

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Optimización de métodos para el análisis de diversidad genética  
en marcadores asociados a resistencia a *Fusarium* spp. en  
variedades de *Zea mays* autóctonas de Guatemala

**Trabajo de investigación presentado  
por Paola Waleska Aguirre Barreda  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología**

Guatemala

2016



Optimización de métodos para el análisis de diversidad genética en  
marcadores asociados a resistencia a *Fusarium* spp. en variedades de  
*Zea mays* autóctonas de Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Optimización de métodos para el análisis de diversidad genética  
en marcadores asociados a resistencia a *Fusarium* spp. en  
variedades de *Zea mays* autóctonas de Guatemala

**Trabajo de investigación presentado  
por Paola Waleska Aguirre Barreda  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología**

Guatemala

2016

Vo. Bo. :

(f)   
\_\_\_\_\_  
(Claudia Paiz)

Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_  
(Claudia Paiz)

(f)   
\_\_\_\_\_  
(PhD. Pamela Pennigton)

(f)   
\_\_\_\_\_  
(PhD. Dalia Lau)

Fecha de aprobación: Guatemala 17 noviembre de 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de investigación pudo ser realizado gracias a la colaboración y apoyo del Centro de Estudios en Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala, el departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala y el Instituto de investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas de la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala. Principalmente al apoyo, consejo y asesoría incondicional de PhD. Pamela Pennington, Claudia Paiz y Julien Assali.

Debo agradecer principalmente a mis padres, por el apoyo financiero y emocional durante los años de mi carrera universitaria, sin ellos no hubiera podido alcanzar este logro académico. A mi hermano que me brindó su apoyo, me escuchó y sin su ayuda no hubiera podido llegar a la universidad. A mi familia y amigos, por darme ánimos en momentos de estrés, escuchar y discutir mis ideas sin importar la hora en la que necesitaba desahogarme.

Agradezco a Dios por darme la vida y curiosidad científica, de esta forma me pude enfocar en esta carrera la cual me llenó de conocimientos y satisfacción. Además de permitirme estar rodeada de familiares, maestros y amigos que me apoyan de forma incondicional.

# ÍNDICE

Listado de cuadros .....	vii
Listado de figuras .....	viii
Sinopsis .....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS .....	2
III. JUSTIFICACIÓN .....	3
IV. MARCO TEÓRICO .....	4
A. Uso de maíz en Guatemala .....	4
B. Industria de maíz.....	6
C. Contaminación fúngica del maíz .....	7
D. <i>Fusarium</i> .....	8
E. Epidemiología en Guatemala.....	13
F. Resistencia de maíz a <i>Fusarium</i> .....	14
G. Métodos moleculares .....	17
V. METODOLOGÍA .....	22
1.Procedimiento .....	22
VI. RESULTADOS .....	30
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	43
VIII. CONCLUSIONES .....	50
IX. RECOMENDACIONES .....	51
X. REFERENCIAS .....	52
XI. ANEXOS.....	56

## LISTADO DE CUADROS

1.	Clasificación botánica de maíz	5
2.	Polimorfismo de único nucleótido asociado a resistencia a Fusarium	15
3.	Componentes PCR punto final	26
4.	Componentes para ciclo-secuenciación	28
5.	Iniciadores diseñados y características	30
6.	Promedio de concentraciones y pureza con Edwards y Chabi	32
7.	Promedio de concentraciones y pureza	32
8.	Resultado optimización PCR	35
9.	Soluciones problemas	35

## LISTADO DE FIGURAS

1.	Producción mundial de maíz 2013/2014	7
2.	Ciclo de vida e infección de <i>Fusarium</i> spp. en cultivos	9
3.	Síntomas de mazorcas de maíz infectadas con <i>Fusarium moniliforme</i>	10
4.	Estructura de Fumonisinas pertenecientes al grupo B	12
5.	Mapa de Guatemala con la concentración media de Aflatoxinas y Fumonisinas por departamento	14
6.	Principio de ciclo-secuenciación	21
7.	Alineamiento de iniciadores en la secuencia de interés	31
8.	Verificación de la extracción con gel de agarosa 1% de muestras hojas de maíz	33
9.	Verificación de la extracción con gel de agarosa 1% de muestras semillas de maíz	34
10.	Gel de agarosa 2% productos de PCR para SNP 1	36
11.	Gel de agarosa 2% productos de PCR para SNP 1	37
12.	Gel de agarosa 2% productos de PCR para SNP 1	37
13.	Gel de agarosa 2% productos de PCR para SNP 3	38
14.	Gel de agarosa 2% productos de PCR para SNP 3	39
15.	Gel de agarosa 2% productos de PCR para SNP 3	39
16.	Electroferogramas de bandas purificadas no muestran la presencia del polimorfismo 1	40
17.	Electroferogramas de bandas purificadas no muestran la presencia del polimorfismo 3	42

## SINOPSIS

El maíz en Guatemala presenta altos niveles de contaminación por diversos hongos, entre ellos *Fusarium* y *Aspergillus*. Estos producen toxinas, fumonisinas y aflatoxinas las cuales son dañinas para la salud. El objetivo de esta investigación fue optimizar los métodos para analizar la diversidad genética de las variedades de maíz guatemalteco respecto a su resistencia a *Fusarium* spp. Se implementaron pruebas moleculares para identificar la presencia de polimorfismos de único nucleótido en tres loci diferentes del genoma de maíz, previamente asociados a resistencia al hongo. Se evaluó una metodología adecuada para la extracción de ADN de semillas y de hojas, se diseñaron iniciadores para las regiones con el SNP (polimorfismos de único nucleótido) de interés y por último se optimizaron las condiciones correctas para amplificar muestras de hojas de maíz. Como conclusión dos de los juegos de iniciadores (8481-2 y 8475-6) diseñados amplificaron ADN de hojas de maíz, mostrando diferencia de alelos en maíz de Guatemala. Esto sería el primer paso para determinar las variedades autóctonas de Guatemala con potencial de resistencia a este hongo para usarlo como estrategia para disminuir la infección del maíz con *Fusarium* y fumonisinas en Guatemala.

# I. INTRODUCCIÓN

Los hongos son los principales causantes de pérdidas de cultivos alimenticios. La especie *Fusarium verticillioides* se encuentra frecuentemente en el maíz siendo el hongo principal que afecta la producción del mismo en todo el mundo. Estos hongos son capaces de causar enfermedades en la plántula, putrefacción de la raíz y del tallo, pudrición de la mazorca, también puede afectar el grano almacenado (Munkvold y Desjardins, 1997).

El hongo *Fusarium* produce fumonisinas, las cuales se han relacionado con la inactivación de la enzima ceramida sintasa en la síntesis de esfingolípidos. La Fumonisina B1 ha sido identificada como posible cancerígeno en humanos, además de ser uno de los posibles causantes de defectos de nacimiento del tubo neural (Marasas *et al.*, 2004)(Jackson y Jablonski, 2004).

El objetivo de este estudio consiste en optimizar los métodos para analizar la diversidad genética de las variedades de maíz guatemalteco respecto a regiones génicas asociadas a resistencia a *Fusarium* spp. De esta forma se buscan estrategias para el control de *Fusarium* y fumonisinas en el consumo y cultivo de maíz en Guatemala mediante la selección de variedades con potencial resistencia.

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general:

Optimizar métodos de extracción y reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para analizar variedades de maíz autóctonas de Guatemala respecto a polimorfismos de un nucleótido, (SNP, por sus siglas en inglés) que se han asociado con resistencia a *Fusarium*.

### B. Objetivos específicos:

1. Diseñar iniciadores específicos para tres SNP asociados a resistencia a *Fusarium spp.* en maíz.
2. Estandarizar pruebas moleculares para la detección de tres SNP en hojas y semillas de maíz por medio de PCR punto final.
3. Realizar pruebas moleculares que permitan caracterizar polimorfismos en los marcadores seleccionados, en variedades de maíz autóctonas de Guatemala.

### III. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del maíz por *Fusarium spp.* es un problema de gran relevancia al ser este uno de los principales granos cosechados a nivel mundial. Las fumonisinas se han asociado como posibles causantes de defectos del tubo neural y como posibles cancerígenos en humanos (Marasas, 2004). Estas son producidas por *Fusarium spp.*, un hongo que está catalogado como uno de los principales contaminantes de cultivo de maíz. No se han encontrado estrategias óptimas para controlar este hongo, lo cual es un problema que afecta a los guatemaltecos ya que para la mayoría su dieta se basa principalmente en maíz y sus derivados. Las fumonisinas afectan principalmente poblaciones vulnerables ya que estas cultivan su propio maíz, y su consumo se duplica mientras sus ingresos económicos disminuyen (Torres, *et al.* 2007), la falta de ingresos interfiere con los cuidados post-cosecha lo cual puede aumentar la presencia de insectos que daña el maíz y aumento en la producción de toxinas. Este proyecto consiste en la optimización de métodos de extracción de ADN de hojas y semillas de maíz de Sololá donadas por la Dra. Silvana Masselli, y Huehuetenango donadas por Lic. Víctor Jiménez. Además de optimizar un PCR para analizar cultivos autóctonos con polimorfismos de único nucleótido relacionado a la resistencia a *Fusarium*, lo cual permitirá generar información y estrategias de mejoramiento genético para agricultores e investigadores para disminuir *Fusarium* y las fumonisinas en los cultivos guatemaltecos.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. Uso de maíz en Guatemala

El maíz se ha considerado uno de los granos de alta importancia en Guatemala desde que se convirtió en el principal sustento entre las culturas de origen maya, este cultivo incluso es descrito en el *Popol Vuh*, libro sagrado de los K'ich's escrito en los años 1700. En el año 2014, el MAGA (Ministerio de agricultura, ganadería y alimentación) reportó una cosecha entre 38-40 millones de quintales de maíz en el territorio guatemalteco. Sin embargo, esta no cubrió las necesidades de la población ya que parte del cultivo se ve afectada negativamente por el clima y contaminantes. El consumo *per cápita* de maíz al año es de 114kg, este puede variar, mientras menor es el ingreso económico mayor es su consumo (Roberto y López, 2002).

1. Origen y variedades. El cultivo de maíz se reportó por primera vez cuando Cristóbal Colón lo vio en Cuba en 1492. En diversos estudios se ha planteado que Mesoamérica es el origen del maíz, entre los años 8,000-600 A.C. Según McBryde y colegas en 1945, plantearon que en el occidente de Guatemala surgieron las variedades de maíz empleadas en Centroamérica, Norteamérica, partes bajas de Suramérica y en ciertas regiones del occidente. Se han identificado 13 razas y 12 sub-razas en Guatemala (FAO e IPGRI, 2001).

Han surgido diversas teorías sobre el origen del maíz, la primera consiste en maíz silvestre, la segunda en teocintle silvestre y la tercera en un antepasado desconocido. Conforme avanzan los estudios se ha cambiado la postura científica más fuerte hacia dichas teorías (Acosta, 2009).

Actualmente existen varias investigaciones respecto al tema, sin embargo México es quien se conoce como el centro principal de la diversidad genética del maíz. En México se han encontrado 50 razas, siete son homólogas en Guatemala, seis en Colombia, cinco en Perú y dos en Brasil (Acosta, 2009). El genoma del maíz B73, la variedad más común en Estados Unidos, fue secuenciado en 2009 este es muy complejo ya que posee más de 32mil genes y 10 cromosomas, es importante mencionar que casi el 85% del genoma está compuesto por elementos de transposición (Schnable, *et al.*, 2009).

**Cuadro 1.** Clasificación botánica de maíz.

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Monocotiledoneae
Grupo	Glumiflora
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Panicodeae
Tribu	Maydeae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i>

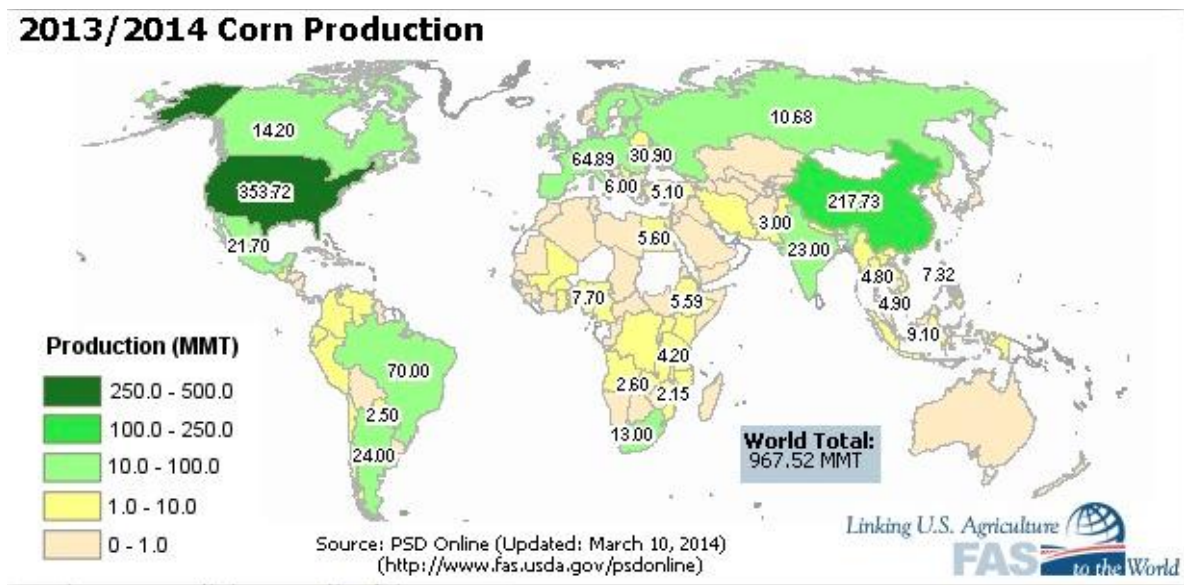
(Acosta, 2009) (ITIS, 2016)

2. Importancia social. El maíz es uno de los granos más antiguos conocidos por el ser humano, su importancia radica en el consumo para humanos y animales. El 64% de la producción mundial es destinada para el alimento en animales y el 19% es destinado para la alimentación humana, además este grano puede ser usado como material en la producción de bioetanol (Kim, 2004). El consumo de altas cantidades de maíz se ve reflejado con el poder adquisitivo de las comunidades, este al ser menor mayor es el consumo de maíz. Las pérdidas globales pueden llegar a ser del 5% anualmente, sin embargo en la región Centroamericana las pérdidas son de 9% (Kim, 2004). Las principales causas de las pérdidas económicas en productos alimenticios se dan por; la pérdida de rendimiento de cultivos por enfermedades causadas por hongos, contaminación de micotoxinas en cultivos y en producción de animales y por último, costos en la salud humana (Schmale y Munkvold, 2014). Varias especies de hongos patogénicos producen micotoxinas, como las aflatoxinas y fumonisinas. Las micotoxinas causan enfermedades humanas, por lo cual la contaminación por hongos patogénicos del maíz tiene una alta importancia a nivel económico y social en Guatemala (Torres, *et al.* 2015).

## **B. Industria de maíz**

En el año 1999, la FAO reporta que el cultivo de maíz global abarca más de 140 millones de hectáreas siendo este cultivado en 66 diversos países. En el año 2002 algunos reportes indican que Guatemala tuvo un rendimiento de 1.77t/ha (toneladas por hectárea) la cual no aumentó significativamente en la producción 2013/2014 como se puede observar en la Figura 1, Guatemala tuvo una producción de 1.0-10MMT (miles de millones de toneladas) . La demanda del maíz ha aumentado mundialmente, de esta forma su precio se ha ido triplicando en los últimos años (Roberto y López, 2002).

**Figura 1.** Producción mundial de maíz 2013/2014



(USDA, 2014)

### C. Contaminación fúngica del maíz

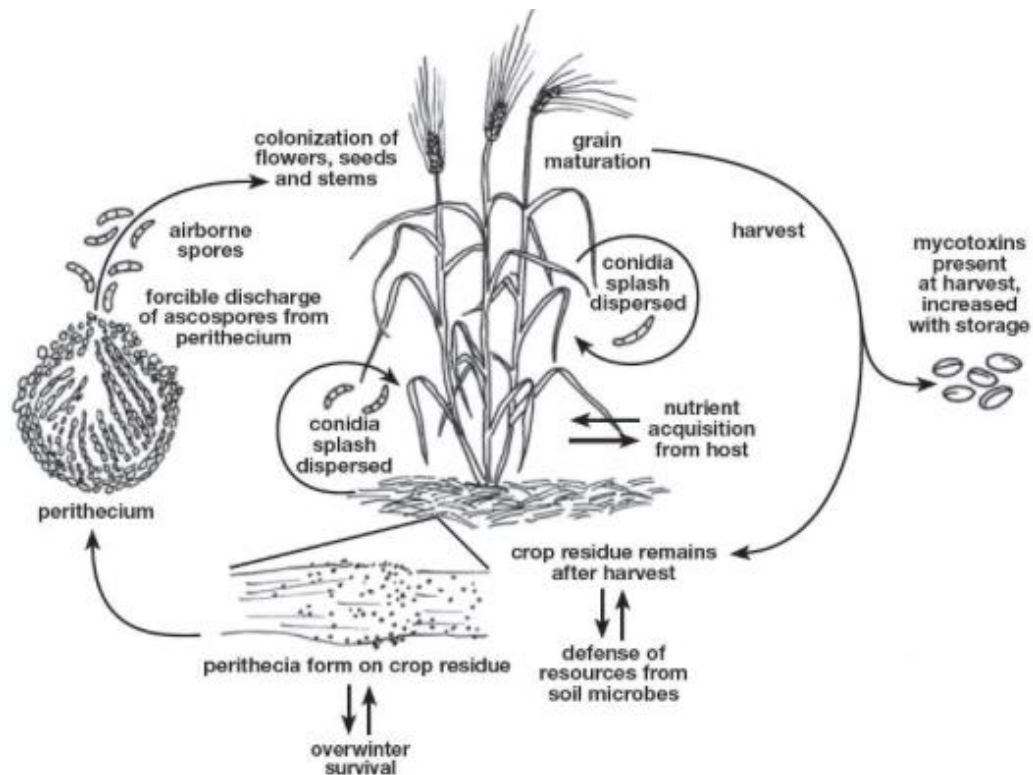
Los hongos son de los principales contaminantes en la industria de alimentos, esto se debe a sus diversos reservorios y la adaptación de esporas para poder diseminarse en el aire (Valdes, 2007). Se han reportado pérdidas de 14-80% en cultivo de maíz debido a contaminación de diferentes hongos. Entre los principales organismos que pueden llegar a ocasionar estas pérdidas económicas son *Fusarium spp.*, *Diplodia spp.*, *Gibellera spp.*, *Aspergillus spp.* (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

## D. Fusarium

1. Características biológicas. El género *Fusarium* es un género anamórfico (asexual), el cual es clasificado como un Ascomiceto del orden Hypocreales (Guarro, 2011). Este es un tipo de hongo que presenta diferentes formas de reproducción lo cual ha causado dificultades en su clasificación taxonómica (Guarro, 2011). Su clasificación taxonómica ha sido problemática debido a la presencia de una fase sexual, la cual es llamada teleomorfo o *Gibberella moniliformis* (Torre-hernández *et al.*, 2014). Como propuesta a la solución de este problema, el investigador O'Donnell y sus colaboradores establecieron una nomenclatura basada en la secuenciación de 3 genes: *EF-1 $\alpha$* , *RPB1* y *RPB2*.

En la Figura 2 se muestra el ciclo de vida e infección de *Fusarium* spp. en cultivos. El grano al ser cosechado posee micotoxinas la cuales incrementan en la etapa de almacenamiento. En la planta madura, los conidios pueden dispersar al hongo en las plantas y en el suelo del cultivo. En el suelo y residuos del cultivo se forman peritecios que sobreviven al clima frío, este al madurar dispersa esporas y coloniza flores, semillas y tallos (Robson, 2015).

**Figura 2.** Ciclo de vida e infección de *Fusarium spp.* en cultivos



(Robson, 2015)

2. Patogénesis por infección de *Fusarium*. La especie *Fusarium verticillioides* se encuentra frecuentemente en el maíz, siendo el hongo principal que afecta la producción del mismo en todo el mundo. Estos hongos son capaces de causar enfermedades en la plántula, putrefacción de la raíz y del tallo, pudrición de la mazorca, también puede afectar el grano almacenado (Munkvold y Desjardins, 1997).

Este hongo infecta diferentes tejidos de *Zea mays*, causando descomposición en tejidos como raíz, tallo y mazorca. El hongo cuenta con diferentes estrategias de infección; una de ellas es la infección sistémica de plántulas, esto sucede desde que la semilla entra en proceso de germinación, el hongo es capaz de ingresar al tejido epidérmico de la raíz tres

días después. Otro método es por medio del estigma, cuando las conidias llegan al estigma por medio de lluvia o de vectores, como el gusano elotero (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Los cultivos de maíz infectados por *Fusarium*, pueden presentar síntomas como pudrición en raíz, tallo y mazorcas. Además de mostrar el crecimiento del micelio en las mazorcas de forma blanca como se muestra en la Figura 3.

**Figura 3.** Síntomas de mazorcas de maíz infectadas con *Fusarium moniliforme*

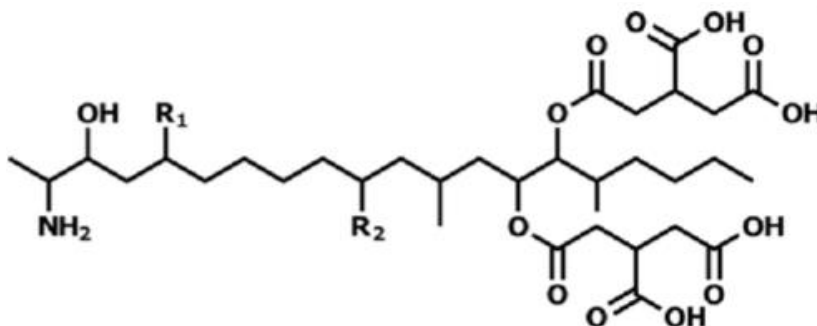


(Munkvold y Desjardins, 1997)

a. Toxinas de *Fusarium*. La especie *Fusarium* puede producir diversas micotoxinas, entre ellas ácido fusárico, fusarina C, naftoquinonas, moniliformina y fumonisinas. Las fumonisinas fueron descritas en 1988 por Gelderblom y compañeros, debido a sus estudios para determinar el agente causante de la leucoencefalomalacia equina. Las fumonisinas son la clase más numerosa de micotoxinas que contaminan principalmente al maíz y son producidas mayormente por *F. moniliforme* y *F. proliferatum*, durante el cultivo y almacenamiento de este grano (Torres y López, 2010). Hay más de 60 moléculas relacionadas con la fumonisina, pero el más grande son las pertenecientes al grupo B (Torre-hernández *et al.*, 2014).

En la Figura 4, se muestra la estructura química de las fumonisinas B, se basa en un esqueleto de 20 carbonos lineales, las variedades pueden diferir por la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en C-5 y C-10. Entre estas, la B<sub>1</sub> es la más abundante, por lo tanto ha sido ampliamente estudiada. Diversos estudios muestran la asociación de fumonisinas con toxicidad y carcinogenicidad en ratas, lesiones necróticas en el cerebro, carcinomas, edema pulmonar porcino, hepatotoxicidad, hepatocarcinomas y efectos inmunosupresivos (Haschek, *et al.*, 1992; Osweiler, *et al.* 1992; Gelderblom, *et al.*, 1991). Estos estudios revelan el efecto negativo de micotoxinas de *Fusarium* en caballos, mulas, gallinas, cerdos, ratas, conejos y ovejas (Munkvold y Desjardins, 1997; Segvic y Pepeljnak, 2001).

**Figura 4.** Estructura de Fumonisinias pertenecientes al grupo B



	R1	R2
Fumonisina B1	OH	OH
Fumonisina B2	OH	H
Fumonisina B3	H	OH

(Torre-Hernández, *et al.*, 2014)

b. Fumonisinias y salud humana. Las fumonisinias tienen un mecanismo el cual consiste en la inactivación de la enzima ceramida sintasa en la síntesis de esfingolípidos. Los esfingolípidos son unidades estructurales de alta importancia en la membrana y en diversas funciones celulares. La inhibición de la enzima provoca la acumulación intracelular de esfinganina. Este aumento de concentración puede causar crecimiento anormal celular y citotoxicidad (Riley, *et al.* 1996). La inhibición es causada por la similitud estructural de las fumonisinias con co-sustratos de la enzima. La acumulación de esfinganina se ha usado como un biomarcador a la exposición de estas micotoxinas (Marasas, 2004).

La Fumonisina B1 ha sido identificada como posible cancerígeno en humanos, además de ser uno de los posibles causantes de defectos de nacimiento del tubo neural (Marasas *et al.*, 2004)(Jackson y Jablonski, 2004). En un estudio realizado en ratones el 79% de los fetos presentaban defectos en el tubo neural cuando las madres fueron administradas con Fb1 durante el período de gestación (Gelineau-Van *et al.*, 2005). Es importante resaltar que el consumo de maíz contaminado con Fumonisinias está

relacionado epidemiológicamente con cáncer de esófago en el Sur de África y China (Madania, *et al.* 2013). En Guatemala las poblaciones susceptibles son aquellas que poseen una dieta alta en maíz y sus derivados (O. A. Torres *et al.*, 2007).

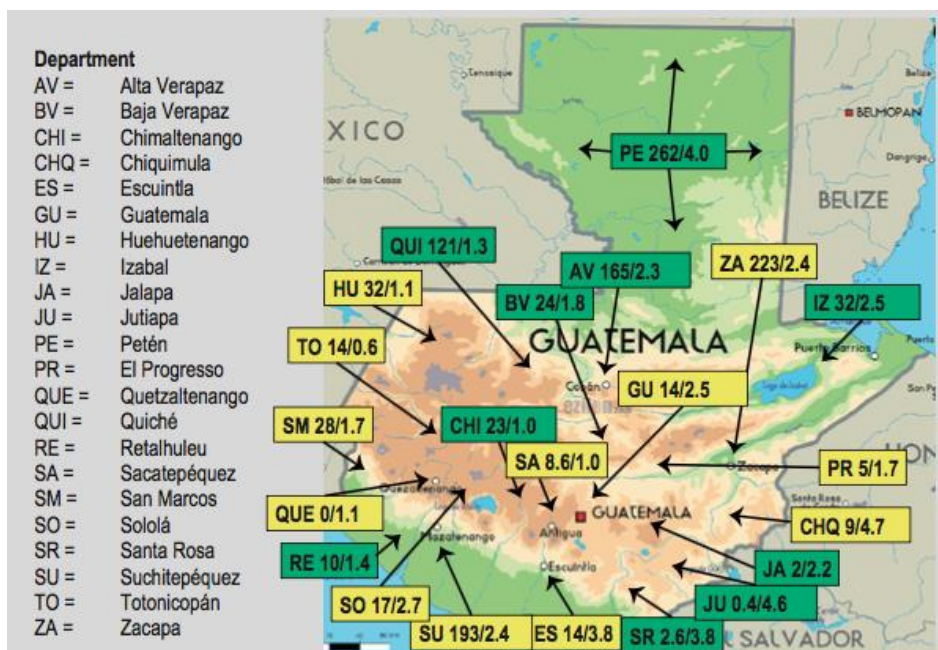
### **E. Epidemiología en Guatemala**

Guatemala es un país en el cual el componente principal de la dieta consiste en maíz y tortillas. Por lo tanto, la ingesta de fumonisinas puede incrementar, esto se ha visto relacionado con la alta incidencia de defecto de tubo neural en Guatemala, la cual es de 6 a 10 veces mayor que en el promedio mundial (Gelineau-Van, 2009; Marasas, 2004).

Un problema de gran importancia en Guatemala es la ingesta de no solo fumonisinas sino aflatoxinas. La Fb1 puede llegar a modular los efectos hepatotóxicos y hepato-cancerígenos en AFB1 (Torres *et al.*, 2015). Se han realizado estudios en donde se da estos efectos hepato-cancerígenos por la ingesta de ambas toxinas en ratas de laboratorio. Estos estudios son importantes para llevarlos a cabo ya que Guatemala posee la mayor incidencia y segunda prevalencia en carcinoma hepato-celular humano en hombres (Torres *et al.*, 2015).

Diversos estudios se están realizando mundialmente ya que el maíz al ser uno de los principales granos cosechados para consumo humano y animal al estar contaminado produce pérdidas económicas muy elevadas. En la Figura 4 se muestra un mapa de Guatemala indicado con la media de aflatoxinas (ug/kg) y fumonisinas (mg/kg) por departamento realizado por Torres y sus colegas en el año 2015. El mapa muestra en color amarillo los departamentos que no producen suficiente maíz para el consumo interno, como es el caso de Huehuetenango y Sololá. Por otro lado, en color verde están indicados los departamentos que tienen suficiente maíz para el consumo interno y distribución a otras áreas geográficas. La Figura 5 indica que hay más fumonisinas en tierras bajas, esto tiene relación con las condiciones ambientales ya que en esta región la temperatura es más alta con mayor humedad, propiciando las condiciones de crecimiento de hongos.

**Figura 5.** Mapa de Guatemala con la concentración media de Aflatoxinas y Fumonisinias nor departamento



(Torres, 2015)

## F. Resistencia de maíz a *Fusarium*

En el año 2013 Zila y colaboradores realizaron un estudio en el cual se deseaba encontrar la presencia de SNPs (polimorfismo de único nucleótido o como sus siglas en inglés, *single nucleotide polymorphism*) asociado a la resistencia a *Fusarium*. Un polimorfismo de único nucleótido sirve como marcador molecular para realizar diversos estudios en el área de biología molecular. Estos se definen como el cambio de una base en la secuencia de ADN la cual está presente en al menos 1% de la población estudiada. Los polimorfismos de únicos nucleótidos se pueden estudiar por secuenciación, PCR, SSCP (polimorfismo de conformación de única hebra), entre otras (Gasser, *et al.* 2007).

El estudio realizado por Zila y sus colaboradores fue de asociación de todo el genoma usando 279 líneas con genotipos conocidos en dos ambientes, Carolina del Norte, Estados Unidos y Galicia, España. Las plantas fueron inoculadas con *Fusarium verticilloides*, las

cuales fueron posteriormente clasificadas por los síntomas encontrados. Los resultados de los análisis de asociación fueron estimados para cada subpoblación usando la frecuencia de alelos que reduce la enfermedad en maíz con la presencia de ciertos SNPs.

El Cuadro 2 muestra los polimorfismos publicados por Zila los cuales se han asociado a la resistencia a *Fusarium*. El SNP ubicado en el cromosoma 1 se encuentra en una región codificante con función desconocida. En el caso del SNP del cromosoma 5 se encuentra más cercano a un gen HSP60, el cual tiene niveles de expresión mayores cuando se desarrolla el endospermo después de 12 días de la floración, HSP60 son proteínas chaperonas que se encargan del plegamiento proteínico en mitocondria y cloroplastos cuando la planta esto bajo estrés. El SNP del cromosoma 9 está en la región codificante de un gen de la familia de celulosa sintasa, su expresión aumenta en el endospermo durante el desarrollo de la semilla después de 20-24 días de la floración. Los genes de esta familia codifican para polisacáridos que se encuentran en la matriz de la pared celular. Es posible que estos polisacáridos tengan un papel importante en la muerte celular programada relacionada con interacciones patógeno-hospedero. Por lo que la estructura de la pared celular y la muerte programada pueden tener un rol importante en la resistencia hacia una enfermedad.

**Cuadro 2.** Polimorfismo de único nucleótido asociado a resistencia a *Fusarium*.

SNP	Cromosoma	Posición, pb	Alelo	Función
1	1	63,540,590	A	Desconocida (Cerca de HSP60)
2	5	30,997,717	G	Desconocida (Cerca de HSP60)
3	9	151,295,233	A	Familia celulosa sintasa

\*HSP60= Proteína de 60kDa de choque térmico

(Zila, *et al.*, 2013)

En el año 2014, Zila y colaboradores realizaron un estudio de asociación de genomas en líneas puras en plantas de Estados Unidos y se encontraron 7 SNPs asociados a la resistencia de *F. verticilloides*. Ninguno de estos polimorfismos son los mismos reportados el artículo de Zila 2013. Los SNPs fueron encontrados en el cromosoma 5, 9 y cinco en el cromosoma 4. La asociación más cercana entre ambos estudios es el SNP encontrado en el cromosoma 5 que se encuentra en el mismo grupo genómico pero con una distancia física de 34Mpb. La importancia de este tipo de estudios radica en realizar líneas de mejoramiento de variedades de maíz con la presencia de estos polimorfismos. Actualmente se conoce muy poco sobre los genes involucrados en la resistencia a la infección del maíz por *Fusarium* spp.,

El hongo *Fusarium* aún no ha podido ser totalmente controlado por fungicidas, diversas técnicas de cultivo ni existe una variedad totalmente resistente al hongo (Yates, *et al.* 2003). El control del hongo por medio de reactivos químicos o técnicas agronómicas modernas pueden elevar el costo de producción y no resultan totalmente efectivas (Yates, *et al.*, 2003). Se han realizado estudios para alcanzar una variedad genética resistente, pero un factor limitante es el efecto del medio ambiente sobre el crecimiento del maíz y de *Fusarium*.

Diversos estudios se han realizado con poblaciones biparentales para encontrar *loci* de rasgos cuantitativos (QTL o como sus siglas en inglés, *quantitive trait loci*) pero estos no tienen efectos de resistencia significativos ni son consistentes entre poblaciones. La realización de más estudios sobre mejoramientos de líneas genéticas pueden conllevar a un QTL consistente entre varias poblaciones para la resistencia de *Fusarium* y el control de la concentración de fumonisinas en el maíz (Lanubile, *et al.* 2014).

## G. Métodos moleculares

1. Extracción ADN. La extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) es un paso crítico en investigaciones de biología molecular. La extracción de ácidos nucleicos en diferentes organismos, requiere de diferentes cuidados. En el caso de trabajar con plantas se debe tener cuidado en el proceso de la lisis celular, por la presencia de pared celular se deben usar detergentes fuertes. Cabe mencionar que se debe tener una buena purificación, ya que las plantas almacenan sales en su tejido (Falcón y Valera, 2007).

El procedimiento usualmente empleado en una extracción es el relatado por Doyle y Doyle en 1990. Este ha demostrado brindar en diferentes estudios altas concentraciones de ADN íntegro. Sin embargo, al trabajar con reactivos como solución amortiguadora de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, conocido como CTAB, sarcosil, cloroformo, resulta siendo un procedimiento más caro y dañino para la salud del investigador y para el medio ambiente. Por lo tanto para esta investigación, se utilizará la extracción de Edwards *et al.* (1991).

La extracción seleccionada ha sido utilizada exitosamente en sinfín de ocasiones, como se evidencia por la cantidad de veces que el artículo original ha sido citado (más de 2200 veces en abril del 2016). La simplicidad y eficiencia de este protocolo lo hace idóneo para reducir costos en cuanto a kits comerciales de extracción se refiere. Una de las virtudes más grandes de este protocolo es la manera de muestrear el tejido vegetal para la extracción.

Para el muestreo, el protocolo utiliza un tubo Eppendorf estéril de 1.5mL, con el cual se masca el tejido vegetal (generalmente una hoja previamente desinfectada). Esto garantiza que todas las muestras de tejido serán del mismo tamaño. A su vez, este tipo de muestreo también reduce la posibilidad de contaminación con utensilios como tijeras,

cuchillos, guantes o manos, en que se podría incurrir con facilidad al manipular la muestra de otra manera.

La extracción en sí depende mayoritariamente de la solución amortiguadora de extracción que se utiliza. Este contiene concentraciones de Tris-HCl, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y SDS (dodecilsulfato sódico). Estos tres agentes son primordiales para la correcta extracción del material genético. El primero de ellos, Tris-HCl, funciona como tamponador para que el pH sea óptimo para la extracción y también ayuda a permeabilizar las membranas exteriores de la célula al interactuar con los lipopolisacáridos externos. Esta interacción se potencializa con la presencia de EDTA, puesto que éste funcionará como un agente quelante de iones metálicos, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , acción que desestabilizará la célula aún más, liberando los contenidos interiores.

El detergente SDS se usa para terminar de permeabilizar las membranas celulares, liberando los contenidos intracelulares. Finalmente, el último elemento de esta solución es NaCl, el cual funciona como un agente que cargará negativamente el ADN, permitiendo que las moléculas de ADN se agreguen, haciendo más exitosa la extracción. Tras esto, una serie de centrifugaciones y purificaciones con isopropanol para precipitar el ADN de la muestra son necesarios para finalizar la extracción (Maniantis, 1982). Si la extracción es exitosa, el ADN genómico obtenido es estable a  $4^{\circ}\text{C}$  por más de un año.

a. Verificación extracción. La verificación del éxito o no de una extracción es clave en un protocolo como el que se presenta aquí, puesto que determina si se puede avanzar el mismo, o no. También, esta verificación permite realizar cálculos acerca de cuanto ADN solubilizado utilizar en PCRs posteriores.

La verificación inicia con la realización de un gel de integridad. Este consiste en un gel de agarosa 1% teñido con Gel Red. A este gel se le agregan 3µL de ADN y 1µL de amortiguador de corrida. El propósito de este gel es observar bandas íntegras. En este gel también se puede saber si el ADN tiene muchas impurezas, que se verán como barridos. Estas marcas pueden indicar que el ADN extraído ha sido digerido por ADNasas que no fueron inactivadas en la extracción.

Si el gel de integridad muestra bandas claras y del tamaño esperado, es prudente proceder con una lectura de pureza en espectrofotometría UV. Para esta segunda corroboración se utilizará un biofotómetro que lee en ondas de 260nm, 280nm y 320nm. La razón entre estas lecturas (260/280) dictan un coeficiente de contaminación por proteínas (en su mayoría aminoácidos aromáticos) en la muestra. El rango de pureza para una muestra adecuada es de 1.7-2.0 (Promega, 2016). La ecuación para determinar la pureza es:

$$\text{Pureza ADN (A260/A280)} = (A260 - A320) \div (A280 - A320)$$

Estas lecturas en UV también permiten cuantificar el ADN obtenido en la extracción. Para poder realizar este cálculo, se usa la ecuación:

$$\text{ADN}(\mu\text{g/mL}) = (A260 - A320) * \text{factor de dilución} * 50\mu\text{g/mL}$$

Tomando en cuenta la relación para  $A_{260}=1$ , y con un paso de luz = 10 mm la concentración para ADN es de 50µg/mL (Promega, 2016). Se puede usar la anterior ecuación para calcular la cantidad de ADN con el que se cuenta. Este cálculo, tomando en cuenta las estimaciones de pureza, se puede usar para calcular la cantidad de ADN necesario como plantilla inicial en una PCR.

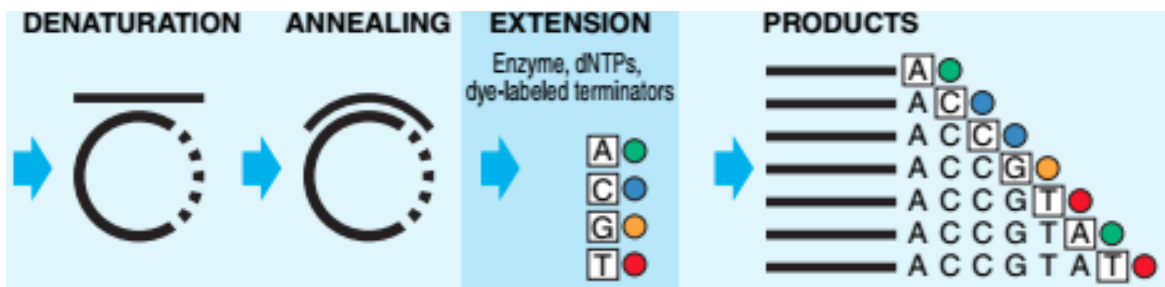
2. Reacción en cadena de la polimerasa PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica empleada para amplificar una región de interés de una muestra de ADN. Esta reacción se da en tres etapas principales; desnaturalización (separación de las hebras de ADN a 95°C), anillamiento (unión de los iniciadores para indicar la sección de interés se da en el rango de temperatura de 55-70°C) y extensión, en este último paso la polimerasa inserta los nucleótidos formando el molde y elongando la región blanco (Cortazar y Silva, 2004). Todo este proceso es posible por la alta tolerancia de la *Taq* polimerasa a alta temperatura.

Para poder llevar a cabo un PCR de forma exitosa se debe emplear un “master mix”. El master mix se compone de: dNTPS (nucleótidos fosforilados), *Taq* polimerasa, *buffer* o solución amortiguadora o tamponador, *primers* o iniciadores y aditivos. La *Taq* polimerasa es una enzima aislada de una bacteria *Thermus aquaticus*, esta es la encargada de polimerizar los dNTPS a nuestra muestra de ADN. Los iniciadores son uno de los componentes principales en el PCR, estos son los cebadores que se unen a la región de interés y le indican a la polimerasa donde debe actuar. El uso inadecuado de iniciadores puede llevar a formar *hairpins*, homodímeros y heterodímeros. Esto implica que los iniciadores actúan sobre ellos mismos y no con la plantilla de ADN (Gilbert, 2005).

Para poder observar y analizar los resultados de un PCR se emplea la técnica de electroforesis. Esta es una técnica empleada en la separación de moléculas usando un campo eléctrico. Esto depende de la carga y de la masa de la molécula. Cabe mencionar que las moléculas más pequeñas migran más rápido. En la electroforesis (Lodis, *et al.* 2005). En el gel se emplean escaleras, estas son marcadores que poseen fragmentos de ADN con tamaños conocidos, esto permite comparar la escalera con las bandas obtenidas con la muestra experimental. Los tamaños que pueden poseer estas escaleras para PCR son de 100pb a 10kb (Novegem, 2008). Para observar las bandas en una electroforesis, se puede emplear el reactivo de GelRed. Este es un colorante seguro para el medio ambiente, además es muy sensible y puede teñir ácidos nucleicos (GENEON, 2013).

3. Secuenciación de Sanger. La secuenciación de Sanger también conocida como terminadores en cadena, se basa en la capacidad de la polimerasa de unir dideoxynucleótidos, estos se caracterizan por no tener el grupo 3'-hidroxilo el cual es importante en la formación del enlace fosfodiéster. De esta forma estos nucleótidos actúan como terminadores en la reacción en cada paso de la extensión de la cadena. Cada dideoxynucleótidos (A, C, G o T) están marcados con fluoróforos específicos de esta forma el equipo puede medir la emisión de cada uno. La lectura se realiza por electroforesis capilar, en la cual se aplica un campo eléctrico para la migración de fragmentos, la velocidad en que salen los productos depende del tamaño del mismo, de esta forma se puede tener resolución de productos de una sola base (Applied Biosystems, 2009). En la Figura 7 se muestra como cada nucleótido está marcado y esto se ve reflejado en el tamaño de cada producto.

**Figura 7.** Principio de ciclo-secuenciación



(Applied Biosystems, 2009)

## V. METODOLOGÍA

La metodología de este estudio consistió en una parte de bioinformática en el cual se diseñaron iniciadores para detectar polimorfismos únicos de nucleótido asociados a la resistencia de *Fusarium* spp. La segunda parte consistió en la optimización de extracción y PCR para el análisis de polimorfismos de único nucleótido. Para esto se trabajaron dos matrices, una consiste en 53 muestras de hojas de maíz provenientes de diferentes cultivos de Sololá, Guatemala donadas por Dra. Masselli (UVG), usados en estudios de germinación y la otra consiste en 118 muestras de semillas obtenidas del departamento de Huehuetenango, donadas por el Lic. Jiménez (UVG), para el Mega-proyecto “Análisis y propuesta de mejora del manejo post cosecha de maíz (*Zea mays*) para la reducción de aflatoxinas y fumonisinas en el maíz cultivado y consumido en el Departamento de Huehuetenango, Guatemala 2015-2016”.

### A. Procedimiento

#### 1. Diseño de iniciadores

- Se seleccionó las secuencias de donde están ubicados los SNPs asociados a polimorfismos de único nucleótido, según estudio de (Zila *et al.*, 2013). Usando base de datos del genoma B73 disponible en la página siguiente: [maizegdb.org](http://maizegdb.org)
- Se usó el programa Primer3 para diseñar 6 parejas de iniciadores, dos para cada polimorfismo que identifiquen las marcas moleculares. Estas se usaron para llevar a cabo el PCR punto final.
- Se verificó la amplificación de ADN utilizando cada uno de los iniciadores previamente diseñados mediante un PCR *in silico* usando la página: [genomaize.org](http://genomaize.org)

2. Optimización de extracción de ADN. Se compararon dos métodos de extracción, según Edwards 1991 y Chabi 2005, con el fin de poder determinar cuál de ellos generaba ADN íntegro para PCR, como control se usó un kit comercial de Promega (Wizard Genomic DNA Purification kit). El procedimiento descrito por Edwards, 1991 fue realizado con modificaciones.

**Procedimiento de Edwards con modificaciones:**

1. Se colocó una hoja joven en tubos de 1.5ml
2. Se maceró durante 15 segundos usando pistilos.
3. Agregó 300µl de solución de Edwards (Tris-HCl 1M, NaCl 5M, EDTA 0.5M, SDS 10%) y se machacó por 15 segundos extra
4. Se incubó 15 min en un baño de agua a 50°C.
5. Se centrifugó 5 min a temperatura ambiente a 13000rpm.
6. En tubos limpios se agregaron 250µl de isopropanol.
7. Se agregó 250µl de sobrenadante a tubos con el isopropanol y se agitó manualmente
8. Incubó a temperatura ambiente con agitación durante 20min.
9. Se centrifugó 20 min a 13000rpm a temperatura ambiente.
10. Se descartó el sobrenadante.
11. El “pellet” se lavó con 300 µl de etanol 70% frío.
12. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el “pellet” colocando el tubo de forma invertida sobre una servilleta por 15min.
13. El “pellet” se resuspendió en 50µl de amortiguador TE (Tris-HCl 10mM, pH 7.5, EDTA 1mM)
14. Se almacenó en un refrigerador a -20°C.

**Procedimiento de Chabi:**

1. Se tomó la mitad de una hoja joven y maceró con pistilos con 400µl de amortiguador de extracción (SDS 1%, NaCl 0.5M) en tubos de 1.5ml.
2. Se maceró y agregó amortiguador de extracción hasta llegar a un volumen final de 1200µl .
3. La solución homogénea se transfirió a microtubos de 1.7ml
4. Se centrifugó durante 4 min a 13,500rpm a temperatura ambiente.
5. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y se agregó el mismo volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión de forma suave.
6. Se colocó en hielo durante 5 min.
7. Se centrifugó durante 4 min a 13,500rpm a temperatura ambiente.
8. El sobrenadante se descartó y se lavó el pellet de ADN con 500µl de etanol 70%.
9. Se centrifugó durante 2 min a 13,500rpm a temperatura ambiente.
10. El etanol se descartó y el “pellet” se secó colocando el tubo de forma invertida sobre una servilleta por 15min.
11. El “pellet” se resuspendió en 50µl de amortiguador TE (Tris-HCl 10mM, pH 7.5, EDTA 1mM).
12. Se almacenó en una refrigeradora a -20°C.
  - a. Cuantificación de ADN. Se usó un espectrofotómetro para medir las absorbancias en 260nm, 280nm y 320nm de diluciones 1:100 del ADN re-suspendido. Como blanco se usó amortiguador TE 1X.
  - b. Verificación de la integridad del ADN extraído
    - Se preparó un gel de agarosa 1% con TAE (Tris-base, ácido acético, EDTA) 1X, (0.30g de agarosa con 30ml de TAE 1X)
    - Se puso en microondas hasta disolver la agarosa (aproximadamente 1min)
    - Se vertió 30ml en la cámara de electroforesis, teniendo cuidado de no dejar burbujas y colocar el peine para los pozos y con bloques a los lados.

- Se dejó polimerizar 25-30min.
- Se retiraron los bloques y el peine, se cubrió el gel con TAE 1X hasta la marca que indique la cámara.

### **Preparación de muestras para electroforesis**

- En papel parafilm se colocó loading Dye (azul/naranja 6X) (1  $\mu$ l para cada muestra), Gel Red (1  $\mu$ l para cada muestra y escalera)\*.
- Se mezclaron 4  $\mu$ l de muestra con su loading dye (6X colorante azul/anaranjado) y Gelred y cargar en pozo respectivo.
- Se recomienda cargar la escalera molecular de último (4  $\mu$ l )
- Se encendió la fuente de poder, y se programó a 100V por 20min
- Se visualizó el gel bajo transiluminador UV y fotografiarlo.
- Se limpió el transiluminador con agua destilada y kimwipes.
- Se lavó la cámara de electroforesis con dos lavados de agua destilada.

\*Nota: Se puede agregar 1ul de GelRed en el gel luego de disolver la agarosa y cuando este ya no esté muy caliente, sin embargo se usa este procedimiento puesto que se muestra una mejor claridad en el gel al colocar el revelador en cada pozo.

### 3. Optimización reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- Para realizar este paso se usó el procedimiento modificado de (Hayashi, Hashimoto, Daigen, y Ashikawa, 2004) como se describe a continuación:
- Se descongelaron y homogenizaron las muestras.
- Se prepararon tubos de 0.5ml en frío.
- El *master mix* se preparó siguiendo las indicaciones de GoTaq Green Master Mix, el cual incluye Taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs y colorante azul y amarillo. Promega (2013). Ver Cuadro 3 para una reacción de 25  $\mu$ l.

**Cuadro 3.** Componentes PCR punto final.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µl)
Agua libre de nucleasas	N.A	N.A	Hasta llegar a volumen final
<i>GoTaq MasterMix (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> colorante azul y amarillo)</i>	2X	1X	12.5
Iniciador izquierdo	10uM	0.4uM	1.0
Iniciador derecho	10uM	0.4uM	1.0
ADN	324.75ng/ µl	32.47ng	2.5
Total	-	-	25

El programa usado en el termociclador fue: desnaturalización inicial 94°C 2:00min (1 ciclo), desnaturalización 94°C 0:30s, anillamiento 54°C 0:30s, elongación 72°C 1:00min (35 ciclos), extensión 72°C 1:00min (1 ciclo), almacenamiento 4°C ∞.

c. Electroforesis de agarosa

- Se usó el mismo procedimiento indicado en la sección: Electroforesis de integridad de ADN con una concentración de agarosa al 2% (0.60g agarosa en 30ml solución amortiguadora TAE 1X).

4. Purificación amplicones para secuenciar. La purificación se realizó para las muestras de SNP 1: 1, 3, 33, 48, 51 y 53. SNP 3: 1, 3, 24, 26, 33 y 52. Estas muestras fueron puestas en un gel de agarosa y por electroforesis se separaron las bandas, siguiendo el procedimiento indicado anteriormente. El gel fue visualizado en un transiluminador con una regla para indicar la posición de las bandas y cortarlas con un bisturí. El bisturí se limpió con etanol 70% y agua destilada. El procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del kit comercial de Invitrogen “PureLink Quick gel extraction and PCR purification combo kit”.

- Se pesó el pedazo de gel con el amplicón y se colocó en un tubo eppendorf.
- Se agregó la solución de solubilización de gel siguiendo la relación 3:1 según el peso.
- Incubar en baño de agua por 15 min a 50°C. Mezclar por inversión cada 3 min.
- Después de haberse disuelto el gel, incubar 5 min extra a 50°C.
- Se agregó un volumen (peso gel) de isopropanol y se mezcló con vortex.
- Se transfirió la solución a una columna debidamente identificada.
- Centrifugación a 12,000 g por 1 min.
- Se descartó el filtrado. Colocar la columna en un nuevo tubo de lavado.
- Centrifugación a velocidad máxima por 2-3 minutos. Se descartó el filtrado.
- La columna se colocó en un tubo nuevo debidamente identificado, se agregó 50 µl de solución de elución.
- Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente.
- Centrifugación a 12,000 g por 1 min.
- Se revisó que haya elución en el tubo, se descartó columna y se almacenó el tubo a -20°C.

5. Secuenciación de Sanger. Este procedimiento se realizó en la Universidad Mariano Gálvez de Guatemala en el Instituto de investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas. Siguiendo las indicaciones del kit de “AppliedBiosystem BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit”.

Las muestras trabajadas fueron SNP 1: 33, 48, 51 y 53. SNP 3: 1, 3, 24, 26 y 33.

**a. Ciclo-secuenciación.** Se realizó una ciclo-secuenciación colocando los componentes indicados en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Componentes para ciclo-secuenciación

Componente	Concentración	Volumen por reacción	
		Izquierda	Derecha
Mezcla de reacción BigDye Terminator 3.1	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l
Iniciador izquierdo	3.2 $\mu$ M	1 $\mu$ l	-
Iniciador derecho		-	1 $\mu$ l
Agua libre des-ionizada	Hasta llegar a volumen final	9 $\mu$ l	9 $\mu$ l
Templado de ADN	3ng	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Volumen final	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

**b. Purificación.** Para la purificación se usó el kit “Big Dye XTerminator”.

- Se aplicó vortex a velocidad máxima al frasco de Xterminator hasta estar homogéneo.
- Se realizó una mezcla de XTerminator 20 $\mu$ l y solución de SAM 90 $\mu$ l para cada muestra con un 20% adicional por error de pipeteo con punta ancha.
- Se agitó la mezcla hasta estar homogénea y se agregó 110 $\mu$ l a cada muestra.
- La placa se selló y se aplicó vortex a 1800rpm durante 30min.

- Se centrifugó la placa a 1000xg por 2min. Posteriormente se colocó en el equipo para realizar la corrida de electroforesis capilar.

## VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se dividen en dos secciones, la parte bioinformática y la parte experimental de laboratorio. Para los iniciadores diseñados se basó en la posición de los SNPs publicada por Zila, *et al.* 2013.

### Parte 1. Diseño iniciadores

**Cuadro 5.** Iniciadores diseñados y características.

SNP	Nombre del iniciador	Sentido	Tm (°C)	Gc%	Horquilla	Producto (pb)	Secuencia 5'-3'
1	8481	Izquierdo	58.28	39.13	0.00	177	tggtaaaagttggtgctacatga
1	8482	Derecho	58.20	55.00	0.00		ccctcctcatctcatggaca
2	8471	Izquierdo	57.98	57.89	0.00	192	cgtcgagctgtgttacctc
2	8472	Derecho	58.91	50.00	0.00		aatcgtgtcaatcgggcaag
3	8475	Izquierdo	59.00	55.00	0.00	194	gtacatgcagagccttgacg
3	8476	Derecho	59.18	55.00	0.00		catgagggttgttgatgcc

En el Cuadro 4 están descritos los iniciadores obtenidos, se diseñaron dos parejas de iniciadores para cada SNP estudiado para obtener productos de 200pb y alrededor de 1000pb. En la sección de anexos se pueden observar las secuencias con las cuales se trabajó y los productos dados en el PCR *in silico*. En negrilla están los iniciadores usados por dar un producto alrededor de 200pb. En la Figura 7 se muestra el anillamiento de los iniciadores seleccionados.



## Parte 2. Comparación de métodos de extracción

Para determinar el método en el cual se lograba extraer ADN genómico de semillas y hojas de maíz. Se realizaron diferentes pruebas de extracción usando las mismas muestras, 1, 2 y 3 de hojas. Se compararon los métodos de extracción de Edwards (1991), Chabi (2015) y como control un kit comercial de Promega. Para poder verificar cual método fue el más efectivo se realizaron medidas de cuantificación y pureza en el espectrofotómetro, como se observa en el Cuadro 5.

En el Cuadro 5 se puede observar que el método de extracción de Edwards obtuvo un promedio mayor en la concentración de ADN genómico y buena pureza. Por lo que la extracción de Edwards se trabajó para el resto de muestras de hojas y semillas de maíz.

**Cuadro 6.** Promedio de concentraciones y pureza con el método de Edwards y Chabi

	<b>Concentración (ng/ul)</b>	<b>Desv. e</b>	<b>Pureza (260/280)</b>	<b>Desv. e</b>
Chabi	11.83	10.27	2.19	0.11
Edwards	19.77	9.94	2.07	0.48
Promega	15.50	2.12	2.24	0.06

En el Cuadro 6 se puede ver que para las muestras de hojas extraídas con el método el método de Edwards el promedio de concentración de ADN genómico en hojas de maíz fue de 324.75ng/ul con una desviación estándar de 336.83 y su pureza de 2.42 con desviación estándar de 0.32. En el caso de semillas se obtuvo un promedio 438.22ng/ul con desviación de 208.36, en el caso de la pureza 1.70 con desviación de 0.29 respectivamente

**Cuadro 7.** Promedio de concentraciones y pureza con el método de extracción de Edwards

Tipo de muestra	Cantidad	Concentración <sup>a</sup> (ng/ul)	Pureza <sup>b</sup> (OD <sub>260/280</sub> )
Hoja	53	324.75 ± 336.83	2.42 ± 0.32
Semillas	118	438.22 ± 208.36	1.70 ± 0.29

<sup>a</sup> Es el promedio de concentración entre todas las muestras con su respectiva desviación estándar. La fórmula para el cálculo de la concentración fue:

$$\text{ADN}(\mu\text{g/mL}) = (A_{260} - A_{320}) * \text{factor de dilución} * 50\mu\text{g/mL}$$

<sup>b</sup> Es el promedio de pureza de todas las muestras con su respectiva desviación estándar.

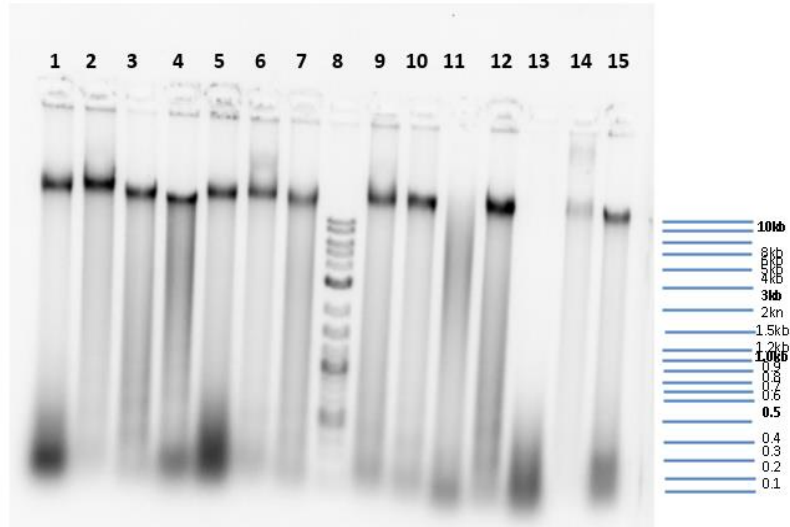
### Parte 3. Extracción de ADN de maíz según método de Edwards

Se realizaron los geles de verificación de la extracción con agarosa para todas las muestras de hojas y semillas de maíz las cuales se pueden observar en la sección de anexos. A continuación se presenta una imagen representativa de gel para muestras de hojas y muestras de semillas.

**Figura 8.** Verificación de la extracción con gel agarosa 1% de las muestras hojas de maíz. El orden de los pozos es el siguiente; 1: muestra 4, 2: muestra 5, 3: muestra 6, 4: muestra 7, 5: muestra 8, 6: muestra 9, 7: muestra 10, 8: Escalera molecular, 9: muestra 11, 10: muestra 12, 11: muestra 13, 12: muestra 14, 13: muestra 15, 14: muestra 16, 15: muestra 17. La escalera molecular usada fue de New England BioLabs.



**Figura 9.** Verificación de la extracción con gel de agarosa 1% de las muestras semillas de maíz. El orden de los pozos es el siguiente; 1: muestra 70, 2: muestra 71, 3: muestra 72, 4: muestra 73, 5: muestra 74, 6: muestra 75, 7: muestra 76, 8: escalera molecular, 9: muestra 77, 10: muestra 78, 11: muestra 79, 12: muestra 80, 13: muestra 81, 14: muestra 82, 15: muestra 83. La escalera molecular usada fue de New England BioLabs.



Como se puede observar en las figura s8 y 9, la mayoría de muestras se observa una banda clara de aproximadamente 10kb que representa el ADN obtenido de maíz; mientras que algunas muestras presentan degradación de ADN (ver pozo 5, 6, 10 de Figura 8). En las figuras 8 y 9 se observan geles de integridad con gel de agarosa 1%. Algunas muestras se observan levemente degradados, sí se observa la banda principal alrededor de 10kb.

#### Parte 4. Optimización de PCR

En la parte de optimización de PCR con las muestras de semillas y hojas se trabajó con los iniciadores mostrados en el Cuadro 4, únicamente se trabajó con los iniciadores que dan un producto menor a 200pb los cuales están indicados en dicho cuadro en negrilla. El Cuadro 7 muestra el tamaño de bandas obtenidas a 54°C como temperatura de anillamiento. En el Cuadro 8 se muestran algunos de los problemas durante la optimización de PCR y sus respectivas soluciones.

**Cuadro 8.** Resultado optimización PCR

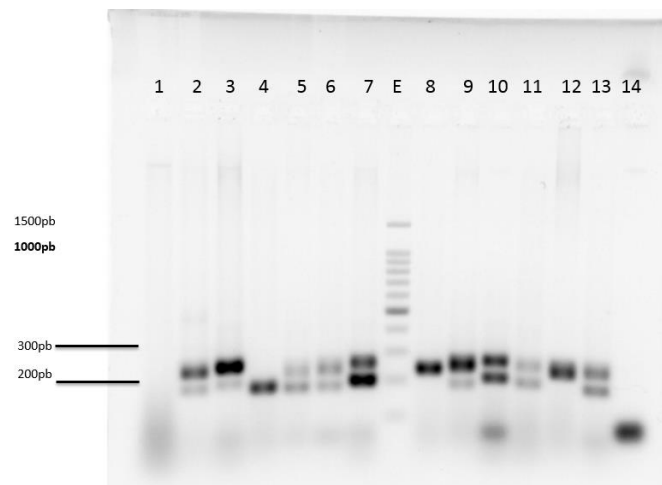
Iniciadores	Amplificación hojas	Amplificación semillas	Tamaño obtenido	Tamaño teórico	Tm experimental (°C)	Tm teórico (°C)
SNP 1	Exitosa	No exitosa	~200pb	177pb	54°C	58.20
SNP 2	No exitosa	No exitosa	-	192pb	-	58.00
SNP 3	Exitosa	No exitosa	~200pb	194pb	54°C	59.00

**Cuadro 9.** Soluciones de problemas

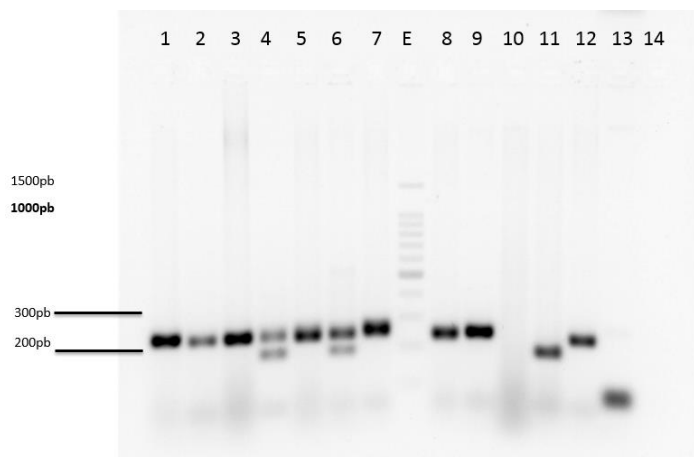
Fase experimental	Problema	Solución	Figura en anexos
PCR SNP 1	No hay bandas	Dilución 1:20 de las muestras	Ver Figura 14A
	No hay bandas	Geles agarosa 2%, no diluciones	Ver Figura 15A
	Se obtienen bandas de baja intensidad	Aumentar Tm 54°C	Ver Figura 16A
	Se obtienen dos bandas	Realizar PCR tipo <i>touch-down</i>	Ver Figura 17A
Fase experimental	Problema	Solución	Figura en anexos
PCR SNP 2	No hay bandas con geles de agarosa 1%	Geles agarosa 2% con Tm 52°C	Ver Figura 18A
		Aumentar Tm 54°C	Ver Figura 19A
		Disminuir Tm 50°C	Ver Figura 20A
		Realizar PCR tipo <i>touch-down</i>	Ver Figura 17A
PCR SNP 3	No hay bandas con geles de agarosa 1%	Geles agarosa 2%	Ver Figura 21A
	Intensidad de la banda es baja	Aumentar Tm 54 °C	
	Banda en control negativo al aumentar muestras	Realizar dos controles negativos al inicio y final del PCR Cambiar agua de PCR	Ver Figura 12

Posterior a la extracción de ADN genómico se realizó cuantificación y medición de pureza 260/280 para todas las muestras (ver Cuadro 5A en anexos). Únicamente se seleccionaron 30 muestras aleatorias que mostraban cantidad de ADN y una pureza entre 1.7-2.0 para realizar PCR correspondientes a SNP1 y SNP3. En las Figuras 10-15 se muestran los resultados obtenidos.

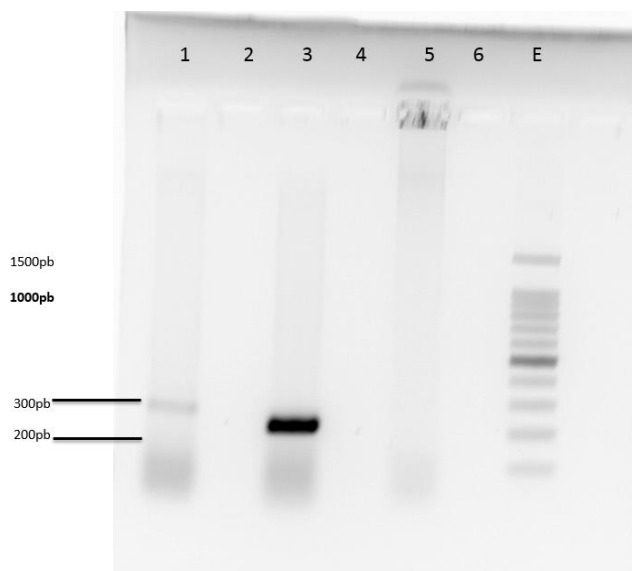
**Figura 10.** Gel de agarosa 2% de productos de PCR para SNP 1. El orden de los pozos es el siguiente; 1: muestra 4, 2: muestra 8, 3: muestra 9, 4: muestra 12, 5: muestra 15, 6: muestra 19, 7: muestra 22, E: escalera molecular, 8: muestra 23, 9: muestra 24, 10: muestra 25, 11: muestra 26, 12: muestra 27, 13: muestra 28, 14: control negativo. La escalera molecular usada de referencia fue 100bp DNA ladder Promega.



**Figura 11.** Gel de agarosa 2% de productos de PCR para SNP 1. El orden de los pozos es el siguiente; 1: muestra 30, 2: muestra 31, 3: muestra 33, 4: muestra 35, 5: muestra 37, 6: muestra 38, 7: muestra 41, E: escalera molecular, 8: muestra 42, 9: muestra 44, 10: muestra 47, 11: muestra 48, 12: muestra 51, 13: control negativo, 14: blanco. La escalera molecular usada de referencia fue 100bp DNA ladder Promega.

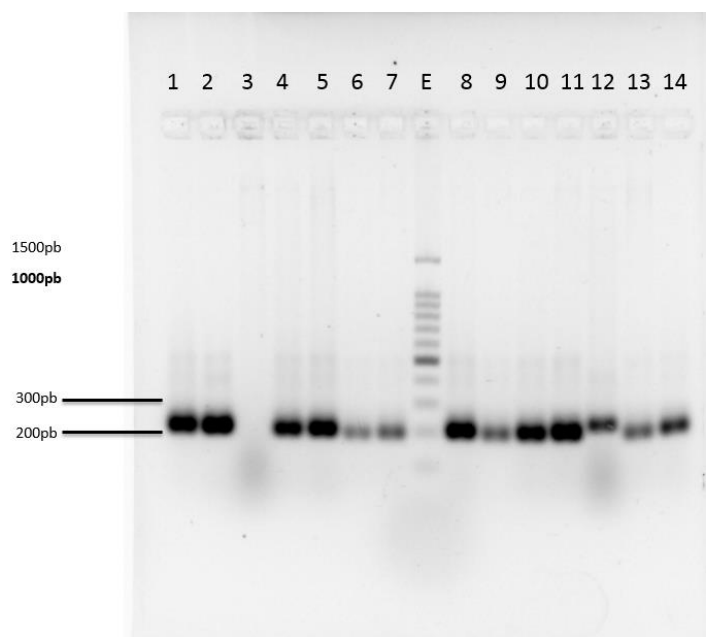


**Figura 12.** Gel de agarosa 2% de productos de PCR para SNP 1. El orden de los pozos es el siguiente; E: escalera molecular, 1: muestra 52, 2: blanco, 3: muestra 53, 4: blanco, 5: muestra 54, 6: blanco. La escalera molecular usada de referencia fue 100bp DNA ladder Promega.

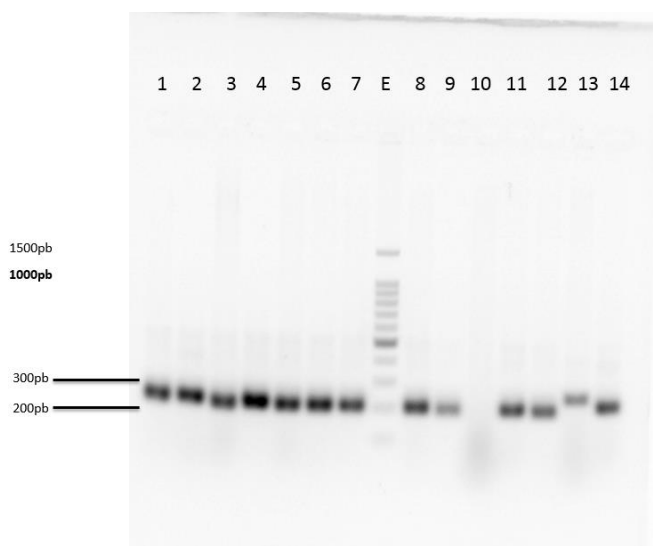


En las figuras 10, 11 y 12 se observan geles de productos de PCR para SNP 1 con gel de agarosa 2%. Dos muestras no presentan la banda esperada del amplicón con un tamaño entre 200-300pb (Figura 10, pozo 1 y Figura 11, pozo 10). Algunas muestras presentan dos bandas (Figura 10, pozo: 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13. Figura 11 en pozo 4 y 6). Los pozos 4 de las figuras 10 y 11 pozos de la Figura 11, muestran únicamente las bandas de un tamaño entre 100-200pb y el resto de muestras presentan una banda entre 200-300pb. El control negativo no muestra bandas anómalas.

**Figura 13.** Gel de agarosa 2% de productos de PCR para SNP 3. El orden de los pozos es el siguiente; 1: muestra 1, 2: muestra 3, 3: muestra 4, 4: muestra 8, 5: muestra 9, 6: muestra 12, 7: muestra 15, E: escalera molecular, 8: muestra 19, 9: muestra 22, 10: muestra 23, 11: muestra 24, 12: muestra 26, 13: muestra 27, 14: muestra 28. La escalera molecular usada de referencia fue 100bp DNA ladder Promega.



**Figura 14.** Gel de agarosa 2% de productos de PCR para SNP 3. El orden de los pozos es el siguiente; 1: muestra 30, 2: muestra 31, 3: muestra 33, 4: muestra 35, 5: muestra 37, 6: muestra 38, 7: muestra 41, E: escalera molecular, 8: muestra 42, 9: muestra 44, 10: muestra 47, 11: muestra 48, 12: muestra 51, 13: muestra 52, 14: muestra 53. La escalera molecular usada de referencia fue 100bp DNA ladder Promega.



**Figura 15.** Gel de agarosa 2% de productos de PCR para SNP 3. El orden de los pozos es el siguiente; E: escalera molecular, 1: muestra 25, 2: muestra 54, C-: control negativo. La escalera molecular usada de referencia fue 100bp DNA ladder Promega.

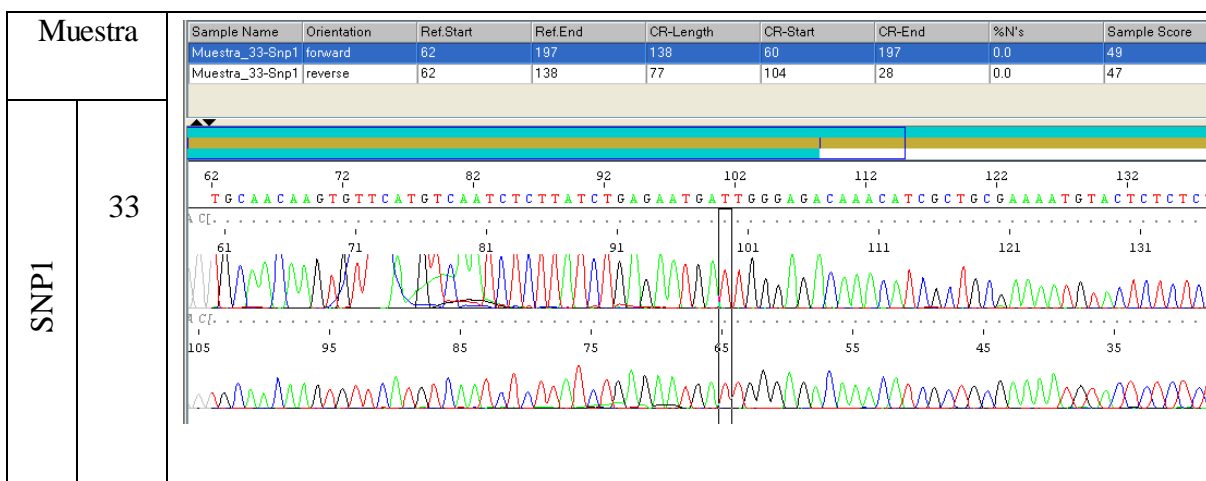


En las figuras 13, 14 y 15 se observan geles de productos de PCR para SNP 3 con gel de agarosa 2%. Tres muestras no presentan la banda esperada del amplicón con un tamaño entre 200-300pb.

## Parte 5. Secuenciación

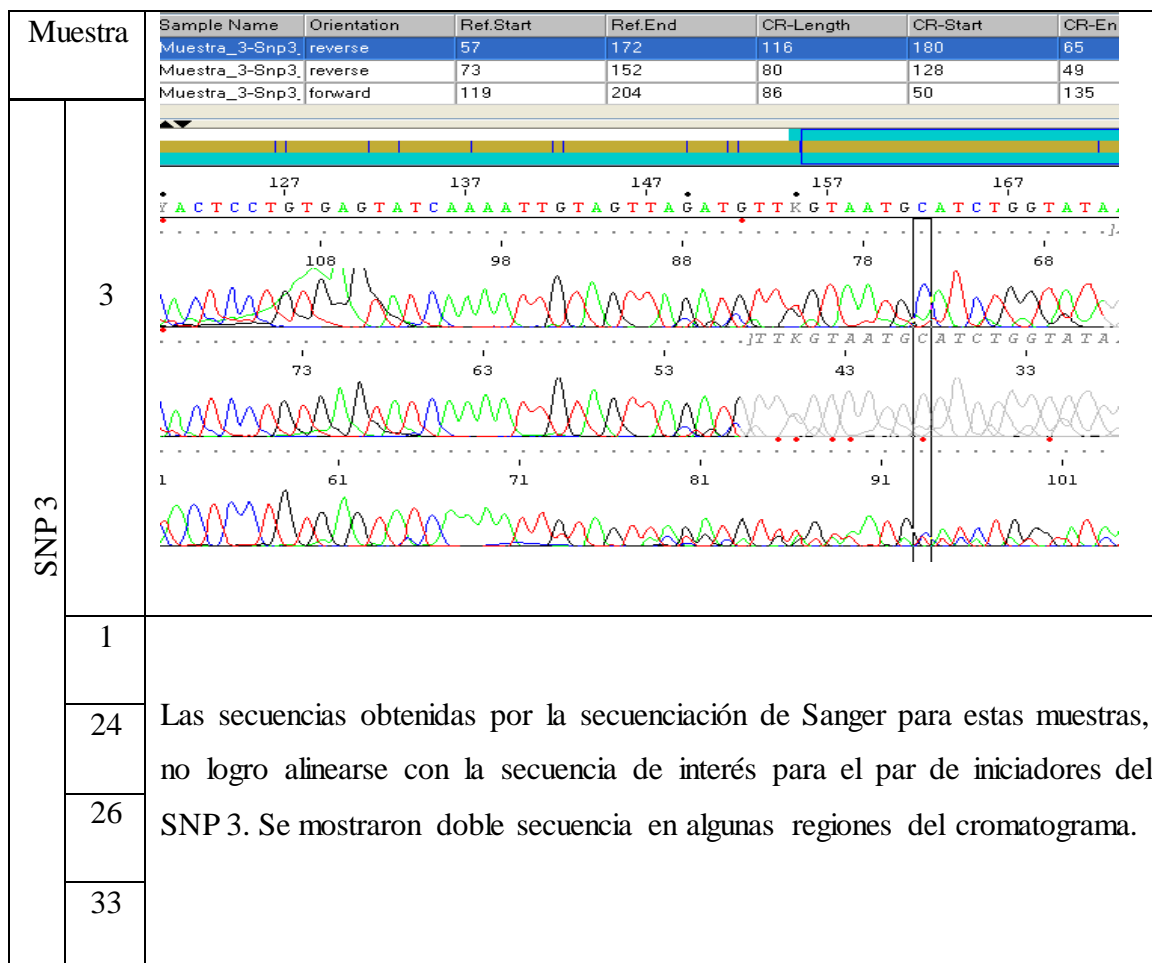
Para realizar la Secuenciación de Sanger, se cortaron las bandas de los geles con el producto de PCR y se purificaron los amplicones. Las muestras que se trabajaron para SNP 1 fueron: muestra 33, 48 y 51. Ya que como se muestra en la Figura 11, la muestra 33 y 12 tienen un tamaño entre 200-300pb, en el caso de la muestra 48 tiene un tamaño entre 100-200pb. En la Figura 16 se muestran los resultados de la secuenciación.

**Figura 16.** Electroferogramas de bandas purificadas no muestran la presencia del polimorfismo 1





**Figura 17.** Electroferogramas de bandas purificadas no muestran la presencia del polimorfismo 3



La Figura 17 muestra los alineamientos de los electroferogramas de las bandas purificadas del producto de PCR con la secuencia de interés mostrada en la Figura 7. Se obtuvo alineamientos y electroferogramas limpios para la muestra 3. En el caso de las muestras 1, 24, 26 y 33, las secuencias no estaban claras por lo que no se pudieron alinear. El rectángulo negro muestra la posición donde se debería observar el polimorfismo. No se observa la presencia del polimorfismo 3 en las secuencias.

## VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El artículo descrito por Zila y colaboradores describen tres SNP reportados asociados a resistencia de Fusarium, este trabajo de investigación buscaba determinar métodos para identificar estos polimorfismos en variedades autóctonas en Guatemala.

Con el programa Primer 3 se diseñaron los iniciadores los cuales se pueden observar en el Cuadro 4. Estos siguen las recomendaciones dictadas por la literatura (Promega, 2013); el largo está en el rango de 15-30 bases. El porcentaje GC de los iniciadores seleccionados están en el rango de 40-60% como se muestra en el Cuadro 5. Tomando en cuenta estas consideraciones son así para evitar la formación de horquillas y anillamiento propio con los iniciadores. Entre las parejas de iniciadores la temperatura de anillamiento es cercana, no difiere más de 1° para facilitar el programa en el termociclador. Se seleccionaron los iniciadores con menor probabilidad de formar horquillas.

Se realizó un análisis bioinformático para determinar la especificidad de los iniciadores. Los productos mostrados en el PCR *in silico* realizado en genomaize.org muestra que si hay amplificación del producto del tamaño esperado 177pb para SNP 1 y 192pb para SNP2, en el caso de SNP 3 se da el producto de tamaño esperado 194pb pero en dos áreas del genoma (estos resultados se muestran en la sección de Anexos). Es importante recordar la complejidad del genoma del maíz el cual posee más de 32mil genes y 10 cromosomas. Se ha reportado que la secuenciación de este cereal fue compleja puesto que casi el 85% del genoma está compuesto por elementos de transposición (Schnable, *et al.*, 2009).

Posteriormente, se prosiguió a realizar las extracciones, se buscaba usar un método “verde” para las extracciones de ADN genómico pero que este fuera adecuado para llevar a cabo PCR. Se define método “verde” a aquel que usa reactivos poco dañinos para el investigador y el medio ambiente, además de ser un procedimiento más económico al usar menos reactivos (Chemat, Abert & Cravotto, 2012). Se decidió trabajar con el método de Edwards ya que este es un procedimiento rápido y verde, con el cual se ha trabajado durante la carrera.

Ya con el método de extracción optimizado, se prosiguió a trabajar con dos grupos de muestras de maíz, hojas y semillas. Las 53 muestras de hojas son de diferentes cultivos de Sololá, Guatemala. El segundo grupo son 118 muestras de semillas provenientes de Huehuetenango, Guatemala. Para cada muestra extraída se determinó la integridad del ADN extraído por medio de un gel de agarosa. La electroforesis en agarosa permitió observar que se logró una extracción de ADN el cual estaba fraccionado en bandas de un tamaño promedio de 10 kb. La posición de la banda varía levemente entre las muestras, esto se puede contribuir a la fragmentación observada en algunos pozos debido a la mala calidad de ciertas muestras lo cual se explica mas adelante.

En el Cuadro 6 se puede observar el promedio de la concentración obtenida para cada muestra y su respectiva pureza. Las muestras de hoja presentan un promedio menor de concentración de ADN 324.75 ng/ul, pero una desviación estándar más elevada. Esto se debe a que las hojas fueron donadas al proyecto y no estaban todas en las mismas condiciones. Las semillas pueden tener una mayor concentración puesto que el ADN puede no ser solo de maíz, si no de hongos u otro microorganismo presente en la muestra. La desviación estándar de la concentración para ambas muestras puede representar la diversidad de muestras integras en el proyecto. Las muestras se recibieron sin control sobre congelamiento y almacenamiento anterior a este proyecto, algunas muestras de hojas se observaban en mal estado, por lo que se presentaron puntos atípicos en las concentraciones ya que el rango es de 0-1000ng/ul, estos datos atípicos influyen en la desviación estándar.

Como se puede ver en el Cuadro 5, la pureza se encontró en el rango de 1.60-2.23 con una desviación estándar menor. La literatura indica que la pureza a 260/280 debe ser de 1.8 para ADN, si esta es menor indica que hay contaminación por proteínas.. En la literatura también se estudia la pureza entre 260/230 la cual no se midió en este estudio pero es importante para futuras ocasiones para determinar contaminación por otros componentes como EDTA, en este caso el dato recomendado es de 2-2.2 o mayor (Nanodrop, 2016).

Para el proceso de optimización se seleccionaron aleatoriamente 30 muestras que tuvieran una pureza 260/280 de 1.8-2.0 (ver Cuadro 3A). En la optimización de PCR no se logró amplificar las muestras de semillas de maíz. La calidad de la semilla puede ser afectada por la cantidad de agua presente en la misma, ya que esta puede interferir en sus actividades biológicas, microorganismos y susceptibilidad al daño mecánico. Las semillas pueden absorber y perder agua de acuerdo al ambiente que las rodea, esto produce expansiones y contracciones en el tejido de las semillas que pueden favorecer el deterioro del embrión y el ataque de microorganismos, esto además puede afectar la germinación de la semilla. La literatura indica que se debe realizar un secado para el almacenamiento de la semilla incluso por debajo de 12-13% de humedad para mantener la calidad (Avelar, *et al.*, 2012).

Las muestras con las que se realizó este estudio no fueron sometidas al secado recomendado, por lo tanto se asume un deterioro del embrión impidiendo la germinación y un deterioro en la calidad de la semilla. Esta puede ser la razón por la cual no se logró la amplificación a partir de estas muestras. Es recomendable purificar este ADN genómico para eliminar impurezas y exceso de proteínas por extraer a partir de las semillas en lugar de plántula. En este estudio se realizó en el proceso de extracción un doble lavado con Etanol 70% para eliminar impurezas. Al trabajar con semillas es necesario someter las semillas a un proceso de secado antes de congelarlas. De esta forma no se pierde la capacidad germinativa de la misma. Los métodos que indica la literatura para procesar este tipo de muestra consiste en secado en sombra a temperatura ambiente, y almacenar de 2-4°C de forma hermética, se recomienda que la humedad de las semillas sea entre 6-8%

(García, 2002). Al tener las semillas secas, se debe seguir un proceso de germinación encontrado en la literatura el cual consiste en colocar las semillas en papel con agua destilada y estéril. Las bandejas con las semillas se ponen con 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, reemplazando el papel de germinación cada 48 horas para evitar contaminación (Biasutti y Galiñanes, 2001).

En la optimización del PCR para SNP 1 se mostraron muestras de maíz con tres diferentes tipos de banda entre 200-300pb. La primera es una banda ~190pb (Figura 13 pozo 4, Figura 14 pozo 11), una banda ~220pb (pozo 8 y 12 Figura 13, pozo 1-3, 5, 7-9, 12 de Figura 14) o la presencia de ambas (pozo 2, 3, 5-7, 9-11, 13 de Figura 13, pozo 4 y 6 de Figura 14). La diferencia del tamaño de bandas puede ser diferentes alelos, diferentes variedades de maíz, y las muestras que presentan ambas bandas pueden ser híbridos. Por lo tanto se decidió purificar para el proceso de secuenciación muestra 1 y 3 (2 bandas), muestra 33 y 51 (banda ~220pb) y muestra 48 (banda ~190pb). En el Cuadro 9 se muestra el resultado de secuenciación de la muestra 33, 48 y 51, estos resultados mostraron un alineamiento exitoso con la secuencia de interés mostrando que los iniciadores si permiten identificar el área donde está el SNP. Para estas tres muestras no se presentó el polimorfismo reportado por Zila. Con estas secuencias se realizó un BLAST (ver anexo 6), donde se encontró que hay un porcentaje de identidad de 99% para las muestras 48 y 51, a pesar de tener un tamaño diferente de bandas. En anexo 6 se puede ver la diferencia de nucleótido al inicio de la secuencia esto no se puede concluir como una diferencia significativa ya que al inicio y final de la secuenciación se presenta ruido. Pero es importante mencionar que la muestra 33 y 48 muestran un 98% de identidad con una diferencia de nucleótidos en el centro de la secuencia como se puede ver en la sección de anexos. La muestra 33 con BLAST con la muestra 51 también presenta una diferencia de nucleótidos en el centro de la secuencia con un 98% de identidad, a pesar que en el gel de agarosa aparentaban tener el mismo tamaño. Es probable que la muestra 33 sea un alelo diferente a las muestras 48 y 51.

En el BLAST que se puede observar en el anexo 6, se puede diferenciar una característica importante en las secuencias. Hay secuencias pequeñas repetidas de las bases nitrogenadas C y T. Estos corresponden a microsatélites (SSR= short sequence repeat, por sus siglas en inglés). Los microsatélites son marcadores moleculares que facilitan los estudios de diversidad en poblaciones, colecciones de germoplasma y estudios evolutivos (Varshney, Graner y Sorrells, 2005). Este marcador encontrado en una región asociada a resistencia a Fusarium, es importante ya que facilita el estudio de esta característica en las poblaciones de maíz.

En la región del SNP 2, no se pudo lograr el anillamiento de los iniciadores a la plantilla de ADN genómico. Este resultado se puede atribuir a la presencia de una gran variabilidad genética en esta región. También se puede considerar hacer más cambios en las condiciones de PCR, se recomienda probar agregar más  $MgCl_2$  ya que este es catalizador para la actividad de la Taq polimerasa. Se recomienda analizar una región más amplia del genoma para determinar si hay variabilidad. Además se deben diseñar nuevos iniciadores para conocer esta área de interés.

Para la optimización de los iniciadores que amplifican para la región donde se ubica el SNP 3, se lograron productos de una sola banda. En las Figuras 10, 11 y 12, se muestra que la banda se ubica entre 200-300pb, la mayoría de muestras presenta el mismo tamaño, sin embargo, se ve una variación entre algunas muestras. La variación de tamaño de bandas se puede atribuir a variabilidad genética. Para verificar la especificidad de los iniciadores y la presencia del SNP se realizó secuenciación de Sanger. En el Cuadro 10 se muestra el resultado de secuenciación de las muestras 1, 3, 24, 26 y 33, estos resultados no mostraron un alineamiento exitoso con la secuencia de interés probablemente a la presencia de una doble secuencia, inserciones o deleciones. Esto se puede atribuir a la inespecificidad de los iniciadores debido a que esta región es muy variable o al blanco. Sin embargo, se logró alinear con la secuencia de interés la muestra 3, pero no se muestra una secuencia limpia, por lo que no se puede concluir la presencia del polimorfismo reportado por Zila y otra

diferencia de nucleótidos entre las muestras. Por lo tanto se recomienda diseñar iniciadores que amplifiquen para una región más amplia y aumentar la especificidad de los mismos mejorando las condiciones de la reacción de PCR, como aumentando la concentración de MgCl<sub>2</sub>.

Es importante mencionar que en los PCR realizados se uso como control negativo la mezcla de reacción de PCR con agua. El control positivo no se pudo trabajar a falta de las muestras con el SNP reportado en el artículo de Zila y compañeros. El tamaño de banda esperado se comparó con los datos obtenidos en el análisis bioinformático. La muestra 1 y 3 demostraron ser las que amplificaban en todas las pruebas realizadas por lo que se colocaron cada vez que se realizó un PCR como control interno.

La muestra 1 y 3 mostraron un tamaño diferente al realizar el PCR correspondiente al SNP 3, sin embargo, al realizar la electroforesis con todas las muestras a analizar no mostró la diferencia en tamaño. Esto se puede deber a la intensidad de las bandas obtenidas o por efectos de la electroforesis. Ya que en el gel se nota que estas bandas están más intensas, lo cual provoca una pérdida en la resolución. En la electroforesis existen factores que pueden afectar los resultados esperados como lo es la concentración del gel, calidad de la agarosa, condiciones de solución amortiguadora, la capacidad de amortiguamiento de la solución, voltaje, grosor del gel, tamaño de pozos y tamaños del fragmento de ADN estudiado (Ven y Rani 2012).

En el estudio realizado se trató de mantener la constancia entre algunas de estas variables, como lo es el tipo de agarosa, el tipo de solución amortiguadora y las condiciones de corrida. A pesar de esto, hubo variaciones en la migración de los fragmentos de ADN. Esta pudo haber sido ocasionada por la pérdida de la capacidad de amortiguamiento del TAE 1X. Por lo tanto, se recomienda usar la solución amortiguadora de corrida un máximo de cinco veces, y se recomienda usar la misma cámara de electroforesis durante todo el estudio ya que estas pueden alterar los resultados cuando tienen mucho tiempo de uso, mal

cuidado, entre otras. Además se recomienda usar la misma concentración de producto de PCR para los geles y probar realizar geles de acrilamida en lugar de agarosa, ya que el tamaño del producto es pequeño y la acrilamida puede aumentar la resolución para definir correctamente el tamaño de las bandas.

Se pueden usar otros métodos para identificar mutaciones como HPLC desnaturante , geles en gradiente desnaturantes, qPCR, pero estos no indican la mutación puntual. Por lo tanto se concluyó que es necesario secuenciar los productos amplificados para identificar la presencia de polimorfismo de único nucleótido. Es importante mencionar que en la prueba de secuenciación realizada no se trabajó con todas las muestras y algunos de los reactivos empleados estaban vencidos.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron iniciadores que amplifican para el cromosoma 1 donde está ubicado SNP 1 y para cromosoma 9, donde está ubicado SNP 3.
2. El juego de iniciadores diseñados para SNP 1 y SNP 3 amplifica ADN genómico extraído de hojas de maíz.
3. Se logró obtener un método de extracción de ADN para muestras de hojas de maíz.
4. El ADN extraído de semillas no logró amplificar.
5. El juego de iniciadores para SNP 2 no logró amplificar para ningún tipo de muestras.
6. El juego de iniciadores diseñados para SNP 1 amplifica ADN de hojas de maíz y muestra diferencia de alelos en maíz de Guatemala.

## **IX. RECOMENDACIONES**

1. Hacer análisis para todas las muestras usando los iniciadores de SNP1.
2. Secuenciar todos los productos amplificados.
3. Probar iniciadores con producto de mayor tamaño para detección de la región donde se encuentra el SNP 2.
4. Realizar electroforesis con geles de acrilamida para mejorar la resolución del tamaño de bandas obtenidas.
5. Germinar las semillas para trabajar con las hojas de maíz.
6. Usar otro kit u otra solución de elución para purificar únicamente una banda de producto amplificado para SNP 1 y 3 y secuenciarlo para detección de polimorfismos.
7. Realizar un estudio más grande comparando cultivos en diversas áreas geográficas de Guatemala y analizar los cultivos para SNP1.
8. Continuar el estudio para encontrar muestras que posean los SNP y realizar pruebas de resistencia.

## X. REFERENCIAS

- Acosta, Rosa. (2009). *El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El Maíz en Cuba. Cultrop*. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362009000200016](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362009000200016) [con acceso en línea 4/7/2016]
- Applied Biosystems (2009). *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis*. Applied Biosystems Chemistry Guide. 2 ed. 310pp.
- Avelar, S., F. Villela y S. Peske (2012). *Avances en el secado de semillas – uso del aire deshumificado por refrigeración*. Disponible en: [http://www.seednews.inf.br/\\_html/site\\_es/content/reportagem\\_capa/imprimir.php?id=134](http://www.seednews.inf.br/_html/site_es/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=134) [con acceso en línea 11/10/2016]
- Biasutti, C y V. Galiñanes. (2001). *Influencia del ambiente de selección sobre la germinación de semillas de maíz (Zea mays L.) bajo estrés hídrico*. Relaciones entre caracteres de plántula con el rendimiento a campo. AGRISCIENTIA Vol. XVIII:37-44
- Chabi Sika, K., Kefela, T., Adoukonou-Sagbadja, H., Ahoton, L., Saidou, A., Baba-Moussa, L., Gachomo, E. W. (2015). *A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems*. *Plant Gene*, 1, 43–45. <http://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.03.001>
- Chemat, F., Abert, M., G. Cravotto. (2012). *Green extraction of natural products: Concept and principles*. *Int J Mol Sci*. DOI: 10.3390/ijms13078615
- Cortazar, A. Y P, Silva (2004). *Métodos fisicoquímicos en biotecnología*. UNAM. Abstraído en línea: [www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf).
- Doyle, J.J ; J.L. Doyle. (1990). *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus* 12:13- 15
- Edwards, K. (1991) *A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis*. *Nucleic acid research*. 19(6): 1349.
- Falcón, L. y A. Valera (2007). *“Extracción de ácidos nucleicos”*. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología. 592pp.
- FAO e IPGRI. (2001). *El papel de la mujer en la conservación de los recursos genéticos del maíz*. Guatemala.
- García, P. (2002). *Bases ecológicas para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana*. Disponible en: [http://servicios.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamicas/20/bases\\_ecologicas\\_semillas\\_forestales.pdf](http://servicios.educarm.es/templates/portal/ficheros/websDinamicas/20/bases_ecologicas_semillas_forestales.pdf) [con acceso en línea 03/10/2017]
- Gasser, R. Hu, M., N. Chilton, B. Campbell, A. Jex, D. Otranto, C. Cafarchia, I. Bevenridge y Zhu, X. (2007). *Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation*. *Nature protocols*. doi:10.1038/nprot.2006.485
- GENEON (2013) *GelRed*. Extraído en línea: [www.trilabo\\_pt/imgs/productos/import/s420.TechnicalDataSheet.pdf](http://www.trilabo_pt/imgs/productos/import/s420.TechnicalDataSheet.pdf)

- Gelderblom, W. C. A., K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar, N. P. J. Kriek (1988). *Fumonisin-Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1806-1811.
- Gelderblom, W.C. y S.D. snyman (1991): *Mutagenicity of potentially carcinogenic mycotoxins produced by Fusarium moniliforme*. Mycotoxin Res. 7, 46- 52.
- Gelineau-Van Waes, J., Starr, L., Maddox, J., Aleman, F., Voss, K.A., Wilberding, J., et al., 120 2005. *Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanisms 121 in an in vivo mouse model*. Birth Defects Res. A. Clin Mol. Teratol. 73 (7), 487–497.
- Gelineau-Van Waes J, Voss KA, Stevens VL, Speer MC, Riley RT. (2009) *Chapter 5 maternal fumonisin exposure as a risk factor for neural tube defects*. Adv Food Nutr Res 56:145-181.
- Gilbert, S (2005). *Biología en desarrollo*. Ed. Médica Panamericana. 882pp.
- Guarro, J. (2011). *Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos*. Enferm Infecc Microbiol Clin. doi:10.1016/j.eimc.2011.09.006
- Haschek, W. M., G. Motelin, D. K. Ness, K. S. Harlin, W. F. Hall, R. Vesonder, R. Peterson, V. R. Beasley (1992). *Characterisation of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine*. Mycopathologia 117, 83-96.
- Hayashi, K., Hashimoto, N., Daigen, M., y Ashikawa, I. (2004). *Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus*. Theoretical and Applied Genetics, 108(7), 1212–1220. <http://doi.org/10.1007/s00122-003-1553-0>
- ITIS (2016). *Zea mays*. L. Taxonomic serial: 42269. Disponible en: [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=42269](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42269) [Con acceso en línea 4/7/2016]
- Jackson L, Jablonski J. (2004) *Fumonisin*. In: Magan N, Olsen M (eds) *Mycotoxins in food*. Abington, Cambridge, England, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, pp. 384–422.
- Kim,S y B. Dale. (2004). *Global potential bioethanol production from wasted crops and residues*. Biomass and bioenergy. doi:10.1016/j.biombioe.2003.08.002
- Lanubile, A; Ferrarini, A; Maschietto, V; Delledonne, M; Marocco, A y Bellin, D. (2014). *Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to Fusarium verticilloides infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance*. BMC Genomics. 15:710.
- Madania, A. M; Altwalli, W; Naffa, P; Volker, y M, Hawat (2013) *Morphological and Molecular Characterization of Fusarium Isolated From Maize in Syria*. J Phytopathol doi: 10.1111/jph.12085
- Maniantis, T. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York. DOI: 10.1016/0307-4412(83)90068-7
- Marasas, W. F. O., Riley, R. T., Hendricks, K. a, Stevens, V. L., Sadler, T. W., Gelineau-van Waes, J.,Merrill, A. H. (2004). *Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism*,

- folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize.* The Journal of Nutrition, 134, 711–716.
- Munkvold, G. P., y Desjardins, A. E. (1997). *Fumonisin in Maize.* Plant Disease, 81(6), 556–565. <http://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.6.556>
- Nanodrop (2016). *260/280 and 260/230 ratios.* Disponible en línea: <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>. [con acceso 10/10/2016]
- Novegen (2002). *Molecular Sizw Markers.* Disponible en línea: [www.ebiotrade.com](http://www.ebiotrade.com)
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Guedan C, Crous PW, Geiser DM. (2009) *Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the Fusarium incarnatum-F. equiseti and F. chlamyosporum species complexes within the United States.* J Clin Microbiol. 2009;47:3851–61.
- Osweiler, G. D., P. F. Ross, T. M. Wilson, P. E. Nelson, S. T. Witte, T. L. Carson, L. G. Rice, H. A. Nelson (1992). *Characterisation of epizooty of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings.* J. Vet. Diagn. Invest. 4, 53-59.
- Promega (2013). *GoTaq Master Mix.* Disponible en línea: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix.pdf> [con acceso 28/6/2017]
- Promega (2016). *How do I determine the concentration, yield and purity of DNA samples.* Disponible en línea: <https://www.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/> [con acceso 7/9/2016]
- Riley, R. T., E. Wang, J. J. Schroeder, E. R. Smith, R. D. Plattner, H. Abbas, H. -S. Yoo, A. H. Merrill JR. (1996). *Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins.* Nat. Tox. 4, 3-15.
- Roberto, M., y López, F. (2002). *Instituto de ciencia y tecnologías el cultivo del maiz en Guatemala: Una guía para su manejo agronómico,* 1–45.
- Robson, K (2015). *Managing Fusarium Head Blight in 2015.* Disponible en línea: <https://agro.basf.ca/West/KnowledgeCenter/AgSolutionsAdvisor/PastIssues/June2015/headblight/index.html> [con acceso 8/9/2016]
- Roche, Dinora (2008) *Caracterización de la biodiversidad de cepas presuntivas de Bacillus thuringiensis en distintos nichos de la filoesfera del árbol del aguacate en Guatemala, Sacatepéquez y Alta Verapaz, 2008.* Trabajo de graduación, Universidad del Valle de Guatemala.
- Torre-hernández, M. E. De, Sánchez-rangel, D., Galeana-sánchez, E., Plasencia-de, J., Od, H., Gh, F., Gho, F. (2014). *Fumonisin –síntesis y función en la interacción Fusarium verticillioides-Maíz,* 17(1), 77–91.
- Torres, L y L. López. (2010). *Consumo de fumonisin y daños a la salud humana.* Salud Pública de México, 52(5), 461-467.
- Torres, O. A., Palencia, E., Lopez de Pratdesaba, L., Grajeda, R., Fuentes, M., Speer, M.

- C., Riley, R. T. (2007). *Estimated fumonisin exposure in Guatemala is greatest in consumers of lowland maize*. *The Journal of Nutrition*, 137(12), 2723–2729. <http://doi.org/137/12/2723> [pii]
- Torres, O., Matute, J., Gelineau-van Waes, J., Maddox, J. R., Gregory, S. G., Ashley-Koch, A. E., Riley, R. T. (2015). *Human health implications from co-exposure to aflatoxins and fumonisins in maize-based foods in Latin America: Guatemala as a case study*. *World Mycotoxin Journal*, 8(2), 143–159. <http://doi.org/10.3920/WMJ2014.1736>
- Schmale, D. y G. Munkvold. (2014). *Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Health*. Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Mycotoxins/Pages/EconomicImpact.aspx> [Con acceso en línea 7/9/2016].
- Schnable, P. *et al.* (2009). *The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics*. *Science*. DOI: 10.1126/science.1178534
- USDA (2014) *Corn production 2013/2014*. Disponible en: <http://www.fas.usda.gov> [Con acceso en línea 8/5/2016]
- Valdes, B. (2007) *Aplicación de diferentes técnicas analíticas para evaluar la contaminación fúngica de alimentos y superficies*. Disponible en línea: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5690/bevd1de1.pdf?sequence=1> [Con acceso en línea 8/5/2016]
- Varshney, R., Graner, A. y Sorrells, M. (2005). *Genic microsatellite markers in plants: features and applications*. ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>
- Ven, S. y Rani, A. (2012). *Discriminatory power of agarose gel electrophoresis in DNA fragments analysis*. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. InTech. Malasia. 346 pp.
- Xie, T y S. Ho (1997). *High resolution single strand conformation polymorphism analysis using formamide and ethidium bromide staining*. *Mol Path* 50: 276-278 doi: 10.1136/mp.50.5.276
- Yates, I.E., J. Arnold, D.Hinton, W. Basinger y Walcott, R. (2003). *Fusarium verticilloides induction of maize seed rot and its control*. *Canadian Journal of Botany*. DOI: 10.1139/B03-034
- Yin, T; Q. Chang, Y. Bin. (2006) *An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels*. *Electrophoresis* 28, 1173-1175.
- Zila, C., Samayoa, F., Santiago, R., Butrón, A., y Holland, J. B. (2013). *A Genome-Wide Association Study Reveals Genes Associated with Fusarium Ear Rot Resistance in a Maize Core Diversity Panel*. *G3 Genes, Genomes, Genetics*, <http://doi.org/10.1534/g3.113.007328>
- Zila, C., Ogut, F., Romay, M., Gardner, C., Buckler, E., y Holland, J. (2014). *Genome-wide association study of Fusarium ear rot disease in the U.S.A. maize inbred line collection*. *BMC Plant Biology*. DOI 10.1186/s12870-014-0372-6.

## XI. ANEXOS

### Recetas de soluciones a utilizar

Se usarán las siguientes recetas para cada solución:

*Cuadro 1A. Soluciones a utilizar en extracción y electroforesis*

Reactivo/ Solución	Solución amortiguadora de extracción Chabi	Extracción	TAE50X
SDS	1%	-	-
NaCl	0.5M	-	-
Isopropanol	-		-
Etanol	-	70%	-
Ácido acético glacial	-	-	5.71mL
Tris-base	-	-	242g
EDTA	-	-	18.61g
H <sub>2</sub> O	-		Aforar a 1L
Indicaciones adicionales			Disolver Tris y posteriormente EDTA

A continuación se muestran las secuencias FASTA usadas para el diseño de iniciadores y el resultado de amplificación esperada según el PCR *in silico* realizado.

**SNP 1**

Secuencia FASTA para iniciadores

>Chr1:63539590..63541590

```
gtggcctccacgtctgtgccgccgaggcgtcgtcggcagagccgagctccaccagc
ctgcagctggcggcgggtcgtcgtcgtccccggcgggtggcggcggcacccggctccac
gtggttctgcaggaagtatatgatgtcgttgtagagccgcctcatgtgggccaagct
ccgacagcagcagcaggttgcgcgcggcggagctcccggttgtcctccgacagggtc
gccaggaagtccttattcccgcctggtggcgggttctcctcctggacgacgtggta
gcccgacgtaggatgccgaggcggctgcggcggcggaaagaagaggctgaggtcgt
aaggccgctggtgctgagggagcggcgggtggctgcagcttctgcggcgggttgcgag
cacgacgaggacttctcgggtggatctccgagaggaggtgcttagcggccttctc
gaagaactcgttggcgaactcccacctgtctgccacgatcttctgaaaccctgca
aaaaaaaaatgctacctacttattcttgaaggatgctgcaagttcttcaaatatctag
ttgtcgcaactcacagctcagaagctagtagataaaaatggtataaatcttgggct
attataagccgtttattagtggatgaccccgaagctaaatgaagctatatagcggg
ttatagcccgctaaagggttgttcgggttatatcctaatacctatggattgaggggg
attcagagagtttcaatccctagtaagtcaaatccccttcaatccgtatcaatcc
cctccaatccatattggattgaaaataaccgaacaagccctaaattgtatacggacg
caaaaagattgatctgcctcaacaactacataaggcgttgtagcaggctatagc
ttcagccaggcatttaaaccttggtaaaagttggtgctacatgaagtcactaaca
caataaatatgcaacaagtggtcatgtcaatctcttatctgagaaatg[at]tg]gga
gacaaacatcgctgcaaaaatgtactctctcttcatcggtgcataatgaatgcatg
gtgtgcttgtggttgtccatgagatgaggagggcaagagaagatattgattgctgc
aaaggcaattgtgaaagggttttgggtcgtcttcaaaccatgaaatgaaataatgcagg
tggtacggcaatattatcgctagaagagaactgaggtttcaaatgaaaagaacgt
aaccaattaagcttcagtcctcatcaaaagatccaatgaaataatgggcaaaaataca
gaagatacttataatggttgttcttttgaataggcaggtagccaggaaacagaagca
cagtagctagctagcagtggttatttcaaatacagcaacaagatattggcagtggtc
acatgtctcctctctgtcccacagccagtgcccagaaacaacaacatctctgtc
acgttctaggaaacacgaaaacggaaatgatgaaacgtcgtcaccagcagtcaccac
tcaccaaccaacacaggtagcgcgcagtagtcttaataaaaatcatcagacatgc
attatgcatgtgacactcaccttctcgcccggcccaccgatgccagacgacgctt
gcagggtgcatgcatgcagctaaactgacagcagccacacgctaagatctcagg
cagtcaggctcagcaatgctgctgtggcttcaaatgaaaaaggctatctaccaaga
gcgccaaaaccatagcttcagaaacgtcagagcgcattcgggtggcacacagggtc
gtcgtcgaaaaaagctagagcttccaaatgaaaccaagagcaaaaatggatcaa
acgacgatggagaagctagcgcgcaactaataataacacacgcagataaattaa
atacacactcgatcataacctcagcatgcatgcgccgctaattaatatatatata
atatatatatatatatatatatatatatatacatatattgc
```

**SNP 2**

Secuencia FASTA para iniciadores

```
>Chr5:30996717..30998717
accggttagctatggtgcatcgtgggttttttgcgtttatgccgctgatttgtccg
tccaaattatttctcatcttgatttggttttgctttgcgactgatttgttatta
cattttgtttaatagtactgaataatccgctctggcccttgggtgcattgtaaacc
acatgcttaagcttgattccgctcctctcgctaattacaagtgattttaacatta
ataatatactaaaaactgaagtacaccatttaaaatattaanaatatttatcat
aaacaaatgatttgtgtaatcttacattagtagtgatgtacaatgataaatttaa
ttaatattaaaaagtataatttcgaatacattagattattggaggttttagagcca
aaatataaataatacttaataaacaanaaagattataattagagtcanaaataa
atacaaggataaataaacagtgacttgatgattttataaagtactttgtacttcc
ataggggtgggttacttatgtgcatgggtacttgcgtcacgcagtttgaataaana
aanaaaaaataatctagatgaataaanaaatcggtcanaaaaaanaaaactag
atgaaaaanaaatctgggcggaanaatcagcgacanaaacgaaaaatataagana
anaaaaaanaaattagtgataaaaaaatacgtccacgatggagcttgaaccana
ccttaagttanaaagtcttgcactctaccgactgagctagacatactttgttgta
catatccgagcccggcgccatagatcttggcgccgagctcggtaaccagttggcg
cacgtcgttcagggtgggcccagcgtagcacgcacctcggcgccatagcctatggcg
tcgagctgtgttacctcggcgccatgggctatggcgccgagcnaagggtcnaaaa
tgacattanaaattttctaagggtcnaaacgtgaattttttccgagt[agg]gcta
aaatanaaaaaatcgggtctccctatgggtgctggcaccatcgctgcgatggcna
agtacttgcccgattgacacgattactcttgattcgctgatattaattttgtcat
tgattcgctaatattaattttttcatgctagttatgctcagactagctgtagcgtg
ctgcgtgcaacccttccatagcactattgtgcttgtggcggtataatactanaac
aaacgacgcgacgctcacccttaaacgtgctacnaatgtgagggggtgcaacnaatg
aacgcnaaataatagggtagcggcccttgcgtgaatttaacgtgcacgtcaatggt
tgttagttagaganaaataganaaataatgatgatganaatanaatganaaanaata
atgattgtagtggggaataggggagaaatcgaggggaaatcgctgcggaaggaga
aaagtagggggtanaatctagggtgacgtgacanaaagtaggataatgagaganaat
tagaggnaaccggttgcaganaaatcttaacgattgctatagcgttgaaggttgaga
taccgatacatagtagtataagagttgtttctactaccctgagcccaggacgaagg
tgggcataatgtagagagtgccggcgacatctgtctatagcaccacacgtgacnaatg
aganaaagagacanaatgagaagaggaganaatanaanaaagggcaattatgacca
tatttggagcaacnaatagtttctanaaagatttagtttttaganaactggttanaatagtg
tttggnaaccacctcagttttcanaaactggctttaggccctatttaanaagcgcana
attttttaanaaataggtttataganaacnaatcagttttanaactcagtttanaanaat
tagactatcagtttcttaanaaactanaagagcttgtctctctaganaanaaacttgt
```

ttcttaaaaacttggttgcttacaacatattcttagctaggc

### SNP 3

Secuencia FASTA para iniciadores

>Chr9:151294233..151296233

```

ttgatctcttggtggttattatggttttggtgagactcctctctagccacttggcatt
attgtgctagcgcctaatacaagtttttggtgattaagtctcaagttcacaggatc
acctattcaccctctctaggtgctctcaacaacgctagccgggaacgacgatat
gatgatgcaaggtccctcccaccaccaaggcagccggagcctgggccaatatgcag
aagcatgggtacaccctcttttttatttaggtatataagcactggattagatattat
ttctaactatctcgttggttttcttgcaagtcggcgctcacatggtggccggccttgc
tccaccttctcgggtctatgctatggcccataagggcaaggcgacgctcgaatgtcac
ctacaaccagatgacgggcccaggccctacccaaccctcgtcgtctacaaccgcc
ttcacgactacacggccatggcgcaggagggtccatggcccagactatggtccgagc
accgagccgatcgaccccgatgtgctcatgagggtgggaggaggcaagagacatgg
gcggtactggattgccgacgagacaatacaactcgtcctccactccactctgtcta
aggtgagagcaaggagcagggctcgagtcagccatacgacctcagcacgacagc
tcacaacatcgcatacagcaactcgtgggttagtgcttctgtaactcgtcattcctt
gagttataaccttctctttgagttactataagttggcttgtaataattacagacc
aactagaagaagagaggagggaacgctcaagagatggaggcgaggataatggcggag
cgggcccggcgtgatcagaggatggcggagatggtctagtagcatgacagagccttga
cgccgcacaggggttctcgtccaccacctccattgtccctgcagtgaccctgctc
agttccatactcctgtgagatcaaaattgtagttacatggttggtaa [tgca]tct
ggtataacacatgcaatctcttctctgtgagggccaatctggggcggcatccaac
aacctcatgaagggttcagcccaatgacagcaccagtcgaaccgtccacctccatg
agtgttatggttttagtggttagacttcagaacttggtggtgaatacttatggttgt
gttgatacttatgtcagagcttgagacttatgagacttatggttgtggttgatac
ttgtggtgaatacttatggttgtgatggatatttatggttgtggttgataatttatg
tttgtgatgatatctgtgatgtataatgtgatatatgtgatgtataatgtggtatc
tttgttgggttggaatgaaataaaaaacaaataaaaagggtgtatactggtcact
ttgccgagtggttacactcggcaagagggtgctttgacgagtgtaggggcatggca
ctcggcaaagaaccaagacctgggcaccggtataggttctttgccgagtgtagtggtg
ctctgacactcggcaaagaaccagctttgcccagtgccataaccaggcactcaaca
aagtacttgacaaggggaccctctgggtggactctttgccgagttctgtcaggcag
acactcggcaaagcgaactgctttgccgagtgtagcccggggactcggcaaagac
tccgtctccatcaccgtcgccgtaatggctgtttctttgttgagtgtctctggtg
cactcagcaaacactttgcccagtgcccagaaaaagtagctcggcaaagacggct
ttgccgatgcaactgtatgccgagccctatttgcccagtgtagcactcggcaaagag
tttgcccagtggttttaagctttgccgagtgcttcgggactcggcaaagcctgctg

```



**PCR *in silico* (<http://genomaize.org/cgi-bin/hgPcr?command=start>)****SNP 1**

>[chr1:63537210+63537386](#) 177bp TGGTAAAAGTTGGTGCTACATGA  
 CCCTCCTCATCTCATGGACA  
 TGGTAAAAGTTGGTGCTACATGAagtcactaacacaataaataatgcaaca  
 agtggtcatgtcaatctcttctatctgagaatgattgggagacaaacatcgc  
 tgcgaaaatgtactctctcttcatcgggtgcataatgaatgcatggtgtgc  
 ttgtggtTGTCATGAGATGAGGAGGG

>[chr1:63536771+63537370](#) 600bp GCCACGATCTTCCTGAAACC  
 GACAACCACAAGCACACCCAT  
 GCCACGATCTTCCTGAAACCctgcaaaaaaaaaatgctacctacttattctt  
 gaaggatgctgcaagttcttcaaataatctagttgtcgcaactcacagctc  
 agaagctagtagatgataaaatggtataaaatcttgggctattataagccgtt  
 tattagtgatgaccccgaagctaaatgaagctatatagcggattatagc  
 ccgctaagggttgttcggttatatcctaatacatatggattgaggggga  
 ttcagagagtttcaatccctagtaagtcaaaatcccctcaatccgtatc  
 aatcccctccaatccataatggattgaaaataaccgaacaagccctaaatt  
 gtatacggacgcaaaaagattgatctgcctcaaacaactacatataggcg  
 ttgtagcaggctatagcttcagccaggcatttaaaccttggtaaaagtt  
 ggtgctacatgaagtcactaacacaataaataatgcaacaagtgttcatgt  
 caatctcttatctgagaatgattgggagacaaacatcgctgcgaaaatgt  
 actctctcttcatcgggtgcataatgaatgcATGGTGTGCTTGTGGTTGTC

**SNP 2**

>[chr5:30977770+30977961](#) 192bp CGTCGAGCTGTGTTACCTC  
 AATCGTGTCAATCGGGCAAG  
 CGTCGAGCTGTGTTACCTCggcgccattggctatggcgccgagcaaaagg  
 tccaaaaatgacattaaaatcttctaaggtccaaacgtgaatttttttcc  
 gagtaagggtctaaaataaaaaatcgggtctccctatggtgctggcacc  
 atcgcctgcgatggccaaagtaCTTGCCCGATTGACACGATT

>[chr5:30977020+30977961](#) 942bp GGCCCTTGGTGCATTGTAAA  
 AATCGTGTCAATCGGGCAAG  
 GGCCCTTGGTGCATTGTAAAccccacatgcttaagcttgattccgtcctc  
 tcgctaattacaagtgatttttaaacattaaataataactaaaaactgaa  
 gtacaccatttaaaaatattaaaaatatttatatcataaacaatgatgt

gttaatcttacattagtagtgatgtacaatgataaattttaattaatatt  
 aaaagtaataatttcgaatacattagattattggagtttagagtcctaaa  
 atataaatatacttaataaacaaaaagattataattagagtcctaaaat  
 aatatacaaggtataaaataaacagtgacttgatgattttataaagtact  
 ttgtacttccataggggtgggttacttatgtgcatggacttgcgctcagc  
 agtttgaataaacaaaaaacaaaaatatctagatgaataaataatcgg  
 cacaaaaaacaaaaaaactagatgaaaaataaatctgggcggacaaatc  
 agcgacataaacgaaaaattatagacaacaaaaaacaaattagtgataa  
 aaaaatacgtccacgatggagcttgaaccacaaccttaaagttaaaagt  
 cttgcactctaccgactgagctagacatactttgttgttacatattccgag  
 cccggcgccatagatcttggcgccgagctcggtagccacgttggcgccag  
 tcgttcaggttgggcccagcgtagcagcacctcggcgccatagcctatgg  
 cgtcgagctgtgttacctcggcgccattggctatggcgccgagcaagg  
 tccaaaaatgacattaaaattttcctaaggtccaacgtgaattttttcc  
 gagtaagggtctaaaaataaaaaattcgggtctccctatggtgctggcacc  
 atcgctgcgatggccaaagtaCTTGCCGATTGACACGATT

### SNP 3

>[chr2:225183474+225183667](#) 194bp GTACATGCAGAGCCTTGACG  
 CATGAGGGTTGTTGGATGCC

GTACATGCAGAGCCTTGACGccgcacagggtttcacttcgccacctccat  
 tgttccctgcagttgacctgctctgttccatactcctgtgagtatcaaa  
 attgtagttagatggttggtattgcatctgggtataacacatgcaatctctt  
 ctctgtgcagggccaatctgggggGGCATCCAACAACCCTCATG

>[chr4:198815637+198815830](#) 194bp GTACATGCAGAGCCTTGACG  
 CATGAGGGTTGTTGGATGCC

GTACATGCAGAGCCTTGACGccgcacagggcatcgctccgccacctccat  
 tgttccctccagttgacctgctctcttccatactcctgtgagtatcaaa  
 attgtagttagattttggtaatgcatctgggtataacacatgcaatctctt  
 ctctgtgcagggccaatcttggggcGGCATCCAACAACCCTCcgG

>[chr9:151028697+151028890](#) 194bp GTACATGCAGAGCCTTGACG  
 CATGAGGGTTGTTGGATGCC

GTACATGCAGAGCCTTGACGccgcacagggtttcgctccaccacctccat  
 tgttccctgcagttgacctgctcagttccatactcctgtgagtatcaaa  
 attgtagttacatggttggtaatgcatctgggtataacacatgcaatctctt  
 ctctgtgcagggccaatcttggggcGGCATCCAACAACCCTCATG

>[chr1:18882432-18882624](#) 193bp GTACATGCAGAGCCTTGACG  
 CATGAGGGTTGTTGGATGCC

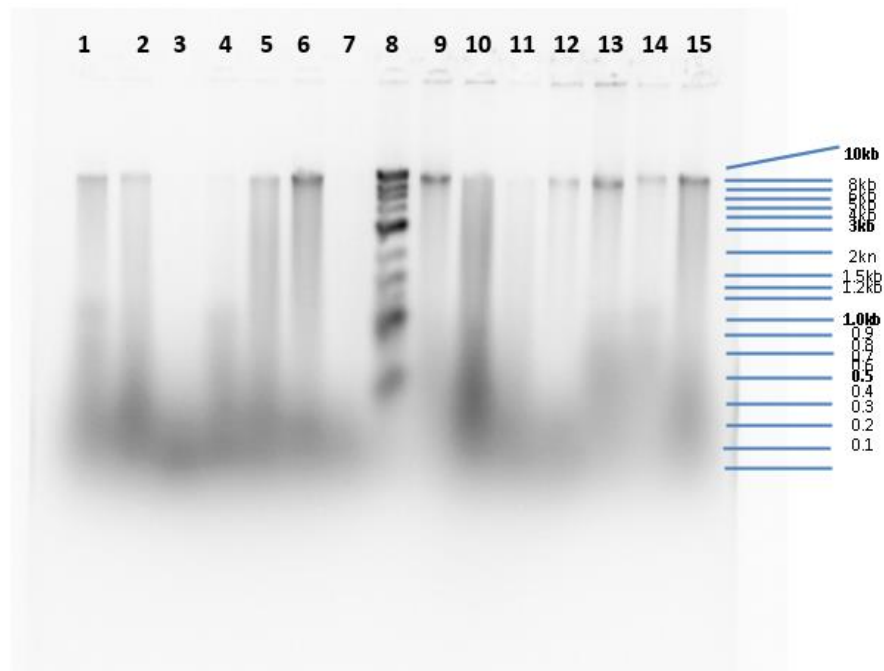
GTACATGCAGAGCCTTGACGccacacaagggtttcgctccaccacctccat  
 tgttccctacagctgacctgctctgttccatactcctgtgagtatcaaa

attctagtagatgttggtaatgcatctggcgtaacacatgcaatctcttc  
 tccgtgcagggacaatctgagggcGGCATCCAACAACCCtATG  
 >[chr4:226836605-226836798](#) 194bp GTACATGCAGAGCCTTGACG  
 CATGAGGGTTGTTGGATGCC  
 aTACATGCAGAGCCTTGACGtcgcacagggttttgctccgccacctctat  
 tgttccctacaatggacctgctctattccatactcctgtgagtatcaaa  
 attgtagttagatgttggtaatgcatctgttataacacatgcaatctctt  
 ctctgtgcagggctaactgggggcGGCATCCAACAACCCTCATG

>[chr9:151028697+151029641](#) 945bp GTACATGCAGAGCCTTGACG  
 GCAAATAGGGCTCGGCATAC  
 GTACATGCAGAGCCTTGACGccgcacagggtttcgctccaccacctccat  
 tgttccctgcagttgacctgctcagttccatactcctgtgagtatcaaa  
 attgtagttacatgttggtaatgcatctggtataacacatgcaatctctt  
 ctctgtgcagggccaatctggggcggcatccaacaacctcatgaagggt  
 tcagcccaatgcagcaccagtcgaaccgtccacctccatgagtgtatgt  
 ttttagtgtttagacttcagaacttggtggaatacttatgtttggttg  
 gatacttatgtcagagcttgagacttatgagacttatgtttggttgat  
 acttggttggaatacttatgtttggtgatggataatttatgtttggttgga  
 tatttatgtttgatgatactgtgatgtatatagtgatataatgtgat  
 gtatatgtggtatctttgtttggttgatgaaatataaaaaacaaataa  
 aaagggtgatactggtcactttgccgagtggtacactcggcaaagagggtg  
 ctttgacgagtgtcaggggcatggcactcggcaaagaaccaagacctggg  
 caccggtataggttctttgccgagtgtagtggctctgacactcggcaaag  
 aaccacgctttgccgagtgccataaccaggcactcaacaagtaacttgaca  
 aggggacccctctggtggactctttgccgagttctgtcaggcagacactc  
 ggcaaagcgaaactgctttgccgagtgctgccggggcactcggcaaagac  
 tccgtctccatcaccgctgccgtaatggctgttttctttggttgagtgct  
 ctctggcactcagcaaaccactttgccgagtgcccgagaaaaagtaactcg  
 gcaaagacggctttgccgatgcaactGTATGCCGAGCCCTATTTGC

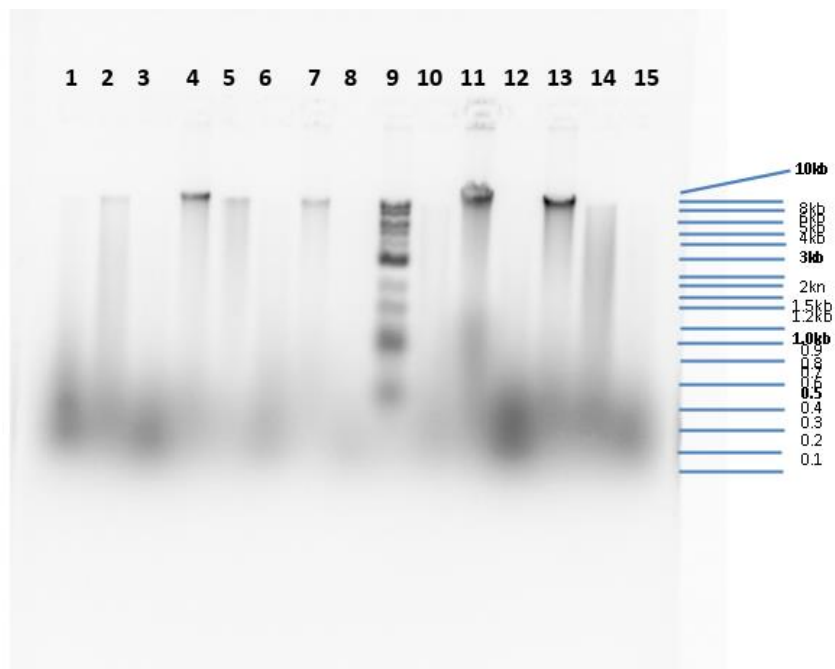
A continuación se muestran las figuras de los geles de integridad para las extracciones con método de Edwards en muestras de hojas y semillas.

**Figura 1A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de hojas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



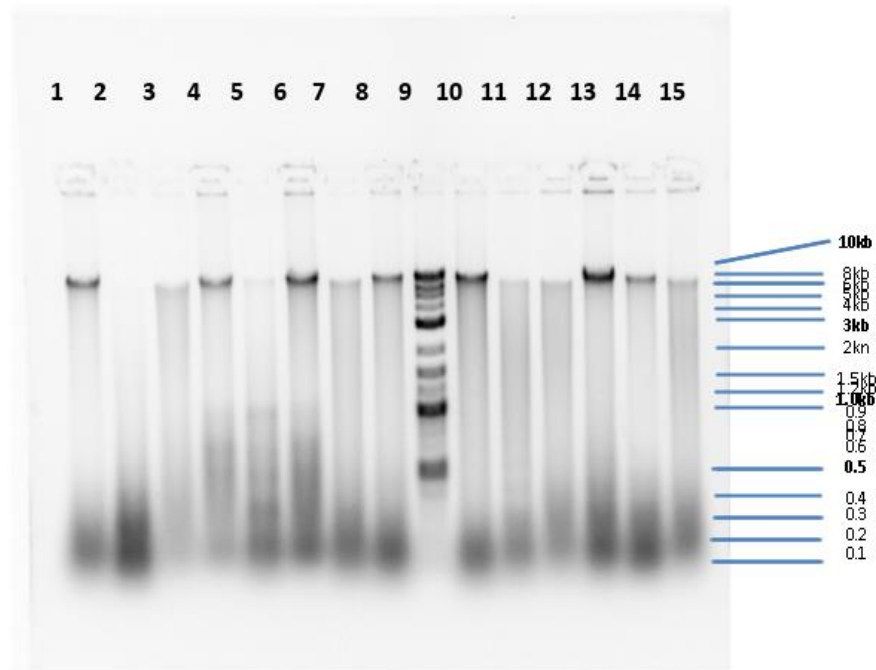
Muestras: 1: muestra 4 , 2: muestra 5, 3: muestra 6, 4: muestra 7, 5:muestra 8,  
6: muestra 9, 7:muestra 10, 8: Escalera, 9: muestra 11, 10: muestra 12, 11: muestra 13,  
12:muestra 14, 13: muestra 15, 14: muestra 16, 15: muestra 17

**Figura 2A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de hojas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



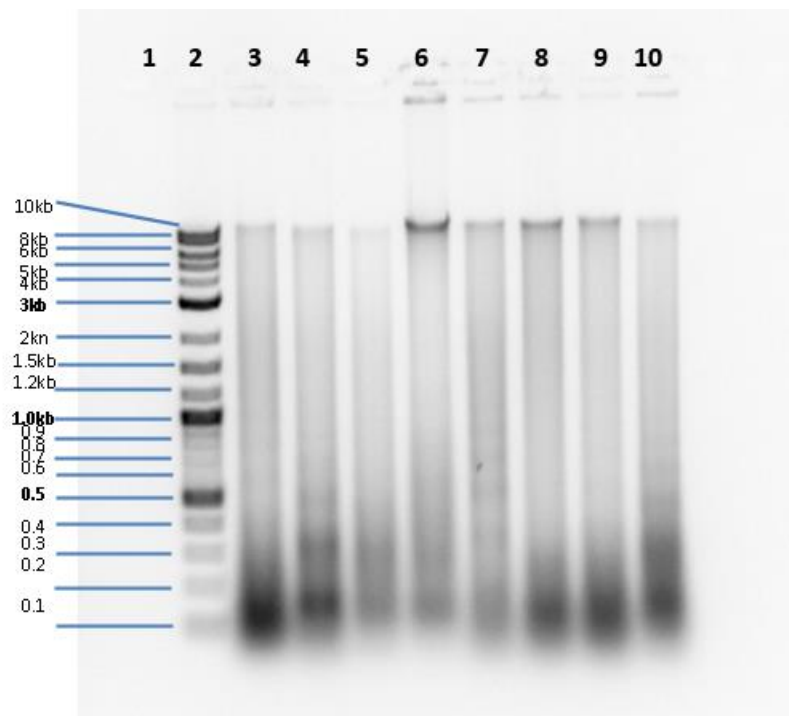
Muestras: 1: muestra 18, 2: muestra 19, 3: muestra 20, 4: muestra 21, 5: muestra 22, 6: muestra 23, 7: muestra 24, 8: Escalera, 9: Escalera, 10: muestra 26, 11: muestra 27, 12: muestra 28, 13: muestra 29, 14: muestra 30, 15: muestra 31

**Figura 3A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de hojas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



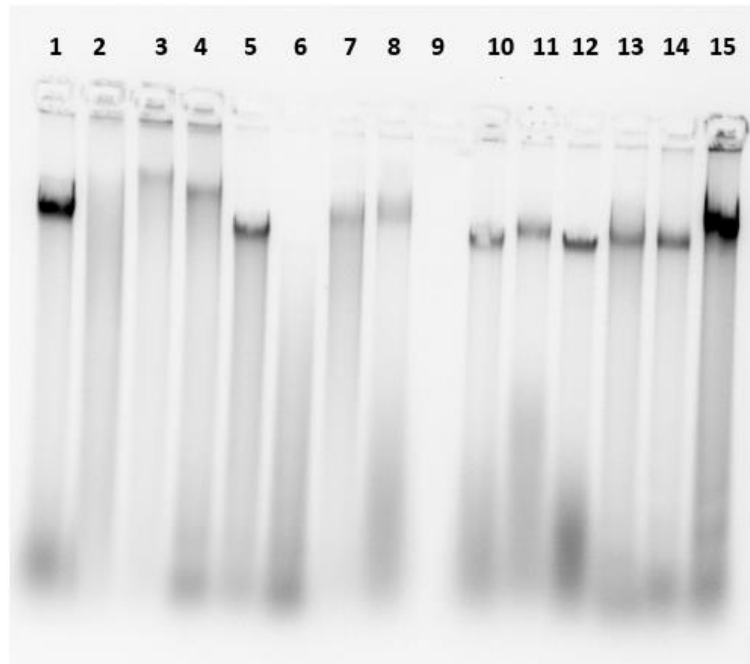
Pozos: 1: muestra 39 , 2: muestra 32, 3: muestra 33, 4: muestra 34, 5: muestra 35,  
6: muestra 36, 7: muestra 37, 8: muestra 38, 9: Escalera, 10: muestra 40, 11: muestra 41,  
12: muestra 42, 13: muestra 43, 14: muestra 44, 15: muestra 45

**Figura 4A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de hojas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



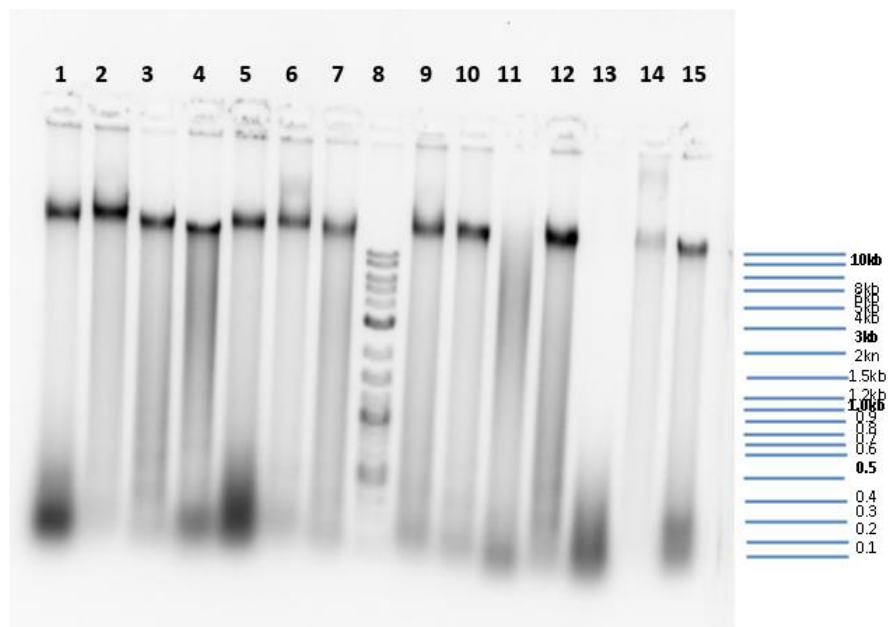
Pozos: 1: / , 2: Escalera, 3: muestra 46, 4: muestra 47, 5: muestra 48, 6: muestra 49, 7: muestra 50, 8: muestra 51, 9: muestra 52, 10: muestra 53

**Figura 5A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



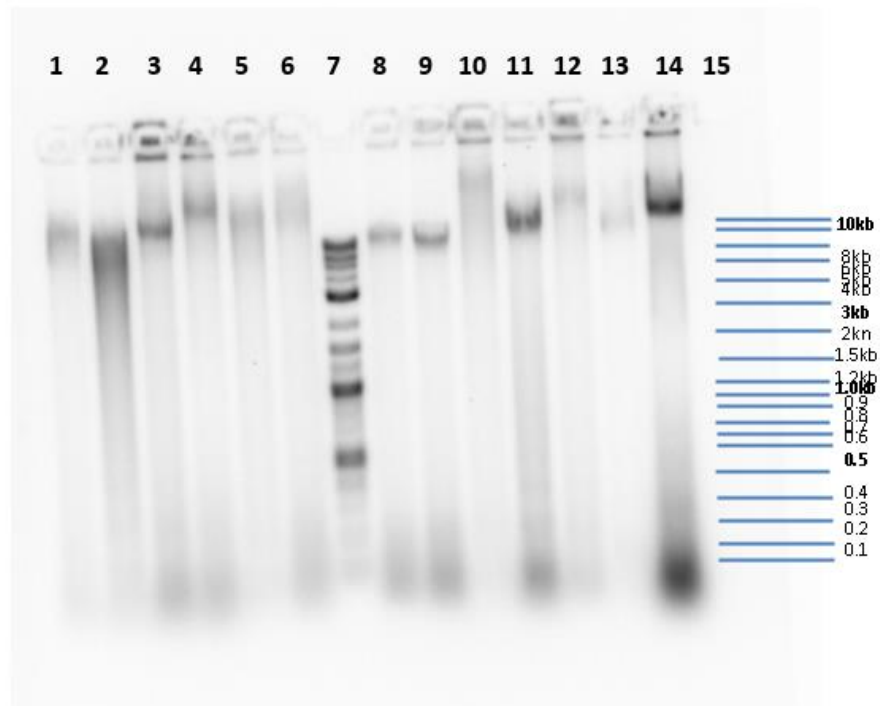
Pozos: 1: muestra 54, 2: muestra 55, 3: muestra 56, 4: muestra 57, 5: muestra 59,  
6: muestra 61, 7: muestra 62, 8: muestra 63, 9: /, 10: muestra 64, 11: muestra 65, 12:  
muestras 66, 13: muestra 67, 14: muestra 68, 15: muestra 69

**Figura 6A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



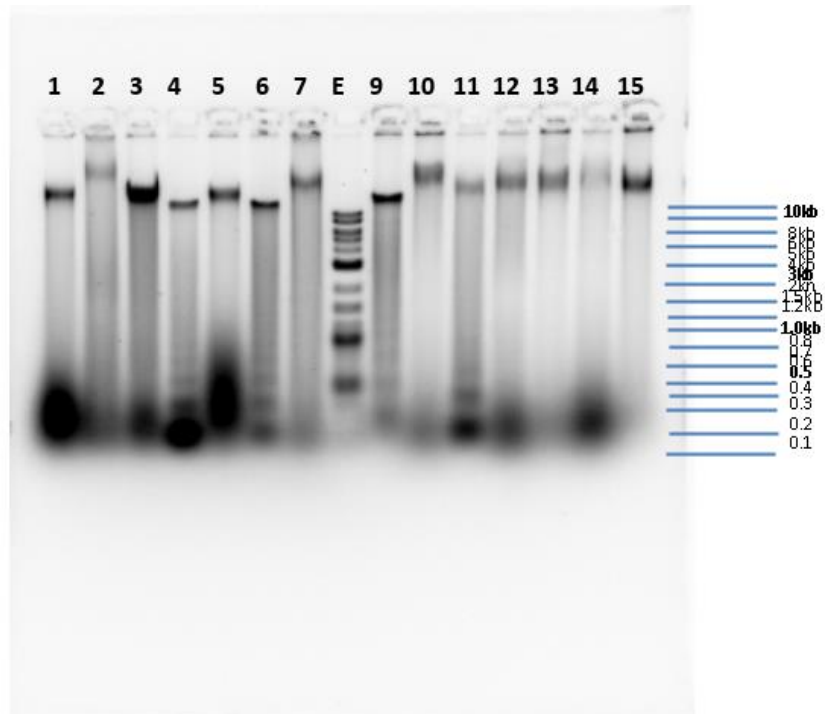
Pozos: 1: muestra 70 , 2: muestra 71, 3: muestra 72, 4: muestra 73, 5: muestra 74,  
6: muestra 75, 7: muestra 76, 8: Escalera, 9: muestra 77, 10: muestra 78, 11: muestra 79,  
12: muestra 80, 13: muestra 81, 14: muestra 82, 15: muestra 83

**Figura 7A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



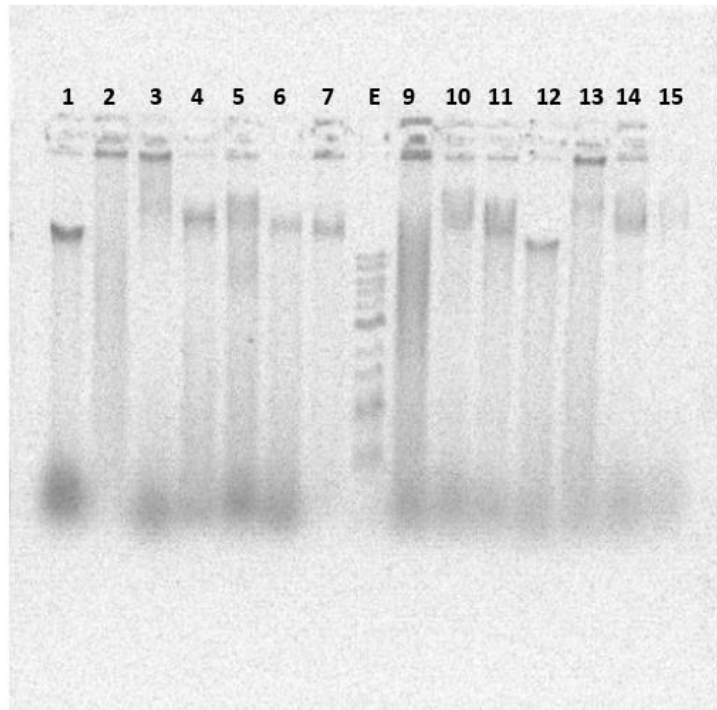
Pozos: 1: muestra 84 , 2: muestra 85, 3: muestra 86, 4: muestra 87, 5: muestra 88,  
6: muestra 90, 7: escalera, 8: muestra 91, 9: muestra 92, 10: muestra 93, 11: muestra  
94, 12: muestra 95, 13: muestra 97, 14: muestra 98, 15: /

**Figura 8A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



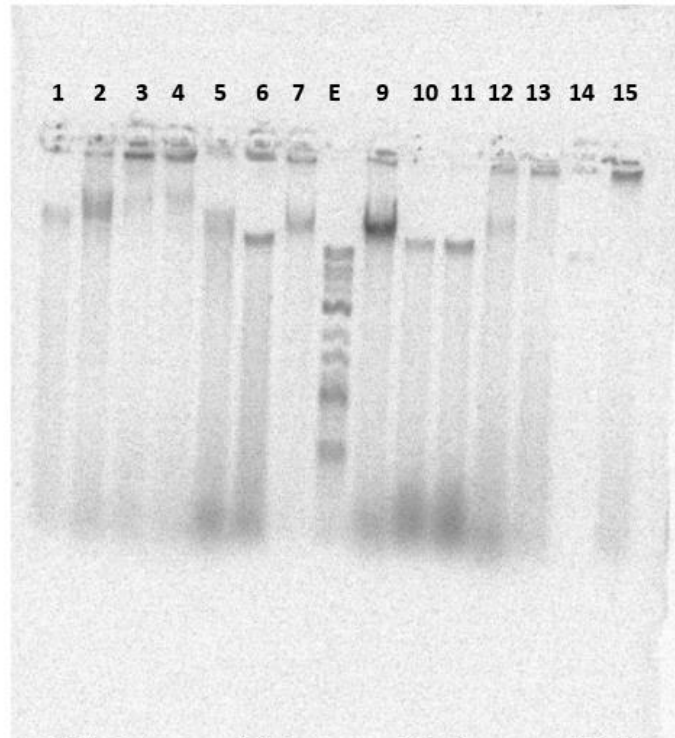
Pozos: 1: muestra 99 , 2: muestra 100, 3: muestra 101, 4: muestra 103, 5: muestra 104,  
6: muestra 105, 7: escalera, 8: muestra 106, 9: muestra 107, 10: muestra 108, 11:  
muestra 109, 12: muestra 110, 13: muestra 111, 14: muestra 113, 15: muestra 114

**Figura 9A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



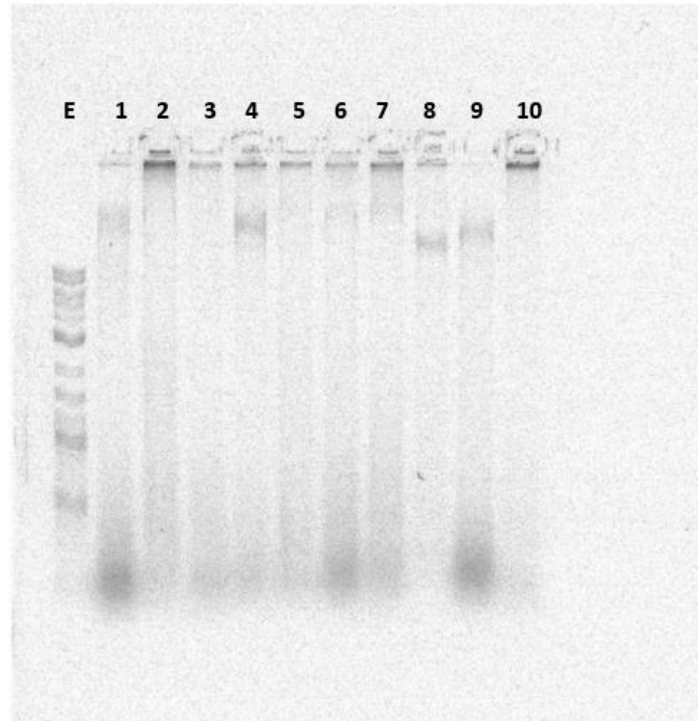
Pozos: 1: muestra 96 , 2: muestra 102, 3: muestra 112, 4: muestra 115, 5: muestra 116,  
6: muestra 117, 7: muestra 118, 8: escalera, 9: muestra 119, 10: muestra 120, 11:  
muestra 121, 12: muestra 122, 13: muestra 123, 14: muestra 124, 15: muestra 125

**Figura 10A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



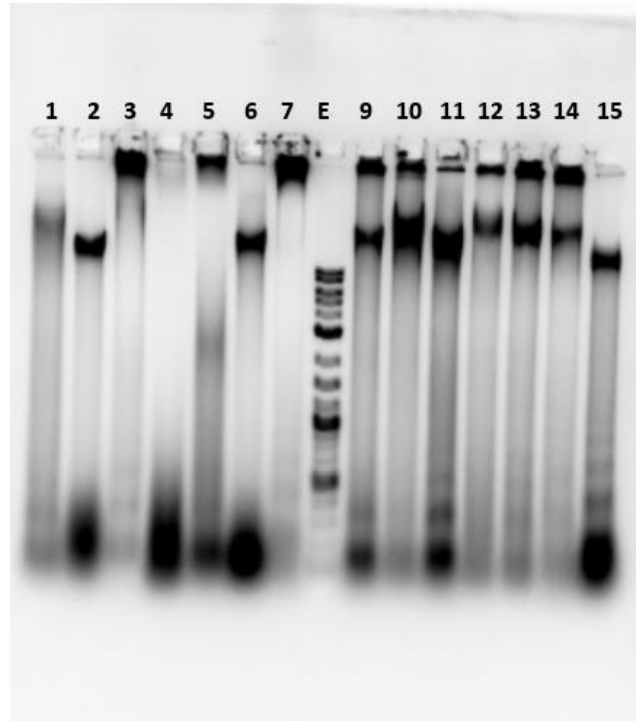
Pozos: 1: muestra 126 , 2: muestra 127, 3: muestra 128, 4: muestra 129, 5: muestra 130,  
6: muestra 131, 7: muestra 132, 8: escalera, 9: muestra 133, 10: muestra 134, 11:  
muestra 135, 12: muestra 136, 13: muestra 137, 14: muestra 138, 15: muestra 139

**Figura 11A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



Pozos: E: escalera molecular, 1: muestra 140, 2: muestra 141, 3: muestra 142, 4: muestra 143, 5: muestra 144, 6: muestra 145, 7: muestra 146, 8: muestra 147, 9: muestra 148, 10: muestra 149

**Figura 12A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



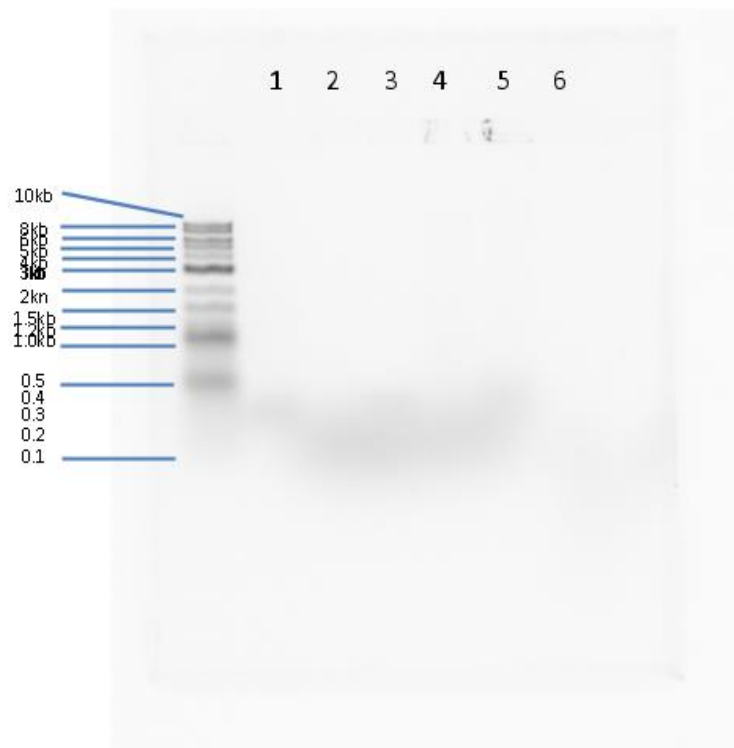
Pozos: 1: muestra 150, 2: muestra 151, 3: muestra 152, 4: muestra 153, 5: muestra 154, 6: muestra 155, 7: escalera, 8: muestra 156, 9: muestra 157, 10: muestra 158, 11: muestra 159, 12: muestra 160, 13: muestra 161, 14: muestra 162, 15: muestra 163

**Figura 13A.** Gel de integridad 1% ADN genómico de semillas de maíz, extraído con método de Edwards. Peso estimado 10kb.



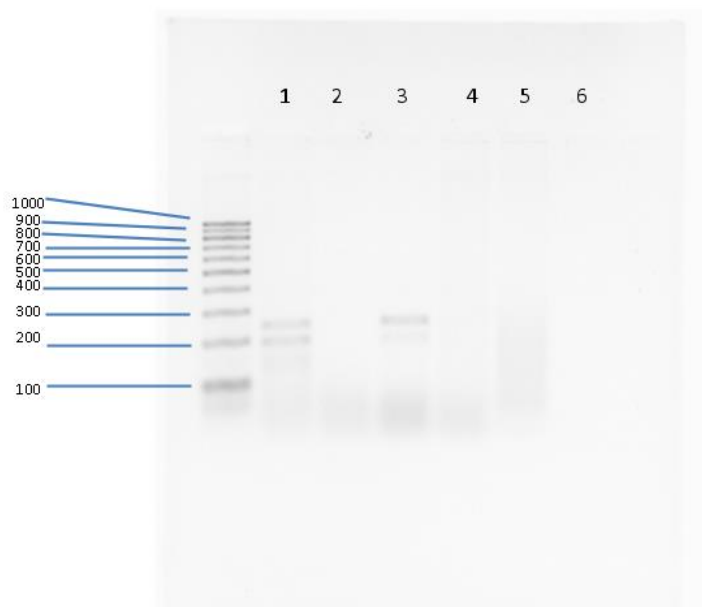
Pozos: E: escalera molecular, 1: muestra 164, 2: muestra 165, 3: muestra 166, 4: muestra 167, 5: muestra 168, 6: muestra 169, 7: muestra 170, 8: muestra 171

**Figura 14A.** Gel de PCR 1% iniciadores SNP 1(8481\_82). Tm 52°C



Muestras: 1: muestra 1 , 2: muestra 2, 3: muestra 3, 4: muestra 58, 5:muestra 60,  
6: control negativo

**Figura 15A.** Gel de PCR 2% iniciadores SNP 1(8481\_82). Tm 52°C.  
Peso estimado entre 200-300pb.

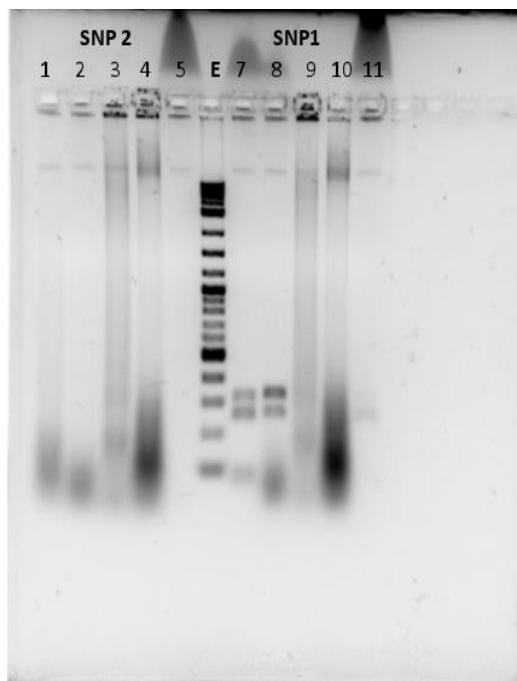


Muestras: 1: muestra 1, 2: muestra 2, 3: muestra 3, 4: muestra 58, 5: muestra 60,  
6: control negativo

**Figura 16A.** Gel de PCR 2% iniciadores SNP 1(8481\_82). Tm 54°C. Peso  
estimado entre 200-300pb.



**Figura 17A.** Gel de touch PCR 2% iniciadores SNP 1(8481\_82).  
*T<sub>m</sub> 54°C. Peso estimado para SNP 1 entre 200-300pb.*



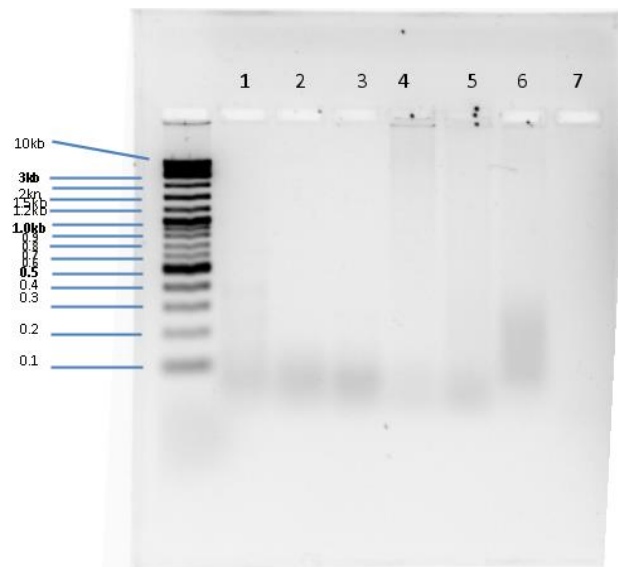
Pozos: 1: muestra 1, 2: muestra 3, 3: muestra 57, 4: muestra 64, 5: control negativo, 7: muestra 1, 8: muestra 3, 9: muestra 57, 10: muestra 64, 11: control negativo

**Figura 18A.** Gel de PCR 2% iniciadores SNP 2(8471\_72). Tm 52°C.



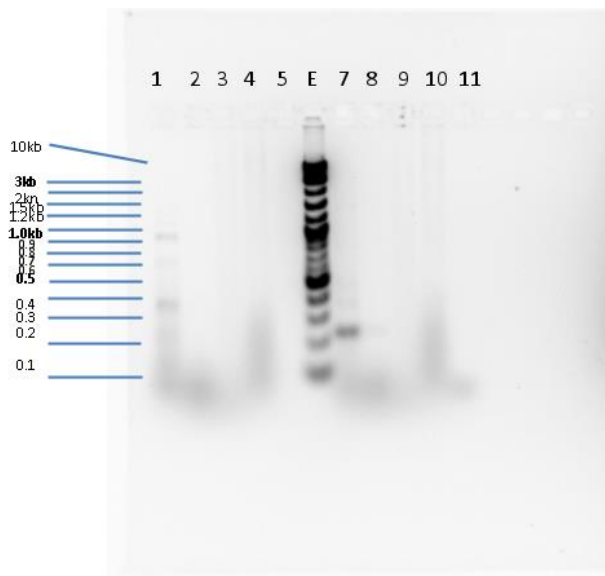
Pozos: 1: muestra 1, 2: muestra 2, 3: muestra 3, 4: muestra 54, 5: muestra 58, 6: muestra 59, 7: control negativo

**Figura 19A.** Gel de PCR 2% iniciadores SNP 2(8471\_72). Tm 54°C.



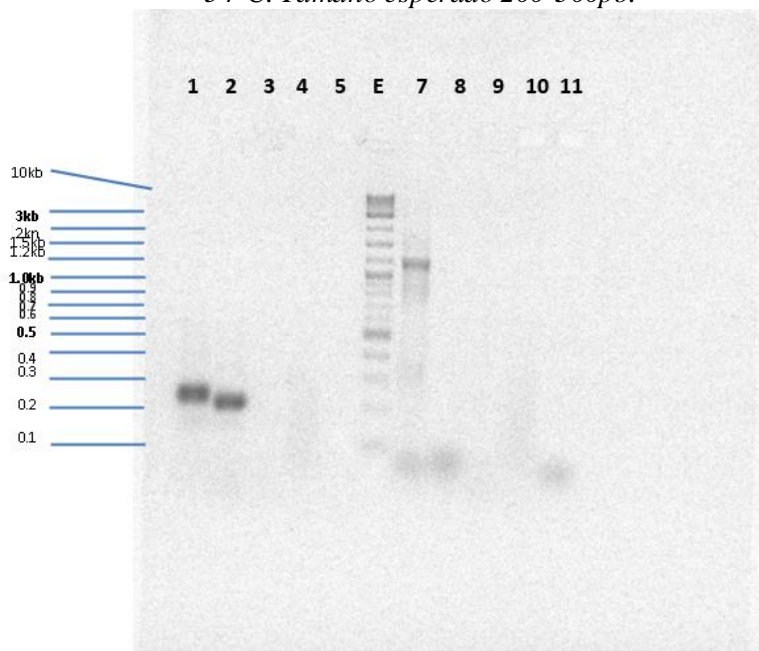
Pozos: 1: muestra 1, 2: muestra 2, 3: muestra 3, 4: muestra 54, 5: muestra 58, 6: muestra 59, 7: control negativo

**Figura 20A.** Gel de PCR 2% iniciadores SNP 2(8471\_72 y 8473\_74). Tm 50°C. Tamaño esperado 200-300pb. No se muestran bandas claras en muestras esperadas.



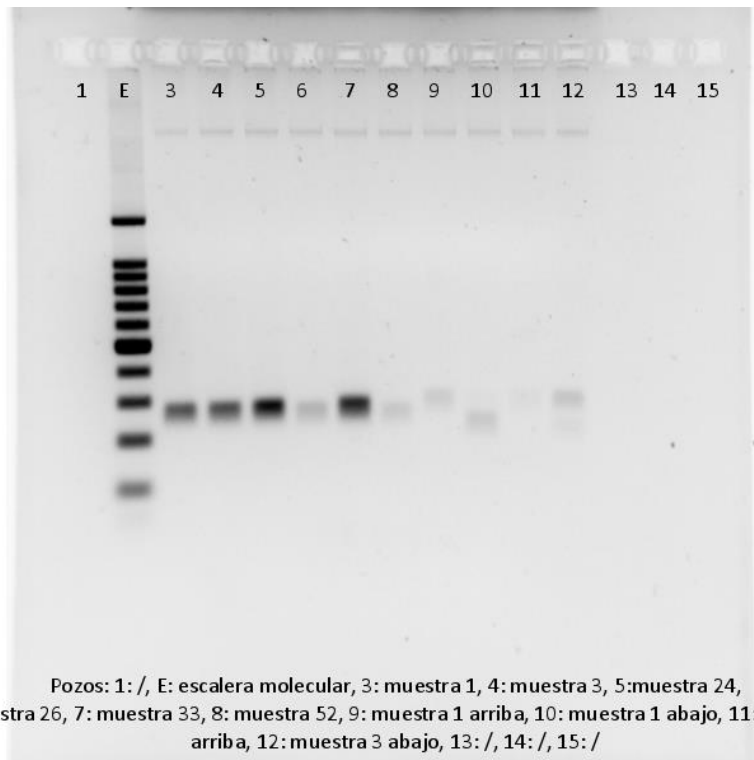
Pozos: 1: muestra 1, 2: muestra 3, 3: muestra 58, 4: muestra 60, 5: control negativo, 7: muestra 1, 8: muestra 3, 9: muestra 58, 10: muestra 60, 11: control negativo

**Figura 21A.** Gel de PCR 2% iniciadores SNP 3(8475\_76 y 8477\_78). Tm 54°C. Tamaño esperado 200-300pb.

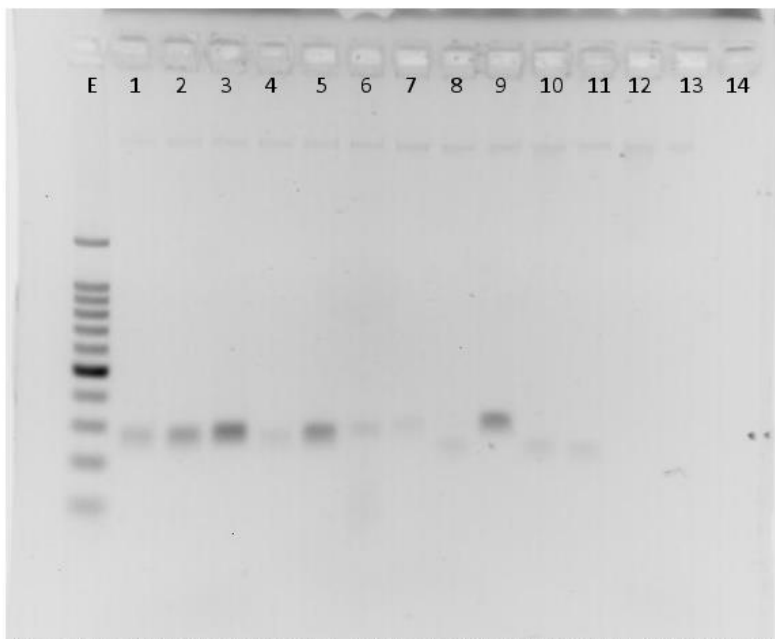


Pozos: 1: muestra 1, 2: muestra 3, 3: muestra 58, 4: muestra 60, 5: control negativo, 7: muestra 1, 8: muestra 3, 9: muestra 58, 10: muestra 60, 11: control negativo

**Figura 22A.** Gel 2% de productos purificados de PCR. Los pozos 9, 10, 11, 12, son amplicones para SNP 1. Los pozos 3, 4, 5, 6, 7, 8, son amplicones para SNP 3. El tamaño estimado es de 200-300pb.



**Figura 23A.** Gel 2% de productos purificados de PCR. Los pozos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, son productos re-purificados. Los pozos 9, 10, 11, son amplicones para SNP 2. El tamaño estimado es de 200-300pb.



Pozos: 1: muestra 1, 2: muestra 3, 3: muestra 24, 4: muestra 26, 5: muestra 33, 6: muestra 52, 7: muestra 1 arriba, 8: muestra 1 abajo, 9: muestra 33, 10: muestra 48, 11: muestra 54, 12: gel, 13: buffer elución, 14: buffer unión

A continuación se muestra la clasificación de las muestras trabajadas:

*Cuadro 3A. Muestra elegidas aleatoriamente para realizar PCR*

Muestras hojas PCR aleatorias	
Aleatorio #filas no setup.org	Muestras
3	1
4	3
5	4
7	8
8	9
9	12
10	15
11	19
13	22
14	23
15	24
16	25
17	26
18	27
19	28
21	30
22	31
24	33
26	35
28	37
29	38
32	41
33	42
35	44
38	47
39	48
42	51
43	52
44	53
45	54

A continuación se muestra la cuantificación y pureza de las muestras trabajadas:

*Cuadro 4A. Cuantificación y pureza de todas las muestras*

<b>Muestras método Edwards</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Pureza (A260/A280)</b>
1	15	2.0100
2	14	1.6300
3	22	2.5800
4	24	2.3200
5	16	2.7200
6	18	2.3900
7	6	-
8	19	2.6100
9	31	2.3900
10	0	-
11	4	-
12	30	2.3700
13	9	3.5000
14	14	3.1200
15	27	2.4900
16	3	-
17	17	2.7500
18	17	2.6800
19	19	2.5400
20	19	2.5000
21	10	3.5500
22	19	2.5800
23	22	2.4200
24	20	2.6000
25	17	2.5800
26	510	2.3182
27	1060	2.3297
28	810	2.3478
29	715	2.3065
30	530	2.3043
31	640	2.3273
32	820	2.3768
33	1175	2.3267

*Continuación Cuadro 4A. Cuantificación y pureza de todas las muestras*

<b>Muestras método Edwards</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Pureza (A260/A280)</b>
34	695	2.3167
35	220	2.3158
36	870	2.2895
37	855	2.3108
38	505	2.3488
39	605	2.3269
40	465	2.2143
41	315	2.3333
42	530	2.3043
43	400	2.2857
44	315	2.1724
45	435	2.2308
46	265	2.3043
47	410	2.2162
48	695	2.3167
49	775	2.2464
50	265	2.1200
51	560	2.2400
52	375	2.2059
53	660	2.2759
54	335	1.9143
55	515	1.6094
56	405	1.5577
57	425	1.7000
58	0	-
58	0	-
59	515	1.8393
60	0	-
60	0	-
61	430	1.8696
62	420	1.8261
63	850	2.0238
64	885	2.0345
65	740	1.9474
66	680	2.1587
67	600	2.0000
68	310	1.5500

*Continuación Cuadro 4A. Cuantificación y pureza de todas las muestras*

<b>Muestras método Edwards</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Pureza (A260/A280)</b>
69	525	1.3816
70	365	1.8250
71	225	1.5000
72	260	1.5758
73	240	2.0870
74	545	2.0185
75	230	1.5333
76	260	1.8571
77	250	1.4286
78	375	1.7045
79	415	1.7660
80	190	1.7273
81	385	1.5400
82	80	1.3333
83	385	2.2000
84	380	1.4615
85	255	1.4571
86	570	1.5833
87	430	1.6863
88	350	1.4583
89	0	-
90	660	1.8082
91	250	1.9231
92	445	1.8936
93	495	1.5714
94	455	2.0222
95	340	1.3878
96	300	2.0690
97	245	1.4412
98	825	1.8132
99	820	2.1026
100	655	1.7467
101	730	2.1159
101	0	-
102	320	1.4884
103	255	2.2174
103	0	-

<b>Muestras método Edwards</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Pureza (A260/A280)</b>
104	1540	2.2319
104	0	-
105	215	2.0476
106	605	1.8333
107	140	1.8667
107	0	-
108	400	1.7778
109	0	-
109	180	1.6364
110	710	2.0882
111	320	1.7297
112	540	1.6875
113	770	1.9250
114	250	1.5625
114	0	-
115	420	1.4483
116	510	2.0000
116	0	-
117	275	1.7742
117	0	-
118	140	1.5556
119	455	1.7843
119	0	-
120	310	1.9375
121	420	2.1000
122	610	1.5844
123	420	1.4000
124	465	1.9787
125	770	1.9744
126	200	1.6000
126	0	-
127	340	1.5455
128	385	1.4259
129	520	1.5072
130	365	1.7805
131	220	1.8333
132	410	1.6735

*Continuación Cuadro 4A. Cuantificación y pureza de todas las muestras*

<b>Muestras método Edwards</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>Pureza (A260/A280)</b>
133	290	1.4146
134	300	2.0000
135	230	2.0909
136	595	1.7246
137	510	1.4366
138	60	1.0000
139	620	1.3778
140	710	1.7750
141	380	1.4074
142	540	1.6615
143	385	1.5400
143	0	-
144	285	1.5405
145	445	1.5345
146	390	1.3684
147	125	1.5625
148	690	2.1231
149	540	1.4400
150	525	1.6667
151	330	2.1290
152	790	1.2951
153	565	1.5479
154	520	1.5522
155	690	2.0597
156	525	1.4000
157	285	2.7143
158	600	1.4458
159	480	1.6000
160	350	1.4000
161	345	1.3800
162	365	1.4314
163	450	1.3433
164	390	1.3000
165	375	1.5625
166	565	1.4125
167	380	1.4340
168	35	1.1667

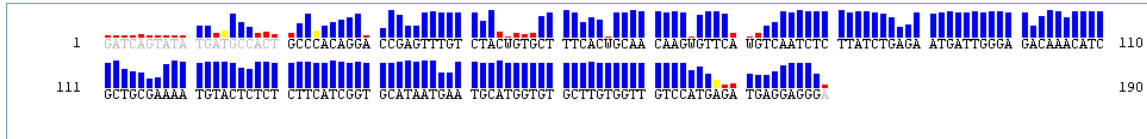
Muestras método Edwards	Concentración (ng/μl)	Pureza (A260/A280)
169	450	1.4754
170	515	1.5846
171	245	1.3243

## Anexo 5. Resultados de la secuenciación

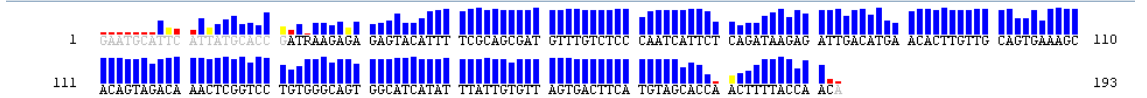
Para SNP 1

### Muestra 51

Muestra\_51-81\_F\_A02

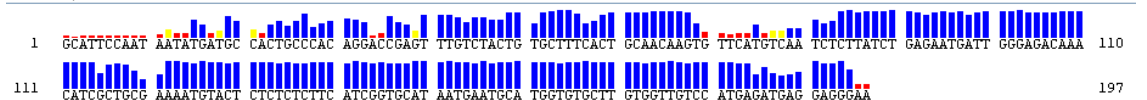


Muestra\_51-81\_R\_B02

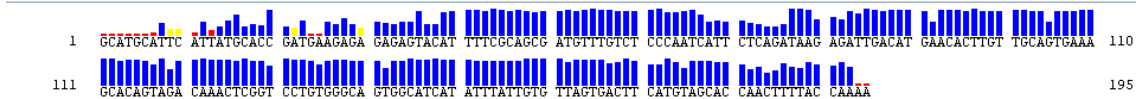


### Muestra 33

ra\_33-Snp1\_F\_E02

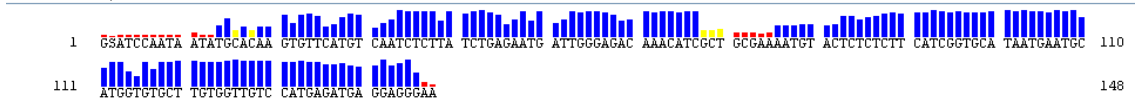


Muestra\_33-Snp1\_R\_F02

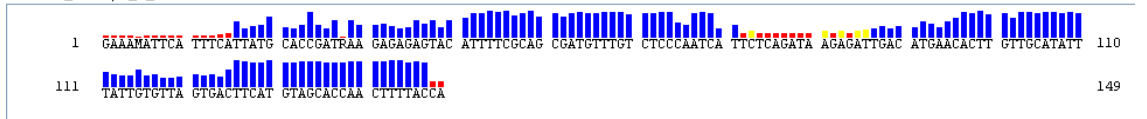


### Muestra 48

Muestra\_48-Snp1\_F\_G02



Muestra\_48-Snp1\_R\_H02



## Para SNP 3

## Muestra 1

Muestra\_1-Snp3\_F\_A01

```

1  GGGTATGGGA TAGCAAAGGG AGTCTCATGC GAKCTRCAC TCTGTTCCTC RYTGACCCTG TCGSTTCATA CTCCTGTGAG TATCAAAATT GTAGTAAKAY GTRKGGWATG 110
111 YWYNTGTGAT ATCACATGTA ATCTCTTCTC TGTGYASGGG CAAAATGGGG CGSMATCAA AAACCTCATG AGGACGGAYT YTTCCYTWTA CAAATGTTCT GGGTGYDIAT 220
221 CTTTTTGTG TGASMACTCT CAGCACGCAC CTCCTTATACA CTCRCTTTTC CCGCTTATCC CCCCCTCC 288

```

Muestra\_1-Snp3\_R\_B01

```

1  ARARGWCCG KAMRWRCRT WGTAKRSWNG CTGGAITAA YCATGAATR NWTIAYMWS ATSTAACTAC AATTTTGTW CTCNCAGRG TGTGAAKAG AGCAGGTC A 110
111 ACTGGRGGGA ACAATGGAGG RGGSGGAGCG RTGCCCTGTC CGGCTCAAG CCTCTCCATG TACAAAAAAA AAAAMAAYGC TCCSCCHCCT CTTTTTGTG CTTGCTTCTC 220
221 CTTCTTART TTTCTCTCC CCGCAKATAT AAAAATTTTT RCATGCTTGA T 271

```

## Muestra 24

Muestra\_24-Snp3\_F\_G01

```

1  ARTAMKCTCR CACCTCCRTT GTTCTTSCAR YTGACCCTRC TCGSTTCAY ACTCTCTGTA GTATCAAAAT TGTAGTWKA GTRKGGWAT GYWCCTGTA TAACACATGT 110
111 AATCTCTTCT CTGTGYASGG SCAATCTGGG CGSMATCCA ACAACCTTCA TGA 163

```

Muestra\_24-Snp3\_R\_H01

```

1  CCAACCGCAC CAGAGAGAKR TAGSATGTA TTAYACCAGA TGCCTTACCA ACATCTAACT ACAATTTGA TACTCACAGG AGTGTGAAR AGAGCAGGCT CAACTGGRGG 110
111 GAACAATGGA GGRGGGGAG CGAWSCCCTG TCGGGCTCA AGCTCTGCA TGTACAAA 168

```

## Muestra 26

Muestra\_26-Snp3\_F\_A02

```

1  CSTCAYGCTC RCACAGCCR RTGTTCCCTS CARITGACC TRCTTSKTC ACACCTCTGT GAGTATATGG TGGAGAYSMT KTRGTAAATG CATCTGGTAT AACACATGAA 110
111 CTCRKTCTCT GTGCAGGGCC AATCTGGGGC GGTTCACACT CTGACTCCIT T 161

```

Muestra\_26-Snp3\_R\_B02

```

1  CRTCGYAGA CAGAGATWCC AYSTGTTATA CCAGATGATT ATSRACATCT AACTACAATT TTSAGTTTTA TTCTRTGAA CAGASCAGGG TCACTGGG GAAAAAAGG 110
111 AGCTGCGGGA CCGATGCCCT GTCCGGCTC AAGGCTTTC ATGTACAAA TCTTTCTT T 172

```

## Muestra 3

Muestra\_3-Snp3\_F\_C01

```

1  CRAAMKCTCR CAACCTCCRTT GTTCTTSCA GTTGACCCTR CTCWSTTCCA YACTCTGTG AGTATCAAAA TTGTAGTWAG ATGTRKGGWA TGYATCTGGT ATAACACATG 110
111 YWATCTCTTC TCTGTGAGG GSCAATCTGG GCGGGCATCC AACAAACCTC ATGA 164

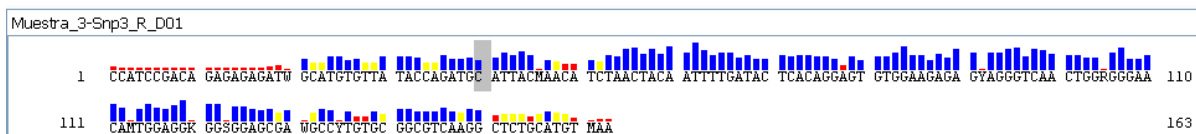
```

Muestra\_3-Snp3\_F\_E01

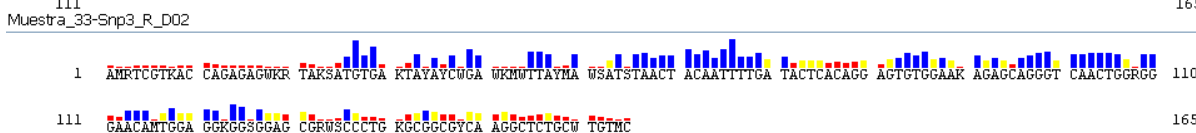
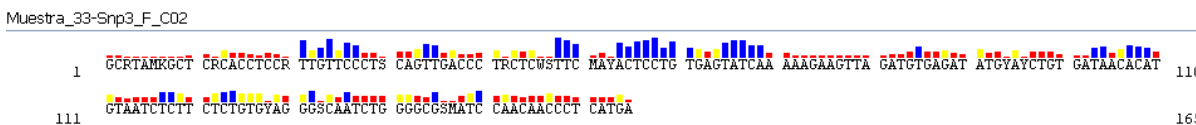
```

1  ARAMWCCGCT RCACACTCCRT TGTCTTSCA RYTGACCCTR CTCWSTTCCA YACTCTGTG AGTATCAAAA TTGTAGTWAG ATGTRKGGWA TGYATCTGGT ATAACACATG 110
111 YWATCTCTTC TCTGTGAGG GSCAATCTGG GCGGGCATCC AACAAACCTC ATGA 164

```



## Muestra 33



## Anexo 6. Secuencias usadas para BLAST muestras SNP 1:

### Muestra 51F

TGTTGGTAAAAGTTGGTGCTACATGAAGTCACTAACACAATAAATATGATGCC  
 ACTGCCACAGGACCGAGTTTGTCTACTGTGCTTTCAC TGC AAC AAGTGTTC AT  
 GTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTGGGAGACAAACATCGCTGCGAAAATGTA  
 CTCTCTTTCATCGGTGCATAATGAATGCATTC

### Muestra 33F

GCATTCCAATAATATGATGCCACTGCCACAGGACCGAGTTTGTCTAC TGTGCT  
 TTCACTGCAACAAGTGTTCATGTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTGGGAGACA  
 AACATCGCTGCGAAAATGTA CTCTCTCTTCATCGGTGCATAATGAATGCATG  
 GTGTGCTTGTGGTTGTCCATGAGATGAGGAGGAA

### Muestra 48F

GSATCCAATAATATGCACAAGTGTTCATGTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTG  
 GGAGACAAACATCGCTGCGAAAATGTA CTCTCTTCATCGGTGCATAATGAAT  
 GCATGGTGTGCTTGTGGTTGTCCATGAGATGAGGAGGAA

## BLAST entre muestras 51-33

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
268 bits(145)	4e-77	153/156(98%)	3/156(1%)	Plus/Plus
Query 38	CAATAAATATGATGCCACTGCCACAGGACCGAGTTGTCTACTGTGCTTTCAC TGCAAC			97
Sbjct 7	CAAT-AATATGATGCCACTGCCACAGGACCGAGTTGTCTACTGTGCTTTCAC TGCAAC			65
Query 98	AAGTGTTTCATGTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTGGGAGACAAACATCGCTGCGAAAAT			157
Sbjct 66	AAGTGTTTCATGTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTGGGAGACAAACATCGCTGCGAAAAT			125
Query 158	GTA--CTCTCTTTCATCGGTGCATAATGAATGCAT		191	
Sbjct 126	GTA--CTCTCTTTCATCGGTGCATAATGAATGCAT		161	

## BLAST entre muestras 33-48

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
233 bits(126)	1e-66	134/137(98%)	3/137(2%)	Plus/Plus
Query 60	TGCAACAAGTGTTCATGTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTGGGAGACAAACATCGCTGC			119
Sbjct 14	TGC-ACAAGTGTTCATGTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTGGGAGACAAACATCGCTGC			72
Query 120	GAAAATGTACTCTCTCTTTCATCGGTGCATAATGAATGCATGGTGTGCTTGTGGTTGTC			179
Sbjct 73	GAAAATGTA--CTCTCTTTCATCGGTGCATAATGAATGCATGGTGTGCTTGTGGTTGTC			130
Query 180	CATGAGATGAGGAGGAA		196	
Sbjct 131	CATGAGATGAGGAGGAA		147	

## BLAST entre muestras 51-48

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
178 bits(96)	5e-50	99/100(99%)	1/100(1%)	Plus/Plus
Query 92	TGCAACAAGTGTTCATGTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTGGGAGACAAACATCGCTGC			151
Sbjct 14	TGC-ACAAGTGTTCATGTCAATCTCTTATCTGAGAATGATTGGGAGACAAACATCGCTGC			72
Query 152	GAAAATGTACTCTCTTTCATCGGTGCATAATGAATGCAT		191	
Sbjct 73	GAAAATGTACTCTCTTTCATCGGTGCATAATGAATGCAT		112	