



# **Desarrollo de una metodología de extracción de ADN a partir de semillas de Arroz para un programa de mejoramiento**

**Jessica Alejandra Ospina Colorado**

**Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)  
Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA)  
Palmira, Colombia  
2018**

# **Desarrollo de una metodología de extracción de ADN a partir de semillas de Arroz para un programa de mejoramiento**

**Jessica Alejandra Ospina Colorado**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Agrónoma**

**Directora:**

**Constanza Quintero MSc.**

**Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)**

**Codirector:**

**Milton Cesar Ararat Orozco PhD.**

**Universidad Nacional de Colombia-Palmira**

**Línea de Investigación:**

**Biotecnología**

**Grupo de Investigación:**

**Semilleros ECAPMA**

**Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA)**

**Palmira, Colombia**

**2018**

*A Dios*

*A mi hijo*

*A mi esposo*

*A mi madre*

*El camino no es fácil, pero cuando se siembran  
sueños hay que luchar para cosecharlos.*

# **Agradecimientos**

A Constanza Quintero por ser mi maestra durante todos estos años, por brindarme la oportunidad, el conocimiento y el apoyo para realizar mi trabajo de grado en el Laboratorio de Biotecnología “Molecular Genetics and Tissue Culture Laboratory”.

Al CIAT y en especial al Dr. Joe Tohme por la oportunidad brindada.

A los Docentes de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia, especialmente a las profesoras María del Carmen Garcés, María del Pilar Romero, Shirley Andrea Rodríguez, y al profesor Álvaro Quiceno por sus explicaciones, consejos, su dedicación y su amistad.

Al profesor Norbey Marín Arredondo por su apoyo.

Al Profesor Milton Cesar Ararat por brindarme su apoyo y consejos durante este proceso.

Al jurado de esta tesis.

A Katherine Castillo, una hermana más que me regalo la vida, quien me ha acompañado en todo momento, quien ha llorado y reído a mi lado, quien me ha brindado su mano cuando más lo he necesitado.

A María Eugenia Recio y Patricia Zapata, por enseñarme el verdadero significado de la amistad, por brindarme su conocimiento y apoyo incondicional.

A Mónica Casamachín, Ana María Leiva, Luisa Leiva, Tatiana Ovalle, Janeth Gutiérrez, por su amistad, por todos los momentos vividos, por los buenos consejos y por el apoyo y colaboración que siempre me han brindado.

Agradezco especialmente a mi familia, mi hijo, Juan José Caicedo, por ser mi mayor motivación, mi esposo, Miguel Caicedo, por ser mi compañero de vida y motivador de ser quien soy ahora, mi mamá, Lucy Colorado, por estar siempre ahí, en las buenas y no tan buenas, a mis suegros, Octavio Caicedo y Nancy Ramírez, por acogerme en su familia y apoyarme.

## Resumen

En el fitomejoramiento se están utilizando los marcadores moleculares como una herramienta de selección de material vegetal con características agronómicas deseables. En el proceso de un análisis molecular, el aislamiento de ácidos nucleicos se ha identificado como uno de los principales limitantes cuando se tratan de evaluar grandes números de plantas de variedades de arroz de ciclo corto. El objetivo de este proyecto de investigación fue desarrollar una metodología no destructiva de extracción de ADN a partir de semillas de arroz y explorar su potencial implementación en los programas de mejoramiento de arroz del CIAT, FLAR y Cirad, para lo cual se evaluaron y modificaron diferentes protocolos de extracción de ADN, hasta lograr los mejores resultados en términos de calidad y rendimiento en cantidad del ácido nucléico. La validación de esta metodología de extracción de ADN se hizo con marcadores moleculares tipo microsatélite. A futuro, la implementación de los resultados de este trabajo permitirá entregar al fitomejorador la semilla ya seleccionada con los marcadores moleculares específicos, logrando reducir los tiempos de evaluación en invernadero y campo, así como los costos de producción de variedades.

**Palabras clave:** Arroz (*Oryza sativa*), Semilla, Extracción ADN, Mejoramiento genético, Marcadores moleculares, Microsatélites.

## **Abstract**

In the plant breeding, molecular markers are being used as a tool for selecting plant material with desirable agronomic characteristics. In the process of a molecular analysis, the isolation of nucleic acids has been identified as one of the main limiting when trying to evaluate large numbers of plants of short-cycle rice varieties. The objective of this research project was to develop a non-destructive methodology for extracting DNA from rice seeds and to explore its potential implementation at CIAT, FLAR and Cirad rice breeding programs. Different protocols for DNA isolation were evaluated and modified, until achieving the best results in terms of quality and yield of the nucleic acid. The validation of this DNA extraction methodology was done with microsatellite markers. In the future, the implementation of the results of this work will allow to select to deliver to the breeder, selected seeds harboring the desirable molecular markers, thus reducing the evaluation times in the greenhouse and field as well as the costs of producing varieties.

**Keywords:** Rice (*Oryza sativa*), Seed, DNA extraction, Genetic improvement, Molecular markers, Microsatellites.

# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>11</b>
<b>Lista de símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Capítulo: Marco teórico.....</b>	<b>15</b>
1.1 El Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) como cultivo.....	15
1.2 Morfología de la semilla .....	16
1.3 Mejoramiento del Arroz .....	17
1.4 Marcadores moleculares como herramienta del mejoramiento en arroz.....	19
1.5 Aislamiento de ADN a partir de semilla .....	21
<b>2. Capítulo: Objetivos.....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Objetivo General.....	25
2.1.2 Objetivos Específicos .....	25
<b>3. Capítulo: Metodología.....</b>	<b>26</b>
3.1 Ubicación .....	26
3.2 Material Vegetal.....	26
3.3 Materiales y métodos Fase 1 .....	29
3.3.1 Extracción de ADN a partir de semilla.....	29
3.3.2 Gel de Calidad y cuantificación.....	31
3.4 Materiales y métodos Fase 2 .....	33
3.4.1 Pruebas de germinación y conservación de semilla .....	33
Germinación Inicial .....	33

---

Desinfección de semilla.....	33
Almacenamiento y viabilidad de semilla.....	34
3.4.1 Extracción ADN .....	35
Extracción de ADN a partir de tejido foliar. ....	37
Extracción de ADN a partir de semilla.....	38
3.4.2 Validación de la metodología de extracción de ADN de semilla con marcadores microsatélites .....	38
3.4.3 Análisis estadístico fase 2.....	40
<b>4. Capítulo: Resultados y Discusión.....</b>	<b>41</b>
4.1 Resultados y discusión fase 1 .....	41
4.1.1 Extracción de ADN a partir de semilla.....	41
4.2 Resultados y discusión fase 2.....	49
4.2.1 Pruebas de germinación y conservación de semilla .....	49
4.3 Extracción de ADN, gel de calidad y cuantificación .....	52
4.3.1 Extracción de ADN a partir de tejido .....	52
4.3.2 Extracción de ADN a partir de semilla.....	54
4.4 Validación de la metodología de extracción de semilla con marcadores micro satélites .....	56
<b>5. Capítulo: Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>63</b>
5.1 Conclusiones .....	63
5.2 Recomendaciones.....	64
<b>Bibliografía .....</b>	<b>65</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructuras interna y externa de la semilla de arroz.....	17
<b>Figura 2.</b> Esquema de fases de la investigación.....	29
<b>Figura 3.</b> Metodología Fase 1 .....	32
<b>Figura 4.</b> Prueba de germinación de semilla en frascos de mayonesa estériles.....	33
<b>Figura 5.</b> División de semilla.....	35
<b>Figura 6.</b> Metodología de Extracción de ADN de tejido y endospermo.....	36
<b>Figura 7.</b> Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad del ADN de endospermo de arroz, extraído con cinco diferentes protocolos. ....	42
<b>Figura 8.</b> Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad del ADN de endospermo de arroz, extraído con cinco diferentes protocolos después del tratamiento adicional con 2ul de RNAsa A (10mg/ml). ....	43
<b>Figura 9.</b> Extracción de ADN de endospermo de arroz con los protocolos seleccionados. ....	45
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de germinación de las 30 líneas evaluadas... ..	49
<b>Figura 11.</b> Semilla en germinación para extracción de ADN de tejido .....	53
<b>Figura 12.</b> Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad del ADN extraído a partir del tejido germinado en laboratorio. ....	53
<b>Figura 13.</b> Protocolo extracción ADN de semilla.....	55
<b>Figura 14.</b> Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad del ADN extraído a partir del endospermo.. ....	56
<b>Figura 15.</b> Gel de agarosa al 4% para validar la metodología de extracción de ADN a partir del endospermo... ..	57

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Principales diferencias entre las subespecies indica y japónica .....	16
<b>Tabla 2.</b> Lista de material vegetal usado para extracción de ADN de semilla .....	26
<b>Tabla 3.</b> Referencias de los seis protocolos evaluados para la extracción de ADN de los endospermos de las líneas Bluebonnet y Oryzica. ....	30
<b>Tabla 4.</b> Marcadores microsatélite utilizados para la validación .....	38
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de amplificación .....	39
<b>Tabla 6.</b> Protocolos seleccionados y modificaciones ensayadas para la extracción de ADN de los endospermos de las líneas Bluebonnet 50 y Oryzica 1. ....	44
<b>Tabla 7.</b> Germinación de semilla después de almacenada DDA.....	50
<b>Tabla 8.</b> Coeficiente de correlación Pearson para Líneas de origen Indica.....	51
<b>Tabla 9.</b> Coeficiente de correlación Pearson para Líneas de origen Japónica.....	51
<b>Tabla 10.</b> Prueba de Tukey para determinar viabilidad de germinación durante tiempo de almacenamiento .....	52
<b>Tabla 11.</b> Tamaño aproximado de los alelos encontrados en los diferentes SSR evaluados. ....	61
<b>Tabla 12.</b> Prueba de Tukey para determinar diferencias entre las lecturas del tamaño aproximado de los alelos, en las muestras provenientes de la mitad del endospermo, y del embrión del endospermo germinado en laboratorio. ....	62

---

## Lista de símbolos y abreviaturas

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ALC</i>	América latina y el Caribe
<i>CIAT</i>	Centro Internacional de Agricultura Tropical
<i>CIRAD</i>	Centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo
<i>CTAB</i>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<i>DDA</i>	Días después de almacenado
<i>EDTA</i>	Ácido etilen diamino tetra acético
<i>FLAR</i>	Fondo Latinoamericano para el Arroz de Riego
<i>IRRI</i>	Instituto Internacional de Investigación del Arroz
<i>NaCl</i>	Cloruro de sodio
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
<i>PVP</i>	Polivinil Pirrolidona
<i>RAPD</i>	Acrónimo en inglés polimorfismos de ADN amplificados al azar
<i>SSR</i>	Acrónimo en inglés de Secuencias simples repetidas (microsatélites)
<i>SDS</i>	Dodecil sulfato de sodio
<i>TRIS</i>	Hidroximetil amino metano
<i>μl</i>	Microlitro unidad de volumen

---

## Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) es considerado como alimento básico para más de la mitad de la población mundial y ocupa el segundo lugar después del trigo con respecto a superficie cosechada (Marco A. Acevedo, 2006). La producción mundial de arroz para el año 2015 a 2016 fue de 490.9 millones de toneladas y se estima que para el año 2017 a 2018 sea de 500.8 millones de toneladas (FAO, 2017). De acuerdo al boletín técnico del DANE el total del área sembrada de arroz en Colombia es de 570,802 ha, el área cosechada es de 525,957 ha, para una producción total de 2.971.975 toneladas, obteniendo un rendimiento de 5,7 t/ha (DANE, 2017).

Actualmente, el CIAT utiliza metodologías de aislamiento de ADN a partir de hojas jóvenes para realizar los procesos evaluación y selección con marcadores moleculares de los materiales que se trabajan en los programas de mejoramiento de arroz. El método de producción de datos moleculares incluye los siguientes pasos: siembra de semillas en invernadero, colecta de tejido foliar para la extracción del ADN entre 15 y 18 días después de siembra, evaluación de la calidad del ADN aislado, realización de la genotipificación de los marcadores moleculares y finalmente selección e identificación (antes de floración) de las plantas más promisorias que serán utilizadas por el fitomejorador en la generación de nuevos cruzamientos.

Cuando las variedades son de ciclo corto, su floración es más temprana lo cual reduce el tiempo de realización de todos los pasos del proceso de aislamiento de ADN y dificulta la entrega oportuna de los resultados de la genotipificación para que sean usados efectivamente por el mejorador. Esta dificultad se acentúa cuando se requiere evaluar un gran número de líneas o variedades. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue desarrollar una metodología no destructiva de extracción de ADN a partir del endospermo de semillas de arroz, asegurando la calidad del ADN y la viabilidad de la semilla seleccionada bajo condiciones controladas.

Este proyecto de investigación es de gran importancia para el programa de arroz del CIAT, porque una vez seleccionadas las semillas con marcadores moleculares, el fitomejorador se enfocaría en estos materiales más promisorios para continuar los procesos de mejoramiento. La realización de la evaluación de marcadores moleculares desde la semilla, permitiría reducir el número de materiales y por ende los costos de desarrollo de las variedades. Los resultados de este proyecto de investigación son de utilidad para el sector arrocero latinoamericano y su difusión puede ser facilitada a través del CIAT, el Cirad y del Fondo Latinoamericano para el Arroz de Riego (FLAR), el cual integra a más de 30 organizaciones de los sectores público y privado en 17 países, dedicados a desarrollar nuevas tecnologías para la producción sostenible de arroz.

# 1. Capítulo: Marco teórico

## 1.1 El Arroz (*Oryza sativa* L.) como cultivo

El arroz (*Oryza sativa* L.) pertenece a la familia de las gramíneas, es una especie monocotiledónea (Tabla 1). El tamaño del genoma del Arroz es de 430 Mb, con más 45000 genes y su densidad genética es de más de 100 genes/Mb (Watson, 2008). Todos los miembros del género *Oryza* tienen  $n = 12$  cromosomas y, aunque es posible el cruce interespecífico dentro de cada complejo, es difícil recuperar descendientes fértiles de cruzamientos entre complejos (Vaughan et al., 2003).

Estudios demuestran que existen dos patrones evolutivos de origen y domesticación del arroz cultivado, uno en Asia para la especie *Oryza sativa* y otro en África *Oryza glaberrima* Steud, ambas son especies de reproducción autógena (Marco A. Acevedo et al., 2006). No existe claridad sobre la época y el origen del arroz, pero se puede precisar, según referencias históricas que 3000 años antes de cristo, el emperador Shen-Nung de China, fue el primero en cultivar arroz como parte de un ritual religioso; además se han encontrado en el valle del Yang-Tse Kiang remanentes de arroz que datan de 3000 a 4000 años antes de cristo (Víctor Degiovanni B., et al 2010).

Otras fuentes indican que el arroz tiene un origen diferente, precisan que *Oryza Sativa* L proviene del sudeste de Asia, al sur de la India, gracias a que la región cuenta con las

condiciones ambientales propicias para el cultivo. De la especie *Oryza glaberrima* Steud se conoce que se originó y dispersó solo en el oeste de África (CIAT, 2010).

La especie de *Oryza sativa* está compuesta por cinco grandes grupos:

Indica, aus, japónica tropical, japónica templada y arroces aromáticos (Garris et.al, 2005).

Las variedades indicas y japónicas presentan diferencias (Tabla 1), que pueden llegar a determinar la calidad y posibles usos, por las distintas cantidades de amilosa y amilopectina características de cada una (FAO, 2000).

**Tabla 1.** Principales diferencias entre las subespecies indica y japónica

<b>Característica</b>	<b>Indica</b>	<b>Japónica</b>
<b>Forma y color de la hoja</b>	Larga y verde clara	Estrecha y verde oscura
<b>Ángulo hoja bandera y tallo</b>	Agudo	Abierto
<b>Forma del grano</b>	Largo y fino	Largo y redondo
<b>Arista</b>	Fina y corta	Gruesa y larga

**Fuente:** Marco A. Acevedo et al., 2006

## 1.2 Morfología de la semilla

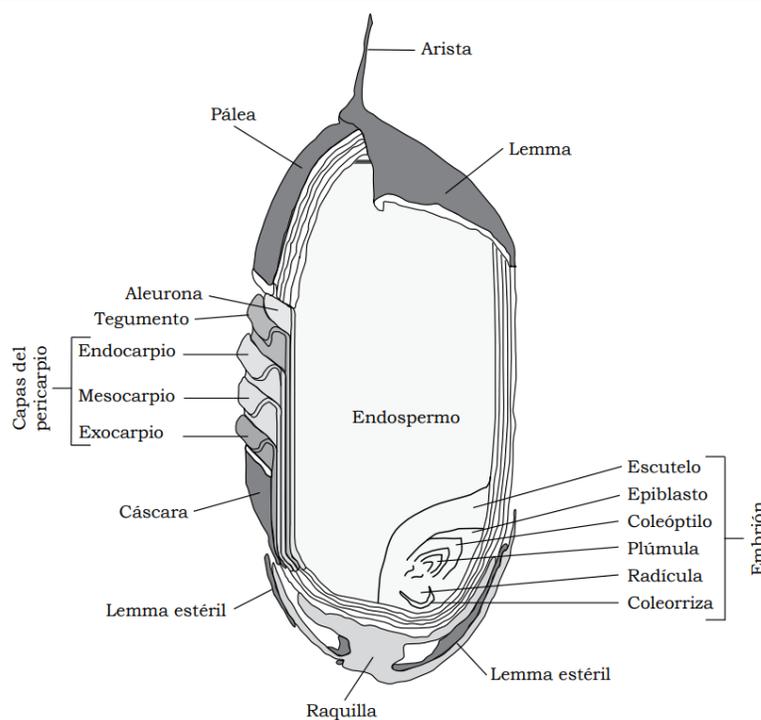
La semilla, es el ovario maduro, seco e indehiscente (Víctor Degiovanni B., et al 2010).

Recién cosechado está formado por el cariópse y por cáscara, la cual está compuesta de

glumas. A su vez el cariópse, está formado por el embrión, el endospermo, capas de aleurona, tegmen (cubierta seminal), y el pericarpio (cubierta del fruto) (Olmos, 2007).

El embrión está conformado por la plúmula u hojas embrionarias y la radícula o raíz embrionaria primaria. La plúmula está cubierta por el coleóptilo, y la radícula está envuelta por la coleorriza (Oscar Arregocés, 2005).

**Figura 1.** Estructuras interna y externa de la semilla de arroz



**Fuente:** Víctor Degiovanni B., et al 2010

### 1.3 Mejoramiento del Arroz

El objetivo principal del mejoramiento del arroz es desarrollar variedades más productivas para obtener un mayor valor comercial, lo cual implica identificar prioridades, definir objetivos y orientar actividades para alcanzar las metas (Víctor Degiovanni B., et al 2010);

por tal razón es necesaria la investigación multidisciplinaria, para contribuir a que el sector arrocero de América latina y el Caribe (ALC) sea más eco-eficiente productivo y competitivo así como resiliente y sostenible para favorecer a la seguridad alimentaria regional y mundial (CIAT, 2016).

A lo largo del tiempo el Programa de Arroz del CIAT en Colombia, ha demostrado la importancia del mejoramiento convencional, contribuyendo al desarrollo de casi el 60% de las 400 variedades mejoradas liberadas por países en ALC hasta el momento (CIAT, 2016).

El instituto nacional Fedearroz; al igual que otras instituciones internacionales como el CIAT, el IRRI, el FLAR, y el CIRAD; trabajan actualmente con diversas técnicas de biotecnología, desarrollando herramientas genómicas para el descubrimiento de genes, la elaboración de criterios y métodos de selección del germoplasma y la evaluación genotípica y fenotípica de las diferentes variedades desarrolladas; para el logro de objetivos de importancia agronómica, como mejorar el rendimiento y la calidad del grano, aumentar la tolerancia a las bajas temperaturas, generar resistencia a *Pyricularia oryzae*, a Sogata (*Tagosodes orizicolus*) y al Virus de la Hoja Blanca del Arroz, entre otros. El objetivo de las diversas investigaciones, generado por estas entidades, permite aumentar los rendimientos del cultivo, para que sea eficiente, sostenible y competitivo; al tiempo que promueve el desarrollo tecnológico y mitiga el impacto ambiental (CIAT, 2018).

## **1.4 Marcadores moleculares como herramienta del mejoramiento en arroz**

Un marcador molecular es un fragmento de ADN ubicado específicamente en el genoma y es utilizado para señalar un gen de interés. El uso de los marcadores moleculares en la actualidad, se ha venido posicionando como una herramienta importante ya que complementa el trabajo del mejoramiento convencional no sólo en el cultivo del arroz, sino también en otros cultivos claves para la seguridad alimentaria (Víctor Degiovanni B., et al 2010). Los marcadores moleculares basados en ADN son útiles para realizar análisis filogenéticos y en la búsqueda de genes de interés agronómico, como en la aplicada para selección asistida por marcadores (MAS), pruebas de paternidad y trazabilidad de los alimentos (FAO, 2010).

La selección asistida por marcadores moleculares complementa el mejoramiento genético convencional, ya que permite identificar un gen o grupo de genes asociados a un fenotipo deseado, se puede decir entonces, que es una metodología de selección indirecta de características agronómicas deseables (Víctor Degiovanni B., et al 2010).

Las ventajas que se obtienen al utilizar los marcadores moleculares son amplias. En este sentido, permite minimizar el tiempo que se necesita para obtener un genotipo deseado, permite incorporar caracteres en genotipos adaptados; en el caso del cultivo de arroz se puede realizar selección en estado de plántula. De esta manera, se convierte en una metodología confiable ya que los marcadores no están expuestos a factores ambientales que

pueden afectar su expresión y además es posible discriminar entre genotipos homocigotos y heterocigotos (Víctor Degiovanni B., et al 2010, Xu et al 2005).

Para el desarrollo de este trabajo de investigación, se utilizó los marcadores moleculares tipo microsatélites o SSRs (Secuencias Simple Repetidas). Este tipo de marcadores consisten en polimorfismos pequeños presentes en el ADN que se amplifican mediante PCR; son variables, muestran a menudo decenas de alelos en un locus, los cuales pueden diferir entre sí en el número de repeticiones (FAO, 2010). Son muy abundantes en los genomas de eucariotas y algunos procariotas, están constituidas por unidades cortas (motivos básicos) de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un numero variable de veces (Sirvent et al. 2012).

En arroz, los marcadores SSR han sido ampliamente utilizados en estudios de diversidad genética (Agrama et al., 2010; Courtois et al., 2012; Zhang et al., 2012; Viviana Becerra, 2017, Xu et al., 2002). El CIAT en conjunto con el FLAR, utilizaron los marcadores moleculares como herramienta de selección de líneas tolerantes del frío. Sarao et al. (2010), respaldó con marcadores SSRs las pruebas DHE (Distinción, Uniformidad y Estabilidad) de variedades de plantas nuevas y notificadas que requieren el registro y protección por la Ley de Protección de Variedades Vegetales y Derechos del Agricultor (PPV & FRA, 2001).

Otros estudios en el cultivo de arroz, permitieron realizar selección asistida por marcadores con SSRs para determinar el polimorfismo entre genotipos resistentes y susceptibles a estrés por salinidad (Rani y Adilakshmi, 2011). Romero et al. (2013), utilizó los SSR para seleccionar la resistencia al VHBA del progenitor donador Fd2000 y el fondo genético de las poblaciones de retrocruzamiento.

En este sentido, en selección de caracteres agronómicos de interés, este tipo de marcadores moleculares han demostrado gran eficacia, dado que presenta elevado nivel de polimorfismo. Además, estos marcadores presentan reproducibilidad y son independientes de las condiciones medioambientales. Los SSRs pueden ser analizados en distintos tejidos y en diferentes estadios de desarrollo de la planta. Estas condiciones los han convertido en uno de los sistemas de marcadores genéticos más informativos y empleados en mejoramiento (Sirvent et al. 2012).

## **1.5 Aislamiento de ADN a partir de semilla**

Dada la creciente demanda en el mercado de arroz a nivel nacional y mundial, los programas de mejoramiento buscan continuamente aumentar los rendimientos, aplicando diferentes técnicas incluyendo la selección asistida por marcadores y la producción de arroz híbrido Huabing Liang (2015). El aislamiento del ADN es un proceso básico e importante para las evaluaciones, de su calidad y cantidad dependen diversos estudios genéticos útiles para el mejoramiento de los cultivos.

La genotipificación a gran escala y las evaluaciones de la pureza de arroz, exigen un rápido aislamiento del ADN genómico de alta calidad de manera rentable a partir de un gran número de muestras, lo que implica buscar nuevas metodologías para aislar el ADN de semillas de arroz eficientes, ya que actualmente están disponibles un gran número de protocolos y kits comerciales, pero son costosos, complejos e inadecuados para el manejo de un gran número de muestras (P. Rajendrakumar et al., 2015).

Anteriormente en el CIAT se utilizaba para extracción de tejido de arroz el protocolo desarrollado por S. R. McCouch (1988), la metodología consistía en macerar el tejido en nitrógeno líquido usando un mortero. El tejido en polvo congelado se mezcla con el buffer de extracción (Tris-HCL, EDTA, NaCl, Bisulfito y SDS), luego se adiciona cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para eliminar proteínas y pigmentos; la fase superior, que contiene el ADN, se recupera a través de una capa de Miracloth entre extracciones, al finalizar el ADN se precipita con 2 volúmenes de etanol al 95% y se enjuaga en etanol al 70%.

Con el objetivo de lograr mayor eficiencia este protocolo fue reemplazado en la actualidad en el Laboratorio de Genética Molecular y Cultivo de Tejidos del CIAT, por una versión modificada y adaptada para arroz por Mathias Lorieux (2002) de un protocolo de aislamiento de ADN de cacao (A. M. Risterucci, L. G. 2000). Ambos protocolos exigen tener pequeñas cantidades de hoja, como materia prima para realizar el proceso de aislamiento de ADN, por tal motivo y en busca de mejorar los procesos, se plantea la alternativa de implementar un protocolo de extracción de ADN a partir de semilla, que permita minimizar el tiempo en el proceso de genotipificación, sin ser necesarios la germinación, ni el crecimiento de las plantas en invernadero, lo que puede ser muy valioso en casos de identificación de la pureza de las variedades antes de su utilización. La extracción de ADN a partir de semillas tiene además grandes ventajas, ya que se puede realizar con una parte del endospermo, dejando el embrión viable y disponible para el crecimiento de las plantas bajo condiciones controladas en laboratorio y posterior fenotipificación.

Es de gran importancia para el programa de mejoramiento de arroz, optimizar y/o implementar métodos de evaluación de los materiales que ofrezcan una reducción en el uso

de recursos y tiempo para la evaluación de estos (P. Rajendrakumar et al., 2015); por tal razón el protocolo para extracción de ADN a partir de endospermo de semillas de arroz desarrollado por Chiaki Mutou (2014), favorece en gran medida el uso de dichos recursos, ya que no hay necesidad de obtener plántulas para disponer de tejido vegetal para la extracción de ADN; este protocolo consiste en macerar el grano de arroz en un tubo y adicionar un buffer a base de urea, adicionar fenol-cloroformo y el sobrenadante se precipita con isopropanol, el producto de la extracción se puede diluir a 35 ng / $\mu$ l y usarse en una PCR para la amplificación exitosa de cloroplasto, mitocondrial, y regiones genómicas.

De manera similar, Li Maoteng (2007) desarrolló un protocolo para extracción de ADN de semillas secas de *B. napus* de usando en el Buffer (NaCl, PVP, EDTA, Tris -HCL). El NaCl y el PVP se usaron para eliminar polisacáridos y polifenoles durante la extracción del ADN. Las semillas se maceran con nitrógeno líquido, luego se adiciona el buffer de extracción, se centrifuga y se pasa la fase acuosa a un nuevo tubo, se adiciona isopropanol, se mezcla y se centrifuga, el pellet que queda se lava con etanol al 75%. En conclusión, este método puede ser utilizado para obtener ADN de calidad y puede ser utilizado en análisis de RAPD.

Un método de aislamiento de ADN ideal debe requerir sólo una pequeña cantidad de tejido, involucrar procedimientos simples, utilizar un mínimo número de productos químicos, debe ser rápido y generar buena calidad y cantidad de ADN. Por lo anterior Huabing Liang (2015), estableció un protocolo donde se divide la semilla a la mitad y se extrae ADN sólo del endospermo que no contiene el embrión, este es macerado con balines y luego se adiciona el buffer (Tris HCL, EDTA, CTAB, NaCl, SDS) y  $\alpha$ -Amilasa, se agrega cloroformo, se rescata el sobrenadante y se precipita con isopropanol, finalmente se enjuaga

el pellet con etanol al 70%. La  $\alpha$ -Amilasa en el buffer es clave, ya que se ha demostrado ser eficaz para la calidad del ADN debido a que elimina la contaminación por polisacáridos lo cual aumenta la tasa de amplificación en PCR de ADN de maíz, trigo y patata.

## **2. Capítulo: Objetivos**

### **2.1.1 Objetivo General**

Desarrollar una metodología no destructiva de extracción de ADN a partir de semillas de Arroz y evaluar su potencial implementación en los programas de mejoramiento de Arroz del CIAT, FLAR y Cirad.

### **2.1.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar diferentes protocolos de extracción de ADN para asegurar la calidad del ADN aislado a partir de la semilla.
- Establecer un flujo de evaluación para realizar la extracción de ADN a partir del endospermo y germinar la semilla seleccionada, bajo condiciones controladas.

## 3. Capítulo: Metodología

### 3.1 Ubicación

Este proyecto de investigación se realizó en el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, en el laboratorio de *Genética Molecular y Cultivo de Tejidos* con el apoyo del Programa Arroz, ubicados en el km 17 Recta Cali – Palmira, Departamento del Valle del Cauca.

### 3.2 Material Vegetal

El material vegetal evaluado fueron semillas de origen *Indica*, *Japónica* y algunas líneas del programa de mejoramiento de arroz del CIAT y Cirad.

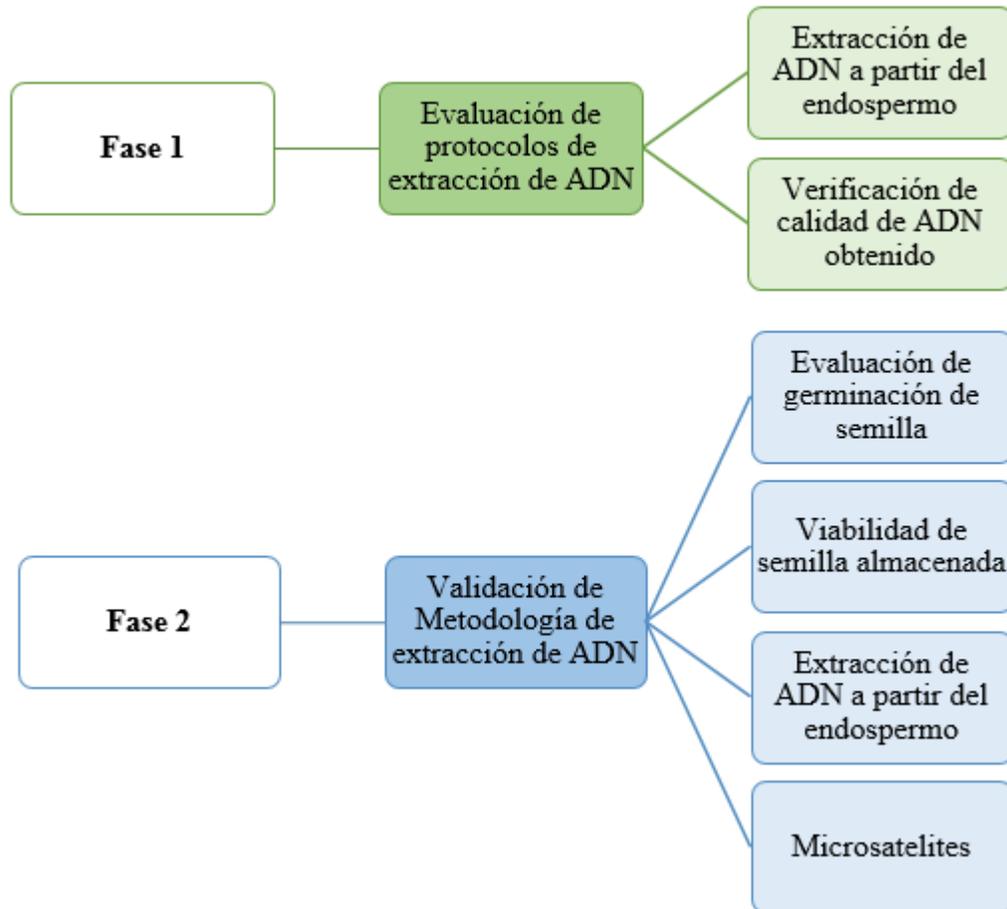
**Tabla 2.** Lista de material vegetal usado para extracción de ADN de semilla. Disponible en el banco de germoplasma del Programa de Arroz del CIAT y Cirad.

ID - Muestra	Nombre
1	Bluebonnet 50
2	Oryzica 1
3	Azucena
4	Colombia 1
6	CT21407-17P-3P-1SR-1-3SR-1P
11	ORYZICA YACU 9
13	SHIN2
14	BLUEROSE

15	KHAODEMG
16	KUSABUE
18	Teqing
20	Minghui 63
21	PINTAWNG::IRGC40673-1
22	IR43::IRGC117005-1
26	ORYZICA LLANOS 5
27	IR60::IRGC3493-C1
28	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-1-1-2-M
29	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-3-4-5-M
31	PCT11:0:0:2,Bo:5:1>158-1-9-3-2-M
32	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-3-4-3-M
33	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-1-2-3-M
35	PCT11:0:0:2,Bo:5:1>102-2-4-3-3-M
36	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>53-1-1-1-1-M
38	PCT11:0:0:2,Bo:3:1>86-4-3-4-M
39	PCT11:0:0:2,Bo:1:1>5-5-3-1-2-M
41	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-1-2-5-M
43	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-3-5-5-M
46	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-2-9-4-M
47	Línea 3
48	Línea 18

La investigación se desarrolló en dos fases (Figura 2), la primera consistió en la evaluación de seis diferentes protocolos de extracción de ADN de semilla para lo cual esta se dividió en dos partes y disponer de solo la mitad del endospermo. La calidad de los ADNs fue evaluada en geles de agarosa al 0.8% en 1X TBE teñido con SYBRsafe y cuantificados por absorbancia usando la placa Take3TRIO y lector Synergy H1m (Biotek). La fase dos fue la validación de esta metodología de extracción de ADN; inicialmente se realizó una evaluación la germinación de las 30 líneas, luego se dividieron las semillas, la parte de la semilla que contiene el embrión fue almacenada en placas a 4°C y se evaluó su viabilidad en periodos de tiempo de 15, 30, 45 y 60 días después de almacenadas. El endospermo de cada línea fue extraído con la metodología ajustada en la fase 1, y finalmente se validó la metodología mediante marcadores moleculares microsátélites.

**Figura 2.** Esquema de fases de la investigación



**Fuente:** Autor.

### 3.3 Materiales y métodos Fase 1

#### 3.3.1 Extracción de ADN a partir de semilla

La evaluación de los diferentes protocolos de extracción de ADN (Tabla 3), se efectuó con los materiales Oryzica 1 y Bluebonnet 50. La semilla de cada línea se colocó en una caja Petri y se dividió a la mitad realizando un corte con bisturí, la parte de la semilla que no

contiene el embrión se depositó en un tubo de microcentrífuga de 2ml, para posteriormente ser macerada.

Para macerar el endospermo a extraer, se evaluaron diferentes metodologías: la primera, consistió en insertar en los tubos 2 balines metálicos y macerar por 3 minutos en el agitador Harbil (Fluid Management); la segunda, consistió en imbibir cada semilla por 12 horas en 150  $\mu$ l de agua estéril, colocar 2 balines metálicos y macerar por 3 minutos en el agitador ya mencionado y la tercera metodología consistió en introducir 2 balines de silica-zirconio por tubo y adicionar 150 $\mu$ l de agua estéril 1 hora antes de macerar, y macerar durante 6 minutos en el equipo TissueLyser (Retsch).

Después de obtener las muestras de semilla maceradas se extrajo el ADN con los seis protocolos de la Tabla 3.

**Tabla 3.** Referencias de los seis protocolos evaluados para la extracción de ADN de los endospermos de las líneas Bluebonnet y Oryzica.

<i>Protocolo</i>	<i>Nombre</i>	<i>Observación</i>
<i>1</i>	A. M. Risterucci et al., 2000. A high density linkage map of <i>Theobroma cacao</i> L. Theor Appl Genet 2000 Vol 101 (948-955) modificado y adaptado para Arroz por Mathias Lorieux (2002). <b>Anexo A.</b>	Control
<i>2</i>	A. M. Risterucci, et al., 2000. A high density linkage map of <i>Theobroma cacao</i> L. Theor Appl Genet 2000 Vol 101 (948-955) modificado y adaptado para Arroz por Mathias Lorieux (2002). <b>Anexo A.</b>	Buffer de extracción + $\alpha$ -Amilasa
<i>3</i>	Chiaki Mutou et al., 2014. DNA Extraction from Rice Endosperm (Including a Protocol for Extraction of DNA from Ancient Seed Samples) <b>Anexo B.</b>	Buffer de extracción + $\alpha$ -Amilasa

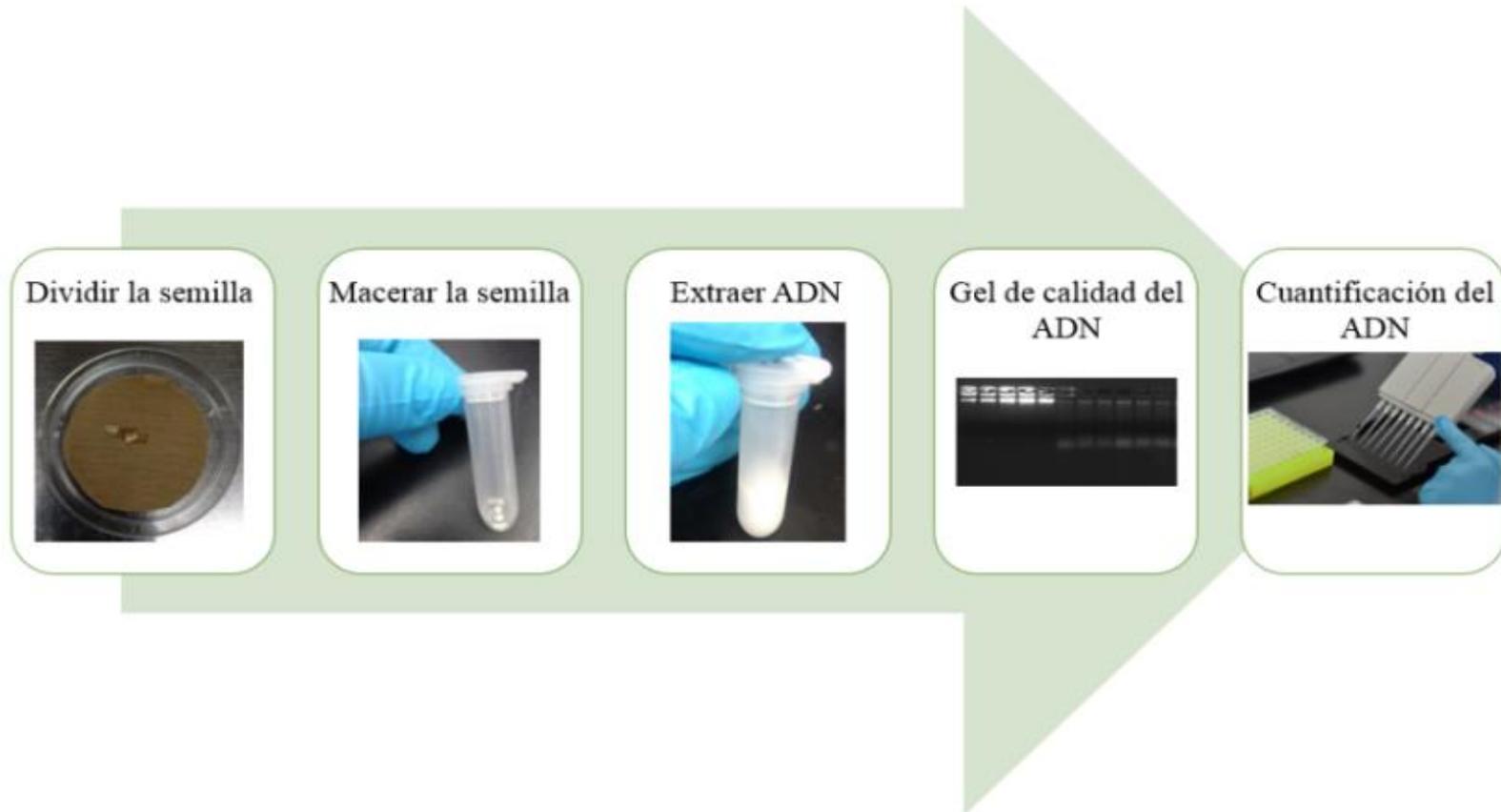
4	Li Maoteng et al., 2007. A Simple DNA Extraction Method for PCR Amplification from Dry Seeds of Brassica napus2007Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (7)1122-1125. <b>Anexo C</b>	Buffer de extracción + $\alpha$ -Amilasa
5	Huabing Liang et al., 2015. A high-throughput DNA extraction method from rice seeds. <b>Anexo D.</b>	Buffer de extracción + $\alpha$ -Amilasa
6	McCouch. S. R , G. Kochert, Z. H. Yu , Z. Y. Wang, G. S. Khush. W. R. Coffman y S. D. Tanksley, 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76:8 15-829. <b>Anexo E.</b>	Buffer de extracción + $\alpha$ -Amilasa

### 3.3.2 Gel de Calidad y cuantificación

Para verificar la calidad del ADN extraído con las diferentes metodologías, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, en 0.5X TBE teñido con SYBRsafe (2  $\mu$ l/100ml de gel). Se visualizaron 2  $\mu$ l de ADN por muestra adicionándole 8  $\mu$ l de buffer de carga (Blue Juice); como control del gel se sembró 2  $\mu$ l de ADN de Lambda (Invitrogen) preparado a una concentración final de 100ng/ $\mu$ l. Para obtener una estimación cualitativa de la cantidad de ADN presente en cada muestra, se realizó dilución seriada (5, 10, 20, 50 y 60 ng/ $\mu$ l) del Lambda Invitrogen, la cual también fue visualizada en el gel junto a las muestras. Los geles se fotografiaron con Fotodocumentador BIO-RAD Molecular Image Gel Doc XR+ with Image Lab Software.

Para evaluar la cantidad del ADN obtenido con las diferentes metodologías, además de verificar si se encontraba limpio de residuos orgánicos, se realizó una cuantificación de ácidos nucleicos por Absorbancia, usando la placa Take3TRIO y lector Synergy H1m (Biotek), siguiendo la Guía Práctica elaborada en el Laboratorio de genética Molecular (Quintero, 2015. Anexo F).

**Figura 3.** Metodología Fase 1



**Fuente:** Autor.

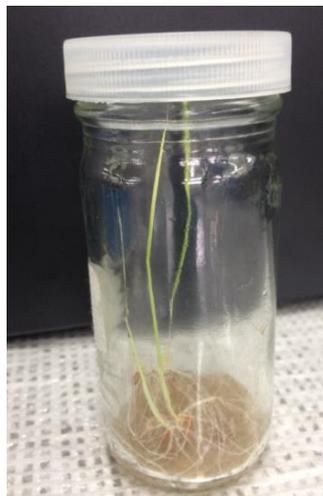
## 3.4 Materiales y métodos Fase 2

### 3.4.1 Pruebas de germinación y conservación de semilla

#### Germinación Inicial

A cada línea de arroz se le evaluó su porcentaje de germinación con una prueba inicial que consistió en desinfectar 12 semillas por cada línea y ponerla en frascos de mayonesa con papel germinador estéril humedecido con 2ml de la solución  $\text{CaSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  0.5mM, la cual ayuda a la germinación de la semilla. (6 semillas en cada frasco, por cada línea).

*Figura 4.* Prueba de germinación de semilla en frascos de mayonesa estériles



**Fuente:** Autor.

Para la desinfección de la semilla se realizó el siguiente protocolo:

#### Desinfección de semilla

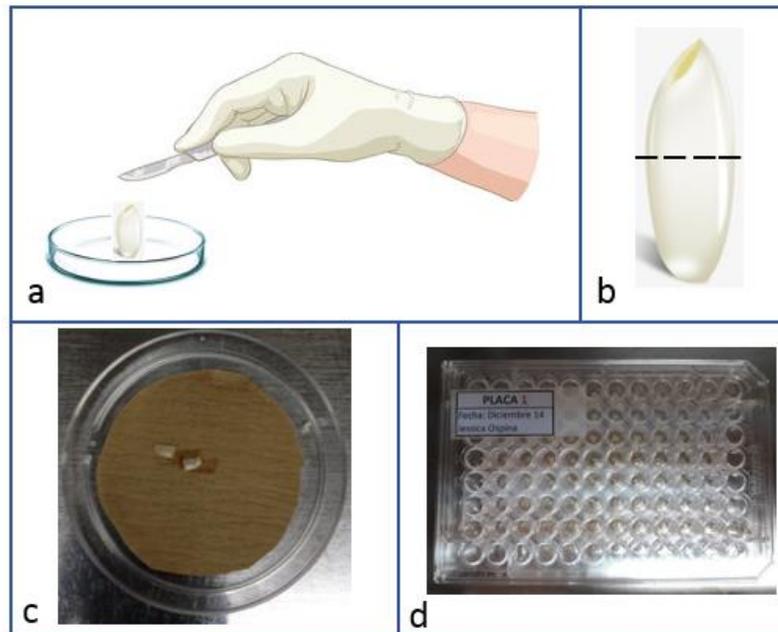
- a. Romper latencia de la semilla. Dejar la semilla por tres días a 50°C

- b.** Remover la testa de la semilla
- c.** 1 lavado con etanol al 70% durante 1 minuto
- d.** 1 lavado con hipoclorito de sodio al 0.525% durante 1 minuto
- e.** 5 lavados con agua estéril durante 5 minutos cada uno
- f.** Todo el proceso se realiza en cámara de flujo laminar.

### **Almacenamiento y viabilidad de semilla**

Una vez evaluado el porcentaje de germinación, se estableció el siguiente protocolo para almacenar la parte de la semilla que conserva el embrión:

- a)** Desinfectar la semilla con el protocolo anteriormente descrito.
- b)** En una caja Petri se divide la semilla de forma trasversal (Figura 5), la parte de la semilla que contiene el embrión es almacenada en la placa de plástico con 96 pozos en distribución de 8filas x 12 columnas, la cual es llevada a 4°C. Las muestras deben tener un mapa para su identificación en la placa de almacenamiento.
- c)** La parte de la semilla que solo tiene endospermo se almacena a 4°C en tubos eppendorf de 2 ml, los cuales deben tener la misma identificación de la placa de almacenamiento.

**Figura 5.** División de semilla

a) División de la semilla. b) Línea de corte. c) División a la mitad. d) Placa donde se almacena

**Fuente:** a. Depositphotos (2018), b. pngtreec (2018) y c. y d. Autor.

Para evaluar la viabilidad de la germinación de las semillas en el tiempo, se realizaron cuatro pruebas de germinación de los embriones almacenados a 15, 30, 45 y 60 días después de su conservación, esta prueba consistió en poner a germinar en frascos de mayonesa con papel germinador estéril humedecido con 2ml de la solución  $\text{CaSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  0.5mM.

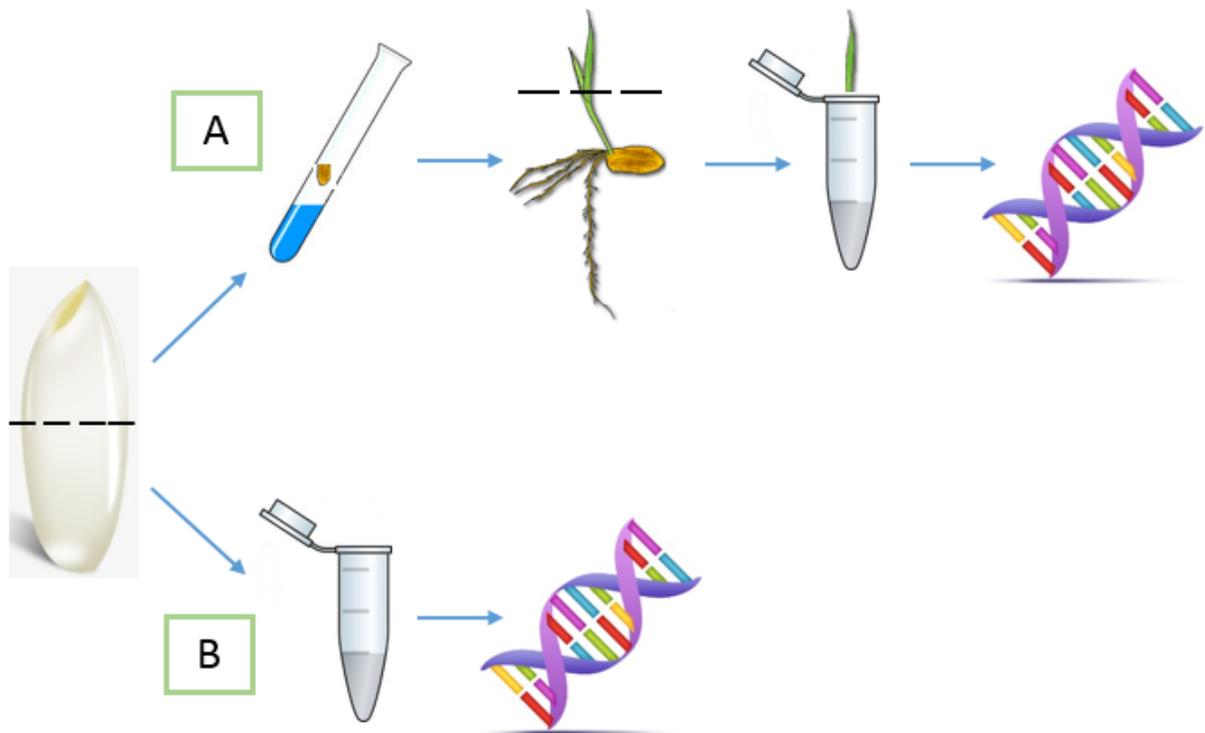
### 3.4.1 Extracción ADN

Se desinfectaron nuevamente otro grupo de semillas de las 30 líneas a evaluar, con el protocolo anteriormente descrito, se dispusieron en cajas Petri y se dividieron. La mitad del endospermo fue almacenado en tubos eppendorf de 2ml y la parte de las semillas que contienen los embriones fueron puestas a germinar.

Se realizaron dos tipos de extracción de ADN, una a partir de tejido foliar germinado en

laboratorio, el cual sirvió como control para la posterior validación, y ADN aislado a partir del endospermo de la misma semilla por cada línea evaluada (Figura 6).

**Figura 6.** Metodología de Extracción de ADN de tejido y endospermo.



A) Proceso de extracción de ADN de tejido foliar a partir de la germinación en laboratorio, de la parte superior del endospermo, la cual contiene el embrión.

B) Proceso de extracción de ADN utilizando la metodología propuesta en este trabajo de investigación, a partir de la mitad inferior del endospermo.

**Fuente:** pngtree (2018), quimicaylaborariomariapaula (2018), <http://www7.uc.cl> (2018). Freepik (2018).

## **Extracción de ADN a partir de tejido foliar.**

Para obtener el tejido a extraer, se evaluaron dos metodologías de germinación en laboratorio: la primera consistió en poner la semilla frascos de mayonesa con papel germinador estéril humedecido con 2ml de la solución  $\text{CaSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  0.5mM; y la segunda metodología consistió germinar la semilla en tubos de 1.1ml estériles con 50 $\mu\text{l}$  de la solución  $\text{CaSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  0.5mM.

Una vez germinadas las líneas, a los 11 días aproximadamente, se colectó el tejido en tubos eppendorf de 2ml, y se maceraron con el siguiente protocolo:

### **Macerado del Tejido Foliar**

- a) Se tomó aproximadamente 80 mg de tejido y se dispuso en tubos de 2ml. (se mantuvo en hielo).
- b) Se introdujo un balón metálico por tubo y se pre-enfrió en nitrógeno líquido por 20 minutos.
- c) Se maceró con nitrógeno líquido durante 3 minutos en el agitador Harbil (Fluid Management).

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo de extracción del Anexo A (M. Risterucci et al., 2000 Modificado y adaptado para Arroz por Mathias Lorieux (2002). Este es el protocolo que se usa actualmente para todas las aplicaciones moleculares realizadas con arroz en el Laboratorio de Genética Molecular y Cultivo de Tejidos del CIAT. Una vez obtenidos los ADNs se verificó su calidad y cantidad para posteriormente ser normalizados a (60 ng/ $\mu\text{l}$ ).

## Extracción de ADN a partir de semilla

La extracción de ADN a partir del endospermo se realizó a las 30 líneas a evaluar, con el protocolo evaluado en la fase 1.

### 3.4.2 Validación de la metodología de extracción de ADN de semilla con marcadores microsatélites

La validación de la metodología de extracción de ácidos nucleicos a partir de semilla, se realizó mediante la técnica de amplificación por PCR, se usó como control ADN de la línea CT21375-F4-43-1 anteriormente evaluada con los mismos marcadores SSR, se compararon las muestras aisladas a partir del tejido germinado en laboratorio, y las obtenidos a partir del endospermo.

**Tabla 4.** Marcadores microsatélite utilizados para la validación

SSR Marker	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
RM 208	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC
RM 225	TGCCCATATGGTCTGGATG	GAAAGTGGATCAGGAAGGC
RM 229	CACTCACACGAACGACTGAC	CGCAGGTTCTTGTGAAATGT
RM 234	ACAGTATCCAAGGCCCTGG	CACGTGAGACAAAGACGGAG
RM 242	GGCCAACGTGTGTATGTCTC	TATATGCCAAGACGGATGGG
RM 263	CCCAGGCTAGCTCATGAACC	GCTACGTTTGAGCTACCACG

Para la amplificación por PCR realizada con ADN de tejido, se utilizaron 3µl a una concentración de 10ng/µl, y para la reacción con ADN de semilla se agregó 2.5µl a una

concentración de 100ng/ $\mu$ l. Las condiciones de amplificación de la PCR se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones de amplificación

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	Reacción 1Rx
GoTaq colorless buffer - Promega	5X	1X	3
MgCl <sub>2</sub> Promega	25mM	2,5	1,5
dNTP	5mM c/u	0,2	0,6
Solution Q	5X	1X	3
Primer Forward	20uM	0,2	0,15
Primer Reverse	20uM	0,2	0,15
Taq JPG 2008 1:5		0,15	0,15
Agua Gibco/Invitrogen			3.95
<b>Total</b>			<b>15</b>

**Condiciones de Amplificación**

94 °C	3 min	1 ciclo
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	34 ciclos
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1 ciclo
4 °C	Incubación	

La amplificación por PCR se visualizó con la técnica de electroforesis anteriormente mencionada con un gel de agarosa al 4%. Se agregaron 5 $\mu$ l de buffer de carga (Blue Juice) a las muestras y se sembró todo el volumen final. Las muestras se corrieron a 150 voltios constantes y se dejaron migrar 6 cm, aproximadamente 3 horas. Los geles se fotografiaron con Fotodocumentador BIO-RAD Molecular Image Gel Doc XR+ with Image Lab Software.

La lectura de los alelos se realizó determinando la distancia de migración de los amplicones

desde el pozo hasta el borde superior de la banda observada. El tamaño en pares de bases (pb) fue calculado tomando como referencia el marcador 1Kb Plus (Invitrogen), el cual se colocó al inicio y final de las muestras. Tales distancias fueron convertidas pb, con ayuda de la herramienta web <http://biotools.nubic.northwestern.edu/SizeCalc.html>.

### **3.4.3 Análisis estadístico fase 2**

Para evaluar la viabilidad de las líneas de origen Indica y Japónica después de cortadas y almacenadas durante 15, 30, 45 y 60 días, se hizo un análisis de correlación de Pearson. Con el propósito de evaluar a nivel estadístico las posibles relaciones entre el porcentaje de la germinación con el tiempo de almacenamiento, se utilizó la prueba de comparación de promedios (método de Tukey).

Para determinar diferencias entre las lecturas del tamaño aproximado de los alelos, en las muestras provenientes de la mitad del endospermo, y del embrión del endospermo germinado en laboratorio, se utilizó la prueba de comparación de promedios (método de Tukey). Todos los análisis estadísticos se realizaron a través del paquete estadístico SAS.

## 4. Capítulo: Resultados y Discusión

### 4.1 Resultados y discusión fase 1

#### 4.1.1 Extracción de ADN a partir de semilla

La primera metodología de macerado de la semilla, consistió en colocar en cada tubo de microcentrífuga dos balines metálicos y macerar por tres minutos en el agitador Harbil (Fluid Management). Esta metodología no funcionó, porque no hubo homogeneidad en el macerado, ya que se observaron trozos de semilla sin macerar. La segunda, consistió en imbibir las semillas en 150  $\mu$ l de agua estéril durante 12 horas antes de macerar con 2 balines metálicos por 3 minutos en el agitador Harbil (Fluid Management). Esta metodología funcionó, pero no fue práctica, ya que requería disponer de más tiempo para preparar las muestras. Finalmente la tercera metodología, que consistió en introducir 2 balines de silica-zirconio por tubo y adicionar 150  $\mu$ l de agua estéril 1 hora antes de macerar, y agitar durante 6 minutos en el equipo TissueLyser, fue la más eficiente y práctica ya que permitía preparar las muestras en menor tiempo y se obtuvo homogeneidad en el macerado de la semilla.

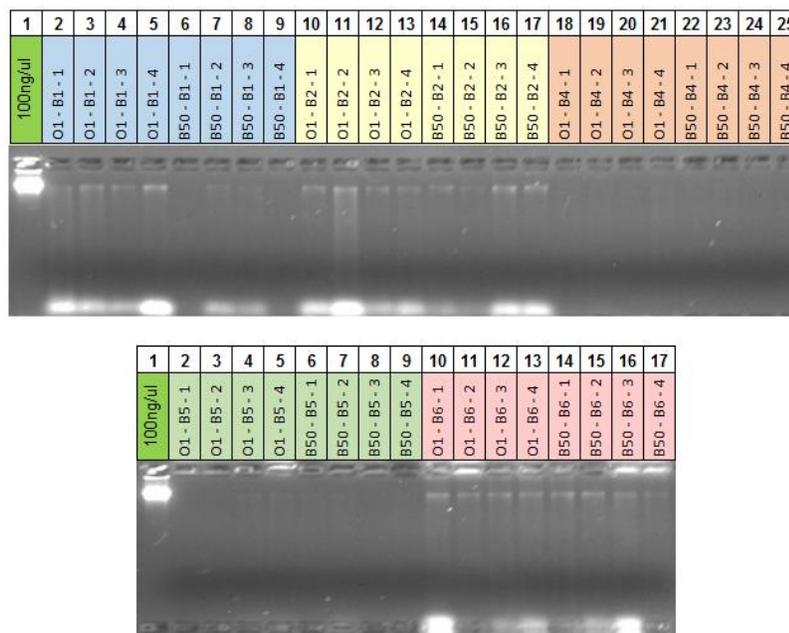
Se extrajo ADN del endospermo de las líneas Bluebonnet 50 y Oryzica 1, utilizando los seis diferentes protocolos de extracción de ADN a probar. Se adicionó  $\alpha$ -Amilasa a una concentración inicial de 15mg/ml (20  $\mu$ l/muestra) en el buffer de los diferentes protocolos, excepto del protocolo 1, el cual se empleó como control, debido a que este protocolo es el más ampliamente utilizado para todas las aplicaciones moleculares realizadas con arroz en el Laboratorio de Genética Molecular y Cultivo de Tejidos del CIAT. (Tabla 3, metodología fase 1).

De acuerdo con Huabing Liang (2015), a partir de la mitad de la semilla se puede obtener una cantidad adecuada de ADN para posteriores evaluaciones moleculares. En efecto, fue posible aislar ácidos nucleicos a partir de cinco, de los seis protocolos inicialmente propuestos para ser evaluados. Sin embargo, el protocolo 3, no funcionó debido a la solidificación del buffer durante su preparación.

En el gel de calidad (Figura 7), se observan los ADNs extraídos con las diferentes metodologías. Como control de la calidad se utilizó ADN del fago Lambda, a una concentración de 100ng/μl.

**Figura 7.** Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad del ADN de endospermo de arroz, extraído con cinco diferentes protocolos.

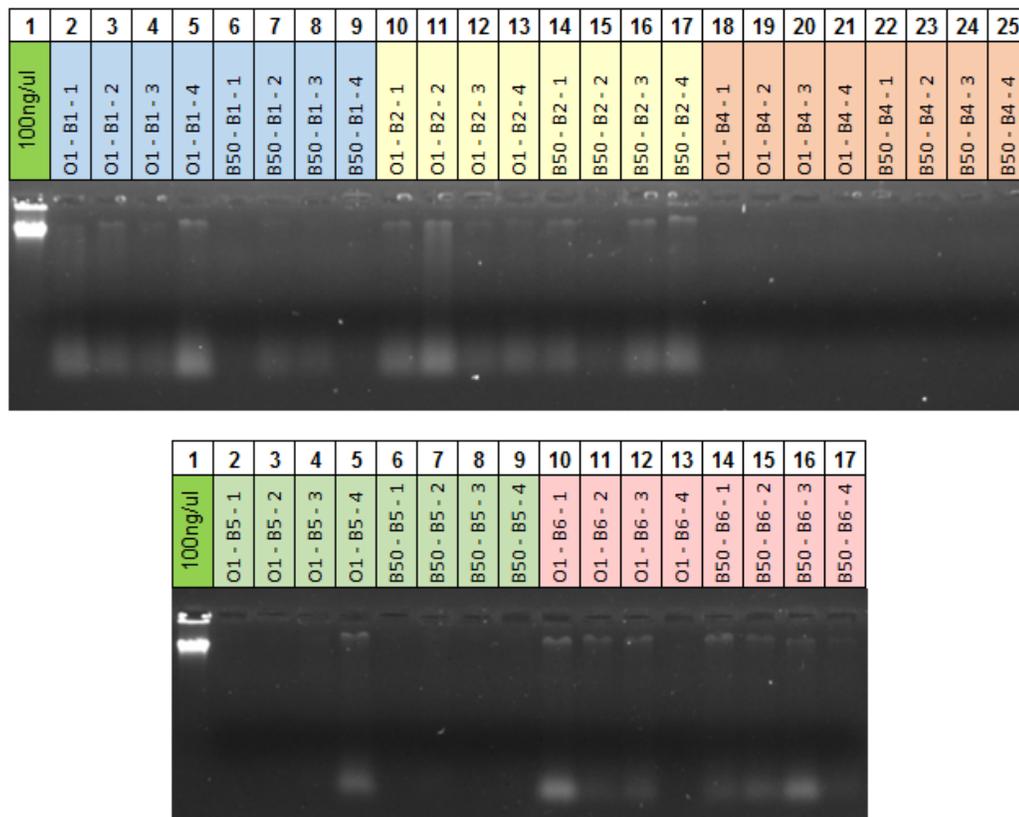
Pozo 1, 2μl de ADN Lambda comercial (100ng/ul). Pozos siguientes, ADNs aislados de semillas, cada color representa uno de los protocolos evaluados, así Protocolo 1, azul, Protocolo 2, amarillo; Protocolo 4, naranja; Protocolo 5, verde y Protocolo 6, rosado.



**Fuente:** Autor.

A nivel cualitativo, se puede apreciar mejor calidad, con los protocolos 1, 2 y 6. Sin embargo, se observó presencia de RNA, por lo cual las muestras se sometieron a un tratamiento adicional con 2µl de RNAsa A (10mg/ml) por 1 hora a 37°C (Figura 8).

**Figura 8.** Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad del ADN de endospermo de arroz, extraído con cinco diferentes protocolos después del tratamiento adicional con 2ul de RNAsa A (10mg/ml).



**Fuente:** Autor.

A partir de los resultados obtenidos en el gel de la Figura 8, se seleccionaron los protocolos 2 y 6 (Tabla 3, fase 1) debido a que en ellos se observó una banda definida del ácido nucleico sin degradación. Con el objetivo de mejorar la calidad se realizaron las siguientes modificaciones: se aumentó la concentración de NaCl para reducir la presencia de

polisacáridos y polifenoles; se aumentó la  $\alpha$ -Amilasa (15mg/ml) en volumen a 40 ul/muestra y se adicionó la RNAasa A desde el inicio en el buffer de extracción (4 $\mu$ l/muestra, 20ug/ml); se aumentó a 30 min el tiempo en el paso de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) en la cámara de extracción. Finalmente, una vez resuspendidas las muestras de ADN en TE, se les hizo una limpieza adicional precipitandolas con etanol al 70% para tratar mejorar la relación de absorbancia de 260/230 y 260/280, las cuales indican contaminación por residuos orgánicos. Los cambios introducidos a cada protocolo se detallan en la Tabla 6. Como controles se realizaron los protocolos 1 y 6 sin modificaciones (Tabla 6), aunque se adicionó RNase A a todos los buffer para tratar el RNA presente en las muestras.

**Tabla 6.** Protocolos seleccionados y modificaciones ensayadas para la extracción de ADN de los endospermos de las líneas Bluebonnet 50 y Oryzica 1.

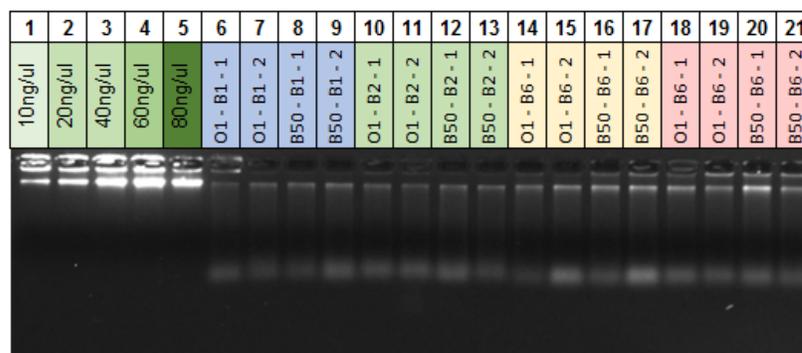
Protocolo	Nombre	Modificación
1: Control	A. M. Risterucci et al., 2000. A high density linkage map of Theobroma cacao L. Theor Appl Genet 2000 Vol 101 (948-955) modificado y adaptado para Arroz por Mathias Lorieux (2002).	RNase A en el buffer de extracción
2: Modificado	A. M. Risterucci et al.,2000. A high density linkage map of Theobroma cacao L. Theor Appl Genet 2000 Vol 101 (948-955) modificado y adaptado para Arroz por Mathias Lorieux (2002).	Buffer + $\alpha$ -Amilasa + RNase A en el buffer de extracción
6: Control	McCouch. S. R , G. Kochert, Z. H. Yu , Z. Y. Wang, G. S. Khush. W. R. Coffman y S. D. Tanksley 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76:8 15-829.	Control + RNase A en el buffer de extracción
6: Modificado	McCouch. S. R , G. Kochert, Z. H. Yu , Z. Y. Wang, G. S. Khush. W. R. Coffman y S. D. Tanksley 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76:8 15-829.	Buffer + $\alpha$ -Amilasa + RNase A en el buffer de extracción

De acuerdo con Huabing Liang (2015) el aumentar en la concentración de  $\alpha$ -Amilasa en el Buffer elimina la contaminación por polisacáridos. En este trabajo se observó un efecto

positivo en la calidad del ADN al aumentar no sólo la  $\alpha$ -Amilasa sino también el NaCl, la RNAsa y al hacer la precipitación adicional con etanol. El valor promedio en la relación de absorbancia 260/280 pasó de 1.7 a 2.0 y en la relación 260/230 que pasó de 0.5, a 1.2. En particular, con el buffer de extracción de S. R. McCouch (1988), que se designó como el protocolo No. 6 modificado y la cantidad de  $\alpha$ -Amilasa adicionada permitió obtener una calidad de ADN superior en comparación con los protocolos No. 1 control y No. 2 modificados (Figura 9). En este sentido, el protocolo desarrollado en este trabajo de investigación, constituye una metodología efectiva en términos de calidad, tiempo y costo, partiendo desde la mitad del endospermo en arroz.

**Figura 9.** Extracción de ADN de endospermo de arroz con los protocolos seleccionados.

Pozo 1, 2 $\mu$ l de la dilución seriada de Lambda. Pozos siguientes, ADNs aislados de semillas, cada color representa uno de los protocolos evaluados, así Protocolo 1 control, azul; Protocolo 2 modificado, verde; Protocolo 6 sin modificaciones, amarillo y Protocolo 6 modificado, rosado.



**Fuente:** Autor.

El protocolo modificado y mejorado como resultado de esta primera fase de investigación se describe a continuación:

## Introducción y consideraciones

- Antes de iniciar el proceso de extracción, rotular debidamente los tubos donde se transferirá el ADN para evitar posibles confusiones.
- Precaución: Manipular el cloroformo: alcohol isoamílico en cabina extractora de gases y después de agregarlo a las muestras continúe el protocolo dentro de ella.

**Materiales requeridos:** Balines de silica-zirconio, puntas estériles, canoas estériles para soluciones, toallas de papel, marcador Sharpie negro, pinzas.

## Soluciones

1 M Tris HCl pH 8.0

0.5 M EDTA pH 8.0

5 M NaCl

$\alpha$ -Amilasa (15mg/ml)

Cloroformo : Alcohol Isoamílico (24:1)

Isopropanol frío

Etanol 80% frío

1X TE (10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA pH8)

RNAse A (Qiagen 1006671)

## Macerado de la semilla

- a) Tomar el endospermo de cada semilla y disponerlo en tubos eppendorf de 2ml.
- b) Introducir dos balines de silica-zirconio por tubo y se adicionar 150ul de agua estéril  
1 hora antes de macerar.

- c) Macerar durante 6 minutos en el equipo TissueLyser.

### Buffer de extracción

- Mezclar los volúmenes correspondientes de soluciones estériles de Tris-HCl, NaCl, EDTA, según cuadro inferior.
- Antes de utilizar agregar SDS y el Bisulfito de Sodio.

- d) Adicionar en una botella de vidrio estéril los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración Final	30 ml
H <sub>2</sub> O		17.4 ml
1M Tris-HCl, pH8.0	100 mM	3 ml
5M NaCl	2 M	8.4 ml
0.5M EDTA pH8.0	50 mM	1.2 ml
SDS	1%	0.5 g
Bisulfito de Sodio	0.5%	0.15 g

### Extracción de ADN

- e) Agregar 250µl del Buffer de extracción caliente (74 °C), más 4µl de RNase A con una concentración de 40µg/ml y 40ul por muestra de α-Amilasa (15mg/ml).
- f) Tapar y agitar vigorosamente, hasta que se vea bien mezclado el tejido con el buffer.
- g) Incubar por 30 minutos a 74°C, mezclar por inversión cada 5 minutos.
- h) Poner las muestras en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- i) Realizar un spin en la centrifuga para evitar posible contaminación.
- j) Agregar 400µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) en la cámara de extracción.

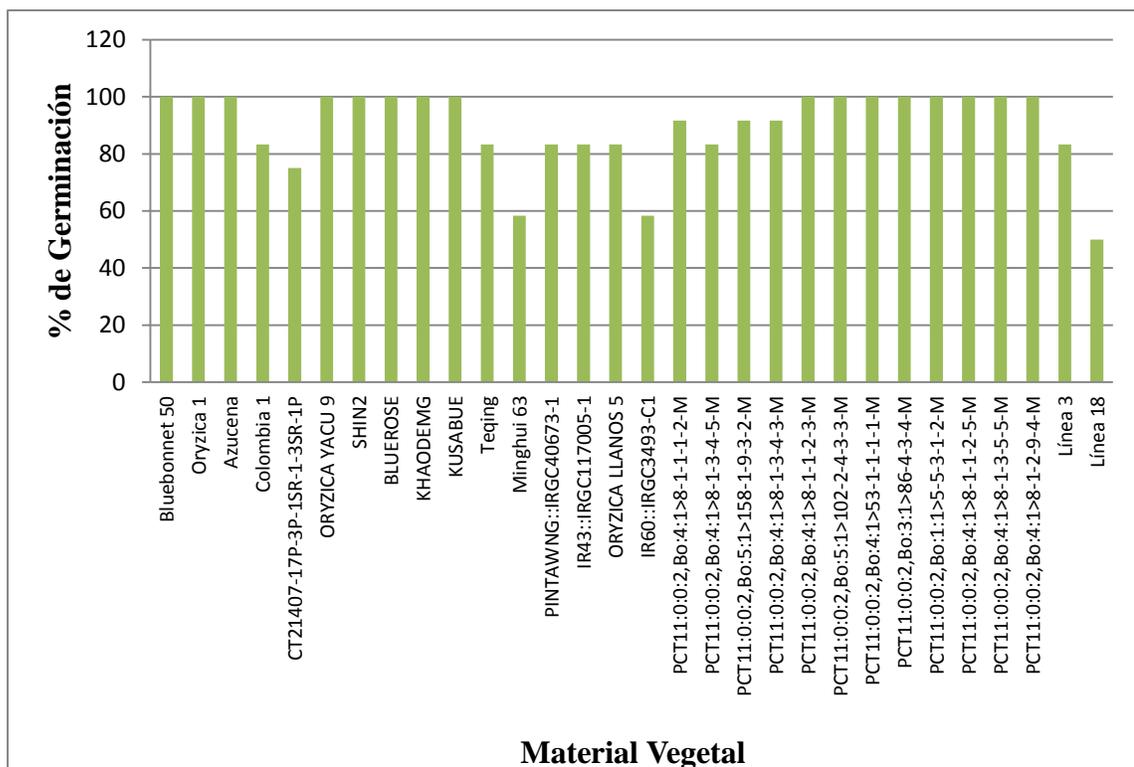
- k)** Mezclar lentamente por inversión durante 30 min.
- l)** Centrifugar a 3000 rpm x 30 min a 4°C.
- m)** Transferir el sobrenadante 300µl aproximadamente (Fase acuosa) con mucho cuidado, a tubos nuevos de 1.5ml.
- n)** Agregar 270µl de isopropanol frío.
- o)** Mezclar por inversión y colocar a -20 °C mínimo durante 1 hora o toda la noche.
- p)** Centrifugar a 3000 rpm x 30 min a 4°C.
- q)** Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no botar los pellets.
- r)** Agregar 100µl de etanol al 80 %.
- s)** Centrifugar a 3000 rpm x 20 min a 4°C.
- t)** Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no botar los pellets.
- u)** Secar a temperatura ambiente (o en el Speed-Vac durante 30 min, sin calor).
- v)** Resuspender en 30µl de Buffer con RNase A, a una concentración final de 40µg/ml.
- w)** Incubar a 37°C por 15 minutos. Resuspender e incubar nuevamente a 37°C por 15 minutos.
- x)** Adicionar 30 µl de Etanol al 70%.
- y)** Mezclar por inversión y colocar a -20 °C durante 1 hora.
- z)** Repetir el proceso desde el paso p.
- aa)** Revisar el ADN extraído (2µl por muestra) en un gel de calidad al 0.8% de agarosa, en 0.5X TBE con SYBRsafe (2 µl/100ml de gel).
- bb)** Una vez obtenidos los ADNs se verificó su calidad y cantidad para posteriormente ser normalizados a una misma concentración (100 ng/µl).

## 4.2 Resultados y discusión fase 2

### 4.2.1 Pruebas de germinación y conservación de semilla

El porcentaje de germinación observado fue de 89% en promedio. El porcentaje mínimo de germinación obtenido fue del 50%, y el máximo obtenido fue del 100%. De las 30 líneas evaluadas, 16 de ellas, presentaron 100% de germinación; 10 líneas obtuvieron porcentajes de germinación entre el 80 y el 90%, y cuatro 4 líneas estuvieron por debajo del 75% de germinación.

**Figura 10.** Porcentaje de germinación de las 30 líneas evaluadas. En el eje Y, están los valores del germinación en porcentajes. Los números en el eje X, corresponden a la identificación de las muestras.



En la evaluación realizada a los embriones almacenados 15, 30, 45 y 60 días después de su conservación, se observó que los materiales puestos a germinar después de su

almacenamiento, que dieron mejor resultado fueron Bluerose con un 100% de germinación, seguido de Shin 2 y Khaodeng con 98%, Bluebonnet y PCT11:0:0:2.Bo:4:1>53-1-1-1-1-M con 94% (Tabla 7).

**Tabla 7.** Germinación de semilla después de almacenada DDA

ID_Muestra	Material	Origen	% de germinación			
			15 DDA	30 DDA	45 DDA	60 DDA
1	Bluebonnet 50	Japónica	100	100	83	92
2	Oryzica 1	Indica	83	75	75	50
3	AZUCENA	Japónica	100	75	67	50
4	Colombia 1	Indica	75	67	92	67
6	CT21407-17P-3P-1SR-1-3SR-1P	Indica	50	75	50	25
11	ORYZICA YACU 9	Indica	83	100	92	83
13	SHIN2	Japónica	100	100	100	92
14	BLUEROSE	Japónica	100	100	100	100
15	KHAO DENG	Indica	100	100	92	100
16	KUSABUE	Japónica	100	83	92	92
18	Teqing	Indica	83	83	83	67
20	Minghui 63	Indica	83	75	83	67
21	PINTAWNG::IRGC40673-1	Indica	83	75	92	83
22	IR43::IRGC117005-1	Indica	83	83	100	83
26	ORYZICA LLANOS 5	Indica	75	100	100	67
27	IR60::IRGC3493-C1	Indica	92	92	100	67
28	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-1-1-2-M	Japónica	92	92	83	67
29	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-3-4-5-M	Japónica	100	100	83	83
31	PCT11:0:0:2,Bo:5:1>158-1-9-3-2-M	Japónica	58	67	100	50
32	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-3-4-3-M	Japónica	58	67	83	92
33	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-1-2-3-M	Japónica	67	67	100	67
35	PCT11:0:0:2,Bo:5:1>102-2-4-3-3-M	Japónica	83	83	83	83
36	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>53-1-1-1-1-M	Japónica	92	100	83	100
38	PCT11:0:0:2,Bo:3:1>86-4-3-4-M	Japónica	83	92	83	92
39	PCT11:0:0:2,Bo:1:1>5-5-3-1-2-M	Japónica	75	83	100	83
41	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-1-2-5-M	Japónica	100	83	100	67
43	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-3-5-5-M	Japónica	83	100	100	75
46	PCT11:0:0:2,Bo:4:1>8-1-2-9-4-M	Japónica	92	75	100	75
47	Línea 3	Japónica	83	75	67	83
48	Línea 18	Japónica	50	58	67	83

Se examinó la correlación entre viabilidad (% de germinación) y tiempo de almacenamiento de los embriones desnudos. Para las líneas de origen indica la correlación entre las dos variables fue negativa de -0.23 (Tabla 8), y para las líneas de origen japónica la correlación también negativa de -0.08250 (Tabla 9).

**Tabla 8.** Coeficiente de correlación Pearson para Líneas de origen Indica.

<b>Coeficientes de correlación Pearson, N = 44 Prob &gt;  r  suponiendo H0: Rho=0</b>		
	<b>germinación</b>	<b>días</b>
<b>germinación</b>	1.00000	-0.23439 0.1257
<b>días</b>	-0.23439 0.1257	1.00000

**Tabla 9.** Coeficiente de correlación Pearson para Líneas de origen Japónica.

<b>Coeficientes de correlación Pearson, N = 76 Prob &gt;  r  suponiendo H0: Rho=0</b>		
	<b>germinación</b>	<b>días</b>
<b>germinación</b>	1.00000	-0.08250 0.4786
<b>días</b>	-0.08250 0.4786	1.00000

Aunque no hay correlación entre las variables o es una correlación muy baja, si se observa una tendencia a disminución de viabilidad a mayor tiempo de almacenamiento. Según la prueba de Tukey, la semilla puede ser estadísticamente viable hasta los 45 días después de almacenada, ya que existe una diferencia significativa entre los 45 y 60 días después de almacenamiento; a los 45 días la media en germinación se encuentra en 87.7%, y a los 60 días después de almacenada la media disminuye a 76.1% de germinación (Tabla 10).

**Tabla 10.** Prueba de Tukey para determinar viabilidad de germinación durante tiempo de almacenamiento

Tukey Agrupamiento			
		Media	días
	A	87.778	45
B	A	84.167	30
B	A	83.611	15
B		76.111	60

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

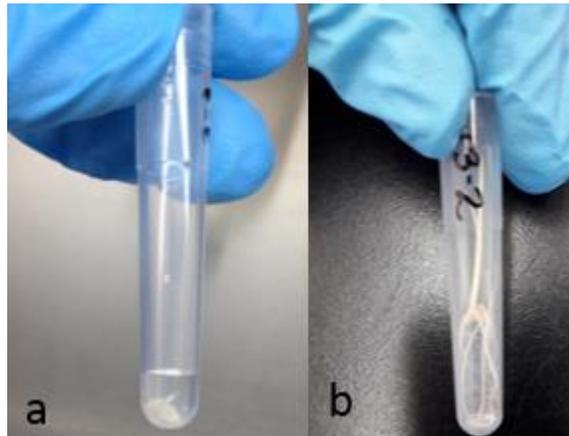
## 4.3 Extracción de ADN, gel de calidad y cuantificación

### 4.3.1 Extracción de ADN a partir de tejido

#### Estandarización del método de germinación en laboratorio para extracción de ADN

La germinación en laboratorio de las mitades de semilla con embrión almacenadas, fue realizada mediante dos metodologías, una consistió en poner la semilla en frascos de mayonesa con papel germinador estéril humedecido con 2ml de la solución  $\text{CaSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  0.5mM, pero esta metodología no fue práctica, por el largo tiempo que se debe invertir en limpieza y esterilización del material de vidrio que se requería; la otra metodología consistió en poner a germinar la semilla en tubos de 1.1ml con 50 $\mu\text{l}$  de la solución  $\text{CaSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  0.5mM, la cual fue práctica y eficiente, ya que los tubos vienen estériles, son de fácil manejo y la plántula se desarrolla bien y se pueden disponer en una gradilla en formato de 8x12.

**Figura 11.** Semilla en germinación para extracción de ADN de tejido



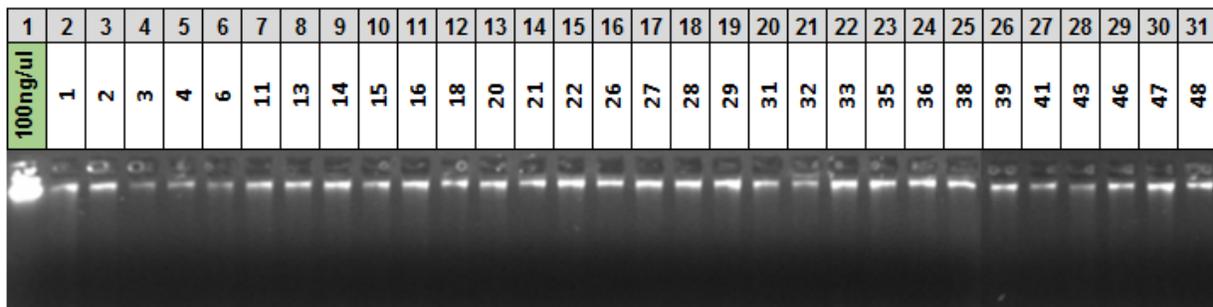
a) Semilla con 3 días de germinación. b) Semilla con 11 días de germinación

**Fuente:** Autor.

La extracción de ADN realizada a partir del tejido germinado en laboratorio de cada línea, con la metodología utilizada actualmente en el Laboratorio de Genética Molecular y Cultivo de Tejidos del CIAT (Anexo A), sirvió como control de calidad en la validación de la metodología de aislamiento de ácidos nucleicos propuesta en esta investigación (Figura 12). La cuantificación por absorbancia de los ADNs, se encontró entre 100ng/ $\mu$ l y 200ng/ $\mu$ l, con un rendimiento entre 10ug y 20ug; la relación 260/280 se encontró en un rango de 1.8 a 2.0 y la relación 260/230 se encontró en 1.3 a 1.5.

**Figura 12.** Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad del ADN extraído a partir del tejido germinado en laboratorio.

En la primera fila se encuentra el consecutivo de los pozos utilizados; en la segunda fila se encuentra la identificación de las muestras. En el primer pozo, se sembró 2 $\mu$ l de Lambda a una concentración final de 100ng/ $\mu$ l; en el pozo No. 2 al No. 31, se sembraron 2 $\mu$ l de las muestras a evaluar.



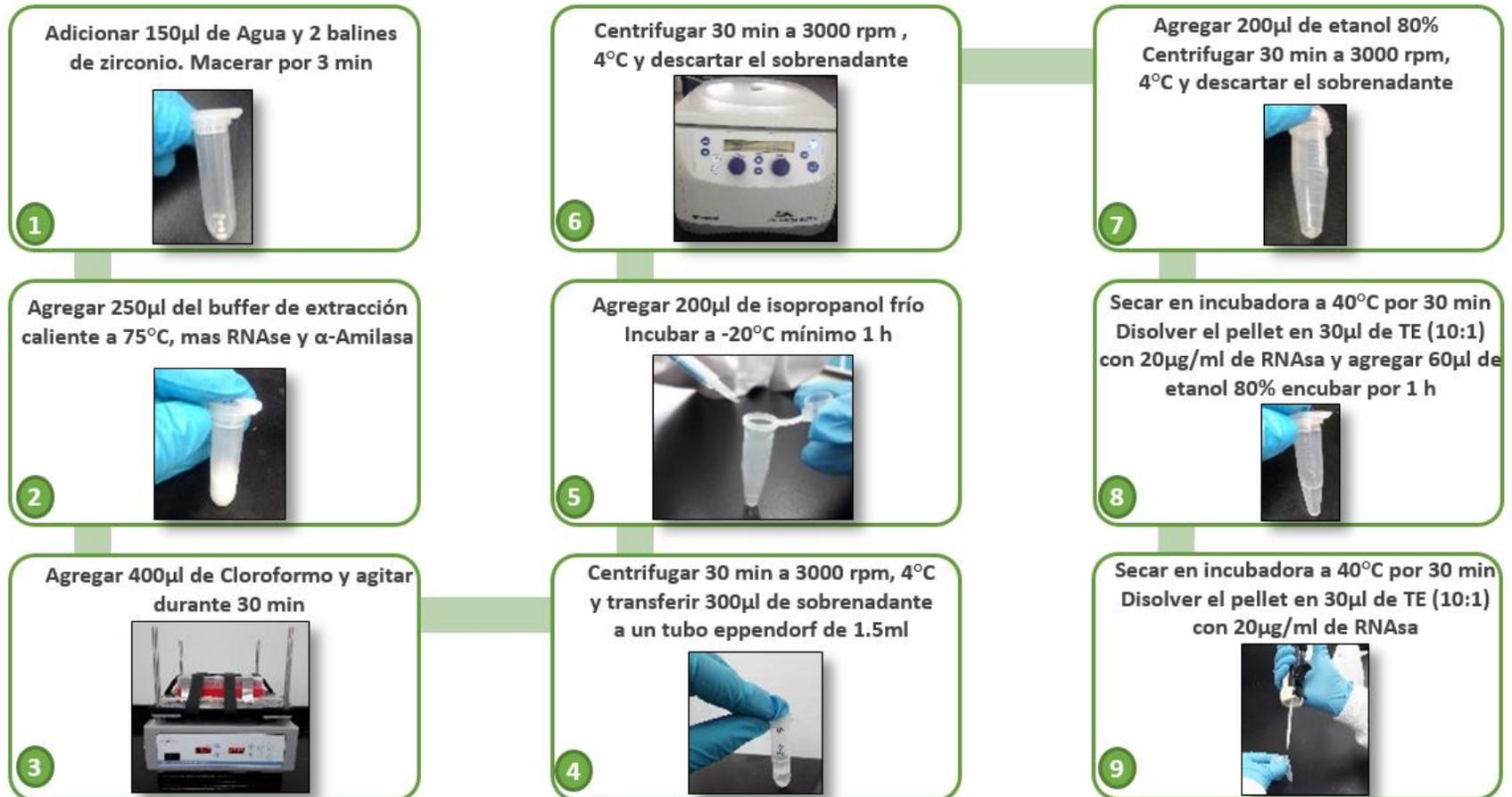
Fuente: Autor.

### 4.3.2 Extracción de ADN a partir de semilla

Con el protocolo desarrollado en la Fase 1: Protocolo No. 6 (Figura 13), se obtuvo ADN de buena calidad como se observa en el gel (Figura 14), cualitativamente se puede decir, que no se observa degradación de las muestras, por el contrario se observa una banda definida. La cuantificación por absorbancia de estos ADNs de semilla, arrojó valores de concentración en el rango de 100 a 130 ng/ $\mu$ l, la relación 260/280 se encontró en un rango de 1.8 a 1.9 y la relación 260/230 se encontró en 1.3 a 1.5.

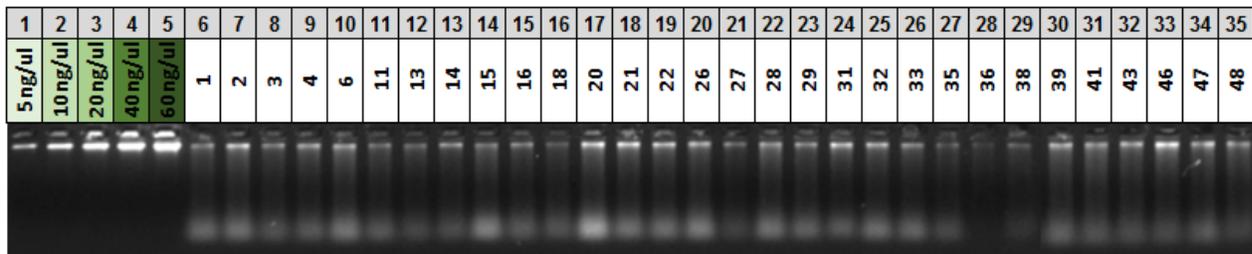
**Figura 13.** Protocolo extracción ADN de semilla.

Diagrama de flujo de la metodología de extracción de ADN a partir de endospermo propuesta en esta investigación.



Fuente: Autor.

**Figura 14.** Gel de agarosa al 0.8% para evaluar la calidad del ADN extraído a partir del endospermo. En la primera fila se encuentra el consecutivo de los pozos utilizados; en la segunda fila se encuentra la identificación de las muestras. Del primer al quinto pozo, se colocó 2µl de la dilución seriada de Lambda; del pozo No. 6 al No. 35 se sembraron las muestras correspondientes.



**Fuente:** Autor.

#### 4.4 Validación de la metodología de extracción de semilla con marcadores micro satélites

La validación de la metodología de extracción de semilla desarrollada en esta investigación, se hizo a través de la comparación de amplicones de cinco SSRs obtenidos con ADNs de semilla y tejido foliar germinado en el laboratorio. Se utilizó como control positivo de amplificación la muestra CT21375-F4-43-1, aislada de la manera tradicional a partir de tejido foliar, la cual ya había sido evaluada con los mismos marcadores. Los amplicones de la reacción fueron visualizados en un gel de agarosa al 4%. No hubo variación en el resultado de la amplificación con DNA de endospermo y de tejido foliar (Figura 15), indicando confiabilidad y reproducibilidad de la metodología propuesta en esta investigación. De acuerdo con Huabing Liang (2015), una concentración adecuada de  $\alpha$ -Amilasa en el Buffer permite aumentar la tasa de amplificación, ya que la está limpia el DNA de polisacáridos, logrando que sea igual a la de un ADN obtenido a partir de tejido, tal y como se evidenció en la Figura 15.

**Figura 15.** Gel de agarosa al 4% para validar la metodología de extracción de ADN a partir del endospermo. Al lado derecho se encuentran los geles de agarosa donde se sembraron las muestras con DNA de tejido y al lado izquierdo los geles de agarosa con DNA de semilla. En la primera fila se encuentra el número de pozos utilizados; en la segunda fila, la identificación de las muestras; en la tercera fila, la lectura de alelos realizada. En la figura A) se observa el SSR RM 225 de color azul; en la figura B) se observa el SSR RM 229 de color amarillo; en la figura C) se observa el SSR RM 234 de color rosado; en la figura D) se observa el SSR RM 242 de color morado, y en la figura E) se observa el SSR RM 263 de color verde. Pozo 1 y 35, 5µl del marcador de peso 1Kb Plus® (invitrogen); pozo No. 2 y No. 34 muestra CT 21375 como control de amplificación positivo; pozo No. 3, control negativo de amplificación; y del pozo No. 4 al No. 33 de sembraron las muestras evaluadas.

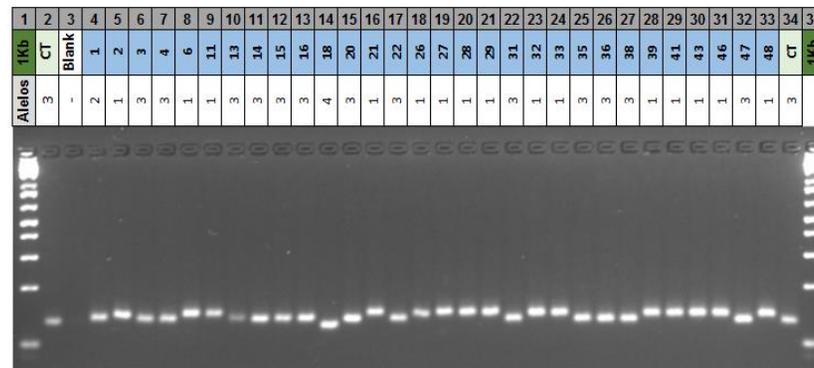
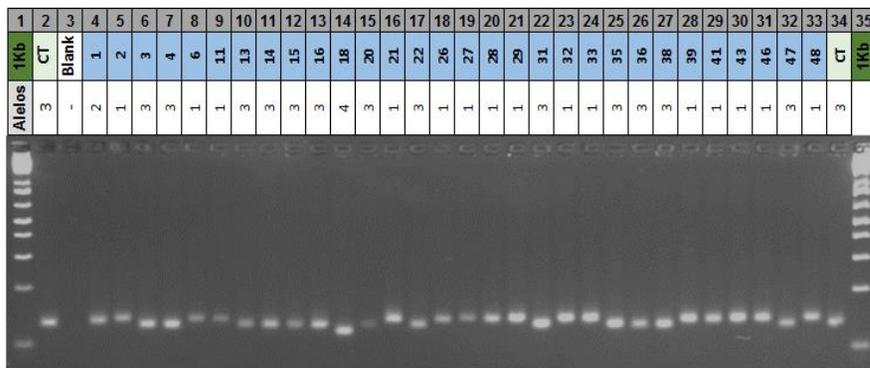
**PCR con DNA aislado de semilla**

**PCR con DNA aislado de tejido germinado en laboratorio**

**RM225**

**RM225**

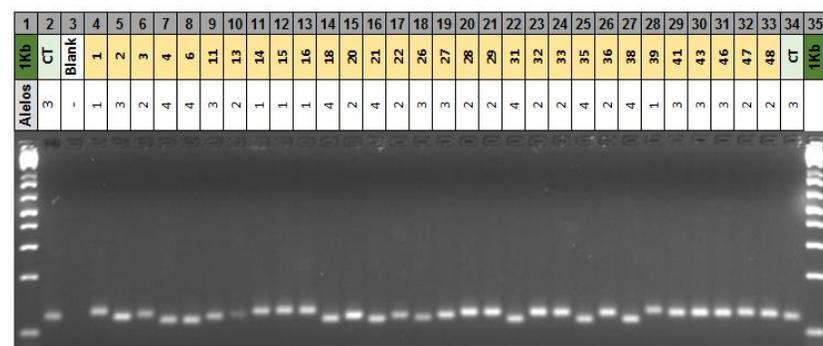
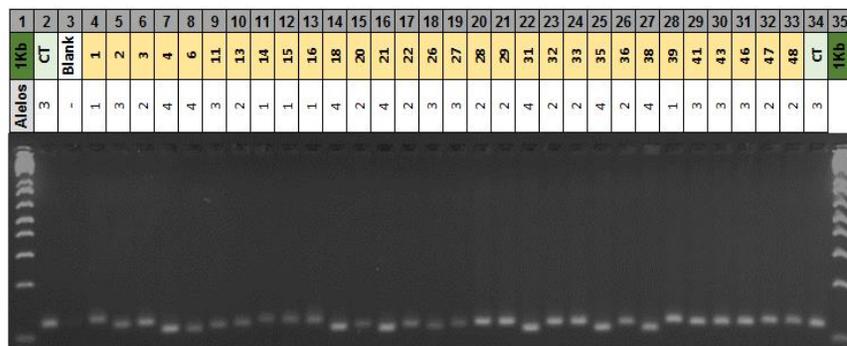
**A)**



**RM 229**

**RM 229**

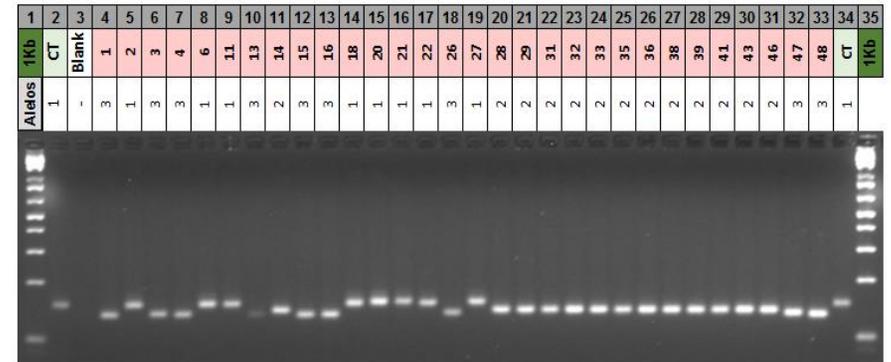
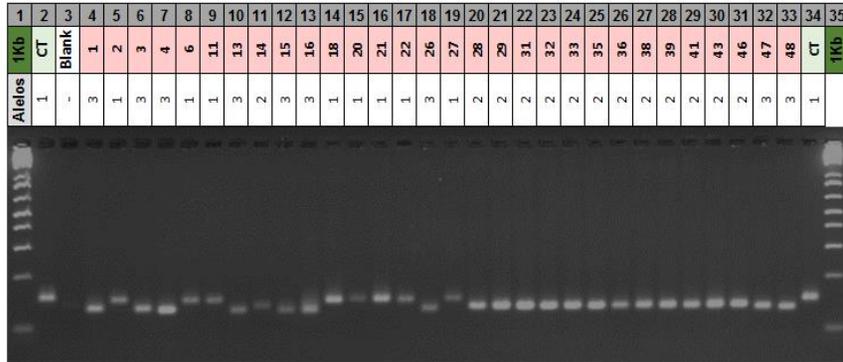
**B)**



RM 234

RM 234

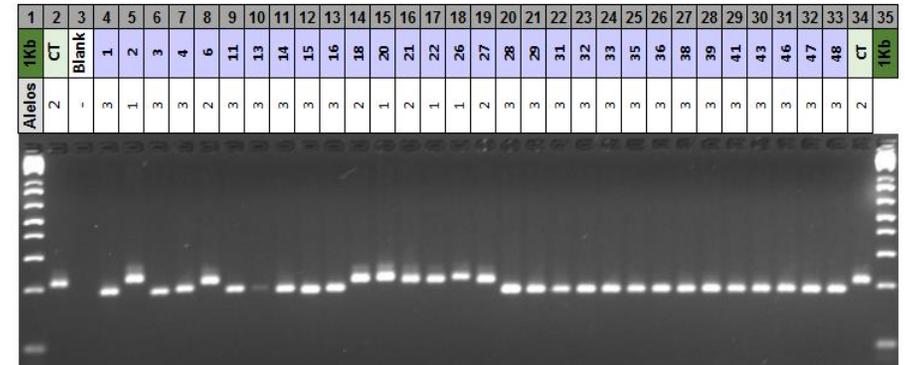
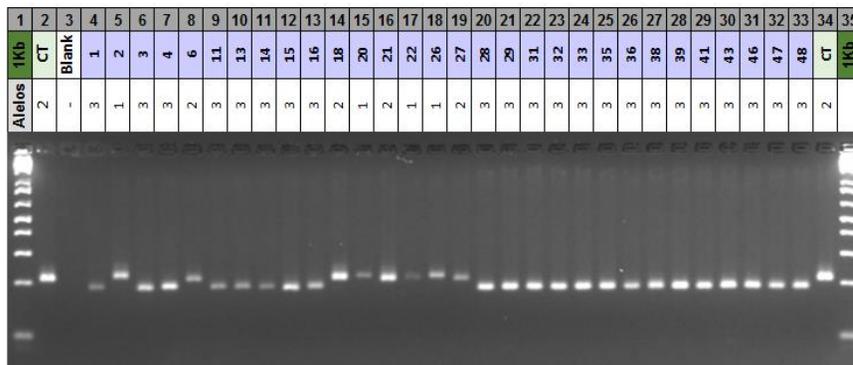
C)



RM 242

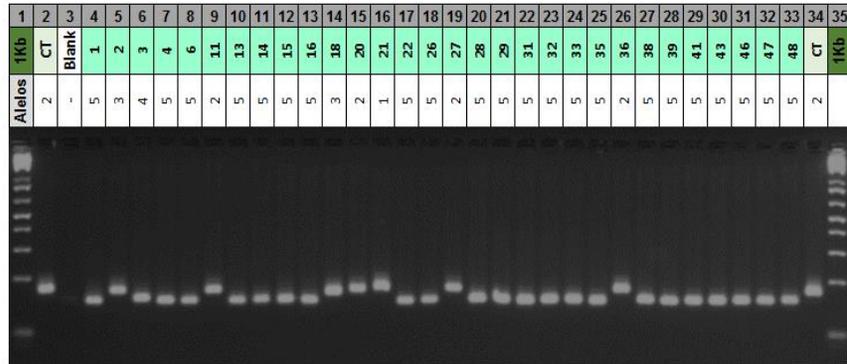
RM 242

D)

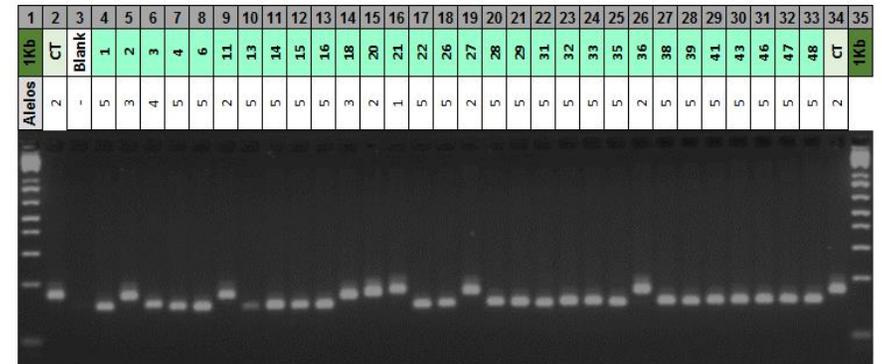


**RM 263**

E)



**RM 263**



Fuente: Autor.

Los 5 marcadores SSR evaluados fueron polimórficos y cada uno presentó de 3 a 5 alelos. Después de aplicar la prueba de Tukey se determinó que la lectura de los alelos a partir de gel de agarosa presentó una diferencia mínima de 8.1 (Tabla 12), entre las muestras provenientes de la mitad del endospermo, y del embrión del endospermo germinado en laboratorio; lo que indica que la metodología de extracción de ADN propuesta en este trabajo de investigación es confiable y reproducible, por lo cual permite realizar selección asistida por marcadores moleculares SSR. Esta diferencia mínima se pudo presentar, debido a la resolución del gel de agarosa, la cual no permitió diferenciar con exactitud el número de pares de bases de cada alelo (Figura 15).

**Tabla 11.** Tamaño aproximado de los alelos encontrados en los diferentes SSR evaluados. En la primera columna se encuentra la identificación de marcador microsatélite; la segunda columna la identificación del alelo; la tercera columna se encuentra el tamaño aproximado en pb del alelo del gel con DNA de semilla, y en la cuarta columna se encuentra el tamaño aproximado en pb del alelo del gel con DNA de tejido germinado el laboratorio.

SSR	Alelo	Aproximado Semilla (pb)	Aproximado Tejido (pb)
RM 225	1	134,9	141,5
	2	128,6	135,3
	3	122,3	126,4
	4	113,2	117,1
RM 229	1	124,4	129,1
	2	120,1	124,8
	3	116,7	120,3
	4	108,4	114,9
RM 234	1	145,4	144
	2	131,4	133,9
	3	124,5	125
RM 242	1	227,8	232,5
	2	216,1	213,5
	3	191,3	192,3

<b>RM 263</b>	1	180	178,4
	2	168,9	169,9
	3	163,8	163,1
	4	151,7	153,4
	5	143,2	147,2

**Tabla 12.** Prueba de Tukey para determinar diferencias entre las lecturas del tamaño aproximado de los alelos, en las muestras provenientes de la mitad del endospermo, y del embrión del endospermo germinado en laboratorio.

<b>Tukey Agrupamiento</b>		
	<b>Media</b>	<b>tratamiento</b>
A	150.663	tejido
A		
A	148.037	semilla

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

## 5. Capítulo: Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

- La metodología de extracción de ADN desarrollada en esta investigación teniendo como base McCouch (1988), permitió establecer que es posible aislar ácidos nucleicos de la semilla de arroz, a partir de la mitad del endospermo, logrando la cantidad y calidad adecuada para posteriores análisis con marcadores moleculares como los SSR.
- La metodología de extracción de ADN desarrollada en esta investigación, es de alta reproducibilidad y confiabilidad para ser integrada a los programas de mejoramiento de cultivos que utilizan la selección asistida por marcadores moleculares.
- La metodología de división y almacenamiento de la semilla, permite conservar la parte de la semilla que contiene el embrión hasta 45 días para su posterior germinación, tiempo suficiente para realizar la selección asistida con marcadores marcadores moleculares, permitiendo así tener un flujo de trabajo eficiente.
- Para el programa de mejoramiento de arroz del CIAT y del FLAR es de gran importancia la realización de selección asistida por marcadores moleculares a partir de ADN aislado de semilla, porque se reducen el número de materiales para continuar el proceso de mejoramiento, el tiempo de evaluación de los mismos y por ende los costos de desarrollo de las variedades.

## 5.2 Recomendaciones

- La metodología de extracción de ADN es eficiente, una vez la semilla haya sido almacenada en las condiciones adecuadas, en este caso el tiempo establecido fue de 45 días después de almacenadas, para no comprometer viabilidad. Sin embargo, posteriormente se deben realizar evaluaciones de humedad y temperaturas adecuadas para almacenamiento de semilla desnuda.
- La calidad del ADN obtenido con la metodología propuesta en esta investigación, permite a futuro poder realizar estudios de genotipificación de SNP (Single Nucleotide Polymorphism), usando el sistema EP1 y SNPtype Assays de Fluidigm.

## Bibliografía

- Amanda J. Garris, Thomas H. Tai, Jason Coburn. (2004). Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. Plant Breeding Department, Cornell University, Ithaca, New York 14853-1901 and U.S. Department of Agriculture-Agricultural Research Service Dale Bumpers National Rice Research Center, Stuttgart, Arizona 72160. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/8848/a5d1641c930ef838d9a320c077bafc2aef7e.pdf>.
- A. M. Risterucci, L. G. (2000). A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor Appl Genet* 2000 Vol 101 modificado y adaptado para Arroz por Mathias Lorieux (2002). 948-955.
- Agrama, H.A., Yan, W., Jia, M., Fjellstrom, R., and McClung, A. 2010. Genetic structure associated with diversity and geographic distribution in the USDA rice world collection. *Natural Science* 2:247-291.
- Acevedo, Marco A, Castrillo, William A, y Belmonte, Uira C. (2006). Origen, evolución y diversidad del arroz. *Agronomía Tropical*, 56(2), 151-170. Obtenido el 07 de enero de 2018, de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2006000200001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2006000200001&lng=es&tlng=es).
- Bitesizebio, 2017. DNA / RNA Manipulation and Analysis. Obtenido de <https://bitesizebio.com/category/technical-channels/dna-rna-manipulation-and-analysis/>.
- Cereales – Arroz (2018). Radícula y Raíces Seminales. Obtenido de <http://www7.uc.cl>

Chiaki Mutou, K. T. (2016). DNA Extraction from Rice Endosperm (Including a Protocol for Extraction of DNA from Ancient Seed Samples). 8-15.

CIAT, (2018). *Arroz*. Obtenido de <https://ciat.cgiar.org/lo-que-hacemos/mejoramiento-de-cultivos/arroz/?lang=es>

CIAT, C. I. (2016). *Investigación en arroz*. Obtenido de <https://ciat.cgiar.org/es/investigacion-en-arroz>

Cirad, 2017. Obtenido de <https://www.cirad.fr/en/home-page>.

Courtois, B., Frouin, J., Greco, R., Bruschi, G., Droc, G., Hamerlin, Ch., et al. 2012. Genetic diversity and population structure in a European collection of rice. *Crop Science* 52:1663-1675.

DANE. (2017). Boletín Técnico. 4° CENSO NACIONAL ARROCERO Año 2016. Recuperado de <http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/censo-nacional-arrocero/boletin-tecnico-4to-censo-nacional-arrocero-2016.pdf>

Estudiemus química (2018). Tubo de ensayo. Obtenido de <http://quimicaylaborariomariapaula.blogspot.com.co/>.

FAO, 2000. Mucha plata en el "arroz gourmet". Obtenido de <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0207sp1.htm>

FAO, 2003. R.C. Chaudhary, J.S. Nanda y D.V. Tran. GUÍA PARA IDENTIFICAR LAS LIMITACIONES DE CAMPO EN LA PRODUCCIÓN DE ARROZ. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/006/y2778s/y2778s02.htm>

- FAO, O. d. (2004). *El Arroz y la Reducción de la Brecha de Rendimiento* . Obtenido de <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja5.pdf>
- FAO, O. d. (2010). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma* . Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>
- FAO, 2017. *Seguimiento del mercado del arroz, Diciembre de 2017*. Obtenido de <http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>
- Federación Nacional de Arroceros, Fedearroz, 2017. Obtenido de <http://www.fedearroz.com.co/new/organizacion.php>.
- Freepik (2018). Hebras de ADN. Obtenido de [https://www.freepik.es/psd-gratis/hebras-de-adn-medicos-icono-psd\\_567790.htm](https://www.freepik.es/psd-gratis/hebras-de-adn-medicos-icono-psd_567790.htm).
- Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego, FLAR, 2017. Mejoramiento genético. Obtenido de [http://flar.org/pest\\_inform/capacidades-en-mejoramiento-genetico/](http://flar.org/pest_inform/capacidades-en-mejoramiento-genetico/)
- Huabing Liang, Y. D. (2015). *A high-throughput DNA extraction method from rice seeds*. Obtenido de <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2015.1088401>
- Instituto Internacional de Investigación del Arroz IRRI, 2017. Obtenido de <http://irri.org/about-us/our-mission>.

Li Maoteng et al, 2007. A Simple DNA Extraction Method for PCR Amplification from Dry Seeds of Brassica napus 2007 Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (7) 1122-1125.

Luz Elena Romero Giraldo, 2012. Introgresión de QTLs de resistencia al virus de la hoja blanca en materiales elite de arroz en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Coordinación General de Postgrados. Palmira. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/12771/1/7215004.2013.pdf>

Olmos, S. (01 de Marzo de 2007). *Apunte de morfología, fenología, ecofisiología, y mejoramiento genético del arroz*. Obtenido de Cátedra de Cultivos II. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Corrientes - 2006 - Argentina: <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar/academico/Apunte-MORFOLOGIA.pdf>

Oscar Arregocés, M. R. (Abril de 2005). *Morfología de la Planta de Arroz*. Obtenido de Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT: [http://www.doc-developpement-durable.org/file/Culture-plantes-alimentaires/FICHES\\_PLANTES/riz/Morfologia\\_planta\\_arroz.pdf](http://www.doc-developpement-durable.org/file/Culture-plantes-alimentaires/FICHES_PLANTES/riz/Morfologia_planta_arroz.pdf)

Pngtree (2018). Un grano de arroz PNG. Obtenido de [https://es.pngtree.com/freepng/a-grain-of-rice\\_1006404.html](https://es.pngtree.com/freepng/a-grain-of-rice_1006404.html).

P. Rajendrakumar, K. Sujatha, K. S. Rao, P. Nataraj Kumar, B. C. Viraktamath, S. M. Balachandran, A. K. Biswal And R. M. Sundaram. (18 de Agosto de 2015). A protocol for isolation of DNA suitable for rapid seed and grain purity assessments in rice. B. Research Notes>VI. Gene, Genome Structure/Function and Methods.

- Rani, M.G., and Adilakshmi, D. 2011. Genetic analysis of blast resistance in rice with simple sequence repeats (SSR). *Journal Crop Improvement* 25:232-238.
- Sarao, N.K., Vikal, Y., Singh, K., Joshi, M.A., and Sharma, R.C. 2010. SSR marker-based DNA fingerprinting and cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) in Punjab state of India. *Plant Genetics Research* 8:42-44.
- Sirvent, M. B. P., & Gómez, C. E. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats).
- Torró Torró, I. (2010). Análisis de los factores que determinan la resistencia al encamado y características de grano en arroz (*Oryza sativa* L.), y su asociación con otros caracteres, en varias poblaciones y ambientes: bases genéticas y QTLs implicados. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/9317/tesisUPV3425.pdf>
- Vaughan DA, Morishima H, Kadowaki K, 2003. Diversity in the *Oryza* genus, *Current Opinion in Plant Molecular Biology*, vol. 6 (pg. 139-146).
- Vaughan D. 2005. Asian Rice and Weedy Rice – Evolutionary Perspectives. Pág. 257 - 277. En: J. B. Gressel. 2005. *Crop Fertility and Volunteerism*. Taylor and Francis Group. Boca Raton, EE.UU
- Víctor Degiovanni B., Cesar P. Martínez R. y Francisco Motta O, 2010. Producción ecoeficiente del arroz en America Latina. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Tomo I, capítulos 1-24. (Publicación CIAT no. 370).

- Viviana Becerra<sup>1\*</sup>, Mario Paredes<sup>1</sup>, Marcio E. Ferreira<sup>2</sup>, Eduardo Gutiérrez<sup>1</sup>, and Lucy M. Díaz<sup>3</sup>, (2017). Assessment of the genetic diversity and population structure in temperate Japonica rice germplasm used in breeding in Chile, with SSR markers. Obtenido de <http://www.chileanjar.cl/files/V77i1Y2017id4494.pdf>.
- Watson, J. D. (2008). *Biología molecular del gen*. Buenos Aires : Editorial Medica Panamericana 5 Edición .
- Xu, W., Virmani, S., Hernández, J., Sebastian, L., Redoña, E., and Li, Z. 2002. Genetic diversity in the parental lines and heterosis of the tropical rice hybrids. *Euphytica* 127:139-148.
- Xu, Y., McCouch, S.; Zhang, Q. 2005. How we can use genomics to improve cereals with rice as refrence genome, *Plant Molecular Biology* 59:7-26.
- Zhang, D.L., Wang, M.X., Qi, Y.W., Sun, J.L., Wang, F.M., Li, J.J., et al. 2012. Genetic structure and eco-geographic differentiation of cultivated Keng rice (*Oryza sativa* L. subsp. Japonica) in China revealed by microsatellites. *Journal of Integrative Agriculture* 11:1755-1766.

## **Anexo A: A high density linkage map of Theobroma cacao L. Theor Appl Genet 2000 Vol 101 (948-955)**

**Referencia: A. M. Risterucci, L. Grivet, J. A. K. N’Goran, I. Pieretti, M. H. Flament, C. Lanaud. 2000. modificado y adaptado para Arroz por Mathias Lorieux (2002).**

### **I. Introducción y consideraciones.**

- Todo material vegetal se maneja refrigerado para evitar degradación del tejido.
- Antes de iniciar el proceso de extracción, rotular debidamente los tubos donde se transferirá el ADN para evitar posibles confusiones.
- Utilizar gafas y guantes de protección cuando se manipule nitrógeno líquido.
- Precaución: Manipular el cloroformo: alcohol isoamílico en cabina extractora de gases y después de agregarlo a las muestras continúe el protocolo dentro de ella.
- Resuspender en 100µl de TE (10:1) con RNase A, a una concentración final de 40µg/ml, si la extracción de ADN se realizó a partir de tejido.
- Resuspender en 30µl suspension buffer (Teknova Cat# T0227) más RNase A, a una concentración final de 40µg/ml, si la extracción se realizó a partir de semilla.

### **Materiales requeridos**

---

Balines metálicos (Carbón Steel Ball 1/8’’)

Nitrógeno líquido

Nevera de icopor

Hielo

Tapas

---

Puntas estériles

Canoas estériles para soluciones.

Toallas de papel.

Marcador Sharpie negro.

Dispensador de balines

### - Soluciones.

1 M Tris HCl pH 8.0

0.5 M EDTA pH 8.0

5 M NaCl

Cloroformo : Alcohol Isoamílico (24:1)

Isopropanol frío

Etanol 80% frío

1X TE (10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA pH8)

RNAse A (Qiagen 1006671)

#### - **Buffer de extracción**

- Mezclar los volúmenes correspondientes de soluciones estériles de Tris-HCl, NaCl, EDTA, según cuadro inferior.
  - Antes de utilizar agregar PEG 8000, el MATAB y el Bisulfito de Sodio.
- a) Adicionar en una botella de vidrio estéril los siguientes reactivos:

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>30 ml</b>	<b>60 ml</b>
H <sub>2</sub> O		17.4 ml	34.8 ml
1M Tris-HCl, pH8.0	100 mM	3 ml	6 ml
5M NaCl	1.4 mM	8.4 ml	16.8 ml
0.5M EDTA pH8.0	20 mM	1.2 ml	2.4 ml
PEG 8000	1%	0.3 g	0.6 g
MATAB	2%	0.6 g	1.2 g
Bisulfito de Sodio	0.5%	0.15 g	0.3 g

### **Extracción de ADN**

- a) Agregar 480µl del Buffer de extracción caliente (74 °C).
- b) Tapar y agitar vigorosamente, hasta que se vea bien mezclado el tejido con el buffer.
- c) Incubar por 30 minutos a 74°C, mezclar por inversión cada 5 minutos.
- d) Poner las muestras en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- e) Realizar un spin en la centrifuga para evitar posible contaminación.
- f) Agregar 480µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) en la cámara de extracción.
- g) Mezclar lentamente por inversión durante 5 min.
- h) Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a temperatura ambiente (tubo microcentrifuga).
- i) Transferir el sobrenadante 400µl aproximadamente (Fase acuosa) con mucho cuidado, a tubos nuevos de 1.5ml.
- j) Agregar 270µl de isopropanol frío.
- k) Mezclar por inversión y colocar a -20 °C mínimo durante 1 hora o toda la noche.

- l)** Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a temperatura ambiente (tubo microcentrifuga).
- m)** Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no botar los pellets.
- n)** Agregar 100µl de etanol al 80 %.
- o)** Centrifugar a 13000 rpm por 15 min a temperatura ambiente (tubo microcentrifuga).
- p)** Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no botar los pellets.
- q)** Secar a temperatura ambiente (o en el Speed-Vac durante 30 min, sin calor).

## **Anexo B: DNA Extraction from Rice Endosperm (Including a Protocol for Extraction of DNA from Ancient Seed Samples)**

**Referencia: Chiaki Mutou, Katsunori Tanaka, Ryuji Ishikawa.**

- El protocolo fue modificado resuspendiendo el ADN en 100µl de TE (10:1) con RNase A, a una concentración final de 40µg/ml.
- El protocolo fue modificado resuspendiendo el ADN en 30 µl de DNA suspension buffer (Teknova Cat# T0227) más RNase A, a una concentración final de 40µg/ml.

### **Materiales requeridos**

---

Balines

Puntas estériles

Canoas estériles para soluciones

Toallas de papel

Marcador Sharpie negro

Pinzas

### **Soluciones**

---

1 M Tris HCl pH 8.0

0.5 M EDTA pH 8.0

5 M NaCl

Urea

20% Na-N-lauril sarcosina

Isopropanol

α-Amilasa (15mg/ml)

---

1X TE (10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA pH8)

### Buffer de extracción

- Mezclar los volúmenes correspondientes de soluciones estériles de Tris-HCl, NaCl, EDTA, según cuadro inferior.
  - No calentar la Urea a más de 70°C.
- a) Adicionar en una botella de vidrio estéril los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración Final	200 ml
H <sub>2</sub> O		158 ml
1M Tris-HCl, pH8.0	100 mM	10 ml
5M NaCl	2 M	14 ml
0.5M EDTA pH8.0	50 mM	8 ml
Urea		84 g
Na-N-lauril sarcosina	20%	10 ml

### Extracción de ADN

- Agregar 600µl del Buffer de extracción y adicionar 20 µl de  $\alpha$ -Amilasa (15mg/ml).
- Incubar por 1 hora a temperatura ambiente, mezclar por inversión cada 5 minutos.
- Centrifugar a 10600 rcf durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir 300µl del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5ml.
- Agregar 200µl de Fenol/cloroformo
- Mezclar por inversión.

- g)** Centrifugar a 10600 rcf durante 5 minutos a 4°C.
- h)** Transferir 200µl del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5ml.
- i)** Agregar 200µl de isopropanol.
- j)** Mezclar por inversión y colocar a 4 °C durante 1 hora.
- k)** Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4 °C.
- l)** Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de no botar los pellets.
- m)** Secar a temperatura ambiente

## **Anexo C: A Simple DNA Extraction Method for PCR Amplification from Dry Seeds of Brassica napus**

**2007 Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (7)1122-1125.**

**Referencia: Li Maoteng, Liu Jinmin, Zhangyi, Wang Pei, Gan Lu and Yu Logjiang.**

- El protocolo fue modificado resuspendiendo el ADN en 30  $\mu$ l de DNA suspension buffer (Teknova Cat# T0227) más RNase A, a una concentración final de 40 $\mu$ g/ml.

### **Materiales requeridos**

---

Balines

---

Puntas estériles

---

Canoas estériles para soluciones

---

Toallas de papel

---

Marcador Sharpie negro

---

Pinzas

---

### **Soluciones**

---

0.5 M Tris HCl pH 8.0

---

0.5 M EDTA pH 8.0

---

1 M NaCl

---

1% PVP

---

Isopropanol

---

$\alpha$ -Amilasa (15mg/ml)

---

1X TE (10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA pH8)

---

**Extracción de ADN**

- b)** Agregar 1ml del Buffer de extracción caliente (65 °C) y adicionar 20  $\mu$ l de  $\alpha$ -Amilasa (15mg/ml).
- c)** Incubar por 10 minutos a 65°C, mezclar por inversión cada 4 minutos.
- d)** Centrifugar a 13200 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- e)** Se formarán tres fases, transferir la fase acuosa aproximadamente 700 $\mu$ l a un tubo nuevo eppendorf de 1.5ml.
- f)** Agregar 2/3 de isopropanol y mezclar varias veces.
- g)** Centrifugar a 13200 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- h)** Descartar el sobrenadante.
- i)** Agregar 1ml de etanol al 70 % durante 10 minutos.
- j)** Secar a temperatura ambiente.

## **Anexo D: A high-throughput DNA extraction method from rice seeds**

**Referencia: Huabing Liang, Ya Deng, Chuntai Wang and Xin Xu.**

### **Introducción y consideraciones**

- Precaución: Manipular el cloroformo en cabina extractora de gases y después de agregarlo a las muestras continúe el protocolo dentro de ella.
- El protocolo fue modificado resuspendiendo el ADN en 30  $\mu$ l de DNA suspension buffer (Teknova Cat# T0227) más RNase A, a una concentración final de 40 $\mu$ g/ml.

### **Materiales requeridos**

---

Balines

---

Puntas estériles

---

Canoas estériles para soluciones

---

Toallas de papel

---

Marcador Sharpie negro

---

Pinzas

---

### **Soluciones**

---

200mM Tris HCl pH 8.0

---

0.5 M EDTA pH 8.0

---

2.8 M NaCl

---

4% CTAB

---

2% Laurilsulfato sódico

---

Cloroformo

5M Acetato de potasio isopropanol

Isopropanol

$\alpha$ -Amilasa (15mg/ml)

1X TE (10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA pH8)

### Extracción de ADN

- a) Agregar 150 $\mu$ l del Buffer de extracción caliente (65 °C) y adicionar 20  $\mu$ l de  $\alpha$ -Amilasa (15mg/ml).
- b) Incubar por 30 minutos a 65°C, mezclar por inversión cada 5 minutos.
- c) Centrifugar la placa a 1660 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- d) Agregar 20  $\mu$ l de cloroformo y mezclar durante 10 s.
- e) Centrifugar la placa a 1660 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- f) Agregar 20 $\mu$ l de acetato de potasio 5M y mezclar por 10 s.
- g) Centrifugar la placa a 1660 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- h) Con cuidado, transferir 100  $\mu$ l de sobrenadante a una placa de 96 pozos.
- i) Agregar 80 $\mu$ l de isopropanol y mezclar varias veces.
- j) Centrifugar la placa a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- k) Descartar el sobrenadante y agregar etanol al 70 % (v/v).
- l) Secar el sedimento por centrifugación a 17 g durante 10 s a temperatura ambiente.

## **Anexo E: Extracción de ADN de Arroz CIAT**

**Referencia: McCouch. S. R , G. Kochert, Z. H. Yu , Z. Y. Wang, G. S. Khush. W. R. Coffman y S. D. Tanksley 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76:8 15-829.**

- El protocolo fue modificado, utilizando solo el buffer de extracción y realizando el proceso según el protocolo: A. M. Risterucci et al., 2000. A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theor Appl Genet 2000 Vol 101 (948-955) modificado y adaptado para Arroz por Mathias Lorieux (2002).
- El protocolo fue modificado resuspendiendo el ADN en 30  $\mu$ l de DNA suspension buffer (Teknova Cat# T0227) más RNase A, a una concentración final de 40 $\mu$ g/ml.

### **Soluciones**

---

100 mM Tris HCl pH 8.0

50 mM EDTA pH 8.0

500 mM NaCl

SDS 1.25%

Bisulfito de sodio 0.38 g / 100 ml de Buffer de extracción

---

## Anexo F: Guía Práctica para cuantificación de ácidos nucleicos por Absorbancia usando la placa Take3TRIO y lector Synergy H1m (Biotek).

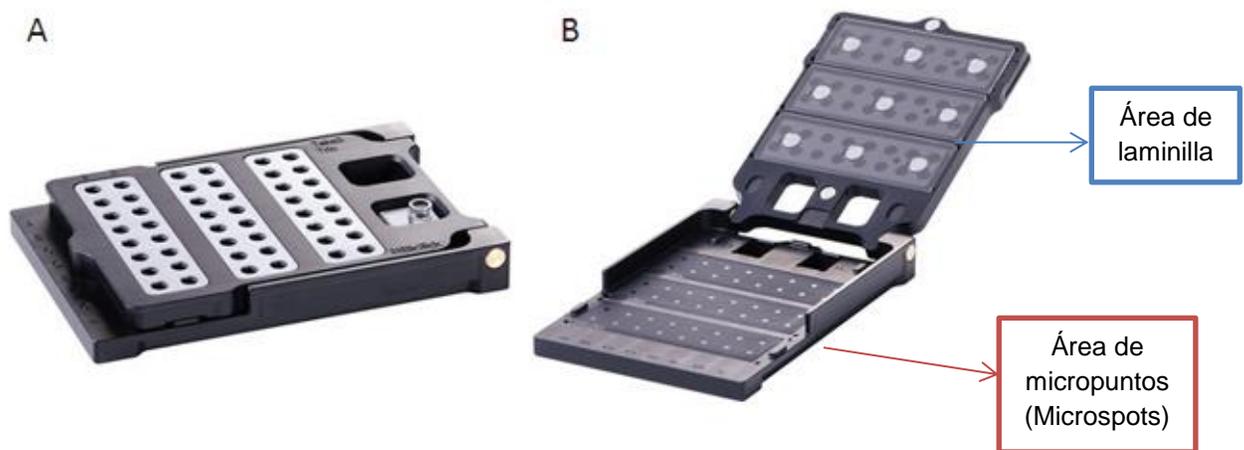
### Introducción y consideraciones.

Se recomienda este método de cuantificación de ADN para toda aplicación de marcadores moleculares excepto Secuenciación Nueva Generación (NGS).

La placa Take3 TRIO permite la cuantificación directa de ácidos nucleicos y proteínas usando un volumen de 2 $\mu$ l. Estas aplicaciones ya están programadas en el software Gen5.

La Take3TRIO tiene capacidad para albergar 48 muestras en micropuntos (Microspots)

[Figura 1A. Placa cerrada, 1B. Placa Abierta).



La placa Take3TRIO es un dispositivo de precisión. Manéjela con cuidado y delicadeza para conservar su integridad.

Mantenga la placa en su estuche cuando no esté en uso, limpia y libre de polvo.

Manipule todo con guantes **SIN** polvo.

Se recomienda organizar sus muestras en placas de 96 o microtubos de PCR, para una fácil y rápida manipulación de las muestras con micropipeta multicanal y así evitar evaporación de las mismas.

## **II- Recomendaciones para el uso correcto del Lector de placas Synergy H1m.**

**IMPORTANTE:** Mantener libre el área frente al lector Synergy H1m. No acercar fuentes de poder, ni celulares. No mover el equipo ni el computador de su sitio.

1. Verifique el funcionamiento adecuado de la UPS. El computador y el Lector Synergy H1m deben estar conectados a ella.

Encienda el computador (Usuario: Lab Genética de Yuca; Password: 2013).

2. Encienda el Synergy H1m (Botón frontal, lado izquierdo).
3. Espere a que el test de inicialización termine, es decir, cuando el equipo expulse la bandeja.

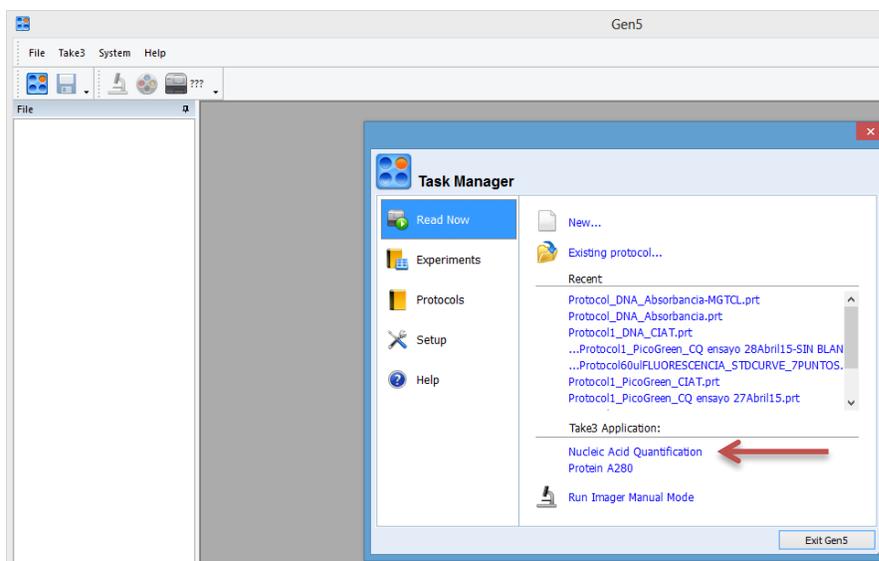
## **III. Materiales requeridos.**

Lector Synergy H1m
Placa Take3 TRIO
Kimwipes®
Agua Milli Q, estéril
Micropipeta multicanal 1-10µL y puntas
Guantes sin polvo limpios.

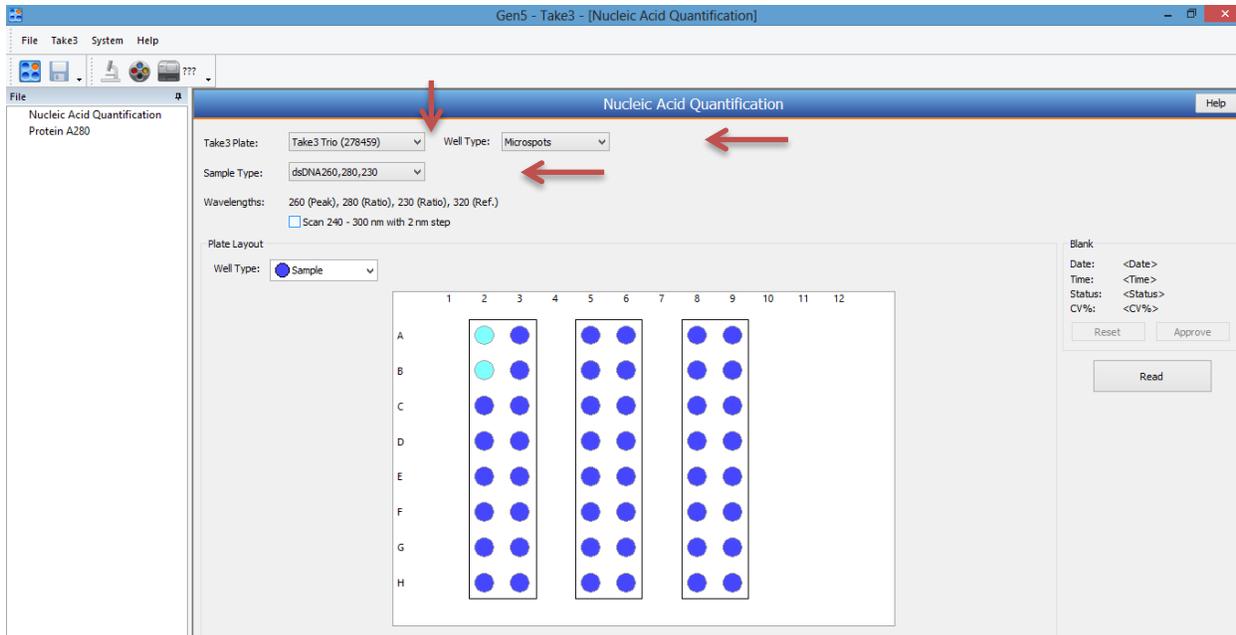
## **III. Procedimiento.**

1. Siga las recomendaciones de uso descritas en el punto II de éste protocolo.
2. Ingrese al software Gen 5. Icono ubicado en el escritorio.

3. Encienda el Lector Synergy H1m de Biotek. (Botón frontal, lado izquierdo).
4. El lector hará un test de inicialización.
5. Abra el software Gen5 (ícono en el escritorio).
6. En la ventana **Task Manager**, en la opción **Read Now**, seleccione **Take 3 applications**.
7. Seleccione la aplicación: **Nucleic Acid Quantification**.

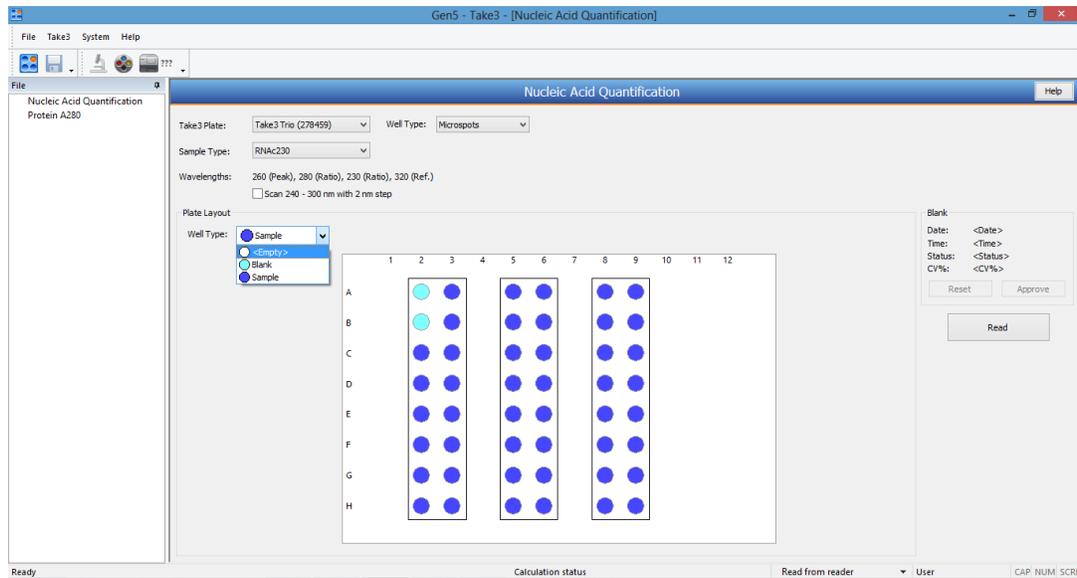


8. Verifique que estén seleccionados: la placa Take3TRIO y la opción de Microspot en Well Type.



9. Defina el tipo de muestra a cuantificar y simultáneamente verifique que se van a determinar las longitudes de onda que Usted necesita. Los tipos de muestras más comunes son: dsDNA,260,280,230 RNAc230

10. Defina la disposición de las muestras en la Placa **Take3 TRIO**, ubicando los blancos y muestras, con el “mouse”.



11. Suavemente abra la placa Take3TRIO, para acceder a los micropuntos.
12. Con pipeta multicanal, ubique 2µl de cada muestra en los micropuntos. No apoye las puntas sobre los micropuntos. Solamente las gotas deben hacer contacto con ellos (Ver Figura 2). Hágalo rápido para evitar evaporación.



**Figura 2.** Transferencia de muestras a Placa Take3, para su cuantificación

13. Cierre suavemente la Take3TRIO y proceda a hacer la lectura inmediatamente.

14. En su sesión de lectura en el software **Gen5**, Click en **Read**.
15. Ubique la posición A1 de la Take3TRIO coincidiendo con la posición A1 de la bandeja del Synergy H1m.
16. Click en **OK**.
17. Verifique que los blancos estén aprobados (**color verde**)
18. Click en **Approve** para aceptar los valores que serán exportados automáticamente a Excel.
19. Para continuar con más muestras, retire suavemente la placa Take3 TRIO del Synergy, ubíquela sobre la mesa y ábrala.
20. Con un Kimwipe nuevo, limpie suavemente, en un solo sentido, sin repasar y sin hacer presión, las áreas de los micropuntos y las laminillas de vidrio.
21. Para continuar la sesión de lectura repita desde el paso **10**.
22. Cuando termine todas las lecturas, Click en **End of Batch**.
23. Los resultados serán exportados al archivo de Excel.
24. Grabe su información en el folder **Archivos de Cuantificación Synergy H1m** ubicado en C:\Users\LAB GENETICA YUCA\Documents\.
25. Los archivos de datos se transferirán **exclusivamente** vía Internet. o en una memoria USB dedicada sólo para ese fin, que le proporcionará la persona encargada del equipo. **NO** inserte otras memorias USB en el equipo.
26. Para una limpieza final, agregue 2ul de Agua Estéril en los micropuntos, cierre la Take3TRIO, y haga una lectura para verificar que no hay residuos que afecten las mediciones siguientes. Verifique que los valores de concentración sean CERO.
27. Abra la Take3TRIO y seque como se describió en el punto **20**.

28. Apague el Lector Synergy H1m.
29. Llene el registro de uso.
30. Deje el área limpia, retire puntas, Kimwipes usados y recipientes con agua, etc.

NOTA: Acerca de la longitud de onda de referencia 320nm. La longitud de onda de referencia es usada para compensar la presencia de contaminantes en las muestras. El software Gen5, resta el resultado de la lectura a esta longitud de onda, de las lecturas a 260nm y 280nm antes de hacer los cálculos. Si la diferencia entre las lecturas, respecto a la longitud de onda de referencia excede los límites, todos los valores afectados se señalarán con amarillo en el reporte, lo cual indica contaminación en la muestra, suciedad en la misma, suciedad en la placa Take3TRIO, o demasiada concentración. Se recomienda repetir esas lecturas. Tenga en cuenta que el límite de detección por absorbancia a 260nm es de 2500ng/ $\mu$ l. Se recomienda que las muestras que excedan esos valores de cuantificación se diluyan y sean cuantificadas nuevamente.