

**Optimización de protocolos para la extracción
de ADN y uso del marcador SCAR ISPJ1 en
Piñón (*Jatropha curcas* L.)**

Jessu Leandro Herrera Rengifo

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2010

ZAMORAMO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Optimización de protocolos para la extracción
de ADN y uso del marcador SCAR ISPJ1 en
Piñón (*Jatropha curcas* L.)**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Jessu Leandro Herrera Rengifo

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2010

Optimización de protocolos para la extracción de ADN y uso del marcador SCAR ISPJ1 en Piñón (*Jatropha curcas* L.)

Presentado por:

Jessu Leandro Herrera Rengifo

Aprobado:

Nils Berger, Dr. Sc. Agr.
Asesor Principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Carrera Ciencia y Producción
Agropecuaria

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Marcelino Guachambala, Ing.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia

RESUMEN

Herrera, J. 2010. Optimización de protocolos para la extracción de ADN y uso del marcador SCAR ISPJ1 en Piñón (*Jatropha curcas* L.). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 20 p.

El diagnóstico molecular es una herramienta que nos ayuda a distinguir secuencias de interés para el mejoramiento genético de las plantas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) permite la detección de uno o más fragmentos específicos de ADN para realizar trabajos más precisos en diagnóstico molecular. La *Jatropha curcas* L. o piñón es una especie oleaginosa perenne, nativa de América tropical que se distribuye en los trópicos que tiene potencial para la elaboración de biodiesel. No existe información con respecto al número de introducciones y diversidad genética de las poblaciones de piñón y su origen sigue siendo polémico. La finalidad de esta investigación fue la optimización de protocolos para la extracción de ADN de *Jatropha curcas* L. que permita identificar el origen de las accesiones que se tienen en la Escuela Agrícola Panamericana, usando el marcador tipo SCAR ISPJ1. Se encontró que las hojas jóvenes tienen la mayor cantidad de ADN extraíble usando el buffer etil xantogenato de potasio (PEX). El protocolo de extracción optimizado permitió obtener una media de 750 ng/ μ L de ADN por muestra. El marcador SCAR ISPJ1 se optimizó a una temperatura de acoplamiento de 63°C, generando una banda definida a 543 pb. El marcador ISPJ1 optimizado fue validado en 38 accesiones, de las cuales 18 presentaron la banda asociada al origen hindú.

Palabras clave: ADN, centro de origen, diagnóstico molecular.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	14
5. RECOMENDACIONES.....	15
6. LITERATURA CITADA.....	16
7. ANEXOS.....	18

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Accesiones de piñón usadas en la validación del marcador SCAR ISPJ1.	3
2. Protocolos experimentales para la extracción de ADN en Piñón.	5
3. Características del primer ISPJ1 para identificar las accesiones de origen hindú	6
4. Reactivos para PCR del marcador SH-13.....	6
5. Perfil térmico del marcador SH-13 con variantes para el marcador ISPJ1.	6
6. Concentraciones de ADN encontrados en el tejido muestreado.	8
7. Concentraciones de ADN obtenidas en protocolos experimentales.....	8
8. Perfil térmico optimizado del marcador ISPJ1 a partir del protocolo del marcador SH13.....	12
Figura	Página
1. Resultado de la electroforesis de la primera reacción de PCR con temperatura de acoplamiento de 60°C (cinco repeticiones)	11
9. Resultado de la electroforesis del protocolo con temperatura de acoplamiento de 61°C (cinco repeticiones).	11
10. Resultado de la electroforesis de la tercera PCR con temperatura de acoplamiento de 63°C (cinco repeticiones).....	12
11. Resultado de la validación del protocolo ISPJ1 en 38 accesiones de la EAP Zamorano.....	13
Anexo	Página
1. Protocolo Cuantificación de ADN.	18
2. Rehidratación de primers.	18
3. Protocolo de extracción de ADN. Skroch et al. (1998).....	19

1. INTRODUCCIÓN

El piñón (*Jatropha curcas* L.) es nativo de América tropical y es un cultivo con potencial para la elaboración de biodiesel. Este cultivo es de importancia por su periodo corto de endurecimiento en sequía, bajo costo de la semilla, alto contenido de aceite, fácil adaptación a tierras marginales, idoneidad como sustituto de los combustibles sin ningún tipo de alteración en los motores existentes y el tamaño de planta hace que la recolección de semillas sea más conveniente (Basha y Sujatha 2007).

El éxito de los programas de mejoramiento genético del piñón está en la identificación de genotipos con material genético divergente que puedan generar combinaciones óptimas para obtener variedades con caracteres deseados (Sakaguchi y Somabi 1987). No hay información con respecto al número de introducciones y la diversidad genética de las poblaciones del género *Jatropha* en Honduras y Mesoamérica. Varios investigadores han tratado de definir el origen de ésta pero la fuente sigue siendo discutida (Dehgan y Webster 1979). Se han reportado tres variedades muy utilizadas que son: Cabo Verde, una variedad que se ha extendido por todo el mundo; Nicaragua, con pocas frutas de gran tamaño; y una variedad mexicana que no es tóxica porque carece de los esteroides de forbol, la cual también puede ser utilizada en alimentación animal (Henning 2006).

El aislamiento y la masa de ADN genómico de alto peso molecular es un importante requisito para aplicar técnicas moleculares como herramienta para el mejoramiento genético de un cultivo (Dhakshanamoorthy y Selvaraj 2009). Una herramienta útil en el mejoramiento genético es la Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM), la cual se basa en el diagnóstico molecular de la presencia o ausencia de un fragmento de ADN de interés ayudando a la investigación en plantas y animales, identificando los genes y las características genéticas de un individuo.

La selección basada en información genética molecular utilizando marcadores moleculares es confiable y consistente, siempre y cuando los protocolos estén adaptados a un laboratorio. En Euphorbiaceae, marcadores moleculares como Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (RAPD) han sido utilizados para determinar el alcance de la genética y la diversidad en el caucho de élite (*Hevea brasiliensis*) y sus clones (Besse *et al.* 1994; Varghese 1997), y en la yuca (Asante y Offei 2003). En *Jatropha curcas*, marcadores de isoenzimas se utilizaron para determinar la relación genética de los miembros del género *Jatropha* y *Ricinus* (Sathaiah y Reddy 1985).

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) es un proceso que logra amplificar dos o más fragmentos específicos de ADN, permitiendo la identificación de distintos genes de interés (Rodríguez y Barrera 2004). Para poder realizar los análisis moleculares en *Jatropha curcas*, se necesitan mecanismos que den un ADN de excelente calidad, pero la planta de piñón contiene polisacáridos y polifenoles que dificultan el aislamiento del ADN genómico. Aunque existen varios protocolos para el aislamiento de ADN genómico de esta planta (Ganesh Ram *et al.* 2008; Ranade *et al.* 2008; Pamidiamarri *et al.* 2008; Basha y Sujatha 2007; Stein *et al.* 2001) no se ha reportado el uso del buffer Etil Xantogenato de Potasio (PEX) con acetato de amonio, acetato de sodio, u otros reactivos que son más accesibles, fáciles de manejar y menos tóxicos al ambiente.

Los análisis moleculares para identificar el origen de las variedades provenientes de África, India y Centro América son muy pobres o son poco específicos como los análisis con marcadores RAPD, aunque son útiles al momento de buscar diversidad genética en una población (Basha y Sujatha 2007).

Basha y Sujatha (2007) investigaron, sobre la diversidad genética de germoplasma de *Jatropha curcas* de la India, junto con un genotipo que no es tóxico de México, utilizando marcadores RAPD e ISSR; logrando desarrollar dos marcadores específicos que diferencian los genotipos de la India de los mexicanos.

El centro de origen del piñón no se ha definido hasta el momento (Basha y Sujatha 2007). Los niveles de diversidad genética entre las accesiones disponibles de *Jatropha curcas* de la India y la amplia variación entre genotipos indios y mexicanos, requiere la caracterización de más genotipos de otras colecciones, que cubra una mayor zona geográfica y se debe realizar una comparación de las relaciones genéticas con características morfológicas, que permitan analizar la distribución y la diversidad genética del género *Jatropha*.

El objetivo de esta investigación fue optimizar un protocolo de extracción de ADN para *Jatropha curcas* L., identificando el tejido adecuado para el muestreo de las plantas. Se regularon los tiempos y temperaturas en el proceso de extracción con reactivos de fácil manipulación, para identificar las 38 accesiones de la colección de la Escuela Agrícola Panamericana por medio del marcador molecular tipo SCAR ISPJ1. Este identifica las accesiones de origen hindú desarrollado por Basha y Sujatha (2007), con el fin de abrir futuras investigaciones para el mejoramiento genético del piñón en Zamorano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano, ubicada en el Valle del Yegüare a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

2.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

Para la optimización del protocolo se utilizó la accesión 108 con procedencia de Puerto Cortes, Honduras, de la colección de la EAP Zamorano. El protocolo del marcador ISPJ1 fue validado con las 38 accesiones de la colección proveniente de diferentes localidades de recolección y procedencias de introducción (Cuadro 1).

Cuadro 1. Accesiones de piñón usadas en la validación del marcador SCAR ISPJ1.

Cantidad	Nombre	Procedencia
Colectadas de Honduras		
5	Filomena, Arturo Araujo, Brasilia, Tanzania	Yoro
1	108	Puerto Cortes
2	111, 112	San Pedro Sula
7	003, 004, 005, 006, 007, 008, 009	Los Hoyos
8	010, 011, 012, 013, 014, 016, 017, 018.	San Matías
5	020, 021, 022, 023, 024	Jacaleapa
Introducidas a Honduras		
1	Masaya	Masaya, Nicaragua
9	Minas, Mali, Piñón 1, Piñón 2, Bravo, Bravo × Mali. Híbrido, Embrapa, Brasil	Brasil
1	AA.AA	Tecualuya, El Salvador
2	HB07, Criolla	El Salvador
1	No tóxica	México

2.3 TOMA DE MUESTRA

Para optimizar el protocolo de extracción de ADN se muestrearon siete diferentes tejidos de la planta en las siguientes cantidades:

1. Hojas jóvenes: 8 discos de microtubos.
2. Primordios foliares: 5 unidades.
3. Meristemo apical: 5 unidades.
4. Tallo joven: 1cm de la parte apical.
5. Peciolos: 3 unidades.
6. Flor masculina: 9 unidades.
7. Flor femenina: 6 unidades.

Se realizaron tres pruebas con tres repeticiones de las siete partes de la planta, luego se cuantificó el ADN por fluorimetría, y se compararon los datos por medio de un análisis estadístico ANDEVA con un nivel de significancia <0.05 para los tejidos utilizados en la extracción, y para los protocolos experimentales, y luego una separación de medias por la prueba DMS (Cuadro 2).

2.4 EXTRACCIÓN DE ADN

Se extrajo ADN genómico basado en el método de Skroch *et al.* (1998) optimizado para las condiciones del Laboratorio de Biotecnología (Anexo 3). Se compararon los datos por medio de un análisis estadístico ANDEVA con un nivel de significancia de <0.05 y una separación de medias por DMS

Se cuantificaron las muestras para determinar la parte de la planta que supere los 95 ng/ml de ADN para trabajar con el marcador. Se probaron cinco protocolos con tres repeticiones de cada uno con variaciones de tiempo y cantidad de reactivo (Cuadro 2). Se midió la cantidad de ADN que tenía cada una de las muestras en ng/ml para determinar las partes con mayor concentración de ADN.

2.5 CUANTIFICACIÓN DE ADN

La cuantificación se hizo de acuerdo al protocolo sugerido en el Manual del Laboratorio de Biotecnología Aplicada (Anexo 1). Se utilizó un fluorómetro Hoefler TKO-100, $\lambda_{ex} + 365$ nm $\lambda_{em} + 460$ nm calibrado con ADN estándar a una concentración de 100 ng/ml. Se mezclaron 2 ml de buffer de cuantificación (10 μ L de solución para tinción concentrada + 100 ml de buffer TNE 1 \times ; pH= 7.4) con 2 μ L de muestra de ADN, colocados en una cubeta de cuarzo puro para minimizar el margen de error al momento de la lectura.

Cuadro 2. Protocolos experimentales para la extracción de ADN en Piñón.

Pasos	Protocolo 1		Protocolo 2		Protocolo 3	
	Cantidad	Tiempo	Cantidad	Tiempo	Cantidad	Tiempo
Macerado	30/370 μ L	3 min	30/470 μ L	10 min	30/450 μ	20 min
Baño María con PEX		60 min		83 min		60 min
Centrifugación 1	14000 rpm	20 min	15000 rpm	15 min	15000 rpm	20 min
Precipitación Acetato de Amonio		45 min		20 min		50 min
Centrifugación 2	3000 rpm	6 min	4000 rpm	10 min	4000 rpm	20 min
Baño María con ARNasa	300 μ L	45 min	300 μ L	60 min	350 μ L	70min
Centrifugación 3	14000 rpm	10 min	15000 rpm	3 min	15000 rpm	5min
Precipitación Acetato de Sodio		10 min		20min		20 min
Centrifugación 4	3000 rpm	3 min	4000 rpm	6 min	4000 rpm	7 min
Centrifugación 5	14000 rpm	50 seg	1000 rpm	30 seg	15000 rpm	30seg

Pasos	Protocolo 4		Protocolo 5	
	Cantidad	Tiempo	Cantidad	Tiempo
Macerado	50/450 μ L	15 min	50/450 μ L	5 min
Baño María con PEX		75 min		80 min
Centrifugación 1	15000 rpm	15 min	15000 rpm	15 min
Precipitación en Acetato de Amonio		25 min		45 min
Centrifugación 2	4000 rpm	10 min	4000 rpm	15 min
Baño María con ARNasa	350 μ L	40 min	350 μ L	50 min
Centrifugación 3	15000 rpm	5 min	15000 rpm	5 min
Precipitación en Acetato de Sodio		25 min		5 min
Centrifugación 4	3000 rpm	6 min	4000 rpm	6 min
Centrifugación 5	15000 rpm	15 seg	15000 rpm	30 seg

2.6 DILUCIÓN DEL ADN

Las muestras de ADN se diluyeron a 50 ng/ml con 100 μ l de Buffer TE 0.1 X para estandarizarlas y que alcancen la misma oportunidad de amplificarse en PCR.

2.7 AMPLIFICACIÓN DE PCR

El ADN genómico fue amplificado por medio de una reacción de PCR con los *primers* ISPJ1 F y ISPJ1 R (Cuadro 3), los cuales se utilizaron a una concentración de 10 μ M (Anexo 2).

Cuadro 3. Características del primer ISPJ1 para identificar las accesiones de origen hindú

Secuencias de Primer Orientación 5' a 3'	ISSR primer	Tamaño (pb)	Referencia
ISPJ1-F:GAGAGAGAGAGAGAGGTG	(GA) ₈ A	543	Basha, S; Sujatha, M. 2007
ISPJ1-R:GAGAGAGAGAGAGAAAACAAT			

Como estabilizador se utilizó el buffer PCR 5 X Green Go Taq®, los DesoxiNucleotidos Trifosfatos (dNTP's) con cloruro de magnesio (MgCl₂), enzima Go Taq® Flexi DNA Polymerase y ADN de los genotipos seleccionados como ADN molde o template. El volumen final de la mezcla maestra por muestra fue de 15 µL. Como referencia se utilizó el protocolo del marcador SH 13 de frijol porque las condiciones de termociclado y reactivos de la mezcla maestra amplifican un fragmento de ADN similar al esperado con el marcador ISPJ1 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Reactivos para PCR del marcador SH-13.

Reactivos	SH-13
ddH ₂ O	7.1 µL
Buffer	3.0 µL
Primer (R)	0.5 µL
Primer (F)	0.5 µL
AND	2.0 µL
dNTP's	1.2 µL
Taq	0.7 µL

Se realizaron cambios en el perfil térmico para encontrar el tiempo y temperatura de acoplamiento adecuada para el marcador ISPJ1 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Perfil térmico del marcador SH-13 con variantes para el marcador ISPJ1.

Perfil térmico	SH-13	ISPJ1
Desnaturalización inicial	94°C/30 s	94°C/30 s
Desnaturalización	94 °C/30 s	95 °C/30 s
Acoplamiento	59 °C/1 min	60, 61, 63°C
Elongación	72°C/ 1min 30 s	72°C/ 1 min 30s
Extensión Final	72°C/ 1 min 30 s	72°C/ 1 min 30 s
Número de ciclos	36	36

Los reactivos usados en los protocolos base son los mismos que en los nuevos marcadores, solo varia la temperatura de acoplamiento.

2.8 VISUALIZACIÓN DE ADN

Para observar los fragmentos de ADN se utilizó la técnica de electroforesis horizontal. El ADN obtenido en las extracciones y los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa a una concentración de 1.2%, en solución tampón TBE 0.5 X (Tris-HCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA) en tanques de electroforesis. Las muestras fueron separadas a 100 V durante 60 min en geles pequeños y 90 min en geles grandes, teñidos en una solución 1:10 de bromuro de etidio: agua destilada durante 15-20 min; luego se visualizaron las bandas de ADN en el transiluminador y se fotografiaron bajo luz ultravioleta. Se utilizó una escalera molecular de ADN con un rango de 100-1500 pb, para verificar la presencia o ausencia de bandas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 MUESTREO DE LAS PARTES DE LA PLANTA.

La cuantificación del ADN mostró que las hojas jóvenes presentan la mayor cantidad al muestrear la planta con una media de 466 ng/ml y una diferencia altamente significativa (Cuadro 6). Esto se debe a que el material presenta bajos niveles de lignificación por ser tejido joven. A pesar de que los primordios foliares y los meristemas apicales son más jóvenes que las hojas, presentan una capa cerosa que los recubre lo cual dificulta el proceso de extracción en el laboratorio.

Cuadro 6. Concentraciones de ADN encontrados en el tejido muestreado.¹

Parte Muestreada	Media (ng/ml)	Separación de Medias
Hojas jóvenes	467	A
Primordios foliares	137	B
Meristemo apical	110	BC
Tallo joven	74	BC
Peciolos	57	C
Flor masculina	40	C
Flor femenina	38	C

1. Medidas con diferente letra son estadísticamente diferentes $P \leq 0.05$

3.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN

Se optimizó un protocolo para extracción de ADN que presenta cambios en tiempos y cantidades de reactivos, el protocolo seleccionado fue el PJ3, con el cual se obtuvieron altas cantidades de ADN con una media de 750 ng/ml por muestra, mostrando una diferencia significativa con los demás protocolos experimentales (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentraciones de ADN obtenidas en protocolos experimentales.¹

Protocolo	Media ng/ml	Separación de Medias
PJ3 (Intermedio – 20 PEX)	750	A
PJ4 (Inter- Lento – 20 PEX)	648	A
PJ2 (Rápido – 3 PEX)	584	A
PJ1 (Base Frijol)	557	A
PJ5 (Lento)	203	B

1. Medidas con diferente letra son estadísticamente diferentes $P \leq 0.05$

El protocolo seleccionado PJ3 emplea 20 minutos más con el reactivo PEX que el protocolo original, con un total de 80 minutos distribuidos en 20 minutos a temperatura ambiente y con dos agitaciones en el vortex y 60 minutos en baño maría a 65°C, para desnaturalizar más las proteínas del tejido vegetal, ya que es una de las etapas decisivas en la obtención de baja cantidad de ADN en las extracciones. El protocolo seleccionado tiene 20 minutos más con acetato de amonio en el periodo de precipitación y la peletización del las muestras tiene 10 minutos adicionales al protocolo original, con el fin de obtener menores residuos vegetales y pellets más firmes para las transferencias entre microtubos.

Para lograr obtener ADN sin contaminación de ARN se incubó por 70 minutos a 37°C con la enzima ARNasa, es decir 10 minutos más a lo sugerido por el protocolo inicial. La centrifugación para precipitar los residuos de la digestión de la enzima fue aumentada a 20 minutos para precipitar los residuos del tejido usado para la extracción. Al igual en las siguientes, se subió a 20 minutos en la precipitación de los ácidos nucleídos, cinco minutos en la segunda precipitación de tejidos remanentes, y siete minutos en la precipitación del ADN final, con el propósito de obtener pellets más fijos para facilidad de trabajo.

Los otros pasos del lavado y secado fueron dejados de igual forma al protocolo original, ya que al hacer cambios en ellos no varió el resultado obtenido al final.

Protocolo optimizado para la extracción de ADN de *Jatropha curcas* L.

1. Cosechar tejido fresco de plantas (8 discos con 0.5 cm de diámetro de hojas jóvenes).
2. Agregar 50 µL del buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra de plexiglás de laboratorio. Agregar 450 µl adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.
3. Dejar reposar muestras durante 20 min a temperatura ambiente con el PEX.
4. Lo más pronto posible (antes de 10 min), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 60 min.
5. Centrifugar la muestra durante 20 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejido (pellet).
6. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 50 min a temperatura ambiente.
7. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 20 min en una microcentrífuga.

8. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 350 μ l de RNAasa A (concentración de 100 μ g/ml) + buffer TE 0.1 X (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 70 min.
9. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por 5 min para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
11. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 20 min.
12. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletarlo. Centrifugar las muestras por 7 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
13. Vaciar el etanol/acetato de sodio y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
14. Colectar los pellets centrifugando por 30 segundos a 14,000 RPM.
15. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).

3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR PARA EL MARCADOR ISPJ1.

Se realizó la primera reacción de PCR utilizando una temperatura de acoplamiento de 60°C con ADN de cinco accesiones que se tenían conocimiento de su origen hindú (Figura 1). Luego de examinar los resultados, en las pruebas siguientes se utilizó la accesión “108” que presentó mayor definición en la banda de 543 pb (Figura 2 y 3).

En las dos primeras muestras se observa la banda de 543 pb, que es la medida predeterminada del marcador ISPJ1. Las dos corresponden al genotipo hindú; una presenta mejor intensidad, a pesar de tener dos pegas inespecíficas fuera del marcador a una longitud aproximada de 460 pb y a 200 pb; por tanto, se seleccionó esta accesión para realizar las siguientes pruebas usándola como control positivo. Se aumentó la temperatura de acoplamiento para eliminar las pegas fuera de la secuencia deseada.

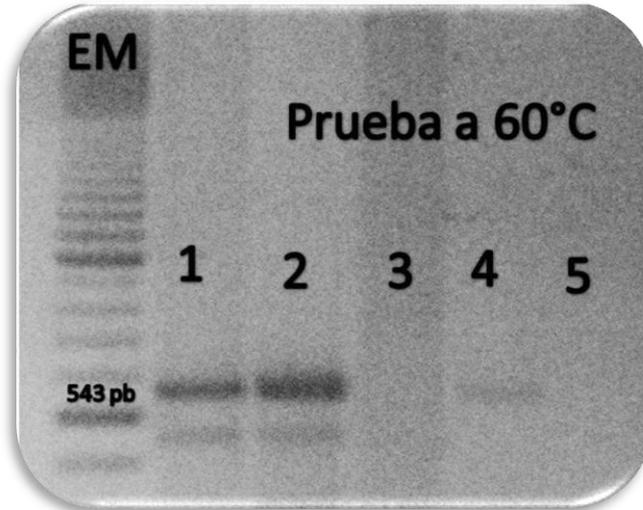


Figura 1 Resultado de la electroforesis de la primera reacción de PCR con temperatura de acoplamiento de 60°C (cinco repeticiones).

En la segunda reacción de PCR con una temperatura de acoplamiento de 61°C, se observa una buena amplificación del marcador en las cinco repeticiones de la banda de 543 pb (Figura 2). Sin embargo, esta reacción presentó pegas inespecíficas a 210, 240 y 450 pb, por lo cual se decidió subir dos grados más la temperatura de acoplamiento para eliminarlas.

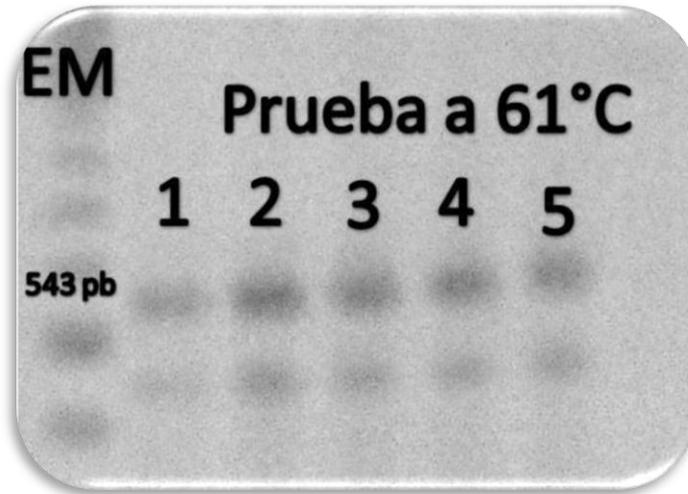


Figura 2. Resultado de la electroforesis del protocolo con temperatura de acoplamiento de 61°C (cinco repeticiones).

En la tercera reacción a 63°C se logró ver de manera definida las bandas a 543 pb en las cinco repeticiones y sin pegas inespecíficas. Las bandas son claras y bien definidas, razón

por la cual se sugirió establecer este protocolo y usar el genotipo “108” como control positivo para la validación del protocolo (Cuadro 8).

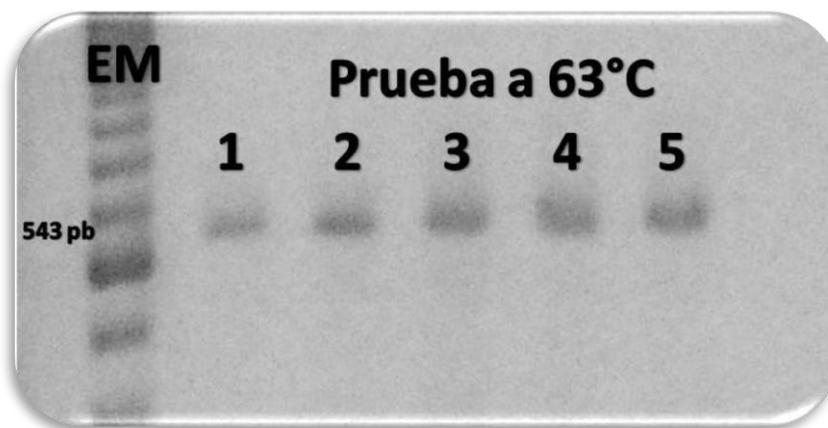


Figura 3. Resultado de la electroforesis de la tercera PCR con temperatura de acoplamiento de 63°C (cinco repeticiones).

Cuadro 8. Perfil térmico optimizado del marcador ISPJ1 a partir del protocolo del marcador SH13.

Perfil térmico	SH-13	ISPJ1
Desnaturalización inicial	94°C/30 s	94°C/30 s
Desnaturalización	94 °C/30 s	95 °C/30 s
Acoplamiento	59 °C/1 min	63°C
Elongación	72°C/ 1min 30 s	72°C/ 1 min 30s
Extensión Final	72°C/ 1 min 30 s	72°C/ 1 min 30 s
Número de ciclos	36	36

3.4 VALIDACION DE PROTOCOLO OPTIMIZADO

El protocolo optimizado para el marcador ISPJ1 fue validado con 38 accesiones de la colección de *Jatropha curcas* de la EAP Zamorano (Cuadro 1). Se utilizó como control positivo la accesión “108”. Las variedades Filomena, Arturo Araujo, Brasilia, Tanzania, 108, Jamastran, Masaya, Minas, Mali, Piñon 1, Piñon 2, Bravo × Mali, Hibrido, Embrapa,

No tóxica, 006, 014, 016 presentaron la banda del marcador ISPJ1 para la procedencia hindú con una amplificación correcta del marcador a 543 pb (Figura 4).

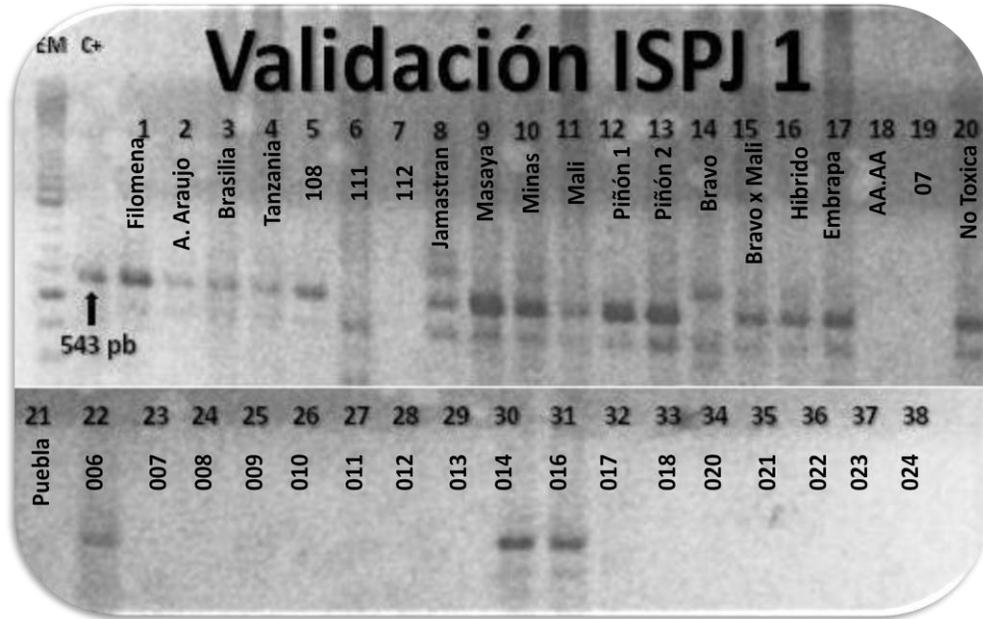


Figura 4. Resultado de la validación del protocolo ISPJ1 en 38 accesiones de la EAP Zamorano.

4. CONCLUSIONES

- Las hojas jóvenes en la planta de piñón presentaron la mayor concentración de ADN con una media de 467 ng/ml.
- El protocolo de extracción de ADN para piñón PJ3 (Intermedio – 20 PEX) extrae una cantidad promedio de 750 ng/ml de ADN por muestra, suficiente para realizar análisis moleculares.
- Se optimizó el protocolo para el marcador ISPJ1 a temperatura de acoplamiento de 63°C, el cual presentó una excelente definición de bandas a 543 bp.
- Se validó el protocolo optimizado del marcador ISPJ1 en 38 accesiones de la EAP Zamorano, encontrándose 18 genotipos positivos para el marcador usado para identificar el origen hindú.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas con marcadores que identifiquen las accesiones con posible origen Mexicano, y/o utilizar otras técnicas moleculares que permitan definir más claramente el origen de las accesiones.
- Antes de establecer un programa de mejoramiento genético con las accesiones estudiadas, se deberá hacer la caracterización morfológica, agronómica y valor industrial (aceite) de las accesiones de la colección de *Jatropha* disponible en la EAP Zamorano.

6. LITERATURA CITADA

Asante, I.K; Offei, S.K. 2003. RAPD-based genetic diversity study of fifty cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes. *Euphytica* 131:113–119.

Basha, S; Sujatha, M. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* L. characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica* 156: 375-386.

Besse, P; Seguin, M; Lebrun, P; Chevallier, MH; Nicholas, D; Lanaud, C. 1994. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 88:199-207.

Dehgan, B; Webster, GL. 1979. Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Univers. California Publ Bot* 74:1–73.

Dhakshanamoorthy, D; Selvaraj, R. 2009. Extraction of genomic DNA from *Jatropha* sp. using modified CTAB method, Department of Botany, Annamalai University, Annamalainagar, Tamilnadu, India. 2009.

Ganesh Ram, S.K; Parthiban, R; Senthil Kumar, V; Thiruvengadam, M; Paramathma, M. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55:803-809.

Henning, RK. 2006. The *Jatropha* system, integrated rural development by utilization of *Jatropha curcas* L. (JCL) as raw material and as renewable energy. www.jatropha.com

Pamidiamarri, D.V.N.S; Singh, SG; Mastan, J; Patil; Reddy, M.P. 2008. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD and AFLP and SSR markers. *Molecular Biology Reports* doi: 10.1007/s11033-008-9320-6.

Ranade AS; Srivastava AP; Rana TS; Srivastava, J; Tuli R. 2008. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR). *Methods Biomass and Bioenergy* 32: 533-540.

Rodriguez, I; Barrera, H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Unidad de laboratorios de ingeniería y expresión Genéticas. *Ciencia UANL*, Vol VII, No. 3, Julio- Septiembre.

Sakaguchi, S; Somabhi, M. 1987. Exploitation of promising crops of Northeast Thailand Siriphan Offset, Khon Kaen, Thailand, pp 50.

Sathaiah, V; Reddy, T.P. 1985. Seed protein profiles of castor (*Ricinus communis* L.) and some *Jatropha* species. Genet Agr 39:35-43.

Skroch, P; Tivang, J; Nienhuis, J. 1998. Analysis of genetics relationships using RAPD marker data. Joint Plant Breeding Sumposium Series. Minneapolis, Minnesota, USA. p26-30.

Stein, N; Herren, G; Keller B. 2001. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as *Triticum aestivum*. Plant Breeding 120:354-356.

Varghese, Y.A; Knaak, C; Sethuraj, M.R; Ecke W. 1997. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) on *Hevea brasiliensis*. Plant Breed 116:47-57.

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo Cuantificación de ADN.

1. Colocar 2 ml de buffer de cuantificación en un recipiente cúbico (cuvette) limpio y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 μL de muestra de ADN al buffer cuantificador.
3. Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.
4. Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/ml.
5. Vaciar el cubo, enjuagarlo con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

Anexo 2. Rehidratación de primers.

1. Encontrar la concentración inicial de los primers en μM :
 - Multiplicar el valor OD por el valor de nanomol (nmol) por OD, estos valores son característicos de cada primer. El valor resultante es la cantidad de nanomoles en el pellet que contiene el primer.
 - El resultado dividirlo para el valor de $\mu\text{g}'\text{s}$ (μL de agua). Se obtienen nanomoles por microlitro.
 - Convertir el resultado a picomoles/ μL $\approx \mu\text{M}$
2. Reemplazar en la ecuación $C_i V_i = C_f V_f$ para conocer el volumen inicial de primer rehidratado que se va a depositar en 500 μL de agua destilada y desionizada. Sabiendo que la concentración final buscada es 1 μM .

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN. Skroch et al. (1998).

1. Cosechar tejido fresco de plantas (6-8 mitades de hojas jóvenes).
2. Agregar 50 μ L del buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 ml. Macerar el tejido en el tubo usando una barra de plexiglás de laboratorio. Agregar 450 μ L adicionales de buffer PEX y agitar el tubo en el vortex.
3. Lo más pronto posible (antes de 1 hora), colocar los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 30-60 min.
4. Centrifugar la muestra durante 10 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga, para concentrar los residuos de tejido (*pellet*).
5. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml. Precipitar los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M. Mezclar invirtiendo los tubos y dejar precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
6. Agitar los tubos manualmente para romper el precipitado. Peletear los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.
7. Eliminar el sobrenadante. Agregar a los tubos con los pellets 300 μ l de RNAasa A (concentración de 100 μ g/ml) + buffer TE^a 0.1X (juntas). Agitar los tubos manualmente y colocarlos a incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.
8. Centrifugar las muestras a >14,000 RPM por 1 min (3 min si se desean muestras más limpias), para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
10. Precipitar el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M. Mezclar invirtiendo los tubos y permitir que se precipiten a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 min.

11. Agitar bien los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletarlo. Centrifugar las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
12. Vaciar el etanol/acetato de sodio y lavar los pellets llenando los tubos con 70% etanol; agitar manualmente.
13. Colectar los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.
14. Vaciar el etanol y secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día para el otro).