

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Departamento de Bioquímica y Microbiología



**Evaluación de técnicas de extracción de ADN y de  
visualización para marcadores microsatélites en  
caña de azúcar (*Saccharum* spp.)**

Karla Melina Ponciano Samayoa

**BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Guatemala  
2004

**Evaluación de técnicas de extracción de ADN y de  
visualización para marcadores microsatélites en  
caña de azúcar (*Saccharum* spp.)**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Departamento de Bioquímica y Microbiología

**Evaluación de técnicas de extracción de ADN y de  
visualización para marcadores microsatélites en  
caña de azúcar (*Saccharum spp.*)**

Trabajo de Graduación presentado para optar al grado académico de  
Licenciada en Bioquímica

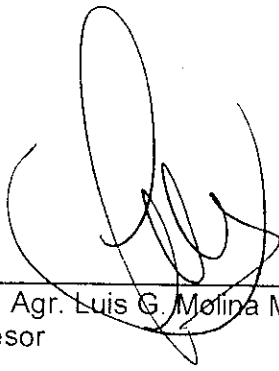
Karla Melina Ponciano Samayoa

**BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

Guatemala  
2004

Vo. Bo.

(f)

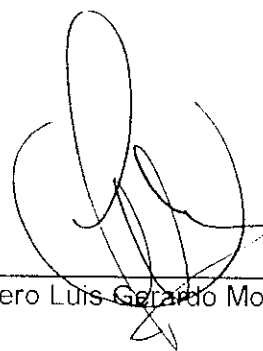


---

Ing. Agr. Luis G. Molina Monterroso  
Asesor

Tribunal


(f)



---

Ingeniero Luis Gerardo Molina Monterroso.

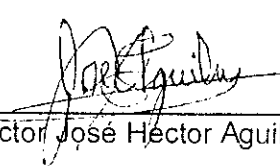
(f)



---

Doctora María Eugenia Morales-Betoulle.

(f)



---

Doctor José Héctor Aguilar Arriola.

Fecha de aprobación:

27 de mayo de 2004.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por guiarme en el camino que considero de bien.  
A mi Familia, por ser parte integral de mi vida.  
A mis amigos, compañeros de trabajo y sus respectivas familias,  
por su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco la colaboración y apoyo brindado por las siguientes instituciones y personas para la realización del presente trabajo.

Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA)  
Ingeniero Agrónomo Luis G. Molina M.  
Andrés Ávalos F.  
Personal Laboratorio de Biotecnología.

Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar  
(CENGICAÑA)  
Doctor José Luis Quemé.

Universidad del Valle de Guatemala (UVG)  
Doctor Héctor Aguilar A.  
Doctora María Eugenia Morales-Betoulle.  
Karen Ramos.

# CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Caña de azúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> L.)	3
1. Descripción	3
2. Composición	5
3. Importancia a nivel mundial y en Guatemala	6
4. Dinámica varietal de la agroindustria azucarera de Guatemala	7
B. Marcadores moleculares microsatélites	10
1. Secuencias microsatélites	10
2. Base genética y detección	11
3. Microsatélites en caña de azúcar ( <i>Saccharum</i> spp.)	13
C. Técnicas o protocolos de extracción de ADN de caña de azúcar destinado a análisis por marcadores microsatélites	15
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	17
A. Objetivo general	17
B. Objetivos específicos	17
C. Hipótesis	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	18
A. Protocolo de extracción 1 (propuesto por Wagner <i>et al.</i> , 2001)	18
B. Protocolo de extracción 2 (propuesto por Lobos y Seelenfreund, 1999)	18
C. Protocolo de extracción 3 (propuesto por Aljanabi <i>et al.</i> , 1999)	20
D. Protocolo de extracción 4 (propuesto por da Silva, 2003)	21

E.	Verificación de la integridad del ADN	23
F.	Estimación de la concentración y pureza del ADN extraído	24
G.	Amplificación de microsatélites por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
	1. Mezcla de reacción	25
	2. Programa PCR	25
H.	Visualización de producto de PCR	25
	1. Visualización con gel de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata	25
	2. Visualización con gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio	27
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	29
A.	Evaluación de protocolos de extracción	29
B.	Visualización de polimorfismos microsatélites	38
C.	Estabilidad del ADN extraído por los protocolos en almacenamiento a 4°C	40
D.	Estabilidad del producto de amplificación en almacenamiento a -20°C	44
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	54
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	56
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	57
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b>	60
A.	Producción de azúcar a nivel mundial	60
B.	Reconstitución de partidores	61
C.	Descripción de partidores	61
D.	Listado de abreviaturas	62
E.	Glosario	62

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación taxonómica de <i>Saccharum officinarum</i> L.	4
2. Proporciones de los componentes del tronco de la caña de azúcar	5
3. Otros componentes del jugo de la caña de azúcar	5
4. Indicadores generales sobre el azúcar en Guatemala (1997-1999)	7
5. Resumen de pasos de los protocolos de extracción	23
6. Mezcla de reacción PCR para amplificación de microsátélites	25
7. Programa para termociclador	25
8. Procedimiento de tinción con nitrato de plata	27
9. Comparación de los protocolos de extracción de acuerdo a su realización	29
10. Estimación del costo de realización del protocolo descrito por Wagner <i>et al.</i> (2001)	29
11. Estimación del costo de realización del protocolo descrito por Lobos y Seelenfreund (1999)	30
12. Estimación del costo de realización del protocolo descrito por Aljanabi <i>et al.</i> (1999)	31
13. Estimación del costo de realización del protocolo descrito por da Silva (2003)	31
14. Concentración y pureza del ADN obtenido con los protocolos	33
15. Producción de azúcar en 2001 por los principales países productores	60
16. Producción de azúcar por los países latinoamericanos y del Caribe (1998-1999)	60
17. Resumen de las características de los partidores utilizados	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Caña de azúcar	3
2. Secuencia microsatélite en una hebra de ADN	11
3. Reconocimiento de secuencias flanqueantes de microsatélites por partidores específicos	12
4. Comparación de los protocolos de extracción de acuerdo a su costo en la extracción de 100 muestras	32
5. Integridad del ADN inmediato a la extracción	34
6. Integridad del ADN después de 14 días de almacenamiento a 4°C	36
7. Integridad del ADN después de 30 días de almacenamiento a 4°C	37
8. Visualización en gel de agarosa al 4%	39
9. Visualización en gel de poliacrilamida al 5%	41
10. Eficiencia de amplificación después de 14 días de almacenamiento	43
11. Eficiencia de amplificación después de 30 días de almacenamiento	45
12. Visualización de producto de amplificación almacenado con <i>Stop Mix</i> a -20°C por 19 días	47
13. Visualización de producto de amplificación almacenado sin <i>Stop Mix</i> a -20°C por 19 días	48
14. Visualización de producto de amplificación almacenado con <i>Stop Mix</i> a -20°C por 47 días	49
15. Visualización de producto de amplificación almacenado sin <i>Stop Mix</i> a -20°C por 47 días	50
16. Visualización de producto de amplificación almacenado con <i>Stop Mix</i> a -20°C por 78 días	51
17. Visualización de producto de amplificación almacenado sin <i>Stop Mix</i> a -20°C por 78 días	52

## RESUMEN

Este trabajo contiene los resultados obtenidos en la comparación de cuatro técnicas de extracción de ADN aplicadas a caña de azúcar. Los protocolos fueron evaluados con el objetivo de establecer uno que permitiera la obtención de ADN de alta calidad para ser amplificado con partidores específicos, que por su realización y costo permitiera manipular un gran número de muestras y obtener una excelente visualización para caracterizar las más de 1000 variedades de caña de azúcar descritas en Guatemala.

Se extrajo el ADN de tres variedades importantes en Guatemala por cuatro protocolos distintos y se amplificó por PCR usando partidores específicos, inmediato a la extracción y después de almacenamiento a 4°C por 14 y 30 días. Se visualizaron los polimorfismos de secuencia simple repetida (SSR) por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% con tinción de plata, por ser esta una técnica de alta resolución. Se observó que el protocolo propuesto por Wagner *et al.* (2001), basado en una extracción con NaOH, permite obtener ADN de baja calidad, no estable en almacenamiento a 4°C, por lo que no se puede amplificar. Los protocolos propuestos por Lobos y Seelenfreund (1999), Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003) permiten obtener ADN con buena integridad, pureza y estabilidad a 4°C por 30 días. Con los tres protocolos se observaron patrones de bandas característicos para cada una de las variedades analizadas. La diferencia entre los protocolos se encontró en el costo y realización; el primero resultó ser tedioso y de alto costo, mientras que los protocolos propuestos por Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003) resultaron ser de un costo moderado y pueden ser realizados en un día. Se concluyó que ambos protocolos son los más eficientes para la caracterización de caña de azúcar, y que la elección de uno depende de los recursos y la disponibilidad de los reactivos.

También se evaluó la estabilidad del producto de amplificación en almacenamiento a -20°C de acuerdo a la calidad de visualización de polimorfismos microsátélites. Se concluyó que el producto de amplificación se conserva mejor con *Stop Mix* y se obtiene una buena visualización después de dos meses de almacenamiento.

Se recomienda evaluar la amplificación de ADN de meristemas obtenido por el protocolo propuesto por Wagner *et al.* (2001) inmediato a la extracción y aplicarlo a hojas de caña. También, aplicar la técnica descrita por da Silva (2003) para análisis AFLP; y utilizar los protocolos propuestos por Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003) para caracterizar variedades de caña de azúcar en estudios futuros. Además, evaluar el efecto del almacenamiento continuo a largo plazo del ADN y del producto de amplificación a -20°C.

# I. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es uno de los principales cultivos en el mundo, que da como producto el 70% del azúcar consumida a nivel mundial. El entendimiento de la organización y caracterización del genoma de esta planta ayudará a incrementar la producción de azúcar a partir de variedades de caña con características genéticas ventajosas.

Los atributos genéticos de los microsatélites como marcadores moleculares (co-dominancia, alta heterocigosidad y herencia mendeliana) acoplados con su presencia en la mayoría de los genotipos, hacen que estos sean preferidos como método para la construcción de un mapa genético con variedades de caña de azúcar. La base genética y detección de marcadores microsatélites se basa en la amplificación individual a través de PCR de secuencias sencillas repetidas reconocidas por primarios específicos en el ADN genómico de muestras vegetales.

Se han publicado muchos protocolos para extracción de ADN genómico de tejidos vegetales, pero pocos aplicados a caña de azúcar. En este estudio se comparó cuatro protocolos representativos con el objetivo de determinar qué método ofrece un costo considerable y buena realización para trabajar en el futuro. Además, se evaluaron respecto a la calidad e integridad del ADN extraído, según la visualización del producto amplificado por PCR utilizando primarios específicos. Para esto, se compararon las técnicas de extracción de acuerdo a su costo (reactivos y equipo requerido) y realización (número de pasos y tiempo requerido). También se evaluó la mejor forma de visualización de polimorfismos de secuencia simple repetida (SSR) o microsatélites en geles de poliacrilamida con tinción de plata y de agarosa con tinción de bromuro de etidio.

Las variedades de caña de azúcar CP72-2086, CP73-1547 y CG97-97, importantes en Guatemala y pertenecientes a la colección de CENGICAÑA (Estación Experimental Finca Camantulul, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla), se sometieron a los diferentes protocolos de extracción utilizando los meristemas como muestra. El primer protocolo, propuesto por Wagner *et al.* (2001), se utiliza para extracción rápida de ADN de hojas de maíz con hidróxido de sodio y calor. El segundo protocolo, propuesto por Lobos y Seelenfreund (1999), se utiliza para la extracción de ADN de hojas de frijol con alta pureza e integridad (Ávalos, por publicar) por lo que utiliza ARNasa y proteinasa K; además de varias extracciones con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico.

El tercer protocolo, propuesto por Aljanabi *et al.* (1999), se utiliza para extracción de ADN de meristemos de caña de azúcar pero elimina la ARNasa y proteinasa K del protocolo anterior, eliminando polifenoles y polisacáridos con el uso de N-lauroil-sarcosina y polivinilpirrolidona. El cuarto protocolo, propuesto por da Silva (2003), se utiliza también en la extracción de ADN de caña de azúcar pero a pesar de incluir ARNasa, elimina la proteinasa K.

La mejor forma de visualización de los polimorfismos SSR fue la electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% y tinción con nitrato de plata, debido a que su alta resolución permitió caracterizar a las tres variedades de caña de azúcar analizadas.

Después de evaluar los diferentes aspectos de interés, y de comparar las ventajas y desventajas de los cuatro protocolos, se llegó a la conclusión de que las técnicas propuestas por Lobos y Seelenfreund (1999), Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003) permitieron obtener ADN con la mejor pureza, integridad, estabilidad en almacenamiento a 4°C, visualización de polimorfismos SSR y estabilidad del producto de amplificación. Sin embargo, el primero resultó ser costoso y tedioso; mientras que los últimos son de costos menores y fácil realización.

Debido a que la calidad del ADN obtenido por los protocolos descritos por Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003) es óptima en ambos, la elección en el futuro de uno de los dos se basaría en los recursos económicos que se tengan y la disponibilidad de los reactivos que se utilizan en cada uno.

Por otro lado, el protocolo propuesto por Wagner *et al.* (2001) dio lugar a ADN de baja pureza, muy contaminado con proteínas, y poca estabilidad en almacenamiento a 4°C, siendo consistente con lo publicado en la literatura. Además, no pudo ser amplificado y visualizado. Esto pudo ser debido a que se obtuvo poco ADN molde para la amplificación, y este fue degradado durante el almacenamiento.

Este estudio será de ayuda a proyectos futuros relacionados con el mapeo genético de las más de 1,000 variedades de caña de azúcar actualmente descritas en Guatemala. Este establece dos técnicas de extracción que permiten la manipulación de un gran número de muestras, obteniendo ADN de alta calidad, que puede ser amplificado después de almacenamiento a 4°C durante, por lo menos, un mes y que resulta en buena visualización del producto amplificado. Además, resultan ser económicos y de fácil realización con el equipo disponible en un laboratorio de biotecnología.

## II. ANTECEDENTES

### A. Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)

1. Descripción. La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es una gramínea tropical con el tallo leñoso, de unos dos metros de altura, hojas largas, lampiñas y flores purpúreas en panoja piramidal. Está emparentada con el sorgo y el maíz (Figura 1). El tallo está lleno de un tejido esponjoso y dulce que acumula un jugo rico en sacarosa. La sacarosa es sintetizada por la caña gracias a la energía tomada del sol durante la fotosíntesis (Procaña, 2002).



Figura 1. Caña de Azúcar (USDA, 2003).

Las hojas de la caña nacen en los entrenudos del tronco. A medida que crece la caña las hojas más bajas se secan, caen y son reemplazadas por las que aparecen en los entrenudos superiores. También las yemas nacen en los entrenudos y bajo ciertas condiciones pueden llegar a dar lugar al nacimiento de otra planta (Perafán, 2003).

La caña de azúcar es un cultivo propagado vegetativamente que posee un genoma complejo. Se cultiva prácticamente en todas las regiones tropicales y subtropicales de la tierra. Al ser un cultivo perenne permite una captura permanente del recurso tropical más abundante: la luz solar. Disminuye los costos y los riesgos asociados a la siembra en los

cultivos semestrales y anuales y mantiene una cobertura constante sobre el suelo, lo que disminuye los costos de control de malezas y permite un uso más eficiente del agua y un mejor control de la erosión (Procaña, 2002).

La clasificación taxonómica de la caña de azúcar, según la base de datos de plantas del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Saccharum officinarum* L. (USDA, 2003).

Reino	Plantae – Plantas
Subreino	Tracheobionta – Plantas Vasculares
Superdivisión	Spermatophyta – Plantas con semillas
División	Magnoliophyta – Plantas con flores
Clase	Liliopsida – Monocotiledoneas
Subclase	Commelinidae –
Orden	Cyperales –
Familia	Poaceae – Gramineas
Género	<i>Saccharum</i> L. – Caña de azúcar
Especie	<i>Saccharum officinarum</i> L. – Caña de azúcar

Existen otras especies del mismo género, que no tienen valor comercial, por ser de bajo contenido de azúcar y altas en fibra, alguna de ellas silvestres, cuyo valor es principalmente genético. También existe un gran número de variedades de caña de azúcar en los diferentes países que cultivan esta planta. Las variedades de caña que se conocen se han obtenido espontáneamente de los lugares de origen de la caña de azúcar y por aparición de mutaciones en los campos de cultivo. Pero modernamente las variedades se obtienen por mejoramiento genético, a través de semillas, por autofecundaciones, o mediante cruces entre variedades o entre especies. Hoy se practica la ingeniería genética que permite la introducción de genes deseables a variedades ya existentes (CEPSA, 2001).

Las variedades o cultivares después de descritos son nombrados de acuerdo a la región donde se desarrollaron y al número de acceso característicos del año en que se cultivaron por primera vez. Tomando como ejemplo la variedad CP72-2086, se tiene que

Cuadro 4. Indicadores generales sobre el azúcar en Guatemala  
(1997-1999) (GEPLACEA, 2002).

CONCEPTO	ZAFRA 1997-1998	ZAFRA 1998-1999
Ingenios	17	17
Área sembrada (ha)	n.d.	n.d.
Producción de azúcar (TMVC)	1,790,000	1,700,000
Importación de azúcar (TMVC)	0	0
Exportación de azúcar (TMVC)	965,000	920,000
Consumo de azúcar (TMVC)	410,000	413,000

*Nota:* n.d. Datos no disponibles

Durante su largo proceso evolutivo, la caña de azúcar ha desarrollado una muy alta capacidad para la producción y almacenamiento de sacarosa; ha sido esta cualidad por la cual el hombre la ha cultivado y continúa cultivándola (Procaña, 2002). Su importancia económica se ha reforzado por su uso en la producción de alcohol, papel, madera, alimento para animales y combustible (Marcano *et al.*, 2001). En Guatemala, el bagazo se utiliza como combustible y es la única fuente biomásica que se ha utilizado para la producción de energía eléctrica. Además, su producción se destina para la generación de energía en los propios procesos de transformación industrial, en el calentamiento de calderas durante la zafra (Sandoval, 2001). Sin embargo, para la industria azucarera y panelera en Guatemala y el mundo, el contenido de sacarosa en la planta es el principal elemento de comercialización en forma de azúcar o panela (Procaña, 2002).

4. Dinámica varietal de la agroindustria azucarera de Guatemala. Las Superintendencias de Campo y Departamentos de Investigación de los Ingenios de Guatemala facilitan la información del 92% del área total cultivada con caña de azúcar para crear estudios que muestran la composición varietal de la agroindustria azucarera en el país. El análisis del censo de variedades de azúcar se basa en la información

proporcionada por 14 de los 17 ingenios en un área total de 171,929.79 hectáreas, que se dividen en 14,869.72 hectáreas cultivadas en la zona alta, 56,790.35 hectáreas en la zona media y 100,269.72 hectáreas en la zona baja del país (Orozco, 2003).

Las variedades de caña de azúcar importantes por constituir más del 1% del área total sembrada durante la zafra 2003-2004 son CP72-2086 con 73.33%, PR87-2080 con 4.80%, CP73-1547 con el 3.78%, PGM89-968 con 3.47%, Mex68P23 con 2.15%, CP88-1165 con 1.77% y CP72-1210 con 1.12% (Orozco, 2003).

La variedad CP72-2086 fue desarrollada en Canal Point, Florida y empezó a figurar con 1.89% del área sembrada en la zafra 1987-1988 y por 17 años consecutivos ha sido la variedad más importante en la agroindustria azucarera guatemalteca, estando presente en todas las zonas del país. La tasa de crecimiento promedio anual en área sembrada de la zafra 1987-1988 a la zafra 2002-2003, en la que alcanza su máxima área sembrada, es del 4.69%. Por primera vez en la historia de la variedad CP72-2086, ésta decae en área de 75.06% en la zafra 2002-2003 a 73.33% en la presente zafra. Estas áreas fueron en buena medida ocupadas por otras variedades y por ligeros incrementos las variedades PGM89-968 y CP88-1165 (Orozco, 2003).

La expansión de la variedad CP72-2086 es indudablemente debido a su alto tonelaje, alta concentración de azúcar, resistencia a las principales enfermedades, amplia adaptabilidad y buena habilidad de resistir sequías y congelamiento (Schueneman et al., 2002). Sin embargo, preocupa la alta incidencia de la "Enfermedad del Mosaico", provocada por el virus del mosaico de la caña de azúcar, la cual puede ser un problema en el futuro al poner en peligro el rendimiento de caña y disminuir la cantidad de sacarosa que la industria azucarera guatemalteca pueda procesar (Orozco, 2003).

La variedad CP73-1547 ocupa el tercer lugar en área sembrada del país. Esta variedad se desarrolló en Canal Point, Florida y se ha cultivado en Guatemala con más del 1% del área por 22 años y su mayor área sembrada la alcanzó en la zafra 1988-1989 con 8.28%. Tiene importancia en la zona media y baja del país. La tendencia de esta variedad es hacia disminución ligera en área. Su comportamiento representa a la mayoría de variedades las cuales no logran expandirse porque carecen sustancialmente de algún carácter agronómico de importancia (Orozco, 2003).

La CP73-1547 es una variedad temprana de alta productividad de azúcar tanto por su tonelaje, como por su concentración de azúcar, pero presenta deterioro de los tallos por formación acelerada de corcho justo después de la floración, problema asociado a la composición uniforme de tallos que conforman la macolla. Estas características sugieren que esta variedad podría permanecer en la industria sin alcanzar mayores áreas (Orozco, 2003).

La variedad CG97-97 fue desarrollada en el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar (CENGICAÑA) en la Estación Experimental Finca Camantulul, Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. Es un híbrido que se seleccionó de la descendencia del cruzamiento CB46-47XCP57-603. La adaptación ideal de esta variedad se da en la zona baja del país; el tonelaje y contenido de azúcar tiene proporciones parecidas a la variedad CP72-2086 (Quemé *et al.*, 2003).

Durante la zafra 2002-2003, la variedad CG97-97 produjo 159.5 toneladas métricas de caña por hectárea y 27.5 toneladas métricas de azúcar por hectárea, comparada con el testigo CP72-2086. El testigo produjo 163.6 toneladas métricas de caña y 27.9 toneladas métricas de azúcar por hectárea (Quemé *et al.*, 2003).

La variedad CG97-97 es resistente al carbón (*Ustilago scitaminea*), escaldadura (*Xantomonas albilineans*), virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) y al virus del amarillamiento foliar de la caña de azúcar (ScYLV) (Quemé *et al.*, 2003).

En la actualidad, el desarrollo de variedades promisorias y su propagación está tomando importancia pues puede ser orientada al mejoramiento de la composición varietal de la industria azucarera (Orozco, 2003) que dé como resultado un incremento en los niveles de producción de sacarosa por unidad de área sembrada. Debido a esto, el cultivo de la caña de azúcar, sus prácticas agronómicas y los programas de mejoramiento genético, han estado encaminados a la selección de variedades que produzcan mayores niveles de sacarosa y sean resistentes a enfermedades y condiciones ambientales desfavorables. Una forma de selección de variedades ventajosas y promover su cruce es el análisis con marcadores moleculares (Procaña, 2002).

## B. Marcadores moleculares microsatélites

1. Secuencias microsatélites. Se sabe que una gran proporción del genoma de organismos eucariotes está compuesta por secuencias repetitivas de ADN. Varias clases de estas secuencias han sido descritas y caracterizadas en varias especies animales y vegetales. Estas difieren en el número y la composición de los nucleótidos. Por eso, desde el punto de vista de los marcadores moleculares, estas secuencias repetitivas se tornan importantes herramientas para el análisis genético pues ofrecen la posibilidad de realizar el muestreo simultáneo de un gran número de *loci* genéticos polimórficos dispersos en el genoma. Las secuencias repetitivas se encuentran agrupadas o dispersas a lo largo del genoma nuclear formando grupos altamente variables en términos estructurales, esto es, altamente polimórficos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Diferentes experimentos en el inicio de los años 80 demostraron que los genomas eucariotes están densamente poblados por diferentes clases de secuencias repetidas, unas más complejas (minisatélites) y otras más sencillas. Las secuencias sencillas repetidas ("SSR-Simple Sequence Repeats"), denominadas microsatélites, consisten en pequeñas secuencias ("sequence motifs") de 1 a 4 nucleótidos adyacentes repetidas lado a lado. El nombre de satélite se debe a que las secuencias repetitivas forman un nódulo satélite distinto al nódulo principal de ADN genómico en la separación del ADN en gradientes de cloruro de cesio, por contener una proporción de pares de bases G-C diferente a la media del resto del genoma. En la Figura 2 se ilustra una región microsatélite en una hebra de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los microsatélites se definen como cualquiera de la serie de arreglos *in tandem*, muy cortos (2-10 pares de bases), repetitivos con secuencias altamente variables (hipervariables) de ADN, dispersas a través de genomas de hongos, plantas, animales y humano. Son secciones que consisten en 5-50 copias de motivos muy simples tales como  $(CT)_n$ ,  $(AT)_{2n}$ ,  $(CAC)_{16}$  o  $(GACA)_{32}$  y para su amplificación se utilizan partidores no mayores a 20 pares de bases (FAO/IAEA, 2002).



genético altamente variable, multialélico, de gran contenido informativo (Figura 3). Cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases) representa un alelo diferente del mismo locus (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

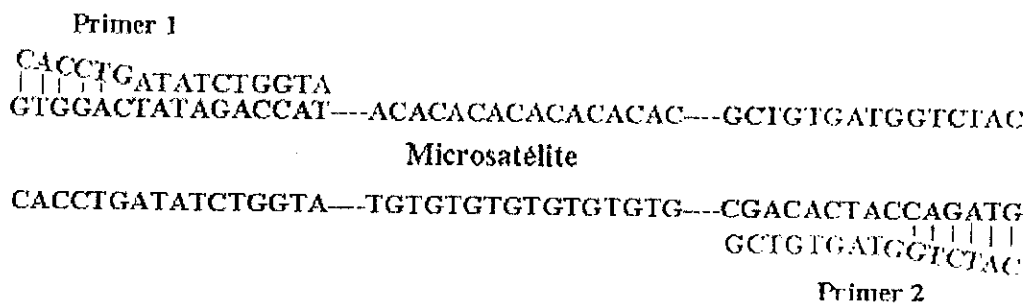


Figura 3. Reconocimiento de secuencias flanqueantes de microsatélites por partidores específicos (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001).

Cada locus de microsatélites es analizado individualmente al utilizarse un par de iniciadores o partidores construidos específicamente para su amplificación. Es posible analizar más de un locus por vez, siempre que los alelos de cada locus tengan tamaños suficientemente diferentes y migren hacia zonas separadas del gel. Los loci SSR parecen estables, y poseen codominancia, es decir, ambos alelos de un individuo heterocigoto son visualizados y son altamente multialélicos, en una población donde potencialmente todos los alelos de aquel locus pueden ser detectados y discriminados (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Teniendo en cuenta la expresión codominante y el multialelismo, los marcadores microsatélites son los que poseen el más elevado contenido de información de polimorfismo. Por esta razón, esencialmente toda y cualquier población segregante puede ser utilizada como población de referencia para estudios de ligamiento y mapeo genético. Así, la elección de la población será mapeada, no necesita basarse en la estimación de la distancia genética, sino con objeto de seleccionar la población más informativa desde el punto de vista de las características biológicas de interés. Los SSR son muy frecuentes y están distribuidos al azar, permitiendo la más completa cobertura de cualquier genoma eucariota. Además los segmentos polimórficos generados son lo suficientemente pequeños como para ser detectados vía PCR. Estas características hacen que los

microsatélites sean los marcadores ideales para el mapeo genético, discriminación de genotipos y para estudios de genética de poblaciones (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Las características principales de los marcadores basados en microsatélites son:

- Alto costo para desarrollo pues se requiere de conocer el genoma
- Se basa en PCR
- Utilizan ADN en baja cantidad y de mediana calidad
- Alta abundancia de polimorfismos y codominancia
- Útil en identificación de variedades y estudios de diversidad genética
- Mapeo, huella digital (FAO/IAEA, 2002).

La mayor limitación de la tecnología de microsatélites es la gran cantidad de trabajo necesario para el desarrollo previo de los marcadores. La metodología de obtención de marcadores SSR comprende resumidamente los siguientes pasos. Primero, se construye una biblioteca de fragmentos genómicos pequeños (300 a 500 pares de bases) para el organismo de interés. Estos clones son seleccionados para la presencia del microsatélite, utilizando sondas sintéticas complementarias a los elementos repetidos más comunes en el organismo (por ejemplo poli-AT). Los clones positivos son secuenciados y finalmente se construyen pares de iniciadores específicos para secuencias únicas a cada lado del microsatélite, cuidadosamente seleccionadas (utilizando programas de computador), que serán amplificadas posteriormente para verificar el nivel de polimorfismo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El método más eficiente para visualizar microsatélites en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida usa radioactividad o marcaje fluorescente de nucleótidos. Estos procedimientos requieren de equipo especial y consumen dinero y tiempo. La tinción con plata fue originalmente descrita para detección ultrasensible de polipéptidos separados por electroforesis en gel de poliacrilamida y después adaptada a ácidos nucleicos. Esta última ha demostrado ser altamente sensible, con resultados similares a la autoradiografía y marcaje con fluorescencia (Creste *et al.*, 2001).

3. Microsatélites en caña de azúcar (*Saccharum spp.*). El género *Saccharum* se caracteriza por un alto nivel de ploidía con números de cromosomas entre 40 hasta por encima de 140. El método de desarrollo de marcadores moleculares microsatélites a partir

de bibliotecas de ADN de caña de azúcar tiene sólo un 20% de éxito, acoplado con un alto costo. Esto hizo énfasis en la importancia de evaluar métodos alternativos para detectar microsatélites en este cultivo (da Silva, 2001). Los investigadores del Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD) desarrollaron logros específicos inspirados en los análisis de isoenzimas y trataron de caracterizar la estructura del genoma aneuploide interespecífico de cultivares modernos de caña de azúcar, junto con un proyecto de secuenciación usando secuencias expresadas etiquetadas (EST-Expressed Sequence Tags) (CIRAD, 2001). La base de datos SUCEST ha sido utilizada para identificar marcadores moleculares microsatélites. Este descubrimiento provee la oportunidad de desarrollar marcadores SSR en una forma simple y directa que involucra la búsqueda electrónica de SSR en base de datos EST (da Silva, 2001). Este proyecto encontró 402 secuencias microsatélites en caña de azúcar (*Saccharum* spp.), varios motivos repetidos dinucleótidos y trinucleótidos. Con estos se diseñó partidores de PCR para 20 de los motivos SSR encontrados y su nivel de polimorfismos fue evaluado utilizando ocho genotipos de caña de azúcar, incluyendo tres de *Saccharum officinarum*, tres de *Saccharum robustum* y dos híbridos comerciales. Se encontró polimorfismos evidentes a nivel cultivar y entre especies de *Saccharum*. Esto mostró que los motivos SSR son útiles como marcadores genéticos porque son polimórficos y transferibles. Debido a esto, el gran número de microsatélites que podrán estar disponibles en el futuro serán utilizados en muchas aplicaciones potenciales como mapeo y planeamiento de cruces de caña de azúcar (da Silva, 2001).

Los ensayos de polimorfismos basados en variaciones en el número de microsatélites han sido recientemente aplicadas con éxito para programas de cruzamiento. Sin embargo, el desarrollo de metodologías es complejo y costoso, lo cual limita su aplicación a cultivos importantes, tales como caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Los marcadores de microsatélites son importantes para investigación en este cultivo porque se amplifican con PCR y son fáciles de realizar, también son producto de partidores específicos y son más estables que aquellos generados por partidores al azar tales como marcadores de polimorfismos amplificados al azar (RAPD). En comparación con los marcadores de polimorfismos de fragmentos amplificados (AFLP), los microsatélites son específicos para un locus, y son transferibles a través de genotipos entre las especies, lo cual es un factor importante para propósitos de mapeo de genes y características que pueden ser de gran utilidad para mejoradores y genetistas. El

entendimiento de la organización y función del genoma de caña de azúcar asistirá a incrementar la producción de azúcar alrededor del mundo (da Silva, 2001).

### C. Técnicas o protocolos de extracción de ADN de caña de azúcar destinado a análisis por marcadores microsatélites

Como otras especies vegetales, los tejidos de caña de azúcar contiene altos niveles de polisacáridos y compuestos fenólicos, lo cual representa un importante problema de contaminación en la purificación de ADN vegetal. Cuando las células son dañadas, estos compuestos citoplásmicos pueden estar en contacto con el núcleo y otros organelos. En sus formas oxidadas, los polifenoles se unen en forma covalente al ADN dándole un color café y haciéndolo inútil para la mayoría de las aplicaciones de investigación (Aljanabi *et al.*, 1999).

Un ADN de alta pureza es requerido para PCR y técnicas basadas en programas de análisis de restricción, tales como microsatélites (SSR), RAPD, AFLP, mapeo genómico y huella digital de ADN. Para obtenerlo se requiere de métodos tediosos, que utilizan reactivos y equipo de alto costo, que dan un bajo rendimiento de ADN. Debido a esto es que se han propuesto modificaciones al protocolo convencional descrito por Doyle y Doyle (publicado en 1987), para aumentar el rendimiento y calidad del ADN extraído (Aljanabi *et al.*, 1999).

Wagner *et al.* (2001) propusieron un protocolo para extracción de ADN de maíz. Este es un procedimiento basado en extracción con hidróxido de sodio y calor, que consiste de dos pasos donde el tejido es macerado y después neutralizado. Una persona es capaz de coleccionar y procesar hasta 400 muestras al día. Sin embargo, se observó que el ADN fue degradado después de 4 semanas y su calidad no fue adecuada para análisis posterior (Wagner *et al.*, 2001). Su efectividad para extracción de ADN de caña de azúcar no se ha estudiado, pero puede ser muy interesante debido a la poca cantidad de reactivos y fácil realización del método.

Lobos y Seelenfreund (1999) propusieron un protocolo de extracción de ADN en plantas que se utiliza en la extracción de ADN de hojas de frijol con alta pureza, para su uso posterior en amplificación utilizando la técnica AFLP (Ávalos, por publicar). Hace uso

de extracciones fenólicas, proteinasa K y ARNasa para eliminar proteínas y ARN, aumentado considerablemente la pureza del ADN extraído por este protocolo.

Aljanabi, *et al.* (1999), propusieron un protocolo de extracción que se basa en una metodología que utiliza una alta concentración de CTAB y cloruro de sodio para remover los polisacáridos y prevenir su interacción con el ADN. Utiliza sulfito de sodio para prevenir la oxidación de los compuestos polifenólicos que resultan en ADN coloreado café, y la polivinilpirrolidona (PVP) para absorber los polifenoles y prevenir su interacción con el ADN. Además, no se requiere de tratamiento con ARNasa, debido a que el ARN es degradado durante la extracción. Esto reduce significativamente la manipulación de muestra y desperdicio de materiales de laboratorio, especialmente cuando se necesita procesar cientos de muestras. En el estudio realizado por Aljanabi, *et al.* (1999) la pureza del ácido nucleico extraído fue determinada por su razón A260/A280, que resultó tener un valor en el rango 1.76- 1.96 en todas las muestras, demostrando alta calidad. El ADN fue estable y pudo ser amplificado por PCR antes y después de 12 meses de almacenamiento a 4°C (Aljanabi *et al.*, 1999).

Da Silva (2003) en su estudio de microsatélites en secuencias expresadas etiquetadas (EST) de caña de azúcar, aplicó un protocolo similar al utilizado en hoja de frijol propuesto por Lobos y Seelenfreund (1999). Las principales diferencias radican en que elimina las extracciones fenólicas por una extracción con cloroformo y el uso de proteinasa K. Desde el punto de vista económico y de realización, es de interés determinar el efecto de dichas diferencias sobre la integridad y pureza del ADN extraído.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### A. Objetivo general

- Establecer una metodología de extracción de ADN de caña de azúcar que permita la manipulación de un número grande de muestras por su economía y realización; con buen rendimiento, integridad y pureza de ADN para su posterior análisis con marcadores microsatélites.

#### B. Objetivos específicos

- Extraer ADN de meristemas de caña de azúcar de tres variedades descritas en Guatemala por cuatro técnicas o protocolos diferentes.
- Estimar el costo de la realización de cada protocolo de extracción.
- Determinar la pureza e integridad del ADN extraído.
- Utilizar el ADN extraído para su análisis con marcadores microsatélites.
- Visualizar la amplificación de microsatélites en geles de agarosa con tinción de bromuro de etidio y poliacrilamida con tinción de nitrato de plata.
- Evaluar la estabilidad del ADN extraído por cada uno de los protocolos después de almacenamiento a 4°C con base en su integridad y capacidad de amplificación.
- Evaluar la estabilidad del producto de amplificación después de almacenamiento a -20°C con base en la calidad de visualización de polimorfismos microsatélites.
- Evaluar individualmente los cuatro protocolos de extracción de acuerdo a la visualización del ADN amplificado, así como su costo y realización.

#### C. Hipótesis

- Por lo menos uno de los protocolos de extracción permite obtener ADN de caña de azúcar con características tales para realizar un análisis mediante microsatélites, en poco tiempo y costo moderado.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrajo ADN de las variedades de caña CP72-2086, CP73-1547 y CG97-97 (parte de la colección de CENGICAÑA) siguiendo los cuatro protocolos que se exponen a continuación. Los pasos descritos en cada protocolo se resumen en la Tabla 5. Los protocolos fueron levemente modificados, sustituyendo el secado de ADN invirtiendo el tubo eppendorf por centrifugación con vacío a 65°C. También se hizo las conversiones necesarias de la velocidad de centrifugación y las cantidades de reactivos para el tejido disponible.

### A. Protocolo de extracción 1 (propuesto por Wagner *et al.*, 2001)

#### REACTIVOS

NaOH 250mM

Tris HCl 100mM (pH 8.0)

Agua ultra pura (destilada, filtrada y esterilizada)

#### EQUIPO

Bloque de calentamiento

Centrifuga

Refrigerador (4°C)

1. Cortar de dos a tres discos (200mg) de tejido del cilindro foliar cercano al meristemo con cuchilla flameada y ponerlos en un tubo eppendorf.
2. Agregar 200uL de buffer de extracción (250mM NaOH) e incubar a 100°C por 60 segundos. Macerar e incubar 60 segundos en bloque térmico a 100°C y otra vez macerar.
3. Agregar 480uL de 100mM Tris-HCl pH 8.0 a cada tubo.
4. Centrifugar por cinco minutos a 13000rpm, alicuotar el sobrenadante.
5. Almacenar a 4°C.

### B. Protocolo de extracción 2 (propuesto por Lobos y Seelenfreund, 1999)

#### REACTIVOS

Nitrógeno Líquido

Buffer de lisis

NaCl 250mM

EDTA 1mM

Tris-HCl pH 8.0 10mM

Proteinasas K (10mg/mL) 450uL

Buffer de extracción

SDS 4%

Beta -mercaptoetanol 1mM

Acetato de potasio 5M

Acetato de sodio 3M  
 Fenol: cloroformo: isopentanol (25:24:1)  
 Cloroformo:isopentanol (24:1)  
 Isopropanol  
 Etanol 70% y absoluto  
 ARNasa 20mg/mL  
 Proteinasa K 10mg/mL

Buffer TE (Tris-EDTA)  
     Tris-HCl      10 mM  
     EDTA          1 mM  
     pH             8.0

### **EQUIPO**

Incubadora  
 Congelador (-20°C)  
 Centrifuga  
 Centrifuga con vacío  
 Refrigerador (4°C)

1. Macerar con nitrógeno líquido 500 mg de tejido foliar cercano al meristemo e introducirlo en dos tubos eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar 600 µL de buffer de lisis (precalentado a 65°C) e incubar dos minutos a 65°C.
3. Agregar 200 µL de buffer de extracción e incubar 30 minutos a 65°C, homogenizando cada cinco minutos.
4. Agregar a cada tubo 160 µL de acetato de potasio 5 M (enfriado a 4°C). Mezclar y dejar en hielo durante diez minutos. Separar el contenido equitativamente en dos tubos (aproximadamente 450 µL)
5. Agregar un volumen (450 µL) de fenol:cloroformo:isopentanol. Homogenizar por un minuto y centrifugar diez minutos a 13,000 rpm. Recuperar la fase acuosa y repetir el procedimiento.
6. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol almacenado a -20°C. Mezclar y almacenar a -20°C durante veinte minutos.
7. Centrifugar a 13,000 rpm durante diez minutos y descartar el sobrenadante (succión).
8. Agregar 300 µL de etanol 70% almacenado a -20°C y desprender el precipitado utilizando un vórtex.
9. Centrifugar cinco minutos a 13,000 rpm. Succionar el sobrenadante y luego secar en centrifuga con vacío (Centri-Vap) tres minutos a 65°C.
10. Agregar 50 µL de buffer TE a cada tubo. Incubar siete minutos a 65°C para resuspender completamente el precipitado.

11. Agregar 15  $\mu$ L de ARNasa y centrifugar diez segundos. Incubar 40 minutos a 37°C.
12. Agregar 20  $\mu$ L de proteinasa K e incubar 20 minutos a 50°C.
13. Llevar a un volumen final de 200  $\mu$ L con buffer TE.
14. Agregar 200  $\mu$ L de fenol:cloroformo:isopentanol. Homogenizar por un minuto y centrifugar diez minutos a 13,000 rpm. Recuperar la fase acuosa (aproximadamente 150  $\mu$ L) y juntar el contenido de los dos tubos en uno solo.
15. Agregar 300  $\mu$ L de cloroformo:isopentanol. Homogenizar y centrifugar diez minutos a 13,000 rpm. Recuperar la fase acuosa (170  $\mu$ L).
16. Agregar 17  $\mu$ L de acetato de sodio 3M pH 5.2
17. Agregar 400  $\mu$ L de etanol absoluto almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Almacenar durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
18. Centrifugar 30 minutos a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante (succión).
19. Agregar 700  $\mu$ L de etanol 70% almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , desprender el precipitado utilizando un vórtex. Centrifugar cinco minutos a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante (succión).
20. Centrifugar al vacío (Centri-Vap) durante tres minutos a 65°C.
21. Agregar 100  $\mu$ l de buffer TE e incubar cinco minutos a 65°C para resuspender el ADN. Homogenizar por pipeteo y almacenar a 4°C.

### C. Protocolo de extracción 3 (propuesto por Aljanabi *et al.*, 1999)

#### REACTIVOS

Buffer de homogenización

Tris-HCl	200 mM
EDTA	50 mM
NaCl	2.2 M
CTAB	2%
Sulfito de sodio	0.06% (PREPARAR JUSTO ANTES DE USAR)
pH	8.0

Fenol:cloroformo:isopentanol (25:24:1)

Isopentanol

NaCl 6M

Polivinilpirrolidona (PVP) 10%

N-lauroil sarcosina 5%

CTAB 20%

Buffer TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH	8.0

**EQUIPO**

Incubadora  
 Centrifuga  
 Congelador (-20°C)  
 Centrifuga al vacío  
 Refrigerador (4°C)

1. Rebanar cerca de 150-200mg del cilindro foliar cercano al meristemo fresco de la caña de azúcar (luego de remover las hojas envainadoras) y colocar en dos tubos eppendorf de 1.5 mL.
2. Homogenizar el tejido fresco con 400uL del buffer de homogenización a cada tubo empleando un homogenizador o pistilo por unos pocos segundos (no se recomienda un tiempo mayor de homogenización puesto que puede obtenerse ADN parcialmente degradado).
3. Agregar 50uL de N-lauroil sarcosina 5%, 50uL de PVP 10% y 50uL de CTAB 20%. Mezclar bien por inversión.
4. Incubar de 30 a 60min a 65°C en baño de agua.
5. Mezclar las muestras por inversión tres o cuatro veces durante la incubación.
6. Retirar las muestras del baño de agua y enfriar a temperatura ambiente.
7. Agregar un volumen igual (550uL) de fenol:cloroformo:isopentanol a cada tubo, mezclar por inversión y luego centrifugar a 13,000 rpm por diez minutos a 4°C.
8. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo (tratando de no perturbar la interfase al pipetear)
9. Agregar 500uL de isopropanol seguido por 100uL de NaCl 6M.
10. Incubar a -20°C por al menos una hora.
11. Centrifugar a 13,000 rpm por cinco minutos, succionar el sobrenadante y agregar 500uL de etanol 70%. Centrifugar por cinco minutos a 13000 rpm y succionar el sobrenadante. Secar en Centri-Vap por tres minutos a 65°C. Luego resuspender en 100uL de bufferTE.

**D. Protocolo de extracción 4 (propuesto por da Silva, 2003)****REACTIVOS**

Buffer CTAB (bromuro de hexadecilmetilamonio)  
 CTAB 2% (p/v)  
 NaCl 1.4 M  
 Tris-HCl 100mM, pH 8.0  
 EDTA 20mM  
 Beta-mercaptoetanol 0.2% (v/v)

Cloroformo: isopentanol (24:1)

ARNasa 20mg/mL  
Etanol 70%  
Etanol absoluto  
Nitrógeno líquido

Buffer TE  
Tris-HCl 10mM  
EDTA 1mM  
pH 8.0

### **EQUIPO**

Incubadora  
Centrifuga al vacío  
Centrifuga  
Congelador (-20°C)  
Refrigerador (4°C)

1. Tomar 150-200mg de cilindro foliar cercano al meristemo y macerarlas con nitrógeno líquido hasta que el material se convierta en un fino polvo. Transferirlo rápidamente a dos tubos eppendorf de 1.5mL y agregar 500uL de buffer CTAB precalentado a 65°C a cada tubo. Evitar agregar el buffer a menos de 15°C.
2. Cerrar el tubo y mezclar.
3. Incubar los tubos en baño maría a 65°C por 30 minutos, mezclar ocasionalmente.
4. Remover los tubos del baño de agua y enfriar a temperatura ambiente; agregar 500uL de cloroformo: isopentanol ; mezclar por diez minutos.
5. Centrifugar a 13,000 rpm por cinco minutos a temperatura ambiente.
6. Transferir la fase superior (acuosa) a otro tubo.
7. Repetir el lavado con cloroformo: isopentanol desde el paso 4 a 6.
8. Agregar 15uL de ARNasa a cada tubo e incubar a 37°C por 30 minutos.
9. Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto almacenado a -20°C y mezclar hasta formar un precipitado.
10. Pescar el ADN utilizando una punta de plástico o vidrio.
11. Descartar la fase acuosa y lavar el precipitado con 335uL de etanol 70%. Centrifugar por cinco minutos a 13000 rpm.
12. Descartar la fase acuosa. Secar con vacío en Centri-Vap por tres a siete minutos.
13. Disolver el ADN en 100uL de buffer TE y dejar a 4°C por media hora. La muestra puede ser almacenada a 4°C.

Cuadro 5. Resumen de pasos de los protocolos de extracción.

Paso	Wagner <i>et al.</i> , 2001	Lobos y Seelenfreund, 1999	Aljanabi <i>et al.</i> , 1999	da Silva, 2003
1. Preparación de tejido	-----	Maceración con nitrógeno líquido	-----	Maceración con nitrógeno líquido
2. Lisis y digestión celular	NaOH e Incubación	SDS/NaCl/EDTA/ Tris HCl/ Proteinasa K Incubación	CTAB/NaCl/ EDTA/ Sulfito de sodio/PVP/N-lauroil-sarcosina Incubación	CTAB/NaCl/ EDTA/ $\beta$ -mercaptoetanol Incubación
3. Extracción de proteínas	-----	Fenol/Cloroformo /Isopentanol (X2)* Cloroformo/ Isopentanol (X2)	Fenol/Cloroformo /Isopentanol	Cloroformo/ Isopentanol (X2)
4. Purificación	-----	↓ Isopropanol ↓ Etanol Alta [sal] Tratamiento Proteinasa K y ARNasa	↓ Isopropanol Alta [sal] ↓ Etanol	Tratamiento ARNasa ↓ Etanol
5. Resuspensión	-----	Buffer TE	Buffer TE	Buffer TE

\* Dos veces ↓ Precipitación

## E. Verificación de la integridad del ADN

### REACTIVOS

Agarosa al 0.8% en TBE 0.5X

TBE 0.5X

Buffer de carga (10X: 600 $\mu$ L glicerol 80%, 2.5mg xilene cianol, 2.5mg azul de bromofenol, 400 $\mu$ L agua destilada)

Buffer TBE 5X (Tris-borato-EDTA)

Para 1 L

Tris base 108g

Ácido Bórico 55g

Ajustar con agua destilada

Solución Bromuro de etidio (2mg/mL)

### EQUIPO

Cámara de electroforesis Fisher Biotech Electrophoresis Systems Midi-Horizontal System Fisher Scientific (Capacidad 200mL) y peines 20 pozos.

1. Preparar 150mL de agarosa al 0.8% en TBE0.5X. Calentar en microondas, con agitación eventual durante un minuto, veinte segundos cada vez y agitando. Se requiere que la solución se vea transparente y sin burbujas.
2. Preparar la cámara y verter el agarosa. Dejar polimerizar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
3. Retirar los peines y llenar la cámara con TBE0.5X suficiente como para que apenas esté por encima del gel.
4. Poner sobre un trozo de parafilm gotas de 2 $\mu$ L de buffer de carga. Mezclar pipeteando 2 $\mu$ L de buffer de carga con 10 $\mu$ L de ADN. Cargar el gel con las muestras y 6 $\mu$ L de marcador molecular Lambda Eco RI/Hin dIII.
5. Correr el gel durante una hora a 100V.
6. Sacar el gel de la cámara y sumergirlo en solución de bromuro de etidio (utilizar doble guante, lentes y bata, tomar todas las precauciones. **CANCERÍGENO!!**) durante diez minutos.
7. Sumergir el gel en agua destilada durante quince minutos y fotografiarlo dentro de transiluminador.
8. El gel se descarta en una solución de un gramo de carbón activado disuelto en 400mL de agua destilada para eliminar el bromuro de etidio adherido al gel.

## F. Estimación de la concentración y pureza del ADN extraído

### REACTIVOS

Buffer TE

Tris-HCl 10mM

EDTA 1mM

pH 8.0

### EQUIPO

Espectrofotómetro UV-Vis SmartSpec 300™ Bio-Rad

1. Hacer una dilución de ADN extraído 1:200 en buffer TE mezclando 995 $\mu$ L de buffer con 5 $\mu$ L del ADN resuspendido. Homogenizar vigorosamente.
2. Encender el equipo. Escoger la opción DNA:RNA. Indicar factor de conversión A260nm 1.0=50.0 $\mu$ g/mL y factor de dilución 200.000.
3. Blanquear con 200 $\mu$ L-1000 $\mu$ L de buffer TE.
4. Medir la concentración de las muestras colocando 200-1000  $\mu$ L de la dilución preparada en la celda de cuarzo. Limpiar la celda utilizando kimwipes. Enjuagar la celda entre muestras con agua destilada.

5. Interpretar los resultados de la cuantificación y evaluación de la pureza A260nm/A280nm. Una razón menor de 1.700 indica la presencia de proteínas, y una razón mayor a 1.900 indica presencia de ARN.
6. Hacer diluciones de las muestras según la cantidad necesaria de ADN necesarias para realizar la PCR.

## G. Amplificación de microsátélites por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 1. Mezcla de reacción.

Cuadro 6. Mezcla de reacción PCR para amplificación de microsátélites.

Componente	Cantidad
ADN caña	5 $\mu$ L (100ng)
10mM dNTP	1 $\mu$ L
50mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L
10X buffer PCR	5 $\mu$ L
Agua Ultra pura	32.8 $\mu$ L
12.5mM partidor R	2 $\mu$ L
12.5mM partidor F	2 $\mu$ L
5U/ $\mu$ L Taq polimerasa	0.2 $\mu$ L (1U)
Total (Master Mix)	50 $\mu$ L

2. Programa PCR Termociclador Genius Techne. Los partidores fueron diseñados específicamente para caña de azúcar. Sus características se resumen en el Anexo C. Según esta información se estableció el programa de amplificación para el termociclador (Cuadro 7).

Cuadro 7. Programa para termociclador.

Evento	# ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94°C	2 min
Desnaturalización	1	94°C	30 seg
Hibridización	1	54°C	1 min
Elongación	1	72°C	1 min
Repetición de ciclo	30		
Elongación final	1	72°C	5 min
Finalización	1	4°C	Indefinido

## H. Visualización de producto de PCR

1. Visualización con gel de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata. El protocolo que se muestra a continuación se desarrolló de acuerdo a la metodología utilizada por Mills (2001).

**REACTIVOS**

Etanol 70%

Etanol 95%

Bind Silano (5 $\mu$ L  $\gamma$ -metacriloxi-propiltrimetoxisilano, 50 $\mu$ l ácido acético glacial en etanol 95% 1mL )

Sigmacote®

Poliacrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 38:2)

Uncle Bill's Magic Solution of Love (58g NaOH, 400g SDS en 1L de agua destilada)

TBE 5X (54g Trizma Base, 27.5g Ácido Bórico, 4.65g EDTA en 1L de agua destilada)

Urea

TEMED

Persulfato de amonio 10%

*Stop Mix* (950 $\mu$ L formamida (deionizada), 30 $\mu$ L agua didestilada, 20 $\mu$ L EDTA (0.5M), 1mg azul de bromofenol, 1mg xilen cianol. Mezclar y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ )

Solución de fijación y parada (ácido acético 10%)

Solución de tinción (nitrato de plata 0.1 %, 1.5mL formaldehído 37%/L)

Almacenada a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después del uso se filtra y se puede guardar para 5 tinciones.Solución de revelado (carbonato de sodio 3% en agua destilada preparada en frío justo antes de usar, 1.5mL formaldehído 37%/L, 200 $\mu$ L tiosulfato de sodio/L)

Solución de lavado (Agua destilada)

Marcador molecular 30-330bp AFLP (Invitrogen)

**EQUIPO**

Cámara Bio-Rad Sequence-Gel (38x50cm) espaciadores, peines de 32 pozos, jeringa de carga.

1. Lavar la placa a la que quedará adherido el gel con jabón y esponja suaves, removiendo restos de gel. Enjuagar con agua suavizada (dos veces), agua destilada (dos veces), etanol 70% (una vez) y etanol 95% (una vez). Dejar reposar por cinco minutos en posición vertical.
2. Secar con un Kimwipe. Distribuir 30 $\mu$ L de bind silano utilizando un kimwipe. Humeder el pañuelo con agua destilada y continuar distribuyendo la sustancia sobre la placa.
3. Dejar reposar la placa por cinco minutos. Colocar en posición vertical y enjuagar con etanol 95% dos veces. Dejar secar por cinco minutos. Acelerar el proceso secando con un Kimwipe cuidadosamente.
4. Lavar la placa de plástico (a la que no queda adherido el gel) con 10mL de solución Uncle's Bill Magic Solution of Love dispersa sobre la placa con esponja dura. Dejar reposar por cinco minutos. Enjuagar con agua corriente (dos veces), agua suavizada (dos veces), agua destilada (dos veces), etanol al 70% (una vez) y etanol al 95% (una vez). Dejar secar por cinco minutos en posición vertical.
5. Colocar en posición horizontal y secar la placa con un Kimwipe. Distribuir 1mL de Sigmacote® en la placa con un Kimwipe. Luego repetir el procedimiento. Dejar reposar por cinco minutos.
6. Ensamblar la cámara con los espaciadores adecuados.

7. Preparar solución de poliacrilamida como sigue: Para 75mL: Medir 30g de Urea disolverlos en 10ml de poliacrilamida 40% y 15mL de TBE 5X. Calentar levemente para disolver. Aforar a 75mL con agua destilada y filtrar con papel Whatman No.1. Agregar 15ul de TEMED y 150uL de APS 10% justo antes de llenar la jeringa (esparcir previamente una capa delgada de vaselina blanca en el pistilo).
8. Colocar el cargador previamente preparado con una capa delgada de vaselina blanca. Cargar la cámara con la solución evitando las burbujas de aire. Descargar hasta que la solución se desborde en la parte superior. Formar un solo pozo con el peine y dejar polimerizar por una hora.
9. Colocar la cámara sobre la base, colocar 1500mL de TBE1X en los reservorios inferior y superior (este debe ser precalentado a 70°C). Colocar el peine para formar los pozos y lavar cada pozo. Aplicar 100W hasta que la temperatura sea igual a 50°C. Ajustar la potencia 55W para mantener la temperatura constante.
10. Preparar las muestras a cargar con producto PCR: *Stop Mix* (1:1). Concentrar en CentriVap a 65°C por 20 minutos.
11. Cargar 2µL de marcador molecular y 3µL de 15 muestras y correr unos minutos para que penetren las muestras dentro del gel y se reajuste la temperatura a 50°C. Cargar las siguientes 15 muestras y repetir con cada grupo de 15 muestras.
12. Correr por una hora a 55W y 50°C. Al terminar drenar el buffer y descartarlo. Separar las placas.
13. Teñir el gel como se indica en el Cuadro 8 sumergiendo la placa en las soluciones correspondientes (Ver reactivos) por el tiempo indicado con agitación constante.

Cuadro 8. Procedimiento de tinción con nitrato de plata.

Solución	Tiempo
Fijación	20 minutos
Lavado	10 minutos
Tinción	30 minutos
Lavado	10 segundos (agitación suave)
Revelado	3-4 minutos
Parada	2 minutos
Lavado	2 minutos

14. Secar a temperatura ambiente por 24 horas o dentro de un horno hasta que no esté pegajoso. Obtener una imagen por scanner y guardar en formato \*.TIF o \*.tif.

2. Visualización con gel de agarosa y tinción de bromuro de etidio.

#### REACTIVOS

Agarosa al 4% en TBE 1X

Buffer de carga (10X: 600µL glicerol 80%, 2.5mg xilene cianol, 2.5mg azul de bromofenol, 400µL agua destilada)

Buffer TBE 5X

Para 1 L

Tris base 108g

Ácido Bórico 55g

Ajustar con agua destilada

Marcador molecular Lambda *Eco RI/Hin dIII* (Promega)

### EQUIPO

Cámara de electroforesis Fisher Biotech Electrophoresis Systems Midi-Horizontal System  
Fisher Scientific (Capacidad 200mL) y peine 20 pozos.

1. Disolver el agarosa en 150mL de TBE 1X, mezclar y calentar en microondas por 30 segundos. Revolver suavemente. Calentar otros 30 segundos y repetir la operación hasta que la solución se vea transparente y sin burbujas.
2. Ensamblar la cámara y probar el peine a utilizar.
3. Enfriar un poco bajo chorro. Verter la solución dentro de la cámara y colocar el peine adecuado.
4. Dejar enfriar hasta que la solución se haya solidificado completamente. Retirar el peine. Llenar la cámara hasta cubrir el gel unos milímetros con TBE 1X.
5. Cargar una mezcla de 2 $\mu$ L de buffer de carga y 10 $\mu$ L de producto de PCR. Mezclar pipeteando y cargar la muestra en el pozo correspondiente. También cargar 6 $\mu$ L de marcador molecular Lambda *Eco RI/Hin dIII*.
6. Cerrar la cámara y correr a 130V por hora y media.
7. Sacar el gel de la cámara y sumergirlo en solución de bromuro de etidio (utilizar doble guante, lentes y bata, tomar todas las precauciones. CANCERÍGENO!!) durante 60 minutos.
8. Sumergir el gel en agua destilada durante el tiempo necesario para que se elimine el fondo sobreteñido, puede ser hasta toda una noche. Fotografiarlo dentro de transiluminador.
9. Sumergir el gel en un gramo de carbón activado disuelto en 400mL de agua destilada por un mes, para eliminar el bromuro de etidio.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Evaluación de protocolos de extracción

En este estudio se extrajo ADN de las variedades CP72-2086, CP73-1547 y CG97-97 de caña de azúcar utilizando cuatro técnicas de extracción diferentes, en busca de un protocolo que permitiera manipular un gran número de muestras por su costo, realización y buena visualización de polimorfismos de secuencia simple repetida (SSR).

Los cuatro protocolos fueron inicialmente evaluados por su realización, número de pasos involucrados y tiempo requerido para llevar a cabo la extracción (Cuadro 9), y el costo de utilizar cada protocolo para cien muestras (Cuadros 10 a 13). Para el cálculo de los costos se asumió que los protocolos se deben realizar en un laboratorio de biología molecular o marcadores moleculares, que cuentan con el equipo mínimo requerido (Referirse a la sección de Materiales y Métodos). Tampoco se consideró el costo de mano de obra, de tal manera que los costos aquí mostrados representan la inversión reactivos. El precio de los reactivos se obtuvo por medio de cotizaciones recientes en casas comerciales que los distribuyen en Guatemala, tomando la mejor oferta.

Cuadro 9. Comparación de los protocolos utilizados de acuerdo a su realización.

Protocolo	Wagner <i>et al.</i> (2001)	Lobos y Seelenfreund (1999)	Aljabani <i>et al.</i> (1999)	Da Silva (2003)
No. pasos	6	21	11	14
Tiempo aproximado	20 minutos	8 horas	4 horas	4 horas
Distribución	1 día	2 días	1 día ó 2 días	1 día ó 2 días

El primer protocolo fue evaluado por Wagner *et al.* (2001) y es muy utilizado para la extracción rápida de ADN de hojas de maíz que posteriormente es amplificado para la detección de marcadores microsatélites. Sus mayores ventajas son su bajo costo y rapidez (Wagner *et al.*, 2001) pues consta de seis pasos y se estimó un costo de Q.0.51 por la extracción (Exn) de 100 muestras (Cuadro 10).

Cuadro 10. Estimación del costo de realización del protocolo descrito por Wagner *et al.* (2001).

Reactivo	Presentación	Costo (Q)	1 Exn	100 Exn	Costo 100Exn (Q)
NaOH	1000 g	150.32	0.0020 g	0.2000 g	0.03
Tris-HCl (Trizma base)	500 g	399.85	0.0060 g	0.6000 g	0.48
Total					0.51

El protocolo propuesto por Lobos y Seelenfreund (1999) se utiliza para obtener ADN de alta pureza destinado a la detección de marcadores AFLP en frijol (Ávalos, por publicar). Consta de 21 pasos que deben ser distribuidos en dos días, por lo que se reduce el número de muestras que se pueden manipular. Debido a que involucra tratamientos de purificación con ARNasa y proteinasa K, reactivos de alto precio, su costo se eleva a Q1,024.70 por la extracción de 100 muestras (Cuadro 11).

Cuadro 11. Estimación del costo de realización del protocolo descrito por Lobos y Seelenfreund (1999).

Reactivo	Presentación	Costo (Q)	1 Exn	100 Exn	Costo 100Exn (Q)
Trizma Base	500 g	880.00	0.0728 g	7.2800 g	12.81
EDTA	250 g	548.83	0.1117 g	11.1700 g	24.52
NaCl	500 g	171.10	0.1753 g	17.5300 g	6.00
SDS	100 g	628.46	0.1200 g	12.0000 g	75.42
b-MercapEt	25 mL	852.10	0.0100 mL	1.0000 mL	34.08
KOAc	1000 g	547.30	0.0942 g	9.4200 g	5.16
NaOAc	250 g	253.10	0.0042 g	0.4200 g	0.43
Fenol	250 g	285.29	0.1187 mL	11.8700 mL	13.55
Cloroformo	4000 mL	444.03	0.1100 mL	11.0000 mL	1.22
Isopentanol	1000 mL	691.79	0.0400 mL	4.0000 mL	2.77
Isopropanol	4000 mL	309.51	0.4500 mL	45.0000 mL	3.48
Etanol	1000 mL	217.30	1.2500 mL	1.2500 mL	0.27
ARNasa	200 mg	2800.00	0.3000 mg	30.0000 mg	420.00
Proteinasa K	200 mg	3000.00	0.2000 mg	20.0000 mg	300.00
Nitrógeno líquido	1000 mL	12.50	100 mL	10000 mL	125.00
<b>Total</b>					<b>1024.70</b>

El protocolo propuesto por Aljanabi *et al.* (1999) fue evaluado para la manipulación de tejidos de caña de azúcar, fresa y lechuga. Estos tienen la característica de ser susceptibles a la oxidación debido a su alto contenido de polisacáridos y polifenoles. La introducción de reactivos como la polivinilpirrolidona, el sulfito de sodio y la N-lauroil sarcosina, disminuyen considerablemente la oxidación del tejido meristemático de la caña de azúcar (Aljanabi *et al.*, 1999), evitando que el ADN se torne de color café oscuro durante la extracción. Este protocolo tiene la ventaja de poder realizarse en once pasos distribuidos en uno o dos días, dependiendo de las necesidades, y del número de muestras que se pretendan manipular. Su costo para 100 muestras se estimó en Q124.44 (Cuadro 12), dado que no requiere tratamiento con las enzimas ARNasa y proteinasa K como lo hace el protocolo anterior.

Cuadro 12. Estimación del costo de realización del protocolo descrito por Aljanabi *et al.* (2001).

Reactivo	Presentación	Costo (Q)	1 Exn	100 Exn	Costo 100Exn (Q)
Tris-HCl	500 g	880.00	0.0098 g	0.9800 g	1.72
EDTA	250 g	548.83	0.0075 g	0.7500 g	1.65
NaCl	500 g	171.10	0.0677 g	6.7700 g	2.32
CTAB	100 g	733.43	0.1080 g	10.8000 g	79.21
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	250 g	471.10	0.0020 g	0.2000 g	0.38
C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>3</sub> Na	250 g	936.60	0.0025 g	0.2500 g	0.94
(C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O) <sub>n</sub>	100 g	765.6	0.0050 g	0.5000 g	3.83
Fenol	250 g	285.29	0.2158 mL	21.5800 mL	24.63
Cloroformo	1000 mL	163.35	0.1500 mL	15.0000 mL	2.45
Isopentanol	1000 mL	691.79	0.0500 mL	5.0000 mL	3.46
Isopropanol	4000 mL	309.51	0.5000 mL	50.0000 mL	3.87
<b>Total</b>					<b>124.44</b>

El último protocolo evaluado (da Silva, 2003) fue utilizado por da Silva (2001) en su análisis preliminar de marcadores microsatélites a partir de secuencias expresadas en caña de azúcar. Esta técnica es muy parecida a la propuesta por Lobos y Seelenfreund (1999), pero elimina las extracciones fenólicas y el uso de proteínasa K. Debido a esto, el protocolo se lleva a cabo en catorce pasos y aproximadamente cuatro horas que se pueden distribuir en uno o dos días según las necesidades. Esta reducción de etapas y reactivos permiten que el precio de realizar la extracción de 100 muestras de caña de azúcar se estime en Q646.57 (Cuadro 13). La Figura 4 muestra la comparación de los costos estimados para los cuatro protocolos evaluados.

Cuadro 13. Estimación del costo de realización del protocolo descrito por da Silva (2003).

Reactivo	Presentación	Costo (Q)	1 Exn	100 Exn	Costo 100Exn (Q)
Tris-HCl (Trizma base)	500 g	880.00	0.0060 g	0.6000 g	1.06
EDTA	250 g	548.83	0.0093 g	0.9300 g	2.04
NaCl	500 g	124.56	0.0409 g	4.0900 g	1.02
CTAB	100 g	733.43	0.0080 g	0.8000 g	5.87
b-MercapEt	25 mL	852.1	0.0100 mL	1.0000 mL	34.08
Cloroformo	4000 mL	444.03	0.2400 mL	24.0000 mL	2.66
Isopentanol	1000 mL	691.79	0.4000 mL	40.0000 mL	27.67
Etanol	1000 mL	217.30	1.2500 mL	125.00 mL	27.16
Nitrógeno líquido	1000 mL	12.50	100 mL	10000.00 mL	125.00
ARNasa	200 mg	2800.00	0.3000 g	30.0000 g	420.00
<b>Total</b>					<b>646.57</b>

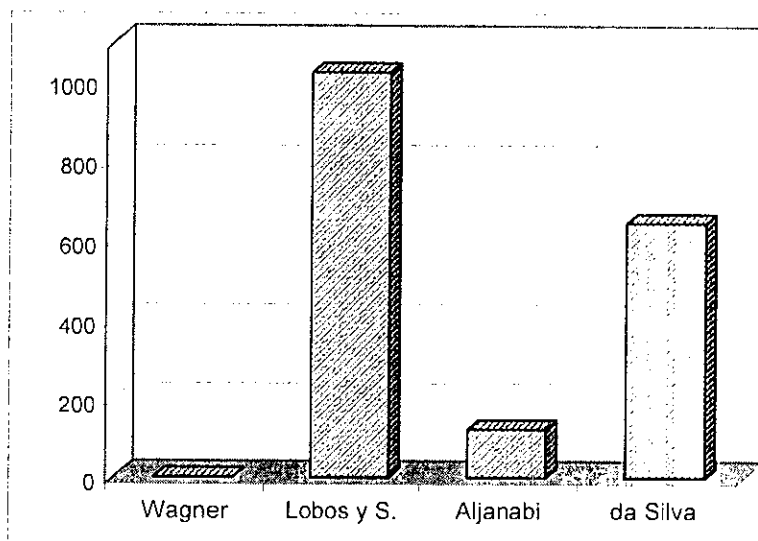


Figura 4. Comparación de los protocolos de extracción de acuerdo a su costo en la extracción de 100 muestras.

Inmediato a la extracción por las cuatro técnicas descritas, se determinó la concentración y pureza del ADN obtenido (Cuadro 14). Ambos aspectos fueron estimados por medio de espectrofotometría. La pureza fue definida por la razón  $A_{260nm}/A_{280nm}$ , considerando un valor aceptable aquel que se encontraba en el rango 1.7000-1.9000. Los valores en el límite inferior de éste se consideraron como indicativos de la presencia de proteínas y los valores en el límite superior como indicativos de la presencia de ARN (Lobos y Seelenfreund, 1999).

Se observó que el ADN obtenido con el protocolo propuesto por Wagner *et al.* (2001) mostró una concentración promedio de 3848.8714ug/mL y pureza promedio de 1.1019, estos valores indicaron una alta concentración de proteínas y ARN. Esto es consistente con el hecho de que esta técnica no utiliza procesos de extracción de proteínas y purificación del ADN.

En el caso del protocolo propuesto por Aljanabi *et al.* (1999) se observó una pureza promedio de 2.1746, que refleja que el protocolo elimina los polifenoles y evita la oxidación del ADN, pero probablemente no elimina el ARN y haya contribuido el fenol. La concentración promedio de ADN obtenida con este protocolo fue de 156.7292ug/mL.

En el caso de la técnica descrita por Lobos y Seelenfreund (1999) se obtuvo una pureza promedio de 2.1557. Esta técnica a pesar de involucrar varios pasos de purificación del ADN, es probable que no elimine por completo el fenol utilizado para la

extracción de proteínas y esto afecte su pureza. El promedio de la concentración de ADN obtenida por este protocolo fue de 206.4625 ug/mL.

La mejor pureza promedio se encontró en las muestras extraídas por la técnica descrita por da Silva (2003), 1.8865, que se encuentra dentro del rango deseado. Esto demuestra que la extracción de proteínas sin fenol es eficiente y mejora la calidad del ADN obtenido. La concentración promedio para este protocolo fue de 199.9593ug/mL. En este protocolo, como en los descritos por Aljanabi *et al.* (1999) y Lobos y Seelenfreund (1999), es posible que la concentración promedio haya sido afectada por la extensa manipulación del ADN, dado que son protocolos multipasos, y se haya sacrificado cantidad por calidad.

Cuadro 14. Concentración y pureza del ADN obtenido con los protocolos.

Protocolo	Variedad	Concentración (ug/mL)	Pureza (A260/A280)
Wagner <i>et al.</i> (2001)	1	3172.6384	1.1851
	2	4269.5758	0.9307
	3	4104.3999	1.1900
	<b>Promedio*</b>	<b>3848.8714±591.4297</b>	<b>1.1019±0.2725</b>
Lobos y S. (1999)	1	275.3496	1.5982
	2	150.8188	2.9590
	3	193.2192	1.9165
	<b>Promedio*</b>	<b>206.4265±63.3129</b>	<b>2.1557±1.3077</b>
Aljanabi <i>et al.</i> (1999)	1	266.3093	2.2367
	2	173.9001	1.7548
	3	202.9181	2.5324
	<b>Promedio*</b>	<b>156.7292±47.2581</b>	<b>2.1746±0.7211</b>
Da Silva (2003)	1	419.8599	1.6421
	2	125.9494	2.2451
	3	54.0686	1.7723
	<b>Promedio*</b>	<b>199.9593±193.8012</b>	<b>1.8865±0.5830</b>

Variedad 1= CP72-2086, 2= CP73-1547, 3= CG97-97. \*Promedio ± Limite de confianza al 95%.

Otro aspecto que se consideró para determinar la calidad del ADN obtenido a partir de los cuatro protocolos fue su integridad. Se cargó una alícuota de ADN resuspendido en TE, o directamente de la mezcla de extracción en el caso del protocolo descrito por Wagner *et al.* (2001), en un gel de agarosa 0.8% (Figura 5). La presencia de ADN íntegro se definió como un núcleo en forma de corona en la parte superior del carril sin o con poca cola. El ADN se desintegra con el pipeteo y transferencia durante la extracción, y forma un barrido o nube a lo largo de los carriles en un gel de agarosa. La presencia de ARN se observa como nubes al final de los carriles (Lobos y Seelenfreund, 1999).

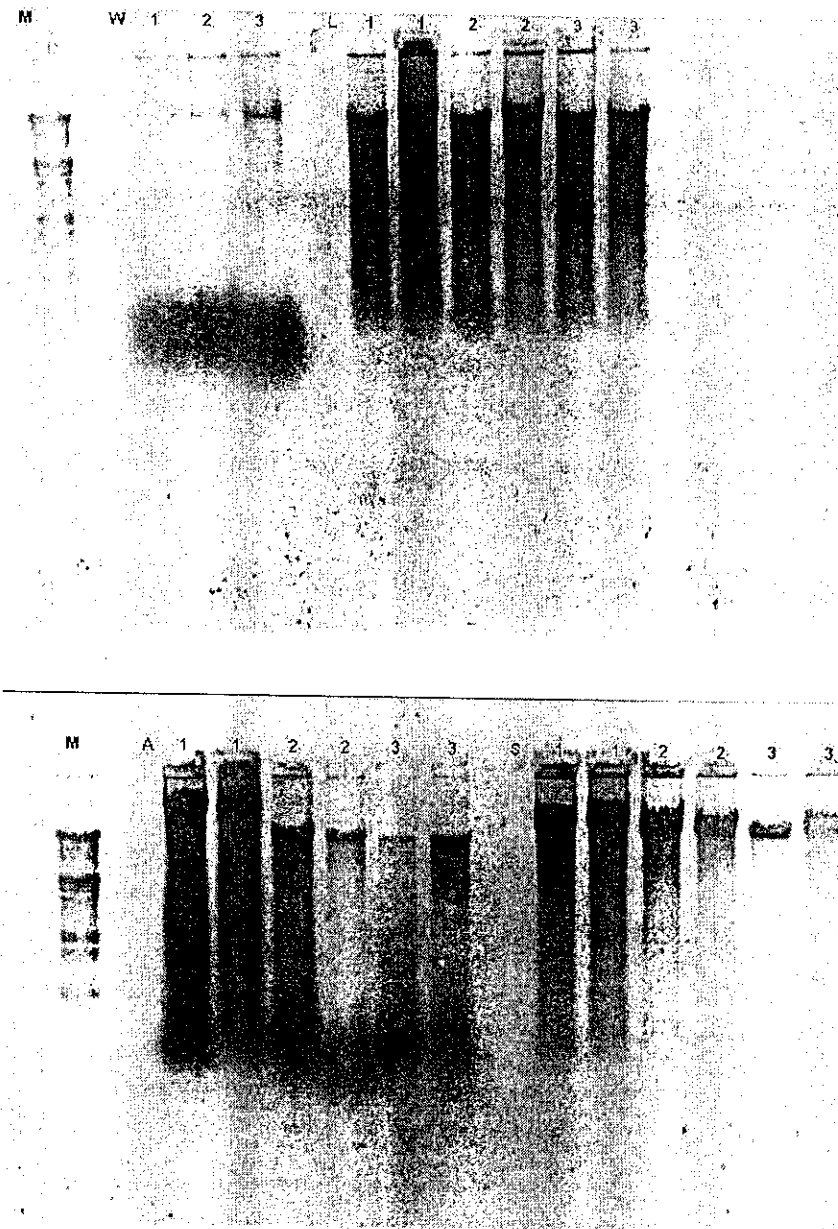


Figura 5. Integridad del ADN inmediato a la extracción.  
 (Negativo del original. M = Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L = Lobos y Seelenfreund (1999),  
 A = Aljanabi *et al.* (1999), S = da Silva (2003), 1= CP72-2086, 2= CP73-1547 y 3= CG97-97).

La alta concentración de proteínas y clorofilas que no fueron extraídas de la muestra en el protocolo descrito por Wagner *et al.* (2001) se pudieron observar en el gel como coloraciones verde, azul y roja a lo largo del carril y nubes de ARN al final (Figura 5). Estas fueron visibles debido a su alta concentración en las muestras. También se observó que el núcleo de éstas fue muy delgado y poco intenso. Estos resultados sumados a la pureza y concentración de las muestras indican que el ADN obtenido por

este protocolo se encuentra en muy baja concentración y contiene gran cantidad de proteínas y ARN, dado que no incluye procedimientos de purificación.

El protocolo propuesto por Aljanabi *et al.* (1999) mostró núcleos muy bien definidos e intensos en la mayoría de los casos, pero también se observó la presencia de ARN al final de los carriles, probablemente debido a que esta técnica no hace uso de ARNasa. Aljanabi *et al.* (1999) propone que en su técnica de extracción el ARN es degradado durante el proceso de extracción. Sin embargo, en este estudio se observó claramente su presencia en la prueba de integridad (Figura 5), y también reflejado en los valores de pureza para las muestras obtenidas (Cuadro 14).

La mejor integridad y ausencia de ARN fue observada en las muestras obtenidas por los protocolos descritos por Lobos y Seelenfreund (1999) y da Silva (2003), siendo superior el último (Figura 5). Se notó que las muestras obtenidas por el protocolo propuesto por Lobos y Seelenfreund (1999) estaban bastante desintegradas probablemente debido a la extensa manipulación de las muestras durante la extracción. Dado que da Silva (2003) elimina las extracciones fenólicas y el tratamiento con proteinasa K que incluye el protocolo anterior, el ADN de estas muestras se mantuvo más íntegro, formando núcleos en forma de corona intensos y definidos con poca cola y sin presencia de ARN.

Se observó que, en general, las tres variedades se comportaron de igual forma para los cuatro protocolos. Sin embargo, la variedad 1 produjo ADN de menor integridad respecto a las demás, probablemente debido a que en todos los casos dicha variedad fue la que se deshojó en primer lugar, por lo que tuvo que esperar más tiempo para empezar el proceso de extracción. Esto implica que la oxidación del tejido meristemático de esta variedad tuvo lugar en mayor proporción en esta variedad que en las restantes, y esto probablemente produjo la prematura desintegración del ADN. También, se notó que respecto a las demás, la variedad 2 parece tener un alto nivel de polifenoles que se ve reflejado en la pureza del ADN obtenido. El protocolo propuesto por Aljanabi *et al.* (1999) los eliminó con efectividad, mejorando la pureza.

Se evaluó la estabilidad del ADN en almacenamiento a 4°C después de 14 días (Figura 6) y 30 días (Figura 7) por medio de la integridad de éste. Se observó que la desintegración del ADN fue evidente, intensificándose las colas de los carriles en todas las muestras y las nubes de ARN en las muestras obtenidas por el protocolo descrito por Aljanabi *et al.* (1999). Sin embargo, se observó que los núcleos se mantuvieron bien formados a pesar de que su intensidad disminuyó. Esto puede ser debido a que la

degradación del ADN en presencia de ARN y proteínas es muy lenta bajo el almacenamiento, pero conforme se toman alícuotas de la muestra original la concentración del ADN disminuye. La degradación paulatina del ADN podría ser retrasada con el almacenamiento de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$ , si se tiene certeza de que no se necesita de descongelamiento continuo de las muestras, debido a que a dicha temperatura es probable que los componentes involucrados en la degradación del ADN cesen su tarea. Esto requeriría de estudios posteriores para evaluar el efecto de altas temperaturas en el almacenamiento del ADN a largo plazo.

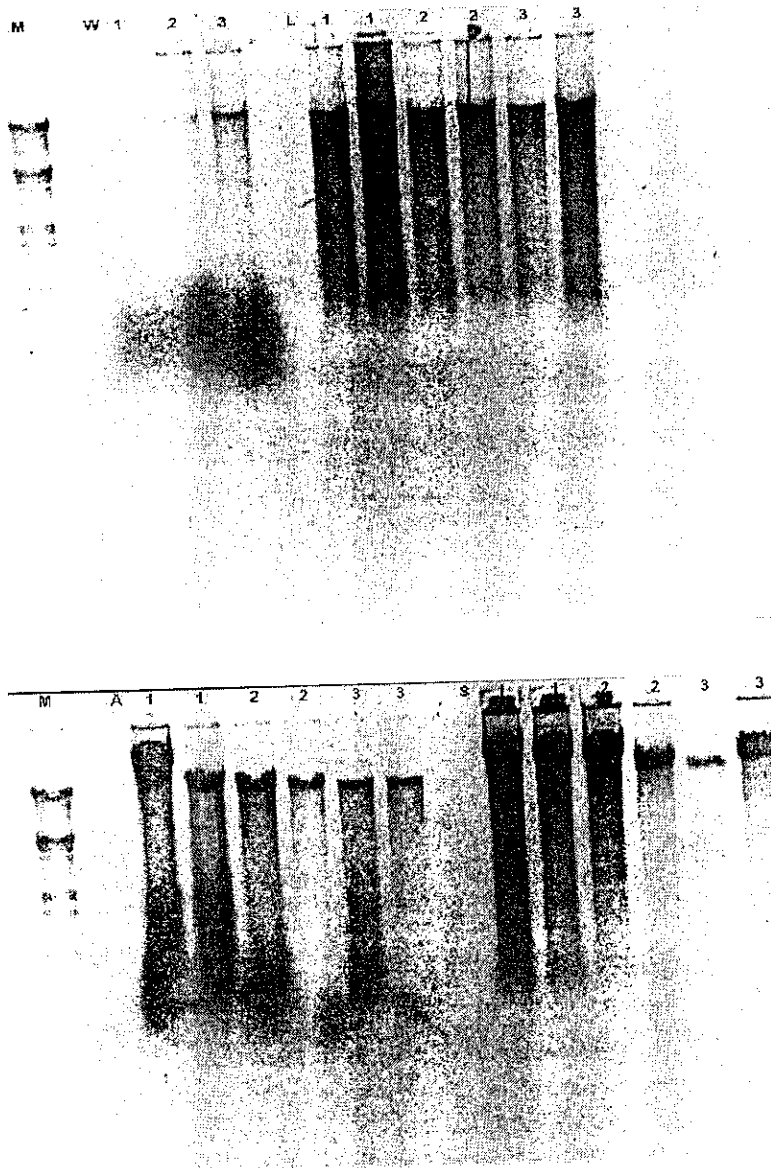


Figura 6. Integridad del ADN después de 14 días de almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$ .  
 (Negativo del original. M = Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L = Lobos y Seelenfreund (1999),  
 A = Aljanabi *et al.* (1999), S = da Silva (2003), 1= CP72-2086, 2= CP 73-1547 y 3= CG97-97).

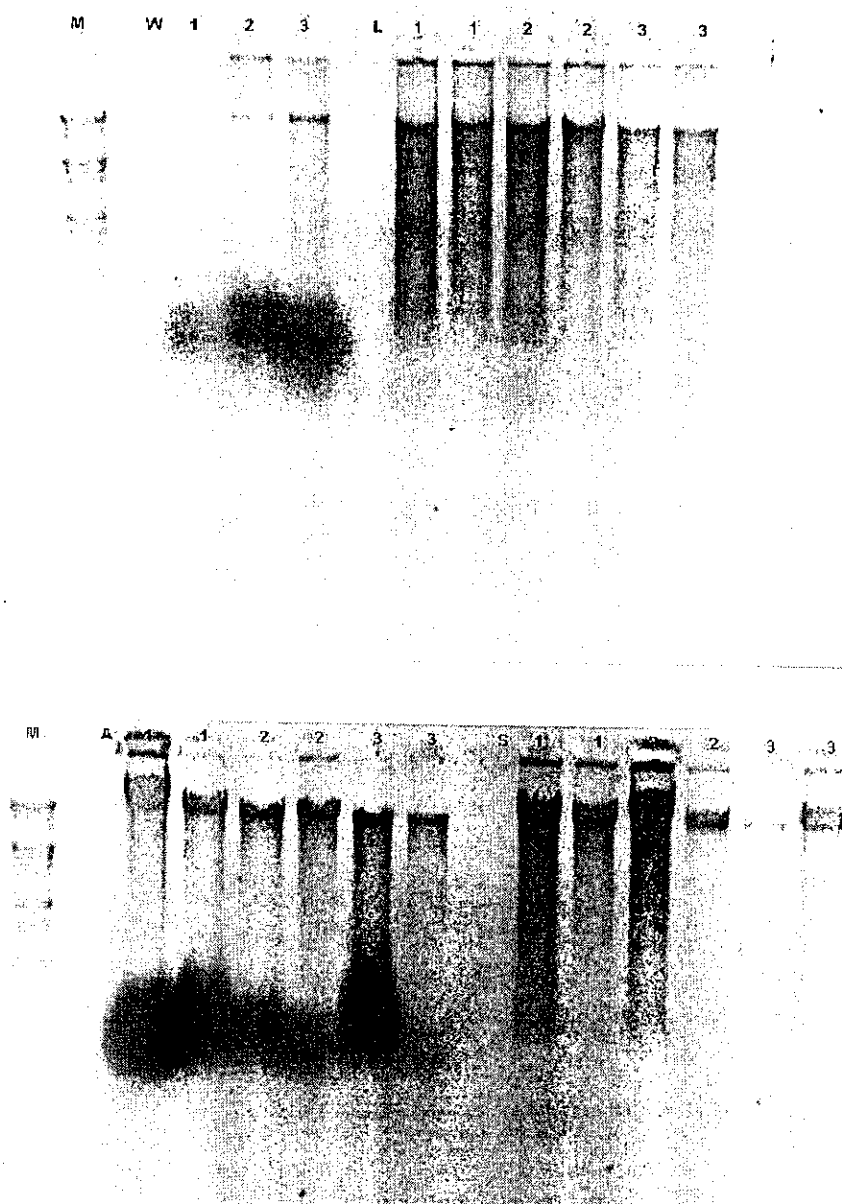


Figura 7. Integridad del ADN después de 30 días de almacenamiento a 4°C.  
 (Negativo del original. M = Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L = Lobos y Seelenfreund (1999),  
 A = Aljanabi *et al.* (1999), S = da Silva (2003), 1= CP72-2086, 2= CP73-1547 y 3= CG97-97).

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Wagner *et al.* (2001), que indica que después de diez días de almacenamiento a 4°C el ADN extraído por este protocolo es degradado en un 13%, y después de 28 días de almacenamiento más del 70%. También, Aljanabi *et al.* (1999) reportó que el ADN obtenido por su protocolo es estable después del almacenamiento a 4°C por doce meses. El ADN extraído con el protocolo propuesto por Lobos y Seelenfreund (1999) debido a su alta calidad y carencia

de otros componentes, tiene una buena estabilidad en almacenamiento a 4°C (Lobos y Seelenfreund, 1999). Esta afirmación también se aplica al ADN extraído por da Silva (2003) debido a la similitud en ambas técnicas y las características del ADN obtenido, como lo son la pureza e integridad.

De acuerdo a los aspectos evaluados, se puede observar que el protocolo descrito por Lobos y Seelenfreund (1999) tiene un costo bastante elevado respecto a los demás, y es un protocolo tedioso, pero que da un ADN de buena calidad. En el lado opuesto, el protocolo propuesto por Wagner *et al.* (2001) es muy económico y de fácil realización, pero la calidad del ADN es baja. Los protocolos que reúnen las mejores características de precio, realización y ADN estable en almacenamiento a 4°C son los propuestos por Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003). La única posible desventaja del primero es que los reactivos que utiliza son poco comunes en laboratorio de biotecnología (Cuadro 12).

## B. Visualización de polimorfismos microsatélites

Otro aspecto de calidad que se esperaba que el ADN obtenido por las cuatro técnicas cumpliera era servir de molde para amplificación de SSRs, que resultara en una buena visualización de bandas para caracterización de las variedades de caña de azúcar.

Inmediato a la extracción, el ADN fue sometido a amplificación por PCR utilizando cinco pares de partidores específicos para amplificar microsatélites en caña de azúcar (referirse a Apéndice C). Para ello se hizo una dilución de las muestras de ADN de todos los protocolos a 100ng en 5uL para la reacción y se llevo a cabo el programa de amplificación (referirse a la sección Materiales y Métodos). Al terminar este programa y para determinar la mejor forma de visualización, se cargaron muestras de la reacción de amplificación en un gel de agarosa al 4% y se tiñó con bromuro de etidio (referirse a la sección Materiales y Métodos). El resultado de esta corrida se muestra en la Figura 8. Se observó que se formaron bandas para todos los protocolos, excepto para Wagner *et al.* (2001), pero no se formaron patrones que permitieran distinguir una variedad de otra. La resolución de las bandas podría ser mejorada, en teoría, si se utilizara un gel con una concentración mayor de agarosa (10-12%) (Lobos y Seelenfreund, 1999). Sin embargo, hacer un gel con esta concentración resulta muy tedioso porque el agarosa se disuelve con mucha dificultad.

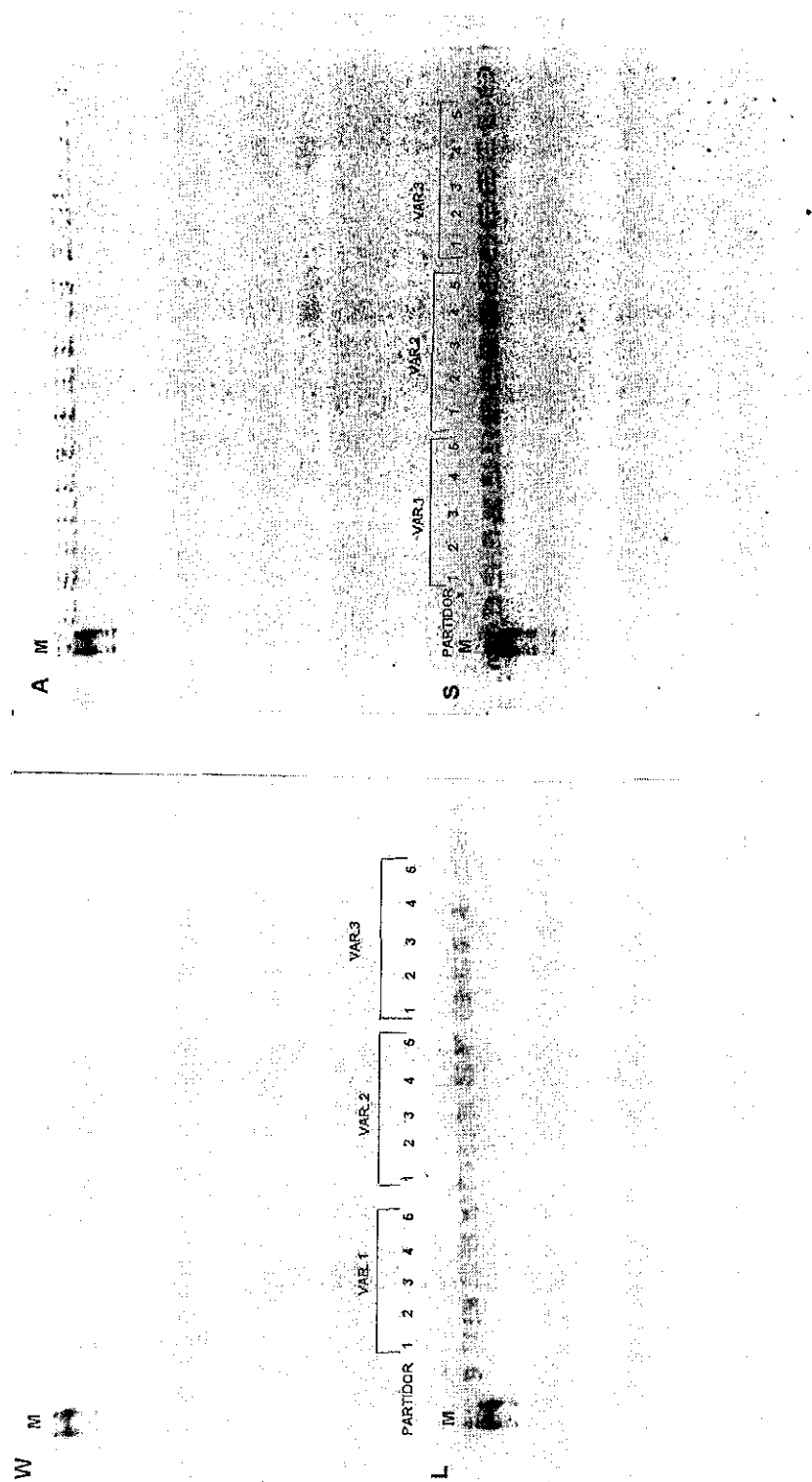


Figura 8. Visualización en gel de agarosa al 4%.

(Negativo del original. 1-5= partidores, M = Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L = Lobos y Seelenfreund (1999), A = Aljanabi *et al.* (1999), S = da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).

También se cargó muestras de producto de amplificación en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 5% y se tiñó con plata (referirse a la sección Materiales y Métodos). En la Figura 9 se muestra que en este tipo de visualización se forman patrones de bandas definidos y característicos de cada variedad, lo que permite distinguirlas entre sí. Esta evidencia hace de esta técnica la mejor forma de visualización de polimorfismos SSR para caña de azúcar de las utilizadas.

Se observó que no hubo amplificación de ADN en las muestras correspondientes al protocolo descrito por Wagner *et al.* (2001), siendo consistente con lo observado en la visualización en gel de agarosa. También se observó que las muestras correspondientes al protocolo propuesto por da Silva (2003) amplificaron levemente y no se visualizaron bandas. En los dos casos es probable que la cantidad de ADN molde utilizada para realizar la reacción no fue la adecuada para la amplificación. Para los protocolos restantes, se obtuvo el resultado esperado, descrito en el párrafo anterior, siendo superiores en definición las bandas obtenidas para las muestras correspondientes al protocolo descrito por Lobos y Seelenfreund (1999). Esto pudo ser debido a que este protocolo se caracteriza por producir ADN genómico (Lobos y Seelenfreund, 1999) por lo que es un buen molde para la técnica de microsatélites que, debido a su especificidad, requiere de ADN de mediana integridad y pureza (FAO/IAEA, 2002).

### C. Estabilidad del ADN extraído por los protocolos en almacenamiento a 4°C

Para estudiar la estabilidad del ADN obtenido por las cuatro técnicas durante almacenamiento a 4°C, además de la prueba de integridad discutida en la sección anterior, se examinó la capacidad de amplificación. Para esto se escogieron los dos pares de partidores que más información ofrecían para todas las variedades, estos fueron los partidores designados 3 y 5 (referirse al Cuadro 17).

Después de almacenar el ADN a 4°C por 14 días, se le sometió a amplificación por PCR con los partidores mencionados. En esta parte del experimento con base en los resultados anteriores, se hizo una dilución 1:2 de las muestras de ADN obtenidas a partir del protocolo propuesto por Wagner *et al.* (2001), 100 ng de ADN para los protocolos descritos por Lobos y Seelenfreund (1999) y Aljanabi *et al.* (1999), y 200ng para da Silva (2003). Esta última resultó ser la dilución adecuada para la amplificación del ADN obtenido por el protocolo descrito por da Silva (2003). Sin embargo, las muestras correspondientes al protocolo basado en Wagner *et al.* (2001) no amplificaron. Es

probable que la dilución todavía haya sido muy grande y la concentración de ADN disponible muy baja. La mejor visualización se obtuvo con el ADN extraído por los protocolos descritos por Lobos y Seelenfreund (1999) y da Silva (2003) (Figura 10).

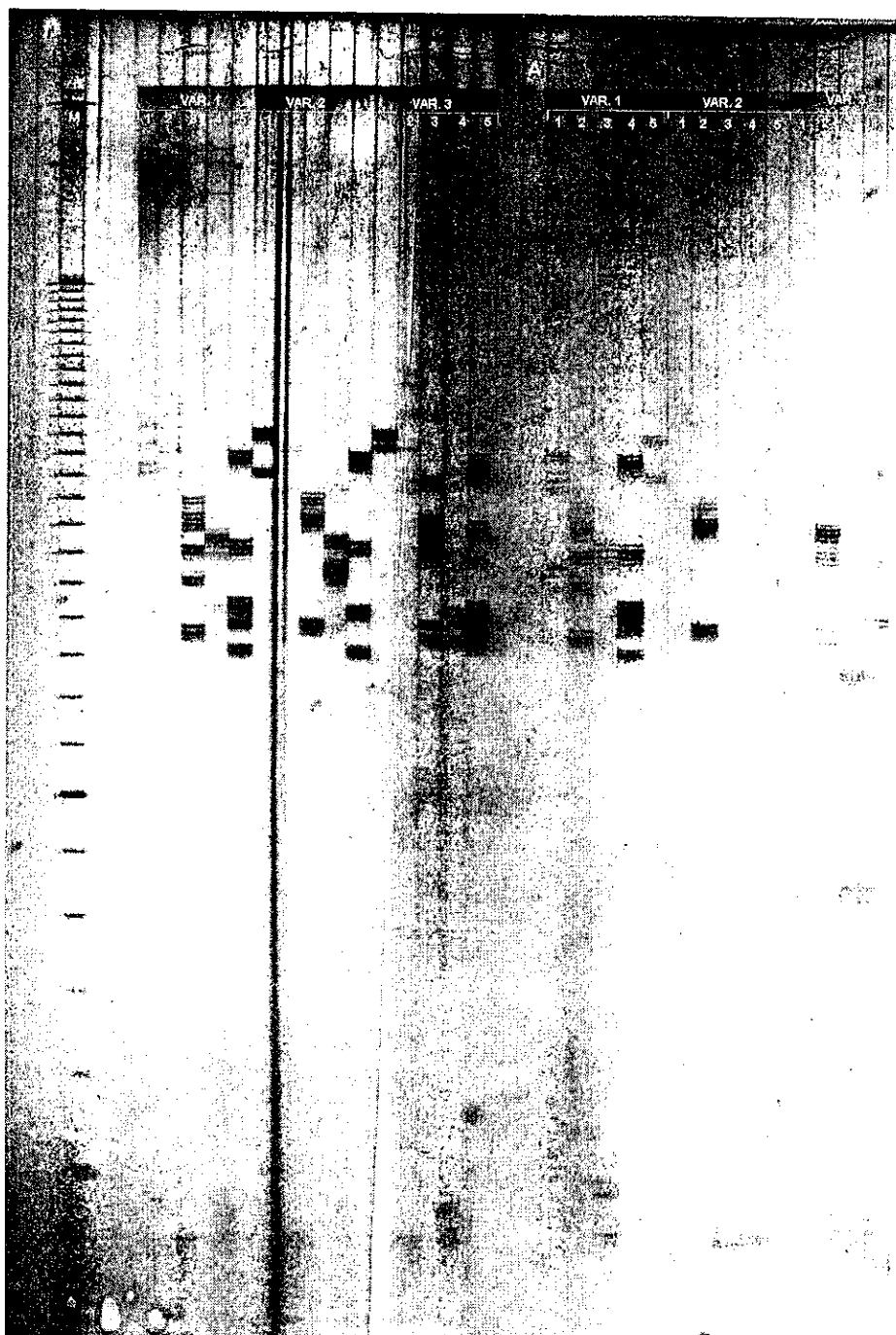


Figura 9. Visualización en gel de poliacrilamida al 5%.  
 (1-5= partidos, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999),  
 A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).

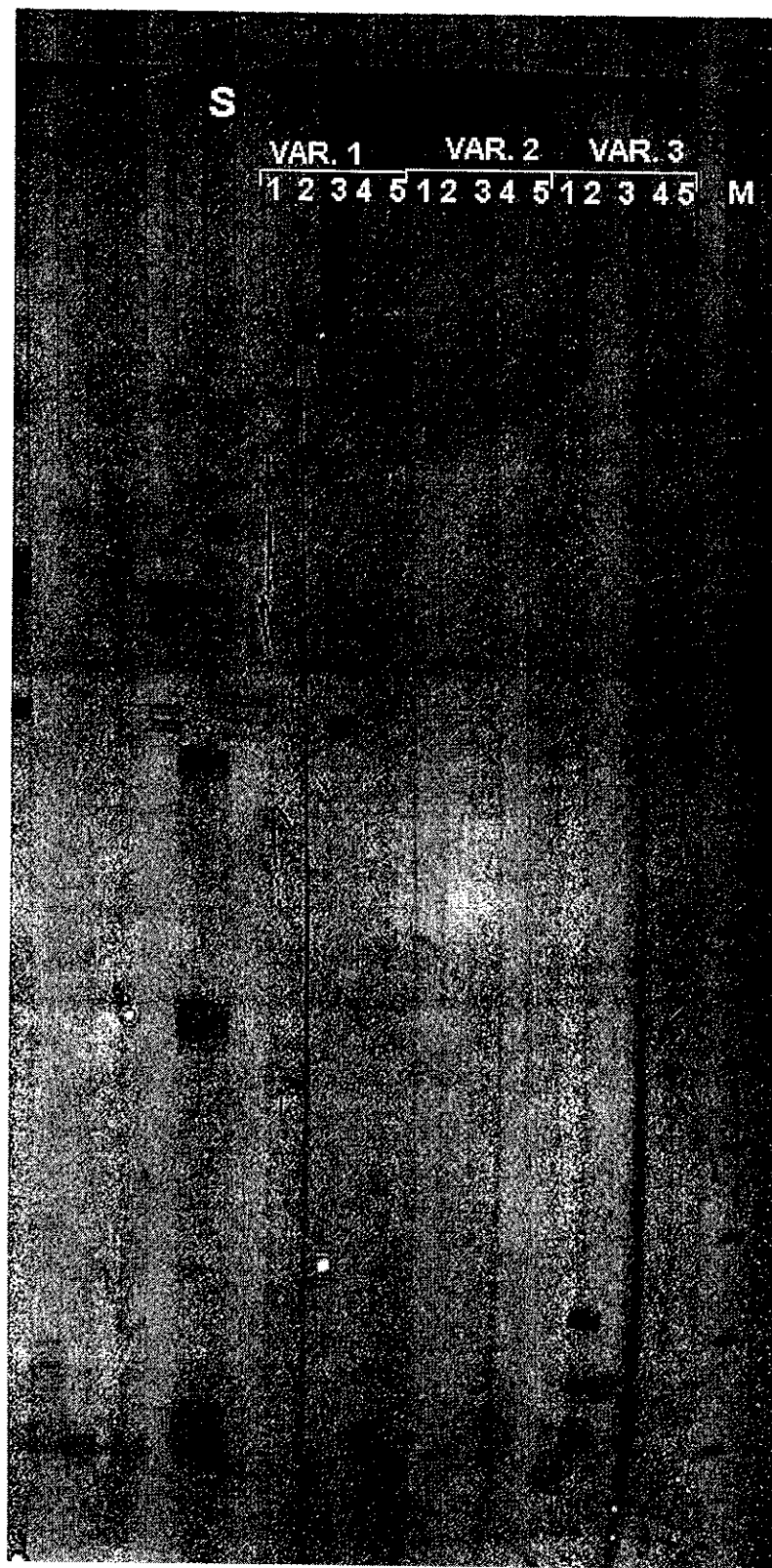


Figura 9. Visualización en gel de poliacrilamida al 5% (Continuación).  
 (1-5 = partidos, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999),  
 A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).



Figura 10. Eficiencia de amplificación después de 14 días de almacenamiento.  
 (3,5= partidores, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999),  
 A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP 3-1547 y Var. 3= CG97-97).

Después de 30 días de almacenamiento a 4°C, se repitió la prueba de amplificación con los partidores escogidos, pero utilizando el ADN obtenido por el protocolo basado en Wagner *et al.* (2001) directamente de la mezcla de extracción, sin diluir, como lo expone el protocolo original. En este estudio no se partió de esto debido a que se trato de uniformizar el tratamiento del ADN para todos los protocolos. En esta prueba, dichas muestras no amplificaron (Figura 11), esto pudo ser debido a la poca eficiencia de amplificación de ADN reportada por Wagner *et al.* (2001) después de 28 días de almacenamiento. Es posible que las muestras si hubiesen amplificado de usarse ADN sin diluir justo después de la extracción. Comprobar esto requiere un estudio posterior.

Para los protocolos restantes, se obtuvo una buena visualización de polimorfismos SSR, siendo muy difícil definir la mejor técnica. Estos tres protocolos demostraron que permiten obtener ADN que puede ser almacenado por 30 días sin perder su eficiencia de amplificación, y que todavía puede ser utilizado para caracterizar variedades de caña de azúcar (Figura 11).

#### D. Estabilidad del producto de amplificación en almacenamiento a -20°C

Otro aspecto analizado fue la estabilidad del producto obtenido de la amplificación del ADN en almacenamiento a -20°C. Después de almacenar el producto de PCR por 19 días con y sin *Stop Mix* (referirse a la Sección de Materiales y Métodos), se corrieron muestras en un gel de poliacrilamida al 5%. Las muestras que se almacenaron sin *Stop Mix* fueron alícuotas del tubo original y se hizo una mezcla fresca con la solución inmediatamente antes de cargar el gel. Se observó que las muestras correspondientes a todos los protocolos, excepto Wagner *et al.* (2001), almacenadas sin la solución mostraron bandas de menor intensidad después del almacenamiento (Figura 13) respecto a las muestras almacenadas con *Stop Mix* (Figura 12). Sin embargo, se obtuvo patrones bien definidos para las tres variedades, con la misma calidad observada con ADN recién extraído en el caso de las muestras almacenadas con la solución, y menor en el caso de las muestras almacenadas sin la solución.

Las muestras correspondientes al protocolo descrito por Wagner *et al.* (2001), como se mencionó en la sección anterior, no amplificaron por lo que no se visualizó bandas después del almacenamiento a -20°C. Se repitió la evaluación anterior con producto de PCR almacenado por 47 y 78 días. En el día 47 de almacenamiento a -20°C se observó una buena amplificación de las muestras almacenadas con *Stop Mix* (Figura 14) para todos los protocolos, excepto Wagner *et al.* (2001).

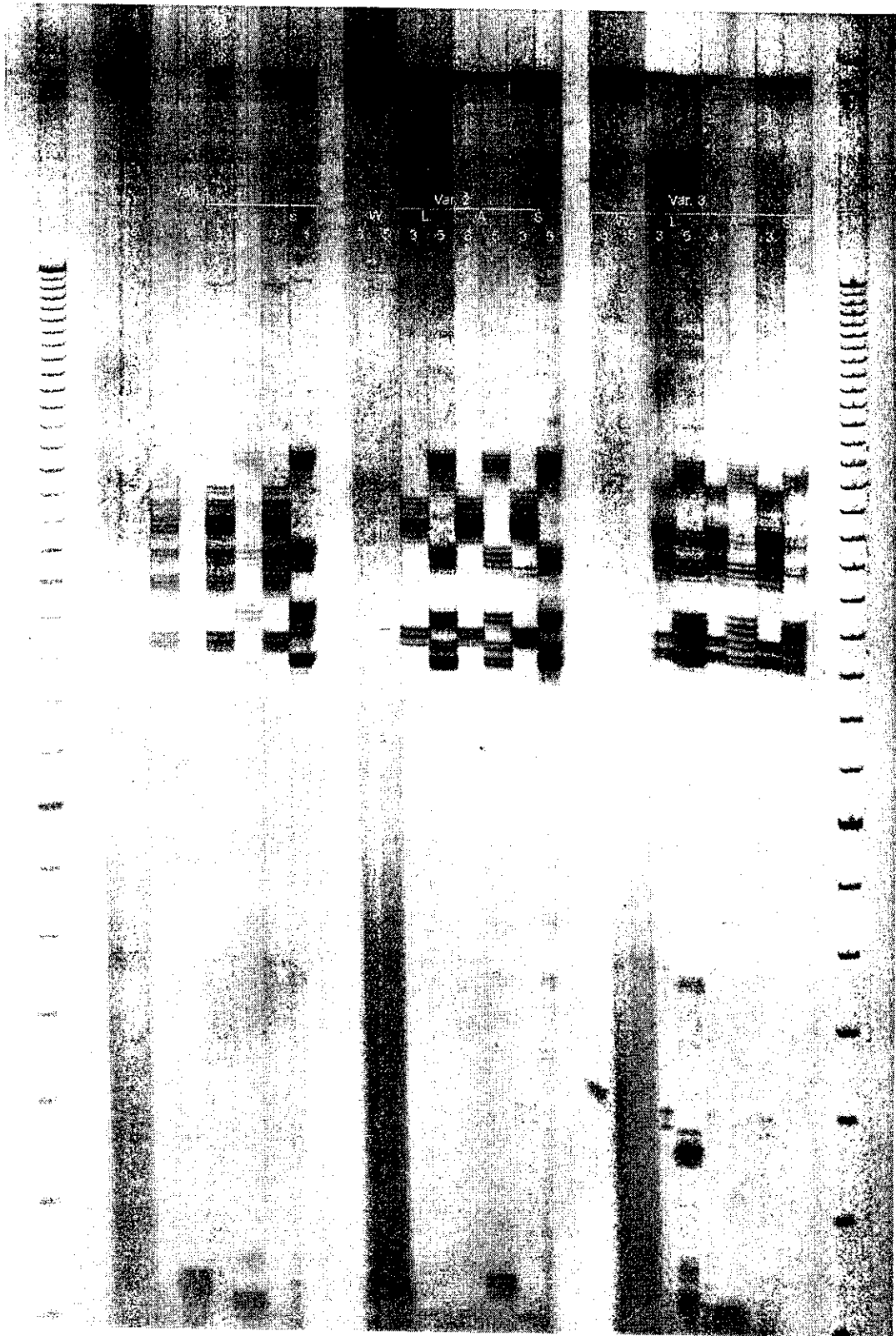


Figura 11. Eficiencia de amplificación después de 30 días de almacenamiento.  
 (3,5= partidores. M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999),  
 A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).

Las bandas correspondientes al producto de PCR almacenado sin la solución se visualizaron más tenues y borrosas (Figura 15) que lo observado con 19 días de almacenamiento (Figura 13).

Esto pudo ser debido a que en este estudio no se pensó en hacer alícuotas para evitar interrumpir el almacenamiento. Por lo tanto, se utilizó el producto de amplificación original en todas las pruebas, congelando y descongelando continuamente. Esto pudo haber afectado la integridad del ADN amplificado degradándolo a fragmentos más pequeños, que se visualizaron como nubes en el gel, en lugar de bandas. También es posible que la concentración del producto de amplificación haya sido menor debido a las diferentes alícuotas tomadas a lo largo del estudio.

Después de 78 días de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  se notó que todas las muestras fueron menos intensas. Esto pudo ser debido a que durante el estudio se tomaron alícuotas directamente de la solución varias veces, disminuyendo la concentración del producto de amplificación.

Las muestras almacenadas con *Stop Mix* permitieron visualizar patrones de bandas bien definidos (Figura 16), obteniendo mejor visualización con los protocolos propuestos por Lobos y Seelenfreund (1999) y da Silva (2003). Las muestras correspondientes al protocolo descrito por Aljanabi *et al.* (1999) se observaron muy tenues, aparentemente debido a que son menos estables en almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras que fueron almacenadas sin la solución correspondientes a todos los protocolos, excepto Wagner *et al.* (2001), mostraron bandas muy débiles; en su mayoría amplificadas con el partidador 5 (Figura 17).

Estos resultados demuestran que el almacenamiento discontinuo a  $-20^{\circ}\text{C}$  tiene un efecto directo sobre la calidad de visualización de polimorfismos SSR. Además, sugieren que el *Stop Mix* por su alto contenido de formamida (referirse a la sección Materiales y Métodos), previene o reduce el daño causado al ADN amplificado cuando este es sujeto a descongelamiento y congelamiento continuo. Se ha publicado que la formamida reduce la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) del ADN y detiene la reacción de amplificación de la enzima Taq Polimerasa (Rauch *et al.*, 2000).

De acuerdo con estos resultados, se puede asegurar que el *Stop Mix*, además de dar peso a las muestras para que penetren el gel de poliacrilamida y contener los colorantes para seguir los frentes de la electroforesis, probablemente mantiene el ADN más íntegro y estable durante el almacenamiento. Por lo que puede ser utilizado como buffer de almacenamiento para el producto de amplificación.

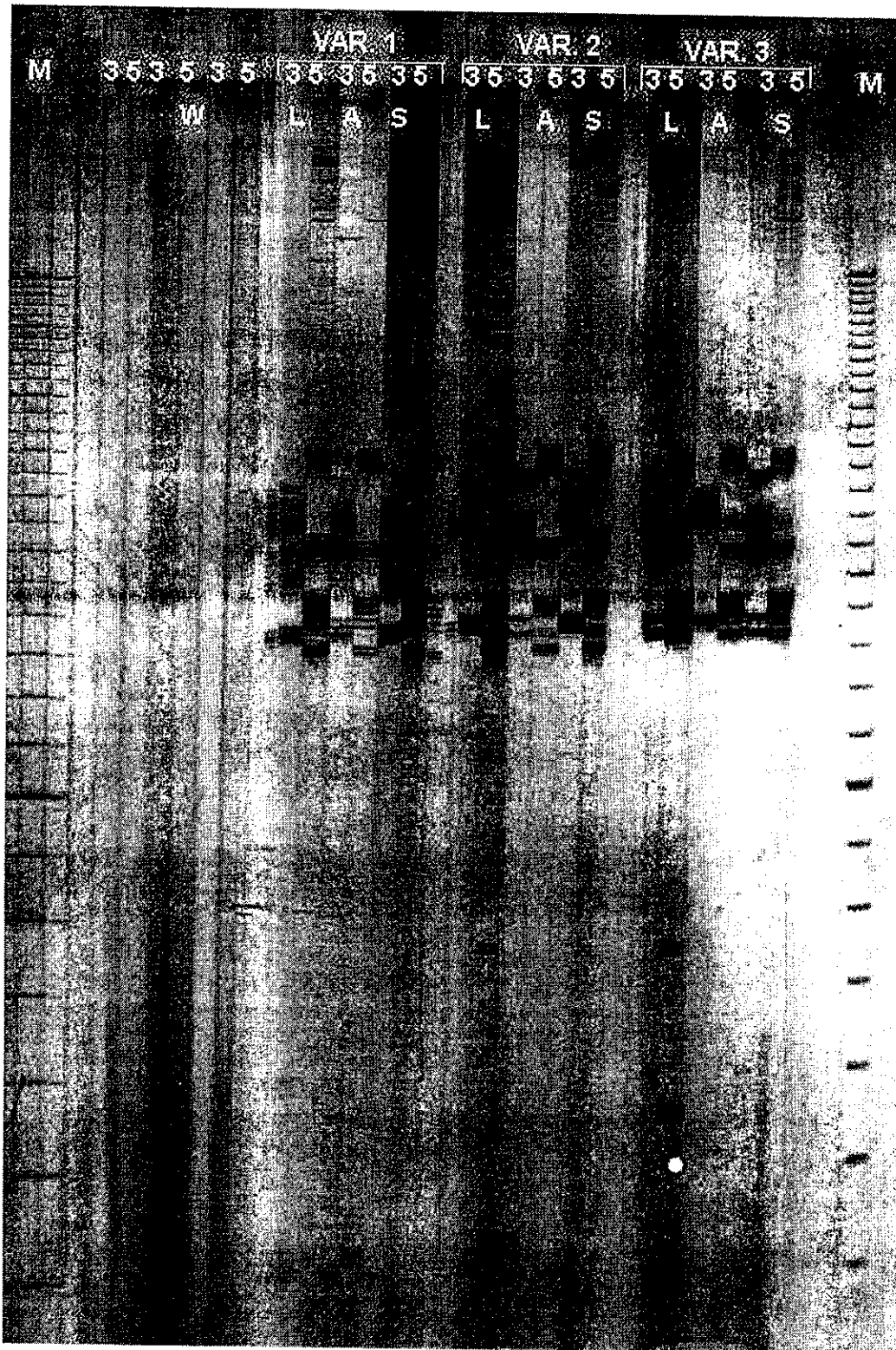


Figura 12. Visualización de producto de amplificación almacenado con *Stop Mix* a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 19 días.

(3,5= partidores, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999), A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).



Figura 13. Visualización de producto de amplificación almacenado sin *Stop Mix* a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 19 días.

(3,5= partidores, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999), A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).

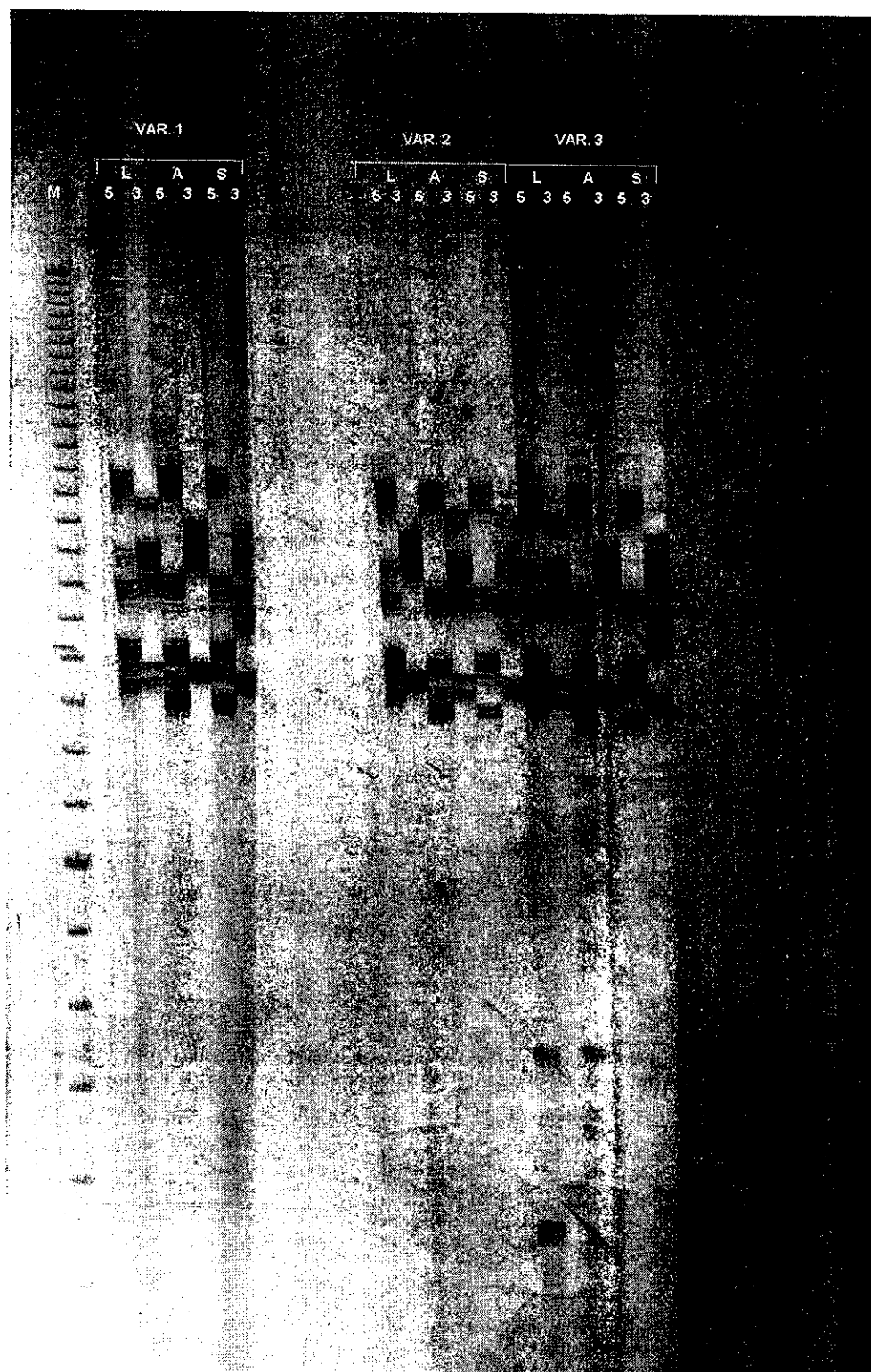


Figura 14. Visualización de producto de amplificación almacenado con *Stop Mix* a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 47 días.

(3,5= partidos, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999), A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).

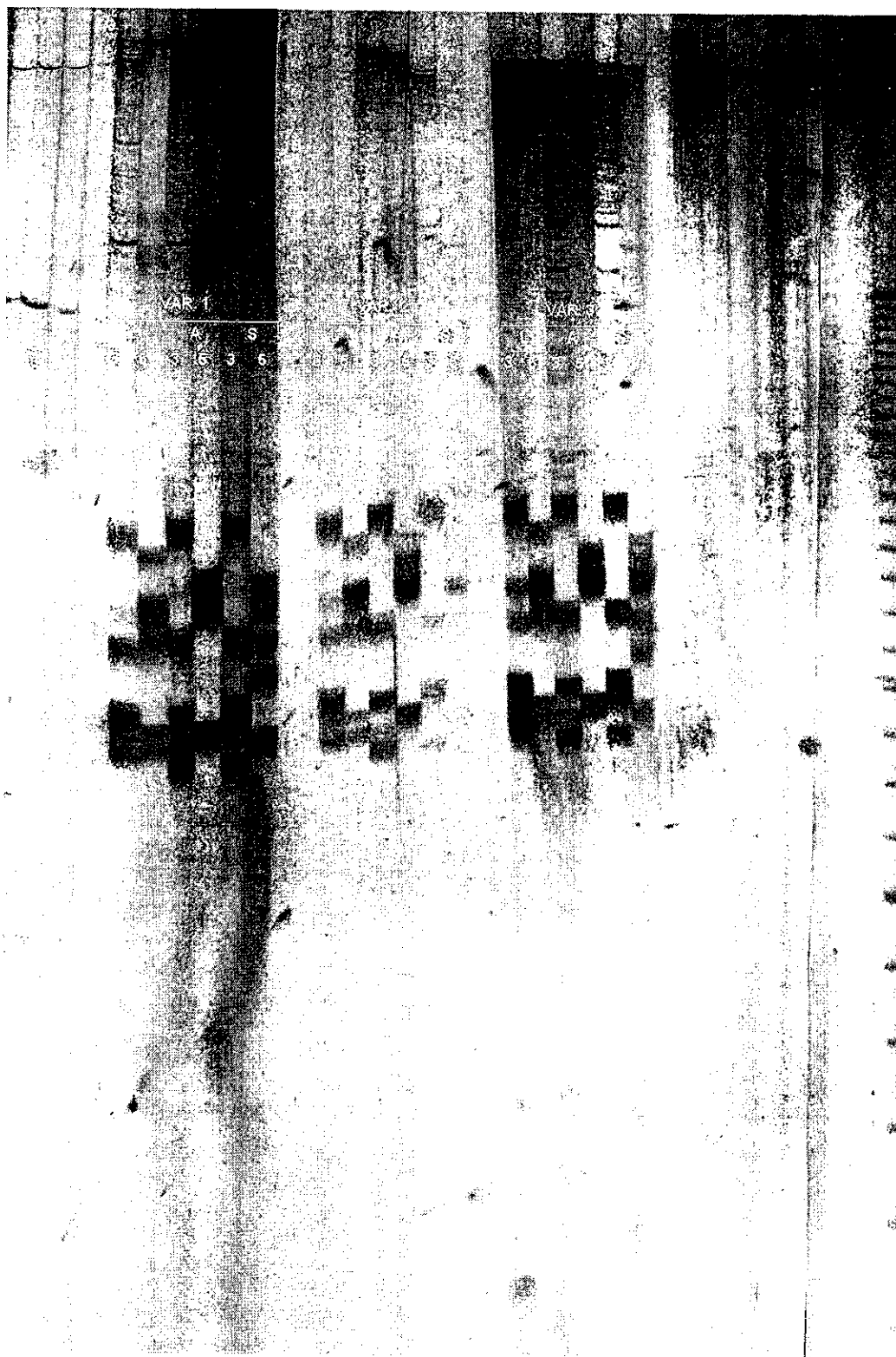


Figura 15. Visualización de producto de amplificación almacenado sin *Stop Mix* a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 47 días.

(3,5= partidores, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999), A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).

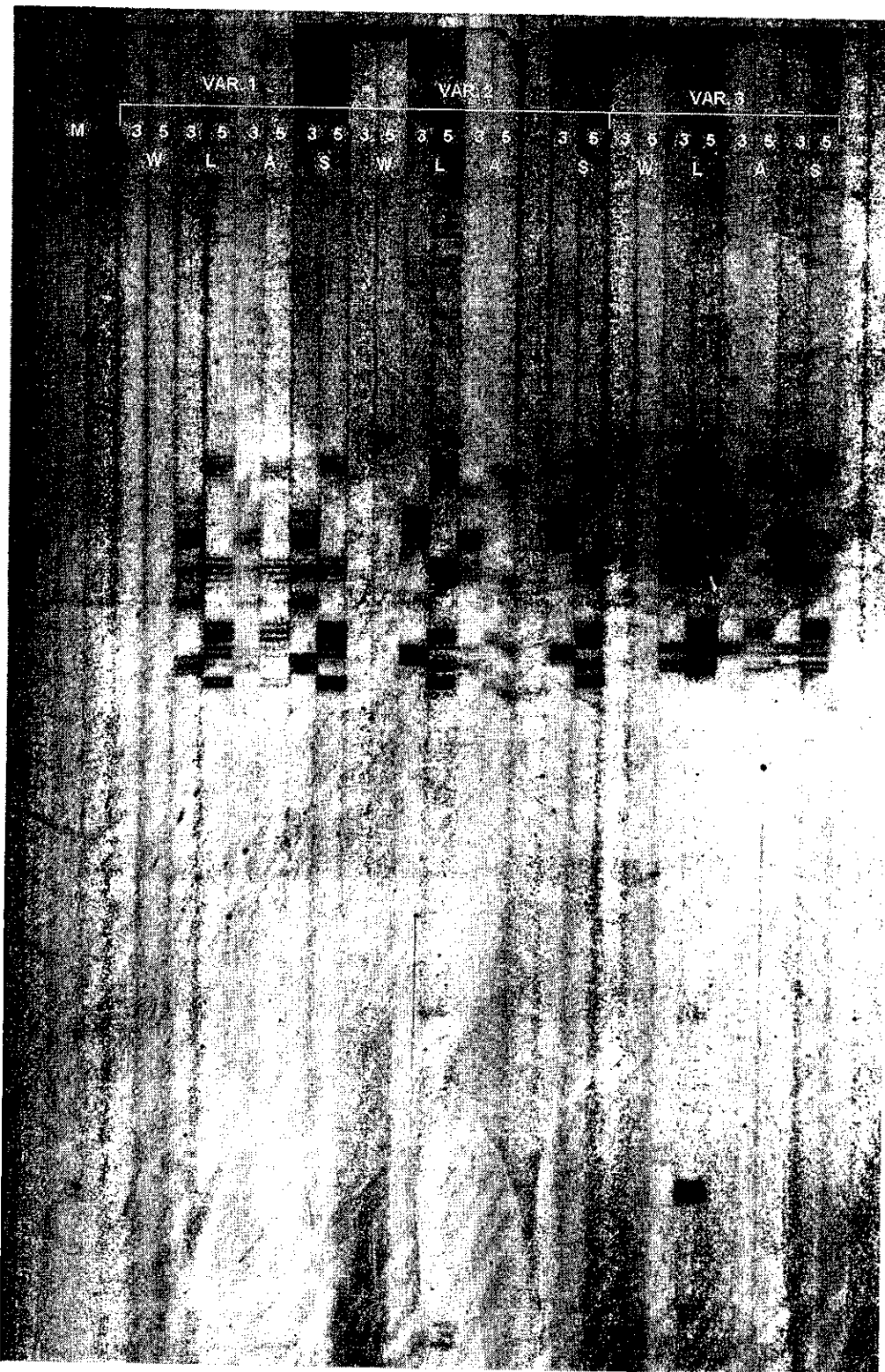


Figura 16. Visualización de producto de amplificación almacenado con *Stop Mix* a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 78 días.

(3,5= partidores, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999), A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).

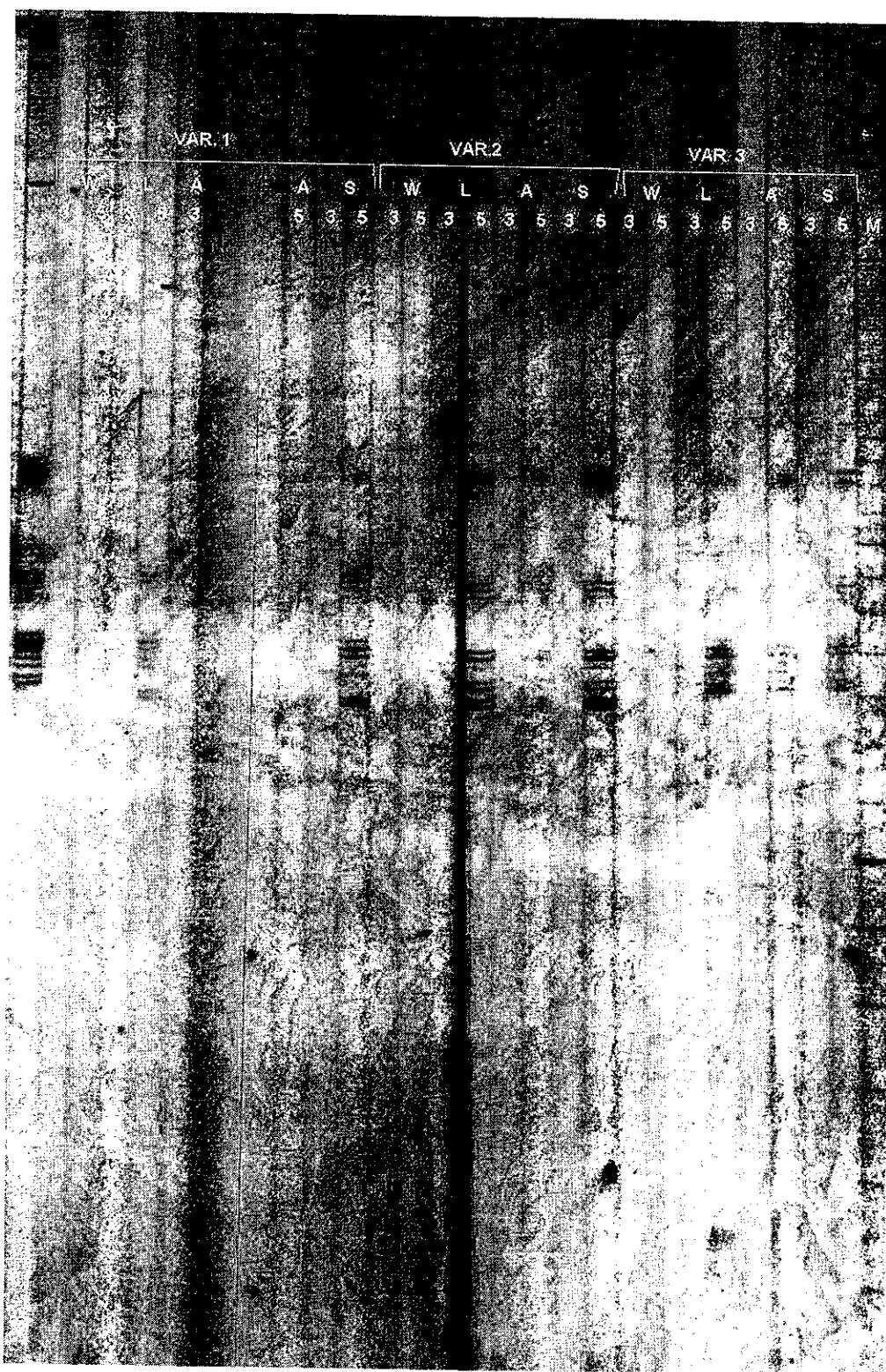


Figura 17. Visualización de producto de amplificación almacenado sin *Stop Mix* a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 78 días.

(3,5= partidos, M= Marcador Molecular, W = Wagner *et al.* (2001), L= Lobos y Seelenfreund (1999), A= Aljanabi *et al.* (1999), S= da Silva (2003), Var. 1= CP72-2086, Var. 2= CP73-1547 y Var. 3= CG97-97).

Según la calidad de visualización de polimorfismos SSR, queda demostrado que el producto de amplificación se puede almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 78 días como mínimo, con y sin *Stop Mix*, para las muestras correspondientes a los protocolos propuestos por Lobos y Seelenfreund (1999), Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003). Esto es válido siempre que se tenga la certeza de que las muestra no se someterán a congelamiento y descongelamiento continuo. Sin embargo, las muestras correspondientes al protocolo de Aljanabi *et al.* (1999), debido a su menor estabilidad, deben visualizarse durante 60 días de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  para obtener buenos resultados.

Además, el producto de amplificación del ADN obtenido por los protocolos propuestos por Lobos y Seelenfreund (1999), Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003), debe ser almacenados con *Stop Mix*, de preferencia, para obtener mejor visualización de polimorfismos SSR.

## VI. CONCLUSIONES

- Se extrajo ADN de las variedades de caña de azúcar CP72-2086, CP73-1547 y CG97-97, descritas en Guatemala, usando cuatro protocolos representativos.
- Se estimó el costo de extracción de 100 muestras como Q. 0.51 para el protocolo propuesto por Wagner *et al.* (2001), Q. 1,024.75 para el protocolo propuesto por Lobos y Seelenfreund (1999), Q. 124.44 para el protocolo descrito por Aljanabi *et al.* (1999), y Q. 646.57 para el protocolo descrito por da Silva (2003).
- El protocolo descrito por Wagner *et al.* (2001) resultó tener el menor costo entre los protocolos evaluados y se realiza en el menor tiempo; pero la integridad, concentración y pureza del ADN obtenido es baja. Este no es estable en almacenamiento a 4°C y no puede ser amplificado después de una semana. Además no amplificó polimorfismos SSR.
- El protocolo descrito por Lobos y Seelenfreund (1999) permite obtener ADN de alta pureza e integridad, que puede ser amplificado aun después de ser almacenado a 4°C por 30 días como mínimo. Permite una excelente visualización de polimorfismos SSR para caña de azúcar. El producto amplificado es estable en almacenamiento a -20°C por al menos 78 días. Sin embargo, su costo es muy elevado y requiere de más tiempo para completarse.
- El protocolo descrito por Aljanabi *et al.* (1999) permite obtener ADN de alta integridad, y efectivamente evita su oxidación. A pesar de que no elimina el ARN, aparentemente esto no afecta su capacidad de amplificación de polimorfismos SSR. El ADN demostró ser estable en almacenamiento a 4°C por al menos 30 días. El producto de amplificación puede ser almacenado a -20°C, pero debe ser visualizado dentro de 60 días para obtener buenos resultados. Este protocolo es de fácil realización y costo moderado.
- El protocolo descrito por da Silva (2003) demostró que permite obtener ADN de excelente calidad, pureza e integridad; estable en almacenamiento a 4°C por al menos un mes. También permite la excelente visualización de polimorfismos SSR, aún después del almacenamiento por 78 días del producto de amplificación -20°C. Su costo es moderado y puede desarrollarse en un día.

- El ADN obtenido por los protocolos propuestos por Lobos y Seelenfreund (1999), Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003), puede ser almacenado a 4°C por, al menos un mes, sufriendo una degradación lenta.
- La visualización en gel agarosa con tinción de bromuro de etidio no permitió obtener una caracterización definitiva de variedades de caña de azúcar, siendo superada por la visualización en gel de poliacrilamida con tinción de plata.
- El producto de amplificación de ADN de caña de azúcar obtenido por los protocolos propuestos por Lobos y Seelenfreund (1999), Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003), puede ser almacenado a -20°C con y sin *Stop Mix*, por al menos 60 días. Las muestras con *Stop Mix* aparentemente sufrén menor daño al ser almacenadas en altas temperaturas.
- Los protocolos descritos por Lobos y Seelenfreund (1999), Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003), pueden ser utilizados para la caracterización molecular mediante marcadores microsatélites de las variedades de caña de azúcar descritas en Guatemala, porque permiten obtener ADN de buena calidad y alta capacidad de amplificar polimorfismos SSR.
- Los protocolos que presentan mejor realización y visualización de polimorfismos SSR son los descritos por Lobos y Seelenfreund (1999), Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003). Sin embargo, tomando en consideración el costo de cada uno de ellos, los más económicos son los últimos dos. Por lo que la hipótesis planteada se acepta.
- La elección entre los protocolos propuestos por Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003) está sujeta a los recursos económicos con que se cuente y la disponibilidad de los reactivos a utilizar. La diferencia entre ambos es que el primero tiene menor precio, pero utiliza reactivos poco comunes.

## VII. RECOMENDACIONES

- Debido a que en este estudio no se determinó la estabilidad del producto de amplificación en almacenamiento continuo a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se recomienda hacer un estudio futuro utilizando alícuotas individuales para no interrumpir el almacenamiento de toda la muestra. Almacenar el producto de amplificación de ADN de caña de azúcar con *Stop Mix* si se desean correr varios geles.
- También se recomienda evaluar la estabilidad del ADN de caña de azúcar obtenido por los protocolos aquí evaluados en almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  a largo plazo. Esto con el objetivo de encontrar evidencia del efecto de altas temperaturas sobre el ADN.
- Además, debido a sus ventajas, se recomienda evaluar el protocolo propuesto por Wagner *et al.* (2001) amplificando el ADN inmediatamente después de la extracción, sin diluir, tomando alícuotas directamente de la mezcla de extracción.
- Implementar el protocolo descrito por Wagner *et al.* (2001) para hojas de caña de azúcar y buscar reproducibilidad del protocolo original que se usa para extracción de ADN de hojas de maíz. De lograrse esto, se tendría como consecuencia una reducción considerable de los costos, y se podría manipular un mayor número de muestras.
- Aplicar el protocolo propuesto por da Silva (2003) para obtener ADN de alta integridad y pureza destinado a análisis AFLP para frijol y otros cultivos.
- Se recomienda utilizar en estudios futuros, los protocolos descritos por Aljanabi *et al.* (1999) y da Silva (2003) para la caracterización de variedades de caña de azúcar.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S., L. Forget y A. Dookun. 1999. *An improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharides- and Polyphenols-Free Sugarcane DNA*. Plant Molecular Biology Reporter **17**:1-8.
- Aranguren-Méndez, J. y J. Jordana. 2001. *Utilización de marcadores de ADN Microsatélites en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción*. Cecaul. Venezuela. (Fecha de consulta: Noviembre 2003 Fecha de última actualización: Junio 2001). Disponible en: [http://www.cecalc.ula.ve/AVPA/articulos\\_libres/AVPAconservacion.pdf](http://www.cecalc.ula.ve/AVPA/articulos_libres/AVPAconservacion.pdf)
- Ávalos, A. *Caracterización de 22 variedades de frijol (Phaseolus vulgaris L.) mediante la Técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP)*. Universidad del Valle de Guatemala. Por publicar.
- CEPASA- Compañía del Grupo El Palmar Cañicultores de Venezuela. 2001. *Variedades de Caña de Azúcar*. (Fecha de Consulta: Octubre 2003 Fecha de última actualización: Noviembre 2001). Disponible en: [http://www.elpalmar.com.ve/pages/canicultores\\_variedades.htm](http://www.elpalmar.com.ve/pages/canicultores_variedades.htm)
- CIRAD- Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement. 2001. *Sugarcane Molecular Analysis of Genetic Diversity*. France. Disponible en: <http://www.cirad.fr> (Fecha de Consulta: Noviembre 2003).
- CIMMYT- International Maize and Wheat Improvement Center. Molecular Genetics Service Laboratory. 2000. *SSR Markers for Opaque-2*. Disponible en: <http://www.cimmyt.com> (Fecha de consulta: Noviembre 2003)
- Creste, S., A. Tulmann y A. Figueira. 2001. *Detection of Single Sequence Repeat Polymorphism in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining*. Plant Molecular Biology Reporter **19** :299-306.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1987. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochemistry Bulletin **19**: 11-15.
- FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. 2002. *Mutant Germplasm Characterization Using Molecular Markers*. Training Course Series No. 19. International Atomic Energy Agency. Suiza. 110pp.
- Ferreira M. y D. Grattapaglia. 1998. *Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético*. Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuaria. Brasilia. 221 pp. (Traducción Fernández J., A. Herhampérez y L. Rodríguez).
- GEPLACEA- Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de Azúcar (Fecha de consulta: Octubre 2003 Fecha de última actualización: Enero 2000). Disponible en: <http://www.geplacea.ipn.mx/paises/guatemala.htm>

- Kahl, G. 2001. *The dictionary of gene technology: Genomics, Transcripomics, Proteomics*. 2da. Ed. Wiley-VCH. Frankfurt. 941pp.
- Lobos, S. y D. Seelenfreund. 1999. *Técnicas Experimentales en Genética Molecular. Manual de Laboratorio*. 5ta. Edición. Universidad de Chile. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 117pp.
- Marcano, A., P. Molina, M. Oropeza y E. García. 2001. *Optimización del proceso de embriogenesis somática en variedades venezolanas de caña de azúcar*. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biología Experimental. Venezuela. (Fecha de consulta: Octubre 2003 Fecha de última actualización: Enero 2001). Disponible en: [http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-098.pdf)
- Mills, K. 2001. *Estudio de la variabilidad genética de poblaciones de Anopheles albimanus de Latinoamérica, mediante el uso de secuencias microsatélites como marcadores moleculares*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 137pp.
- Orozco, H. 2003. *Memoria Presentación de resultados de investigación Zafra 2002-2003*. Memoria CENGICAÑA. Guatemala. 5pp.
- Paulet, F., C. Kaye, C. Gay, M. Rodier-Goud, J. Glaszmann, A. D'Hont. 2000. *Development of Sugarcane (Saccharum sp.) Microsatellite Markers*. Reference mSSCIR1 to mSSCIR78 in EMBL database. Disponible en: <http://www.wbi.ac.uk>.
- Perafán, F. 2003. *La caña de azúcar*. (Fecha de Consulta: Julio 2003). Disponible en: <http://www.perafan.com/ea02cana.html>
- Pérez, J. y L. Pratt. 1997. *Industria Azucarera en Guatemala: Análisis de Sostenibilidad*. CENGICAÑA. (Fecha de consulta: Octubre 2003 Fecha de última actualización: Noviembre 1997). Disponible en: <http://www.incae.ac.cr/ES/clacds/investigacion/pdf/cen720.pdf>
- Procaña- Asociación Colombiana de Productores y Proveedores de Caña de Azúcar. 2002. *Caña de Azúcar*. (Fecha de consulta: Julio 2003) Disponible en: <http://www.procana.org/canazuc.htm>
- Pymes- Pequeñas y medianas empresas digitales. 2003. *Biblioteca de mercados: Guatemala*. (Fecha de consulta: Octubre 2003 Fecha de última actualización: Octubre 2003). Disponible en: <http://www.pymeonline.net/biblioteca/guatemala.phtml>
- Quemé, J., H. Orozco, W. Ovalle y M. Melgar. 2003. *Variedad de Caña de Azúcar CG97-97*. CENGICAÑA. Guatemala. 2pp.
- Rauch, J., D. Woff, M. Hausmann y C. Cremer. 2000. *The influence of formamide on thermal denaturation profiles of DNA and metaphase chromosomes in suspension*. Z. Natuforsch **55c**:737-746.
- Sandoval, C. 2001. *Estudios de casos sobre combustibles forestales Guatemala. Proyecto de información y análisis para el manejo forestal sostenible*. FAO. (Fecha

de consulta Noviembre 2003 Fecha de última actualización: Mayo 2001)  
Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/proyecto/rla133ec/ME-pdf/ME%20Gua.PDF>

- Schueneman, T., J. Miller, R. Gilbert y L. Harrison. 2002. *Sugarcane Cultivar CP72-2086 Descriptive Fact Sheet*. Institute of Food And Agricultural Science. University of Florida. ( Fecha de consulta: Diciembre 2003 Fecha última actualización: Mayo 2002)
- da Silva, J. 2003. Comunicación personal.
- da Silva, J. 2001. *Preliminary Analysis of Microsatellite Markers derived from Sugarcane Expressed Sequence Tags (ETSs)*. *Genetics and Molecular Biology* **24**: 155-159.
- USDA- US Department of Agriculture. 2003. Plants Database. Plants Profile: *Saccharum officinarum L.* (Fecha de consulta: Octubre 2003 Fecha de última actualización: Octubre 2003). Disponible en: <http://plants.usda.gov/>
- Wagner, P., A. Karakousis, A. Schiemann, J. Eglinton, P. Langridge y A. Barr. 2001. *An investigation of a rapid DNA extraction method for routine MAS in the S.A. Barley Improvement Program*. Proceeding of the 10<sup>th</sup> Australian Barley Technical Symposium. The Regional Institute Ltd. Australia. Disponible en: <http://www.regional.org.au>

## B. Reconstitución de partidores

### Reactivos

Tris-HCl 10mM  
Agua Ultra Pura

### Equipo

Espectrofotómetro UV/Visibles SmartSpec 3000™ Bio-Rad.

1. Preparar solución de Tris-HCl 10mM pH 8.0.
2. Centrifugar diez segundos los tubos originales.
3. Agregar 200µL de Tris-HCl 10mM a cada tubo. Mezclar, centrifugar diez segundos.
4. Hacer diluciones 1:333, agregando 3µL de primer en 1mL de agua ultra-pura<sup>1</sup>.
5. Calentar estas diluciones a 65°C por cinco minutos, centrifugar diez segundos.
6. Repetir la incubación a 65°C por cinco minutos y enfriar.
7. Seleccionar el modo de operación **DNA/RNA** del SmartSpec 3000™. Seleccionar **DNA oligo**.
8. Indicar que no se conoce el coeficiente de extinción molar.
9. Ingresar el valor de factor de conversión de  $A_{260nm}$  a concentración 30µg/mL.
10. Ingresar el valor de la masa molecular del oligonucleótido.
11. Blanquear con agua ultra-pura.
12. Determinar la concentración del primer en el tubo original.
13. Hacer la dilución de cada partidador necesaria para la reacción de PCR (12.5pmol/µL en este caso).
14. Preparar una mezcla 1:1 de partidores diluidos (F+R).

## C. Descripción de partidores:

Cuadro 17. Resumen de las características de los partidores utilizados (CIRAD, 2001).

No. Asignación	Secuencia 5'→3'	Unidad Repetitiva	Temperatura hibridación (°C)	Tamaño producto (bp)
1	CCCTATCACTGTTCTTCAT ATTTGTCCTTGCGAGAG	(GA) <sub>18</sub>	54	200
2	CACAAACATCCCTCAACT ATTCTTGCAATTAACCTCTC	(GA) <sub>26</sub> GG(GA) <sub>11</sub>	54	211
3	ATCGCCTCCACTAAATAAT TTGTCTTTGCTTCCTCCTC	(GA) <sub>20</sub>	54	162
4	ACTCAACGACCCACTCACAC CTCACTCCCCATACTTCTT	(CA) <sub>8</sub> N <sub>5</sub> (GA) <sub>4</sub> (GA) <sub>9</sub>	54	154
5	ACAGGGGAGACAAATCAG ACCAAACCACAAAGCAAA	(GT) <sub>8</sub> GC(GT) <sub>5</sub> GC(GT) <sub>8</sub>	54	167

<sup>1</sup> El agua ultra-pura es agua tri-destilada, filtrada y esterilizada.

## D. Listado de abreviaturas

ADN= Ácido deoxiribonucleico  
 ARN= Ácido ribonucleico  
 CTAB= Bromuro de hexadeciltrimetilamonio  
 EDTA= Etilenodiaminotetracetato  
 Exn= Extracción  
 PCR (Polimerase Chain Reaction)= Reacción en Cadena de la Polimerasa  
 SSR (Single Sequence Repeat)= Secuencia simple repetida  
 spp. = Especies (plural de sp.= especie).  
 TBE= Tris-borato etilenodiaminotetracetato  
 TE= Tris-etilenodiaminotetracetato  
 TEMED= Tetrametiletlenodiamina

## E. Glosario

**Ácido deoxirribonucleico (ADN):** Polímero de nucleótidos que contiene la información genética de virus, bacterias y todos los organismos superiores (Kahl, 2001).

**Ácido ribonucleico (ARN):** Polinucleótido mayormente de una hebra de poca masa molecular caracterizado por estar compuesto del azúcar ribosa y por la presencia de la pirimidina uracilo (en lugar de timina en el ADN) (Kahl, 2001).

**Alelo:** Uno de dos o más formas de un gen dado que difieren; estas ocupan el mismo locus en un cromosoma en particular (Kahl, 2001).

**Alelo dominante:** Uno de un par de alelos correspondientes que es fenotípicamente manifiesto en el organismo heterocigoto (Kahl, 2001).

**Alelo recesivo:** Uno de un par de alelos correspondientes que es fenotípicamente silencioso en el organismo heterocigoto (Kahl, 2001).

**ARNasa A:** Una enzima proveniente del páncreas bovino, la cual cataliza el rompimiento de enlaces fosfodiéster entre pirimidinas y nucleótidos adyacentes en ARN (Kahl, 2001).

**Biblioteca de cADN:** Una colección de secuencias de ADN clonado derivado de transcripción de todo el ARN mensajero de una célula y es representado en genes activos en esa célula (Kahl, 2001).

**Codominancia:** Contribución de dos alelos al fenotipo de un organismo; se da cuando alelos diferentes tiene especificidades distintas, por lo que el organismo heterocigoto posee las propiedades de los dos padres (Kahl, 2001).

**Dominancia:** Fenómeno en el que el efecto fenotípico de un alelo específico se expresa tanto en organismos heterocigotos como en organismos homocigotos (Kahl, 2001).

**Etiqueta de secuencia expresada (EST):** Un oligonucleótido sintético corto de 300-500 pares de bases, complementario al final 3' o 5' de un ARN mensajero específico y usualmente derivado de una biblioteca de cADN. Un EST representa etiquetas para el estado de expresión de genes en un tiempo dado y tipo dado de célula o tejido (Kahl, 2001).

**Gel desnaturalizante:** Cualquier gel de electroforesis que contiene componentes para la desnaturalización de las macromoléculas que serán separadas. La migración electroforética de dichas moléculas desnaturalizadas es casi exclusivamente debida a la masa molecular o longitud molecular (Kahl, 2001).

**Híbrido:** Una célula o un organismo que resulta de cruces entre, o una fusión de, dos células o padres genéticamente diferentes (Kahl, 2001).

**Híbrido de ADN:** Una molécula de ADN cuyas hebras son derivadas de dos diferentes moléculas de ADN (Kahl, 2001).

**Locus (Plural loci):** La posición de un gen sobre un cromosoma (Kahl, 2001).

**Marcador codominante:** Cualquier marcador molecular que detecta ambos alelos de un locus genómico en particular. Se considera que un marcador es codominante si los dos alelos se pueden amplificar utilizando el mismo par de partidores, si los alelos difieren ligeramente en longitud (Kahl, 2001).

**Marcador molecular:** Cualquier segmento de ADN específico que es diferente (polimórfico) para diferentes organismos, y por lo tanto diagnóstico de cada uno de ellos (Kahl, 2001).

**Microsatélite (Secuencia Simple Repetida-SSR):** Cualquiera de una serie de pequeños fragmentos de ADN que están constituidos por pequeñas secuencias repetidas, una tras otra, con alta variabilidad y dispersos en genomas de hongos, plantas, animales y humano (Kahl, 2001).

**Multialelismo:** La ocurrencia de más de dos alelos de un locus genómico en una población (Kahl, 2001).

**Nucleótido:** Un nucleosido pirimidina o purina que está esterificado con uno, dos o tres grupos fosfatos en el átomo de carbono 5' del azúcar ribosa o deoxiribosa (Kahl, 2001).

**Oligonucleótido:** Una pequeña molécula de ácido nucleico de por encima de 100 nucleótidos de largo, que consisten de deoxinucleótidos o ribonucleótidos (Kahl, 2001).

**Partidor:** Un oligonucleótido de ADN corto el cual es complementario a una pequeña parte de una molécula más larga de ADN y provee la terminación 3-OH de un sustrato al cual cualquier ADN polimerasa, puede agregar nucleótidos de una cadena creciente en dirección 5' a 3'. *In vitro*, partidores específicos son necesarios para que se lleve a cabo cualquier reacción de polimerización de ADN usando una ADN polimerasa (Kahl, 2001).

**Polimorfismo:** La existencia de varias formas de un carácter fenotípico o genético en una población (Kahl, 2001).

**Polimorfismos SSR:** Cualquier diferencia en el número de unidades repetidas en el microsatélite correspondiente a *loci* genéticos en dos o más diferentes genomas (Kahl, 2001).

**Proteinasa K:** Una enzima proveniente del hongo *Tritirachium album* que cataliza el rompimiento de enlaces peptídicos en proteínas, con leve preferencia por los aminoácidos alifáticos, aromáticos e hidrofóbicos. Es útil para degradar proteínas tales como ARNasa y ADNasa en procedimientos de aislamiento de ADN o ARN, respectivamente (Kahl, 2001).

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Procedimiento de amplificación *in vitro* por el cual fragmentos de ADN de más de 15,000 pares de bases en longitud pueden ser amplificados cerca de  $10^8$  veces. Requiere el uso de partidores específicos que se hibridizan al ADN molde, que sufre desnaturalización y que permite que una ADN polimerasa sintetice las hebras opuestas complementarias a la simple hebra del ADN molde (Kahl, 2001).