



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE QUÍMICA**

**EXTRACCIÓN DE ADN E IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS DE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA IDENTIFICAR
ARROZ, SOYA Y MAÍZ**

Presentado por:
Kaetcy González
Cédula: 4-749-1051

TESIS PARA OPTAR POR EL
TITULO DE LICENCIADA EN QUÍMICA

Asesor:
José Renán García Moreno, *Dr.*

Co-asesores:
Mariel Monrroy, *Dra.*
Roberto Guevara, *MSc.*

Chiriquí, República de Panamá
2021

DEDICATORIA

*“Vanidad de vanidades, dijo el Predicador; vanidad de vanidades, todo es vanidad”
Eclesiastés 1:2*

A mi familia.

AGRADECIMIENTO

A Dios por su infinita misericordia para con mi vida.

Al Dr. José Renán García por su guía, paciencia, disposición, confianza, comprensión y apoyo incondicional, en cuanto a su parte humana, acompañado de todos los conocimientos facilitados al efectuar este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA) por su completo respaldo técnico y financiero en todos los requerimientos de este proyecto.

A mi madre y hermanas por todo su amor y sacrificio.

A mi mejor amigo, Rigoberto Ríos, por su motivación y sostén.

A mi padre que me ha inculcado la independencia y autosuficiencia.

Las palabras nunca serán suficientes para testificar lo que han hecho en mí, no solo para este logro académico sino también para mi desarrollo personal.

A todos ustedes, mi más sincero y profundo reconocimiento.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
I. MARCO REFERENCIAL	1
1.1 <i>Oryza sativa</i> L. (arroz)	1
1.2 <i>Glycine max</i> (L.) Merr (soya).....	2
1.3 <i>Zea mays</i> (maíz)	4
1.4 Extracción de ADN	5
1.4.1 Extracción de ADN con Kit PureLink™	6
1.4.2 Extracción de ADN con CTAB.....	7
1.4.3 Extracción de ADN con amortiguador de lisis.....	8
1.5 Reacción en cadena de la polimerasa.....	8
1.5.1 Componentes para PCR.....	9
1.5.2. Fundamento de la PCR.....	10
1.5.3 Análisis del producto amplificado.....	11
1.6 Reacción en cadena de la polimerasa anidada	12
1.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	12
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. HIPÓTESIS	14

V. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
VI. COBERTURA	14
VII. METODOLOGÍA	15
7.1. Muestreo.....	15
7.2 Protocolos para extracción de ADN.....	16
7.2.1 Extracción de ADN con el PureLink® Plant Total DNA Purification Kit	16
7.2.2 Extracción de ADN con amortiguador de lisis y CTAB.....	18
7.3 Reacción en cadena de la polimerasa convencional y anidada	19
7.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	21
7.5 Análisis estadístico.....	22
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
8.1 Extracciones de ADN.....	23
8.1.1 Extracción de ADN en las muestras foliares utilizando Kit.....	23
8.1.2 Extracción de ADN en las muestras de granos con el método de CTAB y el método buffer de lisis.....	25
8.1.2.1 Efecto del proceso de extracción y del tipo de grano en la concentración de ADN	32
8.1.2.2 Efecto de la variedad del grano en la concentración de ADN.....	33
8.1.2.3 Efecto del método de extracción en la pureza del ADN	36
8.2 Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para la identificación de soya, arroz y maíz	36
8.3. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la identificación de soya, arroz y maíz.....	40
IX. CONCLUSIONES.....	53
X. BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del arroz.....	1
Tabla 2. Principales productores de soya en América Latina y Caribe en el año 2016.....	3
Tabla 3. Clasificación taxonómica del maíz.	4
Tabla 4. Preparación para lisis de la hoja.	16
Tabla 5. Unión y lavado del ADN.	16
Tabla 6. Elución del ADN.	17
Tabla 7. Rendimiento y calidad del ADN.....	17
Tabla 8. Soluciones amortiguadoras para extracción de ADN.	18
Tabla 9. Método con amortiguador de lisis.	18
Tabla 10. Método CTAB.	19
Tabla 11. Proceso de amplificación.	19
Tabla 12. Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa convencional.	20
Tabla 13. Partidores para reacción en cadena de la polimerasa.....	20
Tabla 14. Preparación de amortiguador TAE 10X.	21
Tabla 15. Determinación electroforética de ADN.	21
Tabla 16. Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.	22

Tabla 17. Proceso de amplificación qRT-PCR.....	22
Tabla 18. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de arroz y soya por el método Kit PureLink.....	24
Tabla 19. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de soya por el método amortiguador de lisis.....	26
Tabla 20. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de arroz por el método amortiguador de lisis.....	27
Tabla 21. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de maíz por el método amortiguador de lisis.....	28
Tabla 22. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de soya por el método CTAB.....	29
Tabla 23. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de arroz por el método CTAB.....	30
Tabla 24. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de maíz por el método CTAB.....	31
Tabla 25. Análisis de varianza para los valores de la concentración de ADN obtenida.....	32
Tabla 26. Efecto de las variedades dentro de cada grano en la concentración de ADN.....	33
Tabla 27. Datos de frecuencia de ADN con el método amortiguador de lisis y CTAB.....	36
Tabla 28. Datos de q-RT-PCR.....	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Glycine max (L.) Merr.	2
Figura 2. Esquema general experimental.....	15
Figura 3. Diseño general de la programación para PCR.....	20
Figura 4. Media de la concentración de ADN e intervalo de Bonferroni al 95% de confianza para la extracción con CTAB.	32
Figura 5. Media de la concentración de ADN e intervalo de Bonferroni al 95 % de confianza para la extracción con amortiguador de lisis.	33
Figura 6. Concentración de ADN obtenida por el método extracción con amortiguador de lisis. A, B y C. Variedades de soya, arroz y maíz respectivamente.	34
Figura 7. Concentración de ADN obtenida por el método extracción con CTAB. A, B y C. Variedades de soya, arroz y maíz respectivamente.	35
Figura 8. Determinación de especie vegetal (arroz). Los carriles A y E contienen muestras de ADN de arroz y partidores para el gen Wx. Los carriles B y F son muestras de ADN de arroz y partidores RM1 para la identificación de la región SSR cromosomal. Los carriles C y G son muestras de ADN de arroz y partidores R171 para la identificación de la región SSR cromosomal. Los controles negativos se ubican en los carriles D, H, I, J, K, L.	37
Figura 9. Determinación de especies vegetales (arroz y maíz). Los carriles A y B contienen muestras de ADN de arroz y partidores para el gen Wx. Los carriles C y D con muestras de ADN de arroz y partidores RM1 para la identificación de la región SSR cromosomal. Los carriles E y F son muestras del ADN de arroz y partidores R171 para la identificación de la región SSR cromosomal. Los carriles G	

y H con ADN de arroz y con partidores para el gen Wx preparados un año atrás. Los carriles I, J, K y L para muestras de maíz y partidores para el gen zeína, en estos dos últimos carriles el par de partidores también contaban con un año de antigüedad.	38
Figura 10. Determinación del Promotor 35S en especies vegetales (soya, arroz y maíz). Los carriles A, B, C, D y E contienen muestras de ADN de soya. Los carriles F, G, H, I y J con muestras de ADN de arroz. Los carriles K, L, M, N, Ñ, O y P para las muestras de ADN de maíz. Todos con partidores del Promotor 35 S.	39
Figura 11. Identificación positiva del gen Wx en arroz, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM.	41
Figura 12. Identificación positiva del gen de zeína en maíz, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM.	41
Figura 13. Identificación positiva del gen de lectina en soya, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM con partidores A49 (CIBQUIA).....	42
Figura 14. Identificación positiva del gen de lectina en soya, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM con los partidores de referencias GMO3/GMO4.	42
Figura 15. Identificación positiva del gen de lectina en soya, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM con los partidores A49 y en mezclas de ADN de arroz, maíz, y soya.	43
Figura 16. Identificación positiva del gen de zeína en maiz, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM con los partidores Ze1 y en mezclas de ADN de arroz, maíz y soya.	44
Figura 17. PCR en tiempo real (mix arroz + maíz + soya – gen Wx / lectina / zeína).....	45

Figura 18. Producto de PCR que se obtiene con el par de partidores Fw1/Rw1 que amplifican un fragmento de 121 pb del gen Wx (gen waxy de *Oryza sativa*). El diagrama muestra la disposición de los partidores sobre la secuencia obtenida del Gen BanK (NCBI) HM881012. El segmento se restringió solo para el producto que se espera obtener con los partidores Fw1/Rw1..... 50

Figura 19. Producto de PCR que se obtiene con el par de partidores FZ1/RZ1 que amplifican un fragmento de 250 pb del gen de la Zeína del maíz. El diagrama muestra la disposición de los partidores sobre la secuencia codificante para zeína obtenida del Gen BanK (NCBI) Q083080.1. El segmento se restringió solo para el producto que se espera obtener con los partidores FZ1/RZ1..... 50

Figura 20. Producto de PCR que se obtiene con el par de partidores GMO3/GMO4 que amplifican un fragmento de 118 pb gen de lectina de soya. El diagrama muestra la disposición de los partidores sobre la secuencia codificante para lectina obtenida del Gen BanK (NCBI) K00821. El segmento se restringió solo para el producto que se espera obtener con los partidores GMO3/GMO4..... 51

Figura 21. Producto de PCR que se obtiene con el par de partidores F49/R49 que amplifican un fragmento de 501 pb del gen de lectina de soya. El diagrama muestra la disposición de los partidores sentido y antisentido, la secuencia codificante para lectina obtenida del Gen BanK (NCBI) K00821. El segmento se restringió solo para el producto que se espera obtener con los partidores F49/R49..... 52

EXTRACCIÓN DE ADN E IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA IDENTIFICAR ARROZ, SOYA Y MAÍZ

RESUMEN

El arroz considerado como el alimento principal para la mayor parte de la población, la soya, como la leguminosa con mayor valor proteínico, y el maíz, como el cereal con la mayor producción mundial, son vegetales de gran trascendencia para el consumo. El trabajo con estas especies en campos de la biotecnología, a nivel genómico o molecular requiere de la obtención de la macromolécula ADN con ciertos parámetros de calidad. Igualmente, si se requiere de la aplicación de alguna de las variantes de la PCR, con fines como la identificación de especies o identificación de componentes transgénicos, en alguno de los productos que contengan arroz, maíz o soya, es necesario establecer las bases para su implementación. Por lo cual, el presente trabajo de tesis contempló la evaluación, en términos de pureza y concentración de metodologías de extracción de ADN a partir de muestras foliares y de grano de los vegetales mencionados anteriormente. La extracción de ADN realizada mediante el Kit PureLink™, el método CTAB y el método modificado amortiguador de lisis, junto a la técnica molecular PCR permitió identificar la presencia de los genes wx, lectina y zeína, que a su vez son distintivos particulares de cada especie. Diferencias estadísticamente significativas resaltaron la utilidad de un método frente a otro en base al tipo o variante de la muestra vegetal. Esta investigación permitió demostrar la funcionalidad de las distintas metodologías en la detección de modificaciones genéticas, identificación de genes o la autenticación de las especies vegetales arroz, soya y maíz; plantas de gran valor para la alimentación y economía panameña.

ABSTRACT

Rice is considered the main food for most of the population, soybeans, as the legume with the highest protein value, and corn, as the cereal with the highest world production, are vegetables of great importance for consumption. Working with these species in fields of biotechnology, at the genomic or molecular level, requires obtaining the DNA macromolecule with certain quality parameters. Likewise, if the application of any of the variants of the PCR is required, for purposes such as the identification of species or the identification of transgenic components, in any of the products that contain rice, corn or soybeans, it is necessary to establish the bases for their application. Therefore, this thesis work contemplated the evaluation, in terms of purity and concentration, of DNA extraction methodologies from foliar and grain samples of the aforementioned plants. DNA extraction carried out using the PureLink™ Kit, the CTAB method and the modified lysis buffer method, together with the molecular PCR technique, allowed us to identify the presence of the wx, lectin and zein genes, which in turn are distinctive characteristics of each species. Statistically significant differences highlighted the usefulness of one method over another based on the type or variant of the plant sample. This research allowed to demonstrate the functionality of the different methodologies in the detection of genetic modifications, gene identification or the authentication of the rice, soybean and corn plant species; plants of great value for the panamanian food and economy.

I. MARCO REFERENCIAL

1.1 *Oryza sativa* L. (arroz)

Se estima que el arroz es el alimento principal para la mayor parte de la población mundial, con un consumo humano previsto de 411.7 millones de toneladas durante la campaña 2018/2019. Los mayores productores son China, India, Indonesia y Bangladesh (FAO, 2018).

En 1753, Linneo plantea la clasificación taxonómica del arroz y con ello su nombre científico como *Oryza sativa* L. indicado en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del arroz.

Categoría	Nombre
Dominio	Eukarya
Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	<i>Oryza</i> L.
Especie	<i>Sativa</i>

Fuente: Global Biodiversity Information Facility

Esta gramínea anual, de tallos redondos y huecos compuestos por nudos y entrenudos con hojas de lámina plana unidas al tallo por la vaina, se domesticó hace miles de años en Asia (Arregocés, 2005). El género *oryza* abarca veintidós especies, entre ellas dos cultivadas, *oryza sativa* L. de origen asiático y *oryza glaberrima* Steud. de África. El progenitor salvaje de *oryza sativa* es la especie *O. rufipogon* y *O. nivara*, mientras que el de *O. glaberrima* es *oryza barthii* y *O. longistaminata* (Vaughan, 1994).

El genoma del arroz constituido por doce cromosomas diploides ($2n = 24$) que a su vez contienen cerca de cincuenta mil genes con un tamaño aproximado de 400 mega bases, fue la primera planta comestible en ser decodificada (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).

En la República de Panamá, el Ministerio de Desarrollo Agropecuario informó que para el año agrícola 2019/2020 las provincias de Chiriquí, Panamá Este y Los Santos son las que registran mayor superficie de siembra. La comercialización del arroz se da en grano y en subproductos como harina, vinagre, biomasa, papel y salvado para extraer aceite de arroz, así también como procesado de alimentos para bovinos, aves, peces y porcinos (Instituto de Mercadeo Agropecuario, 2020).

Su valor nutritivo se basa en el aporte energético otorgado por el alto contenido de carbohidratos complejos, esto sumado a la facilidad de cultivo y almacenamiento, convierten al arroz en el principal sustento para la población mundial. Sin embargo, la FAO (2019) estima que en el mundo más de 820 millones de personas padecen hambre, es decir, una de cada nueve; por lo que la seguridad alimentaria prima en importancia y con ello la búsqueda del mejoramiento genético vegetal, tanto para enriquecerlos nutricionalmente como para aumentar su resistencia a factores ambientales, con el fin de alcanzar un mejor rendimiento y calidad del rubro.

1.2 *Glycine max* (L.) Merr (soya)

La soya es una fuente importante de aceite y proteínas, su alta concentración de aminoácidos sulfurados, metionina y cisteína, la ubican como la leguminosa con mayor valor proteínico, tanto en cantidad como en calidad (Ridner, 2006).



La producción mundial 2018/2019 fue estimada en 358.2 millones de toneladas, resultando como mayores productores Estados Unidos, Brasil, Argentina y China (USDA, 2019). Esta planta herbácea (**Figura 1**) cuyo nombre científico es *Glycine max* (L.) Merr pertenece al Reino Plantae; División, Tracheophyta; Clase, Magnoliopsida; Orden, Fabales; Familia, Fabaceae; Género, *Glycine Willd.*; Especie, *Max* (Linneo, 1737; Merrill, 1917).

Figura 1. *Glycine max* (L.) Merr.
(Fuente: ludek.talian, 2019)

Se sugiere que la soya fue domesticada a partir del complejo *G. soja/G. max* que divergió de un ancestro común de estas dos especies de glicina (Kim *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014), aunque se desconoce el sitio exacto de origen, se señala a China, Corea y Japón como candidatos (Carter *et al.*, 2004). Su genoma está constituido por veinte cromosomas que constituyen cerca de cuarenta y cinco mil genes en 1.1 giga bases (Schmutz *et al.*, 2010).

La soya es uno de los cultivos más extendidos en Latinoamérica, sin embargo, la mayoría de la producción está concentrada en pocos países; considerada como la principal oleaginosa cultivada en el mundo, en Sudamérica se representa más del 50 % de la producción mundial, donde China y la UE ocupan los primeros lugares como importadores, especialmente para la elaboración de piensos (JRC, 2019). La creciente demanda internacional con su alto rendimiento son puntos claves para incentivar la expansión de este cultivo en nuestro país, donde es evidente que se encuentra muy lejos de explotar ese mercado (**Tabla 2**).

Tabla 2. Principales productores de soya en América Latina y Caribe en el año 2016.

País	Área de cultivo (ha)	Producción (t)	Rendimiento (kg/ha)	Producción (% de LAC)
Brasil	33 153 679	96 296 714	2 904	56.519
Argentina	19 504 648	58 799 258	3 014	34.511
Paraguay	3 370 000	9 163 030	2 719	5.378
Bolivia	1 336 399	3 204 639	2 398	1.881
Uruguay	1 140 000	2 208 000	1 936	1.296
México	277 802	509 114	1 832	0.299
Colombia	33 644	83 941	2 494	0.049
Ecuador	26 280	41 788	1 590	0.025
Guatemala	15 000	38 000	2 533	0.022
Venezuela	10 000	11 000	1 100	0.006
Belice	2 852	7 779	2 727	0.005
Nicaragua	3 000	7 000	2 333	0.004
El Salvador	2 987	5 595	1 873	0.003
Perú	791	1 371	1 734	0.001
Honduras	559	1 181	2 114	0.001
<i>Panamá</i>	<i>276</i>	<i>109</i>	<i>395</i>	<i>0.000</i>
<i>Total</i>	<i>58 877 924</i>	<i>170 378 526</i>	<i>2 041</i>	<i>100</i>

Fuente: Informe Técnico del Centro Común de Investigación de la Comisión Europea, 2019

1.3 *Zea mays* (maíz)

El maíz es el cereal con la mayor producción mundial total, la cual se estimó para el 2018 en los 1122 millones de toneladas, resultando como mayores productores Estados Unidos, China y Brasil (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, 2019).

Esta planta monoica de raíz fasciculada y caña maciza tiene por nombre científico *Zea mays* L. (Linneo, 1753), su clasificación sistemática se indica en la **Tabla 3**. Se reconoce al maíz como la forma cultivada y al teosinte como su antecesor silvestre (Beadle, 1932; Doebley, 1990); originado en México, posteriormente emigra hacia el resto de América (Acosta, 2009). Su genoma cuenta con diez pares de cromosomas, y treinta y dos mil genes en un tamaño de 2.3 giga bases (Schnable *et.al.*, 2009).

Tabla 3. Clasificación taxonómica del maíz.

Categoría	Nombre
Dominio	Eukarya
Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	<i>Zea</i> L.
Especie	<i>Mays</i>

Fuente: Global Biodiversity Information Facility

En Panamá, durante el período 2018-2019 se consigue la producción en poco más de diecisiete mil hectáreas, encabezada por las provincias de Los Santos y Herrera; entre las principales dificultades que se registraron están las lluvias fuera de temporada lo que provocaron retrasos en la cosecha, y con ello mermas importantes (Ministerio de Desarrollo Agropecuario, 2019).

El valor nutricional del maíz se compara favorablemente con respecto al arroz, pues es más rico en grasa, hierro y fibra, sin embargo, su proteína constituida altamente por zeína presenta deficiencia en aminoácidos como la lisina y el triptófano, con lo cual se ha escogido mejorarlo genéticamente para el enriquecimiento con proteínas de calidad (Paliwal, Granados, Lafitte & Viollic, 2001).

Por lo tanto, basados en la importancia biológica y económica, se escogieron estas tres especies vegetales para implementar algunas técnicas moleculares y con ello proponer rutas funcionales que permitan realizar estudios en el campo de la agroindustria. Para el desarrollo de estas técnicas que se ensayan a partir de ácidos nucleicos, se trabajó con los genes *wx* en el arroz, que codifica una proteína que participa en la vía de la biosíntesis del almidón, en la soya, fue la lectina que codifica una proteína de gran estabilidad y potencial insecticida, y en el maíz fue la zeína codificante de una glucoproteína con alto contenido de prolina.

1.4 Extracción de ADN

Los ácidos nucleicos, son polímeros lineales de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, que almacenan y transmiten la información genética. De acuerdo a la composición química, del azúcar y las bases nitrogenadas que contienen, se clasifican en ácido desoxirribonucleico y en ácido ribonucleico (Jiménez & Merchant, 2003).

El ADN, con su estructura secundaria, de doble hélice enrollada en cadenas antiparalelas y complementarias (Watson & Crick, 1953), forma unidades con información para codificar proteínas determinadas y expresar características específicas. Esta unidad, denominada gen, se transmite y expresa mediante tres procesos: replicación, transcripción y traducción (Jiménez & Merchant, 2003).

Múltiples investigaciones en biotecnología, donde se aprovechan estos tipos de procesos biológicos para producir bienes y servicios, dan inicio con la extracción de ADN. Hasta la actualidad, se han diseñado distintos protocolos con el fin de obtener resultados confiables y reproducibles; los cuales consisten básicamente en tres etapas: lisis celular, eliminación de proteínas y purificación del ADN (Orfao & Morent, 2011). La selección de un protocolo adecuado requiere la consideración de diversos factores tales como:

- a) Cantidad, humedad y origen de la muestra: bacterias (Desneux & Pourcher, 2014), cabello (Higuchi *et al.*, 1988), esporas (Turan *et al.*, 2015), fluidos corporales (Watanabe *et al.*, 2014), heces (Yoshikawa *et al.*, 2011; Claassen *et al.*, 2013), hojas (Yi *et al.*, 2005), hongos (Romanelli *et al.*, 2014), insectos (Freitas *et al.*, 2014), muestras forenses (Pfitzinger *et al.*, 1992), suelo (Santos *et al.*, 2015), entre otros.

- b) Conservación de la muestra: fresca, preservada o congelada.
- c) Uso previsto: AFLP (Reineke *et al.*, 1998), digestión con enzimas de restricción, huella genética (Tilotta *et al.*, 2010), PCR, qPCR, RAPD (Alfonso *et al.*, 2016), RFLP (Maropola *et al.*, 2015), secuenciación o southern blot (Mies *et al.*, 1991).
- d) Calidad y rendimiento del ADN extraído; automatización, rapidez y simplicidad en la ejecución del protocolo; tiempo para obtener resultados; recursos económicos e infraestructura del laboratorio.

El aislamiento de ADN inicia con lisis celular donde se descompone su estructura para liberar los ácidos nucleicos; esta desintegración se da por ruptura mecánica, tratamiento químico o tratamiento enzimático. En la primera, se somete la célula a trituración o a lisis hipotónica; en la segunda, se utilizan detergentes o agentes caotrópicos que solubilizan los lípidos e inactivan las nucleasas; y en la tercera, se da la remoción proteica mediante enzimas proteolíticas. Seguido se elimina el ARN utilizando RNasas (Green & Sambrook, 1989). Luego se separa el ADN de las proteínas y lípidos, por medio de solventes orgánicos polares, que aprovechan las propiedades hidrofílicas de los grupos fosfatos del ADN, y de la centrifugación para apartar la fase acuosa de la orgánica. Posteriormente para recuperar el ADN se adiciona etanol con altas concentración de sales monovalentes que se unen a los grupos fosfatos reduciendo las fuerzas repulsivas entre los nucleótidos, por lo que el ADN se pliega sobre sí y precipita. Finalmente, se eluye e hidrata el ADN con una solución amortiguadora, generalmente, Tris-HCl o EDTA a pH 8.0.

Para esta extracción de ADN se emplearon un Kit comercial de la marca Invitrogen y el protocolo tradicional CTAB, junto a una modificación de este último; a continuación, se describen las particularidades de cada uno.

1.4.1 Extracción de ADN con Kit PureLink™

El Kit purificación de ADN genómico vegetal PureLink™ permite un aislamiento rápido y eficiente en menos de una hora con mínima contaminación por ARN. Recomendado para aislar ADN de tejidos vegetales como brotes, cáscara, hojas, hongos y pasto; y diseñado para purificar ADN de hasta 100 mg de tejido vegetal con un tamaño de 20-50 kb adecuado para PCR, digestión con enzimas de restricción y transferencia de Southern.

Este protocolo utiliza la centrifugación de columnas en ausencia de disolventes orgánicos y se basa en la unión selectiva de dsDNA a una membrana hecha de sílice en presencia de sales caotrópicas. En la lisis se usa un amortiguador de resuspensión con RNasa y SDS, posteriormente las proteínas, polisacáridos y pigmentos fotosintéticos asociados son precipitados con un amortiguador y eliminados por centrifugación a alta velocidad. El ADN presente en el lisado claro se une a la membrana de sílice en la columna, para eliminar las impurezas mediante lavados; finalmente, eluye el ADN (User guide: PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, 2012).

1.4.2 Extracción de ADN con CTAB

Método adecuado y rápido para extraer ADN vegetal de alto peso molecular, superior a cincuenta mil pb, especialmente indicado para eliminar polisacáridos y compuestos polifenólicos que alteran su calidad (Murray & Thompson, 1980); aplicado con frecuencia para transformaciones genéticas (McCown *et al.*, 1991; Anai *et al.*, 2003). Se han desarrollado numerosas variantes para adaptar el método a una amplia gama de matrices (Wilson, 2001; Ren *et al.*, 2006; Demeke & Jenkins, 2009).

Este método ofrece una rápida extracción de ADN en cereales con alto contenido de interferentes, permite el uso de reactivos asequibles, y resulta en un producto estable que se puede almacenar a 4 °C durante dos años sin degradación (Palacios Santamaría, 2008; Ahmadikhah, 2009; Ruiz Maraver, 2012).

Inicialmente para la lisis celular se utiliza nitrógeno líquido en la molienda de la muestra, una vez homogenizada se resuspende en una solución que contiene: tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato, amortiguador que mantiene el pH de la solución estable; cloruro de sodio, una sal que previene la contaminación con polisacáridos al inhibir la actividad de algunas polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción (Velasco, 2005); ácido etilendiaminotetraacético, agente quelante que captura el magnesio, un cofactor de la desoxirribonucleasa, que inactiva ésta nucleasa (Khosravinia & Ramesha, 2007; Brown & Audet, 2008); y bromuro de cetiltrimetilamonio, detergente que forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos en medio hiposalino y solubiliza los polisacáridos (Rocha Salavarieta, 2002).

Posterior a este paso, con amortiguador de extracción, es común someter la muestra a ciclos de incubación, que promuevan la ruptura de lípidos y la liberación del ADN, a una temperatura entre 50 °C y 70 °C, la cual no puede sobrepasar los 80 °C para evitar la degradación del ácido nucleico. Luego el cloroformo extrae los residuos orgánicos y separa el ADN para su siguiente precipitación llevada a cabo con etanol en una alta concentración salina. Finalmente, se centrifuga y lava para eliminar las últimas trazas, y obtener el ADN extraído (Eguiarte, Souza & Aguirre, 2007).

Es importante determinar la concentración del ADN para procedimientos posteriores como los procesos de amplificación. Un análisis habitual es la espectrofotometría, la cual se basa en la medida de la cantidad de luz ultravioleta que absorben las bases nitrogenadas, siempre tomando en cuenta que niveles significantes de ARN, nucleótidos libres o proteínas son algunos contaminantes que contribuyen a la absorbancia resultando en una sobreestimación de la concentración real de ADN. En esta cuantificación se realiza una lectura a 260 nm donde el cálculo de la concentración del ácido nucleico a una densidad óptica corresponde aproximadamente a 50 µg/mL, y una lectura a 280 nm permite la estimación de pureza como los valores obtenidos entre 1.8 - 2.0, cifras por debajo de este intervalo indican contaminación con proteínas (Prieto Solla, 2002).

1.4.3 Extracción de ADN con amortiguador de lisis

Este protocolo es una adaptación del método realizado con CTAB, donde la única variante es no utilizar el bromuro de cetiltrimetilamonio.

Una vez extraído el ADN, a través de los tres protocolos, se utilizó la técnica PCR convencional más las variantes PCR anidada y PCR en tiempo real para la autenticación de arroz, soya y maíz.

1.5 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN utilizando el mecanismo de replicación celular mediante partidores (Mullis, 1990).

1.5.1 Componentes para PCR

Para llevar a cabo la reacción se requieren los siguientes elementos:

- a) ADN, también denominado templado, son cadenas que funcionan como molde para la enzima, pues contienen la región a amplificar; normalmente se emplea entre 0.3 y 1.0 μg para promover la eficiencia de la amplificación (Torres Tejeda & Baca, 1995).
- b) ADN polimerasa, una enzima termoestable con funcionamiento óptimo entre 70 a 75 °C capaz de catalizar la síntesis del ADN molde a una velocidad alrededor de 100 nucleótidos por segundo y soportar altas temperaturas. Generalmente, se utiliza una preparación comercial de Taq ADN polimerasa, una enzima purificada a partir de bacterias *Thermus aquaticus*. Se necesita especial atención con la concentración de la enzima, pues, a muy altas tiende a acumular productos inespecíficos, y a muy bajas no se produce la cantidad suficiente de copias (Cortazar Martínez & Silva Rincón, 2004).
- c) Agua, utilizada como disolvente, debe encontrarse libre de nucleasas, las enzimas que degradan los ácidos nucleicos (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).
- d) Cation divalente, usualmente magnesio (Mg^{2+}), es un cofactor enzimático que afecta la especificidad y rendimiento de la reacción. Se requiere una concentración entre 0.5 a 2.5 mM, especial en cada caso, pues depende de los grupos fosfatos aportados por los dNTPs y partidores (Cortazar Martínez & Silva Rincón, 2004; Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).
- e) Desoxirribonucleótido trifosfato o dNTP, es la base que utiliza la ADN polimerasa para crear las cadenas complementarias del ADN. Se recomienda diluirlos en agua y almacenar a -20 °C con una concentración 1 mM de cada uno (Cortazar Martínez & Silva Rincón, 2004; Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).
- f) Partidor, también conocido como cebador, iniciador, oligonucleótido o primer. Se utilizan dos partidores, uno derecho y uno izquierdo, cada uno complementario a un segmento en la hebra del ADN molde. Es una secuencia corta de entre quince a treinta nucleótidos de longitud con un contenido en GC entre 40 a 75 %. Existen programas informáticos encargados de diseñar partidores con alta especificidad que evitan la complementariedad entre ambos y la formación de productos indeseables (Torres Tejeda & Baca, 1995; Rodríguez Sánchez & Barrera Saldaña, 2004).

- g) Solución amortiguadora de pH, su composición depende de la enzima utilizada, mayormente los proveedores proporcionan un amortiguador 10 X para utilizarlo con la enzima respectiva. El más común es el 10 mM Tris buffer con pH entre 8.5 y 9.0 a 25 °C (Baumforth, Nelson, Digby, O'Neil, & Murray, 1999).

1.5.2. Fundamento de la PCR

La amplificación del ácido desoxirribonucleico, dentro de la reacción en cadena de la polimerasa, se lleva a cabo cuando la doble hélice del ADN molde se separa en dos hebras actuando cada una como molde para la síntesis de su complementaria y crear así dos réplicas exactas constituidas por una hebra original y una nueva (Meselson & Stahl, 1958). Esta técnica se basa en ciclos repetidos que consisten en tres etapas marcadas por cambios de temperatura. A continuación, se describe cada una:

- a) Desnaturalización: la secuencia del ADN molde es calentado y separado a 95 °C durante veinte a treinta segundos. Este aumento de temperatura rompe los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas formando una especie de burbuja donde se perfilan dos estructuras con forma de Y, la cual se conoce como horquilla de replicación (Cairns, 1963).
- b) Hibridación: con esta horquilla, los partidores se alinean al extremo 3' de su secuencia complementaria en el ADN molde indicando el punto de partida para la polimerasa. La formación de este complejo utiliza una temperatura de fusión entre 50 y 60 °C.
- c) Elongación: la ADN polimerasa, cataliza la síntesis de la hebra complementaria a partir de los desoxinucleósidos trifosfatos, pero únicamente en dirección 5' → 3', por lo que la replicación parte en direcciones opuestas desde el origen; a una temperatura de 72 °C; así culmina el proceso de amplificación para un segmento de ADN.

Las temperaturas usadas dependen de la enzima, de la concentración de iones divalentes, de los dNTP en la reacción, de la temperatura de unión de los partidores, así como de la longitud del ADN que se desea amplificar; en tanto los tiempos dependen de la cantidad G-C o de la velocidad del termociclador para incrementar la temperatura (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

El número de ciclos necesarios para producir una banda visible en un gel depende de la concentración inicial del ADN molde, donde cada segmento de ADN duplica su cantidad con cada ciclo; generalmente, se utiliza una serie entre 25 a 35 ciclos. Se debe evitar formular demasiados ciclos, pues esto tiende a aumentar la cantidad y complejidad de productos indeseables; en caso de no obtener el producto deseado después de treinta ciclos, es recomendable tomar 1 μ L del producto amplificado y volverlo a amplificar durante treinta ciclos más en una nueva mezcla de reacción, en lugar de extender los ciclos (Metzker & Caskey, 2001; Cortazar Martínez & Silva Rincón, 2004).

1.5.3 Análisis del producto amplificado

Los fragmentos de ADN obtenidos después de la amplificación se pueden identificar mediante la comparación con marcadores de peso molecular (fragmentos de tamaño conocido) que permite calcular el tamaño aproximado del ADN en estudio (Cortazar Martínez & Silva Rincón, 2004). Esta caracterización se da por medio de una técnica denominada electroforesis, en la cual se da la migración de una molécula por acción de un campo eléctrico a través de una matriz porosa, ésta se separa en función de su tamaño molecular y carga eléctrica cuando se aplica una diferencia de potencial a través de electrodos. La electroforesis se puede clasificar en dos categorías: electroforesis de frente móvil y electroforesis de zona (Bolívar, 2004).

La electroforesis en gel, un tipo de electroforesis de zona, consiste en el desplazamiento de la muestra sobre un soporte semisólido, como gel de agarosa o de poliacrilamida, donde los componentes de la muestra migran en forma de pequeñas bandas. La agarosa es un polisacárido que se extrae esencialmente de algas marinas. Para la preparación del gel se considera que a mayor concentración menor diámetro del poro lo que con lleva una mayor resistencia en la movilidad del ADN (Prieto, 2002). Para el revelado final de los fragmentos de ADN se usa la tinción con compuestos fluorescentes e intercalantes como el bromuro de etidio y una posterior observación bajo luz ultravioleta (Rocha, 2002). Otros factores que influyen en la movilidad de la molécula de ADN son la temperatura y el coeficiente de fricción del campo eléctrico, la viscosidad, fuerza iónica, naturaleza y pH del gel; la composición de los tampones utilizados; y por supuesto la conformación del ácido nucleico (Yábar, 2003).

1.6 Reacción en cadena de la polimerasa anidada

También conocida como Nested PCR, es una variante que incrementa la sensibilidad y especificidad de la PCR, pues trabaja con dos rondas de amplificación sucesivas, en una primera se amplifica de forma convencional, para luego en la segunda utilizar el producto de la primera reacción como molde junto a dos partidores contenidos en la región previamente amplificada (Innis, Gelfand y Sninsky, 1995; Cortazar & Silva, 2004).

1.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real permite la detección de productos amplificados y la cuantificación de ADN en la muestra por medio de un intercalante fluorescente. Esencialmente en función al ADN utilizado se reconocen dos tipos dentro de esta variante, para ADN genómico se le denomina qPCR (quantitative PCR), y en caso de que se use ADN complementario será una RT-qPCR (Livak *et al.*, 2001; Kubista *et al.*, 2006; Krishnamurthy *et al.*, 2015). Los componentes utilizados en la PCR - tiempo real, como lo es la enzima, dNTP's, Mg⁺, buffer e intercalante, generalmente, se encuentran juntos en una solución llamada Master mix; el agua sin nucleasas se añade posteriormente.

La detección de los productos amplificados sucede, conforme avanza la reacción, empleando reporteros fluorescentes. Con base en esta fluorescencia se distinguen dos métodos, específico y no específicos. En los no específicos los intercalantes tienen afinidad por el ADN de doble cadena que al oxidarse generan una señal fluorescente; los más usados son el bromuro de etidio y el SYBR Green. Los métodos específicos emiten la señal de fluorescencia al transferir energía desde un donador (reportero) a un aceptor (quencher), mediante dos posibles reacciones, por hidrólisis o por hibridación; entre estos intercalantes se encuentran la sonda TaqMan y las Beacons (Rodríguez & Rodríguez, 2006). La técnica se desarrolla mediante un sistema informático, denominado termociclador de PCR en tiempo real, el cual proporciona energía, detecta la señal fluorescente y realiza el análisis cuantitativo; este suministro de energía hacia los fluoróforos se puede dar de tres maneras, a través de lámparas, diodos emisores de luz (LED) o láser. El análisis cuantitativo se da con la evaluación de las curvas de amplificación, en las que se representa la fluorescencia detectada versus el número de ciclos de PCR.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reacción en cadena de la polimerasa se establece como una valiosa herramienta para el estudio genético y múltiples aplicaciones entre ellas la identificación de especies o identificación de componentes transgénicos. En nuestro país por la relevancia que tienen en cuanto a consumo las variedades de arroz, maíz y soya, pueden ser objeto de la aplicación de su identificación sobre todo cuando se presentan en mezclas o productos procesados. No obstante, se requiere obtener ADN que reúna ciertos parámetros de calidad. Por años se han dedicado estudios al mejoramiento de los métodos para la extracción de ADN, donde la utilización de kits comerciales para el aislamiento ofrece un extracto de alta pureza y fácil manipulación; por otro lado, los métodos tradicionales aportan un alto rendimiento y son más económicos. Igualmente, la implementación de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, para la cual, existen variantes que responden a las necesidades de las diversas aplicaciones, como la PCR convencional, anidada y en tiempo real, nos lleva a plantear la siguiente interrogante: ¿Qué método de extracción de ADN es adecuado para implementar técnicas de amplificación en cadena de la polimerasa en la identificación de arroz, soya y maíz?

III. JUSTIFICACIÓN

La agroindustria es un sistema complejo e integral en donde se buscan y aplican biotecnologías para enriquecer la producción o los nutrientes en alimentos de gran utilidad para el mercado. Esas aplicaciones biotecnológicas en algunos vegetales destinados al consumo despertaron el interés en este trabajo de graduación, donde se ensayaron técnicas moleculares para la detección de algunos genes o regiones del genoma de variedades vegetales.

Una de las etapas más críticas para emprender trabajos a nivel genómico o molecular es establecer metodologías que aseguren la calidad y rendimiento del ADN extraído, etapa que se vincula con el coaislamiento de polisacáridos y metabolitos secundarios, que a su vez puede verse afectado por la cantidad y estado físico del material de partida o la presencia de contaminantes en el tejido. Posteriormente, en la implementación las variantes de la PCR, además de tener un ADN de calidad, también deben reunirse una serie de requisitos como adecuados diseños de partidores y selección de los parámetros de las reacciones. Por lo anterior, en este trabajo se probaron la PCR convencional, anidada y qRT-PCR.

IV. HIPÓTESIS

La utilización de métodos de extracción de ADN adecuados permitirá la implementación de técnicas de amplificación en cadena de la polimerasa para la identificación de arroz, soya y maíz en tejidos vegetales.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Extraer ADN de calidad para implementar técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en la identificación de arroz, soya y maíz en tejidos vegetales.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer los requerimientos para extraer ADN en algunas variedades de arroz, soya y maíz.
- Evaluar la concentración y pureza del ADN extraído con diversos métodos de extracción.
- Identificar la especie vegetal, arroz, soya y maíz, mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa convencional y en tiempo real.

VI. COBERTURA

Este proyecto forma parte de las líneas investigativas del Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada de la Universidad Autónoma de Chiriquí. La misma contempló muestras de *Oryza sativa*, *Glycine max* y *Zea mays*, a partir de las cuales se obtuvo ADN para la identificación de genes. Algunas muestras fueron proporcionadas por el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.

VII. METODOLOGÍA

En la **Figura 2** se describe la metodología empleada para cumplir con los objetivos de este proyecto.

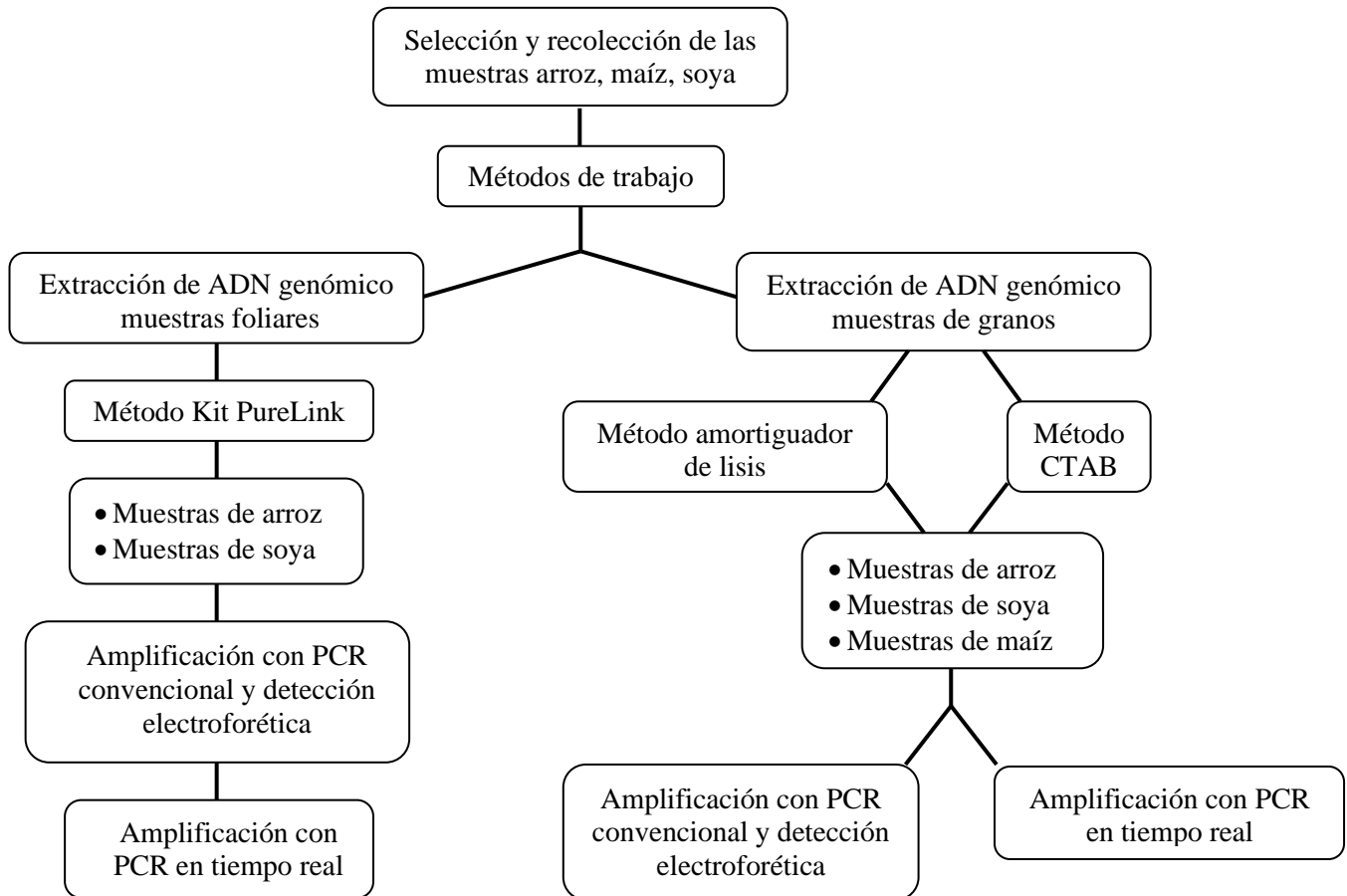


Figura 2. Esquema general experimental

7.1. Muestreo

Las muestras procesadas para la extracción de ADN de arroz y soya, provenían de tejido foliar producto de la germinación y materia vegetal procedente de la maceración de granos de arroz, soya y maíz. Se utilizó un muestreo aleatorio, en el cual cada elemento tuvo la misma probabilidad de ser elegido pues sus individuos se escogieron al azar.

7.2 Protocolos para extracción de ADN

7.2.1 Extracción de ADN con el PureLink® Plant Total DNA Purification Kit

En la extracción de ADN a partir de hojas obtenidas en plántones de arroz y soya se utilizó la metodología brindada por el Invitrogen™ Kit de purificación de ADN genómico vegetal PureLink™, esta se detalla en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Preparación para lisis de la hoja.

Pasos	Actividad
1.	Las muestras de hojas verdes se cortaron en trozos pequeños.
2.	Se adicionaron al tejido 250 µL de la solución amortiguadora de solución (R2) a temperatura ambiente y se homogenizó con un vórtex.
3.	Se añadieron 15 µL de SDS 20 % y 15 µL de RNasa A (20 mg/mL) al lisado.
4.	El lisado fue incubado a 55 °C durante 15 minutos para completar la lisis.
5.	Se centrifugó el lisado a 15,000 rpm durante 5 minutos para eliminar los materiales insolubles y se transfirió el sobrenadante transparente a un microtubo de 1.5 mL estéril, sin perturbar el sedimento.
6.	Se añadieron al lisado 100 µL de la solución amortiguadora para precipitación (N2) y se agitó e incubó en hielo durante 5 minutos, con el fin de precipitar las proteínas y polisacáridos junto con cualquier pigmento fotosintético unido a ellas.
7.	La centrifugación fue realizada a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente para producir un lisado claro.
8.	Se transfirieron 250 µL del lisado claro a un nuevo tubo y se añadieron 375 µL de Binding Buffer (B4) con etanol, luego se mezcló.

La unión de ADN a la membrana de sílice en la columna y el lavado de éste, para eliminar las impurezas mediante soluciones amortiguadoras se puntualiza en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Unión y lavado del ADN.

Unión del ADN	
Pasos	Actividades
1.	Se prepara el sistema para la captación del ADN en la columna, el cual, consiste en un tubo colector sobre el cual, se coloca la columna de sílice. La muestra de la etapa anterior se adiciona a la columna.
2.	Se centrifugó el tubo colector con la columna a 10,000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente, se desechó el filtrado y se rearmó el sistema para proceder con los lavados.

Lavado del ADN	
3.	Se añadieron 500 μ L de la solución amortiguadora de lavado (W4), se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente, se descarta filtrado y se colocó la columna de nuevo en el tubo colector.
4.	Se añadieron 500 μ L de la solución amortiguadora de lavado (W5) con etanol a la columna, se centrifugó el cartucho a 10,000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente, y se desechó filtrado producto del lavado.
5.	Se colocó la columna en el tubo colector y se repitió el paso anterior una vez más.
6.	Se centrifugó el sistema a velocidad máxima durante dos minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier solución residual W5, y finalmente se pasa la columna a un microtubo esterilizado y preferentemente libre de nucleasas.

Las actividades para la elución del ADN con solución amortiguadora de elución (E1) se numeran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Elución del ADN.

Pasos	Actividad
1.	Se añadieron 100 μ L de la solución amortiguadora para elución (E1). El tubo de elución contiene el ADN purificado.
2.	Se incubó a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó la columna dentro del microtubo a velocidad máxima durante un minuto.
3.	Se recuperó más ADN con una segunda etapa de elución usando 100 μ L de la solución E1 en el mismo tubo de elución.
4.	Se centrifugó la columna a temperatura ambiente a velocidad máxima por un minuto. La columna fue retirada y desechada.

Una vez aislado el ADN se utilizó los criterios descritos en la **Tabla 7** para determinar la concentración y grado de pureza aceptable del ADN purificado.

Tabla 7. Rendimiento y calidad del ADN.

Nota	Actividad
1.	La cuantificación de ADN se basa en la lectura de la absorbancia UV a 260 nm. La concentración de ADN se calcula utilizando la fórmula: $[\text{ADN}] = (\text{coeficiente de extinción}) (\text{Abs de la muestra}) (\text{longitud del paso óptico})$ $[\text{ADN}] = (50\mu\text{g/mLcm}) (A_{260}) (1 \text{ cm}) (\text{factor de dilución})$

7.2.2 Extracción de ADN con amortiguador de lisis y CTAB

En la extracción de ADN a partir de semillas de *Oryza sativa*, *Glycine max* y *Zea mays* se utilizaron dos métodos que solo difieren en un reactivo, el CTAB. El primero fue en ausencia de este al que se denominó amortiguador de lisis (**Tabla 9**), y el segundo en presencia de CTAB (**Tabla 10**). Los reactivos empleados en la modificación de la metodología propuesta por Muston, M. (2011) se detallan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Soluciones amortiguadoras para extracción de ADN.

Reactivo	Concentración	Solución A	Solución B
Tris - HCl	100 mM	0.8 g	0.8 g
NaCl	100 mM	0.3 g	0.3 g
EDTA	5 mM	1.5 g	1.5 g
CTAB	1 %	----	1.82 g
Agua	----	50 mL	50 mL

Tabla 9. Método con amortiguador de lisis.

Pasos	Actividades
1.	Se mezclaron dos gramos de semillas con nitrógeno líquido y se pulverizó.
2.	Se colocaron 100 mg de tejido pulverizado en un microtubo de 1,500 µL.
3.	Se adicionaron 500 µL de solución A (Tabla 8).
4.	Se incubó a 65 °C durante dos horas con agitaciones sucesivas por inversión.
5.	Se adicionaron 750 µL cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 24:1, se agitó por inversión y se dejó reposar cinco minutos aproximadamente.
6.	Se extrajeron 400 µL de la parte acuosa y se pasó a un micro tubo de 1,500 µL.
7.	Se repitieron los pasos 5 y 6.
8.	A la parte acuosa se adicionaron 500 µL de etanol frío al 100 % y 20 µL de acetato de sodio 3 M y se dejó precipitar toda la noche a -20 °C.
9.	Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos.
10.	Se identificó el precipitado dentro del tubo una vez centrifugado y se descartó el decantado y se lavó dos veces con etanol frío al 70 %.
11.	Se secó a 50 °C en un bloque de calentamiento.
12.	Se suspendió el precipitado con 100 µL de agua ultrapura y se homogenizó.
13.	Se cuantificó el ADN con un espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm.

Tabla 10. Método CTAB.

Pasos	Actividades
1.	Se mezcló dos gramos de semillas con nitrógeno líquido y se pulverizó.
2.	Se colocó 100 mg de tejido pulverizado en un microtubo de 1,500 µL.
3.	Se adicionó 500 µL de solución B (Tabla 8).
4.	Se incubó a 65 °C durante dos horas con agitaciones sucesivas por inversión.
5.	Se adicionaron 750 µL cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 24:1, se agitó por inversión y se dejó reposar cinco minutos aproximadamente.
6.	Se extrajeron 400 µL de la parte acuosa y se pasó a un micro tubo de 1,500 µL.
7.	Se repitieron los pasos 5 y 6.
8.	A la parte acuosa se adicionaron 500 µL de etanol frío al 100 % y 20 µL de acetato de sodio 3 M y se dejó precipitar toda la noche a -20 °C.
9.	Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos.
10.	Se identificó el precipitado dentro del tubo una vez centrifugado y se descartó el decantado y se lavó dos veces con etanol frío al 70 %.
11.	Se secó a 50 °C en un bloque de calentamiento.
12.	Se suspendió el precipitado con 100 µL de agua ultrapura y se homogenizó.
13.	Se cuantificó el ADN con un espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm.

7.3 Reacción en cadena de la polimerasa convencional y anidada

Para la amplificación del ADN se utilizó un termociclador Applied Biosystems y se preparó una mezcla de reacción con un volumen total 12.5 µL siguiendo el procedimiento descrito en la **Tabla 11**. En la **Tabla 13** se describen las características de los diferentes partidores empleados.

Tabla 11. Proceso de amplificación.

Pasos	Actividades
1.	Se preparó un tubo para PCR de 200 µL.
2.	Añadiendo 1 µL de la solución de ADN a dicho tubo.
3.	La mezcla fue preparada como se indica en el Tabla 12 .
4.	Se agitó suavemente la mezcla por pipeteado y se centrifugó brevemente.
5.	Los tubos de reacción de PCR se colocaron en el termociclador.
6.	El termociclador se programó como se indica en el esquema de la Figura 3 .

Tabla 12. Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa convencional.

PCR convencional	
Reactivo	Concentración
MgCl ₂	1 μL
dNTP	1 μL
buffer	1.25 μL
partidor forward	1 μL
partidor reverse	1 μL
agua libre de nucleasa	7 μL
ADN polimerasa Taq	0.25 μL

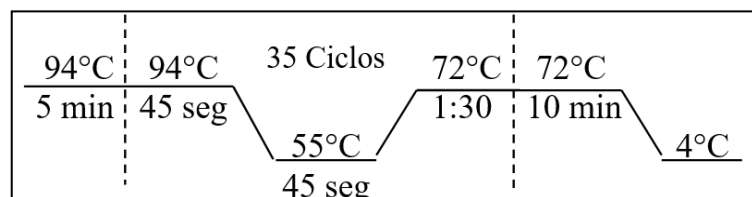


Figura 3. Diseño general de la programación para PCR.

Tabla 13. Partidores para reacción en cadena de la polimerasa.

Partidor (Forward/Reverse)	Tamaño del producto (pb)	T _m (°C)	Gen o región del genoma	Fuente o diseño
FW _x /RW _x	100-125	45/50	W _x de arroz	Chen y Cols. 2006
FRM1/RRM2	100-200	53/49	SSR cromosomal en arroz	Ahmadikhah, A. 2009
FR171/RR171	350	52/55	SSR cromosomal en arroz	Ahmadikhah, A. 2009
FGMO3/RGMO4	118	63/58	Lectina en soya	Meyer y Cols. 1996
F49/R49	500	59/60	Lectina en soya	CIBQUIA, JRGM
FZe1/RZe1	250	56/56	Zeína en maíz	CIBQUIA, JRGM

Posteriormente, la caracterización del ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa para el amplicón producido por la reacción en cadena de la polimerasa. La preparación del amortiguador TAE 10X y las actividades realizadas para la determinación electroforética se localizan en la **Tabla 14** y **Tabla 15**, respectivamente.

Tabla 14. Preparación de amortiguador TAE 10X.

TAE 10X	Cf (1X)	1 L
Tris	40 mM	48.4 g
Ácido acético	-----	11.42 mL
Na ₂ EDTA	2 mM	7.44 g
dH ₂ O	-----	Cbp 1 L

Tabla 15. Determinación electroforética de ADN.

Pasos	Actividades
1.	El molde para electroforesis fue sellado utilizando cinta adhesiva.
2.	Se colocó el peine para formar los pocillos.
3.	La cubeta de electroforesis fue llenada con 2 L de amortiguador TAE 1X.
4.	Se mezcló 2.5 g de agarosa en polvo con 250 mL de amortiguador TAE 1X.
5.	La mezcla fue calentada en un horno microondas por tres minutos.
6.	La mezcla se deja enfriar para añadir 10 µL de bromuro de etidio.
7.	La solución fue esparcida en el molde hasta que tomó consistencia de gel.
8.	Se retiró cuidadosamente el peine y la cinta adhesiva.
9.	El molde fue colocado en la cubeta de electroforesis y se añadió 1.75 L de TAE 1X cubriendo totalmente.
10.	Se cargó 5 µL del marcador seleccionado en el primer pocillo y seguidamente 10 µL de la muestra en el pocillo sucesivo.
11.	La tapa de la cubeta para electroforesis fue cerrada.
12.	Se conectó los cables eléctricos a una tensión de 80 V durante 180 minutos.
13.	El cable de corriente fue desconectado, los cables y la tapa de la cubeta retirados.
14.	Se introdujo el gel en un ultra iluminador y se fotografió.

7.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se implementó la técnica qRT-PCR para algunas muestras de arroz, soya y maíz. El equipo utilizando fue el modelo de Applied Biosystems StepOne™. Cada muestra para la reacción se preparó una mezcla como se detallada en el **Tabla 16** para 2 µL de ADN y un volumen total de 20 µL; el proceso para la amplificación se detalla en la **Tabla 17**.

Tabla 16. Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

PCR en tiempo real	
Reactivo	Concentración
partidor forward	1 μ L
partidor reverse	1 μ L
muestra	2 μ L
master mix (Sybr Green)	10 μ L
H ₂ O	6 μ L

Tabla 17. Proceso de amplificación qRT-PCR.

Pasos	Actividades
1.	La placa de reacción fue colocada sobre la base de soporte sin salpicaduras.
2.	Se pipeteó las muestras en los pocillos.
3.	Los tubos fueron tapados con la cubierta de la placa MicroAmp.
4.	Se escogió las opciones quantum standard curve y Syber Green.

7.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianzas, análisis de medianas y pruebas de comparación múltiple con el software estadístico Statgraphics Centurion XVIII.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Extracciones de ADN

8.1.1 Extracción de ADN en las muestras foliares utilizando Kit

La cuantificación del ADN extraído a partir de hojas frescas de cinco variedades de arroz y diecinueve variedades de soya utilizando el Kit PureLink se muestra en la **Tabla 18**. Los valores promedios de rendimiento y calidad de ADN fueron, respectivamente, para arroz, 8.62 ng/ μ L y 1.44, y para soya, 20.27 ng/ μ L y 1.82, ambos resultados aceptables en términos de concentración. Respecto a la pureza para el ADN de arroz, el valor promedio está por debajo de 1.8 a diferencia del sorgo que muestra un valor superior indicando una pureza optima.

El rendimiento obtenido con el kit depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, es recomendable para tejido vegetal duro o fibroso, aplicarle nitrógeno líquido y molerlo hasta convertirlo en polvo. El uso de este método comercial o kits reduce el número de pasos en la extracción y el tiempo, sin embargo, la cantidad de muestras extraídas pueden limitarse por otros factores como los económicos, para las condiciones de nuestro país, al cual, se deben importar todos estos productos. Comparado con Estados Unidos, donde se tiene acceso a los kits a costos más bajos, la extracción de cada muestra (sin duplicado o triplicado) tendría un precio de cinco dólares, mientras que en nuestro país el costo por muestra, se puede duplicar o hasta triplicar, debido a que las empresas venden estas herramientas a altos montos. Igualmente, el tema de costo de los kits, cuando se requiere de extracciones de muchas muestras ha sido objeto de debate en otros trabajos previamente, por lo que se han presentados métodos modificados, como los que utilizan CTAB u otros, como alternativas (Chen, et. al., 2006, Ahmadikhah, A., 2009; Aboul - Maaty, N., and Oraby, H., 2019). Por lo anterior, en este trabajo se probaron también, otros métodos de extracción, entre ellos el método CTAB y un método modificado de CTAB, al que denominamos “*amortiguador de lisis*”. Con el propósito de presentar alternativas en un paso que resulta crucial, al momento de implementar trabajos con ADN, el cual es la extracción de esta macromolécula con la calidad y cantidades aceptables.

Tabla 18. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de arroz y soya por el método Kit PureLink.

Muestra	ID	λ (260 nm)	λ (280 nm)	[ng/μL]	λ (260/280) nm
Arroz	A 01	0.215	0.172	10.75	1.25
	A 02	0.177	0.110	8.85	1.61
	A 03	0.095	0.073	4.75	1.30
	A 04	0.024	0.039	1.20	0.62
	A 05	0.054	0.028	2.70	1.93
	A 06*	0.200	0.120	10.00	1.67
	A 07*	0.442	0.259	22.10	1.71
Soya	SJ 01	0.668	0.425	33.40	1.57
	SJ 03	0.692	0.455	34.60	1.52
	SJ 04	0.484	0.278	24.20	1.74
	SJ 06	0.337	0.176	16.85	1.91
	SJ 07	0.271	0.136	13.55	1.99
	SJ 08	0.568	0.326	28.40	1.74
	SJ 10	0.551	0.252	27.55	2.19
	SJ 11	0.451	0.270	22.55	1.67
	SJ 12	0.192	0.099	9.60	1.94
	SJ 13	0.392	0.215	19.60	1.82
	SJ 15	0.714	0.448	35.70	1.59
	SJ 16	0.429	0.300	21.45	1.43
	SJ 17	0.272	0.132	13.60	2.06
	SJ 18	0.174	0.084	8.70	2.07
	SJ 20	0.201	0.089	10.05	2.26
	SJ 21	0.584	0.437	29.20	1.34
	SJ 22	0.217	0.107	10.85	2.03
SJ 23	0.254	0.130	12.70	1.95	
SJ 24	0.250	0.144	12.50	1.74	

*Muestras seleccionadas para PCR

8.1.2 Extracción de ADN en las muestras de granos con el método de CTAB y el método buffer de lisis.

Para ambos métodos utilizados en la extracción de ADN de granos, método de CTAB y método buffer de lisis, se utilizó nitrógeno líquido para el maceramiento de las muestras. Este paso se realiza para asegurar la ruptura de la pared celular, a bajas temperaturas, lo cual, mantienen inactivas las enzimas celulares y otras sustancias químicas no deseadas y además reduce la fragmentación y el daño del ADN. La selección del uso de nitrógeno líquido resultó una acertada selección, para esta etapa, y es respaldada por trabajos como los realizados por Aboul-Maaty y Oraby (2019), donde presentan resultados de extracciones a partir de múltiples granos incluyendo los seleccionados para esta tesis. Los referidos autores establecen que el uso de nitrógeno líquido en este procedimiento garantiza una gran reproducibilidad a diferencia de otros métodos de lisis basados en enzimas.

El método para la extracción de ADN con “*amortiguador de lisis*” se llevó a cabo por cuadruplicado para cinco variedades en granos de soya, seis de arroz y siete de maíz. Su cuantificación se describe en las **Tablas 19, 20 y 21**. Los valores muestran una alta concentración de ADN útil para análisis PCR, sin embargo, se registra una baja calidad específicamente para las muestras de soya, esto podría deberse a la alta variedad de metabolitos secundarios y polisacáridos (Demeke y Jenkins, 2009) que presentan los granos de este vegetal; este contenido de sacarosa, fructosa, rufinosa y estaquiosa (De Luna - Jiménez, 2007) que aumenta dependiendo de algunas variedades (Zhang et al., 2017), pueden no ser eliminados por completo durante el proceso de aislamiento. Es sumamente importante determinar la pureza del ADN, pues la presencia de contaminantes afecta la acción de las enzimas durante la reacción en cadena de la polimerasa.

Múltiples factores pueden afectar la integridad del ADN durante este proceso de extracción desde la fragmentación del ADN por el calor que genera la fricción hasta la falta de pericia en el procesamiento de las muestras (Demeke & Jenkins, 2009).

Tabla 19. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de soya por el método amortiguador de lisis.

Variedad de soya	ID	λ (260 nm)	λ (280 nm)	[ng/μL]	(260 nm / 280 nm)
1	1.1.A	2.119	1.415	41.50	1.50
	1.2.A	2.142	1.459	41.95	1.47
	1.3.A	2.108	1.419	41.08	1.49
	1.4.A	1.032	0.679	19.03	1.52
2	2.1.A	2.311	1.525	37.38	1.52
	2.2.A*	2.282	1.554	33.45	1.47
	2.3.A	2.184	1.476	33.93	1.48
	2.4.A	1.971	1.253	33.35	1.57
3	3.1.A*	2.740	1.736	58.30	1.58
	3.2.A	2.256	1.694	41.95	1.33
	3.3.A	2.322	1.639	45.05	1.42
	3.4.A	2.195	1.438	42.43	1.53
4	4.1.A	2.261	2.334	23.48	0.97
	4.2.A	0.630	0.495	9.70	1.27
	4.3.A	1.940	1.310	35.85	1.48
	4.4.A	2.571	1.993	47.48	1.29
5	5.1.A	2.597	1.676	48.53	1.55
	5.2.A	2.353	1.677	41.93	1.40
	5.3.A*	2.307	1.535	45.55	1.50
	5.4.A	2.562	2.244	44.88	1.14

*Muestras seleccionadas para PCR

Tabla 20. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de arroz por el método amortiguador de lisis.

Variedad de arroz	ID	λ (260 nm)	λ (280 nm)	[ng/μL]	(260 nm / 280 nm)
6	6.1.A*	1.379	0.767	28.00	1.80
	6.2.A	1.163	0.613	25.40	1.90
	6.3.A	1.040	0.586	21.85	1.77
	6.4.A	1.330	0.703	29.03	1.89
7	7.1.A	1.099	0.582	23.33	1.89
	7.2.A*	1.378	0.763	28.83	1.81
	7.3.A	1.111	0.632	22.85	1.76
	7.4.A	1.280	0.678	27.93	1.89
8	8.1.A	1.705	0.968	35.35	1.76
	8.2.A	1.559	0.843	34.05	1.85
	8.3.A	1.202	0.651	27.18	1.85
	8.4.A	1.649	0.933	34.33	1.77
9	9.1.A	1.987	0.999	41.80	1.99
	9.2.A	2.037	1.273	40.23	1.60
	9.3.A	1.651	0.941	34.60	1.75
	9.4.A	1.702	0.990	35.08	1.72
10	10.1.A	2.666	1.563	55.20	1.71
	10.2.A	1.575	0.882	33.15	1.79
	10.3.A*	2.450	1.346	54.40	1.82
	10.4.A	1.226	0.646	27.38	1.90
18	18.1.A*	1.561	0.848	33.93	1.84
	18.2.A	1.209	0.690	25.98	1.75
	18.3.A	0.892	0.490	20.20	1.82
	18.4.A	2.377	1.369	51.10	1.74

*Muestras seleccionadas para PCR

Tabla 21. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de maíz por el método amortiguador de lisis.

Variedad de maíz	ID	λ (260 nm)	λ (280 nm)	[ng/μL]	(260 nm / 280 nm)
11	11.1.A	1.650	0.956	34.43	1.73
	11.2.A	1.930	1.137	39.13	1.70
	11.3.A	1.870	1.084	40.25	1.73
	11.4.A*	2.192	1.251	48.23	1.75
12	12.1.A*	1.678	0.983	36.43	1.71
	12.2.A	1.258	0.725	25.98	1.74
	12.3.A	0.897	0.536	18.43	1.67
	12.4.A	1.150	0.681	23.53	1.69
13	13.1.A	0.546	0.319	11.50	1.71
	13.2.A	0.712	0.456	13.03	1.56
	13.3.A	1.114	0.685	21.83	1.63
	13.4.A*	1.677	0.934	35.55	1.80
14	14.1.A*	1.501	0.819	30.53	1.83
	14.2.A	1.203	0.682	24.43	1.76
	14.3.A*	1.973	1.147	39.85	1.72
	14.4.A	1.304	0.827	23.60	1.58
15	15.1.A	0.952	0.561	20.40	1.70
	15.2.A*	1.432	0.846	29.70	1.69
	15.3.A	0.997	0.613	19.88	1.63
	15.4.A	1.781	1.113	33.38	1.60
16	16.1.A	0.749	0.434	15.48	1.73
	16.2.A	0.740	0.470	14.68	1.57
	16.3.A	1.004	0.645	18.73	1.56
	16.4.A*	1.396	0.894	25.30	1.56
17	17.1.A*	1.160	0.669	23.35	1.73
	17.2.A	0.937	0.537	18.78	1.74
	17.3.A	0.686	0.410	14.10	1.67
	17.4.A	0.755	0.448	15.30	1.69

*Muestras seleccionadas para PCR

La extracción con el método CTAB también se realizó por cuadruplicado para cinco variedades de soya, seis de arroz y siete variedades de maíz, los detalles de la cuantificación se puntualizan en las **Tablas 22, 23 y 24**.

En tanto, que los métodos CTAB y amortiguador de lisis son más económicos y producen alto rendimiento, también son vulnerables a variaciones debido a los múltiples pasos del procedimiento. Cabe resaltar, que en la actualidad el método CTAB, es ampliamente promovido dentro de ensayos que procesan un alto número de muestras, debido a que permite obtener ADN de alta calidad eliminando los inhibidores que afectan la PCR; además de ser un protocolo fácil de estandarizar.

Tabla 22. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de soya por el método CTAB.

Variedad de soya	ID	λ (260 nm)	λ (280 nm)	[ng/ μ L]	(260 nm / 280 nm)
1	1.1.B*	2.165	1.228	43.00	1.76
	1.2.B	2.176	1.512	36.83	1.44
	1.3.B	2.006	1.262	38.00	1.59
	1.4.B	2.261	1.524	41.90	1.48
2	2.1.B	2.667	2.021	47.78	1.32
	2.2.B	2.420	1.758	40.70	1.38
	2.3.B	2.295	1.556	42.23	1.47
	2.4.B	2.145	1.400	44.25	1.53
3	3.1.B	2.749	2.018	46.18	1.36
	3.2.B	1.864	1.171	36.13	1.59
	3.3.B	2.570	1.752	47.48	1.47
	3.4.B	1.931	1.314	37.15	1.47
4	4.1.B	2.277	1.505	43.38	1.51
	4.2.B*	2.719	1.658	57.65	1.64
	4.3.B	2.156	1.468	37.50	1.47
	4.4.B	3.523	3.230	59.73	1.09
5	5.1.B	1.028	0.579	15.23	1.78
	5.2.B	1.078	0.556	16.63	1.94
	5.3.B	1.543	1.182	23.48	1.31
	5.4.B	1.234	0.772	19.48	1.60

*Muestras seleccionadas para PCR

Tabla 23. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de arroz por el método CTAB.

Variedad de arroz	ID	λ (260 nm)	λ (280 nm)	[ng/μL]	(260 nm / 280 nm)
6	6.1.B	0.545	0.330	17.65	1.65
	6.2.B	0.243	0.147	7.10	1.65
	6.3.B	0.359	0.233	12.50	1.54
	6.4.B	0.661	0.434	19.90	1.52
7	7.1.B	0.462	0.253	16.90	1.83
	7.2.B	0.749	0.354	25.85	2.12
	7.3.B	0.377	0.220	13.65	1.71
	7.4.B	0.508	0.367	14.90	1.38
8	8.1.B	0.697	0.334	22.60	2.09
	8.2.B	0.749	0.347	27.55	2.16
	8.3.B	0.354	0.093	12.35	3.81
	8.4.B	0.605	0.218	22.85	2.78
9	9.1.B	0.726	0.527	19.15	1.38
	9.2.B	0.566	0.427	12.70	1.33
	9.3.B	0.274	0.131	11.05	2.09
	9.4.B	0.276	0.138	10.15	2.00
10	10.1.B	0.336	0.209	10.65	1.61
	10.2.B	0.289	0.162	8.70	1.78
	10.3.B	0.205	0.112	6.60	1.83
	10.4.B	0.418	0.246	12.80	1.70
18	18.1.B	0.935	0.432	35.10	2.16
	18.2.B	0.631	0.229	25.55	2.76
	18.3.B	0.141	0.065	5.25	2.17
	18.4.B	0.298	0.240	9.30	1.24

Tabla 24. Concentración de ADN y pureza obtenida en variedades de maíz por el método CTAB.

Variedad de maíz	ID	λ (260 nm)	λ (280 nm)	[ng/μL]	(260 nm / 280 nm)
11	11.1.B	0.378	0.240	28	1.80
	11.2.B	0.670	0.526	25.4	1.90
	11.3.B	0.734	0.470	21.85	1.77
	11.4.B	1.172	0.719	29.03	1.89
12	12.1.B	0.291	0.166	23.33	1.89
	12.2.B	0.562	0.334	28.83	1.81
	12.3.B	0.406	0.257	22.85	1.76
	12.4.B	0.520	0.336	27.93	1.89
13	13.1.B	0.696	0.381	35.35	1.76
	13.2.B	0.460	0.221	34.05	1.85
	13.3.B	0.241	0.161	27.18	1.85
	13.4.B	0.311	0.201	34.33	1.77
14	14.1.B	0.546	0.337	41.8	1.99
	14.2.B	1.045	0.651	40.23	1.60
	14.3.B	0.303	0.255	34.6	1.75
	14.4.B	0.597	0.395	35.08	1.72
15	15.1.B	0.365	0.194	12.00	1.88
	15.2.B	1.182	0.681	41.50	1.74
	15.3.B	0.630	0.353	21.65	1.78
	15.4.B	0.885	0.475	31.55	1.86
16	16.1.B	0.823	0.367	33.30	2.24
	16.2.B	0.715	0.374	26.00	1.91
	16.3.B	0.330	0.214	10.20	1.54
	16.4.B	0.355	0.135	14.40	2.63
17	17.1.B	0.123	0.083	3.15	1.48
	17.2.B	1.146	0.826	40.05	1.39
	17.3.B	0.253	0.163	7.35	1.55
	17.4.B	0.017	0.014	0.05	1.21

8.1.2.1 Efecto del proceso de extracción y del tipo de grano en la concentración de ADN

Para determinar el efecto del proceso de extracción y del tipo de grano en la concentración de ADN, se realizó un ANOVA de dos vías. Se encontró que existieron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95.0 % ($p < 0.05$) para la concentración de ADN obtenida a través de los dos procesos de extracción y el tipo de grano (**Tabla 25**). Para determinar la media significativamente diferente entre los granos a un nivel de confianza del 95.0 %, aplicamos la prueba de Bonferroni para cada método de extracción. En el caso del método de extracción CTAB, la concentración de ADN en los granos de soya fue significativamente diferente de la concentración de ADN en los granos de maíz y arroz; mientras que los granos de maíz y arroz, no presentaron diferencias significativas en la concentración de ADN (**Figura 4**). Con respecto, al método de extracción con amortiguador de lisis, la concentración de ADN para los granos de maíz fue significativamente diferente de los otros granos; mientras que los granos de soya y arroz, no presentaron diferencias significativas en la concentración de ADN (**Figura 5**).

Tabla 25. Análisis de varianza para los valores de la concentración de ADN obtenida.

	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos Principales	A: Grano	6.94E3	2	3.47E3	32.24	0.0000
	B: Proceso de extracción	2.18E3	1	2.18E3	20.24	0.0000
Interacciones	AB	1.71E3	2	857.	7.96	0.0005

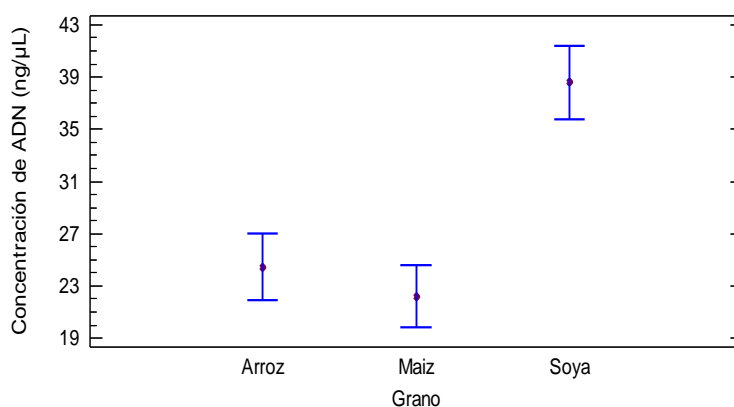


Figura 4. Media de la concentración de ADN e intervalo de Bonferroni al 95% de confianza para la extracción con CTAB.

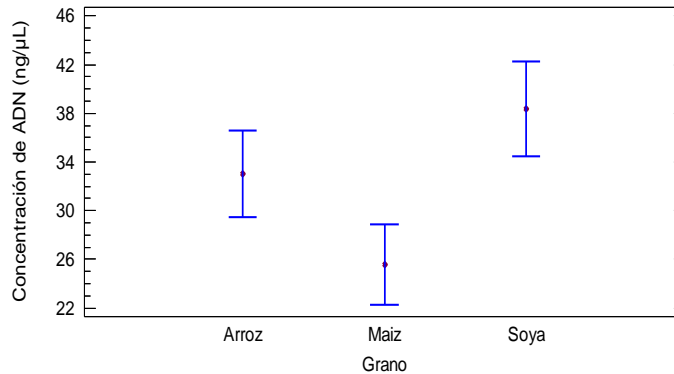


Figura 5. Media de la concentración de ADN e intervalo de Bonferroni al 95 % de confianza para la extracción con amortiguador de lisis.

8.1.2.2 Efecto de la variedad del grano en la concentración de ADN

Para determinar el efecto de la variedad del grano en la concentración de ADN para cada método de extracción, se realizaron distintas pruebas como: ANOVA simple, comparación múltiple y análisis de mediana Kruskal Wallis (**Tabla 26**). Se evaluaron seis variedades de arroz, siete variedades de maíz y cinco variedades de soya. Las cuales fueron codificadas como se muestra en la Figura 6 y 7. Se encontró que existen diferencias significativas a un nivel de confianza del 95.0 % en la concentración de ADN obtenida por el método de extracción con amortiguador de lisis en la variedad de maíz 1 con respecto a la variedad 3, 6 y 7 (Tabla 26, **Figura 6**). En el método de extracción CTAB la variedad de soya 5 es significativamente diferente de las otras a un nivel de confianza del 95.0 % (Tabla 26, **Figura 7**).

Tabla 26. Efecto de las variedades dentro de cada grano en la concentración de ADN.

Método de extracción	Fuente	Prueba	Valor-P	Diferencias significativas
Amortiguador de lisis	Variedades de soya	ANOVA	0.0903	No hay
	Variedades de arroz	Kruskal-Wallis	0.0662	No hay
	Variedades de maíz	ANOVA	0.0027	Si hay
Tukey			Variedad 1 es distinta de la variedad 3, 6 y 7	
CTAB	Variedades de soya	Kruskal-Wallis	0.0241	Si hay
		Diagrama de caja y bigotes, Bonferroni		Variedad 5 es distinta de las otras
	Variedades de arroz	ANOVA	0.2938	No hay
	Variedades de maíz	ANOVA	0.500	No hay

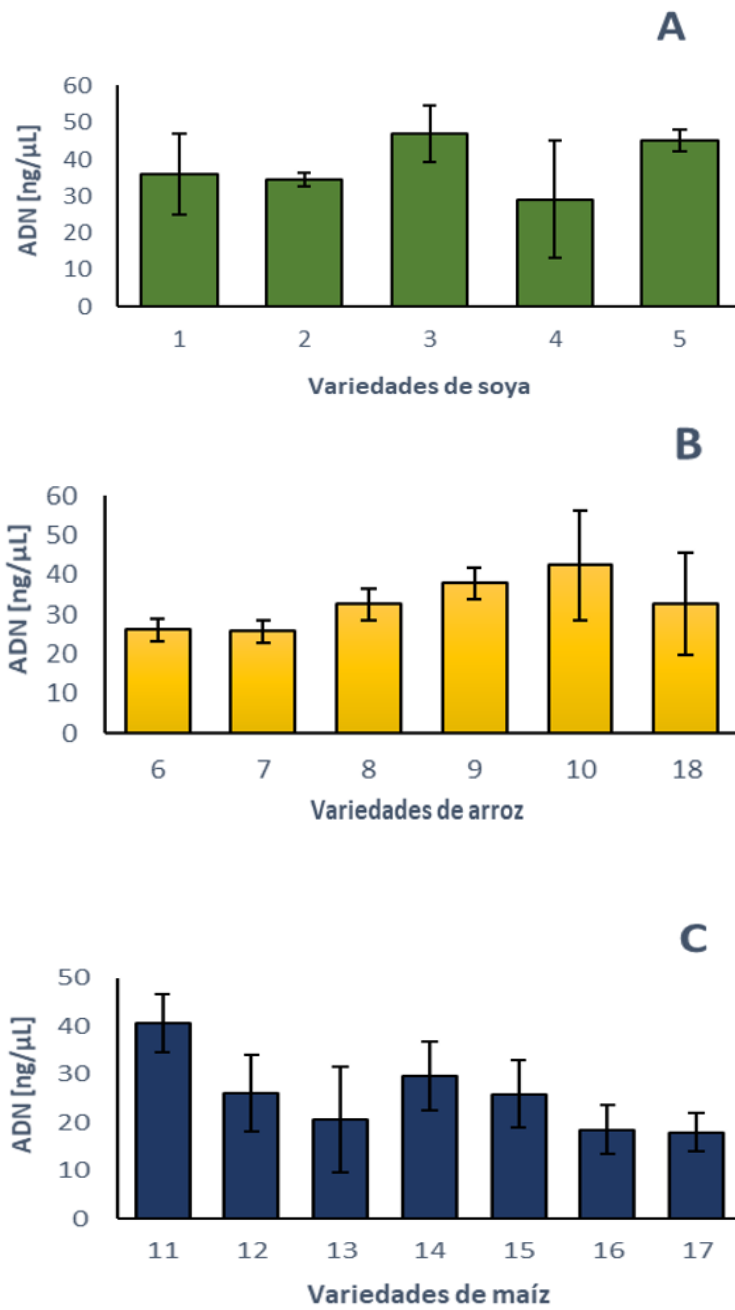


Figura 6. Concentración de ADN obtenida por el método extracción con amortiguador de lisis. A, B y C. Variedades de soya, arroz y maíz respectivamente.

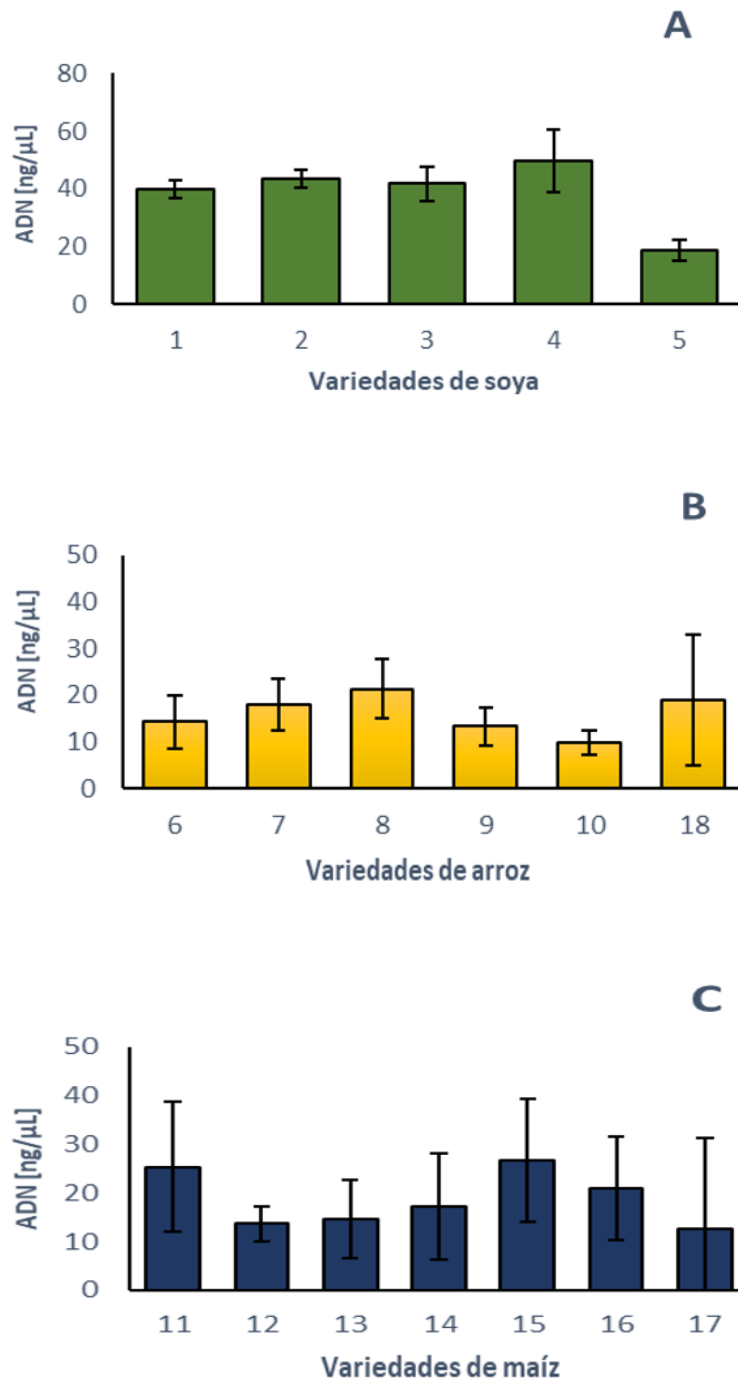


Figura 7. Concentración de ADN obtenida por el método extracción con CTAB. A, B y C. Variedades de soya, arroz y maíz respectivamente.

8.1.2.3 Efecto del método de extracción en la pureza del ADN

De acuerdo a los resultados obtenidos la pureza de ADN depende significativamente del método de extracción empleado ($p < 0.05$) a un nivel de significancia del 95.0 % de acuerdo a la Prueba de Chi cuadrado (**Tabla 27**). Para las muestras de maíz y arroz el método lisis permite la obtención de un ADN con mayor pureza. Mientras que para la muestra de soya se obtiene ADN de mayor pureza usando el método CTAB.

Tabla 27. Datos de frecuencia de ADN con el método amortiguador de lisis y CTAB.

Grano	Pureza	Amortiguador de lisis	CTAB	X ² - Valor de P
Soya	Alta	0	7	0.0125
	Baja	20	13	
Arroz	Alta	24	18	0.0291
	Baja	0	6	
Maíz	Alta	28	15	0.0001
	Baja	0	13	

Nota: Se aplicó la corrección de Yates

8.2 Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para la identificación de soya, arroz y maíz

Obtenido el material genético y seleccionado con calidad y cantidad adecuadas, el siguiente paso fue determinar si podría emplearse para algunos trabajos como amplificaciones por PCR en alguna de sus modalidades.

Dentro de las aplicaciones de la PCR se encuentra la identificación o autenticación de materia prima o componentes de productos, y específicamente una de ellas es la identificación de especies vegetales, como las seleccionadas para este estudio que incluyen soya, arroz y maíz. El principio de la identificación consiste en utilizar partidores dirigidos a zonas exclusivas de cada especie, como lo son el gen que codifica la proteína lectina de la soya, el gen Wx o el sitio SSR de un cromosoma en el arroz, y el gen que codifica la proteína zeína en el maíz. Para estos fines partidores específicos fueron diseñados para amplificar fragmentos de las zonas genómicas antes mencionadas utilizando como molde de ADN extraído de soya, arroz y maíz.

En la **Figura 8** se registra la amplificación mediante una PCR convencional para el ADN de la especie *O. sativa* extraído mediante el Kit PureLink, con el propósito de determinar esta especie vegetal se utilizaron partidores para comprobar la presencia de los genes Wx y SSR cromosomal. Con la ayuda del Ladder DNA Marker (100-3000 bp) de Axygen se logran observar los productos de amplificación de aproximadamente a 100 y 350 pb, correspondientes a los tamaños esperados (**Tabla 13**). Los controles negativos se basan en utilizar ADN de otro vegetal y un par de partidores con la secuencia replicante para otra especie vegetal.

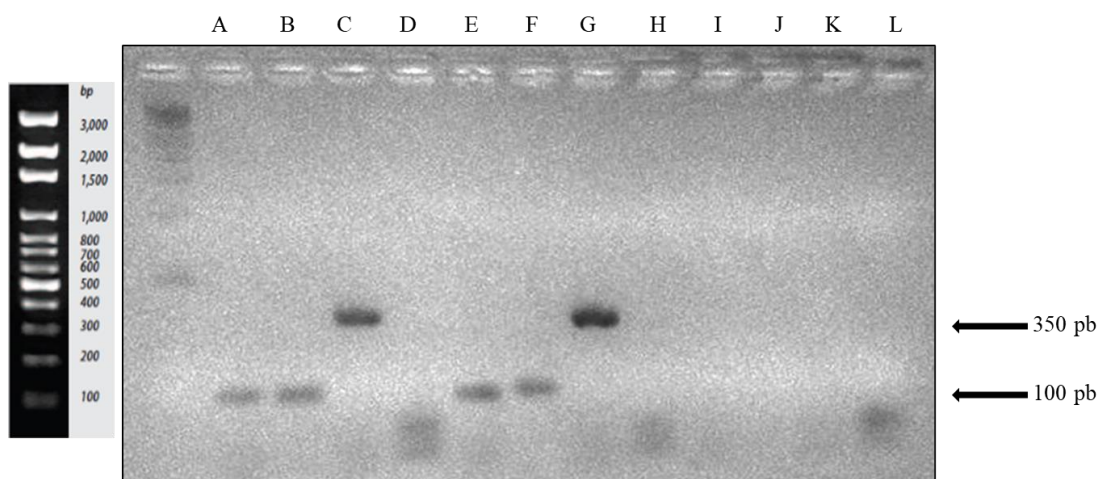


Figura 8. Determinación de especie vegetal (arroz). Los carriles A y E contienen muestras de ADN de arroz y partidores para el gen Wx. Los carriles B y F son muestras de ADN de arroz y partidores RM1 para la identificación de la región SSR cromosomal. Los carriles C y G son muestras de ADN de arroz y partidores R171 para la identificación de la región SSR cromosomal. Los controles negativos se ubican en los carriles D, H, I, J, K, L.

Productos de la amplificación empleando una PCR convencional para el ADN extraído con el Kit PureLink a partir de hojas de arroz y con el método amortiguador de lisis a partir de granos de maíz se ilustran en la **Figura 9**, se aplicó el marcador 100 bp DNA Ladder (100-3000 bp) de DNALand Scientific.

La determinación genética se da utilizando partidores para los genes Wx y SSR cromosomal del arroz, y el gen zeína en el maíz; para la cual se obtienen los productos esperados a 100, 350 y 250 pb, respectivamente. Sin embargo, en el carril G no se obtiene la amplificación que corresponde, reacción en la que utilizamos partidores elaborados con un año de anterioridad, es recomendable para evitar la falta de homogeneidad en la mezcla para PCR utilizar un agitador, pues el congelar y descongelar se cambia las concentraciones de los reactivos o bien forma gradientes dentro de los tubos.

Los resultados de las pruebas de PCR (Figuras 8 y 9) mostraron que el material extraído, es funcional para trabajos como la identificación de especies vegetales utilizando partidores específicos.

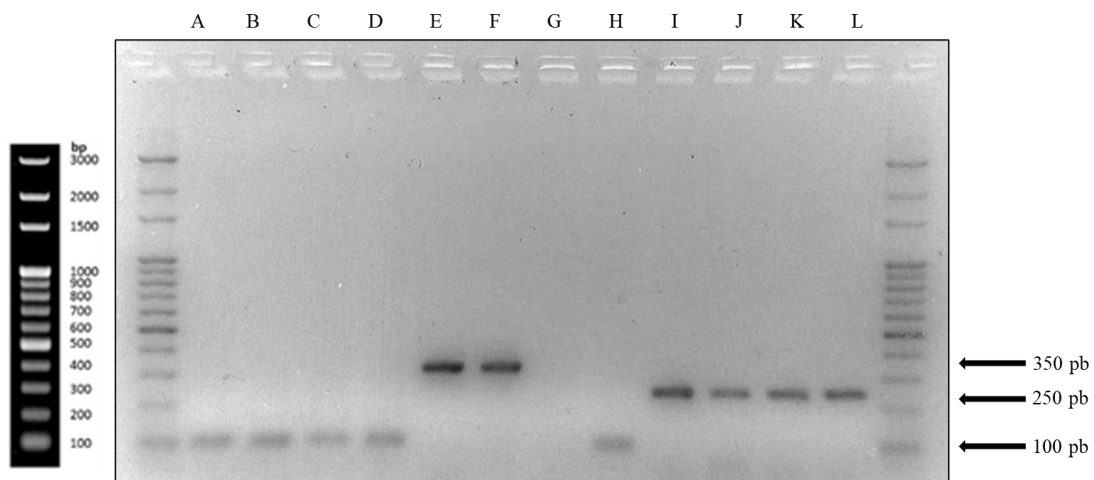


Figura 9. Determinación de especies vegetales (arroz y maíz). Los carriles A y B contienen muestras de ADN de arroz y partidores para el gen Wx. Los carriles C y D con muestras de ADN de arroz y partidores RM1 para la identificación de la región SSR cromosomal. Los carriles E y F son muestras del ADN de arroz y partidores R171 para la identificación de la región SSR cromosomal. Los carriles G y H con ADN de arroz y con partidores para el gen Wx preparados un año atrás. Los carriles I, J, K y L para muestras de maíz y partidores para el gen zeína, en estos dos últimos carriles el par de partidores también contaban con un año de antigüedad.

Dentro de la aplicación de la PCR para la identificación de genes, hay muchos usos, uno de ellos es la identificación de elementos transgénicos, por lo que se incluyó un ensayo donde se buscó identificar la presencia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), uno de los genes más comunes presente en plantas genéticamente modificadas. Para esto se aprovechó la amplificación resultante de una PCR anidada en las tres matrices y como marcador de peso molecular se recurrió al Perfect DNA™ Ladder (500-10000 bp) de Invitrogen (**Figura 10**). De los resultados obtenidos se puede observar claramente que las muestras K y L amplifican un fragmento de aproximadamente 200 pb, lo cual, corresponde al tamaño que se obtendría con el par de partidores específico para amplificar una región del elemento transgénico del promotor 35S. Cabe destacar que por los tamaños que se esperaban obtener, el marcador de 1 Kb (Perfect DNA™ Ladder-Invitrogen) no es el mejor a utilizar, no obstante, al momento de realizar el experimento el marcador de 100 pb no se encontraba disponible. Con este experimento se muestra que el ADN obtenido mediante la metodología aplicada, es apto para pruebas por PCR convencional y su variante anidada.

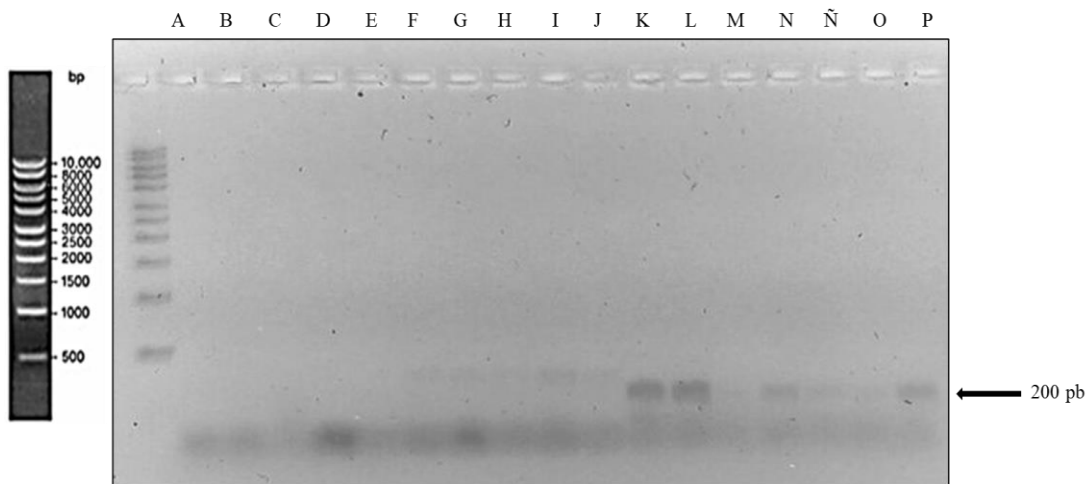


Figura 10. Determinación del Promotor 35S en especies vegetales (soya, arroz y maíz). Los carriles A, B, C, D y E contienen muestras de ADN de soya. Los carriles F, G, H, I y J con muestras de ADN de arroz. Los carriles K, L, M, N, Ñ, O y P para las muestras de ADN de maíz. Todos con partidores del Promotor 35 S.

8.3. Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la identificación de soya, arroz y maíz.

La PCR en tiempo real se utilizó con su variante de “Fusión de alta resolución” (HRM por sus siglas en inglés de High Resolution Melting), esta consiste en que, una vez realizada la amplificación de los productos por PCR en tiempo real, a los productos obtenidos se les aumenta gradualmente la temperatura hasta que alcancen su desnaturalización. En los ensayos realizados se utilizó el agente fluorescente SYBR GREEN el cual, al producirse la síntesis de la doble hebra de ADN, se intercala entre las hebras de ADN y durante el proceso de desnaturalización se registra la pérdida de fluorescencia cada 0.3 °C, como resultado se obtiene una curva que posee un punto de inflexión, que al sacarle la derivada genera un pico, el cual, coincide con el punto de fusión (T_m) del producto sintetizado. En este punto el resultado indica la presencia del elemento para el cual, fueron diseñados los partidores, en otras palabras, si hay amplificación, con el análisis de HRM se deberá obtener un pico que coincide con la T_m del amplicón. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a la primera derivada del proceso de decaimiento de la fluorescencia conocidos como curvas de fusión (en el idioma inglés “melt curve”).

En esta sección experimental se presentan los resultados de dos grupos de ensayos, en primera instancia para muestras puras de ADN obtenidas de soya, maíz y arroz con sus respectivos partidores específicos y en segunda instancia resultados de ensayos aplicados a mezclas de ADN, para identificar las especies vegetales.

En la **Figura 11** se registra el resultado de la PCR en tiempo real con la respectiva curva de fusión para el ADN de arroz extraído con amortiguador de lisis utilizando los partidores F/R W_x. Se puede observar un único pico que corresponde a la temperatura de fusión del amplicón que es de 77.66 °C. El resultado nos ofrece una muestra de lo que se debe esperar en una identificación positiva basada en los partidores para W_x para identificar la especie de arroz.

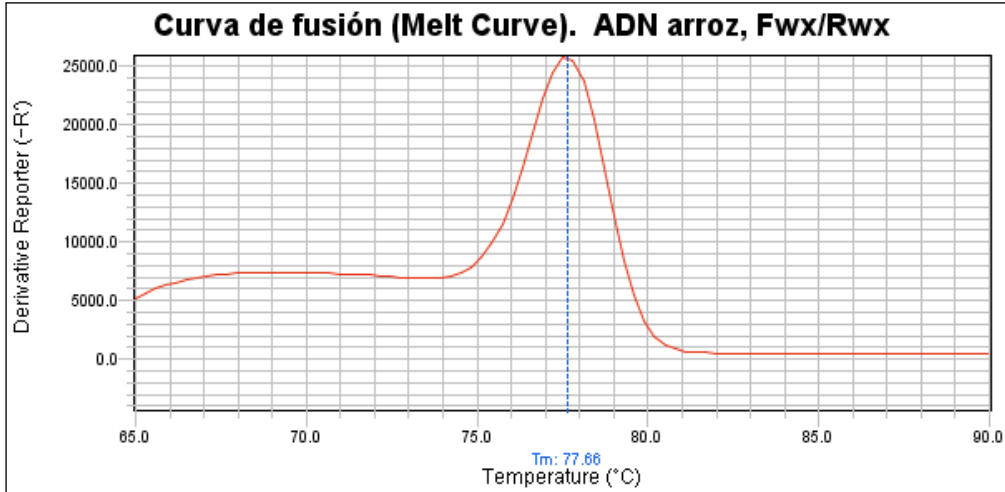


Figura 11. Identificación positiva del gen Wx en arroz, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM.

La curva de fusión para muestras de ADN de maíz extraído con amortiguador de lisis empleando los partidores F/RZe1 se ilustran en la **Figura 12**. Se observan dos curvas que pueden indicar que las muestras usadas pueden contener diferencias en su código genético los cuales, pueden ser detectados por esta técnica al observar el corrimiento en los valores de las Tm. Por otro lado, la Tm calculada de 84.2 °C (**Tabla 28**) no corresponde al valor obtenido experimentalmente 76.48 °C. Esto último puede deberse a que la secuencia amplificada es más pequeña que la esperada.

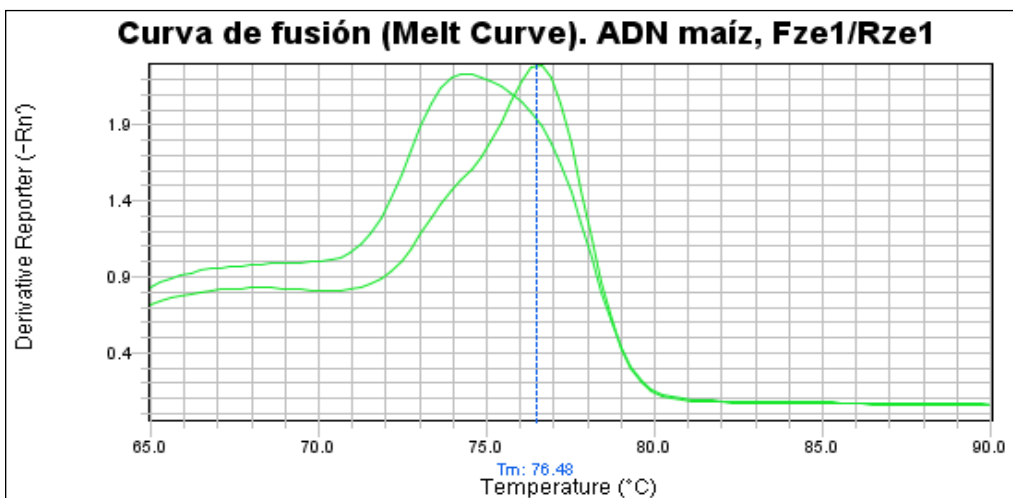


Figura 12. Identificación positiva del gen de zeína en maíz, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM.

En las **Figura 13** y **Figura 14** se presentan las curvas de fusión obtenidas para las muestras de ADN de soja extraído con CTAB usando los partidores FA49/RA49 y FGMO3/RGMO4. Los productos obtenidos con el par de partidores F49/R49 y GMO3/GMO4 alcanzan su punto de fusión a 79.61 °C y 82.14 °C, respectivamente. Al calcular la temperatura de fusión teórica aproximada mediante las herramientas disponibles en línea (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), se determinaron que estas fueron 83.5 °C y 81.8 °C (**Tabla 28**). Con estos valores también se puede decir que para el caso de los partidores GMO3/GMO4, hay amplificación de fragmentos de ADN más pequeños que el amplicón esperado, los cuales tienen una Tm de 72 °C.

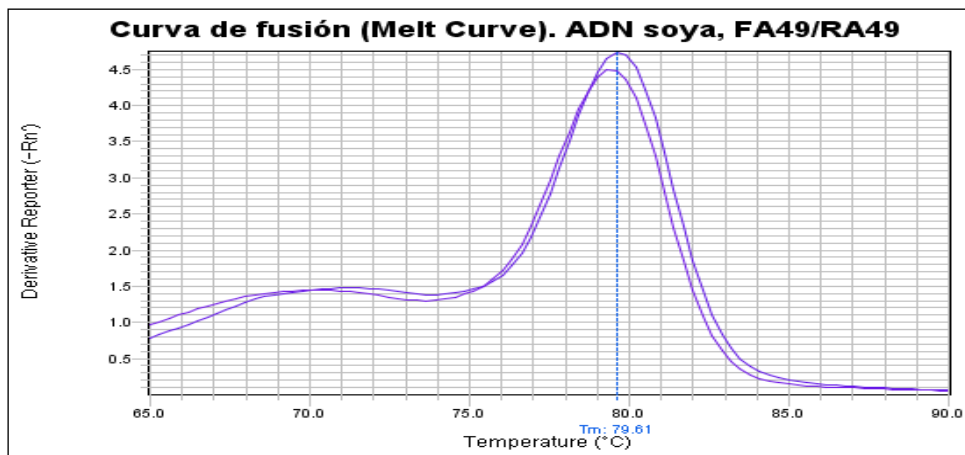


Figura 13. Identificación positiva del gen de lectina en soja, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM con partidores A49 (CIBQUIA).

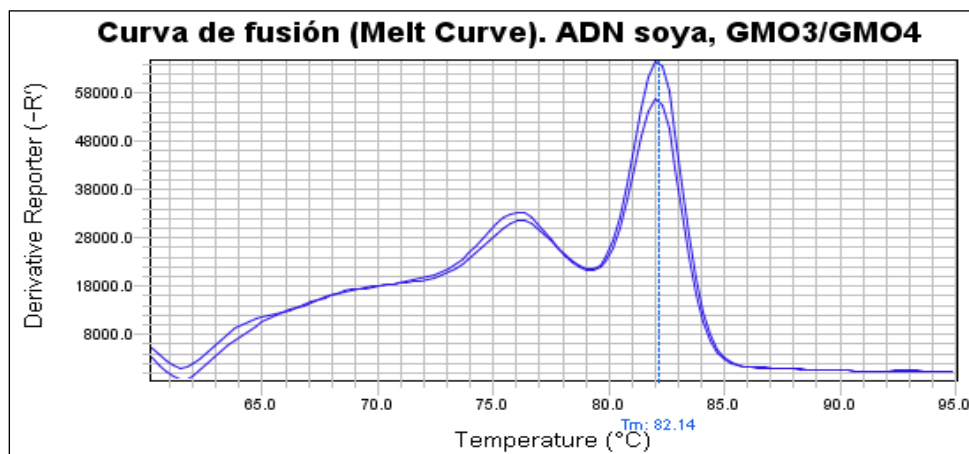


Figura 14. Identificación positiva del gen de lectina en soja, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM con los partidores de referencias GMO3/GMO4.

Al comparar los resultados obtenidos para identificar soya con los partidores A49 diseñados en CIBQUIA y los resultados con los partidores GMO3/GMO4 (Meyer y Cols. 1996), podemos observar que los partidores A49 ofrecen mejores resultados al mostrar un único producto de amplificación, no obstante, el par de partidores GMO3/GMO4, muestran un producto adicional o inespecífico descrito por el pico a 76.0 °C, lo cual, puede deberse a que este par de partidores según la referencia de donde se obtuvieron, fueron diseñados para PCR convencional en su versión anidada, no para PCR en tiempo real.

A parte, de realizar la técnica en reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando ADN puros de especies conocidas, junto a los partidores que amplifican para esa especie y así registrar el comportamiento de la técnica en condiciones ideales, también se buscó ensayar la PCR en tiempo real con una mezcla de ADN de arroz, maíz y soya empleando los partidores FA49/RA49. Este análisis resulta útil para identificar genes en productos constituidos por mezclas de ADN. La **Figura 15** testifica la capacidad de este partidor para detectar el gen lectina presente en soya, logrando amplificar aun cuando este se encuentre mezclado. La amplificación muestra un producto único con una T_m de 79.3 °C.

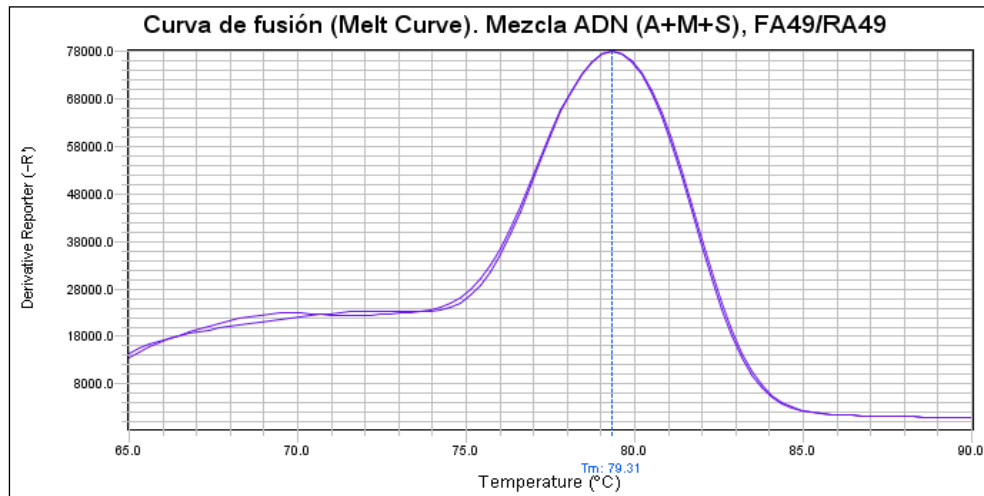


Figura 15. Identificación positiva del gen de lectina en soya, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM con los partidores A49 y en mezclas de ADN de arroz, maíz, y soya.

Asimismo, se realizó la qRT-PCR para una mezcla de ADN de arroz, soja y maíz, pero esta vez con el partidor F/RZe1 (los cuales identifican la zeína en maíz) (**Figura 16**), de igual forma como en la determinación individual del gen zeína solo con ADN de maíz donde no corresponden las T_m , en este caso de 75.1 °C con la T_m calculada de 84.2 °C, se plantea que la secuencia amplificada es más pequeña, aun así, se comprueba la utilidad de este partidor para identificar zeína en una mezcla de ADN.

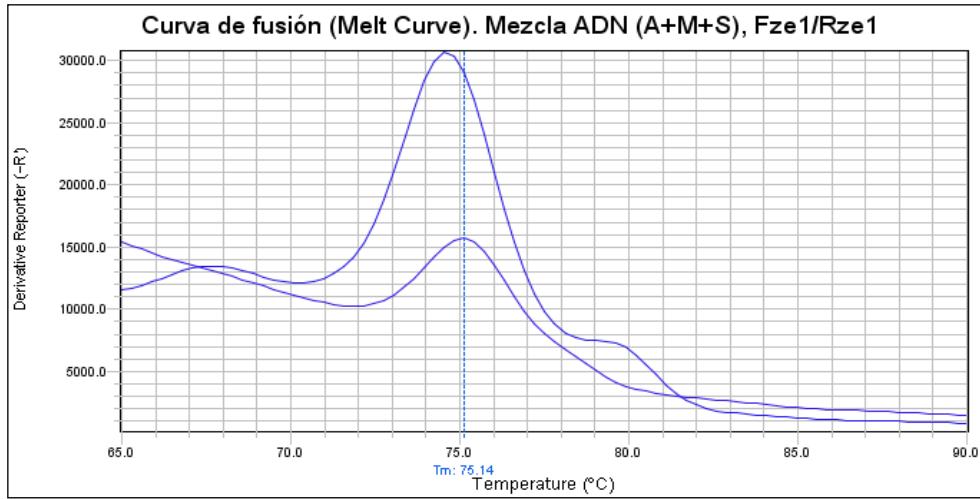


Figura 16. Identificación positiva del gen de zeína en maíz, mediante PCR en tiempo real y la variante de HRM con los partidores Ze1 y en mezclas de ADN de arroz, maíz y soja.

Por último, una amplificación compuesta por una mezcla vegetal de ADN procedente de arroz, soja y maíz en reacción con una solución preparada a base de tres pares de partidores para identificar cada especie (FW_x/RW_x, A49/RA49 y FZe1/RZe1) simultáneamente, se representa en la **Figura 17**. Generalmente, no es recomendable realizar reacciones múltiples, en donde se amplifican varios genes en la misma reacción debido a que la señal emitida no es específica, pues el fluoróforo puede unirse a cualquier amplicón del ADN. Sin embargo, como es de esperar las temperaturas de fusión, acorde a los resultados en las pruebas individuales previas, serían 76.5 °C para maíz y 77.7 °C en arroz, esta cercanía en las temperaturas intensifica la señal traslapando los picos y aumentando la altura de esa curva (Figura 17, pico superior). En tanto, que la T_m de 80.6 °C para el ADN de la soja también evidencia la presencia de esta especie vegetal en la mezcla analizada.

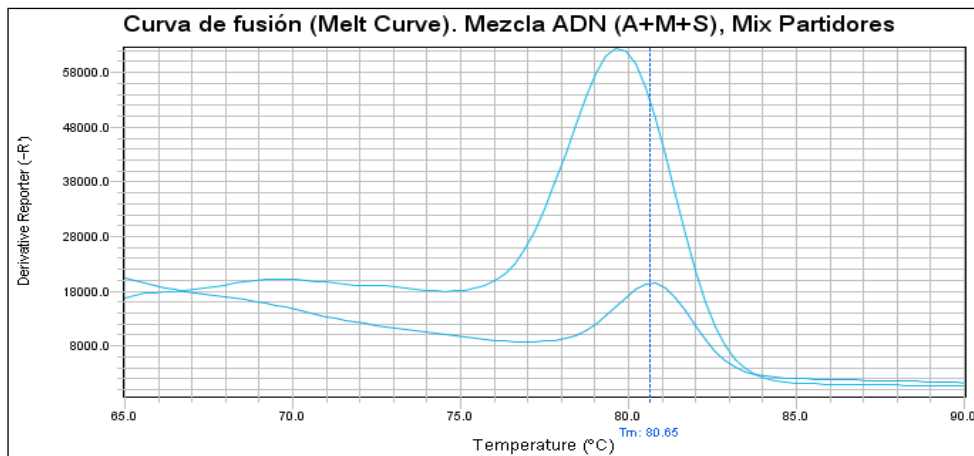


Figura 17. PCR en tiempo real (mix arroz + maíz + soya – gen Wx / lectina / zeína).

Para obtener una mejor resolución de las curvas se aconseja que los productos de PCR en tiempo real sean lo más pequeños posibles, ya que los amplicones muy largos disminuyen la resolución del ensayo debido a tener más probabilidad de abarcar regiones con gran número de mutaciones que varían la temperatura de fusión notablemente, como se puede observar la diferencia de temperaturas para el gen lectina de 501 pb y de zeína con 250 pb (**Tabla 28**). Adicional, dado que el estudio emplea la temperatura de fusión de productos de doble cadena para la identificación de productos, se debe evitar la formación de productos inespecíficos en la reacción ya que al ser detectados producen múltiples picos y alteran significativamente la T_m , provocando datos inconclusos para la identificación de la muestra (Prado, 2017).

Tabla 28. Datos de q-RT-PCR

Especie vegetal	Pares de partidores	Gen o región genómica que amplifica	Producto teórico esperado (pb)	T_m calculada (°C)	T_m RT-PCR HRM
Arroz	FW _x /RW _x	Gen W _x	121 (Figura 18)	77.0	77.66
Maíz	FZe1/RZe1	Zeína	250 (Figura 19)	84.2	76.48
Soya	FGMO3/RGMO4	Lectina	118 (Figura 20)	81.8	82.14
Soya	F49/R49	Lectina	501 (Figura 21)	83.5	79.61

A continuación, las **Figuras 18, 19, 20 y 21** presentan las secuencias de los partidores utilizados, las mismas han sido extraídas del banco de genes, estas permiten visualizar su ubicación dentro del gen para el cual fueron diseñados, además registran el tamaño y secuencia exacta que se busca amplificar. Conjuntamente, se toman estas secuencias que amplifican desde el partidor iniciador hasta el terminador para calcular el punto de fusión teórico.

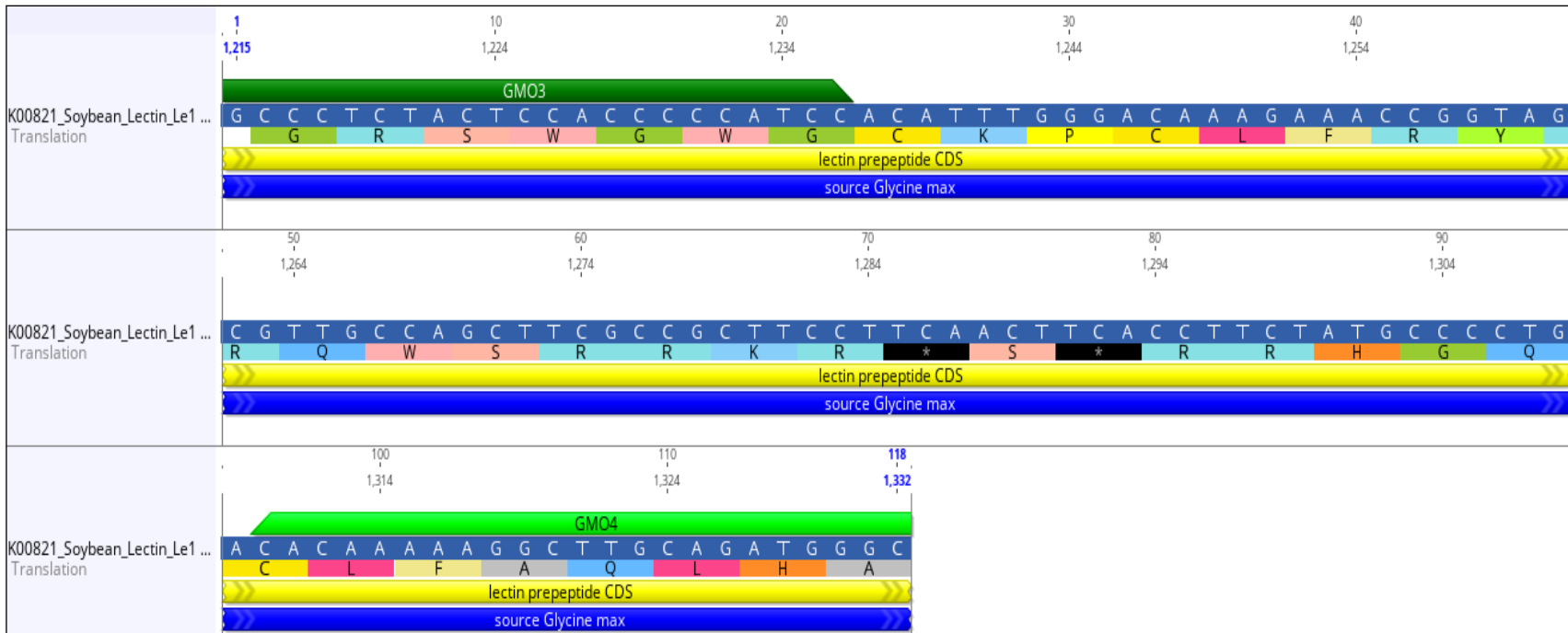


Figura 20. Producto de PCR que se obtiene con el par de partidores GMO3/GMO4 que amplifican un fragmento de 118 pb gen de lectina de soya. El diagrama muestra la disposición de los partidores sobre la secuencia codificante para lectina obtenida del Gen Bank (NCBI) K00821. El segmento se restringió solo para el producto que se espera obtener con los partidores GMO3/GMO4.

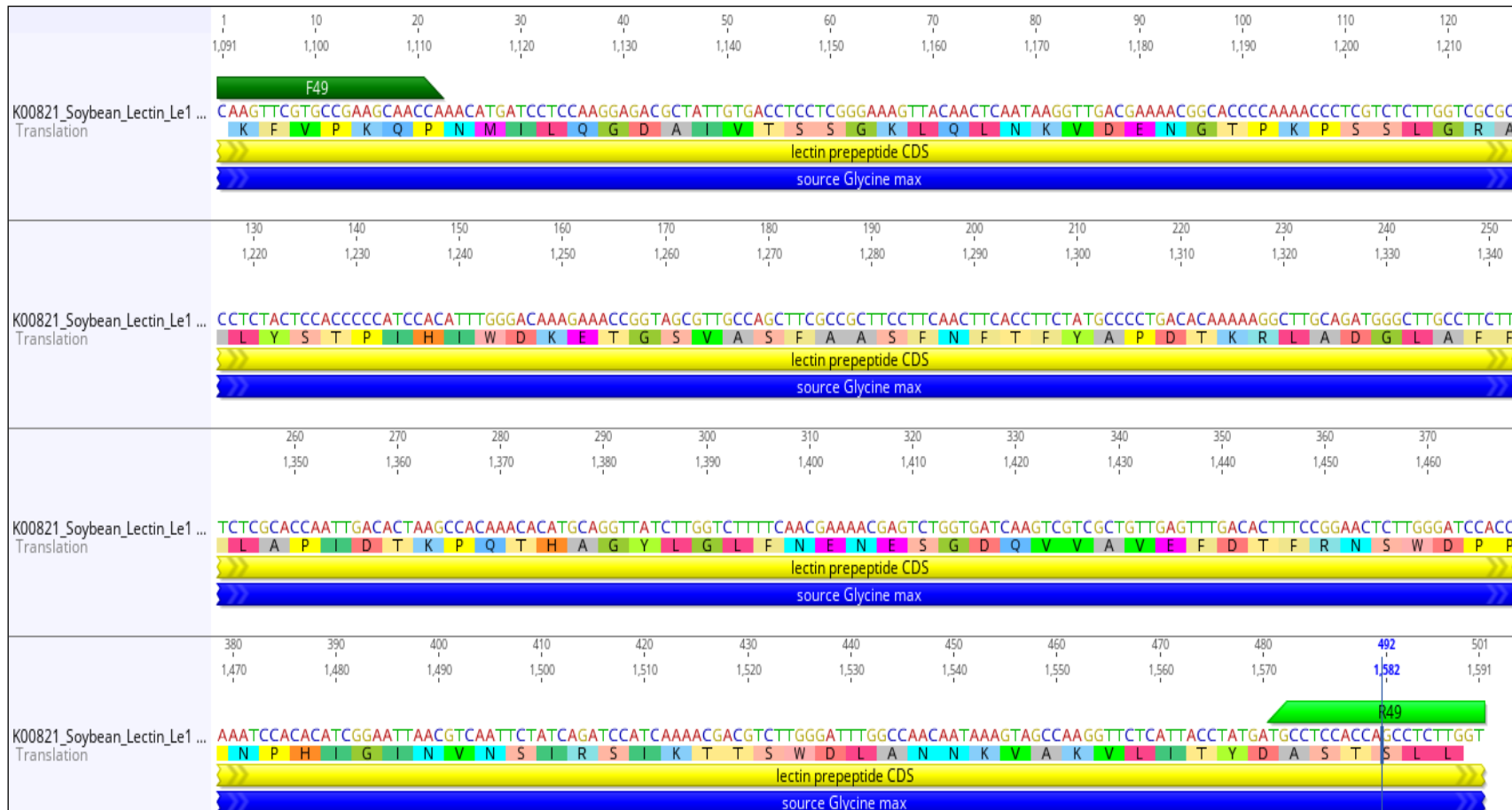


Figura 21. Producto de PCR que se obtiene con el par de partidores F49/R49 que amplifican un fragmento de 501 pb del gen de lectina de soya. El diagrama muestra la disposición de los partidores sentido y antisentido, la secuencia codificante para lectina obtenida del Gen Bank (NCBI) K00821. El segmento se restringió solo para el producto que se espera obtener con los partidores F49/R49.

IX. CONCLUSIONES

- En términos de concentración el método de lisis es una mejor opción para la extracción de ADN a partir de granos de arroz y maíz, mientras que el método CTAB es el mejor para granos de soya.
- La variedad de la especie vegetal es un factor influyente en la extracción de ADN, sobre todo en las muestras de maíz con el método de lisis y en las de soya con CTAB.
- Un mayor grado de pureza se obtuvo en las muestras de maíz y arroz utilizando el método de lisis, en tanto para las muestras de soya se obtiene con el método CTAB.
- El Protocolo comercial PureLink genera un ADN de baja concentración, pero con un buen grado de pureza, funcional para reacciones en cadena de la polimerasa.
- Los ADN obtenidos mostraron su viabilidad para ser usados en diferentes variantes de PCR como convencional, anidada, en tiempo real y HRM.
- El tamaño de los amplicones influye en el punto de fusión experimental de la PCR en tiempo real, por lo cual se recomienda utilizar aquellos que amplifiquen para fragmentos no superiores a las 100 pb.
- La PCR en tiempo real es viable para la identificación genética en mezclas de ADN y de partidores siempre y cuando las T_m no se encuentren muy cercanas, pues esto impide la discriminación entre la fluorescencia de un ADN y de otro.

X. BIBLIOGRAFÍA

(2000). Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

Aboul-Maaty, N., and Oraby, H. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>

Acosta, R. (2009). El cultivo de maíz, su origen y clasificación: El maíz en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 113-120.

Ahmadikhah, A. (2009). A rapid mini-prep DNA extraction method in rice (*Oryza sativa*). *African Journal of Biotechnology*, 234-238.

Alfonso, Y., Noriega, C., Isidró, M., Andraca, L., Alfonso, D., & Rodríguez, D. (2016). Optimization of the protocols of extraction of DNA and of the molecular marker type RAPD in Anonaceas. *Cultivos Tropicales*.

Anai, T., Koga, M., Tanaka, H., Kinoshita, T., Rahman, S., & Takagi, Y. (2003). Improvement of rice (*Oryza sativa* L.) seed oil quality through introduction of a soybean microsomal omega-3 fatty acid desaturase gene. *Plant Cell Rep*, 988-992.

Annah Maropola, M. K., Ramond, J. -B., & Trindade, M. (2015). Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). *ELSEVIER*.

Arregocés, O. (2005). *Morfología de la planta de arroz*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Baumforth, K. R., Nelson, P. N., Digby, J. E., O'Neil, J. D., & Murray, P. G. (1999). *Demystified.. The polymerase chain reaction*. *Molecular Pathology*, 1-10.

Beadle, G. W. (1932). The relation of crossing over to chromosome association in *zeaeuchlaena* hybrids. *Genetics*, 481-501.

Bolívar Zapata, F. G. (2004). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. México.

Brown, R., & Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell. *Journal of the Royal Society Interface*, 131-138.

Cairns, J. (1963). The Bacterial Chromosome and its Manner of Replication. *Journal of Molecular Biology*, 208-213.

- Carter, T., Hymowitz, T., & Nelson, R. (2004). Biogeography, local adaptation, vavilov, and genetic diversity in soybean. *Biological Resources and Migration*, 47-59.
- Chen, W., Cui, H., Bao J., Zhou X., and Shu, Q. (2006). A Simplified Rice DNA Extraction Protocol for PCR Analysis. 67–70.
- Claassen, S., du Toit, E., Kaba, M., Moodley, C., Zar, H. J., & Nicol, M. P. (2013). A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *ELSEVIER*, 103-110.
- Cortazar Martínez, A., & Silva Rincón, E. P. (2004). *Métodos Físico - Químicos en Biotecnología*. México.
- Datta, K., Rai, M., Parkhi, V., Oliva, N., Tan, J., & Datta, S. K. (2006). Improved 'golden' indica rice and post-transgeneration enhancement of metabolic target products of carotenoids (B-carotene) in transgenic elite cultivars (IR64 and BR29). *Current Science Association*, 935-939.
- De Luna - Jiménez, A. 2007. Composición y procesamiento de la soya para consumo humano. *Investigación y Ciencia*, 35-44.
- Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2009). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bionalytical Chemistry*, 1977-1990.
- Desneux, J., & Pourche, A. -M. (2014). Comparison of DNA extraction kits and modification of DNA elution procedure for the quantitation of subdominant bacteria from piggery effluents with real-time PCR. *Microbiology Open*.
- Doebley, J. (1990). Molecular systematics of zea (gramineae). *Maydica*, 143-150.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Ecología Molecular*. México D.F.: Instituto Nacional de Ecología, Semarnat.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019). Obtenido de El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo: <http://www.fao.org/3/ca5162es/ca5162es.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (abril de 2018). Obtenido de Seguimiento del Mercado del Arroz de la FAO : <http://www.fao.org/3/I9243ES/i9243es.pdf>

- Freitas, M., Gomes-Junior, P., Batista, M., Leal-Balbino, T., Araujo, A., & Balbino, V. (2014). Novel DNA extraction assay for molecular identification of *Aedes* spp eggs. *Genetics and Molecular Research*, 8776-8782.
- Global Biodiversity Information: World Checklist of Selected Plant Families. (2017). Obtenido de *Oryza sativa* L.: <https://www.gbif.org/es/species/2703459/treatments>
- Goff, S., Ricke, D., Lan, T.-H., Presting, G., & et.al. (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp.). *Science*, 92-100.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York, EEUU.
- Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. F., & Erlich, H. A. (1988). DNA typing from single hairs. *Nature*, 543-546.
- Innis, M., Gelfand, D., & Sninsky, J. (1995). *PCR Strategies*. ELSEVIER.
- Instituto de Mercadeo Agropecuario. (2020). Obtenido de Catálogo de rubros cultivados en Panamá: https://web.ima.gob.pa/wp-content/uploads/2020/08/CATALOGO_RUBROS_2020.pdf
- Jiménez, L., & Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Prentice Hall.
- JRC. (2019). Informe Técnico del Centro Común de Investigación de la Comisión Europea. Obtenido de Modelación del cultivo de soja en Latinoamérica: https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC110355/final_soja_june_07_2019_online.pdf
- Khosravinia, H., & Ramesha, K. (2007). Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from. *African Journal of Biotechnology* , 184-187.
- Kim, M. Y., Lee, S., Van, K., Kim, T.-H., & et.al. (2010). Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. *PNAS*, 22032-22037.
- Krishnamurthy, V. V., Khamo, J. S., Cho, E., Schornak, C., & Zhang, K. (2015). Polymerase chain reaction based gene removal from plasmids . *Elsevier*, 75-82.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., . . . Zoric, N. (2006). *The real - time polymerase chain reaction*. Elsevier, 95-125.

- Li, Y., Zhang, J., Zhang, J., Hao, L., Hua, J., Duan, L., . . . Li, Z. (2013). Expression of an *Arabidopsis molybdenum* cofactor sulphurase gene in soybean enhances drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 1-12.
- Li, Y.-H., Zhou, G., Ma, J., Jiang, W., Jin, L.-G., & et.al. (2014). De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. *Nature Biotechnology*, 1045-1052.
- Linneo, C. (1737). *Genera plantarum: eorumque characteres naturales secundum numerum, figuram, situm, et proportionem omnium fructificationis partium*.
- Linneo, C. (1753). *Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods*, 402-408.
- Ludek.Talian. (2019). *Glycine max (L.) Merr.: fruta [Figura]*. Recuperado de <https://www.gbif.org/occurrence/2643852106>.
- McCown, B., McCabe, D., Russell, D., Robison, D., Barton, K., & Raffa, K. (1991). Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 590-594.
- Merrill, E. D. (1917). *An Interpretation of Rumphius's Herbarium Amboinense*.
- Meselson, M., & Stahl, F. W. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *PNAS*, 672-682.
- Metzker, M. L., & Caskey, C. T. (2001). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia of life sciences*, 1-10.
- Meyer, R., Chardonens, F., Hubner, P. y Luthy, J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und - Forschung*, 339-344
- Mies, C., Houldsworth, J., & Chaganti, R. (1991). Extraction of DNA from paraffin blocks for southern blot analysis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 169-174.
- Ministerio de Desarrollo Agropecuario. (2019). Obtenido de Dirección de Agricultura - Unidad de Planificación, Información general año 2018-2019: https://www.mida.gob.pa/upload/documentos/cierre___2018-2019_ok.pdf

- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific America*, 56-65.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 4321-4325.
- Musto, M. (2010). DNA Quality and Integrity of Nuclear and Mitochondrial Sequences from Beef Meat as Affected by Different Cooking Methods. *Food, Technology, Biotechnology*, 523-528.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. (Febrero de 2019). Obtenido de El mercado mundial de los cereales: temporada 2018/2019, situación política mundial y perspectivas para la próxima década: https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2019/02/articulo-cereales_febrero.pdf
- Orfao, A., & Morent, M. (19 de julio de 2011). Red Nacional de Biobancos. Obtenido de Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos: <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>
- Palacios Santamaría, D. (2008). Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN para la detección de transgénicos en alimentos mediante tecnología PC. España.
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., & Violic, A. D. (2001). El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Roma: Colección FAO: Producción y protección vegetal.
- Pfizinger, H., Ludes, B., & Mangin, P. (1993). Sex determination of forensic samples: co-amplification and simultaneous detection of a Y-specific and an X-specific DNA sequence. *International Journal of Legal Medicine*, 213-216.
- Prado, A. (2017). Evaluación de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección y genotipificación de los genogrupos humanos de sapovirus. Lima.
- Prieto Solla, L. (2002). Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados. España.
- Red por una América Latina libre de transgénicos. (2014). Obtenido de [rallt.org](http://www.rallt.org/organizaciones/pma/aa%20yorganismosmodfgent.pdf) : <http://www.rallt.org/organizaciones/pma/aa%20yorganismosmodfgent.pdf>
- Reineke, A., Karlovsky, P., & Zebitz, C. (1998). Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Molecular Biology*, 95-99.
- Ren, X., Zhu, X., Warndorff, M., Bucheli, P., & Shu, Q. (2006). DNA extraction and fingerprinting of commercial rice cereal products. *Elsevier*, 433-439.

- Ridner, E. (2006). Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. Buenos Aires, Argentina: Sociedad Argentina de Nutrición.
- Rocha Salavarieta, P. J. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. Palmas, 9-17.
- Rodríguez G, M., & Rodríguez L, W. (2006). Curso Métodos físico - químicos en biotecnología: PCR en tiempo real.
- Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención . Ciencia UANL, 323-335.
- Romanelli, A., Fu, J., Herrera, M., & Wickes, B. (2014). A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification. Mycoses.
- Ruiz Maraver, O. J. (2012). Monitoreo y detección de maíz transgénico en el municipio de Erongarícuaro, Michoacán. México.
- Santos, S. S., Hansen, L., & Winding, A. (2015). Comparison of three DNA extraction methods for recovery of soil protist DNA. ELSEVIER.
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., & et.al. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature, 178-182.
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R., Stein, J. C., & et.al. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics. Science, 1112-1115.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic, 70-78.
- Tilotta, F., Brousseau, P., Lepareur, E., Yasukawa, K., & de Mazancourt, P. (2010). A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting. ELSEVIER, e39-e43.
- Torres Tejeda, A. G., & Baca, B. E. (1995). Reacción en cadena de la polimerasa. Elementos, 16-21.
- Turan, C., Nanni, I. M., Brunelli, A., & Collina, M. (2015). New rapid DNA extraction method with Chlex from *Venturia inaequalis* spores. ELSEVIER.
- U.S. Department of Agriculture. (10 de Diciembre de 2019). Obtenido de World agricultural supply and demand estimates: https://www.usda.gov/sites/default/files/documents/December_2019_WASDE_Lockup_Briefing.pdf

User guide: PureLink® Plant Total DNA Purification Kit. (septiembre de 2012).
Obtenido de fishersci.es: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_plant_man.pdf

Vaughan, D. A. (1994). *The wild relatives of rice*. Manila, Philippines: International Rice Research Institute.

Velasco, R. (2005). *Marcadores moleculares y la extracción de ADN*. Colombia.

Watanabe, K., Iwashima, Y., Akutsu, T., Sekiguchi, K., & Sakurada, K. (2014). Evaluation of a co-extraction method for real-time PCR-based body fluid identification and DNA typing. *ELSEVIER*, 56 - 59.

Watson, J., & Crick, F. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*.

Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*. *Current Protocols in Molecular Biology*.

Yábar Varas, C. A. (2003). *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. Lima.

Yi, G., Choi, J.-H., Lee, J.-H., Jeong, U., Nam, M.-H., Yun, D.-W., & Eun, M.-Y. (2005). Procedimiento rápido y sencillo para homogeneizar tejidos foliares adecuado para la extracción de ADN a mini-midi-scale en arroz. *Prep Biochem Biotechnology*, 257-261.

Yoshikawa, H., Dogruman-AI, F., Turk, S., Kustimur, S., Balaban, N., & Sultan, N. (2011). Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples. *Parasitology Research*, 1045-1050.

Yu, J., Hu, S., Wang, J., Ka-Shu, G., Li, S., Liu, B., . . . Li, W. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 79-92.

Zhang, Q.; Li, Y.; Chin K. L. and Qui, Y. 2017. Vegetable soybean: seed composition and production research. *Italian Journal of Agronomy*, 276-282.