7. Incube las cajas petri toda la noche a 37°C. <i>V. Selección de bacterias clonadas</i> Si el ensayo fue exitoso luego de la incubación se obtendrán colonias bacterianas azules y blancas, las colonias blancas corresponden a bacterias que contienen el inserto clonado. 1. Seleccione 10 colonias bacterianas blancas de las cajas petri. Para esto divida cada caja en cuatro cuadrantes y escoja colonias totalmente aisladas y blancas. Se seleccionan en primera instancia 10 colonias de cada fragmento clonado. 2. En tubos PCR dispense 15 µL de agua destilada autoclavada por cada colonia seleccionada. Etiquete cada tubo con el número de colonia que se evaluará. 3. Utilizando un palillo pinche cada colonia seleccionada y enjuague este palillo en cada tubo PCR con agua. Descarte el palillo. Se utiliza un palillo por cada colonia.
---------------------------------------	--

Procedimiento detallado	4. Realice un subcultivo de cada colonia seleccionada en cajas petri con medio LB. Incube a 37°C por una noche, verifique que exista crecimiento bacteriano y guarde este stock de bacterias a 5°C para futuros ensayos. Realice una reacción PCR utilizando como templado de ADN el producto bacteriano diluido obtenido en el paso 2. Para la reacción PCR utilice los cebadores específicos ya sea para SSR o para secuencia de cloroplasto. 5. Si efectivamente la colonia bacteriana tiene el inserto clonado, la amplificación PCR dará como resultado fragmentos del tamaño esperado. Verifique las amplificaciones en geles de agarosa utilizando como control positivo reacciones PCR que utilicen como templado el ADN genómico del organismo. 6. Proceda a la secuenciación de su producto clonado.
Observaciones	Este protocolo es el indicado en el manual técnico del kit.
Referencias bibliográficas	Invitrogen. 2006. Manual TOPO TA <i>Cloning Kit</i> de Invitrogen (Cat. No. K4500-02)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Applied Biosystems. 2000. ABI Prism 310 Genetic Analyzer. User Guide
- Applied Biosystems. 2003. GeneMapper ID Software Version 3.1 Human Identification Analysis. User Guide
- Bardakci, F. 2000. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers Cumhuriyet University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology, Turk J Biol 25: 185-196
- Benitez, M. y Mcspadden-Gardener, B. 2009. Linking Sequence to Function in Soil: Sequence directed isolation of novel bacteria contributing to soil borne plant disease suppression. Applied and Environmental Microbiology 75: 915-924
- Carrera, A. 2011. Caracterización bioquímica, molecular y funcional del banco de cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP aisladas de la rizosfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la Sierra ecuatoriana. Tesis Ingeniera en Biotecnología. Quito- Ecuador. Universidad Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Tesis *in prep*
- Chavarriaga-Aguirre, P.; Maya, M.M.; Bonierbale, M.W.; Kresovich, S.; Fregene, M.A.; Tohme, J.; Kockert, G. 1998. Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. TAG, 97 (3): 493-501
- Chia, J. 2009. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de un colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú
- CIAT. 1995. Protocolos para Marcadores Moleculares. Gonzáles, D.O.; Palacios, N.; Gallego, G. y Thome, J. (comps. y eds.). Unidad de investigación en Biotecnología, Centro internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 82 p. Publicación CIAT No. 258
- Cifuentes, L. 2008. Manual de Entrenamiento de la Operación del secuenciador ABI-310, Data Collection V3.0. Análisis de resultados GeneMapper ID v3.2, Sequencing Analysis v5.3 y SeqScape v2.6. Applied Biosystems
- Colombo, C.; Second, G.; Losada Valle, T.; Et Charrier A. 1998. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. Genetics and Molecular Biology 21, 11 105-113
- Cornide. 2000. M.T., Diversidad genética y marcadores moleculares. CNIC, La Habana, 2000.
- Delgado, A. 2006. Uso de Marcadores Moleculares en Plantas; Aplicaciones en frutales del Trópico. Agronomía Mesoamericana 17(2): 221-242. 2006
- Dellaporta, S.L.; J. Wood y J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Versión II. Plant Molecular Biology Reporter 1 (14): 19-21
- Fares, T. 2008 Instituto de Análisis. Biología Molecular: sus aplicaciones en el laboratorio clínico. Disponible en: http://www.farestaie.com.ar/te/intros/intro_bio_molec.htm
- Fasre Taie. Instituto de Análisis. Biología Molecular: sus aplicaciones en el laboratorio clínico. Disponible en: http://www.farestaie.com.ar/te/intros/intro_bio_molec.htm
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores Moleculares en el Análisis Genético, Primera edición. Brasilia – Brasil: EMBRAPA-CENARGEN
- González, M.; Medina, M. & Palomares, G. 2004. Identificación y selección de marcadores moleculares Inter-microsatelite (ISSR) para la diferenciación varietal en *Capsicum annuum* L. (en línea), Consultado online

- Jhingan, A. 1992. A novel techonology for DAN isolation. *Methods Mol. Cell. Biol.* 3:15-22.
- JICA. 1998. Manual for ADN Extraction in Plants. Ref. No. 11, 42 p
- LI-COR Biosciences. 2004. Automated Microsatellite Analysis. Lincoln, Nebraska 68504 USA. (en línea), Disponible en <http://www.licor.com/bio/PDF/genomics/microsat.pdf>
- LI-COR Biosciences. 2009. Biotechnology, Advanced Discovery with Infrared Imaging (en línea). Disponible en <http://www.licor.com/bio/applications/applications.jsp>
- Manual (IRDye Fluorescent AFLP for large Plant Genome Analysis). “ IRDye Fluorescent AFLP kit for large Plant Genome Analysis” (LI-COR). Pag 5-6
- Mariac, C.; Trouslot, P.; Poteaux, C.; Bezancon, G.; An Renno, J.F. 1999. Choloroplast ADN Extracction from herbaceous and Woody Plants for direct Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. In *Biotechniques* 28:110-113
- Mathias, M.; Sagredo, B.; Kalazich, J. 2007. Uso de Marcadores SSR para Identificación de Germoplasma de Papa en el Programa de Mejoramiento de INIA de Chile. *Agric. Téc.* 67 (1), 270-281
- Myburg, A.; Remington, D. 2000. Protocol for High-Throughput AFLP Analysis Using LI-COR IR2 Automated Sequencer. Forest Biotechnology Group – Dept. of Forestry, Dept. of Genetics North Carolina State University. pp 13
- PureLink™ Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA Catalog No. K1820-01
- Qubit® Quantitation Platform, Q32857, 2007
- Russell, J.; Fuller, J.; Macaulay, M.; Hatz, B.; Jahoor, A.; Powell, W. y Waugh, R. 1997. Direct comparison of leves of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95:714-722
- Sánchez, R. 2004. El RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA) en el entorno de los marcadores moleculares. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Biología molecular y Biotecnología. Biofarbo. pp. 61:66
- Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60:73-7
- Tautz, D.; y M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Resources.* May 25;12 (10):4127-38
- Templeton, A. and J. Lawrence. 1988. FRAG-LENGTH III: algorithm for the calculation of molecular weights. Software distributed by the autors
- Valadez, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad
- Velasco Mosquera, R. 2004. PRINCIPIOS DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES BASADAS EN PCR, Universidad Nacional Sede Palmira
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolff, K.; Kahl, G. 2005. DNA Fingerprinting in Plant: Principles, Methods an Applications, Segunda edición, Editorial CRC Press Taylor & Francis Group, p.7-9, 42-45
- Williams, J. 1990. ADN polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* Pp. 6531-6535

Mayor información:

INIAP

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

Departamento Nacional de Biotecnología (DNB)

Estación Experimental Santa Catalina

Panamericana Sur km 1

Apartado Postal: 17-01-340 • Tel-fax: (02) 3006 284

E-mail: biotecnologia.eesc@iniap.gob.ec

www.iniap.gob.ec

Quito-Ecuador



GOBIERNO NACIONAL DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR

Econ. Rafael Correa Delgado
PRESIDENTE CONSTITUCIONAL

Dr. Ramón Espinel Martínez
MINISTRO DE AGRICULTURA, GANADERÍA
ACUACULTURA Y PESCA

Dr. Julio César Delgado Arce
DIRECTOR GENERAL DEL INIAP

INIAP - Estación Experimental Santa Catalina