

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

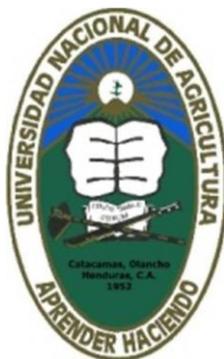
**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN *Rhizobium sp.* Y
DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES RAMs.**

POR:

DARCY LEONARDO MARTÍNEZ ZELAYA

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO**



CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS

NOVIEMBRE 2011

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN *Rhizobium sp.* Y
DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA UTILIZANDO MARCADORES
MOLECULARES RAMs.

POR:

DARCY LEONARDO MARTINEZ ZELAYA

JAIME EDUARDO MUÑOZ FLORES. I. A. Esp. Ph.D

ANDRES MAURICIO POSSO TERRANOVA, Biólogo. M.Sc.

Asesores (Colombia)

HILSY LOURDES SANABRIA ORTEGA, I.A. M.Sc.

Asesor Principal (Honduras, UNA)

TESIS

PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS

NOVIEMBRE 2011

DEDICATORIA

A mí **DIOS TODO PODEROSO**, por darme la sabiduría, fuerza y guiarme e iluminar mi camino para poder alcanzar la meta soñada.

A mis padres **Oscar Rolando Martínez Rodríguez e Ivett Emilia Zelaya Maldonado** a quienes amo con todo mi corazón, a ellos por estar siempre a mi lado cuando los necesite.

A mis Abuelitas queridas **Emelda Zelaya Maldonado y Ada De Los Angeles Rodriguez**, por cumplir todos mis caprichos mientras estuvieron con vida en Paz descansen las amo.

A mi tía **Leivy Sarahi Zelaya** y mis Hermanos **Olman Savier Martinez Zelaya, Kevin Sair Martinez, Daniela Sarahi Martinez**, A los gorditos **Jazlin Najera, y Leonardo Zelaya**, y a **mis sobrinitos gemelos** que ya pronto estarán con nosotros, siempre han estado en mi mente y en mi corazón.

A mi novia **Edissa Alejandra Valdez Cruz** por haberme brindado su apoyo incondicional y por estar conmigo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS TODOPODEROSO**, por guiarme y darme la fortaleza necesaria para poder lograr mí objetivo y llegar a la meta final porque sin él no lo hubiera logrado.

A mis padres **Oscar Rolando Martínez Rodríguez e Ivett Emilia Zelaya Maldonado** a quienes amo mucho y respeto por ser las personas que me trajeron a este mundo y por haberme enseñado a luchar por lo que se quiere lograr en la vida Dios me los bendiga siempre mis viejitos.

A mi tía **Lesvy Sarahi Zelaya**, hermanos y hermana por estar siempre pendiente de mí para apoyarme en cualquier momento de dificultades.

A mi novia **Edissa Valdez** por haber estado conmigo en los momentos buenos y en los malos.

A mis asesores **M.Sc.Hilsy Lourdes Sanabria,M.Sc. Hector Diaz y al M.Sc. José Trinidad Reyes**, por orientarme y apoyarme en la realización de este trabajo y por sus valiosos consejos basados en toda su experiencia profesional.

A mis **compañeros** de la clase **ARMAGEDON** por que han sido como hermanos para mí en esta Universidad y por su apoyo de una u otra forma, en especial primeramente al cuarto **EL PENTAGONO**: Nery Gustavo Gómez López, Edgar Ramón Ferrufino, Carlos Torres, Alex Chacón por los buenos momentos que convivimos juntos, al Grupo de los **ALBAÑILES** Carlos Carrasco R., Mauro Josué Herrera, Manuel Edgardo Reyes, Selvin Saravia, Porfirio Hernández, Ramón Ávila, Feliz Mendoza a todos los paleros de la clase se les aprecia, mis compañeros de lucha con quienes salimos a Colombia Mario Sanchez,

Guillermo López, Alexander Calix, Cecilia Pineda, Ana Pineda con quienes compartimos momentos inolvidables en ese hermoso país.

A la **Universidad Nacional de Agricultura**, por ser mi segundo hogar que me ha permitido realizar mis estudios superiores como lo es la Ingeniería agronómica y porque me ha formado un carácter muy disciplinado.

A la **Universidad Nacional de Colombia sede Palmira**, por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis en su Laboratorio de Biología Molecular y por el apoyo que recibí durante la ejecución del proyecto por el **Ph.D Jaime Eduardo Muñoz, M.Sc. Andrés Mauricio Poso** por haberme enseñado las técnicas de biología molecular y a todas las personas de ese país tan hermoso que nos atendieron de una manera muy especial.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ANEXOS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I INTRODUCCIÓN.....	1
II OBJETIVOS	3
2.1 General.	3
2.2 Específicos.....	3
III REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1 Leguminosas.....	5
4.1.1 Generalidades.....	5
4.1.2 Utilización de las leguminosas.....	6
4.1.3 Características biológicas de las leguminosas.....	6
4.2 La simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	7
4.2.1 Promedio de fijación de Nitrógeno de algunas leguminosas en Sur América.....	7
4.2.2 Inoculación con <i>Rhizobium</i>	8
4.3 Liofilización.....	9

4.4 Medios de cultivos	9
4.5 Bancos de ADN	9
4.6 Caracterización.	10
4.7 Marcadores Moleculares.	10
4.7.1 Marcadores moleculares de ADN.....	11
4.7.2 Caracterización con Marcadores Moleculares – ADN.	12
4.8 Marcador micro satélites amplificados aleatoriamente (RAMs).	12
4.8.1 Ventajas importantes del marcador RAMs.	13
4.9 Aspectos genéticos importantes para el proceso de caracterización.	14
4.9.1 Heterocigosidad.	14
4.9.2 Alelo.....	14
4.9.3 Locus:.....	14
4.9.4 Heterocigótico	14
4.9.5 Diferenciación genética	14
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Localización del sitio de estudio	15
5.2 Materiales y equipo	15
5.3 Reconocimiento del Banco de <i>Rhizobium</i> liofilizado. (CIAT).....	16
5.4 Selección de cepas	16
5.5 Preparación del medio de cultivo.....	17
5.5.1 Preparación.....	17
5.5.2 Introducción a cajas Petri.....	18
5.6 Siembra de la bacteria	19
5.6.1 Incubación	19
5.6.2 Resiembra.....	20
5.7 Preparación de reactivos para Buffer de extracciones	20
5.8 Extracción de ADN	23
5.9 Verificación de presencia de ADN en Geles de agarosa.....	24

5.10 Marcadores moleculares RAMs.....	24
5.11 Selección de cebadores RAMs polimórficos.....	25
5.12 Cebadores RAMs.....	25
5.13 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
5.14 Geles de Agarosa para PCR.....	27
5.15 Gel de Poliacrilamida en tinción con bromuro.....	28
5.16 Tinción con plata para ácidos nucleídos y proteínas.....	29
5.17 Caracterización de las cepas seleccionadas.....	29
5.18 Análisis de la información.....	30
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.1 Cepas seleccionadas.....	32
6.2 Extracción de ADN.....	32
6.2.1 Primera extracción de ADN Protocolo 1.....	33
6.2.2 Amplificación PCR.....	34
6.2.3 Segunda Extracción de ADN, Protocolo 1.....	35
6.2.4 Amplificación PCR.....	36
6.2.5 Tercera extracción de ADN, Protocolo 1.....	37
6.2.6 Proceso de amplificación PCR.....	39
6.3 Segundo protocolo de extracción para verificación de presencia de ADN.....	39
6.3.1 Primera Extracción de ADN, Protocolo 2.....	39
6.3.2 Amplificación PCR.....	40
6.3.3 Segunda Extracción de ADN, Protocolo 2.....	41
6.3.4 Amplificación de ADN en PCR.....	42
6.4 Tercer protocolo de extracción para verificar de presencia de ADN.....	44
6.4.1 Primera extracción, Protocolo 3.....	44
6.4.2 Amplificación con PCR.....	45
6.4.3 Segunda extracción, Protocolo 3.....	45
6.4.4 Amplificación en PCR.....	46
6.5 Comparación de concentraciones de ADN.....	48

6.7 Estandarización de condiciones para PCR	50
6.8 Selección de cebadores RAMs polimórficos	51
6.9 Análisis de la información	51
6.10 Heterocigosidad	55
VI CONCLUSIONES	56
VII RECOMENDACIONES	57
VIII BIBLIOGRAFIA	59
IX ANEXOS	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Especies de leguminosas que fijan N.	8
Tabla 2 Cepas seleccionadas para el estudio	16
Tabla 3 Medio de cultivo manitol.agar (LMA)	17
Tabla 4 Soluciones de reserva	18
Tabla 5 Cantidades para preparar un coctel para PCR.....	26
Tabla 6 Reacción de la cadena de polimerasa (PCR)	27
Tabla 7 Preparación de gel de Poliacrilamida en cámara Biorad	28
Tabla 8 Cepas para la primera extracción	34
Tabla 9 Cepas para la segunda extracción	36
Tabla 10 Cepas para la tercera extracción.....	37
Tabla 11 Cepas para la primera extracción del protocolo 2	40
Tabla 12 Cepas de la segunda extracción de ADN protocolo 2	42
Tabla 13 Cepas para la primera extracción del protocolo 3	44
Tabla 14 Cepas para la segunda extracción del protocolo 3	46
Tabla 15 Cuadro comparativo de los protocolos de extracción.....	49
Tabla 16 Cuadro de heterocigosidad y loci polimórfico	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Primera extracción del protocolo 1	33
Figura 2 PCR de la primera extracción protocolo 1	34
Figura 3 Segunda extracción del protocolo 1	35
Figura 4 PCR de la segunda extracción, protocolo 1	36
Figura 5 Tercera extracción, protocolo 1	37
Figura 6 Concentraciones de ADN del Protocolo N°1, según marcador Lamda.	38
Figura 8 PCR para la tercera extracción del protocolo 1	39
Figura 9 Primera extracción para el protocolo 2	39
Figura 10 PCR de la primera extracción del protocolo 2	40
Figura 11 Segunda extracción del protocolo 2	41
Figura 12 PCR de la segunda extracción del protocolo 2	42
Figura 13 Concentraciones de ADN del Protocolo N°2, según marcador molecular Lamda.	43
Figura 15 Primera extracción del protocolo 3	44
Figura 16 PCR de la primera extracción del protocolo 3	45
Figura 17 Segunda extracción para el protocolo 3	45
Figura 18 PCR de la segunda extracción del protocolo 3	46
Figura 19 Concentraciones de ADN del Protocolo N°3, según marcador molecular Lamda.	47
Figura 21 Marcador de peso molecular	48
Figura 22 Graficas de comparación entre cada uno de los protocolos	49
Figura 24 Gel de poliacrilamida para la cuantificación de alelos	50
Figura 25 Dendograma 8 cepas de Rhizobio	52
Figura 26 Agrupamiento en dimensión de las cepas.	53
Figura 27 Vista en un plano de cuadrantes para un mejor agrupamiento.	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	62
Anexo 2 Matriz de ceros (0) y unos (1) para la determinación del Coeficiente de Similitud.	63
Anexo 3 Protocolo 1 Dra. Kate Wilson (1990)	63
Anexo 4 Protocolo 2 Dra. Thies .curso de aplicación de técnicas moleculares.	64
Anexo 5 Protocolo 3 Dra. Elizabeth Álvarez para <i>Xantomonas axonopodis</i>	65
Anexo 6 Pasos para la tinción en plata para dos geles de tamaño aproximado 10 x 12 cm.	66
Anexo 7 Concentraciones de ADN del Protocolo N°1, según marcador Lambda.	67
Anexo 8 Concentración de ADN del protocolo N° 2, según marcador molecular Lambda. .	67
Anexo 9 Concentración de ADN del protocolo N°3, según marcador molecular Lambda. ..	67

Martínez Zelaya D.L. 2011 Evaluación de métodos de extracción de ADN en *Rhizobium sp.* Y determinación de la diversidad genética utilizando marcadores moleculares RAMs. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho, Honduras. pág.80

RESUMEN

El trabajo se efectuó en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, ubicada en el Valle del Cauca, en los meses del 10 de Agosto al 03 de Septiembre, con el objetivo de evaluar diferentes métodos de extracción de ADN de bacterias (*Rhizobium*) de la colección de cepas que posee el Centro Internacional de Agricultura. El cual consiste primeramente en cultivar 8 cepas de esta bacteria en medios de cultivo LMA, y realizar varias repeticiones de cada una de las cepas para tener material dispuesto y luego proseguir con la extracción de ADN, utilizando aquí 3 diferentes métodos de extracción y así poder verificar que tan aprovechables pueden resultar cada uno de ellos.

Se logró la extracción de ADN de las bacterias de manera exitosa, al momento de utilizar los 3 diferentes protocolos evaluados con las diferencias de cantidad de ADN extraído primeramente, seguido de la calidad del amplificado que mostro cada uno de estos protocolos, llevando esto a poder sacar conclusiones de cada una de las metodologías puestas a trabajar, con esto que la información obtenida pueda servir para investigadores futuros.

En los diferentes métodos de extracción, empleados para la extracción de ADN se obtuvieron resultados ya que el ADN su presencia en bajas y altas cantidades, además que estos métodos son muy económicos y fácil de emplear, por lo que se consideran estas metodologías buenas para la extracción de ADN para rizobios pero eso si que dependiendo del objetivo del trabajo, porque si es para establecer un banco de ADN el mejor protocolo es el primero que se evaluó Dra. Kate Wilson 1990.

Con las pruebas de RAM'S empleadas las especies de rizobios (8) utilizando el cebadore o primer (CCA), se observó que el ADN de las muestras observadas amplifico, el cual es un indicativo que el ADN es de buena calidad y se pueden realizar trabajos de mejoramiento con cualquiera de estos protocolos siendo el más recomendado el anteriormente mencionado.

Palabras Claves: Liofilización, Medio, ADN, CIAT.

Martínez Zelaya D.L. 2011. Evaluation of DNA extracción methods in *Rhizobium sp* and determination of genetic diversity molecular markers RAM's. Tesis Ing. National Agriculture University, Catacamas, Olancho, Honduras. Pag 80.

ABSTRACT

The present work was conducted in the Molecular Biology Laboratory of the National University of Colombia campus Palmira, located in Valle del Cauca during August 10th to September 3rd, in order to evaluate different methods of DNA isolation from bacteria (*Rhizobium*) from the collection of strains of International Center for Agricultural Research (CIAT). Eight strains were performed in order to have enough material and then we proceeded with the isolation of DNA using three different methods here so we can extract and check how profitable each result.

We achieved the isolation of DNA from bacteria successfully when using three different protocols. The differences in amount of DNA extracted first, followed by the quality of the amplified showed that each of these protocols are useful and this information obtained may assist future researchers.

In the different extraction methods used for DNA isolation results were obtained because the DNA presence in low and high quantities, these methods are also very economical and does to use, so these methods are considered good for DNA isolation from rhizobia but that does depend on the objective of the work, because if it is to establish a DNA bank is the best protocol that evaluated the first Dr. Kate Wilson 1990.

With RAM's. tests used species of rhizobia using the primers or primer (CCA) shows that the observed DNA samples amplified, which is an indication that the DNA is good quality and can be carry out improvement work with any of these protocols being the most recommended above.

Key words: Lyophilization, Culture media, DNA, CIAT.

I INTRODUCCIÓN

Los suelos de Latinoamérica se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno y tener, en términos generales, niveles bajos de fósforo y un pH ácido, lo cual, además de ser factores limitantes de la productividad de las plantas, afectarían el desarrollo de la simbiosis leguminosa-Rhizobium. En vista de esto, los científicos vislumbran la solución en el mejoramiento genotípico de las plantas y el fomento de microorganismos que favorezcan la eficiente utilización de nitrógeno y otros nutrientes.

Son varias las especies de leguminosas comestibles que se siembran en Colombia; el área que ocupan se concentra principalmente en la Región Andina y valles interandinos. Este es el primer país productor de fríjol en la Zona Andina, con alrededor de 130.000 hectáreas sembradas en 2007 y donde el primer lugar lo ocupa el fríjol común (*Phaseolus vulgaris*), con 133.720 hectáreas, mientras que en la Región Caribe, la importancia la tiene el fríjol caupi (*Vigna sp*), con 4.600 hectáreas (7,8). Entre tanto, en el país se tiene que importar fríjol, pues la demanda es más alta que la oferta, por lo que se está incentivando la siembra de esa leguminosa. (Depto. Planeación Colombia 2009)

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la fijación biológica de nitrógeno, o (FBN), y esta simbiosis aporta una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos.

Algunos rizobios tienen un rango más amplio de plantas huéspedes que otras y hay muchos problemas con este acercamiento, incluso el hecho de que existen cerca de 18.000 especies

De legumbres e incontables tipos de rizobios. La “especificidad del anfitrión” de las bacterias y plantas prácticamente ha desaparecido. (Cuadrado et al. 2009).

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer una metodología precisa y confiable para la extracción de ADN de esta bacteria con el fin de evaluar la diversidad genética que existe en la Colección Nacional de *Rhizobium* del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Palmira y su relación con la distribución geográfica, además, con el fin de utilizar el ADN en futuros trabajos de investigación. Se evaluaron los diferentes protocolos y se determinó su capacidad de extracción, en cuanto a cantidad de ADN, capacidad de amplificación de marcadores moleculares y la capacidad de durabilidad de estos a bajas temperaturas.

Los datos recolectados se evalúan normalmente por un análisis de agrupamiento, la taxonomía numérica, lo cual puede ofrecer una visión detallada de la variación de las bacterias dentro de una especie o entre diferentes especies y reconocer rasgos característicos de cada especie, siempre con la ayuda de los marcadores RAMs utilizados dentro del trabajo.

II OBJETIVOS

2.1 General.

Evaluar metodologías para la extracción de ADN de *Rhizobium sp.* De la colección de muestras liofilizadas del CIAT y establecer la diversidad genética utilizando marcadores moleculares RAMs.

2.2 Específicos.

Interpretar el protocolo que se hace para trabajar con material liofilizado.

Estandarizar los protocolos en extracción de ADN incorporando en estas cepas cebadores para verificación de la existencia de estos.

Interpretar el marcador molecular RAMs para determinar la diversidad genética y la relación que existe entre las cepas mediante un análisis de varianza.

III REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Leguminosas.

4.1.1 Generalidades.

Las leguminosas son plantas que crecen en vaina, de ellas, se consumen sus granos o semillas secas. Entre las leguminosas podemos mencionar al frijol como uno de los principales cultivos, las lentejas, el garbanzo y la soya entre las más importantes para la alimentación humana. (INCAP /OPS s.f.).

Según Lafarga y Delgado. (2,006). Al igual que en el caso de los cereales, la familia de las leguminosas es numerosa en especies: guisante, frijoles, habín, altramuza, soja, veza, lenteja, garbanzos y otras. Esta diversidad permite una notable adaptabilidad genética; por ello, cada región con sus características pedoclimáticas específicas puede cultivar una o varias especies de leguminosas con éxito.

Las leguminosas no requieren fertilizantes nitrogenados, y las evaluaciones del ciclo de vida han demostrado su valor en términos de utilización de energías fósiles y de reducción de emisiones de gases de efecto invernadero.

Su valor aumenta cuando son introducidas en sistemas de producción intensivos que requieren mayor cantidad de insumos. Además, como el mercado del carbono prevé oportunidades para la agricultura, las leguminosas podrían aportar un nuevo beneficio añadido a las explotaciones agrícolas. (Lafarga, A. Delgado, J. 2006)

4.1.2 Utilización de las leguminosas

El empleo de las leguminosas en la agricultura aparece junto con el de cereales, ya en registros arqueológicos, y el reconocimiento de que fertilizan el suelo y que tienen, por tanto, gran interés para la cosecha siguiente, se manifiesta en algunos de los escritos más antiguos de griegos, romanos, chinos y civilizaciones precolombinas. A partir de la demostración a finales del siglo pasado de que intervienen en la fijación de nitrógeno, se generaliza su uso en rotación con cereales hasta nuestros días. Las estimaciones recientes indican que contribuyen en la actualidad con más de la mitad del nitrógeno fijado por sistemas biológicos, con un aporte anual superior al de los fertilizantes químicos.

Las leguminosas se utilizan para forraje, fertilización de pastizales, obtención de aceites y grano para su consumo, y como abono verde, (IRRNNA, 1984).

4.1.3 Características biológicas de las leguminosas

Según (Redondo, M et. Al s.f.). La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa, es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Curiosamente, este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariontes. (Sprent J. y Sprent P., 1990).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehr J.P. y col., 1998). Dichas bacterias comprenden organismos fototrofos, como bacterias pertenecientes a la familia Rhodospirillaceae, Chlorobiaceae y Cyanobacteriae; organismos quimioautotrofos, como bacterias de los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio* y organismos heterotrofos como las bacterias pertenecientes a la familia Frankiaceae, al grupo Rhizobiaceae y a los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Sprent J. y Sprent P., 1990).

Estos organismos pueden realizar la fijación biológica de nitrógeno ya sea independientemente (a excepción de las rizobiáceas) o estableciendo relaciones simbióticas

con otros organismos. Son estas formas simbióticas, concretamente las establecidas entre las rizobiáceas y las leguminosas, las que antiguamente eran aprovechadas para la renovación de los suelos mediante la práctica de la rotación de cultivos; hoy en día sin embargo, desde la aparición de la “revolución verde” en agricultura, esta práctica se ha sustituido por la utilización de fertilizantes químicos a pesar del elevado coste energético y ambiental que supone. Para poder disminuir la dependencia a fertilizantes nitrogenados que está adquiriendo la agricultura mundial se han propuesto varias alternativas que abarcan desde la modificación genética de las plantas a la optimización y mejora de la fijación biológica de nitrógeno (cito Redondo M. et. Al por Vance C.P., 2001).

4.2 La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Las Leguminosas constituyen la familia de plantas con flores más numerosas, después de las gramíneas, con unos 700 géneros y 14.000 especies. Si bien la nodulación es una característica de las leguminosas en general, hay que decir que existen géneros que no forman tales estructuras. En efecto, mientras que en la subfamilia Papilionoideae, donde se incluye alfalfa, veza, soja, judía, garbanzo, se dan nódulos en un 95 por ciento de los individuos examinados, en la Caesalpinioideae no se ha encontrado nodulación en un 67 por ciento de los miembros estudiados (Allen and Allen, 1981).

4.2.1 Promedio de fijación de Nitrógeno de algunas leguminosas en Sur América.

si se tiene en cuenta que más del 50 por ciento de las leguminosas no han sido examinadas respecto de si nodulan o no, se llega a la conclusión de que el tema necesita de mayor atención. Al respecto cabe decir que muchas de las plantas que no nodulan en su ambiente natural quizás pudieran hacerlo si las condiciones fueran otras. La cantidad de nitrógeno fijado depende de la cepa o estirpe de bacteria, de la planta hospedadora, y de las condiciones ambientales, niveles de fijación que se pueden apreciar en la Tabla, (Picca, A. et. al 1,984).

Valores medios de fijación de nitrógeno de algunas leguminosas. Puede observarse, en general, que la cantidad de la fijación es mayor en las especies perennes y forrajeras que en las de grano.

Tabla 1 Especies de leguminosas que fijan N.

Leguminosa	Nitrógeno fijado Kg. N/Ha y año	Especie de rizobio
Alfalfa	200-250	<i>R. meliloti</i>
Altramuz	150	<i>R. lupini</i>
Trébol rojo	100-150	<i>R. trifolii</i>
Meliloto	100-125	<i>R. meliloti</i>
Veza	100-120	<i>R. leguminosarum</i>
Guisante	100	<i>R. leguminosarum</i>
Lenteja	100	<i>R. leguminosarum</i>
Soja	80-90	<i>R. japonicum</i>
Garbanzo	60-80	<i>R. leguminosarum</i>
Judía	50	<i>R. phaseoli</i>

Citado por (Picca, A. *et. al* 1984).

4.2.2 Inoculación con *Rhizobium*.

Si bien las leguminosas pueden estar bien noduladas y micorrizadas cuando crecen en condiciones naturales, las modificaciones introducidas por el hombre, como es el caso de monocultivos, aplicación incontrolada de fertilizantes químicos, tratamientos con pesticidas y herbicidas, etc., han causado una pérdida en la efectividad de los suelos. Por ello, la inoculación de leguminosas con microbios adecuados es de gran importancia para el desarrollo de aquéllas.

Un criterio de selección es que el rizobio forme nódulos en las raíces de la planta hospedadora bajo un amplio espectro de condiciones ambientales, muestre capacidad de competir con ventaja sobre otros rizobios no deseados, sobreviva y se multiplique en el suelo, tenga resistencia a pesticidas. (Picca, A. *et. al* 1,984).

4.3 Liofilización

El método más usado para almacenar rizobios durante periodos prolongados. En el caso de esta bacteria se suspenden en una solución de peptona-sucrosa (peptona al 10% y sucrosa al 20%; esterilizar las soluciones separadamente y luego mezclarlas) y se liofilizan en ampollas estériles rotuladas. Estas ampollas se cierran al vacío y pueden conservarse así indefinidamente. (CIAT 1990)

4.4 Medios de cultivos

Un medio de cultivo es un material alimenticio que se usa en el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos. Una vez que ha sido preparado, un medio de cultivo puede ser inoculado (es decir, se le añaden organismos) y a continuación incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. (CIAT 1990)

Los medios de cultivo deben contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y deben estar exentos de cualquier microorganismo contaminante. Los medios de cultivo contienen como mínimo: carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras. (CIAT 1990)

4.5 Bancos de ADN

Los bancos de ADN sirven para guardar pequeñas colecciones centrales de accesiones con la intención de utilizarlas repetidamente para descubrir los genes útiles que poseen. La conservación en bancos de ADN es una opción costosa de corto plazo. Debido a las dificultades de realizar la caracterización molecular de poblaciones heterogéneas, el conservar materiales en forma de ADN se justifica solo cuando se trata de accesiones que tienen valor inmediato para la investigación intensiva.

El banco de ADN sirve como fuente eficaz en cuanto al costo de muestras de ADN idénticas que se utilizan en la investigación, pero no reemplaza la conservación de las accesiones originales. La misión de un Banco Nacional de ADN es recibir, procesar y almacenar muestras de ADN, plasma y células de donantes voluntarios, así como información relevante de salud y hábitos de vida asociados a las muestras. (Carreras, J. s.f.)

4.6 Caracterización.

Se entiende por caracterización a la descripción de la variación que existe en una colección, en términos de características morfológicas y fenológicas de alta heredabilidad, es decir características cuya expresión es poco influenciada por el ambiente (Hinthum, 1995, citado por Abadie y Barrieta, 2001).

La caracterización debe permitir diferenciar a las accesiones de una especie. La evaluación comprende la descripción de la variación existente en una colección para atributos de importancia agronómica con alta influencia del ambiente, tales como rendimiento. Se realiza en diferentes localidades, variando los resultados según el ambiente, además de ocurrir interacción genotipo-ambiente. El objetivo principal de la caracterización es la identificación de las accesiones, mientras que el de la evaluación es conocer el valor agronómico de los materiales, la distinción entre ambas actividades es esencialmente de orden práctico (Cerrato I. según Abadie y Barrieta, 2001).

4.7 Marcadores Moleculares.

Tradicionalmente los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general genotipos

de fácil identificación visual, que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos, (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Sin embargo, el bajo número de estos marcadores y la posibilidad de interferencia epistática o ambiental limitaban su uso. La revolución en este plano se inicio con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos. El número de marcadores genéticos disponibles fue ampliado y la aplicación de la técnica se expandió prácticamente a todas las especies de organismos, (Ferreira y Grattapaglia. 1998).

Marcador molecular es cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada. Un marcador molecular recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige de acuerdo con las leyes básicas de la herencia mendeliana, (Yañez. 2002).

4.7.1 Marcadores moleculares de ADN.

Los marcadores de ADN constituyen la nueva generación de marcadores moleculares y solucionaron el problema de la carencia de marcadores que tenían las isoenzimas, pues son capaces de generar una cantidad virtualmente infinita de marcadores (Andrade y Solís, 2007).

Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen. Diversas técnicas de biología molecular se encuentran disponibles para detectar variabilidad en la secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas y las hibridaciones son algunas de las técnicas

que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares y cubrirla totalidad del genoma de un organismo (Carrera, *et al.* s.f.).

4.7.2 Caracterización con Marcadores Moleculares – ADN.

Son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana. Permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo. En relación a los vegetales son de utilidad en estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, identificación, protección legal de germoplasma, mapeo, selección asistida por marcadores y clonado de genes.

Para que un carácter sea considerado un marcador genético debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de la población y un modo de herencia predecible según las leyes de Mendel. Esta variación puede ser considerada a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos hasta la variación de un solo nucleótido. Un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico o variable dentro y entre especies, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos ambientales, codominante, de rápida identificación y simple análisis y de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta.

En los análisis genómicos, se han utilizado varios tipos de marcadores genéticos: morfológicos, isoenzimas, proteínas y marcadores basados en ADN. (Biotecnología y mejoramiento vegetal).

4.8 Marcador micro satélites amplificados aleatoriamente (RAMs).

Son secuencias de ADN pequeñas y repetitivas, generalmente de dos a tres nucleótidos, que pueden estar o no asociados con genes. Las unidades repetitivas no codifican para formar proteína y probablemente esto se debe a que las secuencias de ADN repetitivo consiguen recombinarse y transmitirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias siendo variables y medibles entre especies (Zietkiewicz *et al.* 1994, citado por Lavaire,

2009). Son secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidas una y otra vez (*tandems*) que existen en forma abundante en plantas (Según Cerrato, I. citado por Becerra y Paredes, 2000).

Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. Combinan varias ventajas como son su codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad. El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados (Becerra y Paredes, 2000).

Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en RAPD. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicos y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas. En general, la amplificación de micro satélites ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD (Becerra y Paredes, 2000).

4.8.1 Ventajas importantes del marcador RAMs.

Una de las ventajas de la técnica RAM es que se pueden separar los productos amplificados utilizando geles de agarosa al 1.2% y visualizar en un transiluminador con luz ultravioleta. También se pueden separar en geles de poliacrilamida para obtener una alta resolución y mejor separación de los fragmentos, obteniendo mayor número de bandas por marcador.

El número de bandas polimórficas posiblemente se vea afectada por la técnica de electroforesis utilizada, especialmente por el polímero empleado para la creación de la matriz porosa a través de la cual se separan los fragmentos generados en la amplificación. En el trabajo realizado en mora (*Rubus spp.*) se generaron 43 bandas polimórficas utilizando seis primers RAM en geles de agarosa. En el trabajo de caracterización de guayaba (*Psidium guajava*) realizada por Sanabria *et al.* 2006, se utilizaron los mismos primer mencionados anteriormente, usando geles de poliacrilamida encontrándose así 74 bandas

polimórficas, superior a un trabajo realizado en *Psidium spp* por Rueda *et al.* 2006 con marcadores RAPD (Morillo *et al.* 2008).

4.9 Aspectos genéticos importantes para el proceso de caracterización.

4.9.1 Heterocigosidad.

Frecuencia media de individuos heterocigotos por locus o, frecuencia media de loci heterocigóticos por individuo. Primero se averigua cuantos individuos son heterocigotos en cada locus estudiado. (Wikipedia, enciclopedia libre).

4.9.2 Alelo.

Cada una de las formas diferentes de un gen. Las distintas longitudes de repeticiones de STR representan alelos diferentes en un locus genético.

4.9.3 Locus:

La posición, dentro de un cromosoma concreto, en la cual se sitúan los distintos alelos de un marcador genético. El plural es **loci**.

4.9.4 Heterocigótico

Los dos o más alelos de un locus son dife **Heterocigótico**. Los diferentes alelos de un locus son diferentes (Proyecto Biológico. 2000).

4.9.5 Diferenciación genética

Es el estudio de las poblaciones desde el punto de vista genético considerando la aplicación de las leyes de Mendel y otros principios genéticos, para el estudio de los cambios en las frecuencias génicas. La diversidad genética observada es el resultado de: Selección, Mutación, Migración, Recombinación y Deriva genética. Estos llevan a cambio de frecuencias genéticas y genotípicas, lo que implica la evolución de las poblaciones. (Proyecto biológico. 2000).

IV MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del sitio de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) y en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Municipio del Departamento Colombiano del Valle de Cauca. Latitud 03° 31'48" N y longitud 76° 18'13"O. Se encuentra a una altura de 1,001 msnm. y tiene una temperatura promedio de 23°C, con precipitación media anual que alcanza valores de 2,000 mm a 2,100 mm (Microsoft ® Encarta ®, 2008, citado por Lavaire, 2009).

El trabajo se realizó en el período comprendido entre el 11 de Junio y el 4 de Septiembre del 2011 y consistió en la evaluación y validación de tres protocolos de extracción de ADN en cepas de *Rhizobium* liofilizadas establecidas en el CIAT. utilizando marcadores RAMs, para verificar así que el ADN que se extrajo puede amplificarse dentro del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

5.2 Materiales y equipo

Para la extracción del ADN se requirió del siguiente equipo: cámara de flujo laminar, Asas, Rastrillos de asa, platos petri, mechero, Micropipetas (5000, 1000, 200, 100, 20, 10, 2 µl), puntas para micropipetas amarillas, blancas y azules, termociclador, marcador permanente, vortex, frascos eppendorf, frascos de 1.5 ml y para PCR, gradilla, servilletas de limpieza, alcohol, cámara de electroferésis horizontal y vertical, pipeta Pasteur, tijeras, balanza analítica, papel parafilm. Entre los materiales y sustancias utilizadas están: Medio LMA (medio de cultivo específico), Agua MQ, buffer TE, SDS 10%, proteinasa K, buffer de extracción CTAB/NaCl, Cloroformo isoamil, Isopropanol, etanol 70%, Agua dfe (destilada, filtrada, y esterilizada) NaCl 1M Y 5M, fenol cloroformo, MgCl₂, DNTPs (TG.

GT, AG), Taq DNA polimerasa, ADN del *Rhizobium*, agarosa, TBE 5x, bromuro de Etidio, poliacrilamida, Persulfato de Amonio, Temed, vaselina, BSA (albumina sérica bovina), azul de Bromofenol, ADN de bacteriófago lambda y Marcador de peso molecular.

5.3 Reconocimiento del Banco de *Rhizobium* liofilizado. (CIAT)

Primeramente se procedió al reconocimiento del banco de Rhizobios, que está ubicado en el Centro Internacional de Agricultura (CIAT). el cual posee 4,247 cepas en existencia recolectadas a nivel mundial recolectadas desde 1,984 respectivamente. Dentro de las plantas que se extrajeron estas bacterias existen al menos 65 géneros, y 195 especies de estas leguminosas específicamente liofilizadas. (CIAT. Catálogo de cepas de Rizobio para leguminosas forrajeras tropicales).

Dicho catalogo tiene como propósito dar a conocer a los investigadores interesados en trabajar con leguminosas y con caracterizaciones a nivel de bacterias, ubicación de estas entre otros tantos trabajos que se pueden realizar con las mismas.

5.4 Selección de cepas

Dentro de más de 5,000 cepas que posee el CIAT, seleccionaron principalmente de las más abundantes que existen dentro del banco. Se seleccionaron 8 cepas para reproducirlas en medios de cultivo y poder extraer una mayor cantidad. (Tabla 2)

Tabla 2 Cepas seleccionadas para el estudio

N.	Numero de cepa	Huesped	Depto. De recolección	Localización
1	CIAT 299	<i>Desmodium intortum</i>	Valle (Colombia)	Palmira
2	CIAT 2,295	<i>Stylosanthes guineanensis</i>	Par. (Brasil)	Belén CPATV
3	CIAT 593	<i>Centrosema sp.</i>	México	
4	CIAT 192	<i>Stizolobium deeringianu</i>	Córdova (Colombia)	Turipana
5	CIAT 102	<i>Crotalaria recta</i>	Zim.	Marandellas
6	CIAT 4, 862	<i>Medicago sativa</i>	Brasil	
7	CIAT 3,934	<i>Leucaena leucocephd</i>	Cuba	
8	CIAT 5,079	<i>Cajanus cajan</i>	Colombia	

(CIAT. Catálogo de cepas de Rizobio para leguminosas forrajeras tropicales).

Estas fueron las cepas seleccionadas para la realización de este trabajo, que son más que suficiente dado a que estas se reproducirán en varias repeticiones para poder corroborar cada uno de los protocolos de extracción de esta bacteria.

5.5 Preparación del medio de cultivo

Antes de someter las cepas hay que realizar el medio de cultivo, en este caso un medio específico para la reproducción del *Rhizobium*.

Según (CIAT) El medio de cultivo se preparó de la siguiente manera. (Tabla 3).

Tabla 3 Medio de cultivo manitol.agar (LMA)

Componentes	Cantidades
Manitol	10.0 g
Agua de levadura ó extracto de levadura	100.0 ml
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃ *6H ₂ O	0.01 g
CaCl ₂	0.15 g
Agar (Difco-Bacto):	
Medio neutro	15.0 g
Medio ácido	20.0 g
Solucion indicadora de Ph ó solución de rojo congo	5.0 ml
Agua destilada, agragar hasta.	1000.0 ml

5.5.1 Preparación

Se hierve el medio hasta disolver el agua, agitando de vez, en cuando. Después se esteriliza en el autoclave, y se corrige su Ph a 6.8 – 1 ml de NaOH 0.5 estéril, o se acidifica según sea el caso.

Cuando se preparan cantidades grandes del medio como en este caso, es conveniente usar soluciones de reserva (stock) de algunos de los reactivos preparados con anterioridad en CIAT. Según muestra tabla 4.

Tabla 4 Soluciones de reserva

Solución stock	Reactivos	Concentración g/lt	ml/lt de medio
A	K ₂ HPO ₄	50	10
B	MgSO ₄ *7H ₂ O	10	
	NaCl	20	10
C	CaCl ₂	15	10
D	FeCl ₃ *6H ₂ O	10	1

Para preparar 1 litro del medio, se mezclaron los volúmenes indicados de las soluciones stock en el manitol del agua de levadura y el agua destilada.

Después que se tiene el agar preparado según muestra la tabla 3, esta se lleva a una autoclave para procesos de desinfección total y esterilización. Al salir este se deja enfriar a aproximadamente 50°C para tomarle el Ph y verificar si está en el punto óptimo que es de 6.8 Ph para distribuirlo en las cajas petri, esto dado a que el agar se gelifica a 44°C .Se obtuvieron variaciones en las preparaciones de 7.9 la primera y de 8. 16 de Ph en los medios elaborados pero este se bajó con la ayuda de HCL el cual disminuye el Ph en un rango de 0.45 a 0.80 de Ph. con un promedio de 0.60 Ph por cada 100ul (micro litros) que se introduzca a la solución. Esto medido en un pH metro.

5.5.2 Introducción a cajas Petri

Se elabora la distribución en las cajas petri de vidrio debidamente esterilizadas, estas con volúmenes de 30-40 ml de capacidad, y del medio introducir de 20.25 ml. Estas se dejan que gelifiquen hasta el día siguiente para luego proseguir con la metodología.

5.6 Siembra de la bacteria

Primeramente tener lista la Peptona al 0.1%, u otro caldo estéril. Para poder extraer las bacterias liofilizadas de las ampollas. Las ampollas donde se encuentran las bacterias liofilizadas (estas están cerradas al vacío) se rompen con la ayuda de una lima triangular; por la mitad de la zona donde está el tampón de algodón.

Luego que esta se rompió se procedió al proceso de extraer la bacteria, agregando de 3.5 gota de peptona 0.1% con una pipeta pasteur, siempre tratando de bañar las paredes de la ampolla con la solución para recuperar todas las células de rizobios que están en la misma.

Luego de una pequeña mezcla y tratando de no dañar el rotulo de la ampolla, se extrajo la solución o suspensión de la ampolla con la misma pipeta pasteur y se colocó una gota en cada caja petri que contienen el medio LMA. A un Ph de 6.8 esto porque las bacterias lo requieren para acelerar su crecimiento. Se elaboraron 3 repeticiones de cada una de las bacterias, esto siempre desinfectando y esterilizando los instrumentos utilizados.

Luego la gota dentro de la caja petri se riega con el asa realizando una distribución en en toda la caja petri comenzando por las orillas, esto se hace 3 veces en las orillas hasta llegar a un sic sac hacia el centro de la misma.

Las cajas petri se sellas con papel parafil para evitar la contaminación de otro tipo de organismo dentro de la caja petri.

5.6.1 Incubación

Una vez que se realiza el protocolo anterior se procede a la incubación de las cajas petri a una temperatura de 28°C las cuales estuvieron alrededor de 8-10 días, y las últimas muestras hasta los 15 días.

5.6.2 Resiembra

Luego que en estas cajas petri ya se notan las colonias muy bien se procedió a la realización de nuevas siembras ahora partiendo de colonias ya crecidas. El procedimiento pues es similar solo que en este caso se toma una colonia de la caja petri ya crecida y se distribuye con el asa en otra caja que contiene el medio LMA.

Y así igualmente la realización de 2 repeticiones por cada una de las cajas seleccionadas y dejar incubando a la temperatura anteriormente escrita. Y se pueden cultivar muchísimas muestras de estas bacterias y de cualquier otra.

5.7 Preparación de reactivos para Buffer de extracciones

Para iniciar el proceso de extracción antes se debe preparar los reactivos para el Buffer el cual necesita de reactivos madre como ser: CTAB/NaCl; EDTA 0.5M pH 8.0; NaCl 5M, y 1M, Acetato de potasio, los que se preparan utilizando la siguiente fórmula: entre otros

$$PM \times [] \times Vol. (Lts.) = gr.$$

Dónde:

PM= Peso Molecular

[] = Concentración del reactivo

Vol. = Volumen a preparar

Tris HCL 1M a pH 8.0

$$121.14 \frac{gr.}{Mol} \times 1 \frac{Mol}{litro} \times 0.1lts. = 12.114gr.$$

Se agregan 70 ml de H₂O en un Beaker de 100 ml luego se agrega el tris y se lleva hasta 100 ml. El pH inicial es de 10.8 pero se llevó a 8.0 agregando ácido clorhídrico líquido. (Sambrook *et al* 1989)

EDTA 0.5M a pH de 8.0

$$372.24 \frac{\text{gr.}}{\text{Mol}} \times 0.5 \frac{\text{Mol}}{\text{litro}} \times 0.1\text{ts.} = 18.612\text{gr.}$$

El pH inicial es de 6.0 pero se lleva a 8.0 agregando hidróxido de sodio en perlitas y se completa el volumen a 100 ml con agua de tipo HPLC. (Sambrook *et al* 1989)

NaCl 1M

$$58.44 \frac{\text{gr.}}{\text{Mol}} \times 1 \frac{\text{Mol}}{\text{litro}} \times 0.05\text{ts.} = 2.922\text{gr.}$$

NaCl 5M

$$58.44 \frac{\text{gr.}}{\text{Mol}} \times 5 \frac{\text{Mol}}{\text{litro}} \times 0.05\text{ts.} = 14.61\text{gr.}$$

El volumen se lleva a 50 ml agregando H₂O tipo HPLC. (Sambrook *et al* 1989)

Acetato de Potasio

$$111 \frac{\text{gr.}}{\text{Mol}} \times 3 \frac{\text{Mol}}{\text{litro}} \times 0.05\text{ts.} = ??? \text{gr.}$$

Luego se llevan las soluciones madre a la autoclave para esterilizar, este proceso dura aproximadamente 40 – 50 min.

CTAB/NaCl (50ml)

Disolver 205 g de NaCl en 20 de agua y despacio adherir o ingresar 5g de CTAB (Hexadecyl trimety ammonium broide) y completar a 50 ml. Y refrigerar hasta el día siguiente. (Wilson 1990).

Cloroformo isoamil alcohol (C: I)

Para realizar esta solución es a una proporción de 20:1 respectivamente y dependiendo lo que prepare. En este 100 ml de Cloroformo y de isoamilico será de

20 100%

1 X

X= 5

$100 * 0.05 = 5$ ml de ácido isoamilico. (Sambrook *et al* 1989)

Agua dfe.

No es más que agua destilada, filtrada y esterilizada.

Para esto se toma agua mQ que es agua doblemente filtrada y desionizada y se pasa por el autoclave para poder esterilizarla. Más o menos de 40 a 45 min. (Posso 2011)

Azul de carga.

60% Glicerol en agua

10 mg de azul de bromofenil

10 ml 100%

X 60%

X= 6ml se prepararon

6 ml de Glicerol más 10 mg de azul de bromofenil 4 ml de agua. .(Sambrook *et al* 1989)

PRIMER CCA

9m µl de agua Mq y 1 µl del primer.

BSA

10 mg de BSA granulado

TBE 5X

54 gr de tris base

27.5 gr Ácido bórico

Se completan con 800ml de agua destilada y mientras se mezclan los ingredientes se agrega 20ml de EDTA 0.5M luego llevar el Ph a 8.0 cuando haya una mezcla homogénea se completa la mezcla hasta 1000ml.

Una vez que estén listas las soluciones madres y otros reactivos necesarios se procedió a iniciar los protocolos de extracción. Que son los siguientes.

5.8 Extracción de ADN

La extracción de ADN que en este trabajo es uno de los principales factores a evaluar se realizaron 3 protocolos diferentes anteriormente utilizados pero que no han seguido llevando a cabo en la ciencia durante ya varios años.

Uno de los primeros que se utilizo fue el protocolo de la Dra. Kate Wilson 1990 el cual se definió como protocolo N° 1 para poder identificarlos por una numeración hasta en el momento de utilizarlos según lo muestra el anexo N°3, este protocolo se elaboró 3 veces con las 3 repeticiones de cada una de las cepas anteriormente mencionadas.

El segundo protocolo que se utilizo fue el protocolo elaborado por la Dra. Thies en un curso de aplicación de técnicas moleculares en bacterias según lo describe el anexo N°4, Este protocolo se realizó por 2 veces para su verificación con diferentes muestras de las cepas.

Y el tercer y último protocolo fue el de la Dra. Elizabeth Álvarez este utilizado en *Xantomonas axonopolis* (también fue utilizado por el CIAT en 1967 por primera vez para extraer ADN de rizobios y este funciona) según muestra el anexo N°5. Igualmente que el protocolo anterior este se realizó por 2 ocasiones siempre para corroborar el proceso de extracción, con algunas muestras de las repeticiones.

5.9 Verificación de presencia de ADN en Geles de agarosa.

Para la verificación de la presencia de ADN primeramente se realizaron geles de agarosa al 1.2 % para observar si se extrajo el ADN de cada uno de los protocolos anteriormente descritos, esto con el apoyo del marcador molecular comercial lamda Fig. N°15

Se prepara el gel para una cámara de 40ml en este caso,

40 ml de TBE 5X y 0.48 g de agarosa

Luego calentar la solución para homogenizar y diluir la agarosa, agregar 1 μ l de bromuro, y depositarlo en la cámara de electroforesis, con sus respectivos peines para que así se formen los posos y dejar que esta polimerice.

Depositar 1 μ l de azul de carga en un papel parafil por cada muestra de ADN, y del ADN de cada protocolo tomar 2 μ l, mezclarlo y depositar cada muestra en un poso diferente, y dejar correr la cámara de Electroforesis por:

Un tiempo de 40 minutos, 80 Voltios y 400 mA.

Observar la presencia de ADN, colocando luego de que termino de correr las muestras en la cámara, utilizando un Transluminador, manejado por una PC, colocar el gel, tomar la foto y así se verifica si existe ADN, si hay mucho, poco o nada de ADN, esto dependiendo de la concentración que exista comparándolas con el marcador molecular comercial Lamda.

5.10 Marcadores moleculares RAMs

Para la estandarización de las condiciones del cebador (RAMs) a seleccionar, se preparó una mezcla de reactivos en un tubo estéril de micro-centrífuga (1,5 ml) para un volumen final de 12.5 μ l. El cebador utilizado en este caso se probó con las muestras seleccionadas. La amplificación se realizó en un termociclador, y así se verifica en realidad si existe ADN de cada uno de los protocolos evaluados, si las muestras amplifican correctamente entonces quiere decir que el protocolo en verdad funciona, sin mencionar cantidad de ADN extraído de cada uno de ellos.

El RAMs se hizo prácticamente para amplificar áreas del ADN y así verificar si existe la presencia de ADN para esto primeramente se debe de realizar un coctel de soluciones necesarias para la PCR, para que este pueda amplificar muy bien. Todas las sustancias son necesarias para este proceso de amplificación, ninguna debe estar contaminada, y prepararlos en sus condiciones óptimas y siempre dentro de una cámara de preparación, para evitar todo tipo de contaminación

Todos los cocteles realizados están en las mismas condiciones para las muestras de cada uno de los protocolos.

5.11 Selección de cebadores RAMs polimórficos

Se dispuso de cebadores o primers RAMs polimórficos para la especie, lo cual permitió realizar análisis de diversidad de una manera ágil y simplificada.

5.12 Cebadores RAMs

Se evaluó un solo cebador RAMs a temperaturas de hibridación. Para cada uno de los cebadores, las temperaturas correspondientes son las siguientes:

AG-CA-ACA	50°C
CCA-TG-CT	55°C
GT-CGA	58°C

En este caso el cebador que se utilizo fue el CCA y la temperatura que se utilizó para el proceso PCR fue de 55°C.

Para realizar la PCR será necesario la preparación de un coctel en el cual se tomará en cuenta que todos los instrumentos estuvieran debidamente esterilizados (previamente auto lavados y secados al horno) de forma adecuada al igual que el área de trabajo. Los pasos para la preparación del coctel será el siguiente: (Tabla 5).

Tabla 5 Cantidades para preparar un coctel para PCR.

Reactivo	Volumen (µl)	N. de muestras	Total
Buffer taq	1.25	18	22.5
DNTPs	2	18	36
PRIMER	1	18	18
MgCl₂	1.25	18	22.5
BSA	1	18	18
ADN	2		
TAQ POLIM.	0.1	18	1.8
H₂O	3.9	18	70.2
TOTAL	12.5	18	225

(Posso, 2009).

Siempre es necesario colocar 2 muestras más para la elaboración del coctel una por el testigo que se coloca y otra por las pérdidas en los pipeteados y lo que queda en el tubo.

dNTP's: dinucleotido trifosfatado (A,G,C,T)

Taq Polimerasa: síntesis de ADN extendido la cadena de 5' a 3'.

Buffer Taq: mantiene el pH del coctel.

MgCl₂: es un cofactor de la Taq polimerasa.

Cebador: es el indicador de la secuencia.

BSA: es una proteína del suero bovino que ayuda a relajar el ADN inactivando los inhibidores de la Taq Polimerasa.

Cada uno de estos reactivos sirve para que se obtengan las condiciones necesarias para PCR por lo que se trabajó de manera que se conservaran en óptimas condiciones, el trabajo se realizó con diferentes muestras. El número de muestras se multiplicaron por los micro-litros (µl) requeridos de cada reactivo, el testigo estuvo conformado por el coctel puro (sin el ADN) por lo que si en la electroforesis este amplificada, significaría que hay una posible contaminación o algún reactivo está en mal estado.

5.13 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la reacción en cadena de la polimerasa se tomaron en cuenta todos los factores importantes para su realización como la preparación del coctel, el cebadore a utilizar tanto como los materiales para el proceso de visualización del amplificado. (Posso, A. 2009).
Programable Termal Controller de MJ Research, Inc. Que siempre se utiliza en la PCR.

Y en este caso y para este determinado Cebador (CCA) será el siguiente. (Tabla 6).

Tabla 6 Reacción de la cadena de polimerasa (PCR)

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	5 min
Desnaturalización normal	95	30 seg
Hibridación	55 (dep. cebador)	45 seg
Extensión	72	2 min
37 veces (go too)		
Extensión final	72	7 min
For ever	16	

(Posso, A. 2009).

El producto amplificado se observará mediante electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida respectivamente (Posso, A. 2011)

5.14 Geles de Agarosa para PCR

Al terminar el proceso de PCR se preparó el gel de agarosa al 1.2% el cual contiene cantidades de agarosa y solución TBE 5X dependiendo de la cámara de electroforesis a montar, en dicho trabajo se utilizaron varias de estas, y agregar siempre 1 µl de bromuro para la ayuda a visualizar al momento de ver las bandas en el gel.

Montar las muestras siempre colocando el testigo de primero o al final, dejar correr por 40 minutos, a 80 voltios y 400 mA.

Este luego se cerficó en el transluminador si el ADN logro amplificar en la PCR y así llevar las muestras hasta un gel de poliacrilamida que es donde mejor se notan las bandas y así poder realizar la caracterización de estas 8 cepas solamente como un protocolo para verificar si este ADN es capaz de sufrir todos estos pasos para en un futuro poder utilizar uno de estos protocolos.

5.15 Gel de Poliacrilamida en tinción con bromuro

Se procedió a la elaboración de geles de poliacrilamida para poder obtener una mejor lectura de las bandas para la identificación de cada alelo, y así poder a partir de ahí sacar conclusiones acerca de las cepas evaluadas y también poder proseguir hasta llevar estas muestras a una tinción en plata.

El proceso para la elaboración de estos geles es: Primeramente desinfectar con alcohol los vidrios, armar los vidrios (colocando cintas especiales para sellar estos), prensar los vidrios para que no derrame la solución, preparación de la solución. (Tabla 7).

Tabla 7 Preparación de gel de Poliacrilamida en cámara Biorad

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN 7%
TBE 5x (ml)	5
Poliacrilamida 37:1 (ml)	4.6
Persulfato 10% (µl)	150
Temed (µl)	25
Agua (ml)	15

(Sambrook *et al* 1989).

La solución se introduce al vidrio antes armado con cuidado que no queden burbujas dentro de este, luego que esta la solución dentro se procedió a colocar los peines para construir los posos donde se colocaran las muestras de la amplificación del ADN, esto se debe hacer lo más ligero posible antes de que la solución se polimerice. Al tener todo listo se debe esperar alrededor de 15 a 20 minutos hasta que el gel se polimerice completamente. Se

extraen los peines y montar las muestras igual siempre utilizando el azul de carga (azul de metilo) 1 μ l y 5 μ l del ADN amplificado.

Dejar correr la cámara de electroforesis vertical por.

Voltios	140
Tiempo	1.10 horas
mA	400

Al salir el gel preparar unos 200ml de agua con 3 μ l de bromuro y dejarlos en agitación por 10 minutos, luego agregar los geles de poliacrilamida que salieron de la cámara de electroforesis y dejar otros 10 minutos, esto se hace para poder observar muy bien las bandas del gel al momento de colocarla en el transluminador. Y al finalizar tomar la foto, observar y la lectura del gel.

5.16 Tinción con plata para ácidos nucleídos y proteínas

Esta tinción se puede realizar directamente luego de preparar el gel de poliacrilamida y que este haya corrido en la cámara de electroforesis, pero en este caso y para un mejor aprovechamiento del tiempo y trabajo, se utilizaron los geles que sometimos en bromuro, para hacer esto luego que se verifico su amplificación con bromuro; estos geles se deben dejar en agua destilada toda la noche para poder limpiar el gel del bromuro y evitar contaminación y que la tinción en plata pueda salir muy bien según muestra el protocolo en el anexo N° 6.

5.17 Caracterización de las cepas seleccionadas

Caracterización de cepas establecidas, permitiendo conocer la diversidad genética en relación a su distribución geográfica y el huésped de estas, concluyendo con las accesiones de ADN que se extrajeron en este caso, este permitirá disponer de una base de datos completa y detallada de los materiales seleccionados. Además, los protocolos evaluados permitirán adelantar trabajos futuros en trabajar con forrajes tropicales, diversidad y

detección de genes de interés comercial mediante herramientas de biología molecular. (Sanabria, H. 2011)

5.18 Análisis de la información

Para el análisis de la información se desarrollaron las siguientes metodologías: Construcción de matriz de ceros (0) y unos (1) para la determinación del Coeficiente de Similitud de Nei-Li anexo N°2, para el estudio de individuos también conocida como similitud de Dice cuya fórmula es:

$$S_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Dónde:

S_{ij} = Similitud entre el individuo i y el j.

a= Número de bandas presentes simultáneamente en los individuos i y j.

b= Número de bandas presentes en i y ausentes en j.

c= Número de bandas presentes en j y ausentes en i.

El coeficiente de Dice omite la consideración de pares negativos (0-0) y da doble peso a los pares positivos (1-1), lo que hace útil en términos de similitud del ADN, en que la ausencia compartida de una banda no es necesariamente indicación de similitud entre dos individuos.

Se construyó la matriz binaria (cero: ausencia de bandas, uno: presencia de bandas) en la cual las accesiones forman las filas y las columnas las bandas evaluadas en cada uno de ellos. La matriz de similitud Fig N°18, se construyó con el programa SIMQUAL (Morillo *et al.* 2008).

Se utilizó el Método de Clasificación de distancia (o similitud) media UPGMA (Unweighted Pair-Group Methodwith Arithmeticmeans); con el cual se construyo un dendrograma Fig. N°18 que agrupo las accesiones evaluadas; se realizó un análisis de

Correspondencia Múltiple para realizar una representación multidimensional del grupo de individuos con características descriptivas de ellos en un plano; se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en el cual se verificó las relaciones entre los grupos formados; se calcularon los valores de heterocigosidad Esperada, % de loci polimórfico y Coeficiente de Diferenciación Genética (F_{st}) para determinar el grado de variabilidad existente en los materiales de la Colección. Se utilizaron los programas NTSys y TFPGA para la determinación de los parámetros anteriores.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cepas seleccionadas

Se seleccionaron 8 cepas de Rizobio liofilizadas que están ubicadas en el CIAT colectadas en varias partes del mundo que dispone de una base de datos completa y detallada de los materiales colectados el cual sirvió para obtener muchos resultados, y poder comparar a nivel mundial tanto las plantas en que están ubicadas estas bacterias según muestra la Tabla N°2, como la caracterización de cada una de ellas, en este caso las 8 bacterias seleccionadas son de las más abundantes que se encontraban en este banco, para su crecimiento en agar específico LMA, a un Ph de 6.8 que es un Ph que acelera el crecimiento de estas bacterias, dichas bacterias obtuvieron un crecimiento muy bueno entre 9-15 días, y luego poder trabajar con estas.

6.2 Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó mediante 3 protocolos que el CIAT había utilizado hace muchos años. Estos con algunas pequeñas modificaciones del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia. Se decidió utilizar estas metodologías ya que no se ha trabajado con estas bacterias y así poder dejar un protocolo de extracción base para estas dos instituciones, y además son métodos muy económicos y prácticos.

Esto se hizo para dejar el protocolo más completo, preciso y eficiente de los tres, y así poder realizar trabajos futuros sin necesidad de estar corroborando estos protocolos.

Para esto se tomaron las primeras Tabla N°8 muestras de las bacterias ya crecidas, se realizó el primer protocolo (Dra. Kate Wilson) Anexo N° 3 anteriormente mencionado este se realizó siguiendo cuidadosamente los pasos y se obtuvo lo siguiente.

6.2.1 Primera extracción de ADN Protocolo 1

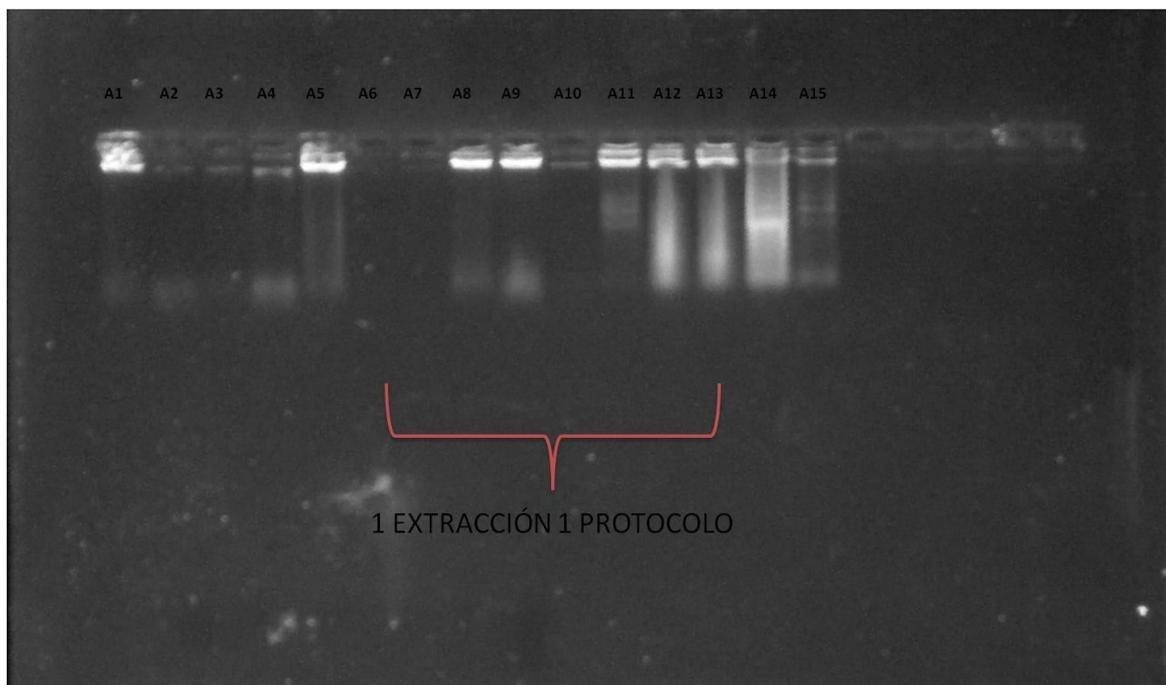


Figura 1 Primera extracción del protocolo 1

Primeras 15 extracciones de ADN. Se pueden observar la presencia del ADN el cual es primer banda bien definida que se puede observar en la mayoría de las muestras, y lo demás que se logra a ver como una barrida son partículas de ARN la cual no la necesitamos, pero que si se comprueba que se realizó correctamente la extracción de ADN en la primer extracción del primer protocolo. Se puede apreciar correctamente el ADN solo que no sabemos en qué cantidades se encuentra y aún en los posos que no se logra ver bien definida la banda puede haber ADN en estas accesiones, lo cual solo se comprueba en una amplificación PCR.

Tabla 8 Cepas para la primera extracción

Identificación	N. Cepa	Repetición
A1	CIAT 192	1
A2	CIAT 192	2
A3	CIAT 102	1
A4	CIAT 102	2
A5	CIAT 299	1
A6	CIAT299	2
A7	CIAT 593	1
A8	CIAT 2195	1
A9	CIAT 2195	2
A10	CIAT 4862	1
A11	CIAT 4862	3
A12	CIAT 5079	2
A13	CIAT 5079	3
A14	CIAT 3934	1
A15	CIAT3934	3

6.2.2 Amplificación PCR

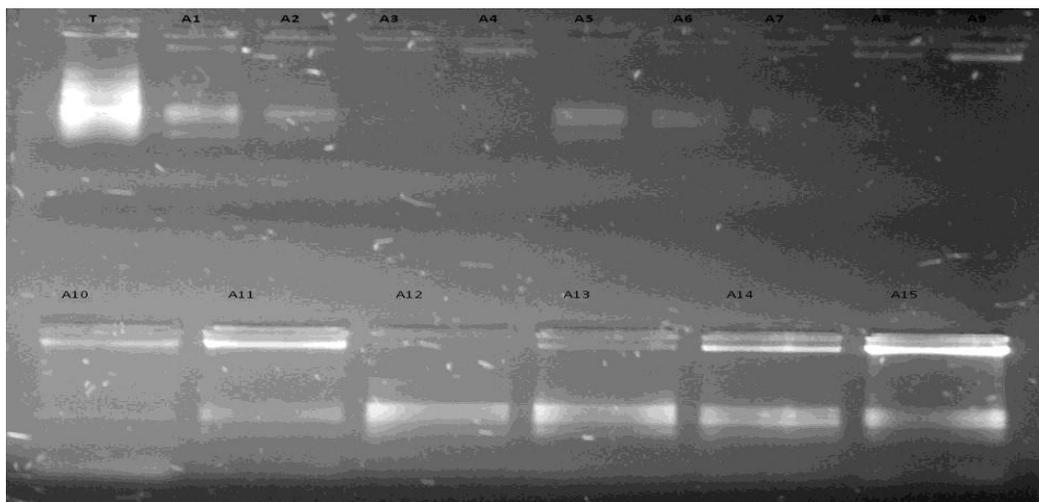


Figura 2 PCR de la primera extracción protocolo 1

En esta primer amplificación no se notaron muy bien las bandas, pero si se nota que amplifico bien las muestras, aunque hubo algún error en algún proceso realizado o en las concentraciones aplicadas para esta, se verificara en las siguientes amplificaciones de este protocolo inicial para así poder tomar una decisión en cuanto a este proceso de

amplificación PCR con RMAs que es el más importante para trabajos de Biología molecular.

6.2.3 Segunda Extracción de ADN, Protocolo 1

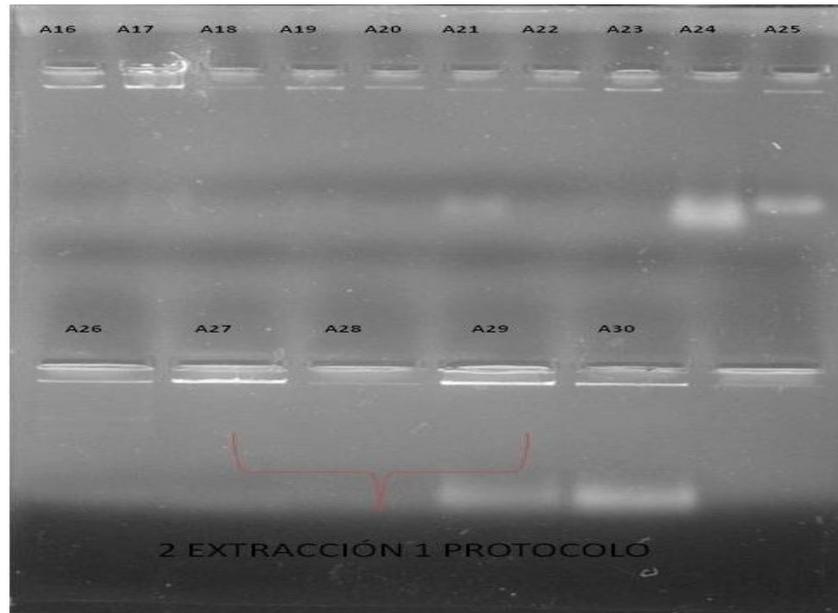


Figura 3 Segunda extracción del protocolo 1

En el segundo proceso de extracción de ADN se puede observar bandas muy bien definidas las cuales muestran el ADN que contiene cada una de las muestras que se aplicaron para este protocolo, igualmente con algunas presencias de ARN la cual no es mucha.

Tabla 9 Cepas para la segunda extracción

Identificación	N. Cepa	Repetición
A16	CIAT 299	1
A17	CIAT 299	2
A18	CIAT 102	1
A19	CIAT 102	2
A20	CIAT 192	1
A21	CIAT192	2
A22	CIAT 2195	1
A23	CIAT 2195	2
A24	CIAT 3934	1
A25	CIAT 3934	3
A26	CIAT 4862	1
A27	CIAT 4862	3
A28	CIAT 593	1
A29	CIAT 5079	2
A30	CIAT5079	3

6.2.4 Amplificación PCR

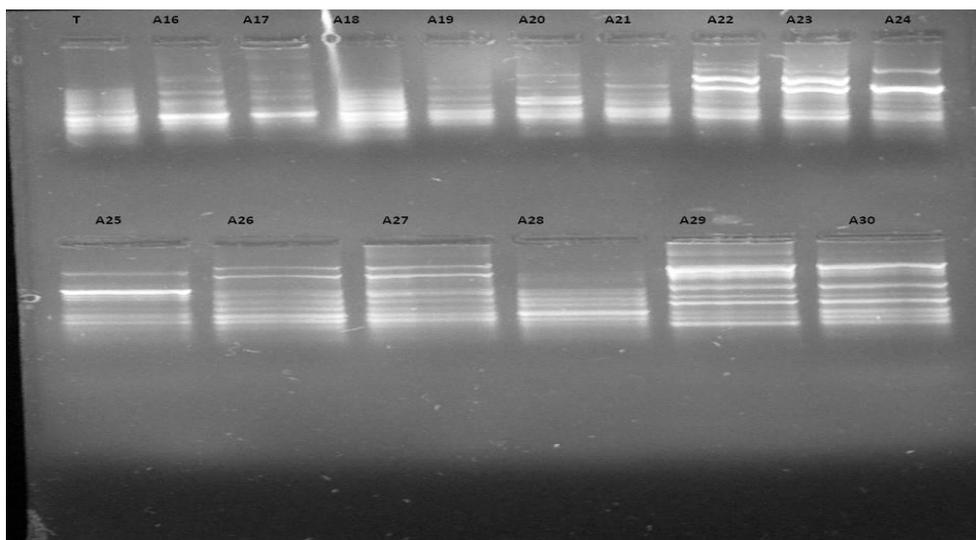


Figura 4 PCR de la segunda extracción, protocolo 1

Según el segundo proceso de amplificación se puede ver que además que las cantidades de ADN son a simple vista muy buenas, también amplifica muy bien y además la identificación de las bandas es notable en gel de agarosa y que este no es el indicado para leer estas bandas.

6.2.5 Tercera extracción de ADN, Protocolo 1

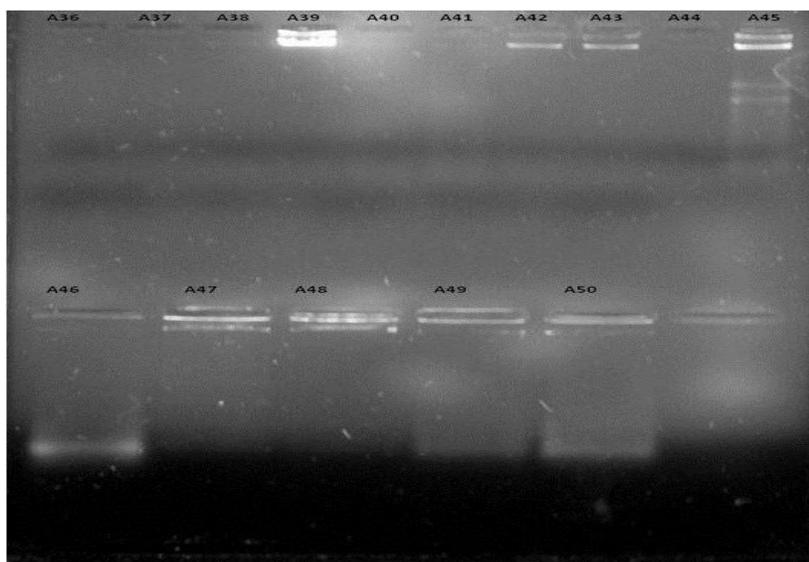


Figura 5 Tercera extracción, protocolo 1

Igualmente se comprobó una vez más que el protocolo funciona muy bien, y aunque la presencia abundante del ADN no está en todas las muestras de las cepas aunque faltaría corroborar si existe ADN aunque sea en partes un poco más bajas que las demás esto igualmente en una prueba de amplificación en PCR.

Tabla 10 Cepas para la tercera extracción

Identificación	N. Cepa	Repetición
A31	CIAT 299	1
A32	CIAT 299	2
A33	CIAT 192	1
A34	CIAT 192	2
A35	CIAT 102	1
A36	CIAT102	2
A37	CIAT 593	1
A38	CIAT 2195	1
A39	CIAT 2195	2
A40	CIAT 3934	1
A41	CIAT 3934	2
A42	CIAT 4862	1
A43	CIAT 4862	3
A44	CIAT 5079	2
A45	CIAT5079	3

Concentracion de ADN

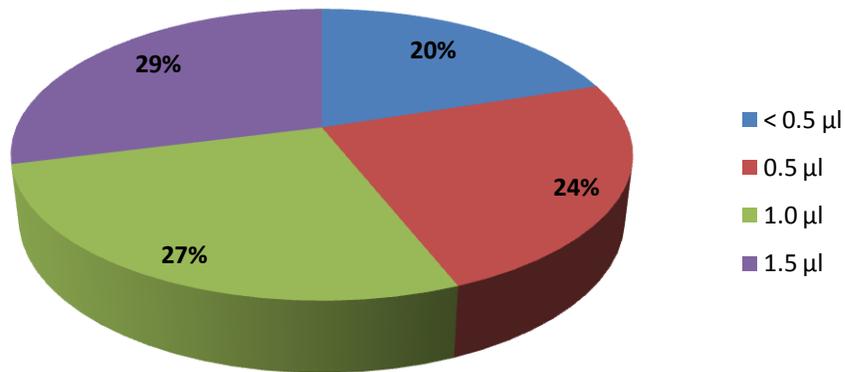


Figura 6 Concentraciones de ADN del Protocolo N°1, según marcador Lamda.

Al observar los datos de estas extracciones se realizo la comparación de concentraciones con el marcador molecular Lamda Figura 21 , realizando una tabla demostrativa de cada una de las extracciones del primer protocolo con sus respectivos porcentajes, Anexo 7 , se puede observar en este protocolo que solamente un porcentaje de 20% está por debajo de la concentración deseada < 0.5 µl el cual son todas aquellas bandas que no muestran la presencia de ADN en los geles de agarosa, esto nos indica que este protocolo esta en optimas condiciones para poder utilizarlo para poder extraer y almacenar ADN bacterial correctamente dado a que el 80% representa concentraciones aptas para el almacenamiento, el cual también muestra un menor porcentaje en la baja concentración de ADN según muestra la figura anterior.

6.2.6 Proceso de amplificación PCR

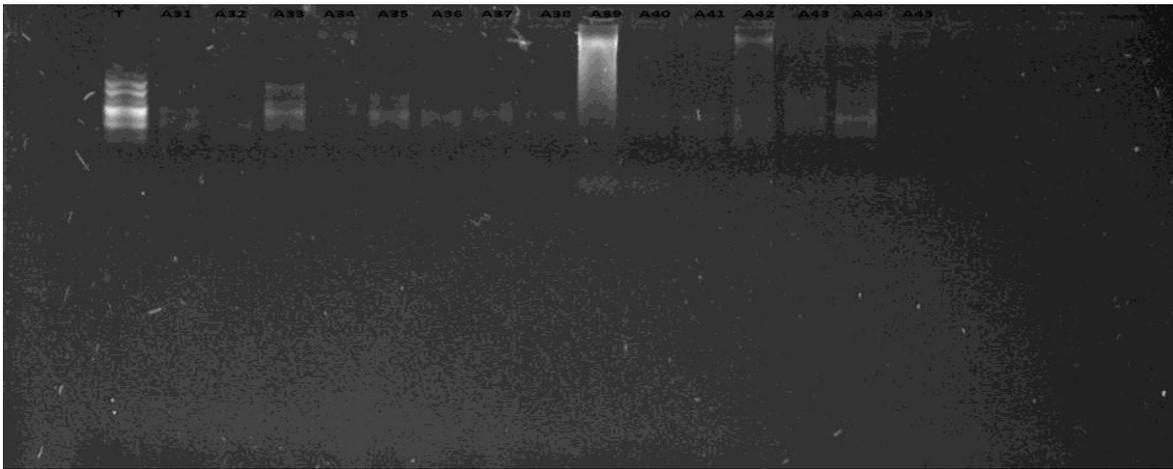


Figura 7 PCR para la tercera extracción del protocolo 1

Esta tercera amplificación nos muestra que el ADN amplifica muy bien y que el protocolo nos puede servir tanto como para almacenar ADN por las altas cantidades que representa en los geles de agarosa de comprobación de la presencia de ADN, como también para trabajos de caracterización para estas bacterias, perfectamente.

6.3 Segundo protocolo de extracción para verificación de presencia de ADN

6.3.1 Primera Extracción de ADN, Protocolo 2

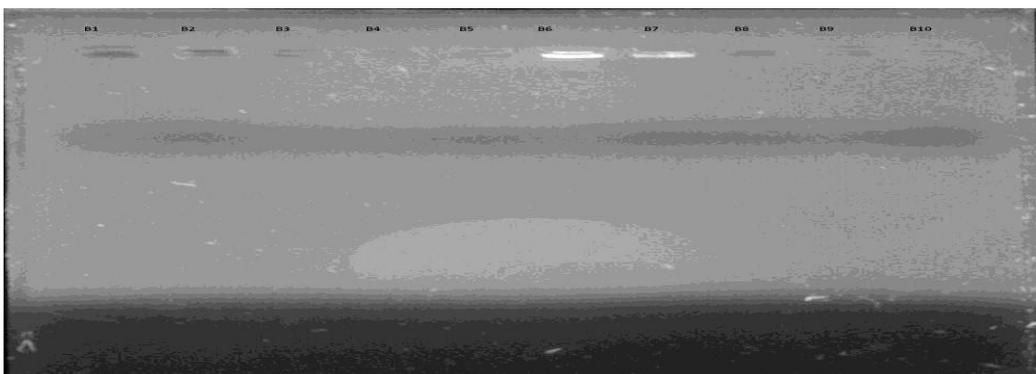


Figura 8 Primera extracción para el protocolo 2

En este segundo protocolo se observaron cantidades muy pequeñas y a pesar de ser un protocolo tan corto, pues para estas bacterias funciona bien, aunque no es un proceso que nos pueda servir como para almacenar el ADN que se pueda extraer con él, dio resultados positivos según muestra la B6 y B7 en estos pozos se nota muy bien la presencia de ADN, y aunque en las otras no se puede determinar a simple vista podría ser que existiera ADN pero a muy bajas concentraciones.

Las muestras utilizadas para este protocolo fueron.

Tabla 11 Cepas para la primera extracción del protocolo 2

Identificación	N. de cepa	Repetición
B1	CIAT 299	3
B2	CIAT 299	3
B3	CIAT 102	1
B4	CIAT 102	1
B5	CIAT 3934	1
B6	CIAT 3934	1
B7	CIAT 4862	1
B8	CIAT 4862	1
B9	CIAT 593	3
B10	CIAT 593	3

6.3.2 Amplificación PCR

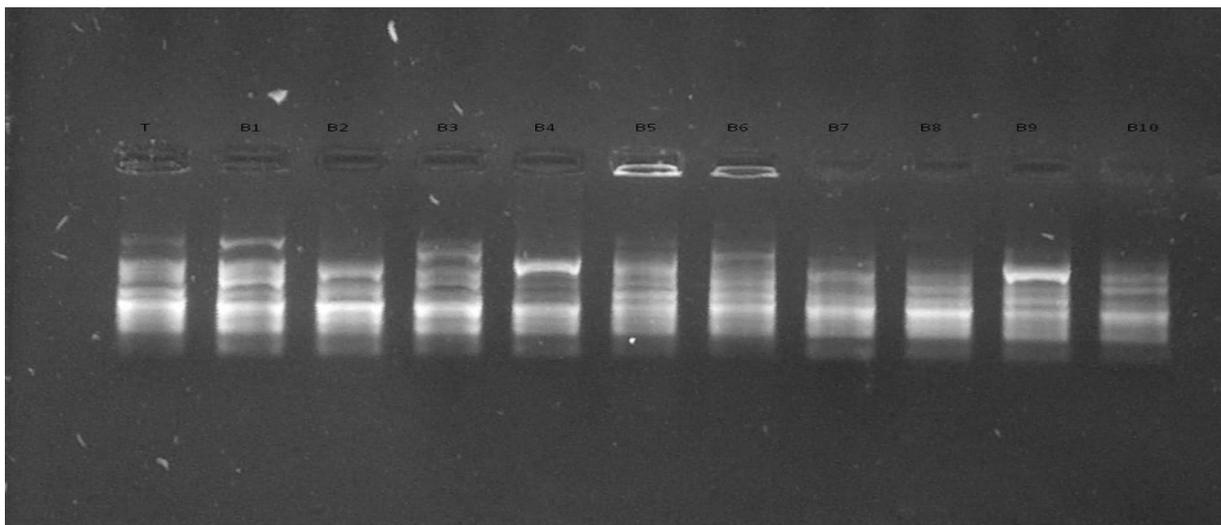


Figura 9 PCR de la primera extracción del protocolo 2

En esta amplificación del protocolo 2 se puede ver que también nos amplificó aunque al inicio no se observaba la presencia de ADN según muestran las imágenes de los geles de agar para la extracción, pero si se comprueba que la extracción funcionó en todas las muestras tomadas para este protocolo, y su amplificación está muy bien.

6.3.3 Segunda Extracción de ADN, Protocolo 2

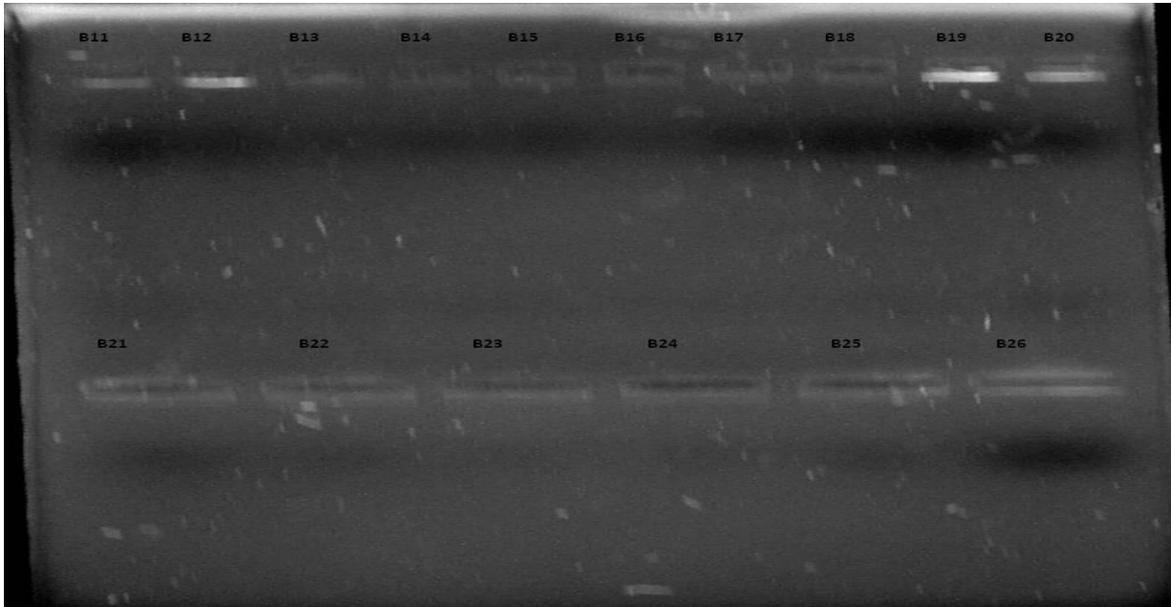


Figura 10 Segunda extracción del protocolo 2

Se puede observar igual que el anterior gel de agarosa para extracción que la presencia puede ser muy bajo o nulo de ADN utilizando este protocolo de extracción, pero aun así se comprobó mediante la prueba de amplificación de ADN en PCR.

Tabla 12 Cepas de la segunda extracción de ADN protocolo 2

Identificación	N. de cepa	Repetición
B11	CIAT 593	1
B12	CIAT 192	2
B13	CIAT 299	2
B14	CIAT 299	2
B15	CIAT 593	3
B16	CIAT 5079	1
B17	CIAT 5079	1
B18	CIAT 4862	2
B19	CIAT 102	3
B20	CIAT 102	2
B21	CIAT 192	2
B22	CIAT 5079	1
B23	CIAT 4862	1
B24	CIAT 3934	3
B25	CIAT 2195	2
B26	CIAT 2195	3

6.3.4 Amplificación de ADN en PCR

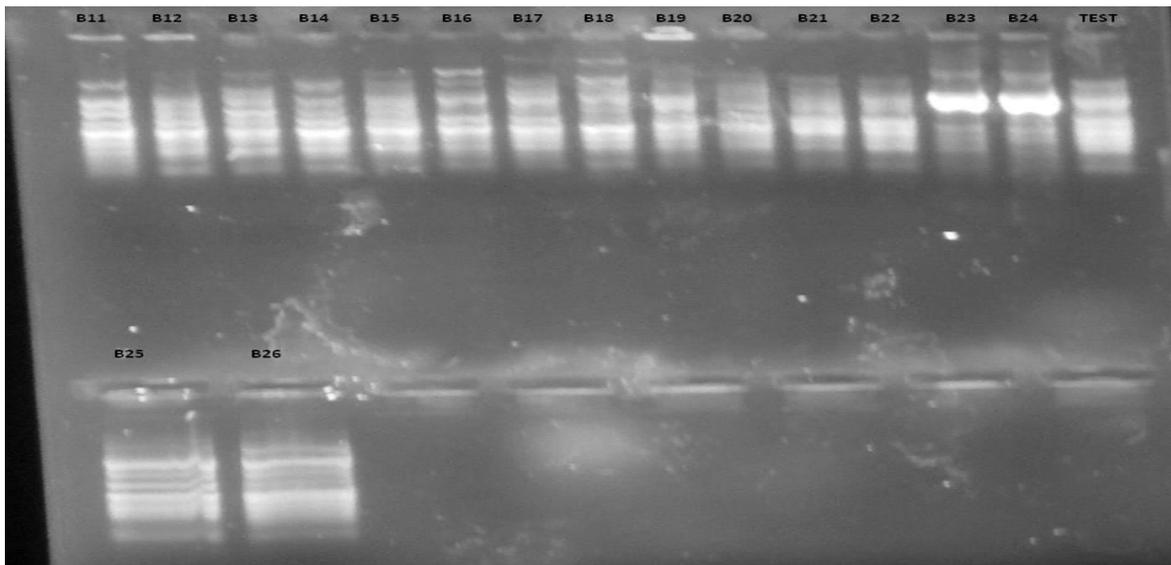


Figura 11 PCR de la segunda extracción del protocolo 2

Se comprobó que sí; en realidad existe ADN utilizando este protocolo pero este, está en muy bajas concentraciones y no serviría como para un proceso de almacenamiento de ADN de esta bacteria por la poca cantidad de ADN que esta poseen, pero que si se puede trabajar dependiendo el trabajo que se va a realizar, porque este amplifica muy bien según lo muestra la figura.

Concentracion de ADN

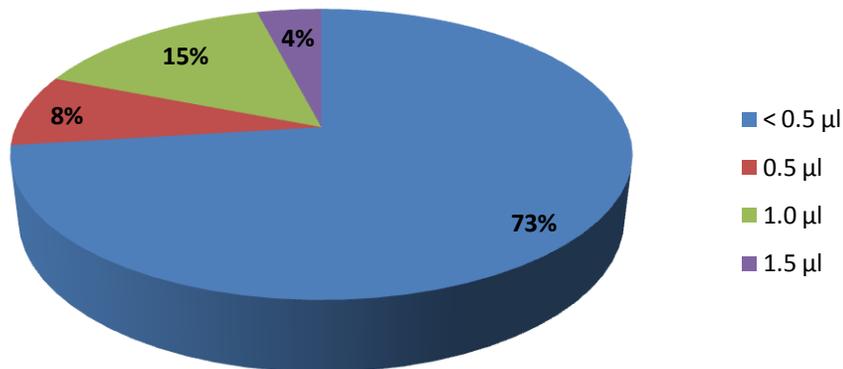


Figura 12 Concentraciones de ADN del Protocolo N°2, según marcador molecular Lamda.

Al realizar una tabla para identificar concentraciones de ADN, Anexo 8, se pudo extraer esta grafica la cual muestra según comparación con el marcador Lamda Figura 21, nos muestra que en este protocolo el porcentaje de concentración deseado $> 0.5 \mu\text{l}$ es muy bajo siendo solamente un 27 %, lo cual muestra mucha desconfianza en cuanto a la presencia o ausencia de el ADN en cada una de las bandas del gel, dicho ADN esta en concentraciones muy bajas para poder ser almacenado para trabajos futuros.

6.4 Tercer protocolo de extracción para verificar de presencia de ADN

6.4.1 Primera extracción, Protocolo 3



Figura 13 Primera extracción del protocolo 3

Tercer y último protocolo de extracción para ADN en Rizobios, este último método que se utilizo es el más extenso a nivel de pasos y de duración de los procesos, pero a pesar de eso la cantidad de ADN que se pudo extraer en la primeras muestras no es muy significativa aunque si existe ADN en dos de estas, en abundancia eso nos dice que en las demás puede que se encuentre pero en cantidades sumisas, el cual se comprobó en la amplificación con PCR.

Las muestras que se utilizaron para este protocolo fueron

Tabla 13 Cepas para la primera extracción del protocolo 3

Identificación	N. de cepa	Repetición
C1	CIAT 593	1
C2	CIAT 593	1
C3	CIAT 3934	2
C4	CIAT 3934	2
C5	CIAT 192	2
C6	CIAT 192	2

6.4.2 Amplificación con PCR.

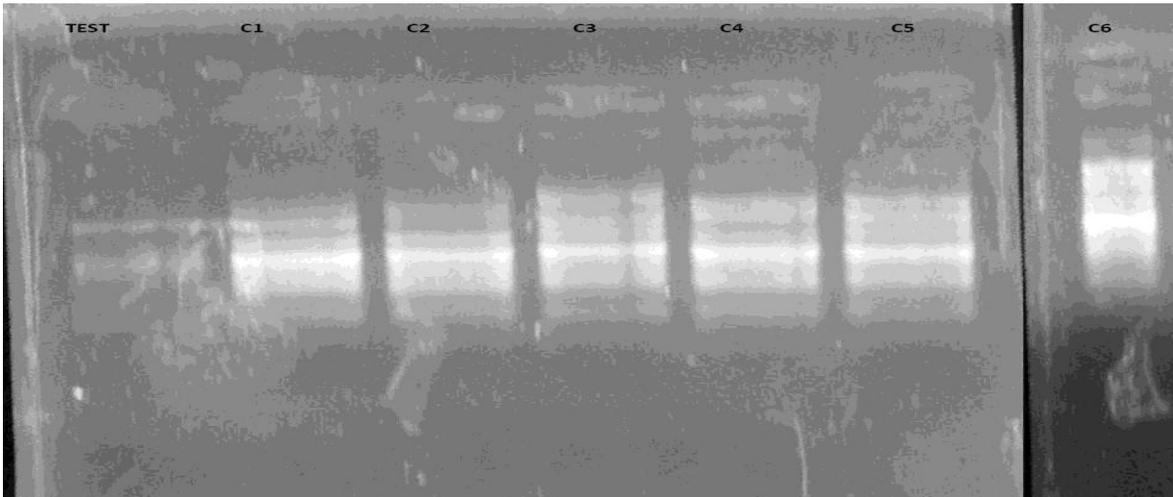


Figura 14 PCR de la primera extracción del protocolo 3

Al igual que los otros dos al parecer este protocolo también puede ser usado para extracción pero con amplificaciones de ADN dado a que las cantidades de ADN para almacenar son en concentraciones muy bajas, pero si es un protocolo que podría funcionar perfectamente para muchos trabajos, con el único impedimento retraso que es un protocolo de extracción demasiado largo para tratarse de bacterias.

6.4.3 Segunda extracción, Protocolo 3

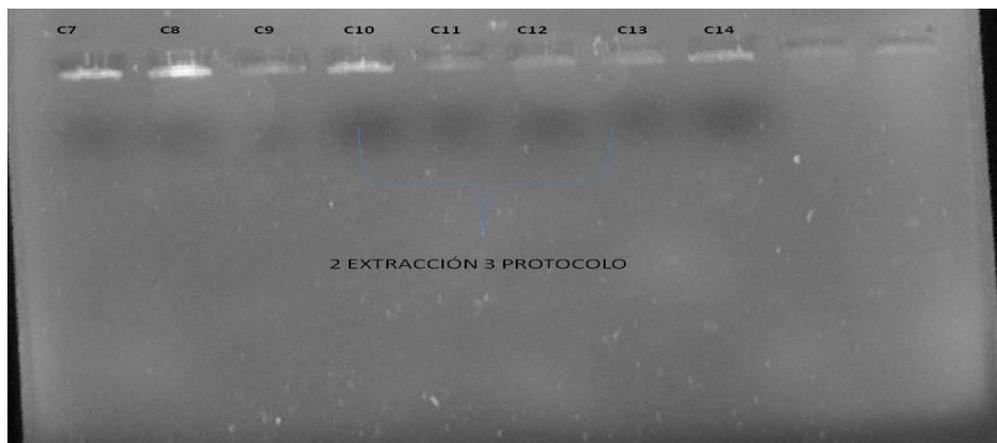


Figura 15 Segunda extracción para el protocolo 3

En este gel ya se nota un poco más la presencia del ADN aunque si lo comparamos con el primer protocolo todavía es muy poco, pero si se comprueba que este último protocolo, es muy eficiente para el proceso de extracción de ADN en rizobio, igual que los otros dos, y para terminar de comprobar esto se realizó la última amplificación de PCR.

Tabla 14 Cepas para la segunda extracción del protocolo 3

Identificación	N. de cepa	Repetición
C7	CIAT 2295	1
C8	CIAT 2295	1
C9	CIAT 2295	2
C10	CIAT 2295	2
C11	CIAT 192	1
C12	CIAT 192	1
C13	CIAT192	3
C14	CIAT 192	3

6.4.4 Amplificación en PCR.

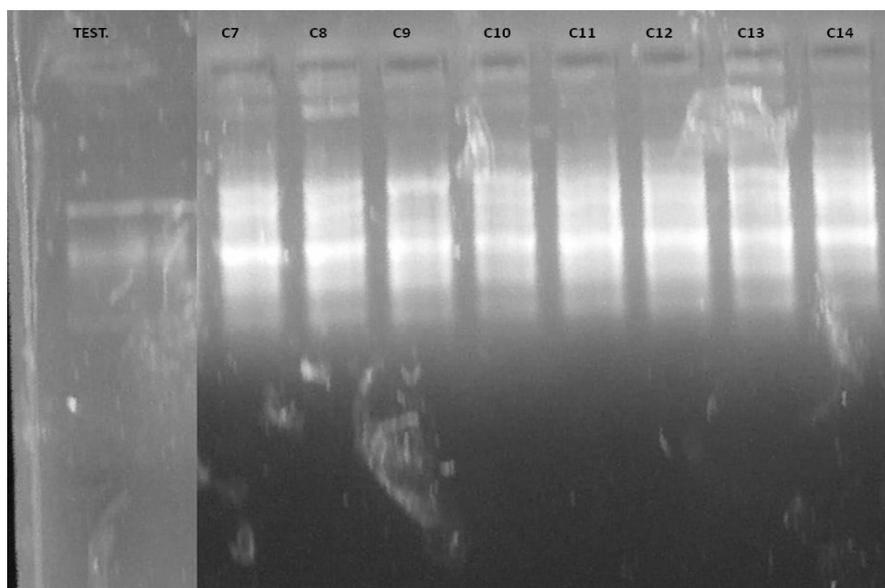


Figura 16 PCR de la segunda extracción del protocolo 3

Con esto se comprueba que el tercer protocolo también amplifico muy bien por lo tanto se podría utilizar en algún tipo de trabajo para procesos de extracción y temas de investigación relacionados con biología molecular.

Se podría decir que los tres protocolos funcionaron a la perfección, con las variaciones de concentración de ADN extraído en cada uno de ellos. Pero si se ratificó al final de este que los tres protocolos se podrían utilizar para la extracción de ADN en rizobios, pero esto va a depender del fin que se le dará al trabajo a realizar en cada una de las investigaciones.

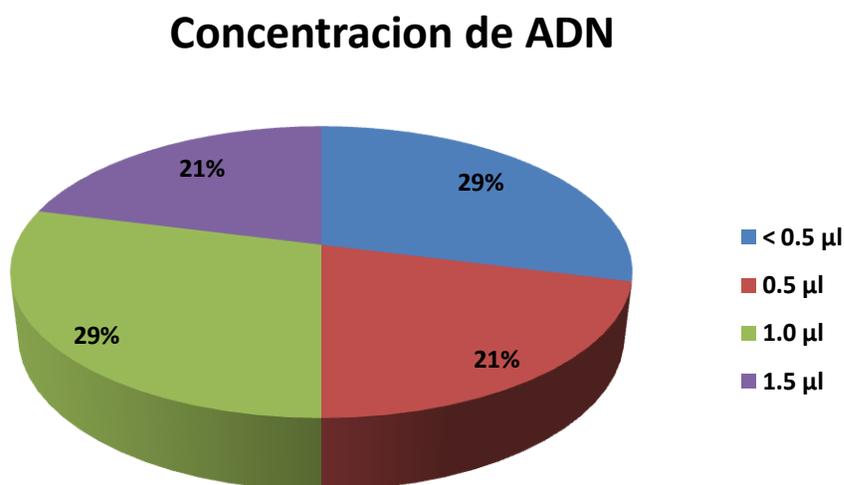


Figura 17 Concentraciones de ADN del Protocolo N°3, según marcador molecular Lamda.

Al igual que en los otros dos casos, para este protocolo también se hizo una tabla de equivalencias de concentraciones de cada extracción, Anexo 9, el cual representa los diferentes porcentajes de cada una de las concentraciones que se obtuvo con este protocolo, logrando así compararlo con el marcador molecular Lamda Figura 21, y poder obtener esta grafica la cual nos muestra que las concentraciones están equilibradas, teniendo una variación en las concentraciones pero que se podría utilizar para un almacenamiento aun desconfiando en sí de la vida anaquel de este, por la variación que se obtiene.

6.5 Comparación de concentraciones de ADN.



Figura 18 Marcador de peso molecular

Los tres pozos de cada fila corresponden al marcador de peso molecular conocido como (Lamda) donde cada microlitro de este contiene 50 ng de ADN y se colocó 0.5 µl, 1.0 µl y 1.5 µl del marcador para poder hacer una mejor comparación de las bandas de ADN para la cuantificación de estos, estas serían las cantidades más visibles que se pudieron distinguir en las cepas utilizadas con cada uno de los protocolos y las cantidades optimas con las que se puede almacenar el ADN una por la concentración, otra porque verificamos la existencia del mismo, como se ha notado en los geles anteriores en algunos la concentración de ADN de estos estaba por debajo de estas cantidades igual que en otras estaban por encima igual en los dos casos estas amplificaron muy bien, pero hasta este el punto de la extracción no se sabe si hay presencia de ADN bacteriano cuando las concentraciones están por debajo de 25 ng/ µl o por decirlo menor que 0.5 µl. y debido a esta tabla se elaboró el siguiente cuadro.

Tabla 15 Cuadro comparativo de los protocolos de extracción.

Protocolo	Grupos	# De muestras	Extracción # bandas	Amplif. # bandas
1. Dra. Kate Wilson	1	15	13	15
	2	15	14	15
	3	15	9	14
2. Dra. Thies	1	10	3	10
	2	16	4	16
3. Dra. E. Álvarez	1	6	3	6
	2	8	4	8

Tomando de cada uno de los protocolos de extracción un porcentaje neto en las muestras totales del 100% según muestra la Tabla 15, tendríamos lo siguiente.

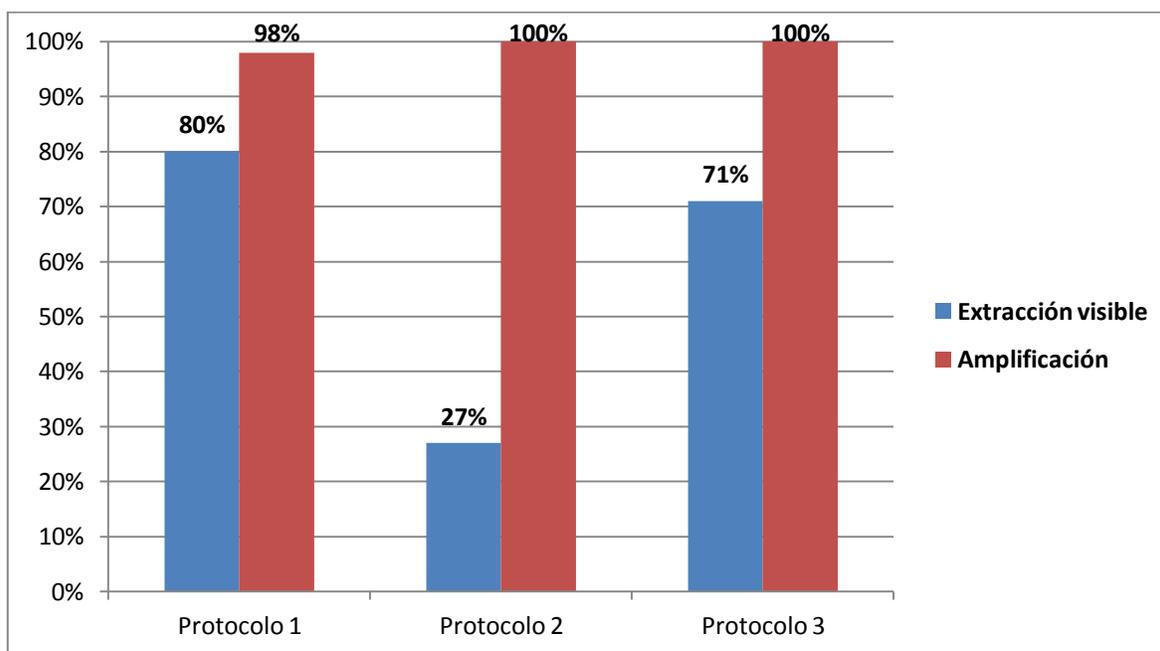


Figura 19 Graficas de comparación entre cada uno de los protocolos

Llevando a cabo la suma de las muestras para tomar un 100% total como una mayor representación de cada protocolo, y sacando el porcentaje tanto de extracción y de amplificación según lo muestra la figura 22. Se puede observar una notable diferencia entre

el porcentaje total de extracción de ADN visible según los geles de cada uno de los protocolos evaluados, siendo el protocolo uno, el de mayor significancia para este proceso que es el fundamental para el almacenamiento del ADN dado a que muestra cantidades altas de presencia de ADN, según el aspecto de amplificación de PCR para la caracterización de cepas los tres protocolos mostraron alta significancia esto nos muestra que para una llevar un trabajo que no requiera de almacenamiento de ADN y solamente para una caracterización se podría utilizar el protocolo que lleva menos tiempo dado que aunque el ADN no es visible en todas las muestras esto nos indica que la presencia de este si está en todas, con la única diferencia en las concentraciones, siendo la mejor para este objetivo según lo muestra la tabla el protocolo número uno.

6.7 Estandarización de condiciones para PCR

La calidad del ADN fue validada a través de su amplificación Figura 24, siendo consistentemente amplificable a través de la técnica de PCR.

Y para esto se realizó el gel de Poliacrilamida y poder hacer una mejor visualización.

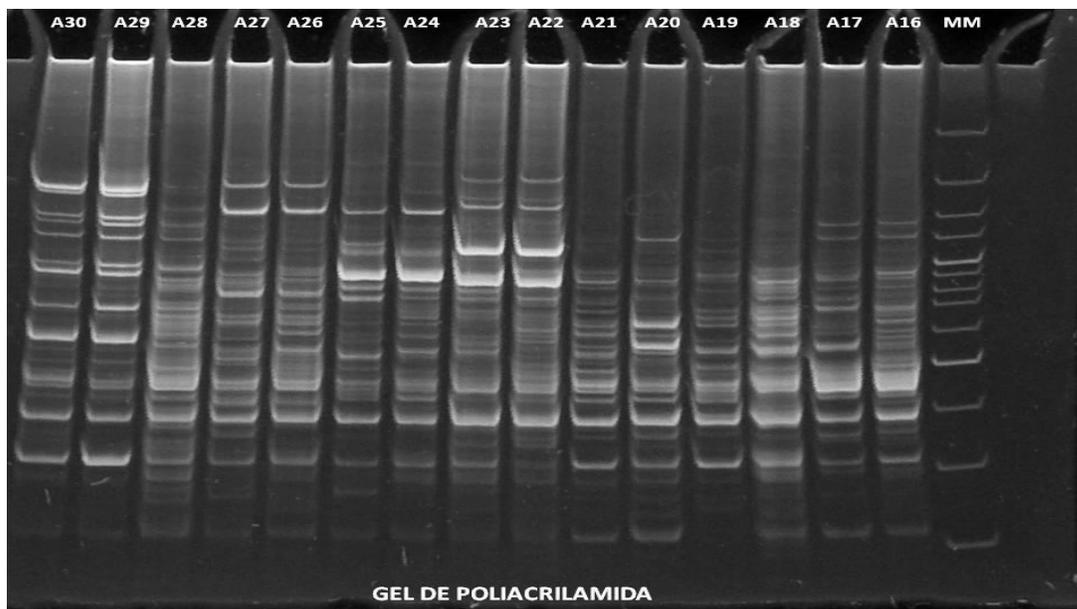


Figura 20 Gel de poliacrilamida para la cuantificación de alelos.

PCR de *Rhizobium*. El pozo No. 16 es el marcador molecular para la comparación de las bandas amplificadas de ADN, se puede observar que se utilizaron las cepas de rizobio de la

1 a la 15 con el “primer CCA”. Dicho primer ba desde los 100pb hasta los 1200pb (pares de bases) y estas muestras mostraron respuesta a este ya que se observó como las muestras se replicaron entre sí mostrando varias diferencias de las bandas siendo un indicativo que el ADN extraído es de buena calidad. Y en este caso se utilizó el primer protocolo que fue el que mostro mejores cualidades en cantidad de ADN y calidad de amplificación y el cual se comprueba haciendo el conteo de las bandas y comparándolas para ver las similitudes y diferencias obteniendo mucha variabilidad, lo que significa que se puede usar para cualquier interés de mejoramiento, y dependiendo de ese interés poder poner en práctica cualquiera de estos tres protocolos que están descritos anteriormente.

6.8 Selección de cebadores RAMs polimórficos

Se usó un cebador o primers RAMs (CCA) polimórficos para las especies de rizobios, solamente para hacer algunas pruebas de amplificación del ADN y observar si estas especies están sujetas a cambios genéticos, lo cual permite realizar análisis de diversidad de una manera más ágil y simplificada, y que otros investigadores puedan acceder a estos protocolos como principales para la extracción de sus bacterias.

6.9 Análisis de la información

La información fue analizada utilizando la metodología construcción de matriz de ceros (0) y unos (1) para la determinación del Coeficiente de Similitud de Nei-Li Anexo N°2, donde los unos indican presencia de bandas de ADN en la muestra tomada comparada con el marcador molecular el cual es utilizado para observar si el ADN amplificó y los ceros representan ausencia de bandas o sea que no amplificó esa muestra en comparación con el marcador. Con los datos obtenidos se construyó un dendrograma que agrupó las cepas evaluadas para comparar las similitudes entre las diferentes especies de rizobio.

Cepas:

CIAT 299 – Valle Colombia

CIAT 3934 - Cuba

CIAT 2295 – Brasil

CIAT 5079 – Colombia.

CIAT 593 – México

CIAT 192 – Córdoba Colombia

CIAT 102 – Zimba

CIAT 4862 - Brasil

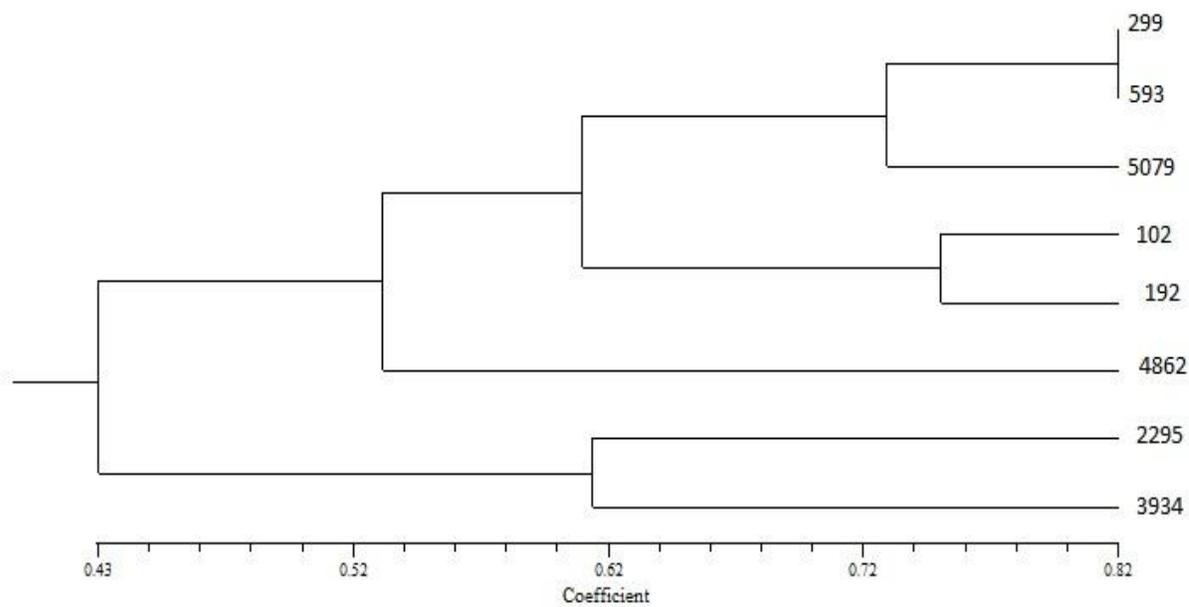


Figura 21 Dendrograma 8 cepas de Rhizobio.

Al considerar un coeficiente de similitud de 0.43 o bien 0.5 podemos observar que se forman 2 grupos de individuos; el primero está conformado por las cepas CIAT 299 (Valle de Colombia), la CIAT 593 (México), la CIAT 5079 (Colombia), CIAT 102 (Zimba), CIAT 192 (Córdova, Colombia), y la CIAT 4862 (Brasil). Estas accesiones poseen características genotípicas más cercanas o similares entre sí, pero se puede notar que las muestra 299 y 593 tienen características más cercanas entre ellas y así también la muestra 5079 se asemeja a estas dos muestras y en un rango más lejano se encuentran en similitud con las demás muestras y así entre más avance el coeficiente de similitud podemos tener más características notables y/o ausentes entre las cepas.

El segundo grupo posee las accesiones restantes donde se encuentran la muestra; CIAT 2295 (Brasil) y la CIAT 3934 (Cuba) las cuales mostraron mayor semejanza entre ellas solamente con el coeficiente de semejanza de 0.43 lo que indica en los dos grupos que hay

materiales que tienen muchas características genótípicas similares aunque sean de diferente origen, y diferente huésped según lo muestra la tabla 2.

El cual muestra que ninguna de las cepas provienen del mismo huésped es más estas varían también hasta en su lugar de recolección, siendo Colombia uno de los países que coinciden entre los lugares de recolección de las cepas liofilizadas y aún ni así con un coeficiente de similitud más alto estas varían mucho. Esta diversidad entre las muestras es importante para cualquier interés de mejoramiento que se desee cambiar o modificar.

Y si tomamos un coeficiente de similitud de 1, se observa que todas las muestras son diferentes entre sí.

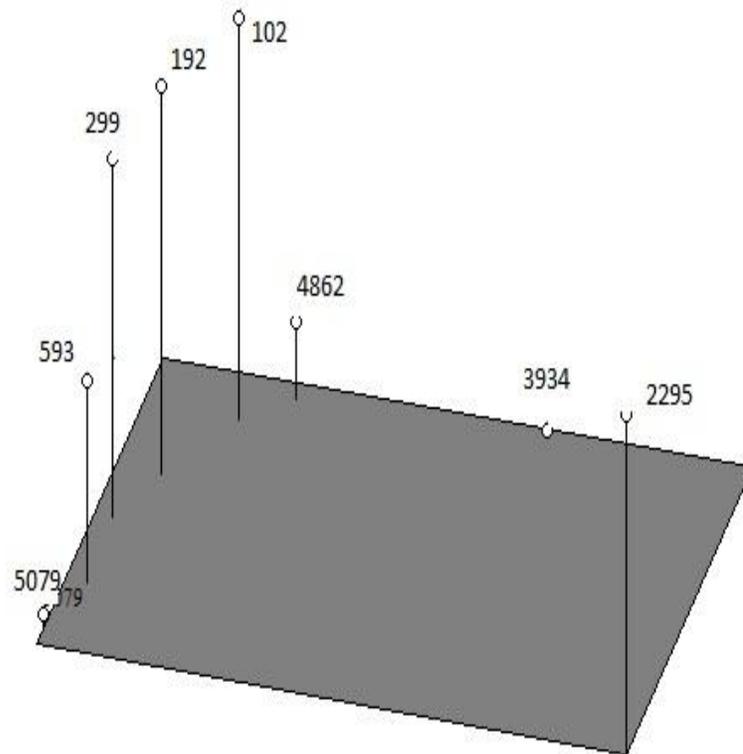


Figura 22 Agrupamiento en dimensión de las cepas.

En este corte de dimensión podemos observar como las muestras adquiridas se agrupan manteniendo el coeficiente de similitud anteriormente utilizado para el agrupamiento según la presencia o ausencia alelopática que estos poseen, mostrando siempre que cada una posee características muy propias y a pesar de que se agrupan así no son semejantes, y para

una mejor visualización podemos tomar los datos en los cuatro cuadrantes para una mejor observación de los mismos a continuación:

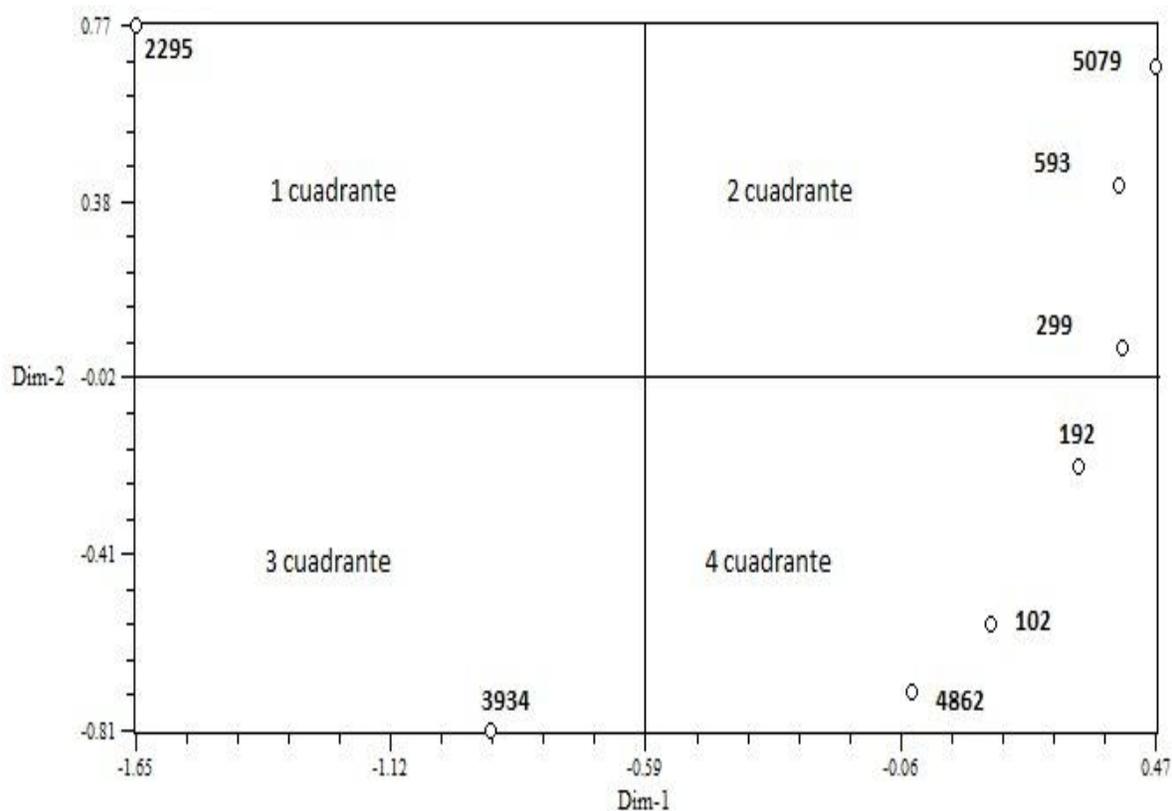


Figura 23 Vista en un plano de cuadrantes para un mejor agrupamiento.

Utilizando esta grafica de cuatro cuadrantes podemos observar cómo nos agrupa las muestras en 4 sub grupos podemos verificar nuevamente que aunque son de diferentes países ahí cepas que muestran similitudes con otras, y lo contrario que cepas que son del mismo país como el caso de CIAT 2295 – Brasil y CIAT 4862 – Brasil se agrupan en cuadrantes muy diferentes y separados, pero las cepas ; CIAT 299 – Valle Colombia, CIAT 5079 – Colombia, y CIAT 192 – Córdoba Colombia se ubican dos en el mismo cuadrante y la otra en un cuadrante distinto pero a la misma vez cercano.

6.10 Heterocigosidad

Tabla 16 Cuadro de heterocigosidad y loci polimórfico

Cebador	Heterocigosidad incesgada	% Loci polimórfico
CCA	0.3750	90%

Tomando un criterio de 95% en el % de loci polimórfico, esto quiere decir que los locus son polimórficos dado a que las frecuencias de los alelos más comunes pueden variar mucho según su comportamiento de genes, una alta diversidad genética de los materiales evaluados.

VI CONCLUSIONES

Se logró la extracción de ADN de rizobios con respecto a los tres protocolos evaluados con algunas diferencias a nivel de concentración de ADN en cada uno de los protocolos. Estos se podrán utilizar para fines de mejoramiento genético de las especies.

Se determinó que el protocolo número uno (**Dra. Kate Wilson**) Anexo N°3, fue el más eficiente con respecto a las concentraciones de ADN que se pueden extraer utilizando este protocolo y que para fines de amplificación de estas bacterias los tres protocolos suelen funcionar perfectamente pero con riesgos de que en no podemos observar la presencia del ADN en todas las bandas esto utilizando el marcador molecular de ADN lambda Fig. N°15, del protocolo 2 y 3 Anexo 4 Y 5 respectivamente.

Con la técnica RAM'S empleada en las especies de *Rhizobium* utilizando el cebador o primer (CCA), se observó que el ADN de las muestras expuestas a la técnica PCR eran fácilmente visibles (amplifico), el cual es un indicativo que el ADN es de buena calidad y se pueden realizar trabajos de mejoramiento.

A pesar que las cepas que se evaluaron en este proceso eran de diferentes partes del mundo estas lograron agruparse según sus características genotípicas, prevaleciendo algunos alelos notables entre ellos y pese a que algunas tenían origen igual hablando por si del mismo país estas no se agrupan alelopáticamente, también podría influir el huésped de cada una de ellas dado a que son huéspedes diferentes en los 8 casos.

VII RECOMENDACIONES

Al momento de la reproducción de la bacteria en el medio de cultivo el Ph de este es de vital importancia para la reproducción de la bacteria, siempre es necesario verificar el Ph hasta llegar al pH óptimo que la bacteria requiere en este caso 6.8 Ph, esto con la ayuda más frecuentemente de un ácido (HCl).

El ADN que se logra obtener de estas cepas de la recolección del CIAT se pueden utilizar en cualquier área de interés que el investigador convenga pudiendo utilizar estos protocolos de extracción preferiblemente si es para almacenamiento de ADN utilizar el protocolo N. 1 dado a que es uno de los más eficientes en cuanto a calidad y cantidad de ADN.

Se recomienda establecer un banco de ADN en el laboratorio de Biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia como réplica al banco de bacterias liofilizadas que se encuentran en CIAT, para poder tener materia prima para muchos otros estudios que se puedan realizar con estas bacterias que son de mucha importancia muchos cultivos de leguminosas.

Trabajar de siempre con Higiene y seguridad dado ya que puede haber una contaminación de nuestra materia prima el ADN por otro organismo extraño al que se está evaluando y puede distorsionar los resultados.

VIII BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, O. N. and ALLEN, E. K. (1981): *The leguminosae*. MacMillan Publishers Ltd.
- Becerra, V; Paredes, MC. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética.
- CADENA. Las Leguminosas. Edición 5. Modulo II. Centro América y Panamá. INCAP/OPS. 11 pág.
- Carreras, J. Fundacion. En línea. Disponible en http://www.fcarreras.org/es/glosario_1937?gclid=CJKez_KF7qgCFQ_u7QodOhfxTQ
- Cerrato, IG. 2010. Caracterización molecular de la colección Nacional de Aguacate (*Persea spp.*) De CORPOICA Colombia, utilizando marcadores RAMs. Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Catacamas, Olancho. Universidad Nacional de Agricultura. 59 pág.
- Chambers, G. MacAboy, E. 2000. Microsatélites: consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology. Parte B 126 pp 455-476.
- Cuadrado, B. Rubio, G. Santos, W. 2009. Caracterización de cepas de (*Rhizobium*) y Bradyrhizobium seleccionados de los cultivos de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinoculos. Artículo de investigación. Cartagena, Colombia. 27 pág.
- Departamento Nacional de Planeación. Anuario estadístico del sector Agropecuario- Min-Agricultura. url: <http://www.dnp.gov.co/PortalWeb/Default.aspx>, agosto, 2009.
- Departamento Nacional de Planeación. República de Colombia. Anuario Estadístico del Sector Agropecuario-Min Agricultura. url: <http://www.dnp.gov.co/PortalWeb/Portals/0/archivos/documentos/ddrs/Indicadores/Tabla%201.pdf>, junio 2009.
- Ferreira, M. Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen. pp220.

Franco, T. Los bancos de germoplasma en las Américas: Informe especial Recursos Filogenéticos. Cali, Colombia. Vol. 53 pp, 81-84.

García, HP. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIAV, Cuba. 1 (2): 31-41pp.

Lafarga, A. Delgado, J. 2006. Leguminosas: Una contribución significativa de la agricultura a la disminución del calentamiento global. ITG Agrícola. 4 pág.

Lavaire, EL. 2009. Establecimiento de un banco de ADN de la colección nacional de aguacate de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Catacamas, Olancho. Universidad Nacional de Agricultura. 55pág.

Morgante, M. Olivieri, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plants. The plant Journal, 3(1), pp 175-180.

Morillo, AC; Morillo, YC; Muñoz, JE. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudio de diversidad genética vegetal. Scielo, Colombia. 57(4): 219.226.

Morillo, AC; Morillo, YC; Muñoz, JE; Vásquez, HD; Zamorano, A. 2005. Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus spp.*, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. UNAL, Colombia. Acta Agronómica. 15 pág.

Picca, A; Salomón, N. Helguera, M. 2004. Marcadores moleculares. Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA, Argentina, V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski (Eds.). Parte II, cap. 4, 61-68.

POSSO, A. M., LETERME, P., MUÑOZ, J. E. 2009. Genetic diversity of *Trichantera gigantea* using Random Amplified Microsatellites. *Rev Colom Cienc pec* 22 (3) 517

Proyecto biológico. 2000. Biología Humana: Genética de la herencia de los STR. Traducción hecha en La Universidad de Alcalá de Henares, España. USA 15 pag.

Puldon, V. 2006. I curso de capacitación en mejoramiento genético vegetal: Documentación, conservación, y multiplicación de germoplasma. Cuba. 10 pág.

Redondo, M. Bonilla, I. Bolaños, L. Fijación biológica del Nitrógeno. Pp 3-6. Disponible en [http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm#FIJACIÓN N BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm#FIJACIÓN%20BIOLÓGICA%20DEL%20NITRÓGENO).

Reyes, A. Ramírez, M. Lozano, A. Caracterización de cepas de (*Rhizobium* sp) que nodulan frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Colombia. CORPOICA. 6 pág.

Romero, G. Bernal, G. Nuñez, V. 2008. Caracterización y evaluación de la efectividad de la fijación de Nitrógeno de cepas de (*Rhizobium*), asociados a pueraria (*Pueraria phaseoloides*), como cultivo de cobertura de palma aceitera (*Eleais guineensis* Jaca). XI Congreso Ecuatoriano de la ciencia del suelo. Quito. 29 pág

Sambrook, J. Fritch, E.F. Maniatis, T.1989. Molecular cloning.USA. Gold spring Harbar laboratory press. Libro 3. 2 Edicion 456 pags.

Velásco, MR. 2004. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. UNICAUCA, CO. Facultad de las ciencias agropecuarias. pp 15-18.

Wilson, K. 1990. Preparation of genomle DNA fron bacteria. Current protocols in molecular biology. Colombia united 2.4..

Yañez, V. 2002. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batata* (L.)). Lima, Peru. Universidad Nacional Mayor de San Carlos. 108 pág.

Zane, L. Bargelloni, L. Patarnello, T. 2002.Strategies for microsatelite isolation: a review. Molecular Ecology 11pp – 1-16pp.

Anexo 2 Matriz de ceros (0) y unos (1) para la determinación del Coeficiente de Similitud.

N	N° de cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	2990	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
3	1920	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
4	2195	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
5	3934	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
6	4862	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
7	5930	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
8	5079	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0

Anexo 3 Protocolo 1 Dra. Kate Wilson (1990)

Para este protocolo se llevaron a cabo 13 pasos hasta llegar a la extracción los cuales se describen a continuación:

1. Crecimiento de rizobio en cajas de petri en el medio LMA.
2. Agregar 5 ml de agua en la caja petri para preparar la emulsión de las células crecidas.
3. Sacar 1 ml de emulsión y centrifugar a 14000 rpm por 10 min. Descartar el sobrenadante.
4. Re suspender el pellet en 567 µl de buffer TE, y con pasos de vortex y golpes en el tubito, disolver el pellet. Adicionar 30µl de 10% SDS y 3µl de proteinasa K (solución 20mg/ml). Mezclar en el vortex e incubar a 27°C por 1 hora.
5. Adicionar 100 µl de 5M NaCl y mezclar en el vortex.
6. Adicionar 80 µl de CTAB/NaCl solución. Mezclar en el vortex e incubar 10 min a 65 °C.
7. Adicionar 500 µl de cloroformo-isoamil alcohol, mezclar en el vortex y centrifugar a 14000 rpm por 5 min.
8. Remover el acuoso, viscoso sobrenadante para un tubo nuevo. Si el sobrenadante sale turbio repetir el paso del cloroformo-isoamil alcohol, agregando 1 ml.

9. Adicionar 0.5 ml de isopropanol (-20°C) para precipitar ADN. Dejar toda la noche a -20°C.
10. Al otro día centrifugar a 14000 rpm por 5 min.
11. Descartar el sobrenadante con cuidado y lavar con 1 ml de etanol 70% centrifugando a 14000 rpm por 10 min.
12. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
13. Diluir en 50µl TE y si es necesario adicionar 1µl de RNAsa.

Este protocolo se elaboró 3 veces con las 3 repeticiones de cada una de las cepas anteriormente mencionadas.

Anexo 4 Protocolo 2 Dra. Thies .curso de aplicación de técnicas moleculares.

1. Crecimiento del rizobio en el medio LMA.
2. Pasar una colonia con el asa a un eppendorf que contiene 50µl de agua dfe. (Destilada, filtrada y esterilizada).
3. Colocar a 95°C en un termociclador por 10 min.
4. Dar un paso de vortex y centrifugar a 10000 rpm por 5 min.

Este protocolo se realizó por 2 veces para su verificación con diferentes muestras de las cepas.

Anexo 5 Protocolo 3 Dra. Elizabeth Álvarez para *Xantomonas axonopodis*.

(Fue utilizado por CIAT 1967 para extraer ADN de rizobios y funcionó)

1. Crecimiento del rizobio en el medio LMA.
2. Lavar el rizobio: pasar una colonia aislada con el asa a un eppendorf que contiene 1ml de NaCl 1M y centrifugar a 13200 rpm por 5 minutos. Descartar el sobrenadante y repetir el proceso, agregando nuevamente 1 ml de NaCl 1M.
3. Resuspender la bacteria en 540 μ l TE Ph 8.0, mezclarla bien empleando el vortex y dejarla 15 min a 70 °C en baño maria.
4. Retirar del baño-maría y adicionar 1.5 μ l de proteinaza K y 20 μ l de SDS 10% mezclar bien los tubos.
5. Dejar en baño-maría a 50°C toda la noche.
6. Al otro día adicionar 900 μ l de fenol-cloroformo, mezclar empleando vortex y centrifugar a 13200 rpm por 15 minutos.
7. Tomar el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo.
8. Adicionar 750 μ l de cloroformo-isoamil y mezclar empleando vortex, suavemente, centrifugar a 13200 rpm por 15 min.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 1ml de etanol absoluto y 50 μ l de acetato de potasio o sodio 3M. Mezclar y llevar 2 hs o toda la noche preferiblemente a -20°C.
10. Centrifugar 20 min. A 4°C descartar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol a 70% , centrifugando 14000 rpm por 10 min.

11. Descartar el sobrenadante y dejar que el pellet seque completamente.

12. Diluir el pellet en 100 μ l de TE y almacenar.

Anexo 6 Pasos para la tinción en plata para dos geles de tamaño aproximado 10 x 12 cm.

1. Fijación: Metanol 15 ml; Ácido acético 3.6 ml; Formaldehido 37% 15 μ l, completar con agua a un volumen de 30 ml, luego agitar por lo menos 1 hora.
2. Lavado: Etanol 30 ml; agua 30 ml, hacer 3 lavados de 20 minutos cada uno.
3. Pre-tratamiento: Tiosulfato de sodio (2 gr/lit) proteger de la luz, se agita por 1 minuto suavemente.
4. Lavado: Se hacen 3 lavados con agua destilada por 20 segundos cada uno.
5. Impregnante: Nitrato de Plata 0.06 gr; Formaldehido 15 μ l, completar con agua hasta 30 ml, dejar 20 minutos en agitación.
6. Lavado: Dos lavados con agua 20 segundos cada uno.
7. Revelado: Carbonato de Sodio 1.8 gr; Formaldehido 15 μ l; Tiosulfato de sodio (2gr/lit) 600 μ l, completar con agua hasta 30 ml, agitar hasta la aparición de las bandas, se agita por dos o tres minutos (se sugiere en hielo, porque la aparición de las bandas se demora).
8. Lavado: Dos lavados con agua, uno rápido y otro por dos minutos.
9. Fijador: Metanol 15 ml; Ácido acético 3.6 ml, completar con agua a 30 ml, dejar por lo menos de 5-7 minutos.
10. Preservar: Metanol 15 ml; agua 15 ml, si se desea secar los geles usar papel celofán.
Todo este proceso dura aproximadamente 2 horas con 45 minutos

Nota: En todos los casos utilizar agua destilada estéril, y si se harán varios geles, colocar señales en los geles para identificarlos dado a que son idénticos.

Anexo 7 Concentraciones de ADN del Protocolo N°1, según marcador Lamda.

Concentración de ADN	1 Extracción	2 Extracción	3 Extracción	Total	Porcentaje %
< 0.5µl	2	1	6	9	20%
0.5 µl	5	5	1	11	24%
1.0 µl	3	5	4	12	27%
1.5 µl	5	4	4	13	29%
Total de muestras	15	15	15	45	100%

Anexo 8 Concentración de ADN del protocolo N° 2, según marcador molecular Lamda.

Concentración de ADN	1 Extracción	2 Extracción	Total	Porcentaje
< 0.5µl	7	12	19	73%
0.5 µl	1	1	2	8%
1.0 µl	2	2	4	15%
1.5 µl	0	1	1	4%
Total de muestras	10	16	26	100%

Anexo 9 Concentración de ADN del protocolo N°3, según marcador molecular Lamda.

Concentración de ADN	1 Extracción	2 Extracción	Total	Porcentaje
< 0.5µl	3	1	4	29%
0.5 µl	0	3	3	21%
1.0 µl	3	2	4	29%
1.5 µl	1	2	3	21%
Total de muestras	6	8	14	100%