



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias

Ingeniería Agronómica

Aplicación de técnicas moleculares para la
delimitación de especies nativas y el estudio de
genes de potencial aplicación biotecnológica

Trabajo final de graduación para optar por el título de: Ingeniero Agrónomo

Autor: Iglesias, Matías Facundo

Tutor: Dr. Acosta, Juan Manuel

Fecha de defensa:

Nota:

Resumen

El presente Trabajo Final de Graduación (TFG) estuvo orientado a integrar el aprendizaje práctico de técnicas de biología molecular, tecnología de gran interés en la actualidad para la agrobiotecnología, desarrollando actividades específicas de laboratorio dentro de un ámbito profesional activamente y de manera autónoma. Las técnicas de laboratorio que se aprendieron se desarrollaron en el contexto de estudios sobre registros florísticos, de conservación de la biodiversidad y evolutivos que se llevan a cabo dentro del Instituto de Botánica Darwinion (CONICET-ANCEFyN). A partir de las técnicas empleadas se logró información genética en 28 especímenes, pertenecientes a diferentes taxones de la flora nativa del Cono Sur. Las principales técnicas empleadas fueron la extracción de ADN, la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa, el clonado de genes mediante vectores y la secuenciación de los productos amplificados. Para llevar a cabo las actividades de laboratorio se tuvo en cuenta el aprendizaje del manejo de instrumentales específicos, se elaboraron protocolos de trabajo adaptados a cada proyecto particular y se estudiaron los fundamentos específicos de trabajo sobre las técnicas desarrolladas. Para realizar el análisis molecular de las secuencias obtenidas para diferentes genes, se realizó un entrenamiento en técnicas bioinformáticas. Cada uno de los casos trabajados se analizó de manera independiente, se explicaron las metodologías incluidas y se mostraron los resultados de los análisis filogenéticos. Aunque no todos los estudios desarrollados durante el TFG son concluyentes, y deben ser continuados en el futuro, se logró obtener datos genéticos precisos sobre el nuevo registro de una especie vegetal para Argentina (*Alstroemeria spathulata*), se trabajó en la identificación y validación de diferentes linajes de evolución independiente en taxones afines del género *Gomphrena* (*Gomphrena umbellata* y *Gomphrena radiata*) y se aportó al estudio de genes de interés agrobiotecnológico en diferentes especies de gramíneas (*Homolepis glutinosa*, *Homolepis villaricensis*, *Homolepis isocalycia*, *Homolepis aturensis*, *Mesosetum comatum*, *Tatianyx arnaces*, *Mesosetum chaseae*, *Oplismenopsis najada*, *Apochloa lutzii*, *Apochloa lorea*, *Apochloa molinioides* y *Apochloa subtiramulosa*).

Palabras claves: estudios moleculares; secuencias genéticas; alineamientos; matriz molecular; PCR; clonado de genes.

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	6
1- Importancia de la biología molecular y el conocimiento sobre las especies nativas.....	6
2- Enfoque del Trabajo Final de Graduación - Modalidad Trabajo Pre Profesional.....	7
3- Relevancia de los Problemas Planteados.....	8
3-1) <i>Registro de especies. Importancia del conocimiento de la biodiversidad en el Cono Sur.....</i>	8
3-2) <i>Delimitación de especies. Diferenciación de linajes evolutivos entre el complejo de especies Gomphrena umbellata y Gomphrena radiata.....</i>	10
3-3) <i>Posibles utilidades biotecnológicas en especies delimitadas. Estudios sobre genes relacionados a la fotosíntesis C4 de potencial aplicación biotecnológica.....</i>	11
Objetivos.....	13
Objetivos específicos.....	13
Principios y elementos a tener presente para el trabajo en laboratorio.....	14
Importancia sobre el conocimiento del equipamiento presente en el laboratorio y sus normas de seguridad.....	14
Detalle sobre instrumentos de laboratorio utilizados.....	16
Especies vegetales estudiadas a nivel molecular.....	26
<i>Alstroemeria spathulata.....</i>	28
<i>Gomphrena radiata.....</i>	29
<i>Gomphrena umbellata.....</i>	30
<i>Homolepis glutinosa.....</i>	31
<i>Mesosetum comatum.....</i>	32
<i>Oplismenopsis najada.....</i>	33

<i>Apochloa lorea</i>	34
Técnicas de laboratorio empleadas.....	35
Elección de material para la extracción de ADN en laboratorio.....	35
Extracción de ADN.....	37
Espectrofotometría: determinación de la calidad del ADN obtenida en el proceso de extracción.....	38
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
Elección y características de primers utilizados.....	41
Determinación de parámetros a tener en cuenta para la amplificación por PCR.....	45
Visualización de productos de PCR amplificados en geles de agarosa...	49
Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	50
Clonado de Genes.....	52
Purificación del ADN plasmídico.....	53
Secuenciación de productos de PCR y plásmidos.....	54
Análisis bioinformáticos.....	55
Análisis de casos y ejemplos.....	57
Selección de vouchers y metodologías para la extracción de ADN y amplificación.....	57
1. Selección de vouchers y metodologías para la extracción de ADN y amplificación de acuerdo al caso 1: Registro de especies. Importancia del conocimiento de la biodiversidad en el Cono Sur.....	57
2. Selección de vouchers y metodologías para la extracción de ADN y amplificación de acuerdo al caso 2: Delimitación de especies. Diferenciación de linajes evolutivos entre el complejo de especies <i>Gomphrena umbellata</i> y <i>Gomphrena radiata</i>	58
3. Selección de vouchers y metodologías para la extracción de ADN y amplificación de acuerdo al caso 3: Posibles utilidades biotecnológicas en especies delimitadas. Estudios sobre genes relacionados a la fotosíntesis C4 de potencial aplicación biotecnológica.....	59
Armado de matriz, alineamiento y análisis filogenético para los 3 casos abarcados.....	60

Resultados del análisis para cada caso abarcado.....	62
1. Resultados de acuerdo al caso 1. Registro de especies. Importancia del conocimiento de la biodiversidad en el Cono Sur.....	62
2. Resultados de acuerdo al caso 2. Delimitación de especies. Diferenciación de linajes evolutivos entre el complejo de especies <i>Gomphrena umbellata</i> y <i>Gomphrena radiata</i>	63
3. Resultados de acuerdo al caso 3. Posibles utilidades biotecnológicas en especies delimitadas. Estudios sobre genes relacionados a la fotosíntesis C4 de potencial aplicación biotecnológica.....	67
Conclusiones y aportes al tema.....	71
Temas abiertos.....	74
Bibliografía.....	75
Páginas web consultadas.....	81
Apéndices.....	83
A1. Protocolo de extracción de ADN.....	83
A2. Preparación de CTAB.....	85
A3. Importancia y fundamentos de la determinación de calidad del ADN.....	85
A4. Protocolo para cuantificar concentración y pureza del ADN.....	88
A5. Consideraciones sobre los principios y fundamentos para la amplificación del ADN.....	89
A6. Protocolo de amplificación de ADN.....	94
A7. Preparación de dNTP's de uso en PCR.....	96
A8. Preparación de primers de uso en PCR.....	97
A9. Principios y fundamentos para visualizar productos de amplificación.....	97
A10. Pasos a seguir para la visualización de ADN.....	99
A11. Preparación de buffer TBE.....	102
A12. Protocolo de purificación de ADN.....	103
A13. Principios y fundamentos para el clonado de genes.....	104

A14. Protocolo de ligación.....	110
A15. Obtención de bacterias electrocompetentes.....	111
A16. Obtención de bacterias termocompetentes.....	113
A17. Protocolo de clonación utilizando bacterias electrocompetentes...	115
A18. Protocolo de clonación utilizando bacterias termocompetentes....	117
A19. Preparación de 1 litro de LB medio de cultivo o 1 litro de LB agar...	119
A20. Selección de colonias con inserto.....	119
A21. Protocolo de purificación del ADN plasmídico.....	120
A22. Principios y fundamentos para la secuenciación de genes.....	122

Introducción

1- Importancia de la biología molecular y el conocimiento sobre las especies nativas

La biología molecular moderna constituye el escenario donde se producen algunas de las innovaciones que, de manera profunda y veloz, están afectando la evolución de las sociedades humanas. Si bien los logros de la biología molecular alcanzan al conjunto de las actividades primarias e industriales, y también a los servicios, es en la producción agrícola, quizás, donde las nuevas biotecnologías han producido un impacto económico y social más rápido y extendido. Este impacto es particularmente importante en países como Argentina, cuya economía depende en gran medida de las actividades agrícolas.

Un recurso genético vegetal se entiende como cualquier material de naturaleza biológica que presenta información genética de valor y/o utilidad real o potencial. Son la base para el desarrollo de la agricultura y el reservorio de variabilidad genética para afrontar los cambios ambientales o bióticos. Durante los últimos 200 años se produjo un gran avance en el mejoramiento genético, el cual permitió un aumento en la producción de alimentos, pero una disminución en la cantidad de genes, perdiéndose de esta manera la variabilidad genética. En la actualidad, se debe entender que el aumento de los rendimientos no debe ser a costa de la pérdida constante de flora silvestre; es importante lograr un acuerdo entre la variabilidad genética y la necesidad de producir cada vez más alimentos.

Las especies silvestres forman parte de la mayor fuente de genes para solucionar dificultades que puedan ocurrir en el futuro. La deforestación masiva, la degradación y la contaminación de los hábitats naturales son los principales enemigos de la variabilidad genética. La búsqueda de especies silvestres, el conocimiento de su distribución y la conservación de los recursos genéticos son cuestiones relevantes para afrontar el contexto de erosión genética actual y revertirlo hacia el tiempo que se avecina.

Con el fin de evitar la extinción de especies y asegurar la biodiversidad genética se destacan los tipos de conservación in situ y ex situ. La conservación in situ hace referencia a la protección del área y hábitat donde crecen las especies

silvestres; se distinguen los parques nacionales y las reservas naturales. Este método de conservación permite mantener el ecosistema natural y la evolución del mismo a largo del tiempo, se favorecen los cruzamientos naturales, mutaciones y demás fenómenos que logran el aumento de la variabilidad genómica. Es importante destacar que estas ventajas significativas van acompañadas de altos costos de mantención, inversión de recursos humanos y problemáticas sociales y económicas. La conservación ex situ es el otro método de conservación, el cual involucra el retiro los recursos genéticos de su zona de origen. Se basa en la colección de muestras representativas de la variabilidad genética de la población y su mantención en bancos especializados de germoplasma. A través de este método se facilita en gran medida el control, se reducen significativamente los costos de mantenimiento y se mejora la accesibilidad del material para la comunidad científica. Más allá de estas ventajas, mediante la conservación ex situ se detiene el proceso evolutivo, por lo que se interrumpen los cruzamientos, las mutaciones y el aumento de variabilidad en el tiempo.

Los bancos de germoplasma son aquellos espacios en donde se conservan los recursos genéticos a través del método de conservación ex situ; toman relevancia los bancos de semillas, los bancos de material in vitro y los bancos de genes. Estos últimos se caracterizan por ser los más recientes, involucran al ADN recombinante como máximo protagonista. Los bancos de genes posibilitan la conservación directa del material genético, es decir secuencias de ADN de interés, lo cual facilita en gran medida la preservación de la variabilidad y la posibilidad de uso de genes en forma directa.

2- Enfoque del Trabajo Final de Graduación - Modalidad Trabajo Pre Profesional

El presente trabajo final de graduación (TFG) se llevó a cabo en el Instituto de Botánica Darwinion (IBODA). El IBODA es una unidad ejecutora dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ANCEFyN). Sus objetivos fundamentales son el desarrollo de investigaciones y tecnologías en las distintas disciplinas científicas relacionadas con la Biología y en particular de la Botánica, desarrollar la transferencia y difusión de los conocimientos generados

al sector productivo, la prestación de asesoramiento y servicios a la sociedad y la formación de recursos humanos de excelencia especializados en el campo de la Biodiversidad Vegetal.

En el presente TFG se planteó el abordaje de diferentes técnicas moleculares y biotecnológicas no abarcadas durante la carrera a fin de desarrollar nuevas capacidades. El TFG fue realizado dentro del marco de los estudios florísticos, estudios de conservación y estudios evolutivos sobre genes de potencial aplicación biotecnológica que el Instituto de Botánica Darwinion viene llevando a cabo para la Flora vascular del Cono Sur. Se desarrollaron trabajos de laboratorio relacionados a diferentes enfoques de investigación, para integrar de manera transversal muchos conocimientos provenientes de otras ciencias como la biología, mejoramiento vegetal, ecología, bioquímica, genética, entre otras.

Los trabajos planteados para este TFG tuvieron 3 orientaciones que representan la utilización de técnicas moleculares que serán aplicadas a diferentes niveles de estudios: 1°) registro de especies, 2°) definición de límites entre especies en particular para taxones conflictivos, y 3°) estudios sobre genes candidatos con potencial aplicación biotecnológica de las especies definidas.

3- Relevancia de los Problemas Planteados

3-1) Registro de especies. Importancia del conocimiento de la biodiversidad en el Cono Sur

La región del Cono sur abarca la mayoría de las regiones subtropicales, templadas y frías al sur de los 20° de latitud Sur, cubriendo aproximadamente 26% del continente de América del Sur (4.705.071 km²), incluyendo Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. La flora del Cono Sur está compuesta por 318 familias, distribuidas en 2.813 géneros, con un total de 18.931 especies. De las 18.931 especies, 17.605 (el 93%) son nativas, de las cuales 7.713 (≈40%) son endémicas; el restante 7% (1.326 especies) son introducidas (Zuloaga et al., 2019).

La pérdida de la biodiversidad y la falta de conocimiento sobre la biodiversidad de una región son dos de los problemas ambientales más críticos en la actualidad (Dirzo & Raven, 2003; Ceballos et al., 2015). El calentamiento

global, junto con la destrucción y la degradación de los hábitats, está provocando importantes cambios en el área de distribución de las especies, produciendo contracciones y extinciones locales, que pueden ser las principales causas de la pérdida de biodiversidad (Brook et al., 2008; Chen et al., 2012; Urban, 2015). La biodiversidad vegetal es la base de la vida en la Tierra, y merece un cuidadoso registro como también una cuidadosa administración en un entorno cada vez más incierto (Nic Lughadha et al., 2020). Junto a las evaluaciones formales del riesgo de extinción de las especies, por ejemplo utilizando las categorías y criterios de la Lista Roja de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza – IUCN 2012, 2019, <https://www.iucn.org/>), el estudio de la biodiversidad en sus diferentes dimensiones taxonómicas, ecológicas, y filogenético-evolutivas, resulta fundamental para comprender el potencial impacto de los factores de amenaza y desarrollar políticas de conservación efectivas (Ricketts et al., 2005; Bennun et al., 2018; Owen et al., 2019; Antonelli et al., 2020; Corlett, 2016; Nic Lughadha et al., 2020).

Los análisis macro-evolutivos de floras integrales (i.e., integrando datos genéticos de las especies registradas en una región junto con datos de su distribución) son innovadores y tienen la capacidad de re-evaluar cuantitativamente el conocimiento tradicional de la biogeografía para una región. Analizar la distribución de las especies registradas y los patrones evolutivos de la flora vascular nativa del Cono Sur en el marco de un contexto filogenético permite no sólo evaluar varias predicciones provenientes de la biogeografía (e.g., que las Yungas y la selva Paranaense son las regiones más diversas dentro del Cono Sur, que los linajes más antiguos se concentran en los bosques sub-antárticos o que existen cunas de reciente especiación a lo largo de los altos Andes), sino además brindar información cuantitativa sobre las áreas de mayor interés para la conservación dentro de las diferentes ecorregiones.

Para aportar al registro sobre datos genéticos de la flora nativa en el país y patrones sobre la distribución geográfica de las especies, se trabajó a nivel molecular sobre una colección reciente de un espécimen proveniente de los altos andes en la provincia de Mendoza no registrado hasta el momento en Argentina. Este espécimen se determinó como *Alstroemeria spathulata*, especie de potencial interés a nivel de floricultura. Estudios moleculares fueron llevados a cabo sobre este taxón empleando marcadores moleculares “universales”, especialmente de

regiones altamente conservadas (regiones codificantes del genoma), lo cual resulta indispensable para su análisis y una administración moderna y sustentable de los recursos florísticos de toda la región.

*3-2) Delimitación de especies. Diferenciación de linajes evolutivos entre el complejo de especies *Gomphrena umbellata* y *Gomphrena radiata**

A pesar del gran número de especies registradas para el cono sur hasta el momento, los conocimientos sobre la biodiversidad siguen siendo incompletos (Diniz-Filho et al., 2013) (Whittaker et al., 2005; Bini et al., 2006; Oliveira et al., 2016). Todos los estudios de biodiversidad en sus diferentes dimensiones (taxonómica – ecológica – evolutiva) son dependientes del concepto de especie, por lo tanto, la delimitación de las “unidades” evolutivas, reflejadas en los límites de las especies, constituye un paso crítico (de Queiroz, 1998).

Por consiguiente, la delimitación de las especies se convierte en una cuestión crítica en los estudios evolutivos, ecológicos y de conservación (Riddle & Hafner, 1999; Agapow et al., 2004; Isaac et al., 2004; Dayrat, 2005; Sukumaran & Knowles, 2017), en particular para géneros y complejos con bajos niveles de diferenciación evolutiva y ecológica (Federici et al., 2013).

El objetivo primario para estudiar la biodiversidad, y sus patrones de diversificación es identificar linajes evolutivos independientes, también interpretados como unidades evolutivas significativas (ESUs – Moritz, 1994). De esta forma, los estudios moleculares son imprescindibles para los análisis de delimitación de especies y para proporcionar la información básica utilizada luego en los estudios biogeográficos, evolutivos, ecológicos, y de conservación (Riddle & Hafner, 1999; Agapow et al., 2004; Isaac et al., 2004; Dayrat, 2005; Sukumaran & Knowles, 2017).

En particular para estudios de conservación, el conocimiento del número real de especies y sus relaciones filogenéticas contribuye en gran medida al diseño de posibles estrategias de conservación, ya que la subestimación del número de especies (i.e. linajes de evolución independiente) puede traducirse en la subestimación del número de taxones amenazados, o de forma inversa, una sobreestimación del número de especies puede aumentar erróneamente el

número de taxones amenazados para una determinada región (Crandall et al., 2000; Fraser & Bernatchez, 2001).

Para abarcar este nivel de estudio, en el presente TFG se trabajó a nivel molecular sobre especímenes de taxones del género *Gomphrena*, debido a que hay dudas respecto a los límites específicos entre los taxones *Gomphrena umbellata* y *G. radiata*. Para delimitar genéticamente estos taxones conflictivos, se emplearon marcadores moleculares de mayor variación genética a los utilizados en el registro de especies del Cono Sur, los cuales permiten tomar decisiones acerca de la validez o no a nivel científico de las especies consideradas.

3-3) Posibles utilidades biotecnológicas en especies delimitadas. Estudios sobre genes relacionados a la fotosíntesis C4 de potencial aplicación biotecnológica

Desde el descubrimiento de la fotosíntesis C4 hace 50 años atrás, numerosos estudios se han focalizado sobre diferentes aspectos de esta vía fotosintética debido a su impacto en la productividad de los cultivos agrícolas. En el futuro se podría aprovechar la fotosíntesis C4 para mejorar aún más la eficiencia y tolerancia a estrés de cultivos C4, crear nuevos cultivos C4 por domesticación de especies silvestres, particularmente para biocombustibles y producción de fibras, así como también lograr convertir en C4 cultivos C3 como arroz y trigo (Von Caemmerer et al., 2012; von Caemmerer and Furbank, 2016). Además, muchas malezas y especies invasoras son C4 por lo cual el conocimiento sobre la evolución y ventajas adaptativas de la fotosíntesis C4 es importante no solo para el manejo de cultivos sino también para la historia y ecología de las pasturas y sabanas tropicales y su respuesta al cambio climático.

Aunque la fotosíntesis C4 ha evolucionado en grupos taxonómicos dispersos dentro de la filogenia en Angiospermas, tiende a agruparse en 3 clados mayores: en Poaceae 22-24 orígenes independientes, en Cyperaceae 6 orígenes independientes y en Caryophyllales 23 orígenes independientes (Sage, 2017). Este patrón sugiere que deberían existir características preexistentes que facilitan la evolución C4 en algunos taxa mientras que la falta de esas características imposibilitaría la evolución C4 en otros taxa (Christin et al., 2013; Sage et al., 2014). La presencia de factores que predisponen a ciertos grupos a evolucionar paralelamente hacia la fotosíntesis C4 probablemente están relacionados tanto a

factores ecológicos, como atributos genéticos y características estructurales de la hoja ancestral C3 (Christin et al., 2013; Sage, 2017).

Dentro de la importante familia de los pastos, la tribu Paspaleae (Poaceae) representan un grupo de especies de la flora nativa de América atractivo para evaluar la adquisición gradual de caracteres fotosintéticos C4 dado que agrupa especies bien delimitadas y definidas, y con diferentes metabolismos fotosintéticos (Acosta et al., 2014, 2019). En otros linajes de Poaceae con especies C3, C4 y vías fotosintéticas intermedias como el género *Neurachne* (clado de especies de África y Asia), una elevada frecuencia de eventos de transferencia horizontal de genes C4-optimizados entre taxa del género han sido relacionados con la evolución C4 (Christin et al., 2012). Este aspecto debe ser tenido en cuenta en la tribu Paspaleae, completando el muestreo molecular para obtener una filogenia robusta que permita utilizar el enfoque filogenético para ensayar roles relativos de duplicaciones génicas, mutaciones y transferencia horizontal de genes en el ensamblado del genoma C4 desde un ancestro C3.

Debido a la relevancia de la tribu Paspaleae y a que sus especies se encuentran actualmente bien delimitadas, proponemos en este TFG aportar al desarrollo de un contexto filogenético robusto de especies dentro de la tribu Paspaleae (Poaceae) mediante la aplicación de técnicas de biotecnología (clonado de genes para identificación de duplicaciones del genoma e información sobre la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de posible interés agrobiotecnológico). La información generada en este nivel de trabajo, aunque no es concluyente, servirá para completar el muestreo de la taxa necesarios para estudiar la evolución molecular de complejos multienzimáticos de interés agrobiotecnológico dentro de la tribu Paspaleae.

Objetivos

El objetivo general de este Trabajo Final de Graduación es el aprendizaje de los fundamentos y el entrenamiento práctico concreto en técnicas moleculares de laboratorio para generar nueva información que permita:

1) Aportar datos sobre registro de especies en la región e integrar los resultados obtenidos a los estudios macroecológicos y de conservación de la Flora vascular del Cono Sur que se vienen llevando a cabo en el Instituto Darwinion.

2) Identificar y validar diferentes linajes de evolución independiente (= unidades evolutivas significativas) en complejos de los géneros *Gomphrena* (Amaranthaceae). Los linajes identificados serán analizados-categorizados como especies bajo el concepto general de especies.

3) Reconstrucción de la historia evolutiva de la tribu Paspaleae de genes candidatos considerados clave en la fotosíntesis C4, para estudiar en el futuro posibles genes candidatos de impacto agrobiotecnológico.

Objetivos específicos

- Entrenamiento y aplicación de diferentes técnicas moleculares desarrolladas en el laboratorio de sistemática molecular y evolución del IBODA (extracción de ADN, amplificación, clonado de genes) y su optimización para cada nivel de estudio.

- Estudiar los fundamentos de trabajo y elaborar protocolos sobre las técnicas desarrolladas.

- Aplicación de técnicas bioinformáticas para análisis de secuencias genéticas.

Principios y elementos a tener presente para el trabajo en laboratorio

Importancia sobre el conocimiento del equipamiento presente en el laboratorio y sus normas de seguridad

Un laboratorio es un lugar que se encuentra equipado con los medios necesarios para llevar a cabo experimentos, investigaciones o trabajos de carácter científico o técnico. En los laboratorios se encuentran investigadores y técnicos que ejecutan distintos protocolos y procedimientos para lograr objetivos específicos. Para entender cada uno de estos es fundamental partir hablando de seguridad y equipamiento que se puede encontrar. La cantidad y tipo de instrumentos, como también las normas de seguridad que tiene un laboratorio, dependerá de la especialidad y las técnicas que se desarrollen; el presupuesto con el cual cuenta también es un dato significativo a la hora de caracterizar estas cuestiones.

La seguridad en los laboratorios se conforma por un conjunto de medidas preventivas, las cuales se destinan a proteger la salud individual de quien realiza el procedimiento y la salud de todos aquellos que lo rodean. También, dichas medidas integran a la sociedad, ya que en definitiva, acciones equivocadas en un laboratorio pueden derivar a contaminaciones exteriores y por ende problemas generalizados en una población. La acción meticulosa de cada técnica, el orden y el cuidado con que se trabaja son las cuestiones más básicas e importantes dentro de un laboratorio, mucho más que equipos y tecnología de última generación. A la hora de comenzar con un protocolo, es relevante limpiar el lugar de trabajo, preparar los elementos a utilizar y colocarlos en un lugar determinado y analizar todas las posibles contingencias, para prever conductas a llevar adelante.

Dentro de un laboratorio es importante conocer la ubicación de elementos de seguridad, tales como matafuegos, salidas de emergencia, lavajojos, alarmas, etc. Está prohibido comer, beber, fumar y guardar alimentos. Es fundamental que todo esté identificado correctamente y que se respete y cuide el trabajo de otro. En un laboratorio es imprescindible mantener el orden y la limpieza; cada persona es responsable directa de la zona en donde trabaja y de todos los espacios comunes.

No todos los procedimientos que se llevan a cabo en un laboratorio se realizan en el mismo lugar; algunos deben desempeñarse en lugares específicos que proporcionan mayor seguridad. Existen métodos que producen gases, vapores, humos o partículas que pueden ser riesgosas por inhalación; estos deben realizarse bajo campana o cabina de extracción. Por ejemplo, cuando se lleva a la práctica la extracción de ADN, generalmente se utilizan reactivos como cloroformo isoamílico y beta-mercaptoetanol; estos pueden resultar muy tóxicos, y su uso se debe desempeñar bajo campana. Otros procedimientos, como por ejemplo la tinción de geles, involucran la utilización de elementos que pueden resultar muy posiblemente perjudiciales para la salud, estos se tienden a realizar también en lugares particulares del laboratorio donde se requiere de guantes y existen materiales propios de ese lugar, que no deben ser utilizados en otros espacios del mismo.

Algo no menor a tener en cuenta en un laboratorio es el manejo de los residuos. Los desechos no tienen siempre las mismas características, y por consecuencia su tratamiento de degradación no es el mismo. La conciencia en la separación de los descartes es clave y se debe atender con máxima responsabilidad.

Todo investigador o técnico científico debe utilizar los instrumentos básicos de protección dentro de un laboratorio, los cuales además de proteger a los individuos que forman parte del espacio, también sirven para evitar la contaminación de los reactivos, las muestras y los elementos en general. Entre dichos instrumentos encontramos al guardapolvo, los guantes, el barbijo y las gafas protectoras. Dependiendo las técnicas a realizar y los lugares en donde se llevarán a cabo se utilizarán en conjunto o en partes.

Además de tener en cuenta las medidas de seguridad en un laboratorio, también es de gran relevancia el correcto uso de los instrumentos que forman parte del mismo y con los cuales se llevan a cabo las técnicas y procedimientos habituales. A continuación, a modo breve y práctico se desarrollarán las características que presentan los instrumentos más comunes de utilizar en un laboratorio de biología molecular. En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se podrán visualizar algunos de ellos.

Detalle sobre instrumentos de laboratorio utilizados

Probetas: es un instrumento caracterizado por tener una parte superior abierta y una parte inferior cerrada que consta de una base para ofrecer apoyo; generalmente son de vidrio y la parte superior puede o no presentar pico. La función principal que tienen es medir volúmenes con precisión y verterlos en lugares determinados. Existen de distintos tamaños con diferentes graduaciones, lo cual genera la posibilidad de manejar cantidades variables.

Matraz de enrlenmayer: generalmente instrumento de vidrio, que tiene como uso principal contener líquidos y calentarlos. Debido a la forma y estructura, que le permite evitar derrames, se caracteriza por tener gran capacidad de agitación. No se suele utilizar para medir volúmenes, ya que tiende a ser impreciso.

Vaso de precipitado: recipiente de forma cilíndrica, de vidrio en la mayoría de los casos, con pico en el borde para facilitar el vertido del contenido. Se encuentra graduado, por lo que se emplea para procesos de medición de volumen y también de precipitación. Se pueden utilizar para calentar, agitar y descartar contenidos.

Termo de nitrógeno líquido: recipiente diseñado para almacenar y mantener nitrógeno líquido a temperaturas extremadamente bajas. Tener en cuenta que el nitrógeno líquido se encuentra a una temperatura de aproximadamente -196°C . El termo está compuesto por un recipiente interno aislado térmicamente y un recipiente externo que proporciona una capa adicional de aislamiento. Se utiliza principalmente para la criopreservación de muestras biológicas. Para su utilización se deben seguir precauciones de seguridad debido a la temperatura extremadamente fría y la presión generada.

Mortero (Figura 1-1): instrumento de laboratorio, generalmente de porcelana, utilizado como recipiente para triturar, pulverizar o mezclas sustancias sólidas. Es fundamental la dureza y solidez en su estructura.

Pistilo (Figura 1-2): instrumento de laboratorio que consiste en una pieza sólida con un extremo redondeado. Generalmente el material por el cual se constituye es porcelana. El pistilo se utiliza aplicando presión y movimiento rotatorio dentro de un mortero. La función que presenta es triturar, pulverizar o mezclar sustancias sólidas.

Cuchara espátula de metal: se utiliza para tomar pequeñas cantidades de compuesto que son generalmente polvos. También, mediante este instrumento se puede mezclar y homogenizar, con la precaución de no raspar o dañar el recipiente en donde se está realizando.

Pipeta automática o micropipeta (Figura 1-3): es el elemento básico de cualquier investigador científico en un laboratorio debido a su continuo uso para casi prácticamente todo. Se emplea para absorber y transferir pequeños volúmenes de líquido. La micropipeta consta de una ventana en donde se indica el volumen programado para absorber. Dicho volumen se modifica a través de una rosca que generalmente se ubica en la parte superior. El pipeteo se realiza presionando y soltando el embolo suavemente; al presionar se libera el líquido y al soltar se absorbe. Existen micropipetas para diferentes rangos de volumen, encontramos: P1000 (se utiliza para trabajar con volúmenes de entre 100 a 1000 μL); P200 (se utiliza para trabajar con volúmenes de entre 20 a 200 μL); P100 (se utiliza para trabajar con volúmenes de entre 10 a 100 μL); P20 (se utiliza para trabajar con volúmenes de entre 2 a 20 μL); P10 (se utiliza para trabajar con volúmenes de entre 1 a 10 μL). Cuando uno utiliza micropipetas es fundamental cumplir con los rangos de volumen, para de esta manera evitar todo tipo de imprecisión en el procedimiento. Las micropipetas se utilizan con tips descartables; si estos no se utilizarían, entonces se contaminarían desde su primer uso.

Tips (Figura 1-4): son insumos descartables con forma de cono que se usan para pipetear. Frecuentemente se utilizan aquellos que no presentan filtros, pero para ciertas técnicas, de mayor especialidad, se pueden utilizar tips que sí los presentan. Finalizada la utilización de un tips, el mismo se descarta para evitar contaminación. Los tips se caracterizan por venir de varios tamaños para ser compatibles con las micropipetas de diferentes graduaciones. Se suelen ubicar en racks (cajas) que contienen gran cantidad de los mismos (Figura 1-5); de esta manera se protegen de la suciedad. Es importante autoclavar los tips previa utilización para maximizar la esterilidad en las técnicas desarrolladas.

Tubos eppendorf (Figura 1-6): son tubos de plástico, cónicos, que sirven para conservar muestras, reactivos y soluciones varias. Actúan como recipientes de reacciones que se llevan a cabo en un laboratorio. Presentan una tapa de plástico adosada que puede abrirse y cerrarse con una sola mano, para con la otra maniobrar la micropipeta. Se caracterizan por ser resistentes a altas temperaturas

y a la centrifugación. Esto es de gran importancia, debido a que se permite manipular las muestras y reacciones de forma variada y flexible, de acuerdo a lo que requiera el protocolo que se esté realizando. Vienen de diferentes medidas, en donde podemos encontrar tubos eppendorf de: 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml. Es fundamental rotularlos siempre que se utilicen, para de esta manera no tener dudas sobre el contenido que presentan.

Placas para ensayos o cultivos (Figura 1-7): son de tamaño variable y pueden tener más o menos recipientes. Se pueden utilizar como pasos intermedios, por ejemplo, antes de realizar la corrida electroforética, donde se mezcla el loading buffer con el ADN proveniente de la PCR.

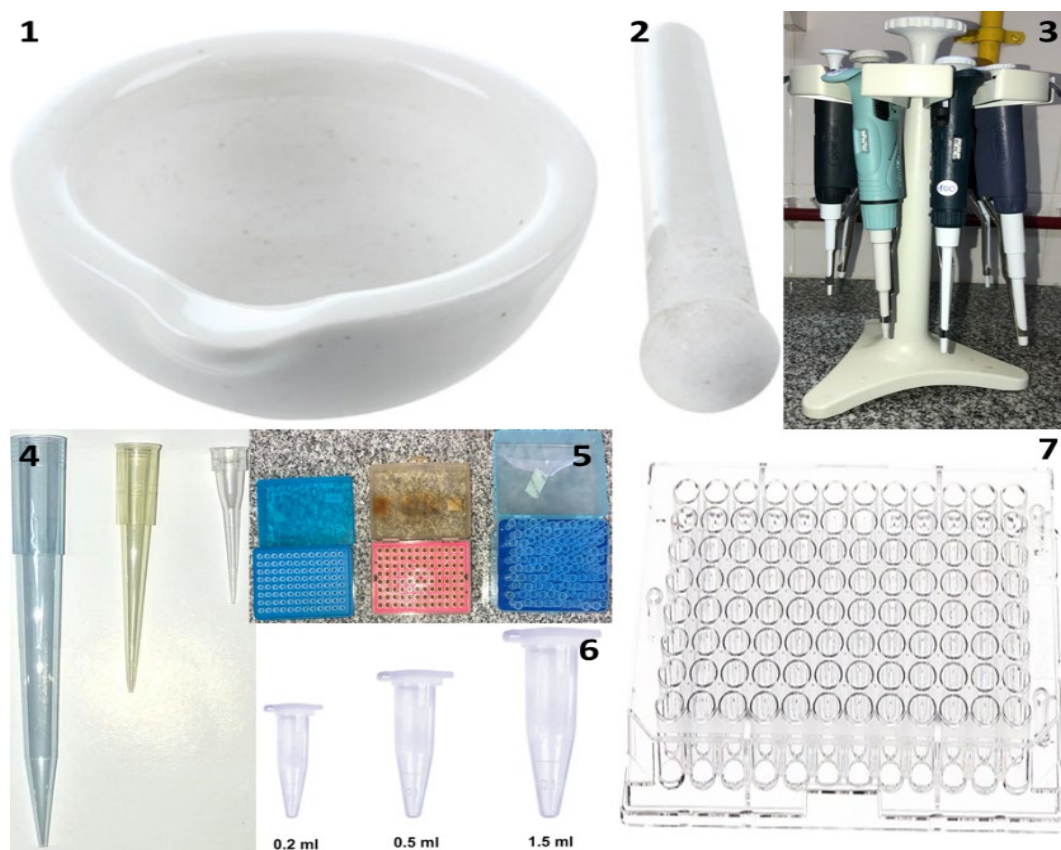


Figura 1. 1-Mortero; 2-Pistilo; 3-Micropipeta; 4-Tips; 5-Rack; 6-Tubos eppendorf; 7-Placa de ensayo.

Tubo falcon: consiste en un tubo cónico que viene graduado; existen de diferentes volúmenes. Pueden o no tener base y sirven para conservar soluciones, realizar reacciones y preparar mezclas.

Placas de Petri: son de uso variado, generalmente de vidrio. Se suelen encontrar en cultivos celulares.

Gradillas: son estructuras que sirven para ubicar los tubos de manera ordenada y erguida. Hay de diferentes tamaños y formas. Se pueden utilizar para la ubicación de tubos eppendorf, tubos falcon, tubos de ensayo, entre otros. Algunas gradillas, dada su estructura y forma, permiten la ubicación de diferentes tipos de tubos en una misma.

Centrífuga (Figura 2-1): es una máquina que se utiliza para poner en rotación una muestra, con el objetivo de acelerar la decantación o sedimentación de sus componentes o fases; los componentes se van a ubicar en una fase u otra dependiendo la densidad que presenten. Debido a la alta velocidad que alcanza el rotor de la centrífuga, la misma debe situarse en una superficie sólida y plana. La máquina consta de tapa, cámara, base, interruptor, marcador de tiempo, tacómetro, freno, control de velocidad, rotor y porta muestras. Tiene la capacidad de poder configurarse para distintas velocidades, las cuales se miden en rpm (rotaciones por minuto) o rcf (fuerza centrífuga relativa). La velocidad va a depender del objetivo y de los componentes de la muestra.

Centrífuga refrigerada (Figura 2-2): tiene la misma funcionalidad que cualquier centrífuga común, pero se diferencia básicamente en la capacidad de control de temperatura mientras se lleva a cabo la centrifugación. Esto resulta relevante para ciertas muestras que requieren de una temperatura particular durante el procedimiento.

Centrífuga spinner (Figura 2-3): a diferencia de la centrífuga común, esta no permite una alta velocidad de centrifugación; sirve para realizar un spin de corta duración a velocidad moderada, con el objetivo de hacer que el volumen del tubo migre hacia la parte inferior y se eliminen gotas que puedan estar en las paredes del tubo o en la tapa del mismo. También, permite que se eliminen por completo las burbujas que pueden estar presentes en el líquido.

Vortex (Figura 2-4): equipo de laboratorio utilizado para mezclar de manera rápida y eficiente pequeñas muestras. Consiste en una base que contiene un motor y un soporte en el cual se inserta un tubo que contiene la muestra a mezclar. Al activar el vortex, el motor del mismo genera un movimiento vibratorio en el soporte que hace que el contenido dentro del tubo se mezcle de manera vigorosa.

Placa seca (baño seco) (Figura 2-5): es un equipo que permite realizar la incubación de muestras a una temperatura estable configurada. Se conforma por una base y un bloque de metal donde se introducen las muestras. La placa seca tiene la capacidad de distribuir la temperatura de manera homogénea por sobre todo el bloque de metal que la representa. La temperatura se configura de acuerdo a lo que se está buscando.

Baño termostático (baño húmedo) (Figura 2-6): es un equipo que permite realizar la incubación de muestras a una temperatura estable configurada. A diferencia de la placa seca, el baño termostático se conforma por un recipiente en donde se le coloca agua destilada y se la calienta. Una vez que el agua tiene la temperatura buscada (configurable) se colocan las muestras de tal manera que permanezcan flotando sobre la misma.



Figura 2. 1-Centrífuga; 2-Centrífuga refrigerada; 3-Centrífuga spinner; 4-Vortex; 5-Placa seca; 6-Baño termostático.

Termociclador (Figura 3-1): equipo primordial en un laboratorio de biología molecular, ya que se utiliza para realizar una de las técnicas más extendidas en el ámbito, que es la PCR. El termociclador permite incubar muestras con ciclos de temperatura con gran precisión. Consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye, a través de una placa, una temperatura homogénea durante tiempos que pueden ser configurables, normalmente con rangos de temperaturas que van desde los 4°C a los 96°C. Los termocicladores se programan de acuerdo al protocolo que se necesite, la cantidad de ciclos y la temperatura y duración de cada uno de ellos. Dado que las soluciones incubadas en el equipo son acuosas, los termocicladores suelen incluir una tapa que por dentro consta de una placa calentada constantemente a 105°C, con el fin de evitar la condensación de agua en la parte superior de los tubos donde ocurre la reacción. Por lo tanto, a través de esto se impide la concentración de los solutos y, por ende, la modificación en la condición de la reacción. Además de la amplificación del ADN, los termocicladores permiten realizar gradientes de temperatura controlada; también se pueden utilizar para incubar muestras a temperaturas determinadas cuando se necesita máxima precisión (mayor a la que brindaría un baño seco o un baño húmedo). Existen termocicladores para PCR punto final o para PCR cuantitativa o real time. Los termocicladores real time tienen la particularidad de poder detectar fluorescencia en las muestras, lo que permite la determinación de cantidades de ADN en cada una de ellas durante intervalos de tiempos. Para esto, los equipos cuentan con un sistema sofisticado de emisión y detección, que se utilizan en conjunto con un software que permite interpretar los datos a tiempo real desde el inicio hasta el final del protocolo.

Fuente y cuba para electroforesis (Figura 3-2): son dos equipos que se utilizan en conjunto para realizar técnicas de separación de moléculas, como el ADN y las proteínas, que según la movilidad que tienen los componentes que los conforman, se van a separar más o menos uno de otros. El proceso se lleva a cabo en un campo eléctrico, en donde los componentes que forman parte de la muestra migran de un polo a otro a través de una matriz de naturaleza porosa, que puede ser un gel de agarosa, un gel de poliacrilamida u otro tipo de matriz. Por un lado, la fuente de poder es la encargada de generar la corriente eléctrica para producir la movilidad de las moléculas a través del gel; se puede regular el voltaje de acuerdo al tipo de sustrato y muestra que se esté corriendo. También se puede regular el tiempo en el cual la fuente debe transmitir la corriente eléctrica. Por

ejemplo, si se quiere mayor precisión en la corrida, la misma se hace con un menor voltaje y un mayor tiempo. La cuba es el otro equipo que interviene, el cual actúa como soporte, en él se ubica el gel sumergido en un buffer (medio acuoso con determinada concentración de electrolitos que mantiene un pH constante en la solución). Consta de un electrodo negativo y un electrodo positivo, los cuales generan el campo eléctrico antes mencionado y, consecuentemente, el movimiento de los componentes de la muestra.

Plataforma de agitación: equipo que se utiliza para proporcionar una vibración suave y constante al gel de agarosa durante el proceso de tinción. La vibración ayuda a facilitar la penetración uniforme del tinte en el gel y a mejorar la eficiencia de la tinción.

Transiluminador UV (Figura 3-3): dispositivo de sobremesa que ofrece al investigador una fuente de luz ultravioleta uniforme e intensa. Sirve para la visualización de ácidos nucleicos luego de la electroforesis. Los geles antes o luego de la electroforesis son teñidos con intercalantes o colorantes que emiten luz al ser iluminados con la luz UV. Los intercalantes se intercalan en las moléculas de ADN y al ver el gel se puede visualizar el ADN en forma de bandas luminosas que se ubican de acuerdo al peso molecular; con la utilización de colorantes se logra el mismo efecto. El transiluminador consta de tubos de luz ultravioleta protegidos por un filtro sobre el cual se posan los geles. Al utilizar este aparato es fundamental proteger la vista de la luz emitida, ya que puede generar perjuicios en la misma. Para esto, se pueden utilizar filtros o anteojos especiales.

Balanza (Figura 3-4): equipo básico muy utilizado en un laboratorio. Es fundamental para el preparado de soluciones que involucren componentes sólidos (polvos, por ejemplo); estos deben ser pesados antes de su agregado, con el fin de evitar subdosis o sobredosis que desemboquen en soluciones incorrectas.

Balanza de alta precisión (Figura 3-5): se caracteriza principalmente por estar rodeada de una caja de vidrio con una puerta que permite el ingreso de los materiales a pesar. Dicha protección evita que corrientes de aire puedan modificar las mediciones. Son utilizadas para pesar materiales muy livianos como, por ejemplo, muestras previas a la extracción de ADN.

Horno microondas: sirve para calentar soluciones o disolver sustancias que requieren calor.

Microscopio: permite tener una visualización aumentada sobre algo en particular, que se ve muy pequeño a simple vista o directamente no se puede visualizar. Los microscopios ópticos, por ejemplo, usan lentes para enfocar y amplificar los rayos de luz que pasan a través de un espécimen o rebotan en él.

Lupa binocular: instrumento óptico que permite magnificar y visualizar objetos con mayor detalle. Tiene dos lentes oculares para proporcionar una visión estereoscópica y ajustable. A diferencia del microscopio, se caracteriza por generar una visualización mucho menos aumentada.

Estufa para cultivo (Figura 3-6): es un equipo programable que permite mantener un determinado componente a una temperatura constante y elevada. Generalmente, se utiliza para propiciar el crecimiento de cultivos celulares de bacterias a una temperatura aproximada de 37°C. Ciertas estufas de cultivo son capaces de generar agitación, la cual normalmente es lenta, pero constante.

Flujo laminar: consiste en una cabina cerrada, que cuenta con una mesada y una abertura por donde se puede introducir manos y elementos varios. La función principal que tiene el flujo laminar es proporcionar un área libre de partículas y contaminación. Garantiza la protección de los procesos críticos y asegura la completa aislación de los productos durante el proceso de manipulación. Toma importancia para manipulación de cultivos celulares y PCR; en ambos procesos resulta indispensable evitar la incorporación de cualquier agente extraño. El funcionamiento del flujo laminar consiste en la generación de un flujo de aire unidireccional, que puede ser vertical u horizontal. El aire ingresa pasando primero a través de un filtro, que evita que cualquier partícula o contaminante entre a la zona de trabajo. Sobre el lado opuesto se encuentra la salida de dicho aire, donde, además de permitir su liberación, también evita que entre cualquier partícula no deseada. Los flujos laminares suelen presentarse con un tubo de luz UV, que tiene como objetivo descontaminar el área de trabajo antes o después de su utilización.

Campana de extracción (Figura 3-7): su función principal es retirar gases que pueden resultar nocivos para el investigador y las personas que formen parte del laboratorio. Se localiza en un lugar específico y abarca un espacio en donde se cuenta con un lugar de trabajo para manipular instrumentos y componentes.



Figura 3. 1-Termociclador; 2-Fuente y cuba electroforética; 3-Transiluminador UV; 4-Balanza; 5-Balanza de precisión; 6-Estufa de cultivo; 7-Campana de extracción.

Fotodocumentador (Figura 4-1): su función consiste en documentar geles; básicamente, es un aparato que sirve para fotografiar geles provenientes de la electroforesis y tinción. Permite la visualización de ADN en geles de agarosa o poliacrilamida de manera nítida y con máximo detalle. Proporciona una gran flexibilidad y versatilidad en términos de opciones de iluminación (incluyendo UV) y configuraciones de cámara. A diferencia del transiluminador UV, el fotodocumentador permite ver con máximo detalle los geles y poder realizar una fotografía de los mismos. Ahora bien, una consideración a tener en cuenta es que, al llevar a cabo el protocolo de purificación de ADN, donde se tienen que realizar cortes en los geles, con el fotodocumentador se dificulta este paso. Por lo tanto, la mejor alternativa para el protocolo mencionado es la utilización del transiluminador UV.

Biofotómetro (Figura 4-2): es un instrumento usado para diversas técnicas como, por ejemplo, la determinación de cantidad y calidad de ADN. Sirve para medir la intensidad de luz absorbida después de que la misma pase a través de una solución determinada. El equipo consta de una abertura en donde se localiza la muestra, a la cual se le proyecta un haz de luz monocromática. Dependiendo las características de la muestra analizada, pasará mayor o menor cantidad de luz. De este modo, el instrumento indica un valor de absorbancia.

Electroporador (Figura 4-3): equipo diseñado para realizar la transformación de bacterias por el método de la electroporación. Su función es crear un campo electromagnético a través de la suspensión celular. Para que se puede efectuar el proceso, la suspensión se coloca en una cubeta específica, que puede ser de 0,1 cm (Figura 4-4) o 0,2 cm (Figura 4-5). Las cubetas se caracterizan por presentar electrodos de aluminio en los costados y un tamaño y forma adecuado para poder ser insertadas en el equipo. El electroporador se configura a través de un voltaje determinado y se lleva a cabo la electroporación. El éxito de esta dependerá en gran medida de la pureza de la disolución de plásmido, especialmente de su contenido en sales.

Espátula de Drygalsky: instrumento que se utiliza para la extensión uniforme de los cultivos dentro de una placa Petri.

UPS: si bien no es un instrumento meramente de laboratorio, su uso en los mismos está muy difundido. Su objetivo principal es regular el voltaje y, a diferencia de un estabilizador convencional, ofrecer un flujo de corriente eléctrica ininterrumpida en caso de que ocurra un corte del fluido eléctrico; esto es posible gracias a baterías que presenta en su interior. La utilización de UPS es semejante para los equipos de PCR, ya que si se produce un corte en la electricidad y el programa configurado finaliza anticipadamente, entonces el mismo va a fallar y se generará una pérdida de recursos y tiempo empleado.

Autoclave (Figura 4-6): se caracteriza por ser un recipiente metálico con paredes muy gruesas y una tapa que permite el cierre hermético. El equipo trabaja con vapor de agua a alta presión y alta temperatura. La función principal que presenta es llevar a cabo la esterilización del instrumental que se utiliza en el laboratorio. Dependiendo el material que se quiere autoclavar se configurarán las condiciones adecuadas que involucran los mismos.



Figura 4. 1-Fotodocumentador; 2-Espectrofotómetro; 3-Electroporador; 4-Cubeta de 0,1 cm; 5-Cubeta de 0,2 cm; 6-Autoclave.

Especies vegetales estudiadas a nivel molecular

El trabajo desarrollado se llevó a cabo mediante la utilización de especies botánicas de potencial diverso interés (Tabla 1). Se trabajó con taxa que está incluida en tres familias principales: Alstroemeriaceae, Amaranthaceae y Poaceae; el fundamento por el cual en algunas de ellas se seleccionaron diferentes géneros y especies y en otras no, radica en el análisis que se quiso realizar y en los resultados que se estimaron lograr.

Familia	Especie	Voucher	Proyecto
Alstroemeriaceae	<i>Alstroemeria spathulata</i> C.Presl	Kiesling 10611 (SI)	Registro de especies
Alstroemeriaceae	<i>Alstroemeria spathulata</i> C.Presl	JMA 1669 (SI)	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena tomentosa</i> (Griseb.) R.E.Fr.	NB 10	Delimitación de especies
Amaranthaceae	<i>Gomphrena colosacana</i> Hunz. & Subils	NB 14	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena cladotrichoides</i> Suess.	FOZ 12804	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena meyeniana</i> Walp.	CZ 183	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena radiata</i> Pedersen	FOZ 14564	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena umbellata</i> J.Rémy	FOZ 13112	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena umbellata</i> J.Rémy	FOZ 15962	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena umbellata</i> J.Rémy	FOZ 16125	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena radiata</i> Pedersen	FOZ 16104	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena radiata</i> Pedersen	FOZ 16263	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena radiata</i> Pedersen	CZ 856	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena umbellata</i> J.Rémy	JMA 1028	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena radiata</i> Pedersen	CZ 1077	
Amaranthaceae	<i>Gomphrena umbellata</i> J.Rémy	JMA 922	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Homolepis glutinosa</i> (Sw.) Zuloaga & Soderstr.	FOZ 6799	Posibles utilidades biotecnológicas en especies delimitadas
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Homolepis villaricensis</i> (Mez) Zuloaga & Soderstr.	FOZ 8919	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Homolepis isocalycia</i> (Meyer) Chase	FOZ 9783	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Homolepis aturensis</i> (Kunth) Chase	OM 5046	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Mesosetum comatum</i> Swallen	FOZ 6815	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Tatianyx arnaces</i> (Trin.) Zuloaga & Soderstr.	FOZ 6965	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Mesosetum chaseae</i> Lucas	FOZ 6945	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Oplismenopsis najada</i> (Hack. & Arechav.) Parodi	OM 5187	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Apochloa lutzii</i> (Swallen) Zuloaga & Morrone	Viana 2539	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Apochloa lorea</i> (Trin.) Zuloaga & Morrone	Longhi-Wagner 9635	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Apochloa molinioides</i> (Trin.) Zuloaga & Morrone	Souza 25702	
Poaceae (Arthropogoninae)	<i>Apochloa subtramulosa</i> (Renvoize & Zuloaga) Zuloaga & Morrone	Brocahdo 96	

Tabla 1. Especies seleccionadas para desarrollar los proyectos involucrados en el Trabajo Final de Graduación.

Es importante destacar que cada familia, género y especie tienen particularidades que deben atenderse a la hora de su análisis, ya que puede suceder que la metodología que se emplee para cada una no sea la misma y dependa de singularidades específicas. A medida que se vayan dando las explicaciones de las técnicas que se emplearon en el trabajo, se detallarán las consideraciones particulares antes mencionadas.

Para registrar efectivamente la presencia de *Alstroemeria spathulata* en Argentina, lo que se buscó es el registro molecular de una especie en particular,

integrando los datos generados con la información existente en Bases de Datos Genéticos públicas como GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Por otro lado, para llevar a cabo la diferenciación de linajes evolutivos entre el complejo de especies *Gomphrena umbellata* y *Gomphrena radiata*, se requirieron diferentes alternativas moleculares, pero limitadas al taxón que se quiso delimitar, para de esta manera poder llevar a cabo comparaciones y conclusiones al respecto.

Finalmente, para el estudio sobre genes relacionados a la fotosíntesis C4 de potencial aplicación biotecnológica, se incluyeron distintos géneros y especies, con el fin de conseguir resultados basados en un muestreo amplio y lograr conclusiones concisas y fiables.

A continuación, se indican características básicas de algunas de las especies involucradas en el Trabajo Final de Graduación, con el objeto de conocer su morfología (mediante descripciones e ilustraciones) y su distribución en el Cono Sur (mediante mapas de distribución).

Alstroemeria spathulata

Hierba perenne (link de descripción morfológica completa: https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf) (para una ilustración morfológica ver Figura 5-1), situada a una altitud que puede ir desde los 2.000 a 3.500 metros sobre el nivel del mar en la región Andina. Generalmente se la encuentra por encima de laderas de rocas sueltas (Figuras 5-2 y 5-3). Se caracteriza por florecer desde diciembre a febrero, llevando a cabo la fructificación en el mes de enero. Hasta el momento se la encontraba únicamente en Chile, pero un nuevo registro, resultado explicado en este TFG (ver Resultados de acuerdo al caso 1 de estudio), corrobora su presencia en Argentina, específicamente en el sur de la Provincia de Mendoza (Figura 5-4). *Alstroemeria spathulata* comparte muchas características morfológicas con otra especie del mismo género denominada *Alstroemeria umbellata*; en la habitualidad, ambas especies suelen confundirse.

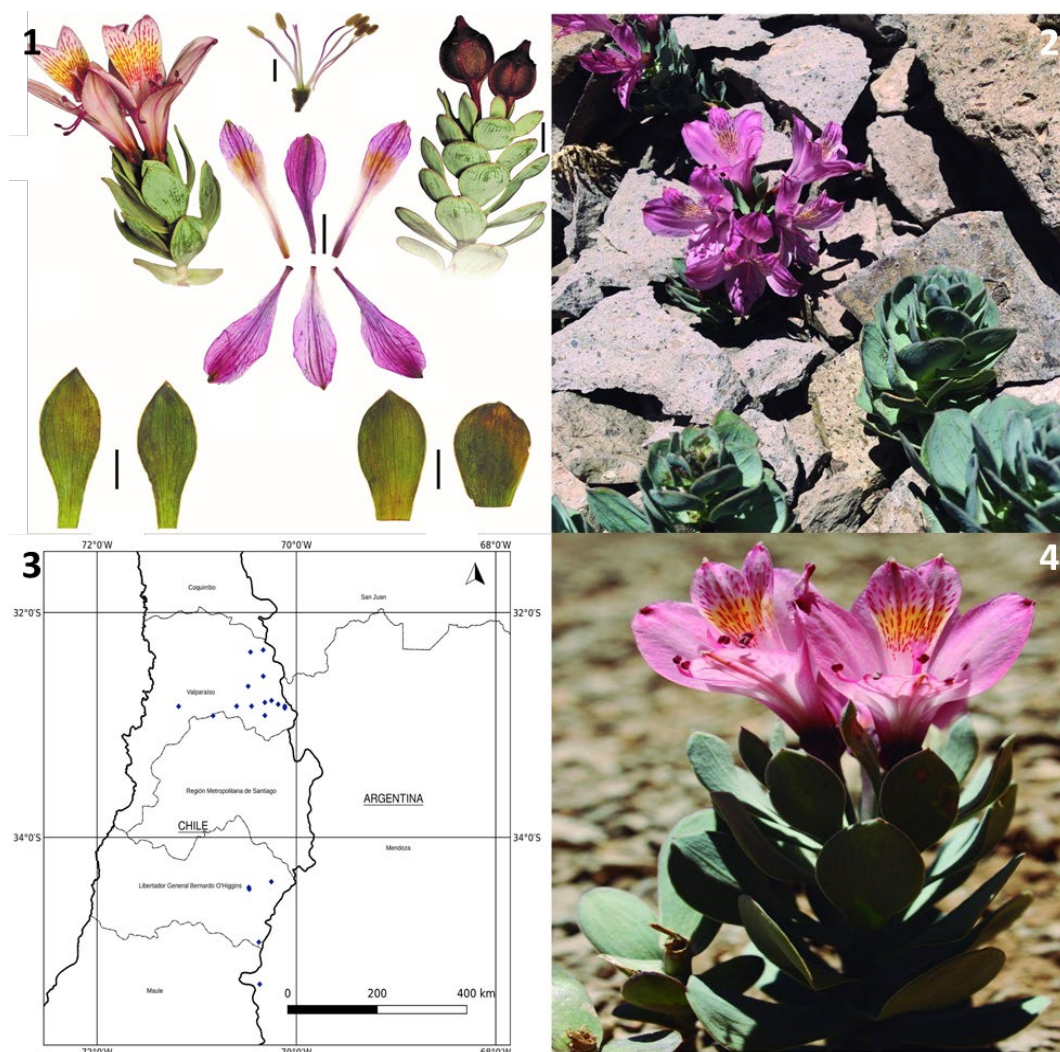


Figura 5. 1-Detalle de órganos de la planta; 2-Ambiente en donde se desarrolla; 3-Aspecto general de la planta; 4-Distribución geográfica.

Gomphrena radiata

Hierba anual (link de descripción morfológica completa: <http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/13396/39323>https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf) (para una ilustración morfológica ver Figuras 6-1 y 6-2), endémica del noroeste argentino. Habita principalmente en las regiones biogeográficas de la Puna y Prepuna, a más de 2.500 metros sobre el nivel del mar. Generalmente se la encuentra en lugares muy arenosos y con escasa pendiente, como bordes de aguadas o cercanía de bancos arenosos próximos a ríos. Se caracteriza por, entre

otras cosas, florecer durante el verano. En Argentina se la localiza en las Provincias de Catamarca, Jujuy, Salta y Tucumán (Figura 6-3).



Figura 6. 1-Aspecto general de la planta; 2-Detalle de la inflorescencia; 3-Distribución geográfica.

Gomphrena umbellata

Hierba anual (link de descripción morfológica completa: <http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/13412/48813> https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf) (para una ilustración morfológica ver Figura 7-1), nativa del noroeste argentino. Habita principalmente en las regiones biogeográficas de Puna y Altoandina. Se localiza

generalmente en lugares arenosos entre los 3.000 y 4.000 metros sobre el nivel del mar (Figura 7-2). Se caracteriza por tener un ciclo estival. En Argentina se encuentra en las Provincias de Catamarca, Jujuy, Salta y Tucumán (Figura 7-3). Si bien es una especie nativa de Argentina, su presencia se ha citado en países como Bolivia, Perú y Chile.



Figura 7. 1-Detalle de la inflorescencia; 2-Ambiente en donde se desarrolla; 3-Distribución geográfica.

Homolepis glutinosa

Hierba perenne y robusta (link de descripción morfológica completa: <http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/13412/48813>)https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf (para una

ilustración morfológica ver Figuras 8-1 y 8-2). Habita principalmente en la región biogeográfica Paranaense, a una altura que va desde los 0 a 2.000 metros sobre el nivel del mar. La especie frecuentemente forma densas poblaciones en márgenes de bosques y selvas. Se caracteriza por florecer y fructificar entre los meses de enero y julio. Se distribuye desde Mesoamérica y el Caribe hasta el sur de Brasil, Paraguay y Argentina; es nativa de las Provincias de Corrientes y Misiones (Figura 8-3).



Figura 8. 1-Aspecto general de la planta; 2-Detalle de la inflorescencia; 3-Distribución geográfica.

Mesosetum comatum

Hierba perenne (link de descripción morfológica completa: http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/12410https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf) (para una ilustración morfológica ver Figura 9-1) de distribución restringida. Habita

principalmente en la región biogeográfica Paranaense, a una altura que va desde los 0 a 300 metros sobre el nivel del mar. Se caracteriza por crecer en suelos flojos y arenosos (Figura 9-2); florece entre los meses de febrero y marzo. Es una especie endémica del noreste argentino, se halla restringida en los campos del sur de la provincia de Misiones. Los ejemplares encontrados de *Mesosetum comatum* provienen de áreas pequeñas de extensión limitada; se destacan únicamente dos áreas muy aislada una de otra en donde se registra la presencia (Figura 9-3). Por lo tanto, de acuerdo al grado de conservación, es una especie que actualmente se encuentra en peligro de extinción.



Figura 9. 1-Detalle de la inflorescencia; 2-Ambiente en donde se desarrolla; 3-Distribución geográfica.

Opismenopsis najada

Hierba perenne, acuática y flotante (link de descripción morfológica completa:

<http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/22869>[https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-](https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf)

[content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf](https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf)) (para una ilustración morfológica ver Figuras 10-1 y 10-2), muy común de encontrarla a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay (Figura 10-3). Su crecimiento se da entre los 0 y 500 metros sobre el nivel del mar. Se caracteriza por florecer y fructificar entre los meses de noviembre y abril. Es endémica de Argentina, Brasil y Uruguay. En Argentina se la localiza en las Provincias de Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos y Santa Fe (Figura 10-4).



Figura 10. 1-Aspecto general de la planta; 2-Detalle de la inflorescencia; 3- Ambiente en donde se desarrolla; 4-Distribución geográfica.

Apochloa lorea

Hierba perenne (link de descripción morfológica completa: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60447876-2/general-information>https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf) (para una

ilustración morfológica ver Figura 11-1), endémica del sudeste de Brasil (Figura 11-2). Crece principalmente en bioma tropical estacionalmente seco.



Figura 11. 1-Aspecto general de la planta; 2-Distribución geográfica.

Técnicas de laboratorio empleadas

Elección de material para la extracción de ADN en laboratorio

El material al cual se le realiza la extracción de ADN en laboratorio puede provenir de plantas vivas, de muestras desecadas en campo con sílica gel o de muestras obtenidas de plantas herborizadas y almacenadas en los herbarios científicos. Teniendo en cuenta las posibilidades y con el fin de lograr una alta eficiencia en el proceso de extracción, en el presente trabajo se utilizó siempre que se pudo muestras en sílica y, en aquellos casos en donde no se contaba con dicho material, muestras de plantas herborizadas y almacenadas en los herbarios. Cabe destacar que el material de herbario se caracteriza por ser de menor calidad,

por el hecho de que es tratado con productos químicos con el fin de preservar su estado. Es importante tener en cuenta que tanto el ADN de las muestras en sílica como el ADN de las muestras herborizadas a medida que pasa el tiempo puede irse degradando y, de esta manera, haciendo que el proceso de extracción se vuelva más ineficiente.

El órgano de la planta al cual se le retiró el ADN fue la hoja, debido a que presenta gran cantidad de células. Las flores, los frutos y las semillas presentan menor cantidad de células en igual cantidad de tejido, y consecuentemente, menor cantidad de ADN. No todas las plantas presentaron la misma facilidad para realizarle la extracción del material genético; algunas de ellas, al tener hojas muy fibrosas, dificultaron en gran medida la molienda. Las gramíneas, a diferencia de otras especies vegetales, se caracterizan por presentar hojas muy fibrosas y por lo tanto complicar la extracción de ADN (Figura 12). Para cada una de las extracciones realizadas en el trabajo se utilizó 35 mg aproximadamente de material vegetal seco. Debido a la poca cantidad de material utilizado, resultó de gran importancia la correcta selección del mismo. Se seleccionaron hojas con coloración verde claro, no manchadas o comidas por insectos y tampoco con bordes arrugados.

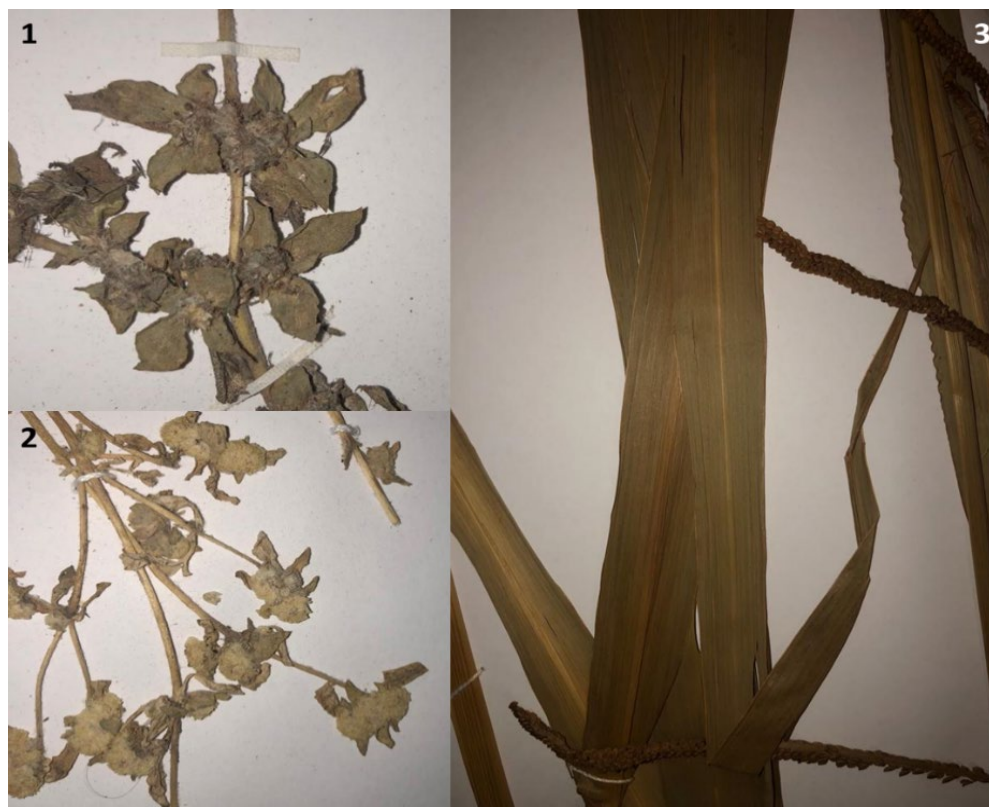


Figura 12. 1-Hojas correspondientes a *Gomphrena tomentosa*; 2-Hojas correspondientes a *Gomphrena radiata*; 3-Hojas correspondientes a gramínea típica.

Extracción del ADN

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se caracteriza por ser esencial para obtener resultados óptimos en las pruebas de biología molecular. Al realizar la extracción del ADN se destacan diferentes etapas. En primer lugar, la ruptura de las paredes y membranas celulares. Luego, la lisis de las células y diferentes orgánulos que contienen al ácido nucleico. Las etapas posteriores hacen referencia a la desnaturalización de los complejos nucleoproteicos, la inactivación de las nucleasas endógenas y la eliminación de las proteínas y de ciertas categorías de ácidos nucleicos no deseados como el ARN. Finalmente, se lleva a cabo la purificación del ADN de interés.

Para realizar la extracción de ADN no existe un procedimiento universal de preparación de las muestras, sino una serie de principios y métodos que se aplican de acuerdo a las particularidades de las mismas y su volumen. En la actualidad, la extracción de ADN genómico en plantas se puede realizar de diferentes maneras. Se destacan tres métodos principales, uno de ellos basado en el uso de

CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio) (Shagai-Maroo et al., 1984; Doyle y Doyle, 1987), otro en el uso del SDS (dodecil sulfato de sodio) (Dellaporta et al., 1983) y, finalmente, otro basado en el uso de proteinasa K (Kaya y Neale, 1993). En el presente trabajo se utilizó el protocolo de bromuro de cetil-trimetilamonio (Doyle y Doyle, 1987) (ver Protocolo de extracción de ADN en Apéndice A1).

En primera instancia se llevó a cabo la molienda de la muestra, facilitada por la utilización de nitrógeno líquido (-196°C). Luego se agregó rápidamente Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (ver Preparación de CTAB en Apéndice A2) y beta-mercaptoetanol (BME), con el fin de realizar la lisis celular y la neutralización de ADNasas y enzimas que tienen potencialidad de degradar ADN. Transcurrido un tiempo aproximado de 1 hora 30 minutos en el cual la solución se mantuvo a una temperatura de 65°C se agregó Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico 24-1), con el objetivo de desnaturalizar proteínas, mejorar la disociación del ADN y evitar la formación de espuma. El resultado del agregado de este compuesto son tres fases, y es la fase superior (sobrenadante) la cual fue separada, precipitada y purificada. Para esto, se aplicó cloruro de sodio (NaCl) e isopropanol y se dejó reposar por al menos 12 horas en el freezer. Retiradas las muestras se llevaron a cabo lavados a través de alcohol 70° (etanol). Finalmente, se resuspendió el pellet resultante a través de buffer TE y se almacenó a la espera de ser utilizado.

Espectrofotometría: determinación de la calidad del ADN obtenida en el proceso de extracción

Contar con ADN de calidad es el punto de partida para llevar a cabo cualquier tipo de técnica molecular (ver Importancia y fundamentos de la determinación de calidad del ADN en Apéndice A3). Por este motivo, en este trabajo se procedió a realizar la medición de calidad en el ADN extraído a través de la técnica de espectrofotometría (ver Protocolo para cuantificar concentración y pureza del ADN en Apéndice A4).

La calidad de ADN extraído depende en gran medida de la planta, sus características, adaptaciones y demás cuestiones como forma en la cual se coleccionó y ambiente en el que se desempeñó. Las gramíneas, por ejemplo, son especies fibrosas, y su proceso de extracción no es sencillo, principalmente la

parte de molienda que se dificulta en gran medida. Por consecuencia, la recuperación de ADN en estas plantas suele ser en menor cantidad y de menor calidad. En la Tabla 2 se ratifica la dificultad que presentaron ciertas especies vegetales, principalmente gramíneas, para lograr obtener un ADN de calidad. Tanto *Homolepis glutinosa* como *Gomphrena radiata* corresponden a una familia botánica diferente, gramíneas y amarantáceas, respectivamente. A pesar de que el ADN de ambas especies fue extraído a partir del mismo procedimiento (protocolo de bromuro de cetil-trimetilamonio), la calidad de ADN de uno y otro es muy diferente; mala en el caso de la gramínea, y buena en el caso de la amarantácea. Los datos resultantes señalados en la Tabla 2 fueron medidos y calculados a partir de un biofotómetro. A través de la Figura 13 se puede visualizar la ilustración del resultado originado por la especie *Homolepis glutinosa*.

Especie	<i>Homolepis glutinosa</i>	<i>Gomphrena radiata</i>
Absorbancia 260nm/280nm	1.6	1.83

Tabla 2. Relación de absorbancia 260 nm/280 nm para *Homolepis glutinosa* (Poaceae) y *Gomphrena radiata* (Amaranthaceae). Se compara la calidad de ADN entre una gramínea y una Amarantácea.

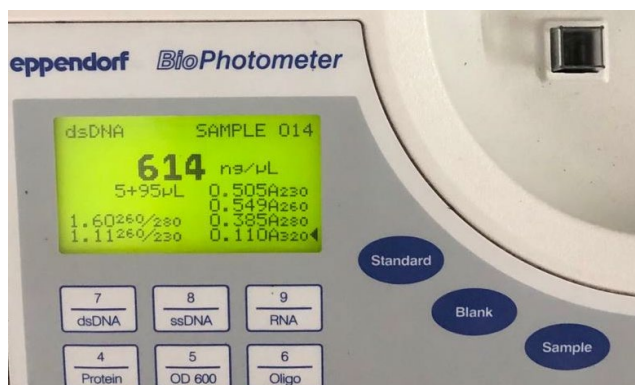


Figura 13. Composición expresada en ng/μL y relación de absorbancia 260 nm/280 nm para *Homolepis glutinosa* (Poaceae).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR permite la producción in vitro de múltiples copias de una región seleccionada de ADN. Esta técnica se puede resumir básicamente en 3 pasos (ver Consideraciones sobre los principios y fundamentos para la amplificación del ADN

en Apéndice A5) y para su desarrollo se debe contar con un equipo especializado denominado termociclador. El primer paso consiste en el calentamiento de la muestra, con el objetivo de desenrollar la doble cadena de ADN y activar la ADN polimerasa. El segundo paso tiene la particularidad de ser repetitivo (la cantidad de repeticiones va a variar de acuerdo al objetivo) y se da la desnaturalización, hibridación y amplificación de la cadena. Finalmente, el tercer paso consiste en la finalización, básicamente se asegura que las millones de copias amplificadas de ADN estén completamente amplificadas. Una vez transcurridos los 3 pasos, las muestras en el termociclador son enfriadas a 4°C por un tiempo indefinido, a la espera de ser retiradas por el investigador y colocadas en un ambiente de almacenamiento correcto. Las reacciones de PCR en este trabajo (ver Protocolo de amplificación de ADN en Apéndice A6) fueron realizadas en volúmenes finales de 25 a 30 µl (Tabla 3), conteniendo 2 µl de suspensión del ADN extraído o en dilución (20-50 ng/µl), 5 o 2,5 µl de la solución “10X Taq Reaction buffer” (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl), 1 a 2 µl de MgCl₂ (62,5 mM), 0,25 µl de cada dNTP (2.5 mM) (desoxinucleótidos trifosfato) (ver Preparación de dNTP’s de uso en PCR en Apéndice A7), 1 µl de cada primer (10 µM) (ver Preparación de primers de uso en PCR en Apéndice A8), 1,25 unidades de la enzima Taq Polimerasa recombinante y el resto del volumen de agua ultra pura.

Factor: 1	Reactivos	Volumen (µL)	Factor: 1	Reactivos	Volumen (µL)
Mix de 23 µL	Agua	16.2	Mix de 28 µL	Agua	18.7
	Buffer	2.5		Buffer	5
	Mg	2		Mg	1
	dntPs	1		dntPs	1
	Primer F	0.5		Primer F	1
	Primer R	0.5		Primer R	1
	Taq	0.3		Taq	0.3
Factor: 6,1	Reactivos	Volumen (µL)	Factor: 6,1	Reactivos	Volumen (µL)
Mix de 23 µL	Agua	98.82	Mix de 28 µL	Agua	114.07
	Buffer	15.25		Buffer	30.5
	Mg	12.2		Mg	6.1
	dntPs	6.1		dntPs	6.1
	Primer F	3.05		Primer F	6.1
	Primer R	3.05		Primer R	6.1
	Taq	1.83		Taq	1.83
Factor: 11,1	Reactivos	Volumen (µL)	Factor: 11,1	Reactivos	Volumen (µL)
Mix de 23 µL	Agua	179.82	Mix de 28 µL	Agua	207.57
	Buffer	27.75		Buffer	55.5
	Mg	22.2		Mg	11.1
	dntPs	11.1		dntPs	11.1
	Primer F	5.55		Primer F	11.1
	Primer R	5.55		Primer R	11.1
	Taq	3.33		Taq	3.33
Factor: 16,1	Reactivos	Volumen (µL)	Factor: 16,1	Reactivos	Volumen (µL)

Mix de 23 μ L	Agua	260.82	Mix de 28 μ L	Agua	301.07
	Buffer	40.25		Buffer	80.5
	Mg	32.2		Mg	16.1
	dntPs	16.1		dntPs	16.1
	Primer F	8.05		Primer F	16.1
	Primer R	8.05		Primer R	16.1
	Taq	4.83		Taq	4.83

Tabla 3. Indicativos para realizar formulaciones de mix de 23 μ L y 28 μ L de acuerdo a distintas cantidades de muestras (1, 6, 11 o 16).

Los genes de núcleo de las especies pertenecientes a la familia Poaceae que se involucraron en el trabajo no resultaron fáciles de amplificar, por lo que para todos los casos se realizó una segunda PCR seguida de la primera. Esto es lo que se conoce como round 2, dado que el round 1 corresponde a la primera PCR llevada a cabo. El round 2 tuvo como objetivo en cada uno de los casos lograr una mayor cantidad de ADN amplificado, lo cual no siempre se alcanzó de manera efectiva. En la Figura 14 se puede observar la diferenciación significativa de amplificación que hubo en alguno de los casos entre un round 1 y un round 2 en una de las tantas amplificaciones para genes de núcleo llevadas a cabo en el trabajo.

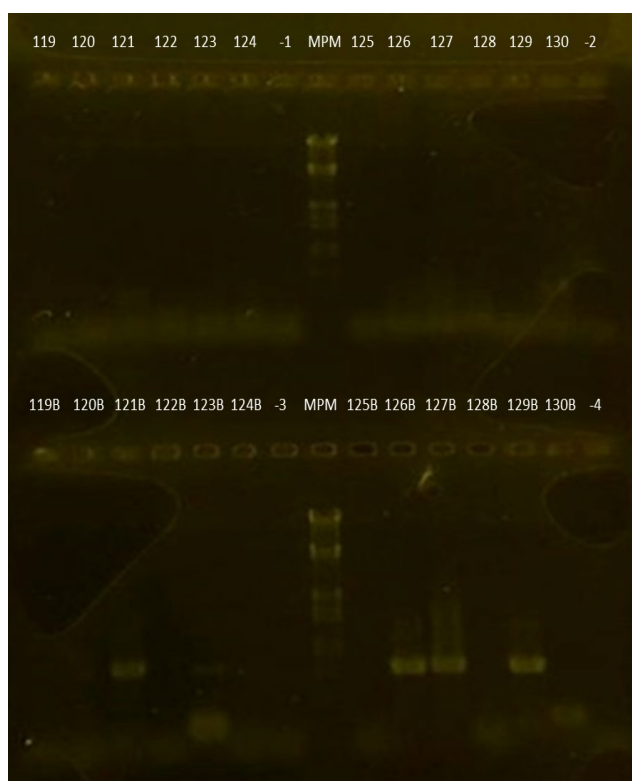


Figura 14. Gel de agarosa post corrida electroforética y tinción que indica diferenciación entre round 1 y round 2. Cada reacción presenta un número y el número repetido con letra “B” corresponde al round 2 de la misma reacción. Las reacciones situadas sobre el peine superior (119-130) corresponden al round 1, mientras que las del peine inferior (119B-130B) al round 2.

Elección y características de primers utilizados

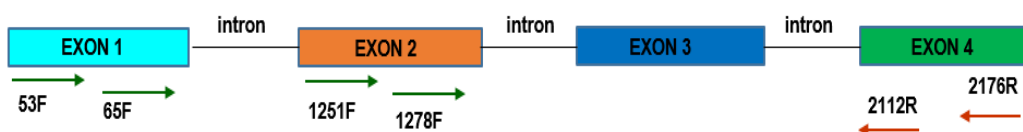
La lista de primers utilizados para amplificar los distintos genes empleados en el TFG se presenta a continuación en la Tabla 4. Se optó por utilizar diferentes conjuntos de primers para algunos genes, con el propósito de mejorar los resultados en caso de que la amplificación no se lograra con un par de primers específico. Estos conjuntos adicionales se localizaron en regiones diferentes. Se emplearon primers tanto para genes nucleares como para genes cloroplastídicos, y en el caso particular de matR, se utilizaron primers específicos para el gen mitocondrial. Con el fin de ilustrar la longitud de los marcadores y sitios de uniones en cada uno de ellos se muestran la Figura 15 (para los genes de núcleo) y las Figuras 16-1 y 16-2 (para los genes cloroplastídicos y mitocondriales).

NOMBRE	NOMBRE	SECUENCIA
GDC-H1	E1-53F	No publicados
	E1-65F	No publicados
	E2-1251F	No publicados
	E2-1278F	No publicados
	2112R	No publicados
	2176R	No publicados
GDC-H2	E1-32F	No publicados
	E1-104F	No publicados
	550F	No publicados
	562F	No publicados
	1437R	No publicados
	1495R	No publicados
apo1	1F	No publicados
	26F	No publicados
	611R	No publicados
	642R	No publicados
	688R	No publicados
dwarf8	F	No publicados
	242F	No publicados
	263F	No publicados
	R	No publicados
	947R	No publicados
	1025R	No publicados
ITS	5F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
	17F	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCTG
	4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	26R	TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC
atpB	S2F	TATGAGAATCAATCCTACTACTTCT
	S1494R	TCAGTACACAAAGATTTAAGGTCAT
atpB-rbcL	F	GAAGTAGTAGGATTGATTCTC

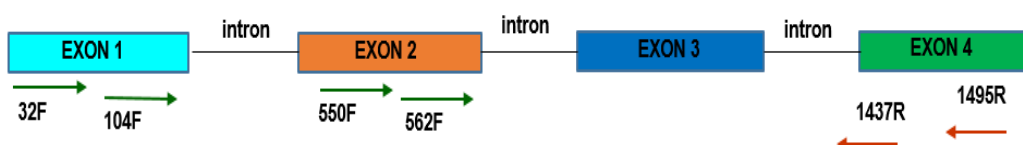
	R	CAACACTTGCTTTAGTCTCTG
matK	XF	TAATTTACGATCAATTCATTTC
	390F	CGATCTATTCATTCAATATTTTC
	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
matR	26F	GACCGCTNACAGTAGTTCT
	1278R	GTTGAACCCCGTCCAGTAGA
	1858R	TGCTTGTGGGCTYRGGGTGAA
	1858R	TGCTTGTGGGCTYRGGGTGAA
ndhF	5F	ATGGAACAKACATATSAATAT
	972R	CATCATATAACCCAATTGAGAC
	aF	ATGTCACCACAAACAGAAAC
rbcL	636F	GCGTTGGAGAGATCGTTTCT
	724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC
	1379R	-
	1460R	TCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG
	1460R	TCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG
trnF-ndhJ	IGS-F	ATCCTCGTGTCAACAGTTCAAA
	IGS-Eb	TGGATAGGCTGGCCCTTAC
trnH-psbA	trnH	ACTGCCTTGATCCACTTGCC
	psbA	CGAAGCTCCATCTACAATGG
trnL-F	C	CGAAATCGGTAGACGCTACG
	E	GTTCAAGTCCCTCTATCCCC
	D	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
	F	ATTGAACTGGTGACACGAG

Tabla 4. Se muestran las secuencias de primers utilizados en el Trabajo Final de Graduación. Los marcadores GDC-H1, GDC-H2, dwarf8 y apol corresponden a secuencias de datos no publicados hasta el momento.

GDC-H1



GDC-H2



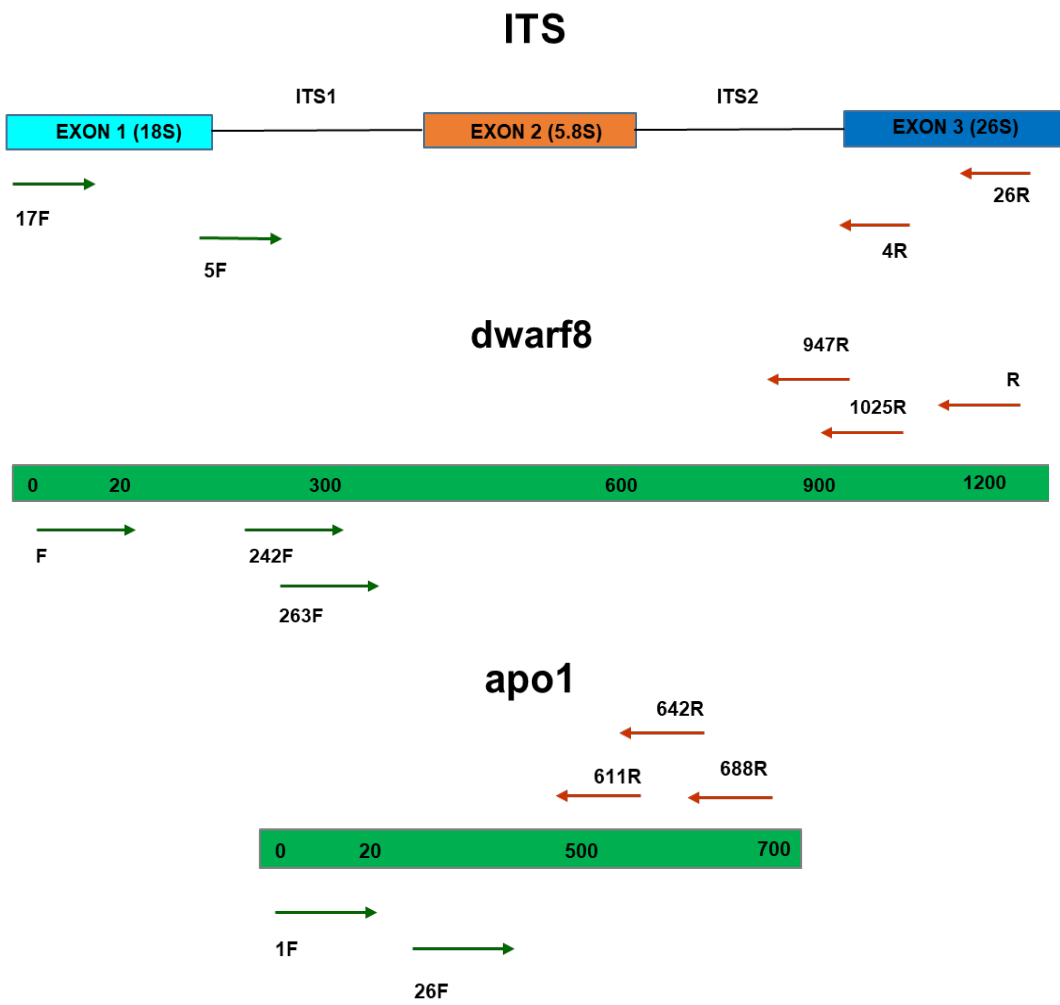
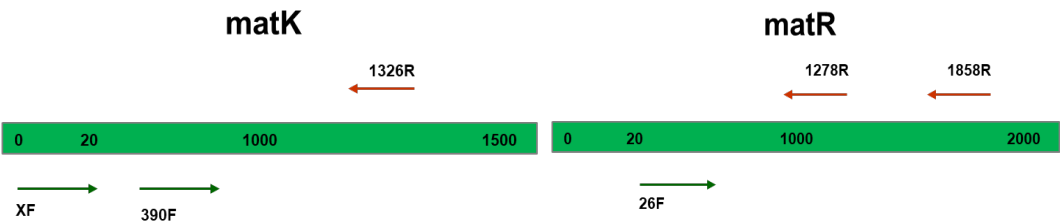


Figura 15. Se muestran marcadores moleculares para genes de núcleo: GDC-H1; GDC-H2; ITS; dwarf8; apo1.



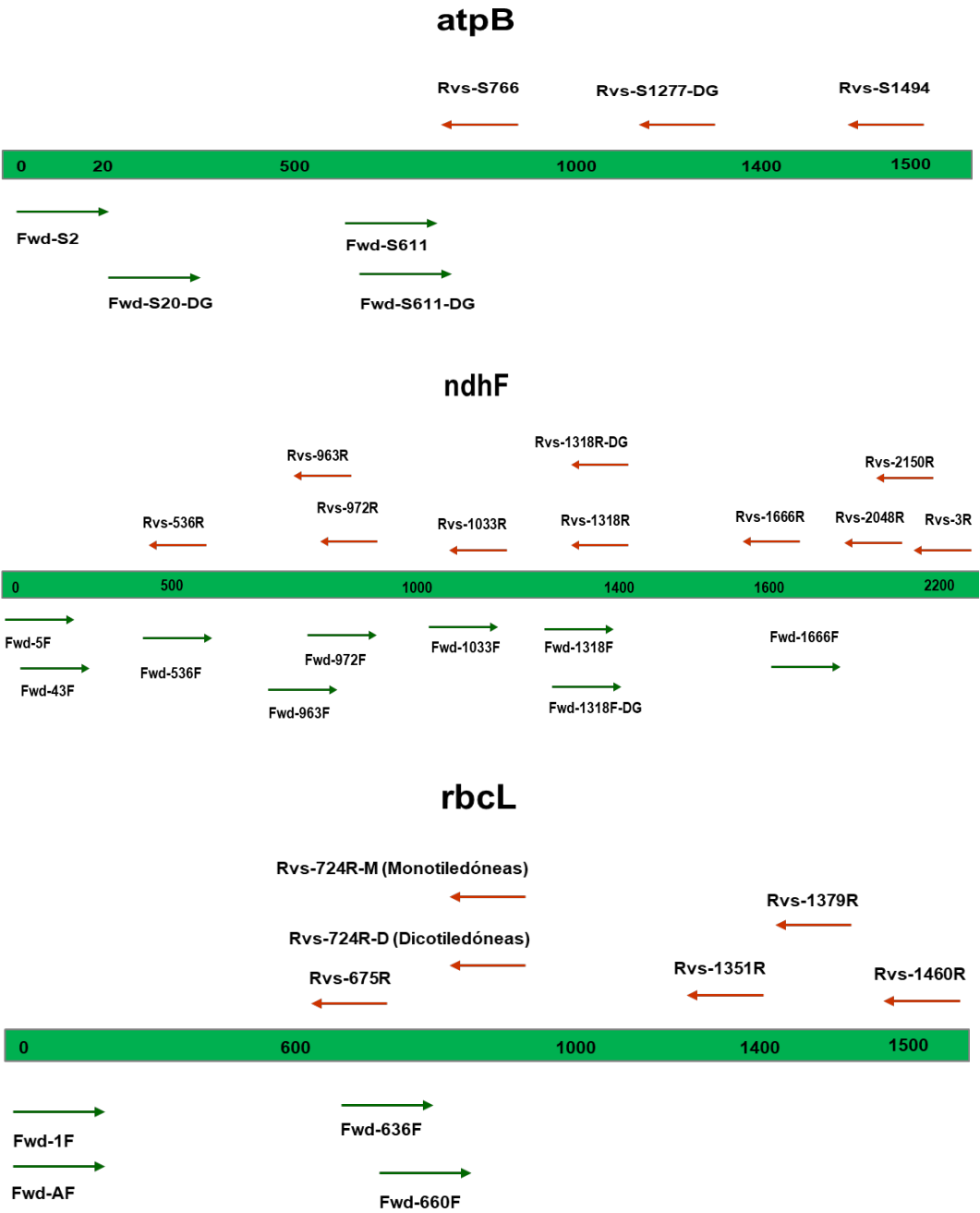
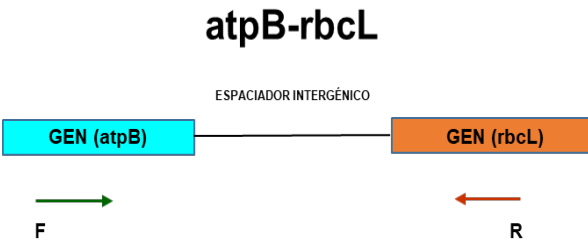


Figura 16-1. Se muestran los marcadores moleculares para genes de cloroplasto (matK; atpB; ndhF; rbcL) y mitocondria (matR).



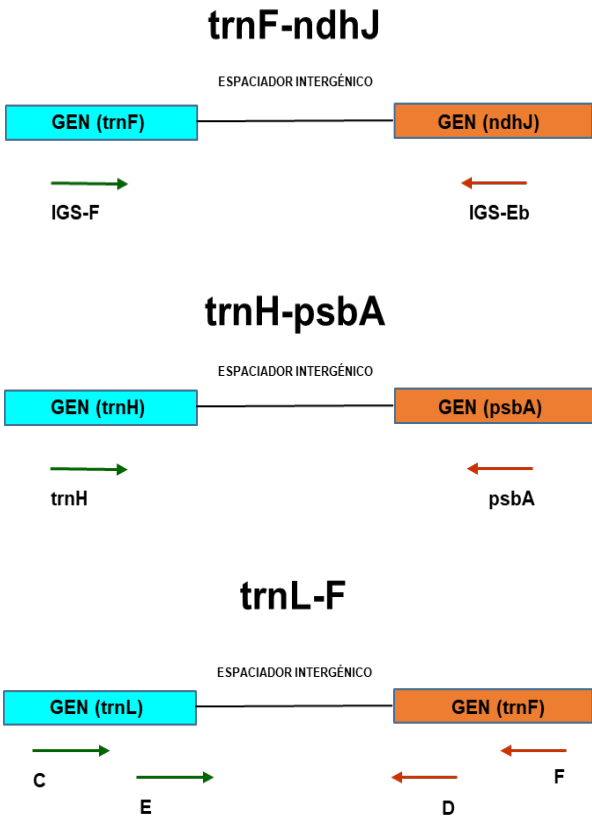


Figura 16-2. Se muestran los marcadores moleculares para genes de cloroplasto (atpB-rbcL; trnF-ndhJ; trnH-psbA; trnL-F).

Determinación de parámetros a tener en cuenta para la amplificación por PCR

Los programas de amplificación por PCR sintetizados y utilizados en el TFG son detallados en la Tabla 5. Cada uno de ellos presenta un nombre y diferentes parámetros en base a necesidades y estrategias determinadas.

PROGRAMA 1				PROGRAMA 2			
Calentamiento	94°C	3 min		Calentamiento	94°C	3 min	
Desnaturalización	94°C	30 seg		Desnaturalización	94°C	30 seg	
Hibridación	48°C	1 min	40 C	Hibridación	48°C	45 seg	40 C
Extensión	72°C	1 min 30 seg		Extensión	72°C	1 min	
Finalización	72°C	7 min		Finalización	72°C	7 min	
Almacenamiento	8°C	Hold		Almacenamiento	8°C	Hold	
PROGRAMA 3				PROGRAMA 4			
Calentamiento	95°C	3 min		Calentamiento	95°C	3 min	

Desnaturalización	95°C	0 min 35 seg		Desnaturalización	95°C	30 seg	
Hibridación	52°C	45 seg	39 C	Hibridación	48°C	1 min	40 C
Extensión	72°C	1 min 30 seg		Extensión	72°C	1 min 45 seg	
Finalización	72°C	7 min		Finalización	72°C	10 min	
Almacenamiento	4°C	Hold		Almacenamiento	4°C	Hold	
PROGRAMA 5				PROGRAMA 6			
Calentamiento	95°C	3 min		Calentamiento	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	45 seg		Desnaturalización	95°C	45 seg	
Hibridación	53°C	1 min	34 C	Hibridación	53°C	1 min	39 C
Extensión	72°C	1 min		Extensión	72°C	1 min 30 seg	
Finalización	72°C	10 min		Finalización	72°C	10 min	
Almacenamiento	8°C	Hold		Almacenamiento	8°C	Hold	
PROGRAMA 7				PROGRAMA 8			
Calentamiento	95°C	3 min		Calentamiento	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	30 seg		Desnaturalización	95°C	30 seg	
Hibridación	54°C	1 min	39 C	Hibridación	56°C	1 min	39 C
Extensión	72°C	1 min 45 seg		Extensión	72°C	1 min 45 seg	
Finalización	72°C	10 min		Finalización	72°C	10 min	
Almacenamiento	10°C	Hold		Almacenamiento	10°C	Hold	
PROGRAMA 9				PROGRAMA 10			
Calentamiento	95°C	3 min 20 seg		Calentamiento	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	0 min 40 seg		Desnaturalización	95°C	45 seg	
Hibridación	60-53°C	1 min	8 C	Hibridación	55°C	45 seg	39 C
Extensión	72°C	1 min 30 seg		Extensión	72°C	1 min 30 seg	
Desnaturalización	95°C	0 min 40 seg		Finalización	72°C	10 min	
Hibridación	53°C	0 min 40 seg	35 C	Almacenamiento	7°C	Hold	
Extensión	72°C	1 min 30 seg		PROGRAMA 11			
Finalización	72°C	6 min		Calentamiento	95°C	4 min	
Almacenamiento	7°C	Hold		Desnaturalización	95°C	30 seg	
				Hibridación	54°C	1 min	37 C
				Extensión	72°C	1 min 30 seg	
				Finalización	72°C	10 min	
				Almacenamiento	4°C	Hold	

Tabla 5. Programas de PCR utilizados para diversos fines en el Trabajo Final de Graduación.

Las variaciones que se llevaron a cabo en cada uno de los programas se fundamentaron a la búsqueda de resultados óptimos para las diferentes muestras de ADN y los diferentes primers utilizados. De acuerdo a los análisis de los mismos se puede sintetizar:

- Menor temperatura de hibridación en los primers diseñados para los genes de cloroplasto y mitocondria (atpB-rbcL; atpB; matR; rbcL; trnF-ndhJ; trnH-psbA; matK; trnL-F). Para estos se podrían utilizar preferentemente los PROGRAMAS 1, 2 y 4.
- Mayor temperatura de hibridación en los primers diseñados para los genes de núcleo (GDCH1; GDH2; apo1; dwarf8) y para primers universales utilizados (ITS). Para genes de núcleo en gramíneas se recomienda

realizar round 1 y round 2. Para el round 1 se podrían utilizar preferentemente los PROGRAMAS 3, 5, 6, 7 y 9. Para el round 2, el cual debe tener mayor especificidad y por ende mayor temperatura de hibridación, se podrían utilizar preferentemente los PROGRAMAS 8 y 10. Para primers universales se recomienda también una temperatura de hibridación elevada, por lo que se podrían utilizar preferentemente los PROGRAMAS 3, 5 y 7.

- Cuanto menor es la temperatura de hibridación óptima para un primer, menor es la especificidad del mismo. La precaución a tener en cuenta sobre esto es que se puede dar una amplificación en un sitio no deseado, lo cual no es buscado por el investigador, dado que fracasaría el fragmento amplificado de ADN objetivo. Los PROGRAMAS 1, 2 y 4 se caracterizan por tener una temperatura de hibridación baja. Los PROGRAMAS 7, 9 y 11, los cuales se utilizan para realizar round 1 también presentan temperatura de hibridación baja comparados con aquellos utilizados para round 2 (PROGRAMAS 8 Y 10).
- Cuanto mayor es la temperatura de hibridación óptima para un primer, mayor es la especificidad del mismo. Esto se puede visualizar al realizar el round 2; para el correcto desempeño de la segunda amplificación es primordial maximizar la especificidad del pegado de los primers en la cadena de ADN a amplificar. La precaución a tener en cuenta sobre esto es que se puede no dar la amplificación, debido a que la alta temperatura podría dificultar la unión del primer con el ADN que se amplificará.
- Se utiliza mayor tiempo de extensión cuando se trabajan con fragmentos de ADN largos. Se calcula 1 minuto de extensión por cada 1000 pares de bases. Por ejemplo, se utilizaría el PROGRAMA 5 y no el PROGRAMA 6 si lo que se quiere amplificar es un fragmento de ADN que presenta 1000 pares de bases. En caso de que el objetivo sea amplificar un fragmento de ADN más largo, como por ejemplo 1.500 pares de bases, entonces lo recomendable sería inclinarse por el PROGRAMA 6.
- El PROGRAMA 9 consiste en un método de PCR denominado touchdown. Básicamente es una modificación de la PCR convencional; su utilización toma relevancia para ciertos procedimientos en donde se trabaja con primers que requieren un aumento en la especificidad para la correcta amplificación de la secuencia de ADN de interés. Si bien a mayor

temperatura de hibridación, mayor especificidad, a través de la PCR touchdown puedo lograr la máxima eficiencia. La PCR touchdown se caracteriza por dividirse en dos etapas, donde los ciclos de cada una tienen características diferentes. Durante la primera etapa es donde se busca la temperatura de hibridación óptima a partir de los cambios de temperatura de un ciclo a otro. La segunda etapa, por otro lado, tiene las generalidades de una PCR convencional. En la PCR touchdown, al disminuir secuencialmente la temperatura de hibridación durante cada ciclo de PCR, se puede reducir la posibilidad de una unión no específica. Es importante destacar que las uniones no específicas dan como resultado amplificaciones no deseadas y por ende productos sin interés. La PCR touchdown se basa en una serie de ciclos que van de mayor a menor temperatura de hibridación (en cada ciclo se disminuye 1°C), con el objetivo de maximizar la eficiencia de hibridación a la mayor temperatura posible. En el caso del PROGRAMA 9, la temperatura va bajando de 60°C a 53°C hasta que se encuentra la temperatura más óptima.

- La combinación de PCR touchdown con PCR inicio en caliente logra una de las técnicas de amplificación más avanzadas y eficientes. No todos los termocicladores son capaces de configurarse para esto. Se requiere la realización de dos pasos en simultaneo: enfriar las muestras antes de su colocación en el termociclador y el calentamiento del equipo antes de recibir a las muestras. Cuando se colocan las muestras frías en el equipo caliente se desencadena un golpe de calor que favorece en gran medida el accionamiento de la Taq y en la posibilidad de que la hibridación se desarrolle a mayor temperatura, lo cual significará mayor especificidad en los primers.
- Para el round 1 de secuencias que corresponden al marcador GDCH2 se optimizó y diagramó el PROGRAMA 11. La temperatura óptima de hibridación en los primers utilizados para amplificar el gen GDCH2 es mayor a la de aquellos utilizados en GDCH1. Por tal motivo, para GDCH2 se emplea un programa que involucra mayor temperatura de hibridación. Por el contrario, el PROGRAMA 5 se utilizaría para el round 1 de secuencias que corresponden al marcador GCDH1.
- A través de los diferentes programas señalados se puede visualizar la variación en la cantidad de ciclos que tienen cada uno. De manera simple,

se puede decir que la presencia de mayor o menor cantidad de ciclos significará mayor o menor cantidad de copias logradas, respectivamente. De igual modo, la cantidad de ciclos que se programan no es una cuestión relevante, siempre y cuando como mínimo se realicen 30 ciclos. La cantidad de ciclos efectivos, es decir ciclos que generan copias de ADN, están dados por la capacidad de supervivencia que tiene la Taq a los cambios de temperatura; si la Taq polimerasa no es de calidad y por ende no soporta muchas variaciones de temperatura, entonces programar muchos ciclos lo único que va a generar es la demora en la finalización del programa. Si la Taq es de calidad, entonces la colocación de mayor cantidad de ciclos puede significar una mayor cantidad de producto de ADN amplificado, lo cual puede resultar de interés para muestras con dificultad en la amplificación.

- La temperatura de calentamiento de la tapa del termociclador puede variar entre un programa a otro, pero debe ser al menos superior en 5°C a la temperatura de desnaturalización, para evitar la evaporación del producto de PCR durante la reacción.
- La temperatura de finalización de la reacción debe ser baja con el fin de terminar la reacción y favorecer la preservación correcta de lo amplificado. En general se utiliza una temperatura entre 10°C y 4°C.

Visualización de productos de PCR amplificados en geles de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR se llevó a cabo la técnica de electroforesis (ver Principios y fundamentos para visualizar productos de amplificación en Apéndice A9). En la mayoría de los casos se utilizaron geles de agarosa 1% p/v, teñidos con SYBR Safe y preparados en solución reguladora TBE 0.5X (10 µl SYBR/200 ml TBE 0.5X). Antes de la siembra, se les agregó a las muestras el buffer de siembra (ver Pasos a seguir para la visualización de ADN en Apéndice A10). Para la corrida electroforética se utilizó solución reguladora TBE 0,5X (ver Preparación de buffer TBE en Apéndice A11) y los geles se corrieron manteniendo un voltaje constante igual a 90 V durante aproximadamente 20-30 minutos.

A través de la Figura 17 se puede observar un gel de agarosa post corrida electroforética y tinción; en el mismo se visualiza la presencia de bandas de ADN, marcadores de peso molecular y controles negativos que no determinaron contaminación de ADN en el procedimiento. El gel de agarosa que se visualiza fue fotografiado a través de una cámara fotográfica mientras se lo ilumina a partir de un transiluminador UV.

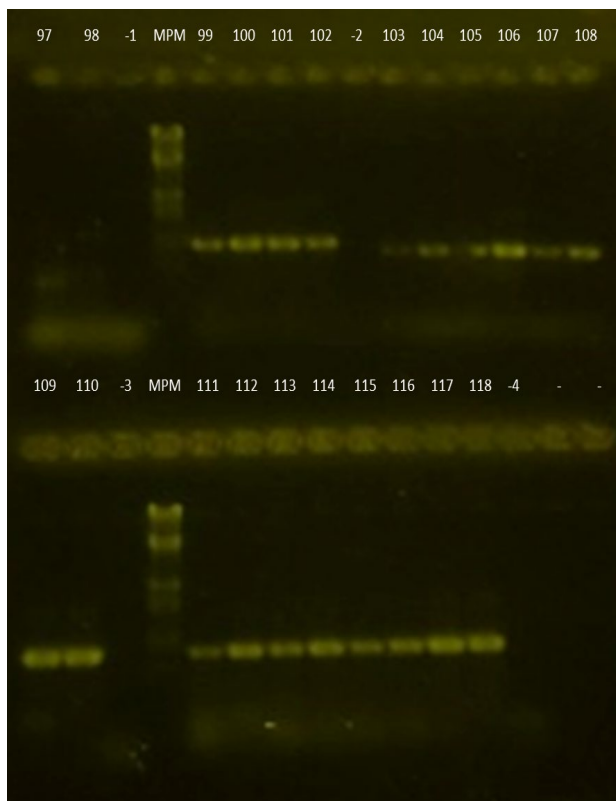


Figura 17. Gel de agarosa post corrida electroforética y tinción que indica bandas de ADN fuertes, medias y tenues; marcadores de peso molecular (MPM) y controles negativos (-1; -2; -3; -4).

Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

A través de la corrida electroforética explicada anteriormente se pueden visualizar fragmentos de ADN. Además de poder ser evaluados visualmente para elaborar conclusiones, también se emplea la corrida electroforética para extraer los fragmentos de ADN de interés, los cuales pueden ser utilizados en un procedimiento posterior denominado purificación del ADN. Esta técnica posee

suma importancia para la realización de pruebas moleculares subsiguientes, como la secuenciación y la clonación. Para llevar a cabo la purificación del ADN, las bandas de interés se aislaron y cortaron a partir de geles de agarosa para ser purificadas usando el kit comercial PBL (Embiotec-SRL) PURO Genomic DNA (ver Protocolo de purificación de ADN en Apéndice A12).

A continuación, en la Figura 18, se pueden visualizar dos fotografías de geles de agarosa (teñidos con SYBR) tomadas con un fotodocumentador de geles. En la Figura 18-1 se pueden ver bandas de ADN sin purificar, y en la Figura 18-2 se pueden ver las mismas bandas, pero ahora purificadas. La diferencia resulta significativa entre muestras sin purificar y purificadas, y es por eso la relevancia que conlleva llevar a cabo la purificación de ADN.

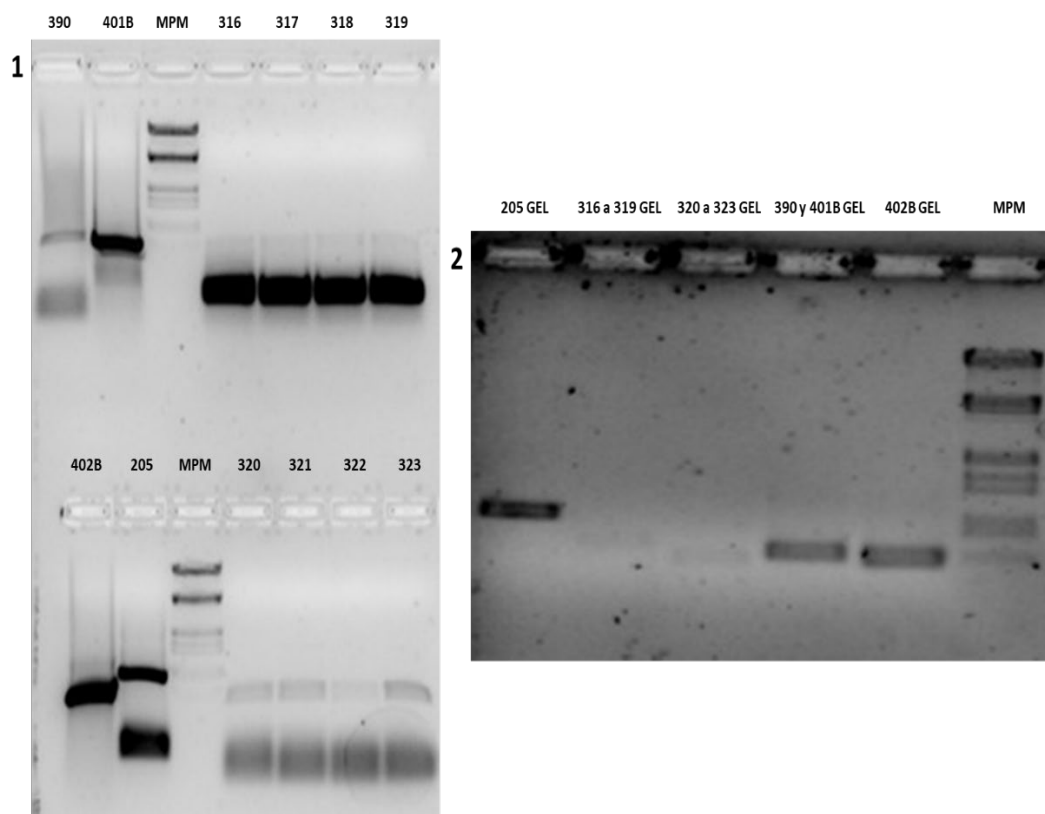


Figura 18. 1-Gel de agarosa con bandas sin purificar; 2- Gel de agarosa con las mismas bandas, pero ahora purificadas y juntadas en ciertos casos tal como se detalla.

Clonado de Genes

La clonación de cualquier secuencia de ADN incluye cuatro pasos bien marcados: fragmentación, ligación, transformación y selección. Para una explicación detallada ver Principios y fundamentos para el clonado de genes en Apéndice A13. En el presente trabajo se llevó a cabo la fragmentación a través de la técnica de PCR. Los fragmentos de interés, previa purificación a partir de geles de agarosa, fueron ligados a vectores de clonado (ver Protocolo de ligación en Apéndice A14). En nuestro caso, para todos los fragmentos se utilizó el vector pGEM-T Easy (Promega) (Figura 19). La relación inserto/vector usada fue de 5/1 con 25 ng de vector, 3 U de T4 ADN ligasa, buffer de ligación rápida 1X y agua ultra pura hasta un volumen final de 10 μ l. Las mezclas se incubaron a 10 °C durante toda la noche. Realizada la ligación, el paso siguiente fue la transformación de células competentes (ver Apéndice A15 para explicación referida a la Obtención de bacterias electrocompetentes y Apéndice A16 para explicación referida a la Obtención de bacterias termocompetentes). Para esto, a una alícuota de 50-60 μ l de células competentes se le agregaron 5 μ l de mezcla de ligación y se incubó durante 2 minutos. La transformación se realizó, por choque eléctrico durante 5 mili segundos (ms) colocándolas en un electroporador (ver Protocolo de clonación utilizando bacterias electrocompetentes en Apéndice A17), o choque térmico durante 1 minuto 45 segundos colocándolas en una placa seca a 42 °C y después nuevamente a hielo por 2 minutos (ver Protocolo de clonación utilizando bacterias termocompetentes en Apéndice A18). Posteriormente, se agregaron 750 μ l de medio líquido LB (ver Preparación de 1 litro de LB medio de cultivo o 1 litro de LB agar en Apéndice A19) y se incubaron las células a 37 °C durante 1 hora para su recuperación. Finalmente, para efectuar el último paso que involucra el clonado de genes, se procedió a sembrar las bacterias transformadas en placas que contenían medio LB-agar (ver Preparación de 1 litro de LB medio de cultivo o 1 litro de LB agar en Apéndice A19) con ampicilina (100 μ g -1ml) como antibiótico de selección, más los productos X-Gal e IPTG que permiten la diferenciación de colonias que incorporaron el vector con o sin el inserto del fragmento de interés. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se seleccionaron las colonias con inserto para hacer subcultivos y extraer ADN plasmídico (ver Selección de colonias con inserto en Apéndice A20).

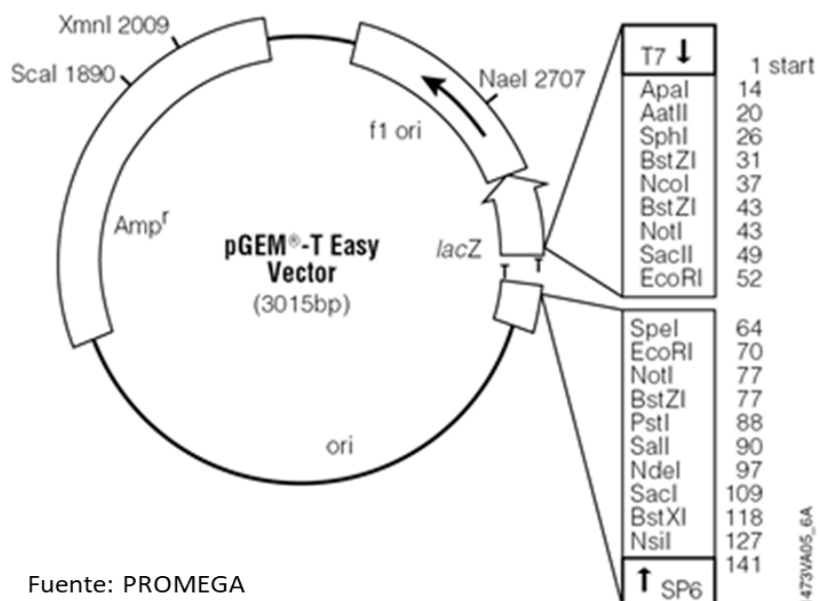


Figura 19. Vector pGEM-T Easy (3015pb) utilizado en el Trabajo Final de Graduación. Es un vector abierto; presenta salientes 3'-T en el sitio de inserción para proporcionar un saliente compatible para los productos de PCR.

Purificación del ADN plasmídico

Llevar a cabo la purificación del ADN plasmídico es un paso primordial, ya que permite separar el ADN plasmídico (lo que interesa) del ADN cromosómico. La técnica permite eliminar las bacterias y cualquier tipo de resto que dejen las mismas. Logra que el ADN plasmídico se encuentre libre de agentes foráneos que interfieran y obstaculicen el éxito de otra técnica molecular, como por ejemplo la secuenciación.

La purificación del ADN plasmídico se realizó a través de un kit comercial PBL (Embiotec-SRL) PURO PLASMIDO (ver Protocolo de purificación del ADN plasmídico en Apéndice A21), el cual está diseñado para la extracción y purificación plasmídica a partir de cultivos líquidos de *E. coli*. No requiere etapas de extracción orgánica ni precipitación de ADN. La purificación de los plásmidos se realizó mediante una columna que contiene una matriz basada en sílica, que permite separar los ácidos nucleicos de las proteínas y restos celulares. Este sistema permitió obtener moléculas plasmídicas ultra puras en menos de 15 minutos listas para ser utilizadas en la técnica de secuenciación.

Secuenciación de productos de PCR y plásmidos

El conocimiento de la secuencia de un ácido nucleico es fundamental para el entendimiento de los procesos biológicos básicos, normales y patológicos; el ordenamiento secuencial determina la especificidad genética. La secuenciación del ADN está basada en métodos bioquímicos, y su objetivo es conocer el orden de los nucleótidos en un fragmento de ADN. De esta manera, se brinda información importante sobre la estructura, función y relaciones evolutivas del mismo. Existen varios métodos para llevar a cabo la secuenciación del ADN, siendo los derivados del método dideoxi de Sanger los más usados globalmente (ver Principios y fundamentos para la secuenciación de genes en Apéndice A22).

En el trabajo desarrollado fue aplicada la secuenciación automática por terminador fluorescente (ver Principios y fundamentos para la secuenciación de genes en Apéndice A22). Esta técnica, además de resultar del método original de Sanger, se destaca por la utilización de un colorante fluorescente diferente en cada uno de los ddNTPs utilizados. Este tipo de secuenciación está muy difundida en la actualidad, debido a la simpleza, rapidez, automatización y posibilidad de análisis electrónico. El fragmento de ADN se digitaliza y es detectado por una computadora que identifica, analiza, descifra y elabora un gráfico, en el cual se representan cada uno de los nucleótidos (bases) constitutivos con picos de intensidad de luz acorde con el colorante fluorescente. El resultado gráfico de la electroforesis capilar llevada a cabo por la secuenciación es el cromatograma; este se compone por una serie de picos de diferentes colores, donde cada color corresponde a un nucleótido. El conjunto de picos ordenados corresponde a la secuencia de un fragmento de ADN. En la Figura 20 se puede visualizar una región de un cromatograma obtenido producto de la secuenciación.

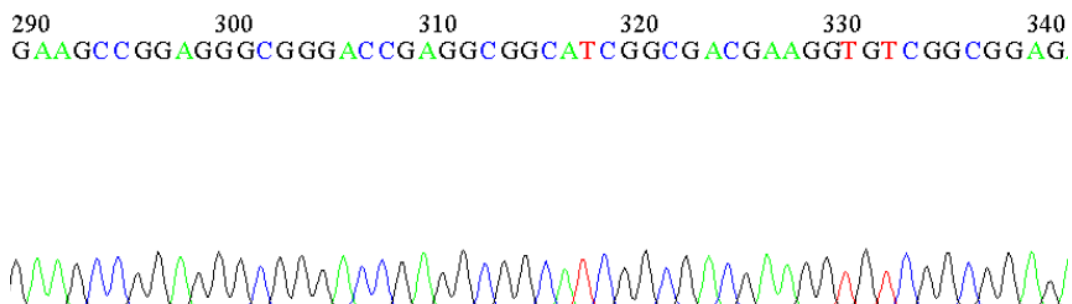


Figura 20. Fragmento de un gen secuenciado correspondiente a *Mesosetum comatum*.

La secuenciación automática conlleva un elevado costo de inversión inicial y mantenimiento muy alto. Los laboratorios pequeños o aquellos con poca demanda generalmente contratan laboratorios comerciales o institucionales para que les presten el servicio de secuenciar muestras. Para este trabajo, por cuestiones operativas se optó por contratar los servicios de MacroGen (<https://dna.macrogen.com/>), una empresa internacional localizada en Corea del Sur. De igual modo, en Argentina se pueden utilizar espacios como INTA Castelar y otros, que cuentan con secuenciador y brindan el servicio a terceros.

Análisis bioinformáticos

En el presente trabajo se utilizó a la bioinformática para recolectar, analizar e interpretar la información obtenida mediante la secuenciación. La bioinformática, también llamada biología molecular computacional, es una disciplina que involucra métodos matemáticos, estadísticos y computacionales, los cuales son fundamentales para el análisis de secuencias de ADN y aminoácidos. El corazón de la bioinformática son las bases de datos biológicos, los cuales incluyen secuencias de nucleótidos, genomas completos, secuencias de proteínas, dominios de proteínas y estructuras de proteínas. Son muchas las plataformas bioinformáticas existentes en la actualidad. En este TFG, para obtener secuencias de interés, se usó la base de datos pública GenBank. Por otro lado, para el armado de matrices y el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó un software denominado Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). Este se caracteriza por ser una herramienta integrada que sirve para alineamientos de secuencias, construcción de árboles filogenéticos, extracción de bases de datos basadas en la web, estimación de tasas de evolución molecular y pruebas de hipótesis evolutivas. Incluye métodos e instrumentos sofisticados para la filogenómica.

Los cromatogramas obtenidos a través de la secuenciación son cargados en MEGA y a través del software se revisan y editan en caso de ser necesario. Las secuencias de ADN que se implementan conforman una matriz que contiene todos los taxones a comparar. Cuanto mayor es la cantidad de información que cuenta la matriz, más alta será la significancia estadística del resultado. En la Figura 21 se puede visualizar como se disponen los alineamientos a través de la

utilización del software. Una vez cargadas en MEGA todas las secuencias de interés, se ejecutan a través del software análisis filogenéticos con el fin de obtener árboles filogenéticos. Estos se presentan como cladogramas y se caracterizan por establecer las relaciones entre las especies. Cuanto más cercanos se encuentren los terminales de cada especie, más relacionadas filogenéticamente estarán las mismas.

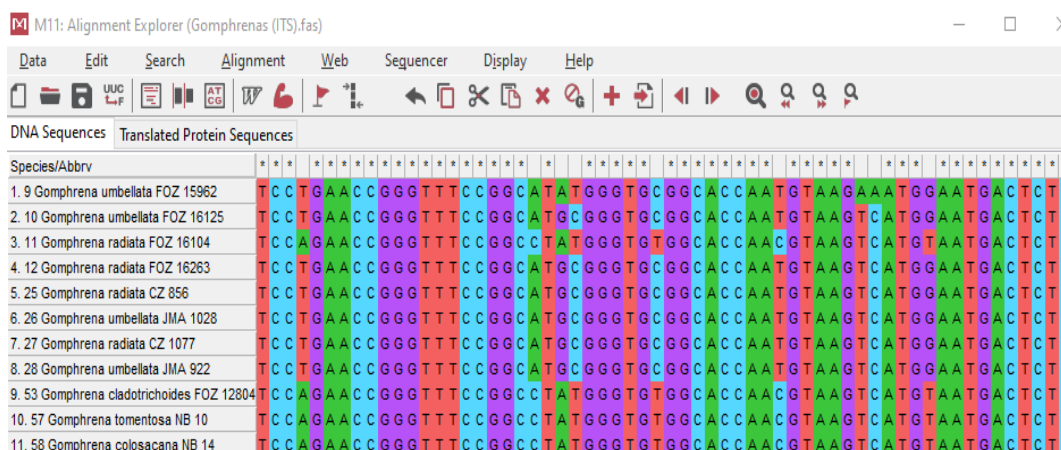


Figura 21. Fragmentos de secuencias alineadas con el fin de ilustrar el software utilizado en el trabajo final de graduación: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA).

Análisis de casos y ejemplos

Selección de vouchers y metodologías para la extracción de ADN y amplificación

1. Selección de vouchers y metodologías para la extracción de ADN y amplificación de acuerdo al caso 1: Registro de especies. Importancia del conocimiento de la biodiversidad en el Cono Sur.

A los fines de corroborar la correcta identificación de los materiales de herbario identificados bajo *Alstroemeria spathulata* [i.e. Acosta et al. 1669 (SI) y Kiesling 10611 (SI)], debido a su alta afinidad morfológica con *Alstroemeria umbellata*, y también con *Alstroemeria andina*, se extrajo ADN de muestras de hojas provenientes del ejemplar Acosta et al. 1669 (SI) conservado en sílica gel, y además, se extrajeron hojas provenientes del ejemplar herborizado Kiesling 10611 (SI).

El ADN genómico total se extrajo de hojas secas con el protocolo de bromuro de cetil-trimetilamonio (Doyle & Doyle, 1987). La amplificación por PCR de los marcadores ITS, matR, matK, ndhF, trnF-ndhJ y rbcL se realizó utilizando los primers utilizados en Tabla 4. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 25 µL (16,2 µL de agua, 2,5 µL de buffer, 2 µL de magnesio, 1 µL de dNTP's, 0,5 µL de primer forward, 0,5 µL de primer reverse, 0,3 µL de Taq polimerasa y 2 µL de ADN) con 50–100 ng de ADN molde, 0,2 µM de cada cebador, 25 µM de dNTP, 5 mM de MgCl₂ y buffer 1x y 0,3 unidades de polimerasa Taq de Invitrogen Life Technologies (Brasil). Los ciclos de la PCR se realizaron bajo los siguientes parámetros, que pudieron haber variado con el fin de obtener mayor eficiencia (ver Tabla 5): 1 ciclo de 94°C por 3 min, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 1 min (para todos los marcadores, excepto ITS que se utilizó 54°C), y 72°C por 1 min 30 s, y una extensión final ciclo de 72°C por 7 min. Los productos de PCR se procesaron en un gel de agarosa TBE al 1 % teñido con tinción de gel de ADN seguro SYBR (Invitrogen), se visualizaron en un transiluminador de luz azul y se fotografiaron a través de un fotodocumentador de geles. La secuenciación automatizada fue realizada por MacroGen, Inc. (Seúl, Corea).

2. Selección de vouchers y metodologías para la extracción de ADN y amplificación de acuerdo al caso 2: Delimitación de especies. Diferenciación de linajes evolutivos entre el complejo de especies *Gomphrena umbellata* y *Gomphrena radiata*.

Con los objetivos de identificar, validar y delimitar genéticamente los taxones correspondientes a *Gomphrena radiata* y *Gomphrena umbellata* se utilizaron materiales en sílica identificados bajo *G. radiata* [Zuloaga, F. O. 16104 (SI), Zuloaga, F. O. 16263 (SI), Zanotti, C. A. 856 (SI) y Zanotti, C. A. 1028] y *G. umbellata* [Zuloaga, F. O. 15962 (SI), Zuloaga, F. O. 16125 (SI), Acosta, J. M. 1077 (SI) y Acosta, J. M. 922 (SI)]. A cada uno de estos se le extrajo ADN de muestras de hojas.

El ADN genómico total se extrajo de hojas secas con el protocolo de bromuro de cetil-trimetilamonio (Doyle & Doyle, 1987). La amplificación por PCR de los marcadores ITS, matR, matK, trnL-F, atpB-rbcL, trnH-psbA, atpB y rbcL se realizó utilizando los primers citados en Tabla 4. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 25 µL (16,2 µL de agua, 2,5 µL de buffer, 2 µL de magnesio, 1 µL de dNTP's, 0,5 µL de primer forward, 0,5 µL de primer reverse, 0,3 µL de Taq polimerasa y 2 µL de ADN) con 50–100 ng de ADN molde, 0,2 µM de cada cebador, 25 µM de dNTP, 5 mM de MgCl₂ y buffer 1x y 0,3 unidades de polimerasa Taq de Invitrogen Life Technologies (Brasil). Los ciclos de la PCR se realizaron bajo los siguientes parámetros, que pudieron haber variado con el fin de obtener mayor eficiencia (ver Tabla 5): 1 ciclo de 94°C por 3 min, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 1 min (para todos los marcadores, excepto ITS que se utilizó 54°C), y 72°C por 1 min 30 s, y una extensión final ciclo de 72°C por 7 min. Los productos de PCR se procesaron en un gel de agarosa TBE al 1 % teñido con tinción de gel de ADN seguro SYBR (Invitrogen), se visualizaron en un transiluminador de luz azul y se fotografiaron a través de un fotodocumentador de geles. La secuenciación automatizada fue realizada por Macrogen, Inc. (Seúl, Corea).

3. Selección de vouchers y metodologías para la extracción de ADN y amplificación de acuerdo al caso 3: Posibles utilidades biotecnológicas en especies delimitadas. Estudios sobre genes relacionados a la fotosíntesis C4 de potencial aplicación biotecnológica.

Para el estudio de la evolución molecular de complejos multienzimáticos dentro de la familia Poaceae, se utilizaron muestras provenientes de la tribu Paspaleae. Se involucraron diferentes géneros y especies con el fin de plasmar posibles factores moleculares que contribuyeron al origen de la vía fotosintética C4 a partir de un ancestro C3. Se extrajo ADN de muestras de hojas conservadas en sílica gel o simplemente herborizadas; donde se identifican los siguientes ejemplares: *Apochloa lutzii* [Viana 2539 (SI) (herbario)], *Apochloa subtiramulosa* [Brocahdo 96 (SI) (herbario)], *Apochloa lorea* [Longhi-Wagner 9635 (SI) (herbario)], *Apochloa molinioides* [Souza 25702 (SI) (herbario)], *Homolepis aturensis* (Kunth) Chase [Morrone, O. 5046 (SI) (sílica)], *Homolepis glutinosa* (Sw.) Zuloaga & Soderstr. [Zuloaga, F. O. 6799 (SI) (sílica)], *Homolepis isocalycia* (Meyer) Chase [Zuloaga, F. O. 9783 (SI) (sílica)], *Homolepis villaricensis* (Mez) Zuloaga & Soderstr. [Zuloaga, F. O. 8919 (SI) (sílica)], *Mesosetum chaseae* Lucas [Zuloaga, F. O. 6945 (SI) (sílica)], *Mesosetum comatum* Swallen [Zuloaga, F. O. 6815 (SI) (sílica)], *Oplismenopsis najada* (Hack. & Arechav.) Parodi [Morrone, O. 5187 (SI) (sílica)] y *Tatianyxa arnaces* (Trin.) Zuloaga & Soderstrom [Zuloaga, F. O. 6965 (SI) (sílica)].

El ADN genómico total se extrajo de hojas secas con el protocolo de bromuro de cetil-trimetilamonio (Doyle & Doyle, 1987). La amplificación por PCR de los marcadores GDC-H1, GDC-H2, apo1 y dwarf8 se realizó utilizando los primers citados en Tabla 4. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 30 μ L (18,7 μ L de agua, 5 μ L de buffer, 1 μ L de magnesio, 1 μ L de dNTP's, 1 μ L de primer forward, 1 μ L de primer reverse, 0,3 μ L de Taq polimerasa y 2 μ L de ADN) con 50–100 ng de ADN molde, 0,2 μ M de cada cebador, 25 μ M de dNTP, 5 mM de MgCl₂ y buffer 1x y 0,3 unidades de polimerasa Taq de Invitrogen Life Technologies (Brasil). Los genes de núcleo se caracterizan por ser exigentes a la hora de amplificar, por lo que se llevaron a cabo dos rounds de PCR. Los ciclos de la misma se realizaron bajo los siguientes parámetros: 1 ciclo de 95°C por 3 min, 39 ciclos de 95°C por 30 s, 54°C por 1 min (para primer round, excepto segundo round que se utilizó 56°C), y 72°C por 1 min 45 s, y una extensión

final ciclo de 72°C por 10 min. Los productos de PCR se procesaron en un gel de agarosa TBE al 1 % teñido con tinción de gel de ADN seguro SYBR (Invitrogen), se visualizaron en un transiluminador de luz azul y se fotografiaron a través de un fotodocumentador de geles. Los fragmentos amplificados provenientes de ADN nuclear fueron subclonados con kit pGEM T-Easy Vector System (Promega, Madison, USA). La reacción de ligación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de ligación se utilizaron para transformar bacterias *Escherichia coli* (cepas *DH5α* y *XL1-blue*). Las colonias que incorporaron el inserto se identificaron mediante la utilización de ampicilina, IPTG y X-Gal. Aquellas colonias blancas se repicaron en el medio LB + ampicilina (0,1 mg/ml). De los cultivos resultantes se purificó el ADN plasmídico de al menos 5 clones positivos mediante el kit de Embiotec/PB-L, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de la purificación fueron secuenciados en Macrogen (Seúl, Corea).

Armado de matriz, alineamiento y análisis filogenético para los 3 casos abarcados

1. Registro de especies. Importancia del conocimiento de la biodiversidad en el Cono Sur.
2. Delimitación de especies. Diferenciación de linajes evolutivos entre el complejo de especies *Gomphrena umbellata* y *Gomphrena radiata*.
3. Posibles utilidades biotecnológicas en especies delimitadas. Estudios sobre genes relacionados a la fotosíntesis C4 de potencial aplicación biotecnológica.

La matriz de secuencias para cada grupo de plantas fue alineada empleando el programa MAFFT v. 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/gotomafft.html>) bajo la siguiente configuración: `mafft --thread 8 --threadtb 5 --threadit 0 -reorder --allowshift --unalignlevel 0.8 --op 3.0 --ep 0.5 --maxiterate 0 --globalpair`.

A nivel de filogenias, para medir la confiabilidad de los datos, generalmente se llevan a cabo tres tipos de análisis: de inferencia Bayesiana (IB), de Parsimonia (P) y de máxima verosimilitud (MV). Cuando entre los mismos realizados se da una coincidencia, entonces es probable que los datos sean de confianza y fiabilidad. Si por el contrario los análisis difieren uno de otro, entonces es probable que la información involucrada no resulte fidedigna y segura.

Los análisis de Inferencia Bayesiana (IB) fueron realizados en MrBayes v.3.2.1 (Ronquist et al., 2012). El mejor modelo de sustitución de nucleótidos se seleccionó utilizando el criterio de información de Akaike en jModelTest 2.1.3 (Darriba et al., 2012). El mejor modelo de sustitución estimado para todos los marcadores fue el Modelo General Reversible de sustitución nucleotídica con distribución gamma y una proporción de sitios invariables (GTR+I+G). Los árboles fueron muestreados cada 1000 generaciones con el parámetro por defecto de cuatro cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) simultáneas (una fría y tres calientes) por 30 millones de generaciones para la matriz de datos de cloroplasto, 10 millones de generaciones para la matriz de datos de los marcadores individuales y para la matriz de datos combinados. La convergencia de las cadenas fue verificada examinando que la escala potencial de reducción de factor (PSRF), fuera cercana a 1. Además, el desvío estándar promedio de las frecuencias divididas (AvgStdDev) fue chequeado, verificando que el valor fuera menor a 0,01 (Lemey et al., 2009).

Los análisis de Parsimonia (P) fueron realizados en TNT v1.1 (Goloboff et al., 2008). Todos los caracteres fueron pesados por igual, tratados como desordenados y los gaps considerados como datos faltantes. Las búsquedas fueron llevadas a cabo utilizando “Nuevas Tecnologías” (New Technologies). Se utilizaron 500 iteraciones de “ratchet” y 500 ciclos de “tree drifting”, repitiendo esta búsqueda con los árboles en memoria. Esta estrategia fue repetida dos veces para corroborar que las búsquedas alcanzaran la menor longitud. Los valores de soporte fueron medidos en TNT mediante un análisis de Bootstrap (Felsenstein, 1985) utilizando un total de 1000 réplicas.

Se utilizó RAxML v.8.1.18 para conducir análisis de bootstrap no paramétricos y búsquedas del mejor árbol de máxima verosimilitud (MV) en una sola corrida (Stamatakis, 2014). Se ejecutaron 1000 inferencias rápidas de bootstrap y luego una búsqueda exhaustiva de MV bajo el modelo GTR+I+G.

Se realizó una matriz concatenada incluyendo todas las secuencias de núcleo y cloroplasto para obtener un árbol combinado. Los valores de soporte fueron interpretados de la siguiente manera: alto $PP \geq .95$, $BS \geq .90\%$; moderado $PP .85-.95$ y $BS 75-90\%$. Valores más bajos fueron considerados no soportados y fueron considerados conflictos potenciales.

Resultados del análisis para cada caso abarcado

1. Resultados de acuerdo al caso 1 de estudio. Registro de especies. Importancia del conocimiento de la biodiversidad en el Cono Sur.

Los resultados del análisis combinado de ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplasto se muestran en la Figura 22. El largo de las secuencias alineadas combinadas fue de 6297 pb (ITS 730 pb, matR 514 pb, matK 1269 pb, ndhF 1584 pb, rbcL 1444 pb y trnF-ndhJ 756 pb). La matriz contuvo un total de 47 terminales; los taxones, marcadores y números de acceso a las secuencias en GenBank se encuentran disponibles en el Apéndice. Las topologías de los árboles de P, IB y MV fueron consistentes en gran medida, mostrando incongruencia solo en la resolución de ramas no soportadas, por lo que aquí solo se muestra la topología de MV con los valores de soporte de IB y P incluidos.

Las topologías obtenidas en los análisis fueron congruentes entre sí para los clados con alto soporte respecto a lo obtenido en la filogenia más completa del género publicada en Chacón et. al (2012a y 2012b). Los análisis recuperaron al género *Alstroemeria* como un clado monofilético fuertemente soportado. Los especímenes determinados morfológicamente como *A. spathulata* se encontraron resueltos en un mismo clado. Además, *A. spathulata* fue recuperada en un clado diferente respecto a las especies morfológicamente afines con secuencias disponibles en GenBank como *A. andina* y *A. umbellata*. Estos resultados apoyan la identificación morfológica de las colecciones identificadas como *A. spathulata*. Además, al ser incluidas las secuencias de *A. spathulata* en el análisis filogenético, las mismas posibilitan a futuro incluir a este taxón en diversos estudios evolutivos basados en los ejemplares depositados en SI.

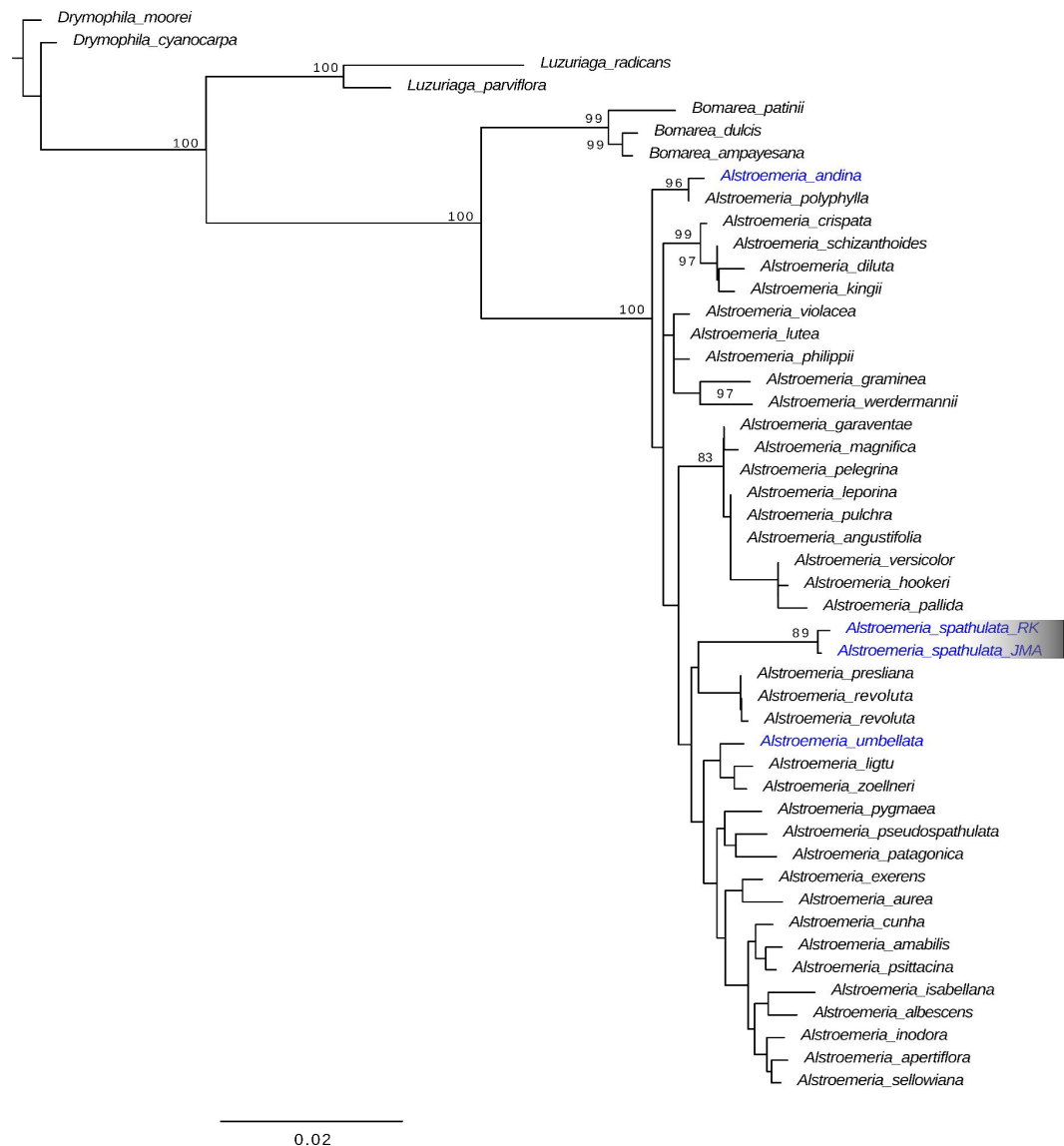


Figura 22. Árbol consenso de mayoría de la matriz concatenada de los marcadores nuclear (ITS), mitocondrial (matR) y cloroplastidial (matK, ndhF, trnF-ndhJ y rbcL) obtenidos bajo inferencia bayesiana. Valores de probabilidad posterior mayores a 0.85 están indicados a la izquierda de cada rama.

2. Resultados de acuerdo al caso 2 de estudio. Delimitación de especies. Diferenciación de linajes evolutivos entre el complejo de especies *Gomphrena umbellata* y *Gomphrena radiata*.

Los resultados del análisis combinado de ADN de cloroplasto y nuclear se muestran en la Figura 23. La matriz molecular en este caso contuvo un total de doce terminales. Se amplificaron 6 marcadores moleculares, 5 cloroplastidiales y

1 nuclear. De los 5 marcadores cloroplastidiales, solo 2 marcadores corresponden a secuencias codificantes (genes *atpB* y *matK*); los otros 3 marcadores contienen secuencias no codificantes (espaciadores intergénico *atpB-rbcL*, *trnH-psbA*, *trnL-F*). El largo de las secuencias alineadas combinadas fue de 5091 pb (*atpB* 1477 pb, *atpB-rbcL* 741 pb, *matK* 847 pb, *trnH-psbA* 360 pb, *trnL-F* 991 pb, ITS 670 pb). Las topologías de los árboles de IB, MP y MV fueron congruentes, mostrando alta resolución de ramas, por lo que aquí solo se muestra la topología de IB con los valores de MP y MV incluidos.

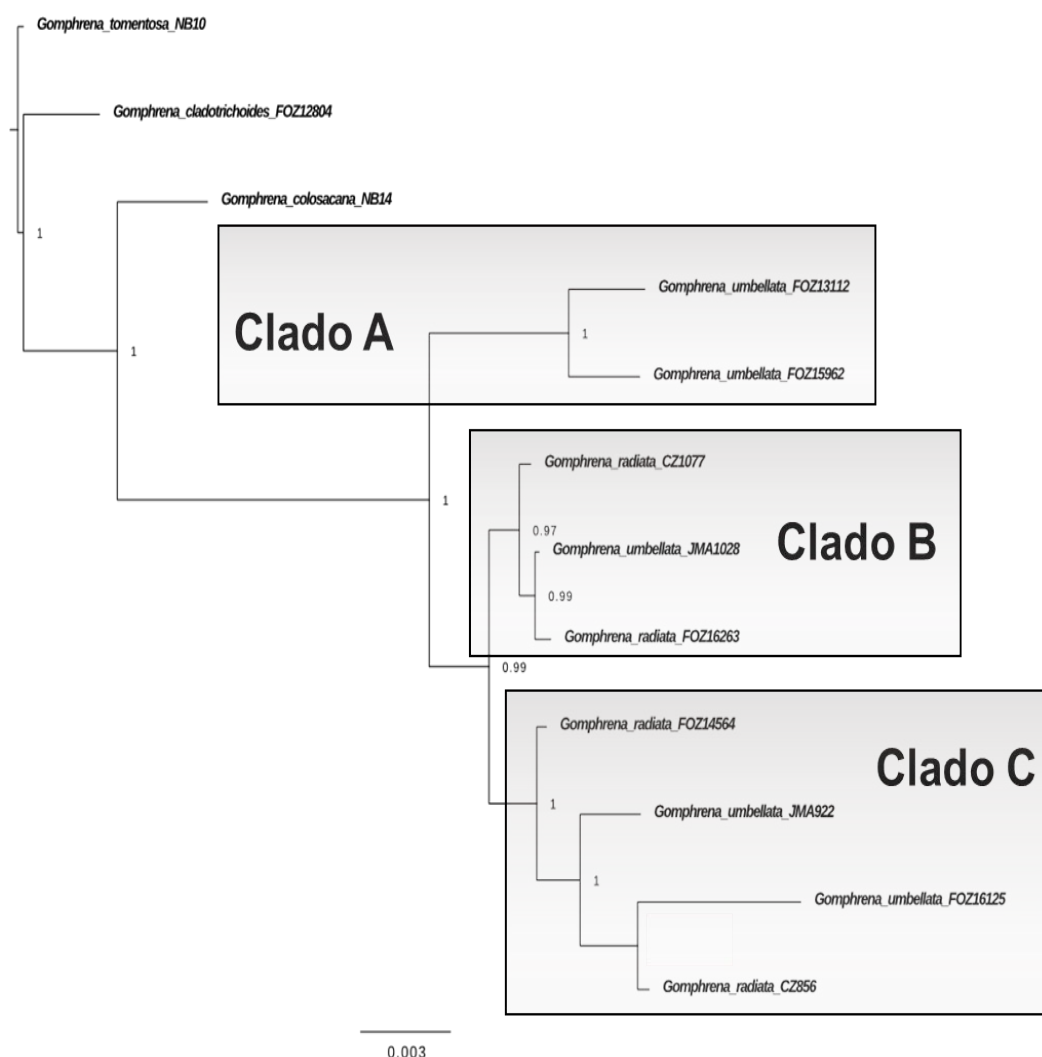


Figura 23. Árbol consenso de mayoría de la matriz concatenada de los marcadores nuclear (ITS) y cloroplastidiales (*matK*, *trnL*, *atpB-rbcL*, *atpB*, *rbcL*) obtenidos bajo inferencia bayesiana. Valores de probabilidad posterior mayores a 0.85 están indicados a la izquierda de cada rama.

Los análisis recuperaron al complejo *Gomphrena umbellata* - *Gomphrena radiata* como un clado monofilético fuertemente soportado (PP: 1; MPBS: 100%; MVBS: 100%). El complejo de especies abordado en el presente TFG posee una distribución en la región Altoandina y resulta de difícil resolución bajo el concepto morfológico de especie. Dada la alta heterogeneidad orográfica, ambiental, y climática que presenta la región Andino-Patagónica en el Cono Sur (Cabrera & Willink, 1980), se presumía que las 2 especies de este complejo, delimitadas en base a análisis de taxonomía clásica, no representarían linajes evolutivos independientes. Teniendo en cuenta los resultados filogenéticos observados se corrobora esta hipótesis, ya que estas especies a nivel filogenético no se agrupan en clados hermanos, sino que se encuentran resueltas sin mostrarse como linajes evolutivos independientes.

Sin embargo, aunque las especies *G. umbellata* y *G. radiata* actualmente aceptadas no representarían unidades evolutivas independientes, dentro de los resultados observados dentro del clado que agrupa los ejemplares analizados del complejo *G. umbellata* - *G. radiata*, muestra especial interés la resolución de 3 subclados recuperados, todos fuertemente soportados (PP: 1; MPBS: 100%; MVBS: 100%). Un clado A (Figura 23) conformado por 2 especímenes correspondientes al taxón *G. umbellata* (LEG. FOZ-13112 y LEG. FOZ-15962). Un clado B (Figura 23) conformado por 3 colecciones, 2 correspondientes al taxón *G. radiata* (JMA-1077 y FOZ-16263) y una correspondiente al taxón *G. umbellata* (CZ-1028). Por último, un clado C (Figura 23), recuperado como hermano del clado B, conformado por 4 colecciones, 2 correspondientes al taxón *G. radiata* (CZ-856 y FOZ-14564) y 2 correspondientes al taxón *G. umbellata* (JMA-922 y FOZ-16125).

Estos clados A, B y C resultan de gran interés debido a que muestran, de manera preliminar, un patrón geográfico en su resolución (Figura 24). El clado A agrupa colecciones de la región Altoandina más hacia el oeste de la Provincia de Jujuy, región caracterizada como Puna, mientras que el clado B agrupa colecciones más hacia el E respecto a las del clado A, región caracterizada como transición entre Quebrada y Puna en las provincias de Jujuy y Salta. Por otra parte, el clado C agrupa colecciones de ambos taxones distribuidos más hacia el sur respecto a los clados A y B, registros ubicados en las provincias de Catamarca y Tucumán.

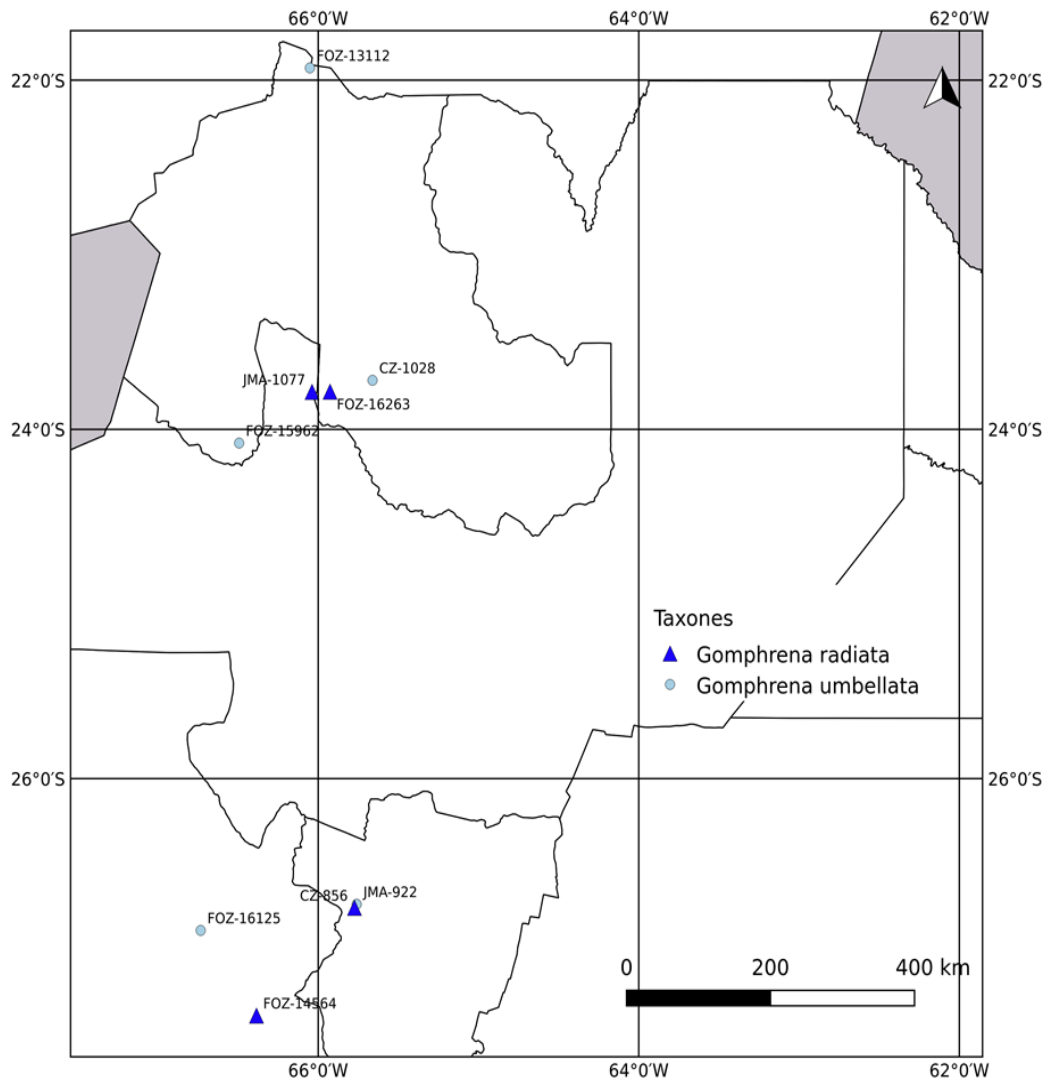


Figura 24. Distribución de los Clados A, B y C por distintas provincias de Argentina.

Los resultados obtenidos del análisis filogenético habilitan la posibilidad de ser complementados con nuevas colecciones para corroborar el patrón geográfico observado. Estos resultados serán utilizados para caracterizar diferentes patrones de divergencia, tanto morfológica como ecológica, y permitirán identificar diferentes factores asociados a su diversificación en la región. Adicionalmente, los resultados obtenidos también serán integrados a los estudios macroecológicos y de conservación de la Flora vascular del Cono Sur que se vienen llevando a cabo en el Instituto Darwinion.

3. Resultados de acuerdo al caso 3. Posibles utilidades biotecnológicas en especies delimitadas. Estudios sobre genes relacionados a la fotosíntesis C4 de potencial aplicación biotecnológica.

Mediante el estudio de la evolución molecular de las cuatro subunidades de la GDC en la subtribu *Otachyriinae* se ha identificado eventos de duplicación génica y transferencia lateral de genes que codifican para la subunidad H desde las especies con fotosíntesis C4 a las especies con fotosíntesis intermedia. Estos resultados indican la existencia de diversos procesos evolutivos que podrían haber influido en la evolución de la fotosíntesis de las gramíneas y que merecen seguir siendo investigados. En particular, el complejo multienzimático GDC presenta un gran interés ya que estaría involucrado en el establecimiento de una bomba de CO₂ en el mesófilo de las hojas de especies con vías fotosintéticas intermedias y en una mayor eficiencia en la fijación de carbono atmosférico.

En el marco del presente TFG, los resultados obtenidos fueron los siguientes. Se lograron amplificar por el método de PCR anidada las 4 regiones de interés en 8 taxones pertenecientes a la subtribu *Arthropogoninae*. Además de la amplificación, también se logró mediante la técnica de clonado la obtención de más de 30 plásmidos con secuencias de posible interés biotecnológico (se han obtenido entre 3 y 5 clones positivos para cada amplificación). De esta manera se amplía el muestreo de taxa pertenecientes a la tribu hermana de la subtribu *Otachyriinae*. Si bien estos plásmidos deben ser enviados para su secuenciación y realizar los correspondientes análisis bioinformáticos, se presenta de manera preliminar la ubicación de uno de los clones obtenidos y secuenciados hasta el momento (figura 25).

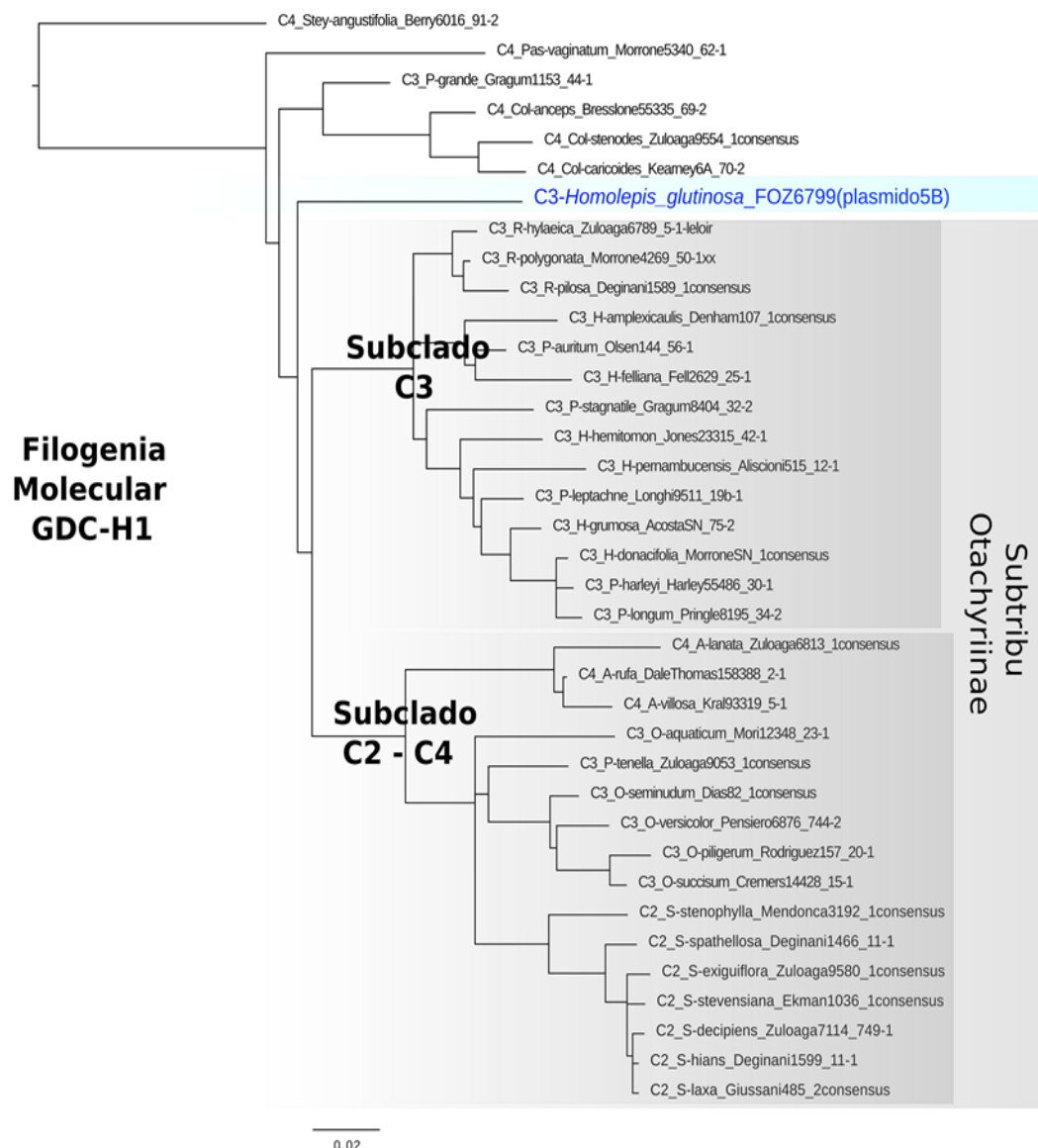


Figura 25. Árbol consenso de mayoría de la matriz concatenada de los marcadores nucleares (GDC-H1 y GDC-H2) obtenidos bajo inferencia bayesiana. Valores de probabilidad posterior mayores a 0.85 están indicados a la izquierda de cada rama.

Como aportes al proyecto en curso, en particular se ha logrado definir que la duplicación génica GDC (H1 y H2) estarían presentes también en los taxones clonados. Esto se infiere debido a que han podido amplificarse ambas subunidades (Tabla 6). La confirmación de esta hipótesis estará condicionada a la próxima secuenciación, en la cual se corroborará si las secuencias amplificadas corresponden a las diferentes copias encontradas hasta el momento. También se lograron amplificar los dos factores de transcripción de interés, *apo1* y *dwarf8* (Tabla 7), que serán necesarios para los estudios evolutivos comparativos futuros.

Especie (Subtribu Arthropogoninae)	ADN	GDC-H2		GDC-H1		
		E1-104-1437R	550F-1437R	E1-65F-2112R	1251F-2112R	E2-1278-2112R
<i>Homolepis glutinosa</i> (Sw.) Zuloaga & Soderstr.	MI001	AMP (1B)		PLÁSMIDO		
<i>Homolepis aturensis</i> (Kunth) Chase	MI004	AMP (4B)				AMP (52B)
<i>Homolepis isocalycia</i> (Meyer) Chase	MI014		AMP (203)	AMP (132B)		
<i>Mesosetum comatum</i>	MI015	AMP (139B)			AMP (390)	AMP (401B)
<i>Mesosetum chaseae</i>	MI017		AMP (205)	AMP (372)	AMP (391)	
<i>Oplismenopsis najada</i>	MI018	AMP (142B)				AMP (402B)
<i>Apochloa lutzii</i>	MI019		AMP (432)			
<i>Apochloa lorea</i>	MI020		AMP (433)			AMP (422B)
<i>Apochloa subtiramulosa</i>	MI022					AMP (414B)

Tabla 6. Las muestras que se encuentran amplificadas, en este caso para los marcadores GDC-H1 y GDC-H2, se determinan por la abreviación “AMP”. También se indica entre paréntesis el número correspondiente de cada reacción.

Especie (Subtribu Arthropogoninae)	ADN	apo1		dwarf8	
		26F-642R	26F-611R	263F-947R	242-947
<i>Homolepis glutinosa</i> (Sw.) Zuloaga & Soderstr.	MI001	PLÁSMIDO	AMP (244B)	AMP (45B)	
<i>Homolepis aturensis</i> (Kunth) Chase	MI004	AMP (248B)	AMP (245B)	AMP (251B)	
<i>Homolepis isocalycia</i> (Meyer) Chase	MI014	AMP (249B)	AMP (246B)	AMP (252B)	AMP (324 a 327)
<i>Mesosetum comatum</i>	MI015	PLÁSMIDO		AMP (316 a 319)	
<i>Mesosetum chaseae</i>	MI017	AMP (195B)		AMP (129B)	
<i>Oplismenopsis najada</i>	MI018	AMP (196B)	AMP (190B)		AMP (320 a 323)
<i>Apochloa lutzii</i>	MI019	AMP (403B)	AMP (432)		
<i>Apochloa lorea</i>	MI020	AMP (404B)		AMP (408B)	
<i>Apochloa subtiramulosa</i>	MI022			AMP (410B)	

Tabla 7. Las muestras que se encuentran amplificadas, en este caso para los marcadores apo1 y dwarf8, se determinan por la abreviación “AMP”. También se indica entre paréntesis el número correspondiente de cada reacción.

Los resultados obtenidos en el presente plan de trabajo, aunque no son concluyentes, permitirán profundizar los conocimientos adquiridos en estos temas en la subtribu Otachyriinae. Al trabajar sobre la subtribu hermana, permitirá validar el modelo encontrado hasta el momento para la subtribu Otachyriinae (Figura 25). Además, permitirá en el futuro trasladar los enfoques desarrollados en este grupo de gramíneas no-modelo a otros linajes de angiospermas como las Amaranthaceae (Figura 26). En el mediano plazo, los resultados de este proyecto podrán aplicarse a una mejor comprensión de la evolución de las diversas vías fotosintéticas en angiospermas. A largo plazo, podrían aplicarse a objetivos biotecnológicos en un contexto de producción agrícola en un escenario de cambio climático.

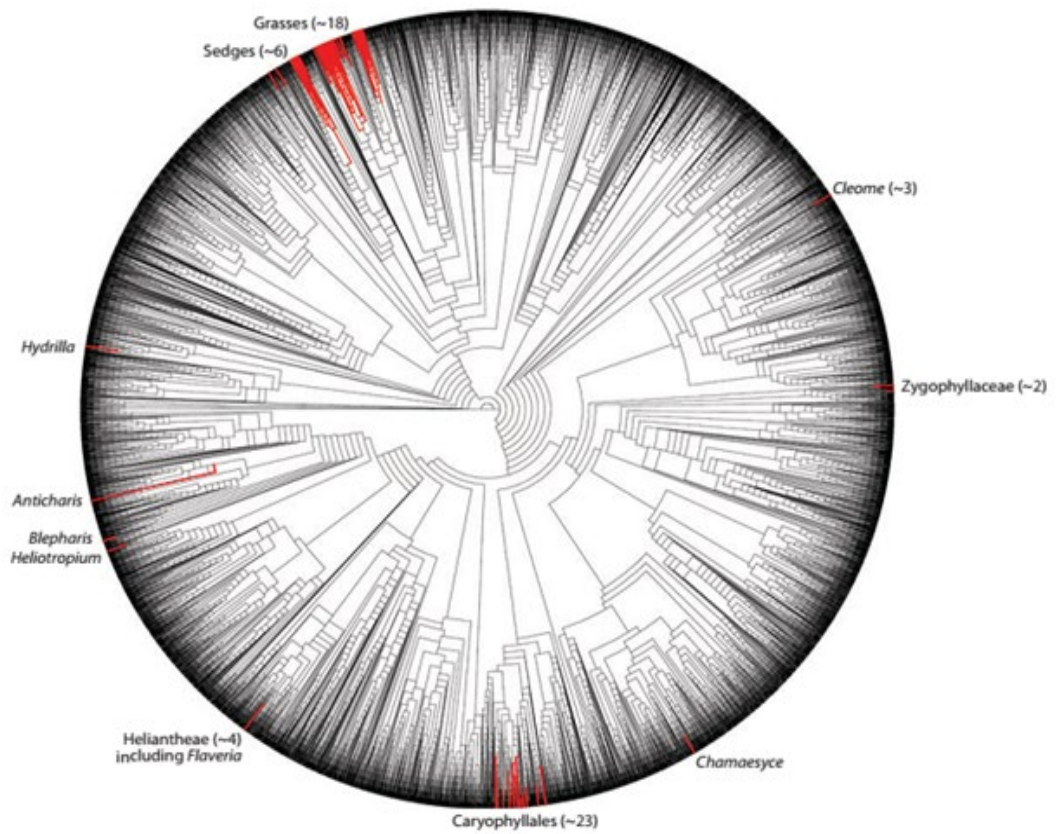


Figura 26. Distribución filogenética de los orígenes independientes de la vía C4 en Angiospermas. Las líneas rojas indican linajes con fotosíntesis C4. Figura adaptada de Sage et al. (2011).

Conclusiones y aportes al tema

El Trabajo Final de Graduación desarrollado me brindó la oportunidad de adquirir habilidades prácticas fundamentales en el ámbito de la investigación y la biología molecular, las cuales no fueron parte del aprendizaje durante la carrera de grado. A través de las técnicas centrales llevadas a cabo, de extracción, amplificación y clonación de ADN he experimentado los pasos necesarios para llevar a cabo ensayos en el laboratorio de distintas complejidades, atendiendo particularidades en diferentes situaciones.

Durante el proceso de aprendizaje, he comprendido los fundamentos de las técnicas y la importancia de la precisión, atención al detalle y seguimiento de protocolos específicos para obtener resultados confiables y reproducibles; también la modificación, e incluso la elaboración de nuevos protocolos con el objetivo de maximizar la eficiencia de lo realizado. A lo largo de los numerosos experimentos realizados he apreciado la relevancia de la planificación cuidadosa, la preparación adecuada de reactivos y la correcta interpretación de los resultados obtenidos.

Además, una cuestión no menor es la de lograr experimentar desafíos inherentes a la investigación científica, como la optimización de las condiciones experimentales, la solución de problemas imprevistos y la interpretación crítica de los resultados. Estos obstáculos me permitieron desarrollar habilidades de resolución de problemas y pensamiento crítico, lo cual resulta fundamental para el desarrollo de una actividad profesional, dentro o fuera del ámbito científico.

La incorporación de técnicas bioinformáticas a través del uso de programas y algoritmos especializados, me proporciono una visión más integral y avanzada en el estudio de las secuencias genéticas. Aprendí a analizar grandes volúmenes de datos genéticos y obtener información relevante para la comprensión de los procesos biológicos, en particular los de tipo evolutivos. Logré aprender alineamiento de secuencias, identificación de regiones conservadas, predecir estructuras secundarias y analizar patrones genéticos en grandes conjuntos de datos.

El trabajo Final de Graduación se desarrolló en el contexto de los siguientes puntos, de los cuales sobre los mismos se llevará a cabo una breve conclusión de lo obtenido.

1) Aportar datos sobre registro de especies en la región e integrar los resultados obtenidos a los estudios macroecológicos y de conservación de la Flora vascular del Cono Sur que se vienen llevando a cabo en el Instituto Darwinion.

Se logró obtener resultados congruentes sobre la presencia de la especie *Alstroemeria spathulata* en Argentina. La información hasta el momento indicaba que dicha especie no se encontraba en el país. A través de los análisis, se recuperó a *Alstroemeria spathulata* en un clado diferente respecto a las especies morfológicamente afines con secuencias disponibles en GenBank como *A. andina* y *A. umbellata*. Estos resultados apoyan la identificación morfológica de las colecciones realizadas en Argentina e identificadas como *A. spathulata*. Además, la inclusión de *A. spathulata* en el análisis filogenético, posibilita a futuro incluir el taxón en diversos estudios evolutivos en otros ejemplares.

2) Identificar y validar diferentes linajes de evolución independiente (= unidades evolutivas significativas) en complejos de los géneros *Gomphrena* (Amaranthaceae). Los linajes identificados serán categorizados como especies bajo el concepto general de especies.

La hipótesis presentada con respecto a *Gomphrena umbellata* y *Gomphrena radiata*, la cual indicaba que ambas especies no representaban linajes evolutivos independientes, se corroboró a través de diversos análisis filogenéticos realizados. También, a través de los mismos, se diferenciaron 3 subclados fuertemente soportados, los cuales resultan de gran interés debido a que muestran un patrón geográfico bien marcado. Si bien, esto no era esperado, se abre una nueva ventana de investigación a partir de la complementación del análisis con nuevas colecciones para corroborar lo observado.

3) Reconstrucción de la historia evolutiva de la tribu Paspaleae de genes candidatos considerados clave en la fotosíntesis C4, para estudiar en el futuro posibles factores moleculares que contribuyeron al origen de la vía fotosintética C4 a partir de un ancestro C3.

A través de la identificación de duplicación génica y transferencia lateral de genes que codifican la subunidad H desde las especies con fotosíntesis C4 a las

especies con fotosíntesis intermedia, se logró concluir la existencia de diversos procesos evolutivos que podrían haber influido en la evolución de la fotosíntesis de las gramíneas y que merecen seguir siendo investigados. Si bien este estudio no ha finalizado, existe una base para trasladar los enfoques desarrollados a otros linajes de angiospermas (como por ejemplo, las *Amaranthaceae*). De esta manera se podrán evaluar los caminos evolutivos hacia las diversas vías fotosintéticas, estudios de gran valor para la selección de genes candidatos de potencial aplicación biotecnológica.

Para finalizar, como alumno de la carrera Ingeniería Agronómica, este trabajo me permitió comprender mejor los procesos biológicos y la capacidad que tiene la ciencia, a través de sus técnicas y herramientas, de avanzar en el conocimiento de lo que nos rodea.

Temas abiertos

1) De acuerdo a los resultados obtenidos en el caso 1 de estudio, se elaboró una publicación científica “CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALSTROEMERIA SPATHULATA (ALSTROEMERIACEAE) PARA LA FLORA ARGENTINA MEDIANTE OBSERVACIONES MORFOLÓGICAS Y ANÁLISIS MOLECULARES” cuyos autores son Christian A. Zanotti, Matías F. Iglesias, Pablo D. Moroni & Juan M. Acosta, la cual está actualmente enviada a los editores de la revista y revisores científicos y obtener su consideración para ser publicada.

2) De acuerdo a los resultados obtenidos en el caso 2 de estudio, queda pendiente llevar a cabo el trabajo molecular y nuevos análisis a partir de nuevas colecciones para ampliar el rango geográfico evaluado de ambos taxones, para de esta manera corroborar o no con mayor número de muestras el patrón geográfico presentado. Esto se utilizaría para caracterizar diferentes patrones de divergencia, tanto morfológica como ecológica, y permitiría identificar diferentes factores asociados a su diversificación en la región.

3) De acuerdo a los resultados obtenidos en el caso 3 de estudio, queda pendiente integrar mayor cantidad de taxones de la subtribu para amplificarlos, clonarlos e integrarlos en el estudio, y plantear una hipótesis robusta sobre la evolución de los taxones de estas subtribus hermanas (Arthropogoninae y Otachyriinae). Cabe destacar que se lograron amplificar y clonar las 4 regiones de interés en 8 taxones

Bibliografía

Acosta, J. M., M. A. Scataglini, R. Reinheimer, and F. O. Zuloaga. 2014. *A phylogenetic study of subtribe Otachyriinae (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae)*. Plant Systematics and Evolution 300: 2155–2166.

Acosta, J. M., F. O. Zuloaga, and R. Reinheimer. 2019. *Nuclear phylogeny and hypothesized allopolyploidization events in the Subtribe Otachyriinae (Paspaleae, Poaceae)*. Systematics and Biodiversity: 1–18.

Agapow, P. M.; O. R. Bininda-Emonds, K. A. Crandall, Gittleman J. L., G. M. Mace, J. C. Marshall A. Purvis. 2004. *The impact of species concept on biodiversity studies*. The Quarterly Review of Biology, 79(2), 161–179. <https://doi.org/10.1086/-383542>

Antonelli, A.; R. J. Smith, C. Fry, Monique S. J. Simmonds, Paul J. Kersey, et al. 2020. *State of the World's Plants and Fungi (Research Report)*. Royal Botanic Gardens (Kew): Sfumato Foundation: hal-02957519.

Bennun, L.; E. C. Regan, J. Bird, J. W. van Bochove, V. Katariya, S. Livingstone, R. Mitchell, C. Savy, M. Starkey, H. Temple & J. D. Pilgrim. 2018. *The value of the IUCN Red List for business decision making*. Conservation Letters 11(1): e12353. <https://doi.org/10.1111/conl.12353>

Bini, L. M.; J. A. F. Diniz-Filho, T. F. Rangel, R. P. Bastos & M. P. Pinto. 2006. *Challenging Wallacean and Linnean shortfalls: knowledge gradients and conservation planning in a biodiversity hotspot*. Diversity and Distributions 12(5): 475-482. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2006.00286.x>

Brook, B. W.; N. S. Sodhi & C. J. A. Bradshaw. 2008. *Synergies among extinction drivers under global change*. Trends in Ecology and Evolution 23: 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.03.011>

Cabrera, A. L. & A. Willink. 1980. *Biogeografía de América latina*. Washington DC: Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.

- Ceballos, G.; P. R. Ehrlich, A. D. Barnosky, A. García, R. M. Pringle & T. M. Palmer. 2015. *Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction*. Science advances: 1(5), e1400253. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253>
- Chacón, J.; A. Sousa, C. M. Baeza & S. S. Renner. 2012a. *Ribosomal DNA distribution and a genus-wide phylogeny reveal patterns of chromosomal evolution in Alstroemeria (Alstroemeriaceae)*. American Journal of Botany 99: 1501-1512. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1200104>
- Chacón, J.; M. C. de Assis, A. W. Meerow & S. S. Renner. 2012b. *From East Gondwana to Central America: historical biogeography of the Alstroemeriaceae*. Journal of Biogeography, 39: 1806- 1818. <https://doi.org/10.1111/j.13652699.2012.02749.x>
- Chen, I. C.; J. K. Hill, R. Ohlemüller, D. B. Roy & C. D. Thomas. 2011. *Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming*. Science 333: 1024-1026. <https://doi.org/10.1126/science.1206432>
- Christin, P.-A., M. J. Wallace, H. Clayton, E. J. Edwards, R. T. Furbank, P. W. Hattersley, R. F. Sage, et al. 2012. *Multiple photosynthetic transitions, polyploidy, and lateral gene transfer in the grass subtribe Neurachninae*. Journal of Experimental Botany 63: 6297–6308.
- Christin, P.-A., C. P. Osborne, D. S. Chatelet, J. T. Columbus, G. Besnard, T. R. Hodkinson, L. M. Garrison, et al. 2013. *Anatomical enablers and the evolution of C4 photosynthesis in grasses*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110: 1381–1386.
- Corlett, R.T. 2016. *Plant diversity in a changing world: status, trends, and conservation needs*. Plant Diversity 38: 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2016.01.001>
- Crandall, K. A.; O. R. Bininda-Emonds, G. M. Mace & R. K. Wayne. 2000. *Considering evolutionary processes in conservation biology*. Trends in Ecology & Evolution, 5(7), 290-295.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing*. Nature Methods 9: 772.

- Dayrat, B. 2005. *Towards integrative taxonomy*. Biological Journal of the Linnean Society 85(3): 407–417. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>
- De Queiroz, K. 1998. *The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation and terminological recommendations*. In D. J. Howard and H. S. Berlocher (Eds.), *Endless Forms: Species and Speciation* (pp. 57–75). Oxford: Oxford University Press.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J. and HICKS, J. B. 1983. *A Plant DNA Minipreparation Version II*. Plant Molecular Biology Reporter. 1 (4): 19-21.
- Diniz-Filho, J. A. F.; R. D. Loyola, P. Raia, A. O. Mooers, & L. M. Bini. 2013. *Darwinian shortfalls in biodiversity conservation*. Trends in Ecology & Evolution 28(12): 689-695.
- Dirzo, R. & P. H. Raven. 2003. *Global state of biodiversity and loss*. Annual review of Environment and Resources 28: 137-167. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.28.050302.105532>
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L. 1987. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochem. Bull. 19:11-15.
- Federici, S.; A. Galimberti, F. Bartolucci, I. Bruni, F. De Mattia, P. Cortis & M. Labra. 2013. *DNA barcoding to analyse taxonomically complex groups in plants: the case of Thymus (Lamiaceae)*. Botanical Journal of the Linnean Society: 171(4), 687–699. <https://doi.org/10.1111/boj.12034>
- Felsenstein, J. 1985. *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*. Evolution 39: 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.15585646.1985.tb00420.x>
- Fraser, D. J., & L. Bernatchez. 2001. *Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units*. Molecular Ecology 10(12): 2741-2752.
- Goloboff, P. A., J. S. Farris, and K. C. Nixon. 2008. *TNT, a free program for phylogenetic analysis*. Cladistics 24: 774–786. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x>
- Gómez, J.E. y otros. *Biología molecular: principios y aplicaciones*. Medellín, CIB, 2011.

- Isaac, N. J.; J. Mallet & G. M. Mace. 2004. *Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation*. Trends in Ecology & Evolution 19(9): 464-469. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.06.004>
- Isaac, N. J.; S. T. Turvey, B. Collen, C. Waterman & J. E. Baillie. 2007. *Mammals on the EDGE: conservation priorities based on threat and phylogeny*. PloS one 2(3): e296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000296>
- IUCN Species Survival Commission. 2012. *IUCN Red List categories and criteria, version 3.1*. Gland: IUCN. <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/RL-2001-001.pdf>
- IUCN Standards and Petitions Committee. 2019. *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria*, version 14. Prepared by the Standards and Petitions Committee. <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>
- Izquierdo, M. *Ingeniería genética y transferencia génica*. Madrid, Pirámide, 1999, págs. 21-146.
- KAYA, Z. and NEALE, D.B. 1993. *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) polymorphisms in Pinus nigra subsp. Pallasiana and Pinus brutia*. Doga- Turkish J. Agri. For. 17:295-306.
- Lemey, P., M. Salemi & A. M. Vandamme. 2009. *The phylogenetic handbook*. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO978051181-9049>
- Moritz, C. 1994. *Defining 'evolutionarily significant units' for conservation*. Trends in Ecology & Evolution 9: 373–375. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)9005-7-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)9005-7-4)
- Nic Lughadha, E.; S. P. Bachman, T. C. C. Leão, F. Forest, J. M. Halley, J. Moat, C. Acedo, K. L. Bacon, R. F. A. Brewer, G. Gâteblé, S. C. Gonçalves, R. Govaerts, P. M. Hollingsworth, I. Krisai-Greilhuber, E. J. de Lirio, P. G. P. Moore, R. Negrão, J. M. Onana, L. R. Rajaovelona, H. Razanajatovo, P. B. Reich, S. L. Richards, M. C. Rivers, A. Cooper, J. Iganci, G. P. Lewis, E. C. Smidt, A. Antonelli, G. M. Mueller & B. E. Walker. 2020. *Extinction risk and threats to plants and fungi*. Plants, People, Planet, 2: 389-408. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10146>

Oliveira, U.; A. Pereira Paglia, A. D. Brescovit, C. J. B. de Carvalho, D. Paiva Silva, D. T. Rezende, F. Sá Fortes Leite, J. A. Nogueira Batista, J. P. Peixoto Pena Barbosa, J. R. Stehmann, J. S. Ascher, M. Ferreira de Vasconcelos, P. Löwenberg-Neto, P. Guimarães Dias, P. De Marco Jr, V. Gianluppi Ferro & A. J. Santos. 2016. *The strong influence of collection bias on biodiversity knowledge shortfalls of Brazilian terrestrial biodiversity*. Diversity and Distributions 22: 1232-1244. <https://doi.org/10.1111/ddi.12489>

Owen, N. R.; R. Gumbs, C. L. Gray & D. P. Faith. 2019. *Global conservation of phylogenetic diversity captures more than just functional diversity*. Nature communications 10(1): 1-3.

Pinilla, G. *Biología molecular: ADN recombinante y sus aplicaciones*. Colombia, El Manual Moderno, 2019, págs. 30-209.

Ricketts, T. H.; E. Dinerstein, T. Boucher, T. M. Brooks, S. H. M. Butchart, M. Hoffmann, J. F. Lamoreux, J. Morrison, M. Parr, J. D. Pilgrim, A. S. L. Rodrigues, W. Sechrest, G. E. Wallace, K. Berlin, J. Bielby, N. D. Burgess, D. R. Church, N. Cox, D. Knox, C. Loucks, G. W. Luck, L. L. Master, R. Moore, R. Naidoo, R. Ridgely, G. E. Schatz, G. Shire, H. Strand, W. Wettengel, & E. Wikramanayake. 2005. *Pinpointing and preventing imminent extinctions*. Proceedings of the National Academy of Sciences 102(51): 18497-18501. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509060102>

Riddle, B. R., & Hafner, D. J. (1999). *Species as units of analysis in ecology and biogeography: time to take the blinders off*. Global Ecology and Biogeography, 8(6), 433–441. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1999.00170.x>

Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, et al. 2012. *MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space*. Systematic Biology 61: 539–542.

Stamatakis, A. 2014. *RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies*. Bioinformatics 30: 1312–1313.

Sage, R. F., P.-A. Christin, and E. J. Edwards. 2011. *The C4 plant lineages of planet Earth*. Journal of Experimental Botany 62: 3155–3169.

Sage, R. F., R. Khoshravesh, and T. L. Sage. 2014. *From proto-Kranz to C4 Kranz: building the bridge to C4 photosynthesis*. Journal of Experimental Botany 65: 3341–3356.

Sage, R. F. 2017. *A portrait of the C4 photosynthetic family on the 50th anniversary of its discovery: Species number, evolutionary lineages, and Hall of Fame*. Journal of Experimental Botany 68: e11–e28.

Sambrook J. y Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1, 2 and 3, Cold Spring Harbor N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 3ª edición, 2001.

SHAGAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R.A. and ALLARD, R.W. 1984. *Ribosomal spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:8014-8019.

Smith, C.A. y Wood, E.J. *Biología molecular y biotecnología*. Wilmington, Addison-Wesley Iberoamericana, 1998, págs. 88-110.

Sukumaran, J. & L. L. Knowles. 2017. *Multispecies coalescent delimits structure, not species*. Proceedings of the National Academy of Sciences 114(7): 1607–1612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607921114>

Thieman, W.J. y Palladino, M.A. *Introducción a la biotecnología*. Madrid, Pearson Education, 2ª edición, 2010, págs. 57-96.

Urban, M. C. 2015. *Accelerating extinction risk from climate change*. Science 348: 571-573. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4984>

von Caemmerer, S., and R. T. Furbank. 2016. *Strategies for improving C4 photosynthesis*. Current Opinion in Plant Biology 31: 125–134.

von Caemmerer, S., W. P. Quick, and R. T. Furbank. 2012. *The development of C4 rice: Current progress and future challenges*. Science 336: 1671–1672.

Walker, J.M. y Gingold, E.B. *Biología molecular y Biotecnología*. Zaragoza, ACRIBIA, 2ª edición, 1997, págs. 23-65.

Whittaker R. J.; M. B. Araújo, P. Jepson, R. J. Ladle, J. M. E. Watson & K. J. Willis. 2005. *Conservation Biogeography: assessment and prospect*. Diversity and Distributions 11: 3–23. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2005.00143.x>

Zuloaga, F. O., Belgrano, M. J., & Zanotti, C. A. 2019. *Actualización del Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Darwiniana, Nueva Serie*, 7(2), 208–278. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2019.72.861>

Páginas web consultadas

https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2020/12/Alstroemeria_spathulata_17RCE_PAC.pdf. *Alstroemeria spathulata*. 2/6/2023.

<http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/13396/39323>. *Gomphrena radiata*. 23/5/2023.

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:112080-2>. *Gomphrena radiata*. 26/5/2023.

<http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/13412/48813>. *Gomphrena umbellata*. 23/5/2023.

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60625-1>. *Gomphrena umbellata*. 26/5/2023.

<http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/12377>. *Homolepis glutinosa*. 23/5/2023.

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:278239-2>. *Homolepis glutinosa*. 26/5/2023.

<http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/12410>. *Mesosetum comatum*. 23/5/2023.

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:157990-2>. *Mesosetum comatum*. 26/5/2023.

<http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/22869>. *Oplismenopsis najada*. 23/5/2023.

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:174706-2>. *Oplismenopsis najada*. 26/5/2023.

<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60447876-2/general-information>. *Apochloa lorea*. 23/5/2023.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. GenBank. 28/4/2023.

<https://worldwide.promega.com/es-es/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>. PROMEGA. 25/4/2023.

Apéndices

A1. Protocolo de extracción de ADN

1. Preparar el lugar de trabajo y el material a utilizar.
2. Enumerar dos tubos eppendorf (eppi) por muestra, según numeración correspondiente al responsable de la extracción. Generalmente, para este paso se utilizan tubos eppi de 1,5 mililitros (mL). El rótulo de cada uno de los eppi debe ser claro y persistente en el tiempo.
3. Pesar entre 15 y 40 miligramos (mg) de material vegetal. Seleccionar hojas color verde claro, evitando las hojas comidas, manchadas o de bordes arrugados. Se recomienda utilizar balanza de precisión para favorecer la exactitud de la medición.
4. Colocar el material en mortero para moler. Se debe asegurar el trabajo con material limpio para evitar contaminación en la muestra de interés. Se recomienda cortar el material vegetal en pedazos pequeños para favorecer la molienda en los pasos siguientes.
5. Agregar nitrógeno líquido. La manipulación de nitrógeno líquido debe realizarse con suma precaución, dado que tiene una temperatura de -196 grados centígrados (°C). Se agrega una cantidad que va a depender de la facilidad de molienda que presenta el material de trabajo. El almacenamiento del nitrógeno se realiza en termos especiales; cuando se quiere utilizar el mismo se lo traspasa a recipientes específicos para simplificar el procedimiento.
6. El material molido se coloca en el tubo eppi correctamente rotulado. A la espera del paso siguiente se recomienda colocarlo en baño de hielo para evitar degradación del ácido desoxirribonucleico (ADN) de interés.
7. Agregar 600 µl de bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) al tubo eppi con el correspondiente material molido. Esto debe realizarse lo más próximo posible a la finalización del paso anterior.
8. Agregar 2,8 µl de beta-mercaptoetanol rápidamente posterior al agregado de CTAB. Es fundamental llevar a cabo este paso con prontitud y precaución para asegurar el éxito del procedimiento y prevenir cualquier riesgo de toxicidad para el investigador.

9. Agitar contenido de eppi mediante la utilización de vortex.
10. Colocar el eppi en baño maría (BM) a 60°C durante aproximadamente 1 hora 30 minutos. Agitar mediante vortex cada 15-20 minutos.
11. Retirar el eppi del BM, dejar que los mismos tomen temperatura ambiente (TA) y agregar 600 µl de cloroformo-alcohol isoamílico 24-1(Sevag).
12. Agitar contenido de eppi mediante la utilización de vortex.
13. Centrifugar contenido de eppi mediante centrífuga común configurada 2 minutos a 12.000 rpm.
14. Separar fase acuosa (sobrenadante) y transferirla a un eppi limpio y rotulado. Es importante registrar el volumen recuperado para el agregado de compuestos en los pasos siguientes. En caso de que se observe la fase acuosa turbia se procede a repetir los pasos 12, 13 y 14. El eppi con el precipitado se descarta.
15. De acuerdo al volumen recuperado en el paso anterior, se agrega 0,5 volumen de solución 5 molar (M) de cloruro de sodio (NaCl). Se registra el volumen total luego del agregado de NaCl.
16. De acuerdo al volumen que tengo en el eppi luego del agregado de NaCl, se agrega 0,4 volumen de isopropanol.
17. Agitar 3 veces por inversión lenta.
18. El eppi se coloca en freezer (-20°C) y se deja reposar por al menos 12 horas.
19. Retirar eppi del freezer y centrifugar su contenido mediante centrífuga común configurada 5 minutos a 12.000 rpm.
20. Se descarta el sobrenadante cuidadosamente sobre un vaso de precipitados. Se puede utilizar micropipeta para maximizar precaución y evitar complicaciones. El objetivo es mantener el pellet (que corresponde a ADN) en el eppi. En caso de que se observe el pellet suelto en el sobrenadante se procede a repetir los pasos 19 y 20.
21. Agregar 500 µl de etanol (alcohol 70°). Se procede a lavar el pellet de ADN mediante su despegamiento. Se lo debe dejar despegado durante 5 minutos a TA antes de realizar nuevamente la centrifugada.
22. Centrifugar contenido de eppi mediante centrífuga común configurada 2 minutos a 12.000 rpm.

23. Se descarta el sobrenadante cuidadosamente sobre un vaso de precipitados. Se puede utilizar micropipeta para maximizar precaución y evitar complicaciones. El objetivo es mantener el pellet (que corresponde a ADN) en el eppi. En caso de que se observe el pellet suelto en el sobrenadante se procede a repetir los pasos 21, 22 y 23.
24. Colocar eppi con tapa abierta por debajo de lámpara incandescente con el fin de eliminar cualquier residuo de etanol que pueda estar presente en el pellet.
25. Resuspender pellet de ADN en 60 µl (puede variar) de buffer AE (Quiagen).
26. Realizar inversiones lentas para favorecer la resuspensión.
27. Almacenar en freezer (-20°C) durante el tiempo que considere correcto.

A2. Preparación de CTAB

Para la preparación de 5 mL de CTAB se procede a utilizar un tubo falcon limpio al cual se agrega:

1. 500 µl de TRISHCl
2. 200 µl de EDTA
3. 1400 µl de NaCl
4. 0,05 gr de PVP
5. 0,1 gr de CTAB

Para favorecer la homogenización de los componentes agregados se realiza vortex. Debido a la utilización de detergentes se producen burbujas. A través del paso del tiempo las mismas van a ir disminuyendo. Para acelerar la eliminación de burbujas se puede colocar el tubo falcon en baño maría a 60°C.

A3. Importancia y fundamentos de la determinación de calidad del ADN

Un investigador siempre busca obtener un ADN que presente la menor cantidad de contaminantes, dado que estos potencian el riesgo de degradación y complicaciones en los resultados. En consecuencia, la medición de calidad en el ADN pasa a ser relevante y muy tenida en cuenta por la genética molecular. Como bien sabemos, el ADN se encuentra en cada una de las células de un organismo, lo cual hace parecer que su extracción es sencilla y similar en cada uno de ellos.

Sin embargo, la biodiversidad es lo que entra en juego; ciertos organismos dificultan en gran medida la extracción de su ADN debido a su composición estructural. No todos los seres vivos son iguales, y cada uno de ellos presenta variaciones que los caracteriza y diferencia. La extracción de ADN en un animal no es igual que en una planta; y la extracción de ADN no es igual en todas las especies vegetales, debido a diferencias en su anatomía y contenidos celulares (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

La espectrofotometría es una de las técnicas experimentales más utilizadas para calcular la calidad obtenida del material genético. La misma se encarga de medir la densidad óptica (DO) de la solución que contiene el ADN o ARN, dependiendo la muestra con la que se cuenta. Los ácidos nucleicos se conforman por, entre otros componentes, bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas), las cuales se caracterizan por ser aromáticas; esta particularidad le permite tanto al ADN como al ARN la capacidad para absorber luz ultravioleta. Está comprobado que el máximo de absorción que tiene el ADN es de 260 nm, por lo que si se trabaja con este valor se puede calcular la concentración de ADN mediante la siguiente formula: $\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = [E \text{ (coeficiente de extinción)} \times A \text{ (absorbancia de la muestra)}] / B \text{ (longitud del paso óptico)} \times \text{factor de dilución}$. El coeficiente de extinción del ADN es de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la longitud del paso óptico generalmente de 1 cm (Gómez y otros, 2011).

El fundamento de realizar la espectrofotometría no es solo medir concentración, sino también determinar cuánto hay de lo que interesa en la solución. El ADN puede presentar una elevada cantidad de contaminantes que no fueron eliminados eficientemente en los pasos de extracción como, proteínas, nucleótidos, ARN, aminoácidos, polifenoles, ligninas, entre otros. También pueden presentarse otras moléculas, que podrían haber sido arrastrados por los reactivos que se utilizaron en el proceso (Gómez y otros, 2011).

Para calcular la absorbancia se utiliza un instrumento denominado biofotómetro, el cual tiene una abertura para localizar la muestra y proyectarle un haz de luz monocromática; de esta manera, se determina la cantidad de luz absorbida y se obtiene la información correspondiente. Cuando se mide la absorción se deben tener ciertas precauciones. En primera instancia, se mide cual es la absorción del medio específico (buffer) en el cual se encuentra el ADN, lo cual se conoce como “blanco”. Luego, se mide lo que se conoce como “muestra”,

que corresponde al ADN en el buffer. La diferencia entre ambas mediciones indica cual es la absorción propiamente dicha del ADN (Gómez y otros, 2011).

Como bien se mencionó anteriormente, el máximo de absorción del ADN es de 260 nm. Por otro lado, las proteínas tienen como máximo de absorción 280 nm; dicho esto, cuando estoy midiendo absorción de ADN (a 260 nm) también están interfiriendo las proteínas. La solución de este problema es realizar, además de la medición a 260 nm, también una segunda medición a 280 nm. Mediante esto, se podrá separar lo que es ADN de contaminantes (Gómez y otros, 2011).

En resumen, para cada muestra se debe medir la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm. La relación que haya entre ambos datos dará la calidad de ADN. Si la relación es de entre 1,8 y 1,9, entonces se cuenta con ADN puro; si la relación es entre 1,9 y 2,0, entonces es posible que el ADN esté contaminado con ARN o bien la totalidad de la muestra sea ARN (este se caracteriza por tener mayor absorbancia a diferencia del ADN); si la relación es mayor a 2,0, entonces es probable que haya nucleótidos libres (estos se caracterizan por tener una absorbancia aun mayor que la del ARN), lo que significaría una posible degradación del ADN; y finalmente, si la relación da menor a 1,8, entonces hay contaminación con proteínas u otros componentes (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

Teniendo en cuenta los resultados plasmados por el equipo se tomarán medidas al respecto, que pueden consistir en la repetición de la extracción, en caso de que el ADN de interés no exista o la calidad del mismo sea muy baja; o, la preparación de diluciones más o menos concentradas para futuras técnicas moleculares. Es importante destacar que los contaminantes llevan a sobreestimar la cantidad real de ADN y tienen el riesgo de la inactivación o degradación del mismo. Por otro lado, las soluciones con demasiada concentración de ADN tienen la dificultad de ser viscosas, lo cual pueden generar errores en volúmenes durante el pipeteo. Cabe destacar que los biofotómetros modernos y utilizados en este TFG tienen la particularidad de realizar todos los cálculos de manera automatizada, haciendo que la practica desarrollada sea rápida y sencilla.

A4. Protocolo para cuantificar concentración y pureza del ADN

1. Preparar biofotómetro, encenderlo y corroborar que su funcionamiento sea correcto.
2. Calibrar el equipo y ajustar la longitud de onda adecuada para la cuantificación de ADN (260 nm) y la evaluación de la pureza del ADN (280 nm). También se puede indicar diluciones realizadas (1:20, por ejemplo) y otros aspectos que resulten de interés.
3. Asegurarse de que las cubetas a utilizar estén limpias y estériles. Es relevante que el manejo de las mismas sea con pinzas o guantes para evitar cualquier tipo de error en la medición.
4. Transferir 90 µl de buffer TE a una cubeta estéril y colocarla en el compartimiento correspondiente del biofotómetro para establecer el valor de referencia a cero.
5. Tomar la muestra de ADN que se quiere analizar y asegurarse que la misma se encuentre homogenizada. En caso de que haya partículas visibles, se recomienda realizar una centrifugación a baja velocidad para promover una adecuada homogeneización y dilución de las partículas visualizadas, para de esta manera obtener una medición con mayor precisión.
6. Con el fin de utilizar la menor cantidad de muestra de ADN, se procede a preparar, en un tubo eppendorf de 1,5 mL, una dilución 1:20. Se agrega 95 µl de buffer TE y 5 µl de ADN.
7. Transferir 90 µl de la muestra de ADN diluida en buffer TE a una cubeta limpia y seca y colocarla en el compartimiento del biofotómetro.
8. Registrar la lectura de absorbancia. El biofotómetro realiza cálculos automáticos y muestra concentración y diferentes mediciones a distintas absorbancias, según hayan sido establecidas en el equipo previamente.
9. La relación de absorbancia 260/280 es el dato de relevancia para determinar la calidad del ADN. Valores entre 1.8 y 1.9 son indicativos de ADN de alta pureza.

A5. Consideraciones sobre los principios y fundamentos para la amplificación del ADN

Para entender el fundamento de la técnica molecular de amplificación de ADN, se debe partir del concepto de la replicación de ADN, ya que este es el proceso mediante el cual se duplica la molécula de ADN in vivo, es decir, dentro del organismo. Cuando se lleva a cabo la división celular, en primer lugar, se da la duplicación de su genoma, para que de esta manera cada célula hija presente un juego completo de cromosomas. Es importante destacar que, cada célula de un organismo vivo, presenta toda la información que necesita para fabricar cualquier célula que compone al mismo. Por lo tanto, cada célula tiene el genoma completo y la replicación consiste en copiarlo de manera idéntica o lo más parecidamente posible (Gómez y otros, 2011).

Principalmente, la replicación in vivo se da a través de un conjunto de enzimas específicas en un procedimiento complejo, mientras que la replicación in vitro (fuera del organismo) se da de manera mucho más simple, a través de compuestos sintetizados químicamente y cambios de temperatura. La replicación in vivo tiene como características importantes la capacidad de llevar a cabo el proceso en condiciones normales de temperatura, y de amplificar cadenas de ADN muy largas, a diferencia de la replicación in vitro, que se limita en fragmentos cortos de ADN. Tal como se mencionó anteriormente, la replicación in vitro es más simple, dado que al realizarse en un contexto de variaciones de temperaturas (altas y bajas), se evita la participación de muchos componentes (enzimas, por ejemplo) sintetizados por complejas vías metabólicas. Dicha manera de llevar a cabo la replicación de ADN, fuera del organismo y de manera sencilla, es lo que se conoce como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gómez y otros, 2011).

La PCR es una herramienta de la biología molecular muy utilizada, que permite la producción de múltiples copias de una región seleccionada del ADN de manera exponencial. Es una técnica que permite la amplificación in vitro de secuencias específicas de ácidos nucleicos, mediante ciclos repetidos de síntesis dirigidos por cebadores (primers). Las reacciones de PCR se caracterizan por tener una alta especificidad, dada por la hibridación correcta de las secuencias específicas de primers complementarios a la región blanco que va a ser

amplificada. En otras palabras, se permite de manera extraordinaria la localización de la secuencia de un gen entre la abundancia de otras secuencias del ADN. La replicación continua, exponencial y semiconservativa, hace que a partir de una región específica de ADN utilizada como molde, se produzcan cientos de copias de ADN nuevo sintéticamente producido (Gómez y otros, 2011; Izquierdo, 1999; Pinilla, 2019).

Los primers son sintetizados químicamente, de modo que son complementarios a las secuencias de ADN que flanquean la secuencia de interés. Uno de los primers es diseñado para alinearse a la hebra con sentido y el otro a la hebra sin sentido, con sus extremos 3' apuntándose el uno al otro. Los primers son mezclados con una solución tamponada, que contiene el ADN molde, los nucleótidos, el magnesio y una enzima polimerasa termoestable. Los tubos de reacción se colocan en un termociclador, el cual consta de un plato termorregulable y un bloque de calor programable; dicho equipo es de gran relevancia, dado que permite programar los cambios rápidos de temperatura que requieren las reacciones sucesivas de la PCR, y también el número de ciclos deseados (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

A modo de resumen podemos desarrollar la PCR en 3 pasos. El primer paso consiste en el calentamiento de la muestra; el objetivo que tiene esto es alcanzar la fusión inicial del ADN utilizado como molde antes de empezar con la repetición de ciclos. De esta manera, se asegura el desenrollamiento de la doble cadena de ADN y la activación de la ADN polimerasa. En el segundo paso se lleva a cabo la repetición de los ciclos (la cantidad puede variar de acuerdo al objetivo), donde en cada uno de los mismos se da la desnaturalización, la hibridación y la amplificación de la cadena. Una vez terminado el último ciclo, se da el tercer paso, denominado finalización, en donde la muestra permanece a 72°C durante un tiempo aproximado de 10 minutos. El objetivo que tiene este paso es el de asegurar que las millones de copias amplificadas de ADN que se han generado estén completamente amplificadas. Cumplida la finalización, las muestras son enfriadas a 4°C por un tiempo indefinido, para de esta manera ambientarlas en condiciones de almacenamiento ideales; una vez que las muestras son retiradas del equipo, deben ser ubicadas a baja temperatura para favorecer su viabilidad en el tiempo (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

Tal como se mencionó anteriormente, el segundo paso de la PCR se basa en la repetición cíclica de tres reacciones sucesivas: desnaturalización, hibridación y extensión (Gómez y otros, 2011).

En primera instancia se lleva a cabo la desnaturalización del ADN, que básicamente consiste en llevar a la muestra a una temperatura por encima de su punto de fusión (se somete a 94°C aproximadamente, en un tiempo que puede ir de los 30 segundos a los 5 minutos); de esta manera, la cadena doble de ADN enrollada pasa a ser una doble cadena desenrollada. La temperatura de fusión (T_m) de la molécula de ADN está definida como la temperatura a la cual la mitad de las bases nitrogenadas que la constituyen no están apareadas con su complementaria en la cadena opuesta. Cuanto mayor sea la extensión de la cadena de ADN, mayor será la T_m . También existe una relación lineal con respecto a la cantidad de guanina y citosina que componen la cadena de ADN; a mayor citosina y guanina, entonces mayor T_m . Es importante destacar que la temperatura de fusión puede aumentar o disminuir de acuerdo a la composición del medio en el que se encuentra (acidez, contenido de sales, etc.) (Gómez y otros, 2011; Izquierdo, 1999; Pinilla, 2019; Walker y Gingold, 1997).

En segunda instancia, la temperatura se disminuye, aproximadamente entre 40 y 65°C, para que ocurra la hibridación entre los primers y el ADN molde. La hibridación no se puede dar en condiciones de alta temperatura, y es por esta razón que la temperatura desciende. La cuestión radica en que, al descender la temperatura, el ADN intenta enrollarse nuevamente, lo cual lo logra, pero no en todas las bases, ya que el exceso de concentración de los primers adicionado a la reacción de PCR asegura la hibridación de al menos algunos de los mismos, lo cual ocurre durante cada termociclo. Por otro lado, también es importante destacar que la temperatura tampoco debe ser muy baja, ya que en ese caso se perdería especificidad en los primers y estos no se unirían en la región del ADN correcto. Si la temperatura de hibridación es muy alta, entonces se dificulta la unión y por ende se disminuye notablemente la amplificación del producto. Es relevante tener en cuenta que el par de primers que intervenga tenga la misma temperatura de hibridación; en caso de que difiera, entonces se tendría problemas en la amplificación (amplificación asimétrica, por ejemplo). Se estima que 30 segundos a temperatura correcta ya es suficiente para la correcta adhesión del cebador en la cadena de ADN; el tiempo podría ser mayor en caso de que la temperatura de

hibridación sea alta o en caso de que los primers sean muy largos. Por último, es muy importante que los primers sean específicos; está probado probabilísticamente que una alta especificidad se logra con primers compuestos por al menos 17 bases (Gómez y otros, 2011; Izquierdo, 1999; Pinilla, 2019; Walker y Gingold, 1997).

En tercera y última instancia la temperatura vuelve a subir (72°C aproximadamente), para que se lleve a cabo la extensión del ADN mediante la acción de la ADN polimerasa, la cual utiliza a los nucleótidos para la síntesis de la nueva cadena de ADN. La misma comienza a partir de los extremos 3' y se corta cuando la temperatura vuelve a aumentar hasta el punto de fusión por segunda vez. El primer ciclo de la reacción da origen a un producto de longitud indefinida y se conoce como "producto largo". El segundo ciclo comienza nuevamente en el punto de fusión, y es seguido por el alineamiento del cebador. Sin embargo, esta vez los primers no solo hibridan con el ADN original, sino también con las hebras que han sido sintetizadas en el primer ciclo. El segundo ciclo repite el primero con respecto al ADN original, pero la síntesis sobre las nuevas hebras ocurrirá solo hasta el final de la molécula, lo cual se corresponde con el extremo 5' del cebador opuesto. Después de un tercer ciclo de PCR, las síntesis dirigidas por los productos de los primeros dos ciclos terminarán en los extremos definidos de ambos primers y este tipo de producto se acumulará exponencialmente con subsiguientes ciclos. El "producto largo" continuará incrementándose en forma lineal. Por consiguiente, el producto mayoritario de una PCR será de una longitud definida, consistiendo en la secuencia entre los primers y la propia secuencia de los primers (Gómez y otros, 2011; Izquierdo, 1999; Pinilla, 2019; Walker y Gingold, 1997).

Como bien se desarrolló anteriormente, la PCR consiste en la sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización del molde y las hebras conseguidas, la hibridación de los primers y la extensión de la síntesis por acción de la ADN polimerasa. Al poder ser utilizados los productos de un ciclo como moldes del ciclo siguiente, el número de copias de ADN se dobla en cada ciclo. Por lo tanto, 30 ciclos de PCR producen una amplificación de un millón de copias aproximadamente (Gómez y otros, 2011).

En la reacción de PCR no se involucra cualquier tipo de ADN polimerasa, se busca que la misma tenga ciertas características para favorecer al proceso. La

más importante es aquella relacionada a la termorresistencia. La polimerasa que se emplea en la técnica es termorresistente, lo cual resulta fundamental, ya que permite no tener que añadir la enzima manualmente en cada ciclo. *Thermus aquaticus* es el nombre de la bacteria de la cual se aísla la polimerasa denominada Taq; es una de las más utilizadas, y se caracteriza por introducir aproximadamente un nucleótido equivocado cada 1.000 colocados a concentraciones altas de magnesio y uno por cada 1.000.000 colocados en otras condiciones. Existen otras ADN polimerasas, que son aisladas de bacterias distintas como *Thermococcus litoralis* y *Pyrococcus furiosus*. Estas tienden a incorporar errores con frecuencia mucho más baja, y tienen la capacidad de copiar fragmentos de mayor longitud a diferencia de la Taq. Un dato no menor, y a tener en cuenta, es que la cantidad de ciclos que se llevan a cabo en una PCR está dada por la capacidad de sobrevivir que tiene la ADN polimerasa. La Taq, por ejemplo, se caracteriza por tener una vida media aproximada de 30 minutos a 95°C. Cuando se realiza una PCR, cada reacción de desnaturalización no suele superar el minuto en cada ciclo. Por lo tanto, generalmente las reacciones de PCR no superan los 30 ciclos de amplificación. Entre algunas consideraciones a tener presente, se destaca que cuando se busca mayor sensibilidad, se recomienda configurar mayor cantidad de ciclos. Teniendo ciertas precauciones (manejo de temperaturas y tiempos), se pueden llegar a realizar hasta 50 ciclos. De igual modo, en muchos casos es recomendable realizar una segunda reacción de PCR (round 2) y no aumentar la cantidad de ciclos en una única (Izquierdo, 1999; Walker y Gingold, 1997).

La composición y longitud de los primers hacen parte de las características más semejantes de una PCR exitosa y específica. Entre tantas cuestiones que clasifican a la molécula de ADN, como el contenido de guanina y citosina, las estructuras secundarias, la presencia de polipurinas y posibles homologías entre fragmentos, resulta fundamental el diseño correcto de los primers. En la actualidad existen diferentes softwares y programas que facilitar el diseño de primers teniendo en cuenta distintas situaciones que se pueden presentar. De igual modo, siempre existe la capacidad de la síntesis manual de estos componentes, nunca dejando de lado cuestiones básicas como la longitud limitada en cuanto a pares de bases, la existencia o inexistencia (en algunos casos) de regiones complementarias al interior del iniciador, el contenido total de guanina y citosina, la similitud en cuanto a temperatura de hibridación en la pareja, entre otras (Gómez y otros, 2011).

A pesar de que el diseño de los primers debe ser muy riguroso y cumplir con todos los parámetros de calidad antes mencionados, es necesaria la completa optimización del protocolo de PCR y la realización de modificaciones en factores como la concentración de magnesio y la temperatura de hibridación, los cuales constituyen los parámetros más determinantes en las amplificaciones por PCR (Gómez y otros, 2011).

Para maximizar la especificidad de la PCR es de gran importancia evitar que la ADN polimerasa y el resto de los componentes estén a temperatura ambiente antes de iniciar el primer ciclo. La polimerasa podría añadirse una vez que se ha producido la primera desnaturalización del ADN o incluso mejor, para no tener que manipular tubos una vez iniciado el proceso, se pueden añadir anticuerpos anti-Taq, que inhibirán la actividad de la polimerasa hasta que se desnaturalicen por calor (Walker y Gingold, 1997).

A6. Protocolo de amplificación de ADN

1. Preparar el lugar de trabajo y material a utilizar. También se debe programar lo que se realizará.
 - a) Limpiar mesada e instrumentos de uso común con alcohol 70%.
 - b) Rotular la cantidad de eppi a utilizar.
 - c) Retirar del freezer los reactivos que requieren descongelarse para su utilización en la formulación del mix. La Taq es una excepción, la misma debe encontrarse siempre en frío para no perder actividad.
 - d) Determinar las cantidades de reactivos necesarios en función al número de reacciones a llevar a cabo.
 - e) Ordenar gradillas y acomodar de acuerdo a la comodidad propia.
2. Realizar diluciones en caso de que no se hayan realizado con anterioridad. Generalmente, las diluciones se llevan a cabo en tubos eppi de 1,5 mL.
 - a) Dilución de ADN (este se encuentra en elusión con buffer AE)
 - 1:10 → 27 µl de agua ultra pura y 3 µl de ADN
 - 1:20 → 57 µl de agua ultra pura y 3 µl de ADN
 - b) Dilución de primers
 - 10 µM

c) Dilución de dNTP's

- 10 μ M

3. Para la reacción de PCR se utilizan eppi de 0,2 mL. A estos se les coloca 2 μ l de ADN a espera de recibir el mix. Cuando este se agrega, cada eppi deberá encontrarse en baño de hielo, ya que el mix, que cuenta con la Taq, no debe perder frío en ningún momento.

a) La reacción de PCR puede ser de diferentes volúmenes, por ejemplo 25 μ l o 30 μ l.

4. Realizar el mix para PCR

a) Se utiliza generalmente un tubo eppi de 1,5 mL.

b) Es un mix por cada par de primers. El mix realizado tendrá mayor o menor volumen dependiendo la cantidad de reacciones en las que se deberá distribuir posteriormente. También, el volumen del mix dependerá del volumen seleccionado para la reacción de PCR (25 μ l, 30 μ l, entre otro.)

c) Ordenados de acuerdo a su agregado para la formulación, los componentes del mix son:

- Agua
- Buffer
- Mg
- dNTP's
- Primer forward
- Primer reverse
- Taq polimerasa

d) Todos los componentes, excepto la Taq, deben ser homogenizados a través de vortex. Posterior a cada vortex se realiza un spin.

e) Antes de agregar la Taq al mix, se realiza el ultimo vortex y spin de los componentes ya involucrados en el eppi.

f) A partir de la presencia de Taq polimerasa se recomienda la utilización de baño de hielo hasta el fin del proceso. Cada uno de los eppi que presenten Taq deben encontrarse en frío, para favorecer la eficiencia de acción de la misma.

g) Terminada la síntesis del mix se coloca en frío a la espera de su distribución.

5. Distribuir el mix en cada eppi de reacción (0,2 mL).
 - a) La cantidad a agregar a cada eppi dependerá de la cantidad de reactivos agregados en la formulación del mix.
 - En caso de que el volumen de reacción de PCR sea de 30 µl, entonces se agregará una cantidad de 28 µl de mix
 - En caso de que el volumen de reacción de PCR sea de 25 µl, entonces se agregará una cantidad de 23 µl de mix
6. Realizar spin rápido, configurar termociclador e iniciar la reacción de PCR.
 - a) En caso de que el equipo esté conectado a una UPS, entonces recordar prenderla.
 - b) Se debe seleccionar un programa acorde al objetivo de la reacción.
7. Segundo Round. No siempre se lleva a cabo.
 - a) Se realiza una dilución 1:100 del eppi proveniente de la PCR común (primer round).
 - Se utiliza eppi de 0,2 mL, al cual se le agrega 198 µl de agua ultra pura y 2 µl de ADN proveniente de tubo amplificado en round 1.
 - b) De la dilución 1:100 se utilizan solo 2 µl para la reacción de PCR. Se debe realizar todos los pasos de manera idéntica a lo explicado en los pasos 1 a 6.

A7. Preparación de dNTP's de uso en PCR

Son 4 los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's): dATP, dTTP, dGTP y dCTP. Cada uno de estos viene en una concentración de 100 µM. El objetivo es juntar a todos y lograr una concentración de 10 µM. Para esto, a cada uno de los dNTP se los diluye a una concentración de 20 µM a través de la mezcla de 10 µl del dNTP y 40 µl de agua ultra pura. Si se quiere preparar un volumen final de 40 µl de dNTP's que tenga una concentración de 10 µM se necesita agregar de cada uno de los dNTP 20 µM un volumen de 20 µl. esto se fundamenta a partir de la siguiente fórmula: $\text{concentración final (CF)} \times \text{volumen final (VF)} / \text{concentración inicial (CI)} = \text{volumen inicial (VI)} \rightarrow 10 \mu\text{M} \times 40 \mu\text{l} / 20 \mu\text{M} = 20 \mu\text{l}$.

A8. Preparación de primers de uso en PCR

El fabricante envía cada primer deshidratado, generalmente con un contenido de 25 nanomol (nmol), lo cual equivale a 25.000 picomol (pmol). El estado del primer debe ser líquido para poder ser utilizado. Por lo tanto, se lo debe mezclar con agua ultra pura. En primera instancia lo que se hace es llevar el tubo que provee el fabricante a la siguiente concentración: 100 pmol/ul. Tener en cuenta que 100 pmol/ul esto es equivalente a 100 μ M.

$$100 \text{ pmol} \rightarrow 1 \mu\text{l} = 100 \mu\text{M}$$

$$25.000 \text{ pmol} \rightarrow 250 \mu\text{l} = 100 \mu\text{M}$$

Las soluciones de uso para PCR, por ejemplo, van de una concentración de 5 a 20 μ M (micromolar). Para la preparación de estas se lleva a cabo una dilución de la solución stock a partir de la utilización de agua ultra pura. Por lo tanto, si lo que se quiere es obtener una dilución 10 μ M apta para la utilización de PCR, lo que se hace es combinar 90 μ l de agua ultra pura con 10 μ l de la solución stock.

A9. Principios y fundamentos para visualizar productos de amplificación

La electroforesis es una técnica que sirve para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. Se tiende a utilizar para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas, en base a su tamaño y carga eléctrica. Hoy en día, el estudio de los ácidos nucleicos y las proteínas es fundamental, y se lo conoce como genómica o proteómica, respectivamente (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

La electroforesis de los ácidos nucleicos es el método más utilizado para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN y ARN. A diferencia de las proteínas, las cuales pueden tener una carga neta positiva o negativa, los ácidos nucleicos están cargados de forma negativa, debido a su esqueleto de grupos fosfato. Por lo tanto, en una electroforesis, los ácidos nucleicos migrarán hacia el polo positivo, es decir, hacia el ánodo. Al desplazarse a través de una matriz porosa, como por ejemplo un gel de agarosa, las moléculas de ADN son sometidas a dos fuerzas de acción opuestas que determinan la velocidad de la

partícula en cuestión. Por un lado, la fuerza eléctrica, que la atrae al electrodo, cuya intensidad es directamente proporcional a la carga, y de acuerdo a la segunda Ley de Newton, le impone una aceleración directamente proporcional al cociente carga/masa (q/m). Por otro lado, la fuerza de rozamiento, que se opone a la migración con una intensidad que depende del tamaño y la forma de la partícula y de las características del medio (viscosidad, estructura, etc.). En resumen, cuanto más pequeña sea la molécula y tenga una forma más flexible o capaz de pasar por los poros del gel, más rápido migrará. Por el contrario, cuanto menos carga tenga y más grande sea, más le costará pasar por entre los poros del gel y consecuentemente migrará más lento (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

Los ácidos nucleicos tienen un fosfato cargado negativamente por cada nucleótido. Como el peso molecular de los cuatro nucleótidos es similar, la relación carga masa (q/m) es independiente de la secuencia y el tamaño de la molécula. Por lo tanto, la aceleración impuesta por la fuerza eléctrica es igual para cualquier molécula de ácido nucleico. La única diferencia en velocidad de migración está dada por diferencias en la fuerza de rozamiento, o sea, por variedad en la forma y el tamaño de las moléculas. En el caso del ADN de doble cadena (suponiendo que todas las moléculas son fragmentos lineales), la forma es la misma para cualquier molécula. Por lo tanto, las distintas moléculas tendrán una velocidad que solo dependerá de su tamaño, es decir, de su longitud en pares de bases (Gómez y otros, 2011).

Para lograr una separación de ADN de doble cadena de manera eficiente se requiere utilizar un medio específico, ya que si se realizaría con un medio acuoso no se tendría éxito, debido a que el rozamiento impuesto por la acuosidad sería tan pequeño que todas las moléculas migrarían juntas, además, durante la electroforesis, las moléculas se separarían una de otras por difusión impidiendo el análisis. Por consiguiente, lo que se utiliza es un medio soporte que aumenta significativamente la fricción recibida por las macromoléculas y reduce la difusión a un mínimo. Este medio suele ser una red molecular de algún polímero orgánico, conocido como gel, por su consistencia gelatinosa. Los más utilizados son de agarosa (derivado del agar agar) y poliacrilamida (red molecular estabilizada por uniones covalentes). La agarosa se caracteriza por ser un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extraen de las algas de los géneros *Gracillaria* y

Gellidium; cuando se disuelve la agarosa forma una red estabilizada por interacciones no covalentes. Las mezclas de ADN de distintos tamaños se hacen migrar (correr) a través del gel durante un cierto tiempo. Como producto, se obtiene una separación en la que la distancia migrada por una molécula dada es inversamente proporcional a su longitud en pares de bases. Por ejemplo, el tamaño de una muestra incógnita puede estimarse corriendo en paralelo muestras de longitud parecida. Cuando se hace un análisis electroforético de muestras de ácidos nucleicos que no poseen todas las mismas formas es necesario, para determinar el peso molecular, homogenizar la estructura. Para esto, se utilizan agentes desnaturalizantes fuertes que destruyen la estructura secundaria (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

Aunque la electroforesis en gel de agarosa no es una técnica difícil de desarrollar, es importante tener en claro que se puede ver influenciada por varios factores, donde encontramos: concentración de agarosa (dependerá del tamaño de los fragmentos de ADN), voltaje aplicado (se podrá lograr una mayor o menor resolución en la corrida), tampones utilizados (es posible que haya un ligero efecto en la movilidad de las moléculas de ADN dependiendo la capacidad amortiguadora del buffer utilizado) y conformación del ADN (el ADN circular cerrado, el ADN lineal y el ADN superenrollado presentan diferencias en la movilidad). Finalizada la electroforesis, los fragmentos de ADN pueden visualizarse al utilizar compuestos fluorescentes o pueden marcarse radiactivamente (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

A10. Pasos a seguir para la visualización de ADN

1. Preparar lugar de trabajo y corroborar presencia de instrumentos y componentes necesarios para el procedimiento. Se debe ordenar gradilla con los eppi provenientes de la PCR acorde al entendimiento del investigador.
2. Preparar gel de agarosa
 - a) Puede presentar distintas composiciones:
 - Gel de agarosa 0,8%
 - Gel de agarosa 1%
 - Gel de agarosa 1,2%

- b) Para la formulación de un gel de agarosa 1%:
 - Agregar 1 gramo de agarosa en un matraz
 - Agregar 100 ml de TBE 0,5X
 - Calentar la solución en microondas hasta observar dilución completa de la agarosa en el líquido.
 - c) En caso de que haya stock de agarosa, entonces utilizar de la misma. Solo se debe calentar hasta observar burbujas.
3. Preparar cama de siembra
- a) Existen distintos tipos de cama de siembra que se ajustan a diferentes cubas electroforéticas
 - b) Se colocan los peines en la cama de siembra con el fin de generar pocillos. Se puede colocar uno o dos peines por cada cama dependiendo la cantidad de reacciones con las que se cuentan.
 - Peines para 15 pocillos
 - Peines para 8 pocillos
 - c) Asegurar la nivelación correcta de la cama en la superficie apoyada.
 - d) Asegurar la correcta posición de los peines, para de esta manera obtener pocillos uniformes y bien formados.
 - e) Agregar gel agarosa previa preparación o calentamiento. La temperatura del líquido no debe ser muy alta dado que puede dañar el material de laboratorio.
 - Cada gel se confecciona generalmente a partir de 30 mL de agarosa 1%. Esto se agrega a la cama con ayuda de un tubo falcon.
 - f) Esperar 30 minutos aproximadamente hasta solidificación del gel.
4. Preparar cuba electroforética
- a) En caso de presentar suciedad debe limpiarse
 - A través de esponja sin detergente y agua destilada
 - No deben ser presionado en ningún momento los hilos de platino que se presentan en los bordes extremos.
 - b) En caso de no presentar TBE 0,5X, entonces debe ser agregado. La cantidad de este debe ser tal que sobrepase el gel de agarosa que se va a colocar
 - c) El TBE se reutiliza para varias corridas. Cuando el mismo empieza a presentar suciedad se recomienda descartarlo y colocar nuevo.

5. Sembrar ADN y llevar a cabo corrida electroforética

- a) Una vez que se tiene la cuba electroforética preparada y el gel de agarosa solidificado, se procede a realizar este paso.
- b) Se coloca la cama de siembra sobre la cuba de electroforesis
- c) Se agrega TBE 0,5X hasta sumergir completamente el gel de agarosa.
- d) La siembra se realiza a partir de 3 μ l de muestra. En caso de presentar un buffer sin colorante, se debe agregar uno extra, mezclando los 3 μ l de la muestra con otros 3 μ l de colorante.
 - La expulsión de la muestra en el pocillo debe ser con máxima suavidad
 - Se debe realizar con pulso dado que el tips no debe tocar las paredes del gel.
 - El tiempo de siembra debe ser lo más rápido posible, dado que la muestra puede empezar a dispersarse por el gel.
- e) Además de las muestras, se recomienda sembrar 3 μ l de marcador de peso molecular (MPM).
- f) Finalizada la siembra, colocar la tapa de la cuba (asegurar la correcta conexión de los electrodos), prender el equipo, configurar tiempo y potencia y comenzar la corrida.
 - Generalmente se suele utilizar 85 voltios durante 25 minutos.

6. Preparar recipiente para llevar a cabo la tinción postcorrida (se debe usar guantes)

- a) Puede o no estar preparado. Para su manipulación es obligatorio el uso de guantes y de instrumentos limitados a su espacio.
- b) El descarte va en bidón especificado
- c) Se agrega en un recipiente (taper) 200 mL de TBE 0,5X y 10 μ l de SYBR
- d) El contenido del taper nunca debe estar en contacto con la luz
 - Es importante apagar evitar la entrada de luz cuando se esté manipulando con el líquido de tinción.
- e) Cada tinción realizada debe ser registrada, con el fin de tener una idea del estado del SYBR y cuando es necesario actualizarlo.

7. Realizar la tinción postcorrida (se debe usar guantes)
 - a) Terminada la corrida electroforética se coloca el gel dentro del taper con TBE 0,5X y SYBR. Se debe evitar la entrada de luz en la sala durante este paso.
 - b) Prender plataforma de agitación
 - c) Esperar aproximadamente 30 minutos para favorecer la tinción
8. Observación, fotografía del gel y descarte del mismo
 - a) Se retira el gel del taper y se lo coloca en un transiluminador UV o en un fotodocumentador.

A11. Preparación de buffer TBE

La siguiente tabla proporciona las cantidades necesarias de los componentes (tris, ácido bórico, EDTA) y los volúmenes finales de agua destilada requeridos para preparar la solución buffer TBE 10X en diferentes volúmenes (1 L y 10 L).

TBE (10X)	Concentración (1X)	Cantidad para 1 L	Cantidad para 10 L
Tris	89 mM	108 g	1,08 kg
Ácido bórico	89 mM	55 g	550 g
0,5M EDTA, pH8	2 mM	40 mL	400 mL
Agua destilada		Cbp 1 L	Cbp 10L

La siguiente tabla proporciona las cantidades necesarias de los componentes (tris, ácido bórico, EDTA) y los volúmenes finales de agua ultra pura requeridos para preparar la solución buffer TBE 5X en diferentes volúmenes (1 L y 10 L).

TBE (5X)	Concentración (1X)	Cantidad para 1 L	Cantidad para 10 L
Tris	89 mM	54 g	540 kg
Ácido bórico	89 mM	27,5 g	275 g
0,5M EDTA, pH8	2 mM	20 mL	200 mL
Agua destilada		Cbp 1 L	Cbp 10 L

Para la corrida electroforética se utiliza TBE 0,5X. Por lo tanto, se coloca en un frasco de preparación 100 mL de TBE 5X y se enrasa en 1000 mL con agua destilada (se agrega 900 mL de agua destilada).

A12. Protocolo de purificación de ADN

Antes de utilizar la solución B, recuerde agregar etanol 96 – 100% (no incluido) según la especificación de la botella.

1. Obtención de la banda del gel. Cortar el taco del gel con ayuda de un bisturí o una cuchilla estéril, e introducirlo en un tubo de 1,5 ml. Minimizar al máximo el tamaño del taco de agarosa. Determinar el peso del taco obtenido.
 - La cuba de electroforesis a utilizar debe estar limpia y con TBE 0,5X sin uso.
 - Se recomienda la utilización de peines grandes.
 - El gel de agarosa se confecciona a partir de 50 mL de agarosa 1% y 1 µl de SYBR
 - La siembra en los pocillos es de la totalidad del tubo de reacción de PCR, es decir, 25 µl, 30 µl, etc.
 - La configuración de la cuba electroforética debe ser de 80 voltios durante 30 minutos. Se busca que la corrida sea prolija.
 - Para determinar el peso del taco, se debe restar el peso del tubo eppi con el taco y el peso del tubo eppi vacío.
2. Disolución del gel. Por cada 100 mg de gel de agarosa obtenido agregar 300 microlitros de solución A. Para geles de porcentaje de agarosa mayor a 2%, duplicar el volumen de solución A. incubar a 55°C hasta que no visualice restos del gel (5 a 10 minutos). Utilizar vortex cada 2-3 minutos para optimizar la disolución completa del gel. En caso de cambio de color de la solución A, de amarillo a anaranjado-rosado, agregar 5 µl de AcNa 3M.
3. Unión del ADN. Colocar la columna en tubo colector de 2 ml (esto no hace falta hacerlo en algunos casos porque ya viene colocada directamente). Cargar la columna con la solución obtenida en el paso 2 (esto se realiza con micropipeta de 1000 µl; lo máximo que se puede colocar son 700 µl). Centrifugar 1 minuto a 11000 xg (11,0 rcf) y desechar lo filtrado. Lo que se descarta va en un vaso de precipitado. Colocar la columna nuevamente en su tubo colector. En algunos casos será necesario realizar este paso 2 veces para cargar el volumen obtenido en el paso 2 (esto sucede cuando el gel pesa mucho o cuando se coloca más de un gel en el mismo eppi).

4. Lavado. Agregar 750 μ l de solución B a la columna. Centrifugar 1 minuto a 11000 xg (11,0 rcf) y descartar el filtrado. Colocar la columna nuevamente en el tubo colector.
5. Secado de la membrana. Para eliminar los restos de solución B centrifugar a la columna 2 minutos a 11000 xg (11,0 rcf). Asegurarse que no queden restos de solución. Descartar tubo colector.
6. Elución. Colocar la columna en un tubo de 1,5 mL estéril (acá se descarta el tubo de restos). Agregar 10 a 50 μ l de solución C directamente sobre la membrana de la columna (generalmente se agrega 35 μ l); la cantidad de solución C es mayor o menor dependiendo la cantidad de ADN que se tiene, se pone menos solución C cuando se tiene poco ADN, de esta manera el gel va a quedar con ADN más puro. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 1,5 minuto a 11000 xg (11,0 rcf). Descartar columna. El eppi resultante (eluato) contiene el ADN purificado.

El rendimiento de fragmentos de ADN mayor a 5 kpb aumenta utilizando la solución C previamente calentada a 65°C.

A tener en cuenta: el descarte va a bidón de campana.

A13. Principios y fundamentos para el clonado de genes

La clonación es un proceso en donde se obtienen copias genéticamente idénticas de un ente biológico. El material copiado, que tiene la misma composición genética que el original, se conoce como clon. Se puede dar la clonación de moléculas, células, tejidos, órganos u organismos pluricelulares completos. La clonación molecular consiste en un proceso que logra como resultado varias copias de una determinada secuencia de ADN. Esta técnica se puede utilizar para amplificar fragmentos de ADN que contienen genes completos o para amplificar cualquier secuencia de ADN. De acuerdo al proceso experimental, la clonación molecular puede dividirse en dos tipos: clonación celular (utilizando células) y clonación acelular, también conocida como amplificación del ADN (Gómez y otros, 2011).

La clonación celular hace referencia a la amplificación de moléculas de ácidos nucleicos mediante la presencia de vectores en células anfitrionas en cultivo. En esta técnica se emplea la tecnología del ADN recombinante. En

resumen, este tipo de clonación se caracteriza por, en un primer momento aislar la secuencia de interés, luego insertarla en un vector y finalmente obtener múltiples copias de la misma, a través de sucesivas divisiones de la célula. Para este procedimiento se pueden utilizar tanto células procariotas como eucariotas. Por otro lado, la clonación acelular se caracteriza por ser una técnica de clonación en donde no intervienen células. Acá se da la amplificación de un gen o fragmento de ADN de manera *in vitro*; este tipo de clonación se realiza mediante la técnica de PCR (Gómez y otros, 2011; Izquierdo, 1999).

El clonaje y la reacción en cadena de la polimerasa son dos métodos distintos de amplificación de secuencias. A simple vista, pareciera que la clonación celular compite con la clonación acelular; la realidad marca que, en la actualidad, ambas técnicas se complementan. Con gran frecuencia, para fines diversos, se pasa de la PCR al clonaje y viceversa. Se podría clonar un producto amplificado para secuenciarlo, o bien, amplificar un gen clonado para cambiarle las dianas de restricción de los extremos y poderlo clonar nuevamente. Para casos en donde el ADN extraído no se obtiene con facilidad, y se lo caracteriza por ser difícil de amplificar por PCR, la clonación toma gran relevancia. El clonaje de los productos amplificados asegura la perpetuación indefinida de los mismos mediante la replicación en un organismo vivo (Gómez y otros, 2011).

La clonación de cualquier secuencia de ADN incluye cuatro pasos bien marcados. En primer lugar, se da la fragmentación, la cual se obtiene frecuentemente a partir de la PCR, pero también puede realizarse por medio de la digestión con enzimas de restricción de un ADN total y posterior detección a través de electroforesis en gel de agarosa. La PCR permite la producción de múltiples copias de una región seleccionada del ADN; es fundamental que las secuencias amplificadas se encuentren en máxima pureza y calidad, ya que caso contrario la eficiencia del método de clonación va a disminuir. Los pasos seguidos de la fragmentación se denominan: ligación, transformación y selección. (Gómez y otros, 2011).

El principio del clonado molecular consiste en insertar un segmento de ADN exógeno en una molécula pequeña capaz de replicarse. A este tipo de molécula de ADN se la denomina vector de clonado, y los más utilizados suelen ser los plásmidos. Los vectores de clonado deben tener ciertas características: un origen de replicación, un marcador de selección y un sitio de múltiple clonado. Además, pueden o no tener un marcador de inserción. En teoría, el cromosoma

podría ser extirpado de una célula bacteriana con el objetivo de insertarle ADN exógeno y devolverlo a una célula viva. En la práctica es imposible, ya que el cromosoma es muy grande y nunca podría ser aislado en forma intacta. Para llevar a cabo el proceso se requiere de una molécula mucho más pequeña que, no obstante, posea capacidad de replicación autónoma (es decir, independiente del cromosoma). Estas moléculas se denominan vectores, y se definen como vehículos que transportan secuencias o genes hacia una célula receptora y responsable de su replicación. Existen principalmente dos clases de moléculas de este tipo: plásmidos y fagos (virus bacterianos). También podemos encontrar, con menor frecuencia, la utilización de cromosomas artificiales y quimeras (combinación de moléculas de diferentes orígenes). Los plásmidos se caracterizan por ser moléculas de ADN extracromosómico que se encuentran en muchas especies bacterianas. Son moléculas cerradas y circulares al igual que los cromosomas, pero la diferencia radica en su menor tamaño. También difieren en que no son necesarios para la viabilidad general de la célula, aunque pueden transportar algunos genes, como los que confieren resistencia a antibióticos, que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales. Los plásmidos naturales disponibles no son lo suficientemente eficientes para utilizarlos en el proceso de clonación; la mayoría de los que poseen marcadores útiles son excesivamente grandes y contienen múltiples sitios de restricción. En consecuencia, una primera tarea de la ingeniería genética consiste en construir plásmidos artificiales, combinando en una molécula pequeña los rasgos idóneos procedentes de plásmidos naturales. La propiedad de “replicación relajada” es lo que destaca a algunas clases de plásmidos. Este origen de replicación incorporado hace referencia a que la replicación no se encuentra bajo control del cromosoma principal, y por ello en cada célula están presentes múltiples copias del plásmido. Los plásmidos multicopiados pueden ser convenientemente aislados y purificados, lo cual resulta esencial para un vector en clonación. Poseen la ventaja adicional de proporcionar a cada célula un gran número de copias de la secuencia clonada. Entre las características más importantes que debe tener un plásmido, que resulte apropiado para el proceso de clonación encontramos: tamaño pequeño para maximizar la capacidad de aceptar insertos, carecer movilidad, llevar marcadores que permiten la selección de los transformantes y llevar adaptadores de policlonaje, los cuales son fundamentales para definir la

orientación del inserto (Gómez y otros, 2011; Smith y Wood, 1998; Thieman y Palladino, 2010).

Los marcadores de selección presentes en los vectores de clonado más utilizados son los genes de resistencia a antibióticos, como la ampicilina y la kanamicina. Uno muy utilizado es el gen *amp*, que codifica para una beta lactamasa capaz de degradar la ampicilina. Como regla, las bacterias transformadas se cultivan en presencia del antibiótico para poder seleccionar las bacterias que incorporan el plásmido, que serán las que tendrán la capacidad de crecer. Además, el medio selectivo evita que la bacteria pierda el plásmido que se la ha introducido. Por otro lado, la presencia de marcadores de inserción en los vectores de clonado no es imprescindible, pero ayuda en la identificación de las bacterias de interés, por lo que es muy apreciada por los investigadores. Un ejemplo de marcador de inserción es el gen *lacZ* de *E. coli*, que codifica la enzima beta galactosidasa. Esta enzima es capaz de transformar el sustrato sintético X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido) en un producto de color azul. El gen *lacZ* se encuentra interrumpido por un policonector o sitio de múltiple clonado (SMC), donde se ubican los sitios de restricción para diferentes enzimas. La presencia del SMC no modifica el marco de lectura del ARN mensajero que es transcrito, por lo que la enzima es sintetizada correctamente. En este lugar se cortará el plásmido para luego ligarlo con un segmento de ADN de interés. La inserción produce generalmente un cambio en el marco de lectura, como consecuencia del cual se genera una enzima defectuosa o trunca. A este tipo de marcador se le llama marcador de inserción porque permite diferenciar las bacterias que incorporaron el vector con inserto de las que incorporaron el vector cerrado (Gómez y otros, 2011; Smith y Wood, 1998; Thieman y Palladino, 2010).

Los plásmidos son excelentes vectores de clonado. Pueden ser “cortados” con una o dos enzimas de restricción, y se les puede incorporar un fragmento de ADN que ha sido previamente cortado a través de enzimas de restricción u obtenido por el proceso de PCR. También puede suceder que los plásmidos vengán abiertos, y de esta manera se simplifique aún más la ligación, ya que con una enzima ligasa implementada bastara para llevar a cabo la unión del ADN en el plásmido y completar el proceso. A todos los plásmidos que presenten ADN inserto en su interior se los denomina plásmidos recombinantes (Izquierdo, 1999; Walker y Gingold, 1997).

Las enzimas son la base para muchas técnicas de biología molecular; se tienden a utilizar para sintetizar, degradar, ligar o eliminar partes de ácidos nucleicos en forma controlada. Podemos destacar dos grandes grupos de enzimas. Por un lado, las exonucleasas, que son obtenidas generalmente de bacterias y pueden reconocer secuencias específicas de ADN de cualquier tipo de organismo. Se caracterizan por intervenir en posiciones terminales los enlaces fosfodiéster de la cadena polinucleótida de los ácidos nucleicos. Por otro lado, encontramos las endonucleasas, también conocidas como nucleasas de restricción. Estas son obtenidas generalmente de bacterias, y pueden reconocer secuencias específicas de ADN de cualquier tipo de organismo. A diferencia de las exonucleasas, se caracterizan por intervenir en posiciones internas los enlaces fosfodiéster de la cadena polinucleótida de los ácidos nucleicos. La importancia de las enzimas de restricción radica en su gran especificidad de reconocimiento de una secuencia corta de ADN de doble cadena y la posterior acción en el enlace fosfodiéster de ambas hebras. Si se quiere clonar un fragmento de ADN obtenido a partir de ADN total, este debe ser cortado con las mismas enzimas de restricción con las que se va a cortar el vector. En caso de que se busque clonar una secuencia o gen específico obtenido previamente por PCR, lo ideal es trabajar con plásmidos que vengan abiertos, por lo que no se requerirán enzimas de corte. Los plásmidos abiertos son claves, debido a la simplicidad que ofrecen en el proceso y a la alta eficiencia de ligación exitosa que presentan. Frente a esto, la gran consideración a tener en cuenta es que la secuencia de ADN amplificada debe poseer los extremos compatibles con los sitios abiertos del vector, lo cual es posible siempre y cuando los primers vengan con adaptadores específicos incorporados en su secuencia. Para culminar con el proceso de ligación, lo único que debe intervenir, además del ADN y el plásmido correspondiente, es la enzima bacteriófaga T4 ligasa, la cual cataliza la unión del plásmido con el ADN. En resumen, el plásmido abierto recibe el ADN, el cual se inserta para que posteriormente intervenga la enzima ligasa T4, que sellará la unión y evitara una posible separación entre el plásmido y el ADN (Gómez y otros, 2011; Smith y Wood, 1998; Thieman y Palladino, 2010).

Para continuar con la técnica de clonado, una vez que el plásmido cuenta con el ADN de interés (plásmido recombinante), este debe penetrar el interior de la bacteria (unicelular), quien será la responsable de llevar a cabo la replicación a través de su maquinaria. El proceso en el que un vector es introducido en una

célula anfitriona bacteriana se conoce como transformación. La membrana plasmática de una célula se caracteriza principalmente por presentar permeabilidad selectiva. Esto permite el ingreso o no de moléculas dependiendo la necesidad que se presenta. Para facilitar el ingreso del plásmido al interior de la célula se debe llevar a cabo una alteración transitoria de la permeabilidad celular. Esto se puede obtener a partir de diversos métodos, que pueden ser activos o pasivos, siendo más importantes estos últimos, debido a su mayor eficacia. Cuando a una bacteria se le altera la membrana plasmática, la misma pasa a denominarse competente y se la caracteriza por estar preparada para ser transformada. La transformación puede lograrse mediante un proceso físico-químico denominado choque térmico (se involucran bacterias termocompetentes) o un proceso netamente físico denominado electroporación (se incorporan bacterias electrocompetentes). Para que el plásmido ingrese en la bacteria termocompetente se requiere la incubación de las mismas en presencia de medio de cultivo a 0°C, seguido de un cambio brusco de temperatura entre 37°C y 43°C. Por otro lado, cuando la competencia se induce por medio de la aplicación de un pulso eléctrico, el cual es muy breve e intenso, se lleva a cabo la electroporación. (Gómez y otros, 2011; Smith y Wood, 1998; Thieman y Palladino, 2010).

A través de los métodos antes mencionados se consigue que el plásmido atraviese la membrana plasmática, se involucre en el citoplasma de la bacteria, se replique y genere, en caso de que presente el ADN inserto, numerosos fragmentos del mismo. Es muy importante que el plásmido tenga un tamaño pequeño, ya que en caso contrario se dificultaría en gran medida su pasaje de un medio a otro a pesar de la intervención del método correspondiente. Existen otras formas en donde el plásmido puede migrar hacia el interior de la bacteria, como a través de liposomas y bacteriófagos. También existen ciertos agregados y agentes químicos que se pueden emplear y favorecer la introducción, logrando una mayor eficiencia en la clonación (Gómez y otros, 2011).

Una vez que el ADN de interés unido al vector es introducido en la célula anfitriona adecuada, la misma amplifica los fragmentos recombinantes, es decir, el vector más el ADN de interés. Para esto, es fundamental propiciar de un ambiente correcto a todas aquellas células transformadas, haciendo hincapié en medio de cultivo adecuado y temperatura óptima. Cuando se lleva a cabo la transformación no todas las bacterias logran ser transformadas; es importante que

las no transformadas sean eliminadas, ya que ejercerían competencia y perjudicarían a las que sí lo fueron. Por otro lado, las bacterias transformadas pueden o no tener inserto en el plásmido el ADN de interés. Tal como se desarrolló con anterioridad, son los plásmidos específicos que se utilizan los que permiten la detección de las células que han incorporado el vector con el inserto. Esto lo logran a través de marcadores de selección y de inserción involucrados en su secuencia. La selección, básicamente consiste en la identificación de las colonias de células que han sido exitosamente transformadas con el vector que contiene el gen deseado (Gómez y otros, 2011; Izquierdo, 1999; Pinilla, 2019).

A14. Protocolo de ligación

1. Preparar lugar de trabajo, instrumentos y componentes a utilizar. Se deben rotular correctamente los tubos que se usarán (indicar que son ligaciones). Es primordial contar con baño de hielo, ya que la mayoría de los reactivos con los que se trabaja necesitan frío.
2. Separar las muestras purificadas y se descongelan.
3. Realizar un mix, el cual cuenta con buffer, enzima T4 ligasa y plásmido (vector P – Gem). Este se formula en un eppi de 1,5 mL. Dependiendo la cantidad de muestras tendrá mayor o menor volumen final.
 - Buffer: es lo primero en agregarse. Se coloca 2,5 µl por muestra. Antes del agregado del buffer realizarle vortex y spin.
 - Enzima T4: es lo segundo en agregarse. Se coloca 0,5 µl por muestra. La enzima es crucial, siempre debe encontrarse en frío, debe ser tratada de igual modo que la Taq. No se le hace vortex y se le hace un spin en caso de ser necesario.
 - P – Gem (vector): es lo tercero en agregarse. Es el plásmido, lo más valioso. Se coloca 0,5 µl por muestra. Debe ser tratado de la misma manera que la Taq. Tiene la particularidad de que se congela. Por lo tanto, antes de utilizarse, se debe corroborar que se encuentre descongelado.
4. El volumen del mix para cada reacción de ligación es de 3,5 µl. Esto se distribuye en tubos eppi de 0,2 mL en una cantidad que va a variar de acuerdo a la cantidad de ligaciones que se llevaran a cabo.

5. Agregar el ADN correspondiente a cada eppi que presenta el mix (es decir, 3,5 µl). Se coloca en cada uno 5 µl de ADN. En total, la reacción de ligación se desencadena en 8,5 µl.
6. Una vez realizados los pasos anteriores se debe llevar a cabo la reacción de ligación, la cual necesita tiempo. Se pueden tomar los siguientes caminos:
 - 1 hora a temperatura ambiente: menos efectivo
 - Over night (ON) en heladera: más efectivo

A15. Obtención de bacterias electrocompetentes

Las bacterias electrocompetentes se pueden obtener a partir de:

1. Bacterias competentes (con el objetivo de multiplicarlas)
 - a) Alicuotar 3 mL de LB estéril (tenerlo autoclavado) bajo halo de calor en dos tubos de ensayo; uno que va a presentar las bacterias competentes a multiplicar y otro será control. Al terminar flamear los picos de cada tubo.
 - b) Tomar bacterias competentes guardadas a -80°C. Con punta de tips P200 estéril de caja recién abierta tomar un pedazo considerable del medio de células congelado y tirarlo adentro del tubo de bacterias. En el tubo control solo tirar un tips P200 estéril.
 - c) Realizado lo anterior, flamear pico de cada tubo, colocarle tapa y ubicarlo en estufa-agitador a 37°C y 150 rpm.
 - d) Dejar over night (ON)
 - e) Continuo en punto 3.
2. Cepa de bacterias no competentes (DH5alfa o XL1-blue o MB7070 u otra)
 - a) Largar durante toda la noche (ON) 100 mL de LB medio de cultivo con el inóculo de la bacteria a crecer.
 - b) Continúo en punto 3.
3. Realizar una dilución 1/100 de bacterias en medio de cultivo; esto lo realizo en tubo de ensayo. La cantidad de bacterias y medio de cultivo a agregar puede variar de acuerdo a lo que se busca. Por ejemplo, se podría agregar 5000 µl de LB medio de cultivo y 50 µl de bacterias. En caso de tener más o menos bacterias agrego más o menos LB, respectivamente.

4. Coloco el tubo de ensayo en estufa-agitador a 37°C y 150 rpm.
5. Cada 20 minutos retirar el tubo de ensayo y medir la densidad óptica que tienen las bacterias utilizadas. Para esto se utiliza un biofotómetro.
 - a) Para llevar a cabo la medición de la densidad óptica se debe utilizar cubas específicas limpias en cada ocasión. Prepararlas con anticipación.
 - b) El biofotómetro debe ser calibrado previamente a partir de LB medio de cultivo (100 µl).
 - c) Realizada la calibración ya se pueden ir colocando las bacterias (100 µl) cada 20 minutos para la medición de la densidad óptica.
6. El objetivo es lograr una densidad óptica óptima de 0,6 en menos de 1 hora 30 minutos.
7. Una vez alcanzada la densidad óptica óptima proceder a enfriar las bacterias. Colocarlas en freezer durante 20 minutos.
8. A partir de este paso es crucial siempre trabajar con baño de hielo (lo suficientemente grande como para que entren tubos de ensayo). Tomar la cantidad de eppi de 1,5 mL necesarios para cada muestra. A estos se los enfría previamente en baño de hielo y se les coloca 1,4 mL de bacterias (casi lleno); esto se realiza a ojo.
9. A los eppi ya con las bacterias colocarlos en la centrífuga refrigerada. Configurar a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
10. Una vez que finaliza la centrífuga, retiro los eppi y veo rápidamente si las bacterias se encuentran en el fondo. De ser así significa que estoy trabajando bien. Se visualiza un pellet de bacterias.
11. Volcar el LB medio de cultivo. Se deja únicamente las bacterias (el pellet). Para hacer esto descartar el cultivo volcando el eppi en un frasco específico de desechos de clonado, el cual previamente a descartar debe tener una cantidad de lavandina en la base. Es importante retirar la mayor cantidad de medio de cultivo posible, por lo tanto, se recomienda la utilización de micropipeta como paso final. Es preferible perder algo de bacterias y no dejar algo de medio de cultivo.
12. Comienzan los lavados: son 4 en total. En cada uno de los lavados se repiten los mismos pasos

- a) Colocar sobre el pellet de bacterias (resuspendiéndolo) 1 mL de agua ultra pura o mili Q. Debo asegurarme que el agua esté suficientemente fría.
 - b) Llevar el eppi a la centrifuga refrigerada nuevamente. Configurar a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
 - c) Finalizada la centrifugada colocar el eppi en baño de hielo y lo que hago es descartar el agua (nuevamente voy a visualizar el pellet pegado en la profundidad del eppi). El descarte lo hago en el vaso volcando el contenido. Acá no uso micropipeta. La idea es que quede menos de 0,1 ml de agua (lo marca el eppi). En caso de que quede más, entonces retiro con micropipeta.
 - d) Llevar a cabo segundo lavado
 - e) Llevar a cabo tercer lavado
 - f) Llevar a cabo cuarto lavado
13. Finalizado el cuarto lavado, descartar el agua del eppi (nuevamente voy a visualizar el pellet pegado en la profundidad del eppi). El descarte lo hago en el vaso volcando el contenido. La idea es que quede entre 70 y 100 µl.
14. Resuspender el pellet de bacterias en el contenido de agua que queda (70 y 100 µl).
15. El contenido del eppi contiene bacterias electrocompetentes listas para transformar. En caso de no realizar el protocolo de clonación en lo inmediato pueden almacenarse; para esto debe agregarse glicerol al 10%:
- Pueden ser guardadas a -80°C para que su conservación dure mucho tiempo
 - Pueden ser guardadas a -20°C, pero la conservación va a ser mucho menor.

A16. Obtención de bacterias termocompetentes

Las bacterias termocompetentes se pueden obtener a partir de:

1. Bacterias competentes (con el objetivo de multiplicarlas)

- a) Alicuotar 3 mL de LB estéril (tenerlo autoclavado) bajo halo de calor en dos tubos de ensayo; uno que va a presentar las bacterias competentes a multiplicar y otro será control. Al terminar flamear los picos de cada tubo.
 - b) Tomar bacterias competentes guardadas a -80°C . Con punta de tips P200 estéril de caja recién abierta tomar un pedazo considerable del medio de células congelado y tirarlo adentro del tubo de bacterias. En el tubo control solo tirar un tips P200 estéril.
 - c) Realizado lo anterior, flamear pico de cada tubo, colocarle tapa y ubicarlo en estufa-agitador a 37°C y 150 rpm.
 - d) Dejar over night (ON)
 - e) Continuo en punto 3.
2. Cepa de bacterias no competentes (DH5alfa o XL1-blue o MB7070 u otra)
 - a) Largar durante toda la noche (ON) 100 mL de LB medio de cultivo con el inóculo de la bacteria a crecer.
 - b) Continúo en punto 3.
 3. Realizar una dilución 1/100 de bacterias en medio de cultivo; esto lo realizo en tubo falcon. La cantidad de bacterias y medio de cultivo a agregar puede variar de acuerdo a lo que se busca. Por ejemplo, se podría agregar 100 mL de LB medio de cultivo y 1 mL de bacterias. En caso de tener más o menos bacterias agrego más o menos LB, respectivamente.
 4. Coloco el tubo de ensayo en estufa-agitador a 37°C y 150 rpm.
 5. Cada 20 minutos retirar el tubo de ensayo y medir la densidad óptica que tienen las bacterias utilizadas. Para esto se utiliza un biofotómetro.
 - a) Para llevar a cabo la medición de la densidad óptica se debe utilizar cubas específicas limpias en cada ocasión. Prepararlas con anticipación.
 - b) El biofotómetro debe ser calibrado previamente a partir de LB medio de cultivo (100 μl).
 - c) Realizada la calibración ya se pueden ir colocando las bacterias (100 μl) cada 20 minutos para la medición de la densidad óptica.
 6. El objetivo es lograr una densidad óptica óptima de 0,6 en menos de 1 hora 30 minutos.
 7. A partir de este paso es crucial siempre trabajar con baño de hielo (lo suficientemente grande como para que entren tubos de ensayo).

8. Una vez alcanzada la densidad óptica óptima se colocan las bacterias en dos tubos falcons de 50 estériles.
9. Centrifugar mediante una centrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
10. Mientras centrifugo preparo solución de competencia. Para esto tomo 1,5 mL de MgSO₄ y 1,5 mL de CaCl₂ y agrego 12 mL de agua roux (los stocks están concentrados al 10X) en esterilidad de fuego. Finalmente filtrar. Dejo sobre hielo.
11. Una vez finalizada la centrifugada, tirar sobrenadante, agregar 5 mL de la solución a cada tubo y resuspender el pellet de células lentamente sobre baño de hielo de 4°C.
12. Dejo reposar durante 30 minutos en hielo.
13. Centrifugar con centrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 10 min a 4°C.
14. Resuspender en el buffer de competencia (1,7 ml entre los dos tubos) y resuspender con mucho cuidado sobre hielo.
15. Buscar nitrógeno líquido, el cual se coloca en envase específico para favorecer su manipulación.
16. Agregar 300 µl de glicerol.
17. Alicuotar 50 µl en eppendorfs estériles de 1,5 mL y rápidamente tirar los tubos a nitrógeno líquido para que se congele. Importante la rapidez.
18. El contenido del eppi contiene bacterias termocompetentes listas para transformar. En caso de no realizar el protocolo de clonación en lo inmediato pueden almacenarse.
 - Pueden ser guardadas a -80°C para que su conservación dure mucho tiempo
 - Pueden ser guardadas a -20°C, pero la conservación va a ser mucho menor.

A17. Protocolo de clonación utilizando bacterias electrocompetentes

1. Obtenidas las bacterias electrocompetentes comenzar con el protocolo de clonación. Se necesita 50 µl de bacterias para cada ligada. Se utiliza un tubo eppi de 1,5 mL correctamente rotulado.

2. Preparar electroporador. Elegir cubeta, que puede tener una separación de 0,1 cm (tapa marrón) o 0,2 cm (tapa verde). Es indistinto la utilización de una u otra. La única consideración a tener en cuenta es que, dependiendo la elección, la configuración del electroporador debe ser: para cubeta de 0,1 cm configurar en Ec1; para cubeta de 0,2 cm configurar en Ec2. Antes de realizar la electroporación se debe colocar la función "bacteria" en el equipo.
 - Las cubetas deben ser refrigeradas con anticipación a su utilización para evitar cambios bruscos de temperatura en las bacterias.
3. Agregar 4 µl de ligada correspondiente a cada eppi ya con las bacterias en su interior. Homogenizar lentamente. Este paso realizarlo en baño de hielo.
4. Dejar reposar durante 2 minutos en baño de hielo.
5. Realizar electroporación. Se desencadena el shock eléctrico. Para esto colocar el contenido del eppi (bacterias con ligada) en la cubeta seleccionada. Esta se pone correctamente en el electroporador y se procede a dar inicio al choque eléctrico, que dura unos pocos milisegundos (ms). Lo óptimo es que se produzca 2,5 kilovoltio (KV) en 5 ms. En caso de que el equipo señale la presencia de un arco eléctrico, entonces la electroporación falló.
6. Rápidamente, luego de choque eléctrico agregar a la cubeta 1 mL de LB medio de cultivo. Homogenizar lentamente. Ya no necesito trabajar en baño de hielo.
7. Retirar todo el contenido de la cubeta y colocarlo en un eppi nuevo rotulado.
8. Colocar tubo eppi en estufa-agitador a 37°C y 150 rpm.
9. Esperar 2 a 3 horas.
10. Aprovechar el tiempo de espera y preparar el medio en el cual se plaquearán y cultivarán las bacterias. Dependiendo la cantidad de muestras voy a sintetizar la cantidad de placas. El medio de cultivo se prepara todo junto y luego se distribuye en las distintas placas de Petri. Se debe colocar aproximadamente 25 mL de LB agar en cada placa. A continuación, se explica la síntesis de 100 mL de medio de cultivo:
 - a) Colocar en vaso de precipitado de volumen suficiente 100 mL de LB agar (recordar que para estar en medio líquido debe calentarse).
 - b) Agregar 100 µl de ampicilina.

- c) Agregar 100 µl de IPTG.
- d) Agregar 160 µl de X-gal.
- e) Proceder a distribuir “a ojo” aproximadamente 25 mL del medio de cultivo en cada placa que se presenta.
 - Se debe cubrir toda la base de la placa de Petri
 - Agregado el medio de cultivo, no tapar la base para favorecer la solidificación.
 - Esperar aproximadamente 1 hora.

11. Plaquear

- a) Retirar el tubo eppi de la estufa-agitador.
- b) Centrifugar con centrífuga común a 3000 rpm durante 5 min.
- c) Descartar sobrenadante volcándolo en frasco de descarte. Se busca que el volumen que quede no sea superior a 0,1 mL.
- d) Resuspender el pellet muy lentamente.
- e) A través de una micropipeta colocar el volumen del eppi en la parte media de la superficie del medio de cultivo ya solidificado que se encuentra en la base de la placa de Petri.
- f) A través de una espátula de Drygalsky, dispersar dicho volumen realizando un movimiento del centro hacia la periferia y girando la placa de manera continua. Realizar esto hasta que el volumen se haya absorbido completamente en el medio de cultivo.
- g) Colocar la tapa y poner la placa de Petri dada vuelta (el medio de cultivo en la parte de arriba) en estufa de cultivo durante toda la noche.
- h) A los días siguientes se debería observar crecimiento de colonias.

A18. Protocolo de clonación utilizando bacterias termocompetentes

1. Obtenidas las bacterias termocompetentes comenzar con el protocolo de clonación. Se necesita 50 µl de bacterias para cada ligada. Se utiliza un tubo eppi de 1,5 mL correctamente rotulado.
2. Preparar placa seca, la cual se configura a 42°C.
3. Colocado el eppi con las bacterias termocompetentes en baño de hielo, agregar 4 µl de ligada.
4. Colocar el eppi que tiene las bacterias y la ligada en la placa seca durante 1 minuto 30 segundos. Se desencadena el shock térmico.

5. Finalizado el paso anterior, se vuelve a colocar el eppi en baño de hielo durante 2 minutos.
6. Pasados los 2 minutos colocar en el eppi 1 mL de LB medio de cultivo.
12. Colocar el eppi en estufa-agitador a 37°C y 150 rpm.
13. Esperar 2 a 3 horas.
14. Aprovechar el tiempo de espera y preparar el medio en el cual se plaquearán y cultivarán las bacterias. Dependiendo la cantidad de muestras voy a sintetizar la cantidad de placas. El medio de cultivo se prepara todo junto y luego se distribuye en las distintas placas de Petri. Se debe colocar aproximadamente 25 mL de LB agar en cada placa. A continuación, se explica la síntesis de 100 mL de medio de cultivo:
 - a) Colocar en vaso de precipitado de volumen suficiente 100 mL de LB agar (recordar que para estar en medio líquido debe calentarse).
 - b) Agregar 100 µl de ampicilina.
 - c) Agregar 100 µl de IPTG.
 - d) Agregar 160 µl de X-gal.
 - e) Proceder a distribuir “a ojo” aproximadamente 25 mL del medio de cultivo en cada placa que se presenta.
 - Se debe cubrir toda la base de la placa de Petri.
 - Agregado el medio de cultivo, no tapar la base para favorecer la solidificación.
 - Esperar aproximadamente 1 hora.
15. Plaquear
 - a) Retirar el tubo eppi de la estufa-agitador.
 - b) Centrifugar con centrífuga común a 3000 rpm durante 5 min.
 - c) Descartar sobrenadante volcándolo en frasco de descarte. Se busca que el volumen que quede no sea superior a 0,1 mL.
 - d) Resuspender el pellet muy lentamente.
 - e) A través de una micropipeta colocar el volumen del eppi en la parte media de la superficie del medio de cultivo ya solidificado que se encuentra en la base de la placa de Petri.
 - f) A través de una espátula de Drygalsky, dispersar dicho volumen realizando un movimiento del centro hacia la periferia y girando la placa de manera continua. Realizar esto hasta que el volumen se haya absorbido completamente en el medio de cultivo.

- g) Colocar la tapa y poner la placa de Petri dada vuelta (el medio de cultivo en la parte de arriba) en estufa de cultivo durante toda la noche.
- h) A los días siguientes se debería observar crecimiento de colonias.

A19. Preparación de 1 litro de LB medio de cultivo o 1 litro de LB agar

1. Agregar 600 ml de agua destilada en frasco específico
2. Agregar 10 gramos de bactotryptona
3. Agregar 5 gramos de extracto de levadura
4. Agregar 10 gramos de NaCl
5. Mezclar hasta que los componentes sólidos se disuelvan.
6. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5 N (agrego algunas gotitas).
7. Llevar solución a volumen (es decir, 1 litro) a partir de agua destilada.
8. Dicha solución se puede utilizar para preparar LB medio de cultivo o LB agar. Se puede preservar en heladera durante algunos meses, aunque lo recomendable utilizarla en lo inmediato. Es fundamental prevenir cualquier tipo de contaminación.
9. Si quiero utilizar LB medio de cultivo, entonces autoclavar durante 20 minutos a 1,5 atm.
10. Si quiero utilizar LB agar, entonces agregar 20 gramos de agar y llevar a cabo la esterilización a través del autoclave durante 20 minutos a 1,5 atm.

A20. Selección de colonias con inserto

1. Visualizar la placa de Petri y determinar si hay crecimiento de colonias. Aquellas placas de Petri que no presentan crecimiento se descartan.
2. Con ayuda de una lupa binocular seleccionar varias colonias blancas de una misma placa de Petri. En principio, se recomienda identificarla a través de un marcador a cada una.
3. Preparar un eppi de 0,2 mL por cada colonia identificada y rotularlo de manera correcta. A cada eppi se le coloca 13 µl de agua ultra pura.
4. Llevar a cabo la selección de colonias.
 - a) A través de un escarbadiante rozar la colonia blanca identificada.

- b) Colocar el escarbadiante con la colonia sobre el agua ultra pura del eppi y revolver durante 20 segundos aproximadamente.
 - c) Descartar escarbadiante.
 - d) Repetir estos pasos de acuerdo a la cantidad de colonias identificadas.
5. Se tiene de esta manera un tubo eppi de 0,2 mL que presenta agua ultra pura y bacterias.
 6. Para ratificar la correcta selección de las colonias realizar un screening. Básicamente consiste en realizar una PCR con posterior siembra de las muestras en el gel.
 7. Obtenido un screening positivo, el contenido del tubo eppi de 0,2 mL (agua ultra pura con bacterias) es traspasado a un tubo de ensayo que presenta 3 mL de LB medio de cultivo con 3 µl de ampicilina.
 8. Colocar el tubo de ensayo en estufa-agitador a 37°C y 150 rpm ON.
 9. Al día siguiente observar si hay crecimiento en el tubo de ensayo. Solamente en caso de que haya habido crecimiento se procede a purificar.

A21. Protocolo de purificación del ADN plasmídico

A partir de 1-3 mL de cultivo de *E. coli* (generalmente 1 mL)

1. Recolectar las células mediante centrifugación a 12.000 xg durante 1 minuto y descartar todo el sobrenadante (el descarte va en vaso de descarte de clonado, con previa colocación de lavandina 10%). El descarte lo hago volcando el eppi en el vaso.
2. Resuspender las células en 250 µl de solución 1 y homogenizar con vortex hasta que todo el pellet esté bien disgregado.
3. Agregar 250 µl de solución 2 y homogenizar suavemente mediante repetidas inversiones del tubo. Estas deben continuar hasta el agregado de la solución 3. La suspensión debe tornarse completamente transparente. Es importante no incubar durante más de 5 minutos con la solución 2.
4. Agregar 350 µl de solución 3 y homogenizar por inversión inmediatamente. Verificar la formación de abundante precipitado de color blanco. Las inversiones de los tubos deben continuar hasta llevar a cabo el paso siguiente.

5. Centrifugar a 12.000 xg durante 10 minutos y transferir el sobrenadante a la columna de purificación, evitando arrastrar restos del precipitado blanco. Este paso se realiza con micropipeta. El eppi con el precipitado se descarta.
6. Centrifugar la columna de purificación a 8.000 xg durante 30 segundos, descartar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo colector.
7. Agregar 750 µl de solución 4 y centrifugar a 8.000 xg durante 30 segundos. Descartar el filtrado y volver a colocar la columna en el tubo colector.
8. Centrifugar a 12.000 xg durante 1 minuto para eliminar todo resto de solución 4. Descarto tubo colector.
9. Colocar la parte restante de la columna en un eppi de 1,5 mL estéril (rotulado).
10. Agregar 50 µl de solución 5 (importante hacerlo sobre la malla de filtro).
11. Esperar 10 minutos.
12. Centrifugar a 8.000 xg durante 1 minuto. Descartar la columna.
13. El ADN recuperado puede ser almacenado a -20°C o utilizarse en el momento.

Principio: este kit está diseñado para la extracción y purificación plasmídica a partir de cultivos líquidos de *E. coli*. No requiere etapas de extracción orgánica ni precipitación de ADN. La purificación de plásmidos se realiza mediante una columna que contiene una matriz basada en sílica, que permite separar los ácidos nucleicos de las proteínas y restos celulares. Este sistema permite obtener moléculas plasmídicas ultra puras en menos de 15 minutos listas para ser utilizadas en técnicas de digestión, marcado enzimático, clonado, amplificación por PCR, transcripción in vitro y secuenciación.

Rendimiento: a partir de 1 – 3 ml de cultivo líquido de *E. coli*, conteniendo un plásmido de alto número de copias, se obtiene hasta 20 µg de ADN plasmídico, libre de ARN, proteínas, sales y otros contaminantes.

Almacenamiento: almacenar a temperatura ambiente todos los componentes del kit excepto la solución 1 (con la ribonucleasas adicionada) que se recomienda almacenar a 4°C.

Nota: almacenar la solución 2 a menos de 10°C genera la precipitación del SDS. En caso de observar precipitado incubar a 65°C durante 10 minutos

A tener en cuenta: la solución 1 y 3 se encuentran en heladera. Las soluciones 2, 4 y 5 se encuentran en fuera de heladera. A todas las soluciones, previo a su uso, se le debe corroborar posible presencia de precipitados; en caso de tenerlos, entonces calentarlas.

A22. Principios y fundamentos para la secuenciación de genes

El método didesoxi de Sanger, también conocido como método enzimático, fue desarrollado en 1981; se basa en el principio de que la síntesis de ADN se termina cuando es el didesoxinucleótido análogo (ddNTP) y no el desoxinucleótido normal (dNTP) quien es incorporado a la cadena de síntesis. La diferencia entre estos nucleótidos sintéticos radica en la presencia o no de un grupo hidroxilo ($-OH$). Si este se encuentra instalado en el carbono 3' de la desoxirribosa, entonces se permite la formación de un enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos normales y, por lo tanto, la elongación de la cadena complementaria por medio de la enzima ADN polimerasa. Por el contrario, la ausencia del hidroxilo en el carbono 3' automáticamente genera el detenimiento de la elongación y la consecuente liberación del fragmento. Los didesoxinucleótidos análogos (ddNTPs) son conocidos como nucleótidos terminadores de cadena (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

A lo largo de los años, el método didesoxi de Sanger fue recibiendo modificaciones con el fin de lograr resultados más rápidos y eficientes; de esta manera se dio el origen de muchas alternativas para llevar a cabo la secuenciación del ADN. Actualmente se destaca la secuenciación automática por terminador fluorescente, esta técnica, además de resultar del método original de Sanger, se destaca por la utilización de un colorante fluorescente diferente en cada uno de los ddNTPs utilizados. Este tipo de secuenciación está muy difundida en la actualidad, debido a la simpleza, rapidez, automatización y posibilidad de análisis electrónico (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019).

En el método de secuenciación automática por terminador fluorescente cada nucleótido terminador de cadena (ddNTP) está marcado con un colorante fluorescente distinto que emite fluorescencias en longitudes de onda diferentes. La gran ventaja que presenta este método es que la síntesis/elongación de la cadena sencilla de ADN se lleva a cabo en un solo tubo de reacción. El método

original de Sanger y otras alternativas que fueron surgiendo del mismo involucran la utilización de cuatro tubos de reacción; lo cual hace dificultar el análisis, demorar el proceso en el tiempo y disminuir la eficiencia en los resultados. Durante la secuenciación se van a obtener una gran cantidad de fragmentos de ADN, cada uno de ellos con una extensión diferente. La terminación de la elongación de cada fragmento de ADN se da por la incorporación de un ddNTP fluorescente, esto hará que cada fragmento de ADN, además de presentar un tamaño específico que determinará la posición en la secuencia, también presente un color determinado que indique el tipo de nucleótido que se localiza. En consecuencia, lo que se obtienen son múltiples fragmentos de ADN de variable tamaño y cada uno de ellos con un ddNTP terminal específico, que mediante fluorescencia se podrá determinar su tipo. La separación de los fragmentos de ADN se hace por electroforesis capilar en un gel específico. Durante la migración, los fragmentos marcados pasan de menor a mayor tamaño por el frente de un rayo láser fijo, que induce fluorescencia dependiendo del colorante fluorescente de cada ddNTP. La fluorescencia y el tamaño del fragmento es electrónicamente registrado y visualizado como cromatogramas, los cuales se representan mediante picos alternativos de nucleótidos correspondientes a la secuencia en dirección 5' a 3'. A medida que se da la migración de los fragmentos de ADN y se va recopilando la información por la computadora, los mismos se escapan del gel. Esto es muy importante por el hecho de que se evita la acumulación y se permite el continuo pasaje de otros fragmentos. La velocidad de migración que presentan los fragmentos de ADN por el capilar dependerá del tamaño de los mismos. A mayor tamaño, mayor fricción y por ende migración más lenta en el tiempo. Por el contrario, si los fragmentos son de menor tamaño, la fricción no será significativa y el tiempo de pasaje de los mismos va a ser mucho más rápido. Cada uno de los fragmentos presentan un ddNTP específico marcado con un colorante fluorescente. Cuando los fragmentos con sus correspondientes ddNTP atraviesan un láser específico, este a través de la emisión de una luz excita a los colorantes fluorescentes de los ddNTP, por lo que se da una fluorescencia a una longitud de onda que es determinada por el sistema óptico. Esto se digitaliza y es detectado por una computadora que identifica, analiza, descifra y elabora un gráfico, en el cual se representan cada uno de los nucleótidos (bases) con picos de intensidad de luz acorde con el colorante fluorescente (Gómez y otros, 2011; Pinilla, 2019; Smith y Wood, 1998).