

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
**División de Ciencias Biológicas y Ambientales**



ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN Y DE LOS  
MARCADORES RAPD E ISTR EN ACCESIONES DE *Solanum*  
*lycopersicum* var. *cerasiforme*.

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD  
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

José Martín García Díaz

TESIS/CUCBA



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología*

1290/ C. C. BIOLOGÍA

C. José Martín García Díaz

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el cambio en el título de su tema de titulación en la modalidad de: Tesis e Informes Opción Tesis: con el título: "Estandarización de la extracción de ADN y de los marcadores RAPD e ISTR en accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: M.C. Martha Isabel Torres Morán y como asesor a el/la Dra. Anne Santerre Lucas y el Dr. Eduardo Rodríguez Guzmán.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 13 de febrero del 2008.

  
DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

  
M en C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

**Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.**  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMNES, opción TESIS, con el título: "Estandarización de la extracción de ADN y de los marcadores RAPD e ISTR en accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*" que realizó el/la pasante **José Martín García Díaz**, con número de código **397295883** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Las Agujas, Zapopan, Jalisco. 31 de enero 2008

*U.B.O*

M.C. Martha Isabel Torres Morán  
 Directora del trabajo

Dra. Anne Santerre Lucas  
 Asesora

Dr. Eduardo Rguez. Guzmán  
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Aarón Rodríguez Contreras		05/Feb/08
Dra. Luz Patricia Castro Félix		05-Feb-08
Dra. Josefina Casas Solís Supl.		05-Feb-2008
Dra. Lucila Méndez Morán		08-Feb-2008

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares perteneciente al Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos (IMAREFI) del Departamento de Producción Agrícola, División de Ciencias Agropecuarias, y fue financiado a través del proyecto "Diagnóstico, exploración y colecta del género *Solanum* sección *lycopersicon* en el Occidente de México" con financiamiento del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios, por permitirme lograr un objetivo más en mi vida.**

**A mis padres, por su esfuerzo y apoyo para concretar mi formación profesional.**

**A la Maestra Martha Isabel Torres Morán por su apoyo y dedicación para la realización de este trabajo.**

**Al Profesor Eduardo Rodríguez Guzmán y a la Maestra Anne Santerre Lucas por formar parte como asesores de este trabajo.**

**A mis compañeros del laboratorio, Andrés López Rivera y Ana Paulina Velasco Ramírez por su ayuda brindada.**

**A los Maestros sinodales por la sus oportunos comentarios y correcciones al presente trabajo.**

**A todos los Maestros del CUCBA que participaron en mi formación profesional.**

**A mis amigos del CUCBA por su apoyo y amistad brindados a lo largo de mi formación.**

RESUMEN .....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	3
II. ANTECEDENTES .....	5
2.1 Recursos fitogenéticos .....	5
2.2 Monitoreo de la diversidad genética en una población .....	6
2.3 El género <i>Solanum</i> .....	7
2.4 Aislamiento de ADN y aplicación de marcadores moleculares .....	10
2.5 Factores que determinan la elección de un método de extracción .....	11
2.6 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por espectrofotometría .....	12
2.7 Análisis cualitativo por electroforesis .....	14
2.7.1 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis .....	15
2.7.2 Electroforesis en geles de agarosa .....	15
2.7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	16
2.7.4 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida .....	17
2.8 Tinción de geles .....	17
2.9 Marcadores moleculares RAPD e ISTR .....	18
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	21
3.1 Objetivo .....	21
3.2 Hipótesis .....	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
4.1 Extracción de ADN genómico .....	22
4.3 Estandarización del protocolo de PCR para RAPD .....	24
4.4 Estandarización del protocolo de PCR para ISTR .....	24
4.5 Análisis estadístico .....	25
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
5.1 Extracción de ADN genómico .....	26
5.2 Análisis estadístico .....	28
5.3 Determinación de la calidad de los productos de amplificación por PCR para RAPD .....	30
5.4 Determinación de la calidad de los productos de amplificación por PCR para ISTR .....	32
VI. CONCLUSIONES .....	37
VII. PERSPECTIVAS .....	38
VIII. LITERATURA CITADA .....	39
ANEXO .....	43
PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO .....	43
PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES .....	45

## RESUMEN

La importancia de la conservación del tomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en nuestro país, radica en que es una fuente de genes utilizables en el mejoramiento genético de las variedades comerciales de tomate existentes.

Entre las acciones que se deben tomar para la conservación y manejo de los recursos fitogenéticos como el tomate silvestre, se encuentra su caracterización, cuya finalidad es describir y conocer los materiales que se pretenden conservar. A su vez proporciona una información valiosa para los investigadores acerca de sus características agronómicas y genéticas.

En la actualidad, una de las técnicas utilizadas para la caracterización de recursos fitogenéticos es la aplicación de marcadores moleculares, que proporcionan huellas genéticas e información que se genera desde el ADN de los organismos. Para la aplicación de herramientas moleculares en la caracterización, filogenia y relaciones fenéticas es necesario contar con protocolos convenientes de extracción de ADN que permitan la obtención del mismo con buena calidad y la más alta concentración posible. Por otra parte, es necesario para el trabajo de laboratorio en este tipo de estudios, estandarizar los protocolos que se encuentran publicados para esa especie o para especies afines, ya que las condiciones específicas varían, tanto en las muestras manejadas, como en los protocolos utilizados en los laboratorios de investigación.

El objetivo del presente trabajo fue comparar la calidad y concentración del ADN obtenido con dos métodos de extracción y verificar su calidad de amplificación por PCR utilizando marcadores tipo

RAPD e ISTR. Para ello, se utilizaron nueve accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* colectadas en el Occidente de México y una muestra de tomate tipo Saladette.

Se encontró que existen diferencias significativas entre las concentraciones de ADN obtenidas por los dos métodos comparados. El método de Saghai-Marroof y col. (1987) generó la mayor concentración. Sin embargo, la mejor calidad de amplificación se obtuvo en las muestras extraídas por el método Keb-Llanes y col. (2002). En lo que respecta a la amplificación por PCR, se obtuvieron patrones de amplificación más definidos en las muestras de ADN que se obtuvieron con el método Keb-Llanes y col. (2002) para ambos marcadores.



# I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo forma parte del proyecto titulado: Diagnóstico, exploración y colecta del género *Solanum* sección *lycopersicon* en el Occidente de México. El proyecto es financiado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). El objetivo de proyecto es la exploración de la diversidad genética del recurso y la conservación del mismo con fines de utilización en el mejoramiento genético. También pretende evitar la erosión genética.

La importancia de la conservación de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* en nuestro país, radica en que las especies silvestres de tomate son una fuente de genes utilizables en el mejoramiento genético. Esto abarca, por ejemplo, especies resistentes a la salinidad, que pueden crecer a sólo cinco metros del mar. El valor del aporte de semejante diversidad genética al cultivo industrial del tomate es inestimable. Al tomate cultivado se le han introducido por lo menos veinte características de resistencia del tomate silvestre. De hecho, esta diversidad de los tomates silvestres es la que ha hecho posible el cultivo industrial del tomate.

Como primer paso para alcanzar el objetivo del proyecto mencionado, es necesario contar con ADN genómico de buena calidad y concentración para la utilización de herramientas moleculares. También es esencial contar con protocolos convenientes de extracción de ADN que permitan la obtención del mismo con las características necesarias. Por otra parte, en cada laboratorio es necesario estandarizar los procesos relativos a la aplicación de marcadores moleculares, ya que las

condiciones en cada uno varían de acuerdo al equipo y reactivos que se utilizan.

Este trabajo servirá como base para la caracterización molecular de las accesiones del proyecto. Se pretende con el mismo, determinar el mejor método de extracción de ADN de las colectas totales del proyecto y la estandarización de las técnicas basadas en PCR que servirán para su estudio.

## II. ANTECEDENTES.

### 2.1 Recursos fitogenéticos

De acuerdo a la FAO, la agricultura y la seguridad alimentaria de cualquier país se basan en tres recursos primordiales: el agua, la tierra y los recursos fitogenéticos. Los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura, generalmente referidos como recursos fitogenéticos, consisten en la diversidad de material genético contenido en las variedades tradicionales y cultivares modernos utilizados por los agricultores, así como los parientes silvestres y otras especies de plantas compatibles que pueden ser usadas como alimento humano, animal y producción de fibras. El término Recursos Genéticos implica que los materiales tienen valor económico real o potencial (Sánchez, 2004).

De acuerdo a Sánchez (2004), a pesar de su importancia, los recursos fitogenéticos no se han estudiado suficientemente, son frágiles y se encuentran continuamente amenazados. Además juegan un papel muy importante desde diferentes puntos de vista: a) la variabilidad genética es la base del desarrollo de variedades mejoradas que podrían asegurar cantidades estables y suficientes de alimentos y otros satisfactores, b) representan una fuente de nuevas opciones de cultivo y resistencia a factores adversos, c) ayudan a resolver problemas de rehabilitación de ecosistemas degradados en base a la selección o reintroducción de especies apropiadas d) pueden ser una opción segura para ampliar la frontera agrícola, e) un elemento estratégico en tratados de intercambio de países y f) un legado de seguridad para generaciones futuras.

En el caso de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, se han encontrado registros de su cultivo desde hace muchos años. Es un

pariente silvestre del que hoy conocemos como jitomate cultivado o tomate como se le conoce en muchas partes del mundo. Sánchez (2004) lo reporta como una especie muy pobremente representada en las colecciones de los bancos de germoplasma y como especie que es difícil de regenerar. Este tipo de recursos, siembra su propia semilla y exhibe por lo general, una adaptación a ambientes especializados, los cuales están muy bien definidos en función de longitud del día, suelo, disponibilidad de humedad, temperatura, polinizadores y relación con otras especies. Poseen muchos genes dominantes y alelos recesivos de bajas frecuencias y muy difícilmente es posible regenerar la integridad genética de las muestras recolectadas, debido entre otras cosas a que los sitios de regeneración son diferentes a los sitios de recolección.

## **2.2 Monitoreo de la diversidad genética en una población**

La caracterización genética de las poblaciones naturales contribuye a la descripción de su diversidad genética, inter e intrapoblacional y permite el desarrollo de proyectos de conservación de los recursos naturales para el estudio de los cambios evolutivos y la variación en los patrones genéticos de las poblaciones naturales (Sosa, 2003). La diversidad genética dentro de las especies, es la razón principal por la que un determinado taxón tenga la oportunidad de evolucionar bajo condiciones cambiantes del ambiente y presiones de selección. Como es sabido, la variabilidad que se observa entre individuos, es debida parcialmente a la interacción de diferencias genéticas con el ambiente que los rodea. La diversidad genética dentro y entre especies, puede determinarse por medio del examen directo de muestras del material genético, ya que ocurre en forma de variantes de nucleótidos dentro del genoma. Las variantes generadas se denominan alelos. La variación alélica ocurre en varios lugares o posiciones cromosómicas llamadas *locus* (*loci* en plural). Cuando los *loci* son variables, es decir, que

presentan más de un alelo, entonces se les llama polimórficos (Sánchez, 2004).

La determinación de la variabilidad en vegetales requiere de la identificación de caracteres o marcadores que permitan discriminar entre las diferentes entidades. Actualmente existe una gama muy amplia de marcadores que pueden utilizarse para el estudio de la diversidad vegetal. Los marcadores difieren en la sensibilidad para resolver diferencias genéticas, en el tipo de datos que generan y en los niveles taxonómicos en que pueden ser aplicadas (Karp y col., 1996). Los marcadores morfológicos han sido los más ampliamente utilizados, pero también existen marcadores químicos (Almaraz-Abarca y col., 2006), bioquímicos y moleculares (Almaraz-Abarca, 1994; Almaraz-Abarca y col., 1998 y 2002; Sosa y col., 2002).

Los marcadores de ADN, permiten identificar variaciones directamente en el material genético de los organismos. Resultan de diferentes clases de mutaciones en el genoma, son prácticamente ilimitados en número y no están influenciados por factores ambientales o por la edad o el estado fenológico de la planta (Sosa y col., 2002). La mayoría de los marcadores de ADN se obtienen a través de la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) o uno de sus múltiples variantes, al ADN extraído y purificado.

### **2.3 El género *Solanum***

El tomate (*Solanum lycopersicon* Mill.) es un fruto ampliamente utilizado para consumo humano. Las variedades que se cultivan comercialmente han adquirido, a través de selección natural e innumerables programas de mejoramiento genético, su uniformidad, tamaño y resistencia a enfermedades. Muchos de los caracteres que pueden encontrarse en las variedades mejoradas del tomate, han sido

adquiridos gracias a la diversidad genética existente en el género. Existen reportes de que el tomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) es una de las fuentes de genes mejoradores a través de hibridación (Williams y St. Claire, 1993; Villand y col., 1998; Restrepo y Vallejo, 2003).

Breto y col. (1993) estudiaron, por medio de isoenzimas, la variabilidad genética en diversas accesiones del género, reportado en ese tiempo como *Lycopersicum* spp. y encontraron que las especies con mayor variabilidad genética son *Lycopersicum chilense*, *L. peruvianum* y *L. folium*. En contraste las especies que cuentan con menor variabilidad son: *L. parviflorum* y *L. pimpinelli*. En el mismo estudio, estos autores reportaron a *L. esculentum* con una variabilidad intermedia. En un trabajo similar, Villand y col. (1998) estudiaron la magnitud y la estructura de la variación genética entre accesiones de tomate colectadas en diferentes regiones. Los RAPD (por sus siglas en inglés Randomly Amplified Polymorphic DNA) fueron utilizados para estimar las relaciones filogenéticas entre las accesiones colectadas en diferentes rangos geográficos y distancias genéticas. Los resultados indicaron que las poblaciones de *L. esculentum* var. *cerasiforme* eran distintas de las colectadas en Perú, Ecuador y Chile pero con niveles similares de diversidad entre ellas.

Williams y St. Claire (1993) realizaron un estudio de la variabilidad con marcadores RAPD y RFLP (Restriction fragment length Polymorphism). Utilizaron 46 accesiones de tomate cultivado, tomate silvestre y tomate regional de Sudamérica. Los resultados mostraron 135 bandas monomórficas de un total de 215 para RAPD y 31 *loci* monomórficos de los 48 que se obtuvieron con RFLPs (por sus siglas en inglés Restriction fragment Length Polymorphism). La frecuencia de

polimorfismos resultó muy baja ya que el cultivado mostró 2.8%, el regional de Sudamérica 11.6% y el silvestre 24.5%.

Por otra parte, se ha estudiado otras características en especies silvestres de este mismo género. Por ejemplo, la resistencia a moho polvoriento *Oidium lycopersicum* (Lindhout y col., 2007). En este trabajo se incluyeron *Lycopersicum hirsutum*, *L. parviflorum* y *L. peruvianum*, las que mostraron una gran variación de resistencia, además de compatibilidad con el tomate cultivado. Trabajos como este, muestran buenas perspectivas en programas de mejoramiento. Adicionalmente en este trabajo, se logró el mapeo del gen de resistencia al moho polvoriento oi-1 en el cromosoma 6 de *L. hirsutum*.

Como un ejemplo de la utilización de genes de especies silvestres en programas de mejoramiento genético, se tiene el caso de la incorporación de genes de tolerancia al frío utilizando *Lycopersicum hirsutum* para generar un cruzamiento recombinante endogámico de una línea y usando *L. esculentum* como padre recurrente. La tolerancia al frío fue evaluada bajo condiciones de invernadero y posteriormente se hicieron análisis QTL (por sus siglas en inglés Quantitative Traits Loci) obteniendo que la tolerancia al frío se encontró en ambos progenitores. Los alelos de tolerancia confieren desarrollo de hojas más altas bajo condiciones de estrés que usualmente coinciden con la tolerancia al frío (Oyanedel y col., 2007).

En tomate cultivado se han reportado estudios sobre diversidad genética. En un primer caso se estudiaron 25 accesiones de tomate tipo "Chonto" de Cauca, Valle de Cauca y ejes cafetaleros, Antioquia, Huila y Santander en Colombia. Los principales resultados reportan coeficientes de variación entre 4.58 y 82.34% indicando que el potencial genético

disponible para los programas de mejoramiento depende de las características que se pretenda mejorar. Para el análisis de clasificación se utilizaron seis marcadores tipo microsátélites, sin embargo, no se reportó un estimativo de la diversidad genética (Restrepo y Vallejo, 2003).

#### **2.4 Aislamiento de ADN y aplicación de marcadores moleculares**

Se han desarrollado muchos métodos para aislar ADN genómico de alto peso molecular a partir de diferentes tipos de tejido de plantas. Dichos métodos difieren básicamente en el tejido que usan para la extracción, el cual puede ser fresco, liofilizado y en cantidades que difieren según la condición del tejido (Hillis y col., 1996); pueden diferir además en los compuestos utilizados en los diferentes pasos de la extracción, como es la precipitación de proteínas y la precipitación y lavado del ADN (Valadez y col., 2000).

Muchos de los protocolos de extracción que se han publicado, mencionan la importancia en la purificación del ADN, es decir, la remoción de sustancias contaminantes como polisacáridos y polifenoles cuya presencia en los tejidos varía según la especie de que se trate, ya que cuando se encuentran presentes en el ADN extraído, a menudo interfieren con los procesos de digestión con enzimas de restricción, electroforesis, PCR y secuenciación (Murray y Pitas, 1996; Csaikl y col., 1998; Rogstad, 2003). Finalmente, el protocolo, debe garantizar eficiencia, reproducibilidad y estabilidad del ADN, así como potencial para aplicar el producto en amplificaciones, restricciones, formación de bancos genómicos y estudios filogenéticos (Wolfe y col., 2002).

El tomate es una especie que contiene altos niveles de taninos y componentes polifenólicos en sus tejidos. Estos compuestos a menudo se co-extraen con los ácidos nucleicos. En sus formas oxidantes, los



compuestos polifenólicos forman enlaces covalentes con el ADN, dándole al extracto un color café y haciéndolo menos útil para la aplicación de técnicas moleculares (Peterson y col., 1997).

## **2.5 Factores que determinan la elección de un método de extracción.**

Los factores que deben ser tomados en cuenta para la elección del mejor método de extracción son:

Cantidad de ADN obtenido. La mayoría de las reacciones de amplificación, parten de cantidades que se encuentran en el orden de 50 a 100 ng/μl (Valadez y Kahl, 2000).

Calidad. Deben tomarse en cuenta la cantidad de polifenoles presentes en la muestra, así como ARN y polisacáridos. Estos compuestos pueden inhibir la acción de la polimerasa de ADN y las enzimas de restricción, que afectan significativamente los resultados que pueden obtenerse en la aplicación de técnicas moleculares (Murria y Pitas, 1996; Csaikl y col., 1998; Rogstad, 2003).

Facilidad y costos. Estos factores dependen de los pasos que se realicen en la extracción. Algunos métodos dan énfasis a la precipitación de proteínas, o bien al lavado de ADN. Por otra parte, según los diferentes reactivos que utilice cada método, pueden encontrarse residuos de los mismos, que no se eliminan durante los lavados y esto interfiere de igual manera con la acción de las enzimas en la restricción o en la PCR. Los costos dependen de la cantidad de reactivos empleados y el tiempo utilizado en el procesamiento de las muestras (Morales, 2006).

Reproducibilidad. Debe garantizar la obtención de cantidad y calidad constantes en las muestras procesadas, así como la estabilidad del ADN en almacenamiento (Morales, 2006).

## **2.6 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por espectrofotometría**

Muchos métodos para el análisis cuantitativo de productos biológicos se basan en la formación de soluciones coloreadas. En estas la intensidad del color obtenido puede utilizarse como medida de concentración de la sustancia a determinar, por lo que para la cuantificación de soluciones se realiza una comparación de la intensidad de color producida por una muestra (muestra a determinar) con la producida por el patrón, conocida como referencia (blanco de calibración). Además, se pueden hacer análisis cuantitativos haciendo un barrido de la solución a determinar sobre una amplitud de longitudes de onda de luz de interés proporcionada por una porción de absorbancia o transmitancia de la muestra.

La intensidad del color se establece en función del grado de absorción de luz a longitudes de onda específicas del espectro visible (400 y 750 nm), las longitudes de onda que están fuera del rango visible son ultravioleta o infrarrojo que escapan al alcance del ojo humano (cuadro 1). Por medición espectrofotométrica, se entiende la medición de la intensidad de luz en un estrecho intervalo de longitudes de onda del espectro. Los principios de estas mediciones se basan en la ley de Lambert Beer, la cual especifica que: "la concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de luz absorbida o inversamente proporcional al logaritmo de la luz transmitida". Transmitancia (T) es la capacidad de una solución para transmitir la luz, es decir, la relación entre la luz transmitida (luz que emerge de una solución) y la cantidad de luz entrante o incidente.

Absorbancia (Abs) es la cantidad de luz absorbida por volumen por una solución como Densidad Optica (DO), es decir, el porcentaje de luz absorbida por la solución. En condiciones apropiadas, la DO o

absorbancia es directamente proporcional a la concentración del componente coloreado de la solución, por lo tanto la absorbancia es el logaritmo negativo de la transmitancia (Zañudo y col., 2003).

Cuadro 1. Absorción de luz por una muestra a diferentes longitudes de onda (Zañudo y col., 2003)

<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>Nombre de la región del espectro</b>	<b>Color transmitido</b>	<b>Color absorbido</b>
180 - 220	UV lejano	No visible	
220 - 380	UV	No visible	
380 - 430	Visible	Violeta	Verde amarillento
430 - 475	Visible	Azul	Amarillo
475 - 495	Visible	Azul-verdoso	Anaranjado
495 - 505	Visible	Verde-azuloso	Rojo
505 - 555	Visible	Verde	Púrpura
555 - 575	Visible	Verde-amarillento	Violeta
575 - 600	Visible	Amarillo	Azul
600 - 620	Visible	Anaranjado	Azul-verdoso
620 - 700	Visible	Rojo	Verde-azuloso

Los fundamentos para cuantificar el ADN por medio de espectrofotometría se basan en la absorbancia del ADN en longitudes de onda de luz ultravioleta. Su absorción máxima es en la longitud de onda de 260 nm y esto permite calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una densidad óptica de 1 ( $DO=1$ ) corresponde aproximadamente a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  de ADN de doble cadena. Las proteínas absorben luz UV en los 280 nm y la relación entre las lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm es útil como indicador de contaminación por proteínas o ARN. Esta relación aporta una estimación de la pureza del ADN obtenido.

En general, una preparación pura de ADN de doble cadena presenta una relación  $DO_{260}/DO_{280}$  con un valor 1.8 a 2.0. Relaciones más altas se deben frecuentemente a contaminación con ARN, mientras

relaciones menores, entre 1.4 y 1.7 pueden indicar la presencia de proteínas u otras impurezas (Sambrook y col., 1989).

## **2.7 Análisis cualitativo por electroforesis**

El grado de degradación del ADN puede ser estimado por electroforesis de una alícuota de muestra en geles de agarosa. El ADN de peso molecular alto, aparece como una banda bien definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos (inicio del corrimiento), mientras que el material parcialmente degradado, forma un barrido parecido a una mancha de fragmentos pequeños a lo largo del carril, haciendo en ocasiones que la definición de la banda citada pierda nitidez o no se aprecie. Algunas veces, el ADN puede estar contaminado con otras sustancias que también absorben la radiación UV, como son los compuestos fenólicos y polisacáridos. La presencia de estos compuestos puede impedir la interpretación correcta de la calidad e incluso la cantidad del ácido nucleico que está siendo analizado. Una forma rápida de estimar la pureza del ADN es a través de la fluorescencia que emite el bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino-6 etil, 5-fenilfenantridio). Este compuesto químico tiene afinidad por las moléculas de ADN de doble cadena y de ARN, entre las que se intercala, de manera que al irradiar el gel con una fuente de luz UV se puede apreciar la ubicación, calidad y cantidad de la preparación en cuestión. La estimación puede llevarse a cabo debido a que la fluorescencia emitida es proporcional a la masa del ADN o ARN. La cantidad de ácidos nucleicos en la muestra puede ser estimada por comparación respecto a estándares utilizados, como pueden ser el ADN del fago lambda o diluciones de ADN cuantificadas previamente por espectrofotometría (Morales, 2006).

### **2.7.1 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.**

Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN producidos por el corte de enzimas de restricción, o bien por la amplificación por PCR, es necesario utilizar una matriz inerte y semisólida. Esta matriz o soporte puede ser de agarosa o de poliacrilamida, que se eligen dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados.

Mientras que la poliacrilamida separa fragmentos inferiores a 200 pb, la agarosa separa fragmentos que van de 200 pb a 30 kb. La movilidad del ADN a través de la matriz está en función de su carga negativa, por lo que los fragmentos tienden a migrar hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis. La velocidad de migración depende del voltaje que se le aplique y la concentración de agarosa o acrilamida de los geles (Sambrook y col., 1989).

### **2.7.2 Electroforesis en geles de agarosa.**

La electroforesis en geles de agarosa es un método simple y eficiente para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN de varias longitudes. Los geles estándar de agarosa separan y resuelven fragmentos de 0.1 a 25 kb. El porcentaje de agarosa con el que se elabora un gel, depende también del tamaño de las moléculas que van a separarse. Normalmente, la agarosa al 0.8% separa fragmentos provenientes de la digestión con enzimas de restricción que reconocen secuencias de seis pares de bases, mientras que la concentración de 1% se utiliza para separar fragmentos generados por las enzimas de restricción que reconocen cuatro pares de bases, debido a que son fragmentos más pequeños. Sin embargo el uso de otras concentraciones de agarosa, permite hacer más eficiente la separación de los fragmentos. En el cuadro 2 se muestran las concentraciones óptimas para agarosa.

Cuadro 2. Espectro de resolución de fragmentos lineales de ADN (Sambrook y col., 1989).

<b>% AGAROSA</b>	<b>FRAGMENTOS DE ADN (KB)</b>
0.5	30 a 1.0
0.7	12 a 0.8
1.0	10 a 0.5
1.2	7 a 0.4
1.5	3 a 0.2

### **2.7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Los geles de poliacrilamida (PAA) se utilizan principalmente para separar fragmentos de ADN de bajo peso molecular (de 50 a 1000 pb), como son los productos de amplificación o productos de digestión con enzimas de restricción que requieren mayor definición de la que se puede tener con geles de agarosa. Dependiendo de la longitud del fragmento a separar, la concentración de poliacrilamida en el gel puede ser variable. Por ejemplo, para separar fragmentos de 80 a 500 pb la concentración utilizada normalmente es del 5%, para fragmentos menores, se incrementa la concentración.

Los geles de poliacrilamida se preparan a partir de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida, persulfato de amonio y TEMED (tetrametiletilendiamina). La proporción de las dos primeras sustancias influye en el tamaño del poro y las otras sustancias son el polimerizador y el catalizador de la polimerización, ya que a diferencia de los geles de agarosa que tienen una gelificación física (por enfriamiento) los geles de acrilamida necesitan una gelificación química (Sambrook y col., 1989).

#### **2.7.4 Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.**

Los geles de poliacrilamida pueden ser desnaturalizantes o no, la característica de desnaturalizante puede ser otorgada por la utilización de urea en el gel. Este tipo de geles se utiliza para la separación de fragmentos de ADN de cadena sencilla y para asegurar la migración de fragmentos de bajo peso molecular que pudieran verse afectados durante el corrimiento por la formación de estructuras secundarias debido a la complementariedad de bases. La concentración de estos geles varía de 4 a 8% (Sambrook y col., 1989).

#### **2.8 Tinción de geles**

La visualización de las moléculas de ADN, ARN y proteínas separadas por electroforesis, se lleva a cabo mediante el uso de ciertos compuestos químicos en solución que tienen la capacidad de unirse a estas macromoléculas en el gel e interactuar con ellas. Dependiendo del tipo de compuesto químico que se utilice, su visualización puede ser directa o con luz UV. Se han desarrollado varios métodos para tales efectos. El ADN puede visualizarse en el gel por previa tinción con una solución de bromuro de etidio (0.4 a 1.0 µg/ml) durante 15 minutos y posteriormente observarlo con una fuente de luz UV. La tinción con sales de plata se utiliza para la visualización de proteínas y ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida, en donde los iones de plata reaccionan con las macromoléculas en un pH mayor de 10, formando complejos. Durante la reacción, las macromoléculas quedan reducidas y la plata se deposita en los sitios de reducción, por lo que los ácidos nucleicos o las proteínas pueden ser fácilmente visualizados con este método de tinción (Sambrook y col., 1989).

## **2.9 Marcadores moleculares RAPD e ISTR**

### **RAPD**

El procedimiento de los RAPDs es relativamente rápido, solamente se requiere de pequeñas cantidades de ADN, además no involucra radioactividad ni la transferencia tipo Southern. Usualmente esta técnica provee marcadores dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas. Estos últimos resultan de inserciones o deleciones en las regiones amplificadas, o de cambios en las bases nitrogenadas con lo que se altera la unión del iniciador, sin embargo, para la reproductividad de los patrones de RAPDs es absolutamente necesario optimizar las concentraciones de ADN,  $MgCl_2$ , iniciadores y dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatos). También la clase y marca de la ADN polimerasa termoestable deben de mantenerse constantes durante la experimentación así como la utilización del mismo termociclador; cualquier cambio en la ADN polimerasa o en el termociclador puede afectar inevitablemente la reproducibilidad de los patrones. Por esta razón, aquellos patrones de RAPDs que no son constantes no son factibles de publicación por lo que deben probarse las condiciones de optimización de la reacción. Una vez que todos los parámetros se conocen, los patrones de RAPDs son reproducibles y por lo tanto confiables (Valadez y Kahl, 2000).

Los marcadores RAPD amplifican secuencias aleatorias dentro del genoma, proporcionan un método rápido para generar fragmentos de amplificación que pueden variar de 2 a 25, dependiendo la especie y el cebador y permiten el estudio de analizar poblaciones provenientes de diferentes cultivares de plantas, de especies dentro de un mismo genero o diferentes géneros de una misma familia. Las mayores ventajas de este marcador sobre los de otro tipo son su simplicidad técnica y que no existe necesidad de información previa de la secuencia del genoma que



se está estudiando. Por otra parte, tiene como desventaja su naturaleza dominante, lo cual limita su uso en genética de poblaciones y en el mapeo.

## **ISTR**

Las repeticiones de secuencias etiquetadas o ISTRs (por sus siglas en inglés: Inverse Sequence-Tagged Repeat) son marcadores basados en el aprovechamiento de secuencias de retrotransposones, los cuales son elementos genéticos que se mueven dentro del genoma de un organismo vía ARN. Existen en la mayoría de las plantas y son secuencias de que se auto-repican y reinsertan en diferentes partes del genoma (Rhode, 1996).

Los ISTRs representan una técnica basada en la PCR que permite el análisis de genomas del reino vegetal y animal, ya que se ha encontrado la presencia de retrotransposones en organismos de ambos reinos (Kidwell, 2002).

Esta técnica surgió del estudio del ADN genómico del coco, misma que fue basada en la presencia abundante de los elementos copia (elementos móviles o transposables) en el reino vegetal. En el experimento inicial para este tipo de marcador, se analizaron muestras de ADN de otras especies de plantas, con el objetivo de demostrar la presencia de estos elementos en otros organismos además del coco. Para esto, se diseñaron cebadores con la secuencia ya conocida de los elementos copia o retrotransposones del coco, que fueran capaces de amplificar la región entre ellos (de ahí el término de la secuencia invertida), que es lo que realmente genera polimorfismo (Rhode 1996, Kidwell y Lisch, 1997).

La detección de polimorfismo asociado a la inserción de retrotransposones en el genoma, crea conexiones nuevas entre el ADN genómico y las secuencias altamente específicas al final de esos elementos transposables, los cuales para insertarse en el genoma requieren la síntesis de una molécula de ADN a partir de ARN, que sirve de molde (Lightbourn y Villeux, 2003).

Los elementos transposables (TEs, por sus siglas en inglés) fueron descubiertos desde 1950, pero el significado y valor de este descubrimiento, como fuente de variación genética en animales y plantas, se incubó durante los siguientes 30 años. Diferentes tipos de TEs parecen estar presentes en todas las especies de plantas pero los arreglos genómicos y las alteraciones estructurales y regulatorias de la expresión de genes individuales que ocasionan son muy variables aún en taxa muy relacionados (Bennetzen, 2000).

Las aplicaciones prácticas de los ISTRs están representadas principalmente por la determinación general de la biodiversidad, la caracterización de especies silvestres, el manejo de bancos de genes, el estudio sobre genética de poblaciones, las huellas de variedades para su identificación, la introgresión de genes y otros estudios sistemáticos, como posible selección asistida por marcadores en el mejoramiento, debida a la identificación de marcadores co-segregantes con caracteres deseables. Los ISTRs tienen un valor potencial para identificar cruces entre materiales, ya que permiten seguir la introgresión de *loci* genéticos en un material híbrido (Osorio y col., 2006). Se han utilizado en la identificación de variabilidad genética asexual en agaves, probando ser efectivos en la detección de ésta (Infante y col., 2003; Osorio y col., 2006; Torres-Morán y col., 2007).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que *Solanum lycopersicum* es una especie que posee un alto contenido de compuestos fenólicos y polisacáridos en su follaje, es necesario probar y estandarizar protocolos de extracción de su ADN genómico, con el objetivo de determinar con cuál de ellos se obtiene una calidad y concentración de ADN que permita la aplicación de técnicas de estudio y de caracterización como son los marcadores RADP e ISTR.

#### 3.1 Objetivo

##### General:

Comparar la calidad y concentración del ADN obtenido con dos métodos de extracción y verificar la calidad de su amplificación por PCR con los marcadores RAPD e ISTR.

##### Particulares:

- Evaluar la calidad del ADN obtenido con el método reportado por Saghai-Marooft y col. (1987).
- Evaluar la calidad del ADN obtenido con el método reportado por Keb-Llanes y col. (2002)
- Estandarizar y aplicar las técnicas de RAPD e ISTR en las muestras de ADN genómico de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* obtenidas con ambos protocolos de extracción.

#### 3.2 Hipótesis

Existe diferencia en cantidad y calidad del ADN obtenido entre los protocolos, las cuales afectan la calidad de los marcadores moleculares RAPDs e ISTRs.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Extracción de ADN genómico

Los trabajos de estandarización de la extracción de ADN en accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Filogenéticos (IMAREFI), perteneciente al Departamento de Producción Agrícola de la Universidad de Guadalajara. Para ello se utilizó tejido fresco de un grupo de accesiones representativas de Occidente de México. Las muestras se tomaron de plantas sembradas en el invernadero del Instituto. En el cuadro 3 se describe el material vegetal utilizado. Los materiales fueron proporcionados por el Dr. Eduardo Rodríguez Guzmán. Una vez obtenido el tejido, se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Cuadro 3. Material vegetal utilizado

No.	Procedencia		
	Accesión	Localidad	Municipio
1	81-6	San Miguel del Zapote	Techaluta de Montenegro, Jal.
2	84-10	Alcaraces	Cuauhtemoc, Colima
3	260-11	Yurécuaro	Tanhuato de Guerrero, Mich.
4	267-7	La Rosa	Tamazula de Gordiano, Jal.
5	267-16	La Rosa	Tamazula de Gordiano, Jal.
6	285-2	El Atajo	Mascota, Jal.
7	319-6	Poblado Tierra Generosa	Tecuala, Nay.
8	132-2	Tecalitlán	Tecalitlán, jal.
9	135-7	Sayula-Ayutla	Ayutla, Jal.
10	H	Híbrido comercial tipo saladette	

Para la extracción se probaron los métodos reportados por Saghai-Marooif y col. (1984) y Keb-Llanes y col. (2002). Las diferencias entre estos métodos de extracción se mencionan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Comparación de los métodos de extracción de ADN utilizados

<b>Método reportado por Keb-Llanes y col., 2002</b>	<b>Método reportado por Saghai – Maroof y col., 1984</b>
<b>Lisis celular:</b> triturado con N <sub>2</sub> líquido	<b>Lisis celular:</b> triturado con N <sub>2</sub> líquido
<b>Cantidad de tejido:</b> 0.350 g	<b>Cantidad de tejido:</b> 0.350 g
<b>Buffer de lisis:</b> a base de: CTAB, TRIS, EDTA, BME ac. ascórbico, PVP y SDS	<b>Buffer de lisis:</b> a base de: CTAB, TRIS, EDTA, BME y bisulfito de Na
<b>Precipitación de proteínas:</b> En baño María a 65°C x 10 minutos	<b>Precipitación de proteínas:</b> En baño María a 60°C x 30 minutos
<b>Precipitación del ADN:</b> Con Isopropanol	<b>Precipitación del ADN:</b> Con Isopropanol
<b>Lavado y precipitación del ADN:</b> Etanol al 70%, acetato de potasio 5M	<b>Lavado y precipitación del ADN:</b> Etanol, acetato de sodio 1M y acetato de amonio 10mM
<b>Resuspensión del ADN:</b> en T.E. 100 µl	<b>Resuspensión del ADN:</b> en T.E. 50 – 100 µl
<b>Almacenamiento:</b> a -20°C	<b>Almacenamiento:</b> a -20°C

Se realizaron dos repeticiones de la extracción con cada método y posteriormente se verificó la calidad y la concentración del ADN obtenido, utilizando los métodos de electroforesis en gel de agarosa al 1% y espectrofotometría con lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm donde la relación entre ambas lecturas estima la calidad del ADN. Se aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración a partir de las lecturas de espectrofotómetro:

$$ConcADN_{(\mu g / \mu l)} = [DO_{260} \times \text{factor dilución} \times 50 \mu g / ml] / 1000$$

Donde el factor de dilución fue 1:100 y el término 50 µg/mL es debido a que una densidad óptica a 260 nm (DO<sub>260</sub>)=1 corresponde a una concentración de 50 microgramos (µg) por microlitro (µl) de ADN.

-4.2 Análisis estadístico para la comparación de calidad y concentración de ADN obtenida.

Con las lecturas espectrofotométricas obtenidas en cada muestra, se hizo una comparación estadística, consistente en un análisis de

varianza para grupos apareados con muestra pequeña y una prueba de significancia de medias por contrastes ortogonales. Ambos análisis se llevaron a cabo con el programa Excel de Windows.

#### **4.3 Estandarización del protocolo de PCR para RAPD**

Para la estandarización del protocolo de PCR para los RAPD se realizaron pruebas de PCR con el ADN extraído, utilizando los cebadores 1-5 del kit Ready-to-go de Amersham® las secuencias de los cebadores son:

Cebador 1 – 5´d[GGTGCGGGAA]-3´

Cebador 2 – 5´d[GTTTCGCTCC]-3´

Cebador 3 – 5´d[GTAGACCCGT]-3´

Cebador 4 – 5´d[AAGAGCCCGT]-3´

Cebador 5 – 5´d[AACGCGCAAC]-3´

Se utilizaron diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  (3.5 y 1.75 mM), *Taq* polimerasa (0.1 y 0.05 U) y dNTPs (0.5, 0.2 y 0.15 mM) probando cada concentración en eventos independientes. Se utilizó el programa de amplificación descrito en el kit, que consta de 1 ciclo de 95°C por 5 min, 45 ciclos de: 95°C, 1 min; 36°C, 1 min y 72°C 2 min y una extensión final de 72°C por 10 min. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl utilizando los reactivos incluidos en el kit mencionado. Para la amplificación se utilizó un termociclador de la marca Techne. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1% y visualizados con luz ultravioleta utilizando tinción con bromuro de etidio.

#### **4.4 Estandarización del protocolo de PCR para ISTR**

Con la finalidad de estandarizar la reacción de PCR para ISTRs, se hicieron pruebas con el protocolo descrito por Osorio y col. (2006). Las pruebas consistieron en la utilización de *Taq* polimerasa de las marcas

Fermentas, Promega e Invitrogen, cuyas concentraciones de  $MgCl_2$  variaron de 50 a 25 mM y amortiguador PCR 5 y 10X. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l, utilizando 50 ng de ADN, 0.3  $\mu$ M de cada uno de los iniciadores, amortiguador PCR 1X, 3 mM de  $MgCl_2$ , 0.025 U *Taq* polimerasa y 0.025 mM dNTPS. Se utilizó una combinación de cebadores identificada como F9/B6 donde F es el Forward y B el reverse (F9: 5' GCA CTC CAC CAA GAA TAC C 3' y B6: 5' GGT TCC ACT TGG TCC TTA G 3'). Posteriormente los productos de la amplificación se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 6% y se tiñeron con sales de plata para su visualización.

Los supuestos en los que se basa éste marcador son: que el marcador es dominante, amplifica *loci* específicos y el polimorfismo que detecta se debe a la ubicación de los retrotransposones en diferentes posiciones dentro del genoma de las muestras.

#### **4.5 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza para comparar los tratamientos de extracción, tomando los parámetros concentración y calidad de ADN obtenidas por ambos métodos. Se consideró un diseño factorial 10x2x2, donde los factores son: 10 materiales, dos métodos de extracción y dos repeticiones.

La comparación de medias se realizó por contrastes ortogonales.

De los geles obtenidos con ISTRs se construyó una matriz presencia/ausencia de bandas, misma que se utilizó para calcular el coeficiente de similaridad de Jaccard y posteriormente un análisis de agrupamiento UPGMA teniendo como resultado un dendrograma. El análisis fue realizado por medio del programa NTSyS 2.11.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Extracción de ADN genómico

En la Figura 1 se muestra la fotografía de un gel de agarosa al 1% con los productos de la extracción con ambos métodos. En todos los casos, se observa presencia de ADN de alto peso molecular que puede compararse con la primera banda del marcador de peso molecular que corresponde a 21,226 pares de bases (ADN Lambda/EcoRI + Hind III).

En el cuadro 6, pueden observarse los valores obtenidos del cociente  $DO_{260}/DO_{280}$  para las dos repeticiones de cada muestra y tanto la fotografía como los valores, indican que en general se tienen presentes algunos contaminantes que no permiten obtener una calidad óptima del ADN, ya que el cociente obtenido de los datos, en ningún caso se encuentra entre los valores de 1.8 y 2.0 reportados como óptimos (Valadez y Kahl, 2000).

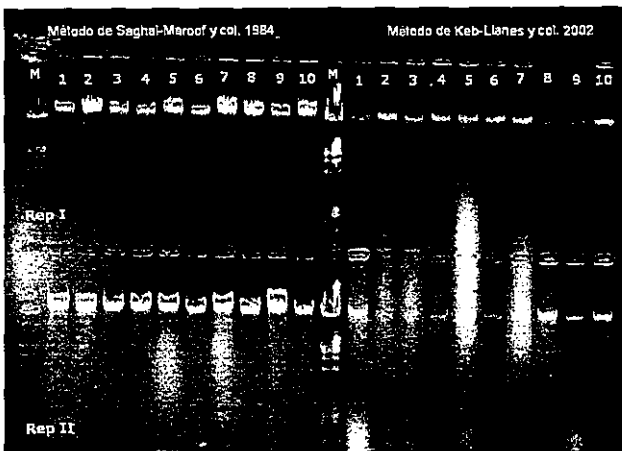


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. De izquierda a derecha se muestran las bandas de ADN para todos los materiales utilizados en la extracción. (M= marcador de peso molecular).



Cuadro 6. Estimación de la calidad de ADN extraído y purificado de las muestras de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*.

Materiales	Calidad (DO <sub>260nm</sub> /DO <sub>280nm</sub> )			
	Saghai-Marooof	Saghai-Marooof	Keb-Llanes	Keb-Llanes
	Repetición I	Repetición II	Repetición I	Repetición II
81-6	1.60	0.94	1.38	1.11
84-10	1.72	1.31	0.54	0.38
260-11	1.38	1.18	0.82	1.51
267-7	1.56	1.33	1.85	1.30
267-16	1.54	1.29	1.23	1.62
285-2	1.44	1.69	4.63	1.67
319-6	1.78	1.36	1.39	1.68
132-2	1.60	1.35	1.48	1.82
135-7	1.38	1.13	1.35	1.11
H	1.82	1.54	1.80	1.30

En el cuadro 7, se muestran las concentraciones de ADN en cada muestra, por accesión y por repetición según el método de extracción utilizado. Puede notarse que se obtuvieron concentraciones variables de ADN a partir de las diferentes muestras. El ADN se mantuvo en solución de T.E. a -20°C hasta la preparación de soluciones de trabajo para PCR hasta una concentración de 100 ng/μl. Lo anterior facilitó la última dilución según la concentración que marca el protocolo del marcador utilizado. Tanto RAPD como ISTR, requieren una concentración de las muestras en la reacción de PCR de 50 ng/μl.

Los promedios de las concentraciones obtenidas por muestra (cuadro 8) y por método evidencian que el método con el que puede obtenerse mayor concentración de ADN es el reportado por Saghai-Marooof y col., 1984. Este método es fácil de realizar y se invierte poco tiempo en la obtención del ADN. Sin embargo, en el gel que muestra la Figura 1, puede observarse contaminación en los carriles del gel en casi todas las muestras. Se observa también la presencia de barridos que probablemente se refieran a la presencia de compuestos fenólicos, proteínas o polisacáridos.

Cuadro 7. Concentración de ADN en microgramos por microlitro ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) extraído y purificado en accesiones de *Solanum lycopersicum* Cerasiforme.

MATERIALES	Concentraciones en microgramos por microlitro ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			
	Método Keb-Llanes y col., 2002		Método Saghai-Marooof y col., 1984	
	Repetición I	Repetición II	Repetición I	Repetición II
81-6	330	440	1370	1345
84-10	100	30	1425	1470
260-11	245	1055	1285	1975
267-7	2650	985	3360	3780
267-16	1025	615	2355	2235
285-2	555	1385	2420	4195
319-6	1385	1035	1465	760
132-2	1210	1545	3790	2925
135-7	650	810	2445	1660
H	2515	345	4745	2380

Cuadro 8. Promedios de concentración de ADN extraído de accesiones del género *Solanum lycopersicum* Cerasiforme.

Materiales	Método Keb-Llanes y col., 2002 (ng/ul)	Método Saghai-Marooof y col., 1984 (ng/ul)
81-6	385	1357.5
84-10	65	1447.5
260-11	650	1630
267-7	1817.5	3570
267-16	820	2295
285-2	970	3307.5
319-6	1210	1112.5
132-2	1377.5	3357.5
135-7	730	2052.5
H	1430	3562.5
<b>Promedio</b>	<b>945.5</b>	<b>2369.25</b>

## 5.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico mostró que para el factor calidad, no existió diferencia significativa (cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de Varianza para la variable calidad de ADN en 9 accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* y un híbrido.

FV	SC	GL	CM	F	P	F <sub>0.05</sub>
Accesiones	8.56789444	19	0.450941812	1.738921184	0.11846456	2.1682516
Métodos	0.8022436	1	0.802243601	3.093610646	0.09469578	4.38074967
Error	4.92713213	19	0.259322744			
Total	14.2972702	39				

Sin embargo, para concentración de ADN el análisis detectó diferencias significativas sólo entre materiales utilizados para la extracción ( $p=0.001$  y  $0.34$  respectivamente) (cuadro 10) y no para los métodos utilizados para la misma.

Cuadro 10. Análisis de Varianza para la variable Concentración de ADN en 9 accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* y un híbrido.

F.V.	SC	GL	CM	F	P	F <sub>0.05</sub>
Accesiones	42908386.9	19	2258336.15	4.378826	0.00114681	2.1682516**
Metodos	474150.625	1	474150.625	0.91935963	0.3496865	4.38074967
Error	9799061.88	19	515740.099			
Total	53181599.4	39				

\*\* altamente significativo

Los contrastes ortogonales permiten comparar los valores de concentración obtenidos por el método de Saghai-Marroof contra los obtenidos por el método Keb-Llanes. En el cuadro 11, se muestra que el valor del contraste (ZW) es positivo, a favor de los datos obtenidos con el primero de los métodos que, en la matriz de contrastes tenía asignado el valor positivo.

Cuadro 11. Contrastes ortogonales para la variable Concentración de ADN en 9 accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* y un híbrido.

Zw	Zw <sup>2</sup>	Dw	Zw <sup>2</sup> /Dw	Fc	F <sub>0.05</sub>
28475	810825625	40	20270640.63	78167615.92	3.924 **

ZW= valor del contraste

DW= Línea ortogonal de la matriz de contrastes

\*\* altamente significativo

Por lo anterior, el resultado de los contrastes muestra que la diferencia entre las medias es significativa a favor del primero de los

métodos, es decir, que se obtiene en promedio, mayor cantidad de ADN cuando el método de extracción utilizado es el de Saghai-Marroof.

### 5.3 Determinación de la calidad de los productos de amplificación por PCR para RAPD.

En el protocolo para la reacción de PCR para RAPD, se obtuvieron mejores resultados con las concentraciones 1.75 mM de  $MgCl_2$ ; 0.1 U de *Taq* polimerasa y 0.2 mM de dNTPs. Posteriormente a la amplificación de los RAPDS por PCR, se separaron los productos en geles de agarosa que se muestran en las Figuras 2 a 5. En general, la estandarización del método para las muestras utilizadas en el presente trabajo, permitió obtener en la mayoría de los casos, patrones de amplificación repetibles en las muestras. Se determinó un tiempo de corrida para los geles de agarosa al 1%, de 2 horas a un voltaje de 80 V. Se tiñeron durante un tiempo de 30 min. en una solución de 500 mLde agua destilada con 0.005 mg/ml de Bromuro de Etidio. Las fotografías fueron tomadas con cámara digital con filtro para luz UV mientras el gel se observaba en el transiluminador.

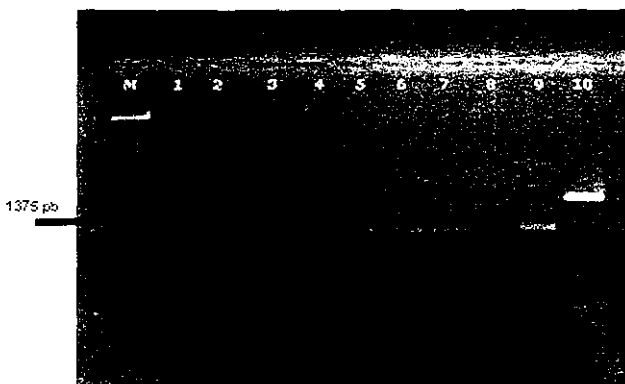


Figura 2. Patrón de amplificación de fragmentos de PCR para RAPD con el cebador 2, en 9 accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* y un híbrido comercial.

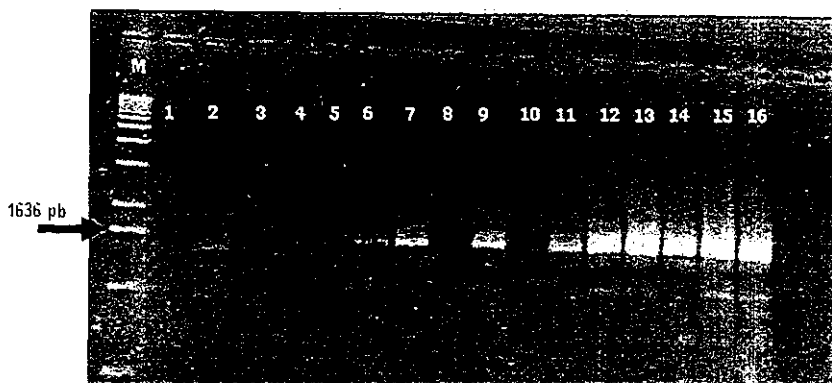


Figura 3. Patrón de amplificación de fragmentos de PCR para RAPD con el cebador 3 en 8 accesiones de *S. lycopersicum*. Carriles 1 al 8, muestras extraídas por el método Saghai-Marooif y col., 1984, carriles 9 a 16, muestras extraídas por el método Keb-Llanes y col., 2002.

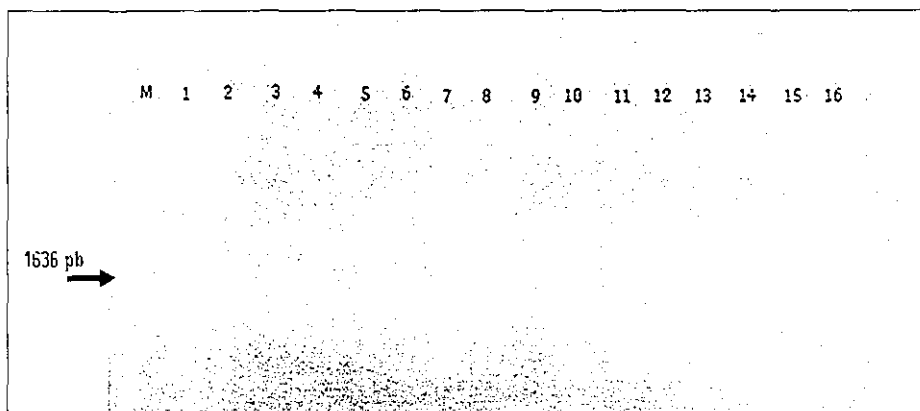


Figura 4. Patrón de amplificación de fragmentos de PCR para RAPD con el cebador 4 en 8 accesiones de *S. lycopersicum*. Carriles 1 al 8, muestras extraídas por el método Saghai-Marooif y col., 1984; carriles 9 a 16, muestras extraídas por el método Keb-Llanes y col., 2002.

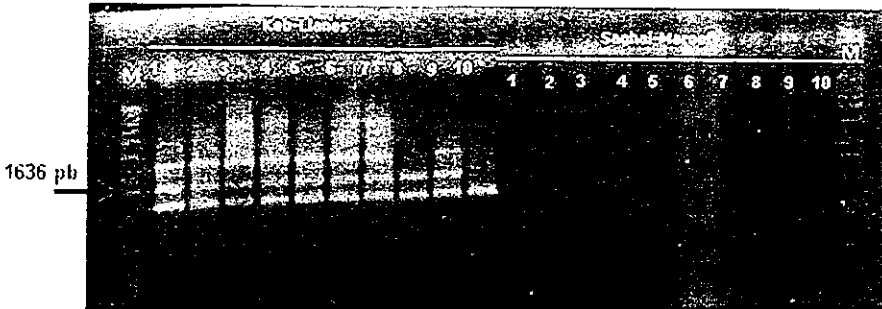


Figura 5. Patrón de amplificación de fragmentos de PCR para RAPD con el cebador 5 en 9 accesiones de *S. lycopersicum* y un híbrido. Carriles 2 al 11, muestras extraídas por el método Keb-Llanes y col., 2002; carriles 12 a 21, muestras extraídas por el método Saghai-Maroo y col., 1984, M= Marcador de peso molecular (1kb).

De los cebadores probados, sólo se identificó que la secuencia del cebador 2 separa con una banda polimórfica la muestra de la variedad comercial de jitomate tipo Saladette de las accesiones de *S. lycopersicum*. Los cebadores restantes solo presentaron bandas monomórficas. En la figura 3, 4 y 5 se puede observar que no amplificaron las muestras que habían sido extraídas por el método de Saghai-Maroo.

#### 5.4 Determinación de la calidad de los productos de amplificación por PCR para ISTR.

Se utilizó el marcador ISTR que es un marcador basado en secuencias terminales de repeticiones largas de retrotransposones. El protocolo estandarizado corresponde al reportado por Osorio (2006).

El gel de poliacrilamida al 6% que se muestra en la Figura 6, se utilizó para separar los productos amplificados en la PCR para el marcador ISTR. Se tiñó con sales de plata de acuerdo a protocolos estándares.

Como se puede observar en la Figura 6, se obtuvieron algunas bandas polimórficas las cuales se señalan con flechas en la figura y se logró una buena definición de las mismas con la tinción de sales de plata a la que se sometieron los geles obtenidos. Con excepción de algunas muestras que fueron extraídas con el protocolo de Saghai-Marooof (1987).

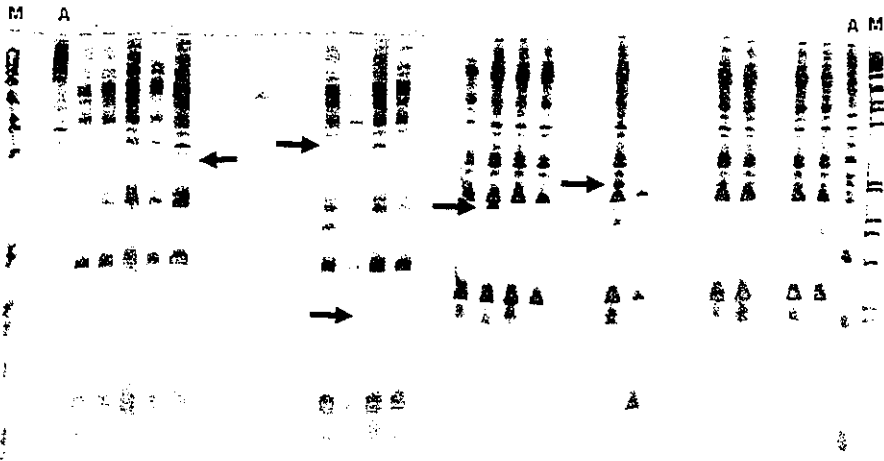


Figura 6. Patrones de amplificación de fragmentos de PCR para ISTR con el cebador F9/B6 en muestras de accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*. M= marcador de peso molecular (1 kb). A= muestras de Agave.

Con los geles anteriores, se obtuvo una matriz presencia/ausencia para calcular el coeficiente de similitud entre las muestras, para lo que se utilizó el Coeficiente de Jaccard y el análisis de agrupamiento (UPGMA) contenido en el programa NTSyS 2.11. El resultado se presenta en forma de dendrograma en la Figura 7.

Como patrón de comparación, en las PCR para ISTR que se realizaron, fue incluida una muestra de *Agave durangensis* proveniente

de poblaciones naturales colectadas en la Sierra del Registro en Durango ya que con Agave se tiene estandarizada la técnica.

Se hicieron un total de 6 geles de bisacrilamida al 6% y se obtuvieron patrones de amplificación en las muestras de ADN extraído con el método Keb-Ilanes y col. (2002). Para este marcador tampoco se obtuvo una buena amplificación con las muestras de ADN obtenidos con el método de Saghai-Marroof y col. (1987) probablemente por los residuos de reactivos que quedan en las muestras de ADN después de la extracción y que interfieren con la calidad de amplificación por PCR.

En la figura 7 se muestra una clara separación entre las muestras de accesiones de *Solanum lycopersicum* y la muestra de agave, por lo cual se infiere que el marcador ISTR tiene la capacidad de diferenciar muestras de diferentes géneros. Por otra parte, el dendrograma El primero, formado por las muestras de Techaluta de M. y el híbrido tipo Saladette con una similaridad de 0.36, un segundo grupo formado por las muestras colectadas en Cuauhtemoc, Colima, Tanhuato Michoacán, Tamazula, Mascota, Ayutla, Tecalitlán Jalisco y Tecuala Nayarit cuya similaridad entre ellas es de 0.42. Dentro del segundo grupo, podrían considerarse como un subgrupo, las muestras de Ayutla, Jalisco y Tecuala, Nayarit que se encuentran marcadas como diferentes entre si y con el resto del grupo. La agrupación que se obtuvo con el análisis probablemente sea debido al origen de las colectas.

Es evidente que se obtiene mayor información acerca de las características genéticas de los materiales en estudio, utilizando el marcador ISTR que el RAPD, ya que el número de bandas que se genera es mayor con el ISTR. La mayor similaridad fue reportada para los materiales de Cuauhtemoc, Colima; Tanhuato Michoacán, Tamazula, Mascota y Tecalitlán Jalisco que se encuentran dentro del grupo 2.



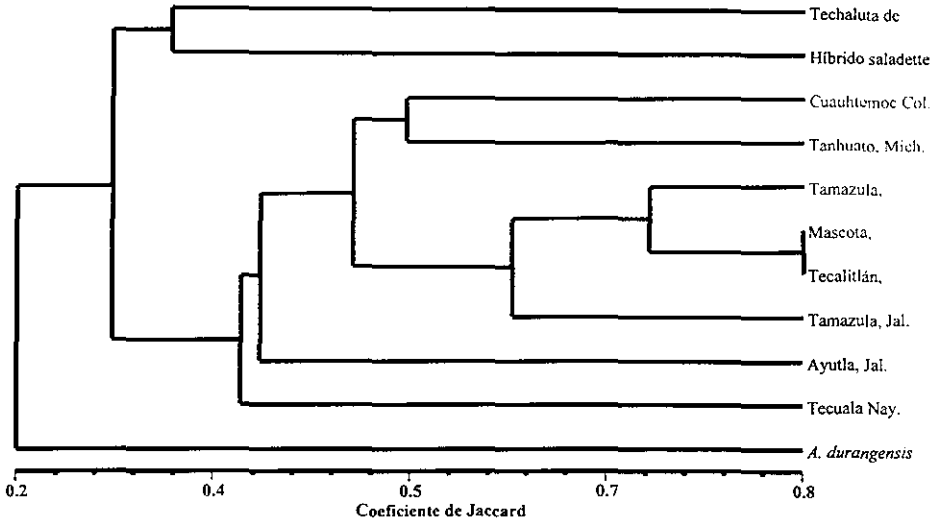


Figura 7. Dendrograma para muestras de accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*.

Cabe mencionar que, a diferencia de lo esperado, las muestras provenientes de Tamazula, Jalisco no fueron similares, ya que se separaron con un coeficiente de similaridad de 0.586. Este hecho podría indicar que existen diferencias intrapoblacionales en el material colectado. En la siguiente figura, se ubican los puntos de las colectas consideradas para el presente estudio. Las diferencias ambientales que pueden complementar la información generada por el marcador ISTR no son objeto del presente trabajo, sin embargo, cabe mencionar que en la forma que fueron agrupados los materiales, se muestra cierta tendencia de agrupación para algunos que comparten ambientes o microclimas similares, como son: Tamazula, Mascota y Tecalitlán.

# Región Occidente del país

## Nayarit



Figura 8. Lugares de colecta de donde provienen las accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* utilizadas en el presente trabajo.

## VI. CONCLUSIONES

El análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa entre la concentración de ADN obtenida por los métodos probados. El método de Saghai-Marooof y col. (1984) fue el que produjo las mejores concentraciones. Sin embargo, la aplicación de las técnicas de PCR para RAPD y para ISTR mostró que la amplificación de las muestras de ADN extraído por el método de Keb-Llanes y col. (2002), proporciona patrones de bandeo con mejor definición.

Para la variable calidad, no se encontró diferencia significativa para los métodos probados.

Se logró la estandarización de la técnica RAPD en las condiciones del Laboratorio de Marcadores Moleculares del IMAREFI-CUCBA. Es posible realizar la técnica de RAPD, probando una mayor cantidad de cebadores para detectar diferencias entre accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*.

El marcador ISTR detectó diferencia entre las accesiones de *S. lycopersicum* usadas en el presente trabajo y la muestra control (grupo externo) de *Agave durangensis*, por lo que puede inferirse que este marcador permite/puede discriminar diferencias interespecíficas. Por otra parte, este marcador proporciona mayor información que el RAPD, ya que genera un patrón de amplificación mucho mayor ya que proporciona un número de bandas entre 25 a 30 mientras que el RAPD generó sólo 1 a 5. Es recomendable utilizar el marcador ISTR con fines de caracterización de los materiales estudiados, el cual genera un patrón repetible.

## **VII. PERSPECTIVAS**

Los métodos de extracción evaluados en el presente trabajo, representan facilidad técnica de aplicación, sin embargo, para esta especie, es recomendable utilizar el método reportado por Keb-Llanes y col. (2002) que permite obtener un ADN con menor número de contaminantes y posteriormente aplicar técnicas de PCR para marcadores específicos como RAPD e ISTR.

Debido a que en el presente trabajo se utilizaron diferentes plantas de cada accesión y al modo en el que fueron ubicadas en el dendrograma por su similitud, se asume que este marcador puede detectar diferencias entre las plantas de una misma población, lo cual será reportado en los análisis que posteriormente serán hechos en plantas de una misma accesión y entre accesiones.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Almaraz-Abarca** N (1994) Estandarización de un método de aislamiento de ADN cloroplástico para ser usado en el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción. Tesis de maestría. ENCB-IPN. México.
- Almaraz-Abarca** N; JA Ávila-Reyes; J Herrera-Corral; N Naranjo-Jiménez (1998) Evolución del genoma cloroplástico. *Ciencia* 49:14-20.
- Almaraz-Abarca** N; JA Ávila-Reyes; N Naranjo-Jiménez; J Herrera-Corral; MC González-Güereca (2002) Perfiles electroforéticos de las proteínas de semilla de pinos como caracteres taxonómicos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4:39-43.
- Almaraz-Abarca** N; MS González-Elizondo; JA Tena-Flores; JA Ávila-Reyes; N Naranjo-Jiménez; J Herrera-Corral (2006) Foliar flavonoids distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (Coniferales: Pinaceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 119 (3):426-436.
- Bennetzen** JL (2000) Transposable element contribution to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* 42:251-269.
- Breto** MP; MJ Asins; EA Carbonell (1993) Genetic variability in *Lycopersicon* species and their genetic relationship *Theoretical Applied Genetics* 86:113-120.
- Csaiki** UM; H Bastian; R Brettschneider; S Gauch; A Mier; M Schauerte; F Scholz; C Sperisen; B Vornam; B Ziegenhagen (1998) Comparative analysis of different DNA preparation of High Quality Plant DNA for Genetic Evaluation and Phylogenetic Studies. *Plant Molecular Biology Reporter* 16:69-86.
- Esayas** A (2005) Molecular Genetic Diversity Study of Forest Coffee Tree [*Coffea arabica* L.] Populations in Ethiopia: Implications for Conservation and Breeding. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*. Alnarp:79.COMPLETAR
- Hillis** DM; BK Mable; A Larson; SK Davis; EA Zimmer (1996) *Molecular Systematics*. 2a. ed. Sinauer Associates. Inc Sunderland. MA. USA. pp: 321-344.
- Infante** D; G González; L Peraza-Echeverría; M Keb-Llanes (2003) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* 164:223-230.

- Karp** A; O Seberg; M Buiatti (1996) Molecular techniques in the Assessment of Botanical Diversity. *Annals of Botany* 78:143-149.
- Keb-Llanes** M; G González; B Chi-Manzanero; D Infante (2002) A Rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 20:299.
- Kidwell** MG; D Lisch (1997) Transposable elements as source of variation in animals and plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94:7704-7711.
- Kidwell** MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetics* 115:49-63.
- Lightbourn** G; R Veilleux (2003) Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusion of monoploid potato. *Acta Horticulturae*. ISHS 619:35-43.
- Lindhout** PH; van der Beek; P Gerard (1994) Wild *Lycopersicum* species as sources for resistance to powdery mildew (oidium *Lycopersicum*): mapping of resistance Gene OL-1 on chromosome 6 of *L. Hirsutum*. *Acta Agronomica* 376:387-394.
- Morales** PE (2006) Comparación de métodos de extracción de ADN en el género *Zea*. Tesis. División de Ciencias Agronómicas. Universidad de Guadalajara.
- Murray** MG; JW Pitas (1996) Plant DNA from Alcohol-Preserved Samples. *Plant Molecular Biology Reporter* 14 (3):261-265.
- Osorio** M; D Infante; S Molina (2006) Estudio de la variabilidad genética asexual en *Agave cocui* Trelease mediante el uso de marcadores moleculares. *Boletín NAKARI* 17 (1):1-7. Edición Digital.
- Oyanedel** E; DW Wolfe; AJ Morforte; SD Tanksley; TG Owens (2007) Using *Lycopersicum hirsutum* as a source of cold tolerance in processing tomato breeding. *Acta Horticulturae* 542:387-391.
- Peterson** GD; KS Boehm; SM Stack (1997) Isolation of Milligram Quantities of Nuclear DNA from tomato (*Lycopersicum esculentum*), A plant Containing High Levels of Polyphenolic Compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* 15(2):148-153.
- Restrepo** EF; FA Vallejo (2003) Diversidad genética del tomate cultivado tipo "Chonto", *Lycopersicon esculentum* Mill, en las zonas productoras de Colombia. *Acta Agronómica* 52:11-17.

- Rhode W** (1996) Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR based technique for genome analysis in plant and animal kingdom. *Journal of Botany* 89:312-326.
- Rogstad SH** (2003) Plant DNA Extraction Using Silica. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:463a-463g.
- Saghai-Marooif MA; KM Soliman; RA Jorgensen; RW Allard** (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of Natural Academy of Sciences, USA* 81:8014-8018.
- Sambrook J; EF Fritsh; T Maniatis** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol I.
- Sánchez GJJ** (2004) Apuntes de la clase "Manejo de Recursos Fitogenéticos". Posgrado en Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad de Guadalajara.
- Sosa P** (2001) Genes, poblaciones y especies. En: *Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y conservación* (Fernández-Palacios, J.M., J.L. Martín, Eds.). Ediciones Turquesa. pp. 151-155.
- Sosa P; F Batista; MA González-Pérez; N Bouza** (2002) La conservación genética de las especies vegetales amenazadas. En: *biología de la conservación de plantas amenazadas. Técnicas de diagnóstico del estado de conservación* (Bañares A Ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente. España.
- Sosa P** (2003) Conservación genética de endemismos vegetales amenazados de las Islas Canarias. Proyecto de Investigación. Inédito. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Torres-Morán MI; MM Morales-Rivera; R Nuño-Romero; F Santacruz-Ruvalcaba; A Rodríguez-García** (2007) Variabilidad de *Agave tequilana* Weber var. azul encontrada en micropropagación y su exploración a nivel molecular. *Boletín NAKARI* 18(1):3-4 Edición digital.
- Valadez ME; G Khal** (2000) Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundi-prensa, S.A., México. pp 147.
- Villand J; PW Skroch; T Lai; P Hanson; CG Kuo; J Nienhuis** (1998) Genetic Variation Among Tomato Accessions from Primary and Secondary Centers of Diversity. *Crop Sciences* 38:1339-1347.
- Williams CE; DA St Claire** (1993) Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome* 36:619-630.

**Wolfe** KA; MC Breadmore; J Ferrance; ME Power; JF Coroy; PM Norris; JP Landers (2002) Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acid. *Electrophoresis* 23:727-733.

**Zañudo** HJ; E Pimienta; BC Ramírez (2003) Manual de prácticas de Fisiología Vegetal. Universidad de Guadalajara.



## **ANEXO**

### **PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO**

#### **Protocolo de Saghai-Marroof y col. (1984)**

1. Programar el Baño María a 60°C.
2. Triturar 0.350 g. de tejido con nitrógeno líquido en mortero con pistilo.
3. Agregar 0.5 ml de amortiguador CTAB 2X y moler nuevamente hasta que la mezcla quede homogénea.
4. Transferir la mezcla a tubos eppendorff de 2 ml e incubar 30 min a 60°C en baño María
5. Dejar enfriar por 10 min para que la mezcla regrese a temperatura ambiente.
6. Agregar un volumen igual de cloroformo:octanol (24:1) e invertir los tubos continuamente por 5 min.
7. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min.
8. Recuperar el sobrenadante y páselo a un tubo limpio. (utilizar tubo de 2 ml la primera vez y tubos de 1.5 ml la segunda vez)
9. Repetir pasos 6, 7 y 8.
10. Agregar un volumen igual de alcohol isopropílico frío (-20°C) y mezclar por inversión hasta que el ADN precipite.
11. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min. Decantar el isopropanol y agregar 1.0 ml de 76% EtOH/0.2M Na-acetato. Dejar el ADN en esta mezcla por 20 min. (se puede parar en este punto si es necesario y continuar más tarde en el día). Agitar por 5 minutos antes de continuar al paso 12. Centrifugar 5000 rpm por 5 min.

12. Decantar el 76% EtOH/0.2 Na-acetato y agregar 0.5 ml de 76% EtOH/10mM NH<sub>4</sub>-acetato. Dejar el ADN en esta mezcla por 1 o 2 min., centrifugar de nuevo y luego decantar el 76% EtOH/10mM NH<sub>4</sub>-acetato.
13. Agregar 50 a 100 µl de T.E., la cantidad depende de que tan buena fue la obtención de ADN. Colocar a 4°C durante la noche para que el ADN se resuspenda en la solución.
14. Al día siguiente centrifugar por 10 min para eliminar las partículas no disueltas y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.

### **Protocolo de Keb-Llanes y col., (2002)**

1. Moler 0.350 g de tejido de hoja con nitrógeno líquido en mortero pre-enfriado a -20°C hasta obtener un polvo fino. Transferir la muestra con una espátula a tubo eppendorf de 2 ml. Agregar 300 µl de Buffer A, 900 µl de Buffer B y 100 µl de SDS. Agitar entre una aplicación y otra.
2. Agitar en "vortex" e incubar en baño maría a 65°C por 10 min. Agitar cada 2 min.
3. Añadir 410 µl de Buffer de lisis frío. Centrifugar a 12000 rpm por 15 min. en centrífuga refrigerada a 4°C.
4. Transferir el sobrenadante a tubo limpio (aprox. 800 µl), agregar 540 µl de isopropanol frío a cada tubo, mezclar e incubar a -20°C durante 20 min.
5. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min. Descartar el sobrenadante, vertiendo con cuidado. Lavar el pellet obtenido con 500 µl de etanol al 70%. Centrifugar de nuevo y dejar secar el pellet para que se evapore el etanol.

6. Resuspender el pellet en 500  $\mu$ l de Buffer T.E. y añadir 60  $\mu$ l de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 360  $\mu$ l de isopropanol frío. Mezclar e incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 min.
7. Centrifugar a 10000 rpm durante 10 min. Repetir los pasos 5 a 7 dos veces. Lavar con 500  $\mu$ l de etanol 70% y volver a centrifugar. Dejar secar hasta total evaporación del alcohol.
8. Resuspender el pellet en 100  $\mu$ l de T.E.

## **PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES**

### **Tris1 M** pH 7.5, 8.0 o 9.5 (PM 121.14)

1. Disolver 121.14 g de TRIS-Base en 750 ml de  $\text{dH}_2\text{O}$ .
2. Añadir HCl hasta alcanzar el pH deseado (75 ml HCl = pH 7.5; 49 ml HCl = 8.0).
3. Aforar a 1000 ml con  $\text{dH}_2\text{O}$ .

### **Cloruro de sodio (NaCl) 5 M** (PM= 58.44).

Este producto puede encontrarse ya preparado como reactivo especial para biología molecular.

### **EDTA 0.5 M** pH 8.0 (PM= 372.24)

1. Disolver 186.12 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 750 ml de  $\text{dH}_2\text{O}$ .
2. Añadir pellets de NaOH hasta alcanzar un pH de 8.0.
3. Cuando el EDTA esté disuelto, aforar a 1000 ml con  $\text{dH}_2\text{O}$ .

### **BUFFER T.E.:**

10 mM Tris  
1mM EDTA (pH 8.0)

## Reactivos para el protocolo Keb-Llanes y col., (2002)

- 20% dodecil sulfato de sodio (SDS) (w/v) –no refrigerado-
- 5 M acetato de potasio –20°C Buffer lisis (60mL acetato de potasio 5M, 11.5mL de ácido acético glacial y 28.5mL agua (Sambrook y col., 1989).
- Acetato de sodio 3 M –20°C
- Etanol al 70% -20°C
- Isopropanol absoluto –20°C.

### 2X CTAB + Bisulfito de sodio

Compuesto	Cantidad en volumen Final de 100 ml	Concentración final
Tris-HCl 1M pH 7.5 u 8	10 ml	100 mM
CTAB	2 g	2 %
NaCl 5 M	28 ml	700 mM
EDTA 0.5 M pH 7.5 u 8	4 ml	20 mM
B-mercaptoetanol*	1 ml	1 %
Bisulfito de sodio	1 g	1 %

\*Añadir en el momento de usarlo  
Aforar con agua destilada a 100 ml

### 76% ETOH/0.2M Na-acetate

Compuesto	Cantidad
Acetato de sodio	2.72 g
Etanol (ETOH) 95%	80 ml
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 100 ml

### 76% ETOH/10mM NH<sub>4</sub>-acetate

Compuesto	Cantidad
Acetato de amonio	0.077 g
Etanol (ETOH) 95%	80 ml
dH <sub>2</sub> O	Aforar a 100 ml

### BUFFER A (Keb-Llanes y col., 2002)

CTAB 2%, Tris HCL pH 8 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 mM PVP-40 4%,  $\beta$ ME 10mM.

**BUFFER B (Keb-Llanes y col., 2002)**

Tris HCL pH 8 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM,  $\beta$ ME 10mM.

**BUFFER DE LISIS (Keb-Llanes y col., 2002)**

Acetato de potasio 5M

**Reacción típica de PCR para RAPD (Valadez y Khal, 2000)**

Mezcla 25 $\mu$ l	Concentración final
Primer 2 25pmol/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ M
Buffer PCR 10 X	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.75 mM
ADN	4 ng
Taq polimerasa 5 U	0.1 U
dNTPs 10 mM	0.2 mM
H <sub>2</sub> O Milli	

**Programa termociclador**

95°C 5 min	} 45 ciclos
95°C 1 min	
36°C 1 min	
72°C 2 min	
72°C 10 min	
4°C $\infty$	

**Reacción típica de PCR para ISTR (Rhode1996, Osorio y col., 2006)**

Reactivo	Concentración Final
H <sub>2</sub> O milliQ	
Buffer PCR 10X	1 X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 mM
Cebador F (Forward)	0.3 $\mu$ M
Cebador B (Reverse)	0.3 $\mu$ M
dNTPs 10 Mm	0.25 mM
Taq. Polim.5 U	0.25 mM
ADN 50 ng	

### Programa del termociclador

95°C 3 min	} 45 ciclos
95°C 30 seg	
45°C 1 min	
72°C 2 min	
72°C 2 min	
4°C ∞	

### Componentes del gel de Poliacrilamida

Bisacrilamida 4%, TBE 1 X, urea 7M, persulfato de amonio.06%, TEMED 0.012 %.

### Tinción con Sales de Plata

**A) Solución Reveladora:** Hidróxido de sodio 3%, 1.5% de Formaldehído-37%.

**B) Solución fijadora:** Ac. Acético Glacial 0.5%, etanol 1%.

**C) Solución de Nitrato de Plata:** Nitrato de plata 2%, disuelto en solución fijadora.

### Pasos

SOLUCIÓN	TIEMPO
1.- Solución Fijadora	5 min
2.- Decantar la solución fijadora	
3.- Sol. de nitrato de Plata	5 min
4.- Decantar	
5.- Lavar con H <sub>2</sub> O dd	
6.- Solución Reveladora	Hasta aparición de bandas
7.- Enjuagar con H <sub>2</sub> O	