

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Producción Agrícola y Animal  
Licenciatura en Agronomía

Informe Final de Servicio Social  
**Capacitación para la evaluación del ADN de trigos harineros con el uso de  
marcadores moleculares relacionados a caracteres de rendimiento.**

Prestador de Servicio Social:  
Diego Valadez Palmero  
Matrícula: 2143063363

Asesor Interno:  
M. en C. Dorys Primavera Orea Coria  
No. Económico: 16435

Asesor Externo:  
PhD. Susanne Dreisigacker

Lugar de realización:  
Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)  
Carretera México-Veracruz Km. 45, El Batán, Texcoco de Mora, Edo. de México, C.P.  
56237, México

Programa Global de Trigo (Global Wheat Program)  
Mejoramiento Molecular de Trigo (Wheat Molecular Breeding)  
Laboratorio de Biotecnología

Fecha de inicio y terminación:  
03 de Enero - 04 Julio 2022

## Índice

1. Introducción	3
2. Marco Teórico	4
3. Objetivo general y específicos	7
4. Metodología utilizada	7
5. Actividades realizadas	14
6. Objetivos y metas alcanzadas	19
7. Resultados, discusión y conclusiones	20
8. Recomendaciones	24
9. Fuentes consultadas	26

## Resumen

En el presente informe se describen las técnicas empleadas para extracción de ADN genómico de plantas de trigo, igualmente se describen los parámetros para la interpretación de los dos tipos de lectura que se emplean en el Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo (WMB por sus siglas en inglés) del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz Y Trigo (CIMMYT), los cuales son: amplificación por gel de agarosa y Lecturas KASP (en inglés *Kompetitive Allele Specific PCR Genotyping System*). La identificación de genes en las plantas por medio de los marcadores moleculares, es una herramienta que sirve a cualquier fitomejorador para llevar a cabo el mejoramiento genético y en el caso del CIMMYT, poder así continuar con su misión de promover la seguridad alimentaria en el mundo. Para el presente proyecto de servicio social se utilizaron 16 líneas parentales de plantas de trigo de un proyecto que el Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo tiene con una empresa llamada Intertek, de las cuales se extrajo ADN y se realizaron las lecturas para identificación de genes relacionados a rendimiento, de manera detallada, genes relacionados a: Peso de grano, Número de espiguillas por espiga, Incremento en el número de granos, Rendimiento por planta, Resistencia al estrés abiótico, Altura de planta, Fenología (cambios estacionales) y Resistencia a la roya.

## Introducción

Los marcadores moleculares son útiles tanto en la investigación básica como en la aplicada. La diversidad entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. La variación genética es notable y cada individuo de una especie, posee una secuencia de ADN única. Las variaciones en el ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido – SNP), inserción o deleción de fragmentos de ADN de diversas longitudes (desde uno a varios miles de nucleótidos), o duplicación o inversión de fragmentos de ADN (FAO, 2010).

El trigo es el cereal más utilizado para consumo humano en el mundo. Se ubica en primer lugar en superficie cosechada y volumen comercializado en el mercado internacional, mientras que en volumen de producción, se ubica en segundo lugar, después del maíz.

De la producción mundial en 2019, el 67.2% se cosechó en cinco principales países productores de trigo: Unión Europea 18.7%, China 18.0%, India 13.7%, Rusia 9.8% y Estados Unidos 7%. Mientras que México participa únicamente con el 1.0%. Los cinco principales consumidores participan con 56.4% del total: China 17.0%, Unión Europea 16.8%, India 13.0%, Rusia 5.5% y Estados Unidos 4.1%. Ante todo esto, se prevé que el consumo mundial siga creciendo exponencialmente con el paso de los años (Juárez, 2019).

El proyecto de servicio social se enfocó en la capacitación del uso de marcadores moleculares para la detección de genes relacionados a caracteres de rendimiento de plantas de trigo harinero y su posterior evaluación. Para esto se utilizaron 16 líneas parentales como material de trabajo, cabe mencionar que dichas líneas son propiedad de una empresa con la que el Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo del CIMMYT realiza proyectos en conjunto. Por lo que parte de la información que se proporcionó y que resultó en este trabajo de servicio social, es de carácter confidencial y no se puede divulgar sin el consenso de las partes antes mencionadas.

Las prácticas desarrolladas en el presente trabajo de servicio social fueron realizadas en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), ubicado en la carretera México - Veracruz, El Batán km 45.

## **Marco Teórico**

### *Ácido Desoxirribonucleico*

Los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) son polímeros de nucleótidos formados por un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa en el ADN y ribosa en el ARN), una base nitrogenada (adenina, timina, citosina, guanina o uracilo) y una molécula de fosfato. El ADN es la macromolécula que contiene la información genética de las células procariotas, eucariotas y de los adenovirus (Falcón y Varela, 2007).

### *Extracción*

La extracción de ADN combina procesos químicos, físicos y mecánicos e incluye básicamente tres pasos:

1. Lisis celular
2. Eliminación de proteínas
3. Precipitación y limpieza del ADN

Estos métodos de extracción de ADN presentan algunas ventajas y desventajas respecto a otros métodos: son económicos, no se manejan compuestos químicos tóxicos o contaminantes al ambiente y se obtienen grandes cantidades de ADN; pero por otro lado, la pureza del ADN no es absoluta y en algunas especies se obtiene un ADN parcialmente degradado (Falcón y Varela, 2007).

### *Marcadores moleculares*

Son fragmentos de ADN que están asociados a una determinada ubicación dentro del genoma. Corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además puede detectarse fácilmente. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo, y se pueden aplicar usando a todo el individuo o sólo parte de él. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN (Rentarías, 2007).

Se utilizan para localizar y aislar genes de interés. Existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen

por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante.

Por mencionar algunos de los tipos de marcadores más conocidos, se encuentran:

- **RAPD** (DNA polimórfico amplificado al azar)
- **STS** (*Sitios etiquetados por la secuencia*)
- **SSR** (*Repetición de secuencias discretas*)

### *Electroforesis en gel*

Es una técnica muy utilizada en la investigación básica, muy importante para la comprensión de la función de genes y proteínas. Se realiza generalmente en una especie de caja que tiene una carga positiva en un extremo y una carga negativa en el otro. Las muestras de ADN se cargan en pozos (ranuras) en un extremo de un gel y se aplica una corriente eléctrica para arrastrarlas a través del gel (Christopher, 2018).

Cuando se pone una molécula cargada en un entorno así, las moléculas negativas van a la carga positiva, y viceversa. Al analizar las proteínas en un gel, en una de estas cajas, por lo general se toma la proteína completa para ver lo grande que es. Cuanto más corta, más migran en el gel, de modo que las proteínas pequeñas terminarán en la parte inferior del gel, porque han ido más lejos, y las más grandes terminarán quedándose en la parte superior. Cuando un gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN, los fragmentos de ADN pueden verse como bandas, las cuales representan un grupo de fragmentos de ADN del mismo tamaño (Serrato *et al.*, 2007).

En el caso del ADN, este es una molécula muy larga, así que no se puede hacer un gel de una molécula entera de ADN de una célula. Es tan grande que nunca se metería en el gel, así que lo que hacen los científicos es cortar el ADN en pedazos más manejables, y entonces esas piezas, dependiendo de lo grande que sean, migran más o menos por el gel y terminan más arriba o más abajo.

### *Protocolos PCR (Bolivar et al., 2014)*

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido la principal herramienta diagnóstica de la biología molecular al punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido a su adaptabilidad y aplicabilidad. Sus parámetros incluyen:

- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)

Los cuatro dNTPs son los ladrillos para construir las nuevas cadenas de ADN. Variaciones en su concentración afectan especificidad y fidelidad. Concentraciones altas hacen disminuir la actividad de la enzima e incluso pueden llegar a inhibirla. El uso de concentraciones desbalanceadas también afecta la fidelidad, siendo las concentraciones utilizadas en la mayoría de los casos entre 0,2 a 1 Mm.

- Iones divalentes y monovalentes

Los iones divalentes actúan como cofactores de la enzima por tanto tienen una función crítica en la reacción. La concentración debe optimizarse para cada ensayo. En general, concentraciones insuficientes dan lugar a bajo rendimiento mientras que el exceso tiende a producir amplificaciones inespecíficas.

- Buffer

Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Por lo general incluye Tris-HCl (pH=8,4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y MgCl<sub>2</sub>.

- Primers (cebadores, oligonucleótidos)

Delimitan la zona de ADN a amplificar. Al ser reconocidos por la enzima permiten iniciar la reacción. Son secuencias cortas, normalmente de 18 a 22 nucleótidos (aunque pueden llegar hasta 40 según el caso) y contenido en GC entre 40-75%. Deben estar situados enfrentados y no a mucha distancia. Son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo. Normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN y la concentración a la que suelen emplearse está en el intervalo de 0,1-0,5  $\mu$ M.

- ADN molde

Contiene la región de ADN que se va a amplificar. La cantidad de este molde puede ser de tan sólo 1 $\mu$ g en caso de material genético clonado o de un mínimo de 20 $\mu$ g cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. El molde puede ser también ARN previamente transformado en ADNc (Complementario) mediante transcripción reversa.

## Objetivo general y específicos

- Conocimiento sobre técnicas de extracción de ADN genómico de plantas de trigo.
- Capacitación para la evaluación de genes relacionados al rendimiento de trigos harineros mediante el uso de marcadores moleculares.
- Aprender a interpretar resultados obtenidos mediante la amplificación por electroforesis y por lectura de placas con el método KASP.

## Metodología utilizada

*Aislamiento del ADN Genómico de Plantas (Dreisigacker et al., 2016)*

- Extracción de ADN a pequeña escala en placas de 96

### 1. Muestreo de tejido

Se cortan pequeñas porciones de tejido de hojas de cada planta y se colocan en hileras de 8 tubos de 1.1 ml cada uno, debe llenarse cada tubo máximo hasta la mitad. Se colocan hasta 12 hileras de tubos en placas de 96.

Deben mantenerse los tubos con tejido fresco hasta que puedan congelarse, pero debe hacerse lo más pronto posible. Se almacenan en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas o bien puede usarse nitrógeno líquido. Las muestras no deben descongelarse antes de la liofilización.

Colocar las placas con los tubos con tejido congelado dentro de la liofilizadora. Las tapas de los tubos deben estar abiertas y debe revisarse que la cámara de la liofilizadora esté a  $-50^{\circ}\text{C}$  en todo momento. Verificar que llegue a hacer vacío correctamente entre 0.0 y 0.120 mBar después de colocar las muestras. De 1 a 4 placas dentro de la liofilizadora tardan 24 horas y de 5 a 15 placas tardan 48 horas en secar.

El tejido seco se almacena en los tubos con las tapas cerradas a temperatura ambiente por unos cuantos días o se pueden almacenar por periodos aún más largos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La extracción de ADN se realiza dentro de esos mismos tubos.



## 2. Trituración de Tejido

Esto se realiza en placas de 96. Se colocan de 1 a 2 bolitas de acero inoxidable (4 mm de diámetro) dentro de cada tubo y se deben cerrar correctamente. Se coloca la placa completa dentro de una trituradora de tejido y se tritura por 2 - 3 minutos hasta que el tejido haya quedado hecho polvo muy fino.

Posteriormente el polvo puede ser almacenado en los tubos cerrados, o bien, se puede empezar la extracción de ADN inmediatamente dentro de los mismos tubos.

## 3. Extracción de ADN

Precalear el buffer de aislamiento CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) o Bromuro de hexadeciltrimetilamonio a 65°C. Agregar 400 µl de buffer y revolver agitando levemente para homogeneizar el tejido con el buffer. Incubar las muestras a 65°C por 90 minutos con movimiento de rotación continuo para revolver.

Remover los tubos del horno y dejar que se enfríen durante 10 minutos. Agregar 300 µl de cloroformo/octanol (24:1) y mezclar gentilmente como movimiento de rotación continuo durante 15 minutos.

Centrifugar a 3750 rpm por 30 minutos a 4°C para generar una capa amarilla/acuosa y otra capa verde/orgánica. Tomar aproximadamente 300 µl de la parte amarilla/acuosa y colocarla en una hilera de tubos nueva conteniendo 15 µl de Ribonucleasa A (RNasa A). Mezclar gentilmente e incubar a 37°C por 30 minutos.

Agregar 280 µl de isopropanol al 100%, mezclar gentilmente para precipitar el ácido nucleico. Incubar las muestras a -20°C durante 3 minutos o 1 hora. Centrifugar a 3750 rpm a 4°C por 30 minutos para formar lo que se conoce como pastilla de ADN al fondo de los tubos y después descartar el sobrenadante.

Por último, agregar 400 µl de etanol (EtOH) a 70% y lavar la pastilla de ADN con cuidado. Centrifugar a 3750 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Descartar el etanol por decantación y nuevamente agregar 400 µl de etanol (EtOH) a 70% y lavar la pastilla de ADN. Centrifugar a 3750 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente y descartar el etanol por decantación.

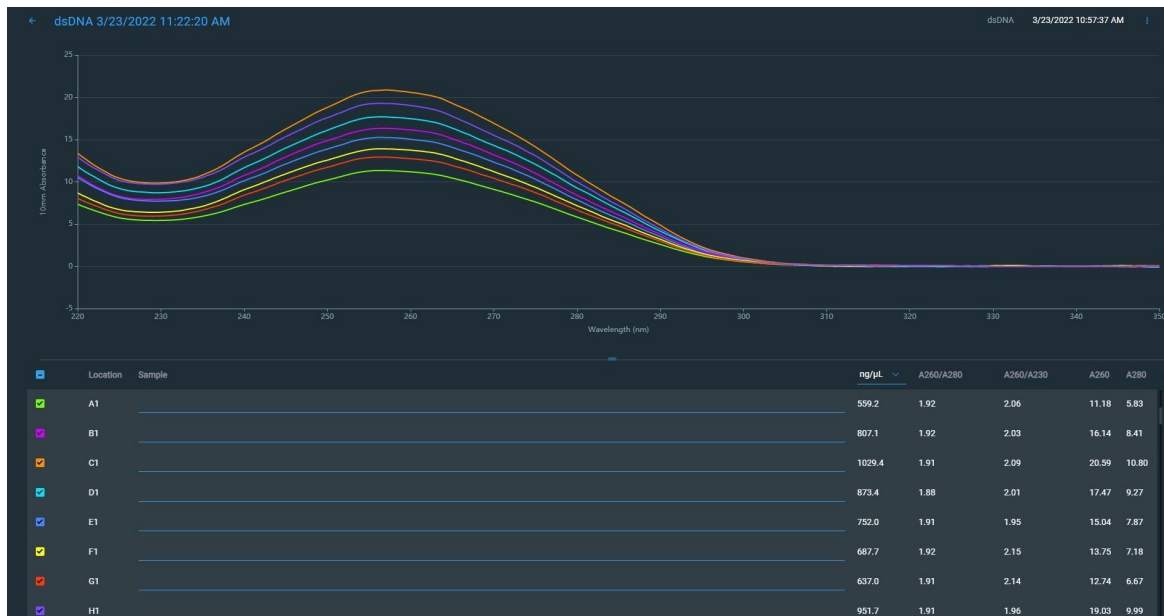
Dejar secar la pastilla de ADN dentro de una campana de extracción hasta que el etanol se evapore completamente, si persiste algún olor a alcohol, indica que la pastilla aún no está completamente seca.

Resuspender la pastilla de ADN en 200  $\mu$ l de Tris-HCL (1mM, pH 8). Almacenar las muestras a una temperatura de 4°C hasta que se use. El ADN que es congelado nuevamente después de haberse descongelado empieza a romperse en cada sesión, por lo que se recomienda congelarlo hasta haber terminado de utilizarlo por completo.

*Cuantificación, Control de la Calidad y Purificación del ADN (Dreisigacker et al., 2016)*

- Cuantificación de ADN vía UV con espectrofotómetro NanoDrop 8000 (thermoscientific, USA)

Después de la resuspensión del ADN en Tris (pH 8.0) se deben leer las muestras a OD260 y OD280 para determinar la cantidad y la pureza del ADN. Para realizar la lectura se carga primero la muestra de referencia de 2  $\mu$ l de Tris (pH 8.0) y después se cargan 2  $\mu$ l de la muestra a revisar (**Figura 1**).



**Figura 1.** Lectura de la calidad de ADN de 8 muestras con el uso del espectrofotómetro NanoDrop 8000 de la marca thermoscientific, USA.

- Control de la calidad del ADN mediante electroforesis

En este paso se revisa que el ADN aislado sea de alto peso molecular. A pesar de que la degradación del ADN aislado es inevitable. El procedimiento explicado a continuación está diseñado para correr el ADN bajo condiciones óptimas para obtener resultados asertivos.

Se debe preparar una dilución de 50 ng/μl de las muestras seleccionadas. Se colocan 100 ng de cada muestra diluida (2 μl ADN + 5 μl 1X Gel buffer) en gel de agarosa al 0.7%. Se debe incluir al menos una línea de ADN sin cortar que funcione como marcador de peso molecular.

Colocar 100 mg de dicho marcador para revisar la calidad y la cantidad de la muestra de ADN. Correr el gel de agarosa a 70 V durante 90 minutos y visualizar el ADN.

#### *Protocolo de PCR para marcadores STS/SSR (Dreisigacker et al., 2016)*

Dicho protocolo (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés que significan: Reacción de la Cadena de Polimerasa) consiste de tres pasos fundamentales: Desnaturalización, Alineamiento y Extensión. En el primero lo que ocurre es que el material genético es desnaturalizado como su nombre lo indica, convierte la doble hebra del ADN en una sola. Después en el Alineamiento, los primers (son pequeñas secuencias sencillas de ADN usadas en el PCR) que se utilizan deben tener un buen diseño para obtener reacciones exitosas, estos son alineados a las regiones complementarias de la hebra que quedó sola en el paso anterior. En el tercer paso la hebra es extendida por la acción del ADN Polimerasa. Todos estos pasos son sensibles a los cambios de temperatura, por lo que las temperaturas recomendadas para cada paso son: 94°C, 60°C y 70°C.

- Sitios Etiquetados en Secuencia (Sequence-Tagged Sites)

Son secuencias pequeñas que se pueden ampliar fácilmente con el PCR. Producen un patrón simple y reproducible en el gel de agarosa o gel de acrilamida. Es importante destacar que en la mayoría de los casos, los marcadores STS son co-dominantes.

- Repeticiones Simples Secuenciadas (Simple Sequence Repeats)

Son locus polimórficos presentes en el ADN nuclear que consisten en unidades repetitivas que van de 1 - 10 pares de bases, por lo general con una longitud de 2 - 3 pb. Las SSR's son muy variables y distribuidas a lo largo del genoma.

La calidad del ADN no es tan importante para los STS's y los SSR's. Se logran obtener buenos resultados usando ADN de tejido foliar molido previamente congelado y liofilizado.

- Amplificación

1. Se prepara una mezcla con los siguientes reactivos listados a excepción del ADN. Se recomienda ensamblar todos los reactivos en hielo.

Reactivos/Cantidades	Final	10 µl RXN
ddH <sub>2</sub> O	— — — — —	0.05 µl
5X Green or Colorless GoTaq Flexi	1X	2.0 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	0.6 µl
dNTP Mix (2.5 mM c/u)	200 µM	0.8 µl
Primers F+R (1.0 µM c/u)	0.25 µM c/u	2.5 µl
GoTaq (ADN Polimerasa 5U/µl)	0.25 U	0.05 µl
ADN (10 - 50 ng/µl)	50-100 ng	4.0 µl

Los primers que se utilizan son adquiridos en forma liofilizada. Existen diferentes niveles de pureza y concentración. Se deben disolver con agua destilada o con Tris (pH 8.0) de acuerdo a la concentración de ambos primers.

2. Se deja mezclando el conjunto de reactivos y se conserva en hielo.
3. Se agregan las muestras de ADN a cada charola de PCR previamente rotulada.
4. Se agregan las alícuotas de reactivos a cada placa de PCR.
5. Gentilmente mezclar la reacción y coleccionar todo el líquido en el fondo de los tubos con un centrifugado rápido en caso de ser necesario.
6. Transferir la placa a una máquina PCR y comenzar el termociclado. Amplificar usando el siguiente programa.

*Programa para PCR Estándar (Dreisigacker et al., 2016)*

94°C por 2 minutos

30 ciclos:

94°C por 1 minuto

50-68°C por 2 minutos

72°C por 2 minutos

1 ciclo:

72°C por 5 minutos

Temperatura final: 15°C

Después de este programa aplicado a las placas, se procede a realizar la lectura KASP de cada una con el lector de placas BMG Labtech.

Lo que hace este equipo es leer la fluorescencia basada en la fotoluminiscencia, un proceso físico en el cual ocurren emisiones de luz después de haber sido absorbida por alguna sustancia. La intensidad de la fluorescencia indica cuánta luz (fotones) es emitida, la cual depende de la concentración de fluoróforos en estado de excitación. (BMG Labtech, 2022)

La fluorescencia es creada por la absorción de energía (luz) por moléculas fluorescentes llamadas fluoróforos. La energía absorbida eleva a los electrones a un alto nivel de energía. Como este estado de excitación es inestable, los electrones regresan a su estado normal y a la par emiten luz, la cual posteriormente nosotros identificamos en nuestro lector de placas y podemos hacer así interpretaciones de cada muestra de ADN.

*Electroforesis en gel (Dreisigacker et al., 2016)*

El sistema de gel a usar en la electroforesis va a depender del tamaño de amplificación de la muestra, de la resolución requerida para ver claramente la diferencia de tamaños entre los productos amplificados y en la intensidad en los mismos. En el laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo se utilizan diversos geles de diferentes concentraciones y calidades: agarosa de calidad normal, geles pequeños verticales de poliacrilamida, bisacrilamida manchado con bromuro de etidio, nitrato de plata o GelRed.

La selección del gel a utilizar va a depender de algunas reglas generales:

1. Usar gel de agarosa (AGE) si se espera una clara diferencia entre productos amplificados (>20 bp).
2. Para fines de diversidad genética, usar gel de poliacrilamida dado que requiere mayor resolución.
3. Para mapeos, empezar con las líneas parentales para polimorfismos en geles de agarosa y volver a correr en poliacrilamida solo aquellos marcadores con

pequeñas diferencias o baja intensidad que no puedan ser vistos fácilmente en geles de agarosa.

Con el producto amplificado de PCR se realiza una digestión con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes de la digestión son separados por electroforesis en geles de agarosa teñidos con un colorante que permite la diferenciación de cada muestra amplificada.

### *Uso e Interpretación de los Marcadores Moleculares*

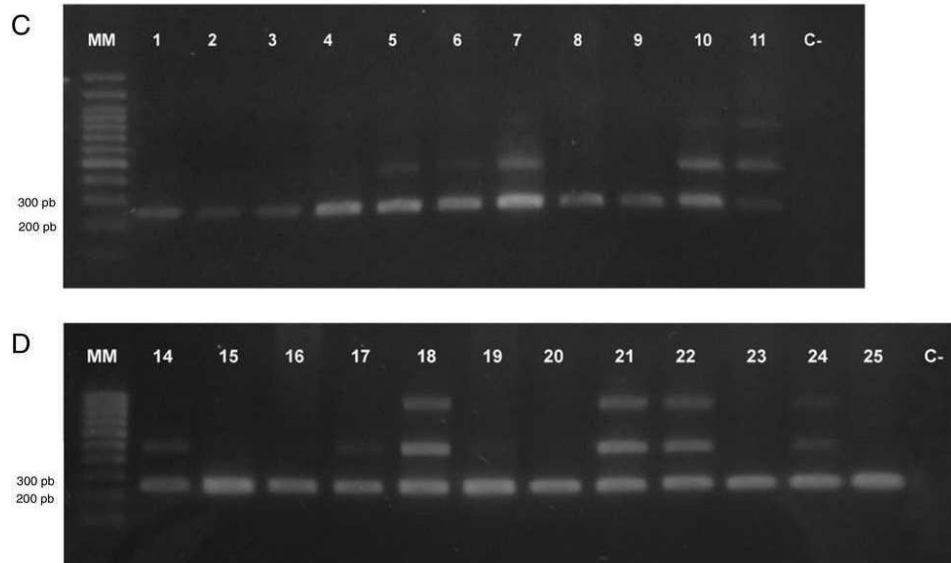
Al momento de hacer alícuotas en proporción 10/90 (10µl de ADN y 90µl de ddH<sub>2</sub>O) de las placas de 96 de las muestras de tejido del cual previamente se hizo extracción de ADN, se van a agregar en la placa de 384 junto con los controles como pueden ser: Assay Mix A y Assay Mix B (LGC Biosearch Technologies, 2014).

Dichos controles contienen los marcadores moleculares que son secuencias de ADN que servirán para identificar si las muestras presentan la misma secuencia de bp (pares de bases) junto con reactivos que proporcionan fluorescencia a cada control para que se puedan leer e identificar en un lector de placas. En el laboratorio de WMB utilizan un lector de marca BMG Labtech.

En el laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo del CIMMYT realizan la interpretación de dos formas:

#### *1. Amplificación por gel de agarosa*

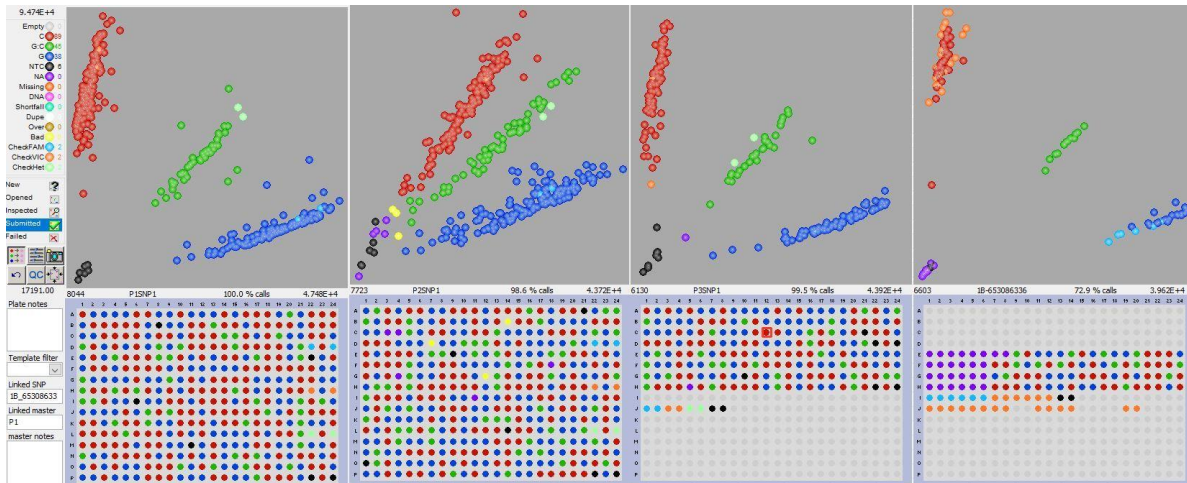
Se hace un comparativo con el control aplicado de cada muestra de las 24 que contiene un “peine” dentro de las charolas de 4 peines. Se deben identificar cada una de las muestras para seleccionar aquellas que presentan el gen que se está buscando de acuerdo a las necesidades de los fitomejoradores (**Figura 2**).



**Figura 2.** Resultados de la amplificación vía electroforesis. En la primera columna se observan los controles aplicados y las columnas posteriores son cada una de las muestras.

## 2. *KASP (Kompetitive Allele Specific PCR Genotyping System)*

En este segundo método se utiliza un lector de placas que observa las fluorescencias aplicadas a las muestras. Cada una de ellas lleva un marcador que permite observar si la muestra que se está analizando presenta los genes que se están buscando y así de manera más rápida y eficaz descartar todas aquellas que no lo contienen, estos marcadores se van a identificar en una gráfica con ejes X y Y como VIC (Color verde) y FAM (Color azul). Esto se realiza en placas de 384 que fueron previamente llenadas por muestras contenidas en placas de 96 (**Figura 3**).



**Figura 3.** Lectura con programa Kluster Caller. Ejemplo de cómo se observan las muestras en una lectura de KASP de acuerdo a los parámetros determinados.

### Actividades realizadas

La secuencia de actividades llevadas a cabo en el trabajo de servicio social, se desarrollaron de la siguiente manera:

1. Recolección de las semillas de las 16 líneas de plantas con las que se trabajó.
2. Llenado de macetas con sustrato para la posterior siembra de las semillas en el invernadero optimizado del Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo.
3. Se sembraron las semillas, 3 por maceta en forma de triángulo (**Figura 4**).
4. Se regó con agua adicionada con nutrientes. El riego se realizó a lo largo de toda la duración del trabajo para el mantenimiento adecuado de las plantas.
5. Se esperó a que las plantas llegaran a un tamaño como se puede observar en la **Figura 5** para posteriormente tomar muestras de tejido vegetal.
6. Para tomar las muestras de tejido, se utilizaron unas tijeras y los tubos de 1.1 ml cada uno previamente mapeados en las cajas de 96 para colocar cada muestra en dichos tubos.
7. Se llevaron las muestras a un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas.
8. Se retiraron las muestras congeladas para llevarlas a la liofilizadora a  $-50^{\circ}\text{C}$ , se debe hacer vacío entre 0.0 y 0.120 mBar. Se mantuvieron dentro de la liofilizadora durante 48 horas para que secan (**Figura 6**).
9. Se llevaron a triturar las muestras en un Geno/Grinder a 1490 rpm durante 3 minutos. Esto es un estándar previamente establecido, lo importante con este paso es que cada muestra quede hecha polvo (**Figura 7**).
10. Se realizó la extracción de ADN siguiendo los pasos mencionados en *Extracción de ADN* del apartado de *Aislamiento del ADN Genómico de Plantas* de la *Metodología utilizada* para el presente trabajo.

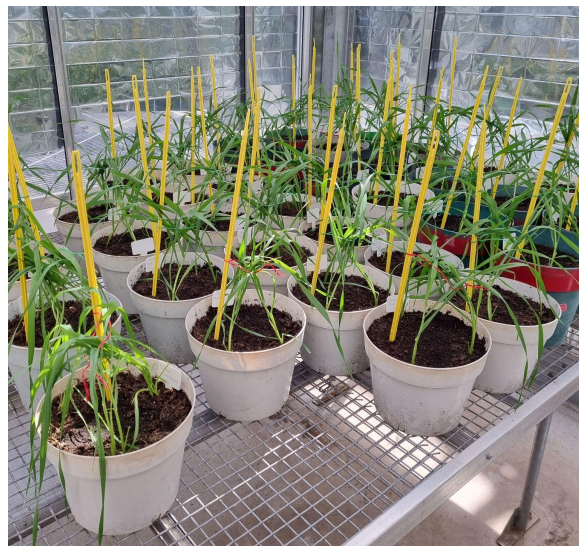


11. Al final se obtuvo la pastilla de ADN (**Figura 8**). Esta se dejó secar dentro de una campana de extracción hasta que el etanol se evaporara completamente
12. Se resuspendió la pastilla de ADN en 200  $\mu$ l de Tris-HCL (1mM, pH 8) para después hacer la cuantificación de ADN y evaluar su pureza con ayuda del NanoDrop 8000 (**Figura 1**).
13. Una vez realizada la cuantificación de ADN de las muestras, procedemos a hacer electroforesis y KASP.
14. Para **electroforesis**: Se prepara una dilución de 50 ng/ $\mu$ l de las muestras seleccionadas. Se colocan 100 ng de cada muestra diluida (2  $\mu$ l ADN + 5  $\mu$ l 1X Gel buffer) en los pozos del gel de agarosa al 0.7%. Se debe incluir al menos una línea de ADN sin cortar que funcione como marcador de peso molecular.
15. Se debe colocar el marcador deseado para revisar la calidad y la cantidad de la muestra de ADN. Correr el gel de agarosa a 70 V durante 90 minutos y visualizar el ADN.
16. Una vez terminado el programa, se enjuaga el gel con ddH<sub>2</sub>O y después se coloca en un transiluminador UV para obtener las fotografías de los resultados (**Figuras 10, 11, 12, 13 y 14**).
17. Para **KASP**: Se hicieron alícuotas en proporción 10/90 (10 $\mu$ l de ADN y 90 $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O) de las placas de 96 de las muestras de tejido, del cual previamente se hizo extracción. Las alícuotas se van a agregar en las placas de 384 junto con los controles identificados como VIC y FAM dependiendo el caso de cada marcador utilizado.
18. Para cada una de las 16 muestras se preparó una mezcla en tubos dentro de una charola de unicel con hielo para conservarlas. Cada una de estas contenían los siguientes reactivos:
  - ddH<sub>2</sub>O – 0.05  $\mu$ l
  - GoTaq – 2.0  $\mu$ l
  - 25 mM MgCl<sub>2</sub> – 0.6  $\mu$ l
  - dNTP Mix (2.5 mM c/u) – 0.8  $\mu$ l
  - Primers F+R (1.0  $\mu$ M c/u) – 2.5  $\mu$ l
  - ADN Polimerasa 5U/ $\mu$  – 0.05  $\mu$ l
  - ADN (10 - 50 ng/ $\mu$ l) – 4.0  $\mu$ l
19. Una vez que se tiene listo el tubo de cada muestra que vamos a tratar (16 líneas) se depositó la mezcla en unas pequeñas charolas de plástico previamente lavadas con ddH<sub>2</sub>O que lo que hacen es esparcir la mezcla en forma de línea para poder tomarla con una pipeta multicanal.
20. Se depositó la mezcla en las charolas de 384 con el ADN. Estas previamente se rotularon bajo el nombre “PT22GSBM - B02”, número de placa y SNP correspondiente (**Figura 9**).

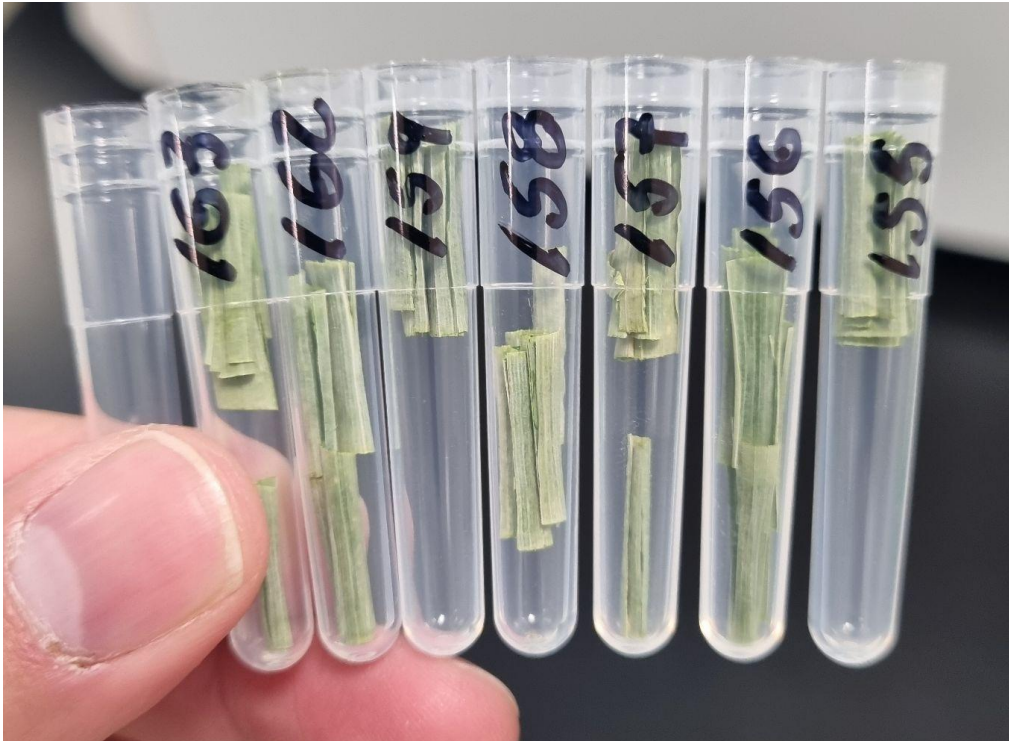
21. Se llevaron las placas al Termociclador ProFlex para aplicar el programa correspondiente de PCR.
22. Por último, se realizó la lectura KASP con el lector de placas BMG Labtech y se obtuvieron los resultados finales, estos se observan como en las **Figuras 15 y 16**.



**Figura 4.** Por maceta se sembraron 3 plantas. Cada una identificada con el marcador que se puede observar en la fotografía.



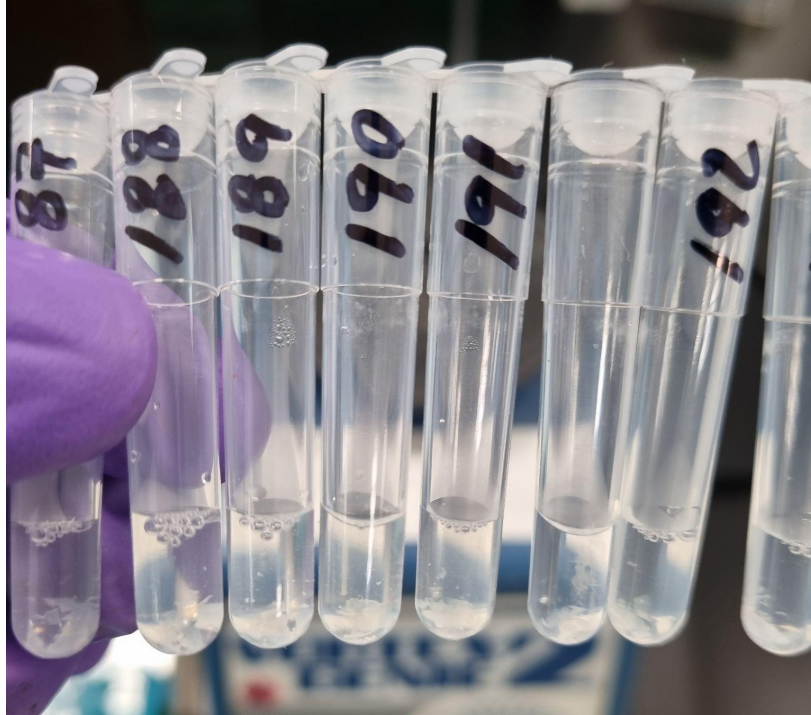
**Figura 5.** Fotografía de las 16 líneas de Intertek dentro del invernadero del Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo.



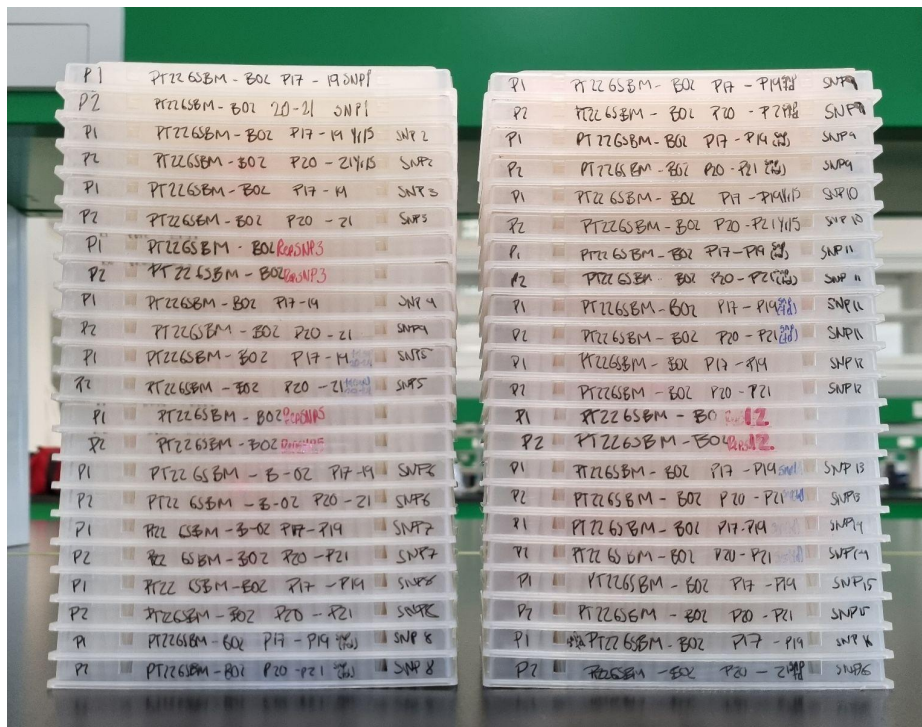
**Figura 6.** Tejido previamente congelado y liofilizado listo para trituración.



**Figura 7.** Tejido triturado con balines de acero inoxidable (véase el último tubo de la serie).



**Figura 8.** Resuspensión en 200  $\mu$ l de Tris-HCL (1mM, pH 8) para terminar el proceso de extracción y obtener la pastilla de ADN como se observa al fondo de cada tubo.



**Figura 9.** Placas de 384 con el ADN de cada una de las muestras que se leyeron en el lector de placas BMG Labtech.

## Objetivos y metas alcanzadas

En relación a los objetivos planteados, es posible concluir lo siguiente:

1. Se completó con éxito el proceso de extracción de ADN. La pureza de cada una de las muestras fue la adecuada para realizar posteriormente la amplificación de ADN vía electroforesis y también para realizar el método KASP de lectura de placas.
2. Comprendí los parámetros para hacer lecturas de placas con las tecnologías KASP y amplificación en gel de agarosa y así identificar la presencia de genes relacionados al rendimiento de plantas de trigo.
3. La interpretación de los resultados en el caso de amplificación vía electroforesis, consiste en visualizar las bandas donde se encuentran las muestras de ADN y comparar si se encuentran en la misma localidad que los controles. Con el método KASP se requiere más detalle por que en cada placa se deben establecer cuáles son los controles (Vacíos, VIC, FAM y Heterocigotos) y determinar cuáles muestras son las relevantes por la presencia de los genes que se están buscando.

## Resultados, discusión y conclusiones

Los resultados de la amplificación por electroforesis se pueden observar en las **Figuras 10 - 14**. Se aprecia la amplificación de los diferentes fragmentos de ADN separados de acuerdo a su peso molecular, diferenciados y comparados con un fragmento de peso molecular conocido.

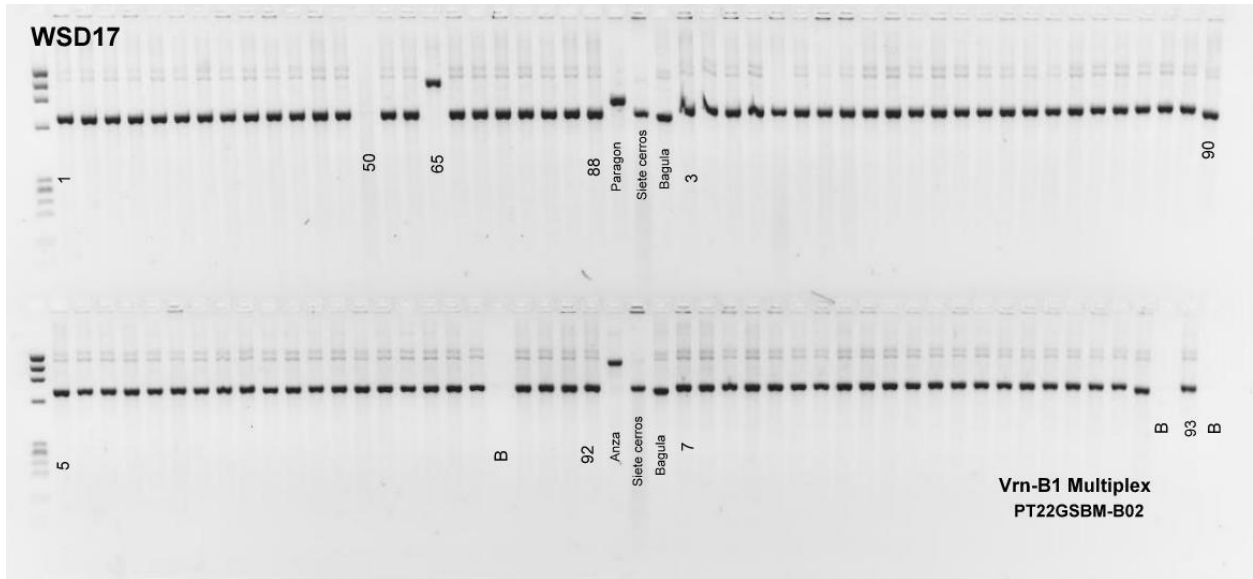


Figura 10. Resultados de electroforesis de la placa P17 PT22GSBM-B02.

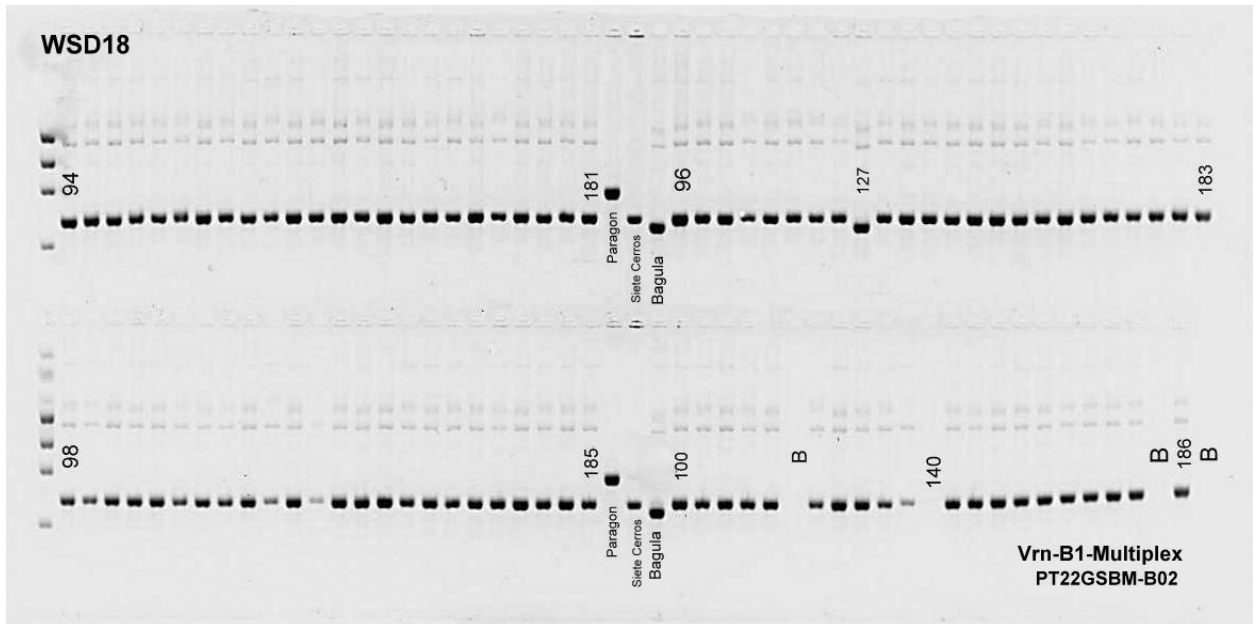
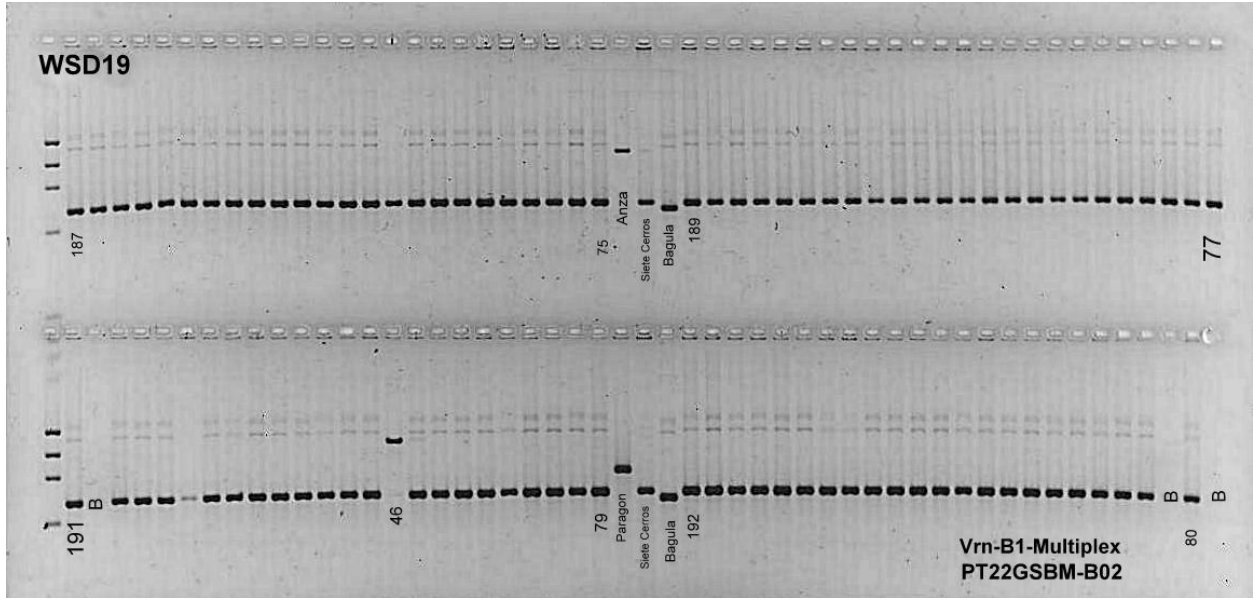
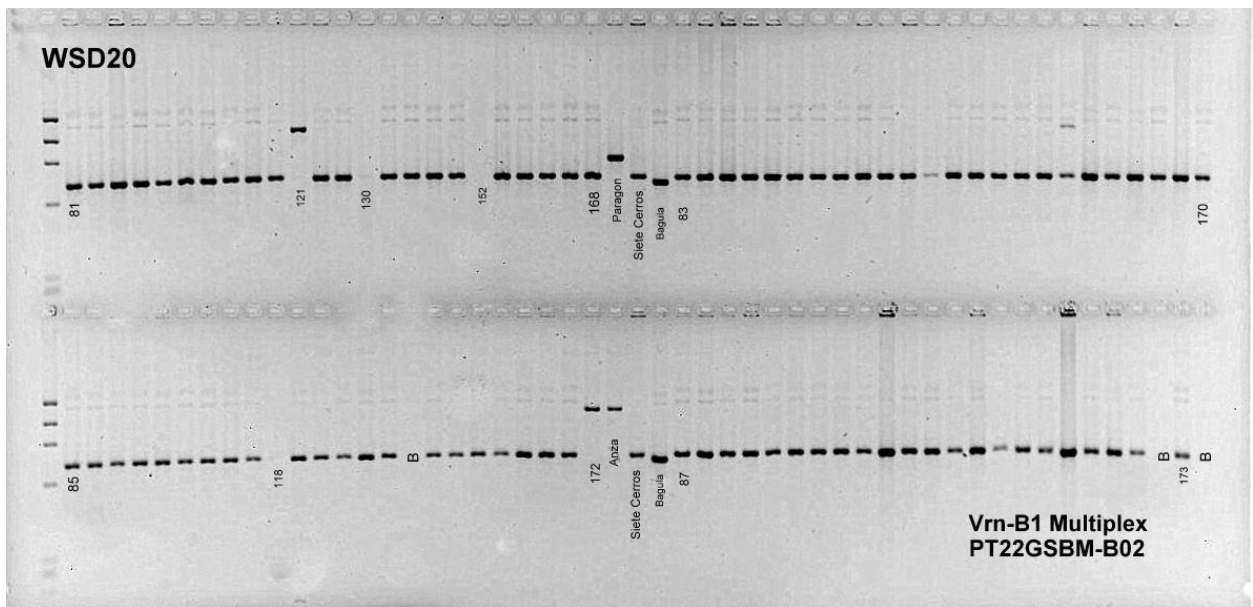


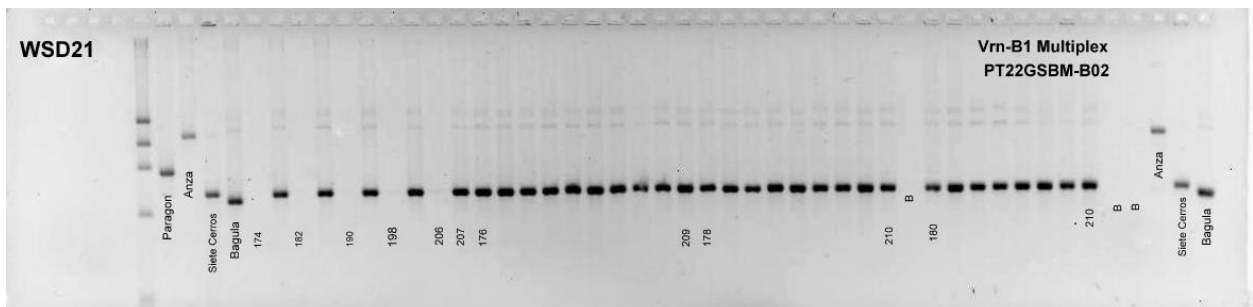
Figura 11. Resultados de electroforesis de la placa P18 PT22GSBM-B02.



**Figura 12.** Resultados de electroforesis de la placa P19 PT22GSBM-BO2.



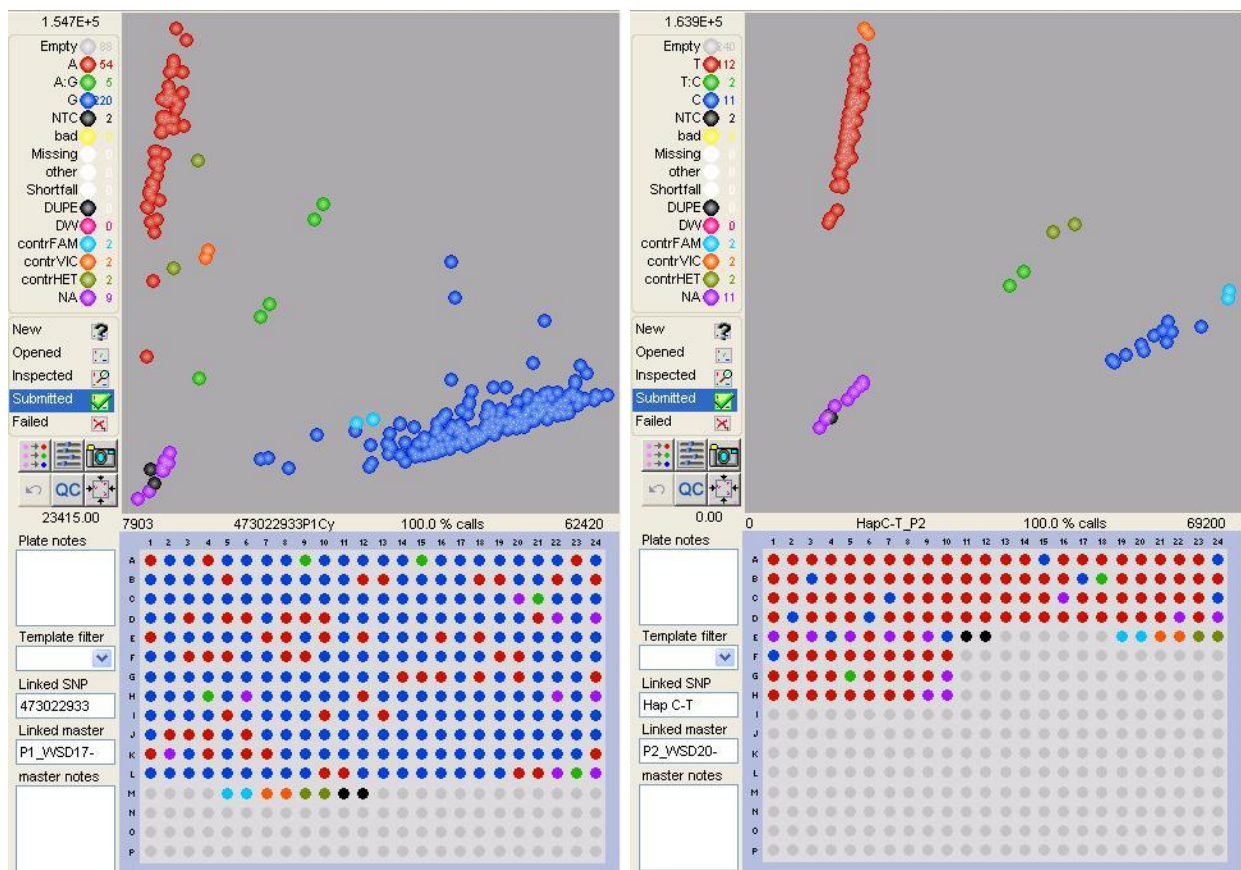
**Figura 13.** Resultados de electroforesis de la placa P20 PT22GSBM-BO2.



**Figura 14.** Resultados de electroforesis de la placa P21 PT22GSBM-BO2.

Los resultados de las lecturas de placas por el método KASP se obtuvieron como se muestran en las **Figuras 15** y **16**. Se pueden observar dos controles FAM (azul claro), dos controles VIC (naranja), dos controles Heterocigotos (verde olivo), dos vacios (negro), NA son las muestras que no amplificaron.

En la **Figura 15**, las muestras A (rojo) son aquellas con presencia del gen marcado con el control VIC, las muestras G (azul) son aquellas con presencia del gen marcado con el control FAM y las muestras A:G (verde) son aquellas donde se encuentra la presencia de ambos genes. Después de todo esto se hace un conteo y se sacan los porcentajes de cada muestra de las placas.



**Figuras 15 y 16.** Vista de la lectura de dos placas mediante el método KASP con el lector de placas BMG Labtech del Laboratorio de Mejoramiento Molecular del CIMMYT.

Los resultados, o bien los porcentajes de las lecturas KASP al ser información de carácter confidencial del CIMMYT, no pueden ser compartidos libremente, ya que se firmó un acuerdo de confidencialidad (**Anexo 1**).



Lo que sí es posible compartir es la lista de las líneas que se trabajaron (**Tabla 1**), los controles VIC y FAM que se usaron y los programas PCR que se les aplicó a cada una de las placas para revelar la presencia de genes relacionados al rendimiento.

**Tabla 1.** Lista de las líneas de Intertek con las que se trabajó en el proyecto de Servicio Social en el Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo (WMB) del CIMMYT.

CIMMYT SNP ID	PCR Program	DMSO/MgCl <sub>2</sub>	Check FAM	Check VIC	Check Heterozygote (Ratio)
CIMwMAS0106	snp(td)	Not necessary	Pavon F76, Seri M82	Opata M85, Weebill1	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0140	Yr15	2.5 Mgcl2	Spark, Avalon	Savannah, Cadenza	Null (Rialto)
CIMwMAS0028	snp(td)	Not necessary	Pavon F76, Wyalkatchem	Krichauff, Berkut1	2 Check VIC + 3 Check FAM
CIMwMAS0029	snp(td)	Not necessary	Krichauff, Tonichi	Pavon F76, Parula	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0040	td(snp20-24)	Not necessary	Chinese spring, Kite	Pavon F76, Pastor	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0043	snp(td)	Not necessary	Parula, Pastor	Chara, Siete Cerros	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0045	snp(td)	Not necessary	Tonichi, Parula	Bagula, Seri M82	2 Check VIC + 3 Check FAM
CIMwMAS0048	snp(td)	Not necessary	Yipti, wyalkatchem	Pastor, Atilla	Not necessary
CIMwMAS0123	snp(td)	2.5 Mgcl2	Opata M85, Chinese spring	Spark, Pavon F76	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0122	Yr15	2.5 Mgcl2	Savannah	Rialto	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0001	snp(td)	Not necessary	Pastor, Pavon F76	Tonichi, Opata M85	1.5 Check VIC + 3.5 Check FAM
CIMwMAS0094	snp(td)	Not necessary	Avocet, Thatcher	Parula, Pavon F76	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0056	snp(td)	Not necessary	Frontana, Parula	Pavon F76, Pastor	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0004	snp(td)	Not necessary	BW: Milan	BW: Avocet, Thatcher	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0138	snp(td)	Not necessary	Avocet, Thatcher	Super seri, Lr19/Sr25	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM
CIMwMAS0003	snp(td)	2.5 Mgcl2	Berkut1, Weebill	Pavon F76, Parula	2.5 Check VIC + 2.5 Check FAM

Todos los métodos y procedimientos realizados en el trabajo de servicio social son una pequeña fracción de todo el proceso que implica la estabilización de una nueva generación de plantas con genes de interés que los fitomejoradores están buscando.

A grandes rasgos, las herramientas que proporciona el Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo sirven para definir si el camino por el cual se está yendo a la hora de realizar cruces, es el correcto de acuerdo a los genes que se buscan adquirir para posteriormente dar solución a algún problema en materia de seguridad alimentaria en el mundo.

## **Recomendaciones**

Las recomendaciones que se pueden hacer respecto a trabajar en una institución de investigación como es el CIMMYT es que es muy importante el dominio del inglés por dos simples motivos: Uno, porque la gran mayoría de artículos, manuales y equipos con los que se trabaja manejan este idioma. Dos, la mayoría del personal que trabaja en CIMMYT es gente proveniente de otros países, por lo que el único idioma en común de igual manera es el inglés.

Es importante también ser profesional al momento de trabajar en espacios como los que proporciona CIMMYT, en ocasiones se trabaja con reactivos o equipos que pueden ser perjudiciales para la salud y pueden llegar a ocurrir accidentes. Por lo que es muy importante seguir las indicaciones que hace el personal encargado de cada uno de los laboratorios.

## Agradecimientos

A la Dra. Susanne Dreisigacker, por darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de servicio social en el departamento de Mejoramiento Molecular de Trigo. A Karen Castro, por apoyarme con toda la documentación requerida por ambas partes, el CIMMYT y la UAM Xochimilco. Al equipo del Laboratorio de Mejoramiento Molecular Bacilisa, Claudia, Yoloxochitl, Adriana, Alma, Silverio y Paulino por ayudarme, enseñarme cada proceso que llevan a cabo y hacer de mi estancia una gran experiencia.



## Fuentes consultadas

BMG Labtech (2022). *Fluorescence intensity*. Consultado el 13 de abril de 2022. Disponible en: <https://www.bmglabtech.com/fluorescence-intensity/>.

Bolívar, A., Rojas, A., García, P. (2014). *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización*. Facultad de Ciencias Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Christopher, A., (2018). *Electroforesis*. National Human Genome Research Institute en gel. Consultado el 22 de marzo de 2022. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis#:~:text=La%20electroforesis%20es%20una%20t%C3%A9cnica,a%20trav%C3%A9s%20de%20un%20gel.>

Dreisigacker, S., Sehgal, D., Reyes, A., Luna, B., Muñoz, S., Núñez, C., Molins, J., Mall, S. (2016). *CIMMYT Wheat Molecular Genetics: Laboratory Protocols and Applications to Wheat Breeding*. CIMMYT, Texcoco, México

Falcón, L., Valera, A., (2007). *Ecología Molecular, Las herramientas moleculares, Extracción de ácidos nucleicos*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. UNAM, México.

FAO, (2010). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, Parte 4, Sección C: Marcadores moleculares: Una herramienta para explorar la diversidad genética*. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 2010.

Juárez, A. (2019). *El mercado mundial y nacional del trigo*. El Economista, Opinión - Agronegocios. México.

LGC Biosearch Technologies, (2014). *KASP Genotyping Manual*. Consultado el 11 de abril de 2022. Disponible en: <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/kasp-explanation-fact-sheet.pdf>.

Rentaría, M. (2007). *Ecología Molecular, Las herramientas moleculares, Breve revisión de los marcadores moleculares*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. UNAM, México.

Serrato, A., Flores, Ll., Aportela, J., Sierra, E., (2007). *Ecología Molecular, Las herramientas moleculares, PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. UNAM, México.

**Anexo 1.** Apartados 5, 6 y 7 del Convenio Estudiante - CIMMYT, referentes a la propiedad intelectual y confidencialidad firmado por la Dra. Susanne Dreisigacker, encargada del Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Trigo (WMB) y el prestador de Servicio Social: Diego Valdez Palmero.

#### 4. PROPIEDAD INTELECTUAL Y PUBLICACIONES

4.1. Todo material, incluido, pero no limitado a información, datos crudos y procesados, métodos, diseños, mejoras ("Propiedad Intelectual") producto de la Investigación realizada por el Estudiante en el CIMMYT pasarán a ser propiedad del CIMMYT.

4.2. Dependiendo de las obligaciones que el CIMMYT haya contraído con terceras partes, el CIMMYT otorgará al Estudiante el derecho de hacer uso de la Propiedad Intelectual que resulte de la Investigación, sin costo alguno y de manera no exclusiva, con el propósito de continuar sus estudios.

4.3. No obstante la Cláusula 4.1, el Estudiante podrá utilizar los resultados del Servicio para la eventual generación de una tesis de licenciatura. En este caso, el Plantel Educativo o la Estudiante (dependiendo del sistema de adjudicación de propiedad intelectual interno del Plantel Educativo) serán los propietarios de la tesis de licenciatura. Así mismo, el CIMMYT podrá seguir usando sin restricciones los resultados de la Investigación en futuras actividades de investigación y desarrollo.

4.4. En todo reporte, póster o artículos publicados como resultado de la Investigación de la Estudiante deberá citarse al CIMMYT como institución anfitriona y patrocinadora o co-patrocinadora (cuando sea el caso) de la Investigación. La Estudiante deberá seguir los lineamientos del CIMMYT en lo referente a la publicación de resultados de la Investigación. Al publicar los resultados de la Investigación se atribuirá apropiadamente a los participantes según su contribución.

4.5. En caso de que el Estudiante utilice o cite material protegido por derechos de autor, publicado o inédito, o cualquier otro material protegido por derechos de propiedad intelectual (p. ej. por patentes, por protección de variedades vegetales, diseños, marcas registradas o de otro tipo ("Derechos de Terceras Partes"), el Estudiante deberá solicitar autorización anticipadamente ( en los casos en que esto aplique ) para utilizar los Derechos de Terceras Partes y proporcionará al CIMMYT una carta que de

4.6. constancia de dicha autorización. En caso de duda acerca de si los materiales que pretende usar están o no protegidos por derechos de propiedad intelectual, la Estudiante deberá consultarlo primero con el Coordinador y, de no aclarar su duda, con el Funcionario de Asuntos de Propiedad Intelectual del CIMMYT.

Centro Internacional de  
Mejoramiento de Maíz y Trigo  
Carretera México-Veracruz Km. 45  
El Batán, Texcoco, Edo. de México  
C.P. 56237 MEXICO

Tel: +52 (55) 5804 2004  
Fax: +52 (55) 5804 7558  
U.S. Tel. +1 (612) 605 5205  
Email: [cimmyt@cgiar.org](mailto:cimmyt@cgiar.org)  
[www.cimmyt.org](http://www.cimmyt.org)

4.7. El Estudiante está de acuerdo en indemnizar al CIMMYT contra cualquier costo, reclamos, y gastos, que surjan por lo incurrido con relación a cualquier reclamo hecho por terceros en caso de una violación a los Derechos de Terceras Partes.

4.8. Los derechos y los deberes proporcionados bajo esta sección 4 continuarán, a pesar de la terminación de este convenio o la ejecución de otras provisiones.

## 5. CONFIDENCIALIDAD

5.1 Si en el transcurso del Servicio en el CIMMYT, el Estudiante recibe información de carácter confidencial ("Información Confidencial"), el Estudiante hará uso de tal información únicamente para el desempeño de la Investigación y no podrá divulgarla a ninguna otra parte ajena al CIMMYT sin el consentimiento expreso y por escrito del CIMMYT. La información será confidencial ya sea porque esté clasificada como tal ("confidencial") o porque le sea comunicada de manera verbal en circunstancias que impongan la obligación de mantenerla como tal y que se pondrá por escrito y se clasificará como "confidencial".

5.2. La Información Confidencial no incluirá información que sea:

5.2.1. del dominio público a la fecha en que entra en vigor este convenio o que posteriormente se haga del dominio público, con excepción de la divulgación no autorizada por parte del Estudiante; y/o

5.2.2. que ya esté en posesión del Estudiante a la fecha de este convenio, con excepción de la divulgación no autorizada por parte del Estudiante; y/o

5.2.3. que tenga que divulgarse por decreto oficial.

5.3. Dependiendo de la Investigación que realice, podría pedírsele al Estudiante que acepte otras restricciones de confidencialidad, las cuales se le comunicarán por escrito cuando comience la Investigación.

## 6. TERMINACIÓN

6.1. Cualquiera de las partes puede dar por terminado este convenio:

6.1.1. Informándolo por escrito a la otra parte con por lo menos cinco (5) días hábiles de anticipación;

6.1.2. de inmediato y por escrito si una de las partes incumple alguna de las condiciones del presente convenio y en el caso de una infracción que pueda enmendarse y no se encuentra una solución en un término de cinco (5) días hábiles después de haber recibido el aviso de la infracción cometida.

6.2. A la terminación del presente convenio, la Estudiante de inmediato:

6.2.1. devolverá al CIMMYT todo bien material e información que éste le haya proporcionado para el desarrollo de su Servicio Social, incluida la Información Confidencial, y que esté en su poder y/o control; y

6.2.2. proporcionará por escrito al CIMMYT todos los pormenores de la Investigación y de los métodos que en ésta haya generado y estado utilizando.

6.3. Las obligaciones descritas en las cláusulas 4 y 5 seguirán vigentes a la terminación del presente convenio.

**7. RELACIÓN DE LAS PARTES**

7.1 **Está expresamente acordado que CIMMYT no mantiene una relación laboral con la Estudiante, ni tiene alguna obligación de proporcionarle un empleo o cualquier otro tipo de posición al término de su Servicio.**

7.2 **Las partes se comprometen a hacer su mejor esfuerzo por dar cumplimiento a las condiciones y términos asentados en el presente convenio. Sin embargo, en caso de que hubiera algún desacuerdo respecto a su interpretación y ejecución, las partes se comprometen a encontrar una solución, negociando de manera amistosa.**

7.3 **Los horarios establecidos para la realización de su Servicio son: asistencia a CIMMYT Batán Texcoco los días lunes, miércoles y viernes en un horario de 8:00 am a 13:00 pm a partir del 03 de Enero al 04 de Julio 2022, horario que deberá ser estrictamente respetado.**

CIMMYT

\_\_\_\_\_

Lic. Martha Miriam Mora Rojas

Recursos Humanos

\_\_\_\_\_

Dra. Susanne Dreisigacker

Supervisor

Aceptó y Confirmó

\_\_\_\_\_

Diego Valadez Palmero

Estudiante

Fecha: 03 Febrero 2022