

Colecta de tejido foliar, extracción de ADN y envío de muestras en poblaciones de *Megathyrus maximus* (Pm21) e híbridos interespecíficos de *Urochloa* sp (Br19) para secuenciación genómica.

Maria Camila Malatesta¹, Felix Pinzón¹ Luis Miguel Hernández¹, Rosa Noemi Jauregui^{1*}

¹Alianza Biodiversity International-CIAT

*Autor por correspondencia R.Jauregui@cgiar.org

Accelerated Breeding Initiative

Resumen

El proceso aplicado en las poblaciones de *Megathyrus maximus* (Pm21) e híbridos interespecíficos de *Urochloa* sp. (Br19) consistió en la colecta de hojas, extracción, purificación, cualificación, cuantificación y preparación del ADN para ser enviado al International Livestock Research Institute (ILRI) en Kenia y el Earlham Institute (EI) en Reino Unido respectivamente. En el caso de los genotipos Pm21, una vez extraído el ADN fue necesario desarrollar una prueba basada en diluir a diferentes concentraciones el ADN (100 ng/μl, 300 ng/μl y 25 μl del stock) y liofilizarlo a una presión aproximada de 0,001 mbar durante un periodo de 24 horas. Para la regeneración de este, se agregó 35 μl de agua ultrapura, a cada muestra, ocho días después con el objetivo de estandarizar el procedimiento de liofilización en forrajes tropicales.

Palabras clave: *Brachiaria*, *Panicum*, secuenciación, ADN, genómica.

● Colecta y maceración del material

Las poblaciones Br19 (*Urochloa* sp.) y Pm21 (*M. maximus*) se encontraban en condiciones de casa malla, por lo tanto, previo al proceso de recolección fue necesario podar con diez días de antelación las plantas para garantizar la edad y calidad idónea del tejido. Este se compone de hojas jóvenes y sanas que presentan un desarrollo casi total de sí mismas y cuya base expone un leve enrollamiento con el pseudotallo; por otra parte, la metodología consistió en asignar un consecutivo a cada genotipo y coleccionar tres trozos de 0,5 cm de largo y depositarlos en tubos Eppendorf de 2 ml rotulados y pre-enfriados con nitrógeno líquido, los

cuales en su interior contenían tres balines que ayudan en la maceración del tejido. La trituración del material se llevó a cabo en un macerador durante un periodo de dos minutos por muestra.

- **Extracción y purificación del ADN**

El protocolo fue el mismo para ambas poblaciones. El proceso de extracción se caracterizó por usar sales como Tris HCl, EDTA, NaCl, PEG 8000, Bisulfito de sodio y MATAB para facilitar la lisis celular en baño María, separación de moléculas por medio de centrifuga y Cloroformo 24:1; y, por último, precipitación de ácidos nucleicos empleando isopropanol (2-propanol). Por otra parte, la purificación del ADN se ejecutó con lavados de etanol al 80% acompañado de centrifugaciones y descartando sobrenadante entre ellos; además, para secar e incrementar la concentración de los ácidos nucleicos las muestras fueron puestas en un SpeedVac y se resuspendieron e incubaron en dos ciclos de 37 °C por 15 minutos con RNA-sa tipo A. Por último, los tubos fueron almacenados a -20 °C para su análisis. Las muestras que presentaron un pellet pequeño o anomalías durante la ejecución del proceso fueron descartadas y repetidas nuevamente.



Imagen No.1 Equipos utilizados durante el proceso de extracción y purificación de ADN donde: **A)** Baño María; **B)** SpeedVac; **C)** Incubadora. Tomado por Malatesta, C. (2022)

- **Cualificación del ADN**

Las muestras fueron sometidas individualmente a cámara de electroforesis para determinar la integridad y calidad del ADN obtenido. Para ello, se prepararon geles de agarosa con TAE al 0,5X a una concentración del 1% y 1,5%, según la bandeja empleada, utilizando el tinte de gel SYBR® Safe en su elaboración. Para facilitar la carga y el seguimiento de las muestras en los geles se sirvió el ADN en una solución con el tampón de carga de gel BlueJuice (2X), los tiempos de corrida se realizaron a 50 voltios para una hora y 100 voltios para treinta

minutos. Por último, los geles fueron visualizados en un fotodocumentador Gel DocTM XR+ Gel Documentation System (BioRad, CA, USA)

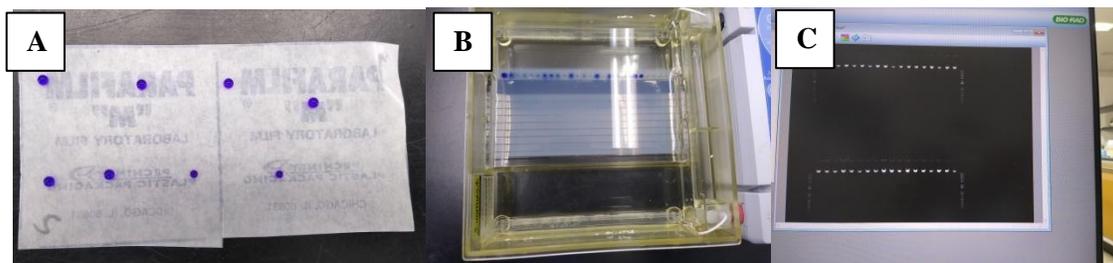


Imagen No.2. Proceso de cualificación donde: **A)** Solución de BlueJuice (2X) + ADN; **B)** Gel de Agarosa al 1% con muestras de ADN en cámara de electroforesis; **C)** Gel de Agarosa visualizada en fotodocumentador. Tomado por Malatesta, C. (2022)

Las muestras que presentaban pérdida de definición en la banda predominante y el acompañamiento de una estela o smear concentrado en la parte superior o inferior del gel fueron descartadas y repetidas nuevamente.

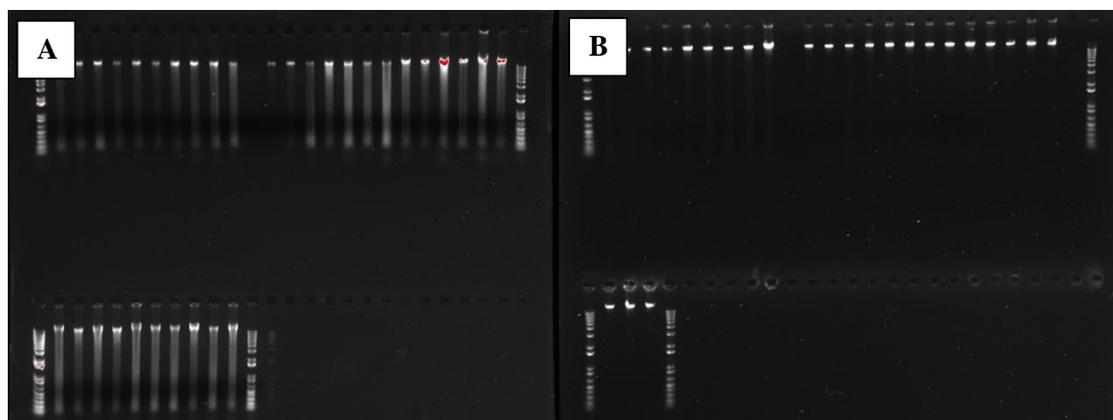


Imagen No.3. Gel de Agarosa con ADN de la población Br19 donde: **A)** Muestras degradadas; **B)** Muestras no degradadas. Elaborado por Malatesta, C. (2022)

- **Cuantificación del ADN**

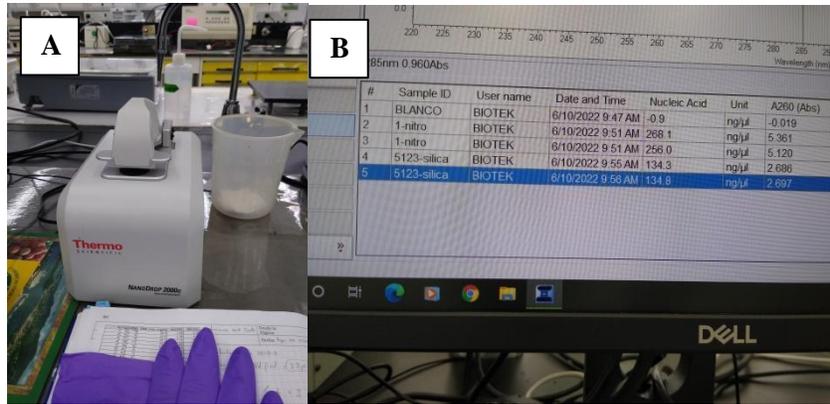


Imagen No.4 Cuantificación de ADN donde: **A)** Equipo NanoDrop 2000c; **B)** interfaz del programa NanoDrop 2000c. Tomado por Malatesta, C. (2022)

La cuantificación de ácidos nucleicos se desarrolló por absorbancia (ng/μL) empleando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c). Las muestras fueron analizadas por duplicado y se tomaron los ratios A260/280 y A260/230 como controles de pureza y contaminación por compuestos orgánicos. Los genotipos que presentaron una concentración menor a 50 ng/μL fueron descartados a pesar de exhibir buena calidad y valores óptimos en los ratios mencionadas.

Tabla No.1 Controles de pureza y contaminación establecidos para la cuantificación de ácidos nucleicos en poblaciones Br19 y Pm21.

Técnica de análisis	Análisis	Parámetro	Criterio validez.
Espectrofotometría	A260/280	Pureza	≥1.8-2.1 Pureza óptima
			≥1.6-1.7 Pureza aceptable
			<1.6 ADN contaminado con compuestos aromáticos
			>2.1 ADN contaminado con ARN
	A260/230	Pureza	>2-2.2 Pureza óptima
			> Pureza aceptable
			< 1.8 ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono ...
			< 1.5 ADN altamente contaminado

			con sales, fenol, hidratos de carbono ...
--	--	--	----------------------------------------------

El promedio general para la concentración fue de 328,7 ng/μL en las Br19 y 453.1 ng/μL en Pm21. En el caso de los ratios de pureza y nivel de contaminación todas las muestras se encontraron dentro del rango con valores de 2 para el primero y 2,4 para el segundo en ambas poblaciones.

Tabla No.2 Consolidado final de la cuantificación en 28 genotipos de la población Br19. Elaborado por Malatesta, C. (2022).

Etiqueta	ID	Promedio de Nucleic Acid	Promedio de A260 (Abs)	Promedio de A280 (Abs)	Promedio de 260/280	Promedio de 260/230
1	BR19:0025	180,6	3,6	1,8	2,1	1,9
2	BR19:0028	295,9	5,9	2,9	2,0	2,1
3	BR19:0032	453,2	9,1	4,4	2,1	2,1
4	BR19:0039	301,2	6,0	2,9	2,1	2,1
5	BR19:0041	225,8	4,5	2,2	2,1	2,0
6	BR19:0043	148,4	3,0	1,4	2,1	1,9
7	BR19:0102	254,0	5,1	2,5	2,1	2,1
8	BR19:0106	233,8	4,7	2,3	2,1	2,0
9	BR19:0111	257,3	5,1	2,5	2,1	2,0
10	BR19:0113	857,8	17,2	8,2	2,1	2,2
11	BR19:0163	145,8	2,9	1,4	2,1	1,9
12	BR19:0234	370,5	7,4	3,6	2,1	2,1
13	BR19:0236	204,8	4,1	2,0	2,1	2,0
14	BR19:0240	205,0	4,1	2,0	2,1	2,0
15	BR19:0247	502,5	10,0	4,9	2,1	2,1
16	BR19:0255	310,8	6,2	3,1	2,0	2,3
17	BR19:0257	184,6	3,7	1,8	2,0	2,3
18	BR19:0355	375,2	7,5	3,8	2,0	2,3
19	BR19:0357	113,8	2,3	1,1	2,0	2,4
20	BR19:0361	178,2	3,6	1,8	2,0	2,3
21	BR19:0364	234,4	4,7	2,3	2,0	2,4
22	BR19:0366	260,8	5,2	2,6	2,0	2,3
23	BR19:0369	213,7	4,3	2,1	2,0	2,3
24	BR19:0370	318,5	6,4	3,2	2,0	2,2
25	BR19:0371	310,2	6,2	3,1	2,0	2,4
26	BR19:0373	234,1	4,7	2,3	2,0	2,3

27	BR19:0407	441,8	8,8	4,4	2,0	2,3
28	BR19:0408	317,0	6,3	3,2	2,0	2,3

- **Dilución y envío del ADN en genotipos de *Urochloa* sp.**

Una vez determinada la calidad y concentración en cada muestra, se realizaron las diluciones utilizando agua ultrapura y el ADN extraído. Para lo anterior, se determinaron las cantidades empleando la ecuación $C1*V1= C2*V2$ e igualmente, se estableció el volumen y concentración ideal según los requerimientos del solicitante.

Tabla No.3 Consolidado final de la cuantificación en 28 diluciones de la población Br19.
Elaborado por Malatesta, C. (2022).

Etiqueta	ID	Volumen DNA (µl)	Volumen AUP (µl)	Promedio Nucleic Acid	Promedio A260 (Abs)	Promedio de A280 (Abs)	Promedio 260/280	Promedio 260/230
1	BR19:0025	10,8	25,2	52,45	1,05	0,53	1,97	1,44
2	BR19:0028	6,6	29,4	56,00	1,12	0,57	1,97	1,70
3	BR19:0032	4,3	31,7	53,00	1,06	0,53	2,00	7,06
4	BR19:0039	6,5	29,5	50,90	1,02	0,51	1,99	5,86
5	BR19:0041	8,6	27,4	51,25	1,03	0,51	2,00	4,02
6	BR19:0043	13,1	22,9	51,20	1,02	0,52	1,98	2,57
7	BR19:0102	7,7	28,3	51,40	1,03	0,52	1,99	4,28
8	BR19:0106	8,3	27,7	52,15	1,04	0,52	1,99	4,03
9	BR19:0111	7,6	28,4	50,65	1,01	0,51	1,98	5,04
10	BR19:0113	2,3	33,7	53,10	1,06	0,54	1,97	9,34
11	BR19:0163	13,3	22,7	54,15	1,08	0,55	1,99	1,30
12	BR19:0234	5,2	30,8	54,80	1,10	0,55	1,98	1,77
13	BR19:0236	9,5	26,5	52,50	1,05	0,53	1,98	1,51
14	BR19:0240	9,5	26,5	53,35	1,07	0,54	1,97	1,53
15	BR19:0247	3,9	32,1	55,60	1,11	0,56	1,98	1,89
16	BR19:0255	6,3	29,7	55,45	1,11	0,56	1,98	1,74
17	BR19:0257	10,5	25,5	59,10	1,18	0,60	1,96	1,55
18	BR19:0355	5,2	30,8	51,15	1,02	0,52	1,96	1,99
19	BR19:0357	17,1	18,9	51,95	1,04	0,52	1,98	1,42
20	BR19:0361	10,9	25,1	51,05	1,02	0,52	1,96	1,66
21	BR19:0364	8,3	27,7	55,50	1,11	0,54	2,04	2,00
22	BR19:0366	7,5	28,5	55,25	1,10	0,55	2,02	1,98
23	BR19:0369	9,1	26,9	50,60	1,01	0,50	2,03	1,89
24	BR19:0370	6,1	29,9	52,70	1,05	0,52	2,03	2,06
25	BR19:0371	6,3	29,7	58,60	1,17	0,58	2,03	2,07
26	BR19:0373	8,3	27,7	51,60	1,03	0,52	2,01	1,92
27	BR19:0407	4,4	31,6	59,00	1,18	0,58	2,04	2,24

28	BR19:0408	6,1	29,9	51,85	1,04	0,52	2,01	2,10
----	-----------	-----	------	-------	------	------	------	------

En el caso de los genotipos pertenecientes a la población Br19 se determinó un volumen y concentración final de 36 µl y 54 ng/µl respectivamente. Una vez efectuadas las diluciones, fueron cuantificadas nuevamente de manera individual y elegidas al azar 46 genotipos para visualizar la calidad de estas en gel. Las muestras se embalaron dentro de una nevera de poliestireno expandido (Icopor) cuyo interior contenía cuatro bolsas Ziploc con 100 tubos Eppendorf cada una y amortiguadas entre pilas de hielo según recomendación del Earlham Institute (Inglaterra). Finalmente, el envío se realizó el 18 de octubre del año en curso y entregado el 25 del mismo mes.

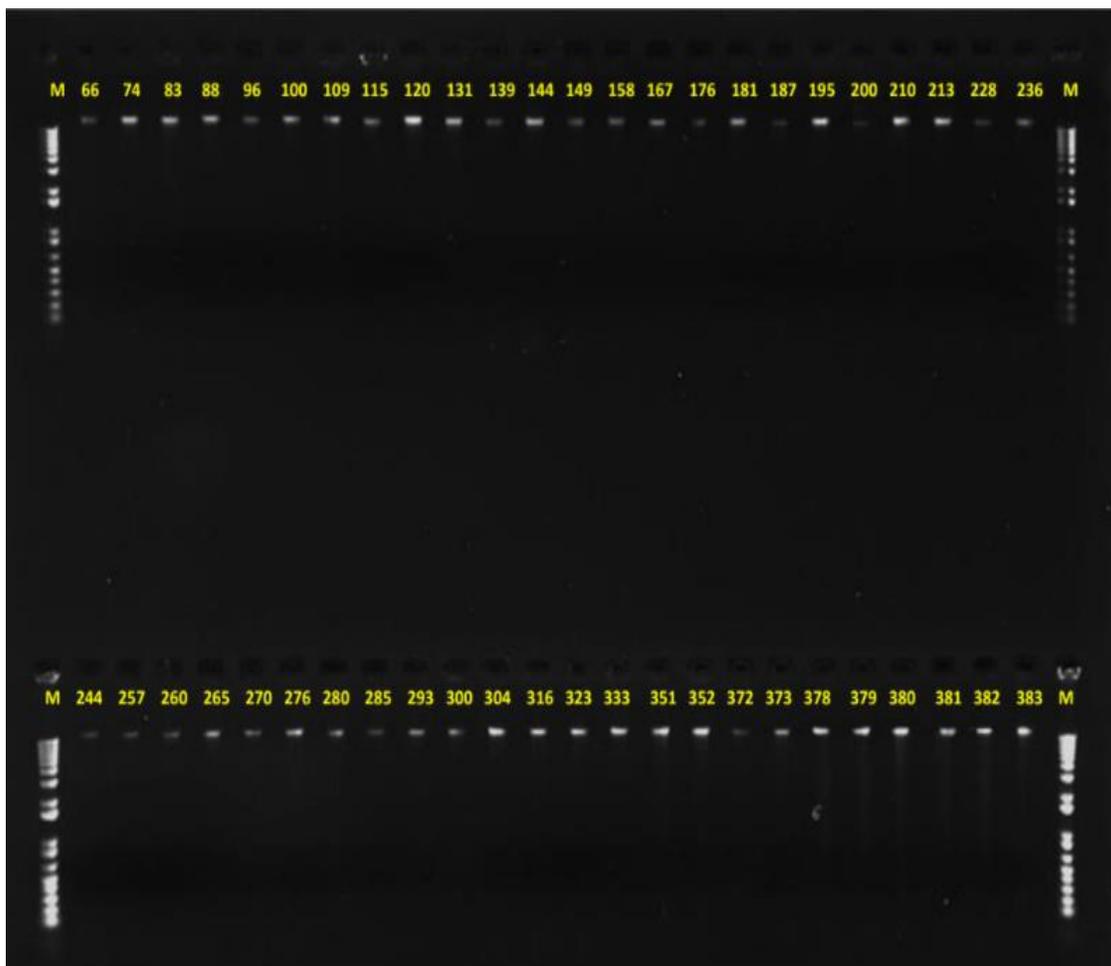


Imagen No.5 Prueba de calidad en diluciones de 46 genotipos elegidos al azar en la población Br19. Elaborado por Malatesta, C. (2022)

- **Liofilización de ADN en genotipos de *Megathyrus maximus***

Para el ensayo de liofilización se emplearon cuatro genotipos que fueron extraídos por duplicado, los tratamientos consistieron de varias diluciones a diferentes niveles de

concentración (tratamiento A:100 ng/μl y tratamiento B: 300 ng/μl) y el stock (tratamiento C: 25 μl del stock), las cuales fueron almacenadas a -80°C durante una hora y luego sometidas a un proceso de secado a 0,001 mbar de presión durante 24 horas. Por último, el equipo empleado fue un liofilizador Labconco™ FreeZone™ -105°C 4.5L Benchtop Freeze Dry Systems.

Tabla No.4 Cuantificación de ADN en 4 genotipos de la población Pm21. Elaborado por Malatesta, C. (2022)

Etiqueta	ID	Promedio Nucleic Acid	Promedio A260 (Abs)	Promedio de A280 (Abs)	Promedio 260/280	Promedio 260/230
1	Pm21:0004	307.2	6.144	3.0655	2.005	2.46
29	Pm21:1937	324.6	6.491	3.2535	1.995	2.44
38	Pm21:2384	1079.4	21.6	10.8	2.0	2.4
72	Pm21:4241	256.6	5.132	2.553	2.01	2.44

Una vez liofilizadas, cada tubo fue sellado con Parafilm alrededor del tapón y almacenado entre silica gel a temperatura ambiente durante ocho días. Transcurrido este tiempo, se agregó 35 μl de agua ultrapura a cada uno y fueron evaluados aplicando el procedimiento mencionado anteriormente (Tabla No.5).

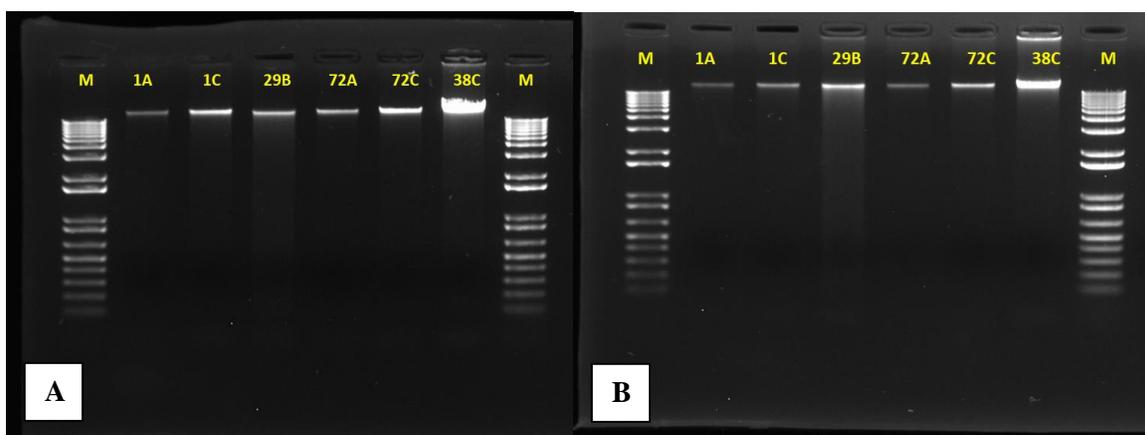


Imagen No.6 Prueba de calidad en diferentes diluciones de ADN en genotipos de la población Pm21 donde: **A)** Diluciones antes del proceso de liofilización; **B)** Diluciones después del proceso de liofilización. Elaborado por Malatesta, C. (2022)

Lo anterior permite concluir que, a menor concentración en una dilución, menor será el nivel de degradación por la relación ADN-Agua (tratamiento A) pero la definición en la banda

predominante tiende a disminuir debido a su inestabilidad. Por otra parte, diluciones superconcentradas (tratamiento B) o el stock (tratamiento C) sostienen una mayor definición del ADN, pero la concentración de este disminuye drásticamente. Por lo tanto, los tratamientos B y C son los más adecuados para liofilizar ADN.

Tabla No.5 Cuantificación de ADN en 4 genotipos de la población Pm21 antes y después del proceso de liofilización. Elaborado por Malatesta, C. (2022).

Genotipo			Dilución o stock sin liofilizar					Dilución o stock liofilizado				
Etiqueta	Volumen DNA (μl)	Volumen AUP (μl)	Promedio Nucleic Acid	Promedio A260 (Abs)	Promedio de A280 (Abs)	Promedio 260/280	Promedio 260/230	Promedio Nucleic Acid	Promedio A260 (Abs)	Promedio de A280 (Abs)	Promedio 260/280	Promedio 260/230
1A	11.8	23.2	104.3	2.1	1.0	2.0	1.9	84.2	1.7	0.8	2.1	1.9
1C	25.0	0.0	312.3	6.2	3.1	2.0	1.9	155.6	3.1	1.5	2.1	1.9
29B	56.2	3.8	307.6	6.2	3.2	1.9	1.8	429.2	8.6	4.4	1.9	1.8
38C	25.0	0.0	1079.4	21.6	10.8	2.0	2.4	651.0	13.0	6.4	2.0	2.2
72A	14.2	20.8	106.2	2.1	1.0	2.0	1.9	102.1	2.0	1.0	2.1	1.8
72C	25.0	0.0	258.4	5.2	2.6	2.0	1.8	124.4	2.5	1.2	2.1	1.8

Referencias

- Ospina Colorado, J.A., 2018. Desarrollo de una metodología de extracción de ADN a partir de semillas de Arroz para un programa de mejoramiento. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).
- Risterucci, A.M., Grivet, L., N’Goran, J.A.K., Pieretti, I., Flament, M.H., Lanaud, C., 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 101, 948–955. <https://doi.org/10.1007/s001220051566>