



RED TEMÁTICA EN SALUD FORESTAL:

Actividad Específica:

Movilidad

Informe 2016:

Informe de actividades Silvia Edith García Díaz



Coordinador General:

Dr. David Cibrián Tovar

Coordinador de línea:

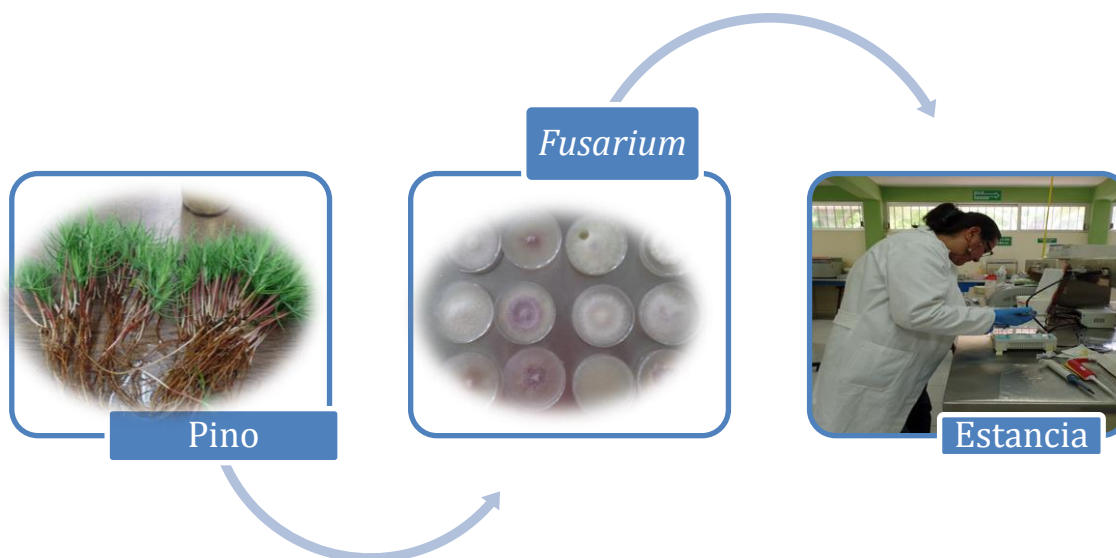
M.C. Silvia Edith García Díaz

Texcoco, Edo. de México, Diciembre de 2016

“TÉCNICA DE MICROSATELITES RAPD-PCR, ANÁLISIS DE DATOS, GENERACIÓN DE MATRICES BINARIAS Y DENDOGRAMAS, CON LA FINALIDAD DE OBSERVAR LA VARIABILIDAD EN LOS AISLAMIENTOS DEL HONGO *Fusarium circinatum* EN VIVEROS FORESTALES DE LA REGIÓN CENTRO”

Actividad específica de la Red Temática en Salud Forestal por Movilidad

DEL 6 AL 20 DE NOVIEMBRE DE 2016



Desarrollada por: M. C. Silvia Edith García Díaz

Responsable y tutor de la estancia: Dr. Arturo Reyes Ramírez



PROGRAMA DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES ESTANCIA AL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL, YUCATÁN DEL 6 AL 20 DE NOVIEMBRE

Responsable de la estancia: Dr. Arturo Reyes Ramírez

Alumna: M. C. Silvia Edith García Díaz

FECHA	ACTIVIDADES
El 7 de noviembre de 2016	El día lunes se revisó el material y equipo de laboratorio que se trabajaría durante la estancia en el laboratorio de Fitopatología, Microbiología y Genética molecular
El 8 de noviembre de 2016	Esterilización de material para el proceso del laboratorio en la autoclave, como tubos PCR, tubos ependorf, puntas azules, puntas amarillas, puntas azules, etc.
El 9 de noviembre de 2016	Revisión de DNA de las muestras para ver la cantidad de ADN en los tubos y seleccionar 8 muestras a trabajar en el laboratorio y determinar la variabilidad de coloraciones de las cepas de los aislamientos, preparar los iniciadores a utilizar OPA 1, OPA 4 y AO 3
El 10 y 11 de noviembre de 2016	Cálculo de la mastermix para 10 reacciones con el marcador molecular OPA 1 y OPA 4, realizar el RAPD-PCR con el programa del termociclador con la temperatura de alineamiento de 40° C y realización del gel al 1.5 % para la electroforesis, con el colorante Gel Roc XL, con un marcador 1 kb y verificación del gel en el fotodocumentador
El lunes 14 de noviembre de 2016	Cálculo de la mastermix para 10 reacciones con el marcador molecular OPA 3, realizar el RAPD-PCR con el programa del termociclador con la temperatura de alineamiento de 36° C. La realización del gel al 2% para la electroforesis cambiando

	el colorante Uviem TM 6 X loading D y E un marcador 1 kb y verificación del gel en el fotodocumentador
El 15 de noviembre de 2016	La realización del gel al 2% con 14 reacciones, marcador 1 kb y un negativo, para la electroforesis cambiando el colorante con bromuro de etidio, verificación del gel en el fotodocumentador. Buscar nuevos primers, pues se observó que no están amplificando con los que trabajamos al no generar bandas.
El 16 de noviembre de 2016	Extracción de DNA con el ZR Funga/Bacterial DNA MiniPrep Kit de 9 cepas de diferentes viveros con la finalidad de obtener nuevo ADN con diferente método de extracción y obtener mayor cantidad, Calidad y pureza del ADN.
El 17 de noviembre de 2016	Realizar más PCR con los nuevos ADN y seguir estandarizando la PCR con diferentes temperaturas de alineamiento (36 y 37° C) y nuevos marcadores OP24 y POH13
El 18 de noviembre de 2016	Se realizó una sesión de cómo se debió haber trabajado el análisis de datos y elaboración del dendograma, pues debido a que no funcionaron los marcadores no se logró llegar hasta esta etapa.



INTRODUCCIÓN

El polimorfismo entre individuos se evalúa por la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado cuando se utilizan cebadores o iniciadores de secuencia arbitraria y corta longitud. La presencia de dos o más alelos en un locus dentro de una población o muestra de individuos.

La PCR utiliza la enzima ADN polimerasa la cual copia de forma exponencial un fragmento de una región de la molécula de ADN. Además utilizan primers u oligonucleótidos, los cuales delimitan la región que será amplificada (Brown, 2010) y finalmente se produzcan suficientes cantidades de ADN para su análisis posterior con los microsatélites como el RAPD.

La técnica de RAPD (Random amplified polymorphic DNA), es una técnica que utiliza el mismo principio que el PCR, pero con la diferencia que ésta amplifica regiones específicas del genoma distribuidas al azar. Estas regiones después se separan mediante un gel de agarosa y se obtiene un perfil electroforético. Varios fragmentos de ADN son usualmente amplificados y alguno de estos pueden estar presentes en diferentes proporciones en los individuos de una población (Black, 1993).

La estancia inicial se había programado al Centro de Investigación de Yucatán A.C. en Mérida Yucatán (CICY) para la aplicación de Técnicas Moleculares para determinar huella genética para 20 muestras de *Fusarium circinatum* con 10 marcadores moleculares y análisis de datos, como generación de matrices binarias, dendrogramas y cálculo PIC (contenido de información polimórfica), pero para llevar a cabo la estancia se requería realizar el pago por capacitación y es un rubro que no cubre movilidad, por lo cual fue necesario realizar el cambio al Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, estableciendo los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Aprender y ajustar la técnica molecular RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado aleatorio y reacción en cadena polimerasa) con especies de *Fusarium*, para observar la variabilidad en los aislamientos de hongos en viveros forestales de la región centro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Conocer la técnica de RAPD (Random amplified polymorphic DNA), para encontrar variabilidad entre cepas aisladas de *Fusarium* spp. de los viveros forestales de la región centro.
- b) Ajustar la metodología para evaluar el polimorfismo de *Fusarium circinatum* de los viveros forestales de la región centro.

LISTA DE MATERIALES

Los materiales de consumo directos y la justificación de los mismos para la capacitación de Movilidad a los laboratorios de Fitopatología, Microbiología y Genética Molecular del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, actividad específica de la Red Temática en Salud Forestal, desarrollada por la M. C. Silvia Edith García Díaz y el Dr. Arturo Reyes Ramírez como responsable de la capacitación de la “Técnica de microsatelites RAPD-PCR, análisis de datos, generación de matrices binarias y dendogramas, con la finalidad de observar la variabilidad en los aislamientos del hongo *Fusarium circinatum* en los viveros forestales de la región centro”, del 6l al 20 de noviembre. Para el correcto desarrollo de la actividad fueron necesarios los productos que se enlistan a continuación.

ARTICULO	CANTIDAD	JUSTIFICACIÓN
ZR Funga/Bacterial DNA MiniPrep Kit	1	Es un Kit necesario para realizar la extracción del ADN de las cepas de los hongos de <i>Fusarium</i> .
Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar 450 G Dibico	1	Es un medio de cultivo necesario para realizar los reaislamientos de las cepas de los hongos de <i>Fusarium</i> preservados en aceite mineral.
Caja petri estéril 90x15mm, 500/caja	1	Son cajas Petri estériles grandes para vaciar el medio de PDA y reactivar las cepas.
Caja petri desechable esteril 60 * 15mm fabricada en poliestireno bolsas con	1	Son cajas Petri estériles chicas para vaciar el medio de PDA y tener los aislamientos puros de <i>Fusarium</i> .

20 400pzs/caja		
Gel Red TM Nucleic Acid Gel Stain, 10000X in water (0.5 mL).	1	Es un colorante necesario para la tinción en la electroforesis para la formación de bandas en gel agarosa.
Primer CGA GGT TCG C	2	Se requieren iniciadores o primers que reconocen un fragmento de ADN de 10 nucleótidos que flanquean la región a amplificar específica a <i>Fusarium</i> sp. para observar variabilidad en los aislamientos.
1kb DNA Ladder. Marcador de peso molecular	1	Marcador molecular que se usó para correr el producto de PCR en gel de agarosa
GoTaq Flexi DNA Polymerase, (500 ul)	1	Es una enzima muy importante en la replicación, ya que es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN.
dNTP Mix. Solución pre mezclada de sales de sodio de dATP, dCTP, dGTP y dTTP	1	Son desoxinucleótidos trifosfato, necesarios en la PCR, se desplazan hacia la parte desarrollada del ADN y se colocan por complementariedad enfrente de la base que les corresponde (A=T, C=G) de la cadena que actúa como molde y una vez que están en el sitio adecuado se unen entre sí por la acción de la polimerasa III.
Puntas amarillas de 200 ul presentación: 1000 piezas marca: AXYGEN	1	Se utilizan bastante durante todo el proceso para la PCR (es una técnica molecular que permite <i>in vitro</i> obtener millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula).
Puntas azules de 1000 ul presentación: 1000	1	Se utilizan bastante durante todo el proceso para la PCR (es una técnica molecular que permite <i>in vitro</i>

piezas marca: AXYGEN		obtener millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula).
Puntas blancas de 0.5-10 ul presentación: 1000 piezas marca: AXYGEN	1	Se utilizan bastante durante todo el proceso para la PCR (es una técnica molecular que permite <i>in vitro</i> obtener millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula).
TAE Buffer, 10X, Molecular Biology Grade.	1	Es utilizado cuando se lleva a cabo la electroforesis para la formación de diversas bandas que nos indicaran la variabilidad entre las cepas.
Tubos para PCR de 0.2 ml presentación: 1000 piezas marca: AXYGEN	2	Son necesarios para realizar la PCR en el termociclador y se ocupan bastante, ya que dentro de la técnica se tiene que estar realizando varias PCR para ajustar los primers que mejor se comportan para tener la variabilidad de <i>Fusarium sp.</i>
Tubos ependor de 1.5 ml de 500 piezas marca: AXYGEN	2	Son necesarios para realizar mezclas y reacciones durante la PCR y son desechables, no pueden volver a ocuparse pues se trabajan diferentes ADN.
Enzima de restricción Alu I, (500u). Reactivos para la reacción de restricción de Alu I con sitio de reconocimiento AGCT y produce extremos romos	1	Es un enzima con la secuencia Alu, que es un fragmento de ADN de aproximadamente 300 pares de bases y podrán analizar todo tipo de polimorfismos genéticos.
Enzima de Restricción Cfo I, (3,000u).	1	Es una enzima con la secuencia Cfo I, que es un fragmento de ADN de aproximadamente 530 pares

Reactivos para la reacción de restricción de CfoI con sitio de reconocimiento GCGC y produce extremos romos.		de bases y podrán analizar todo tipo de polimorfismos genéticos.
--	--	--

METODOLOGÍA

Se tuvo que realizar la preparación y esterilización del material que se iba a utilizar durante el desarrollo del proceso de la técnica.

Se realizaron varios RAPD-PCR con diferentes iniciadores que se tenían en el laboratorio de Microbiología y Genética Molecular del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán. Del Dr. Arturo, como se muestra en el cuadro 1., con 10 nucleótidos y modificación en las temperaturas de alineamiento para comenzar a probar la técnica con las muestras de ADN de los *Fusarium* spp., obtenidos en los viveros forestales de la región centro, en lo que se lograba obtener el primer CGA GGT TCG C específico para *Fusarium* spp.

Cuadro. 1. Iniciadores probados para la técnica de RAPD para *Fusarium* sp., con 10 nucleótidos.

Iniciador	Secuencia	Temperatura de alineamiento
OPA 4	5' AATCGGGCTG 3'	36 °C
OPA 1	5' CAGGCCCTTC 3'	36 °C
OPA2	5' AGGCTGTGCT 3'	(-37.4) ósea 36.4 °C
POH13	5' GACGCCACAC 3'	(-38.7) ósea 37.7 °C
AO3	5' TGCCTCGCACCA 3'	36 °C

Se realizó primero la RAPD-PCR siguiente:

Se seleccionaron las muestras de ADN que fueron: SF2, SF3, SF7, SF14, SF19, SF26 y SF33 como se muestra en el **Cuadro 2.**, y la **Figura 1.**, con los datos de diferentes viveros y se prepararon tres iniciadores para trabajar OPA-1, OPA-3 y OPA-4 (se colocaron 90 μ L DNA Elution Buffer y 10 μ L del iniciador).

Cuadro 2. Muestras de aislamientos de *Fusarium* spp., y extracción de ADN de muestras de pino en viveros forestales.

Clave del aislamiento	Hospedante	Fuente	Vivero	Estado
SF2	<i>P. montezumae</i>	LMF	VFM_Atlangatepec	Tlaxcala
SF3	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Los Insurgentes	Puebla
SF7	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	Hidalgo
SF14	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Ixtlahuaca	Puebla
SF19	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. De México
SF26	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. De México
SF33	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VF_Ixtlahuaca	Puebla

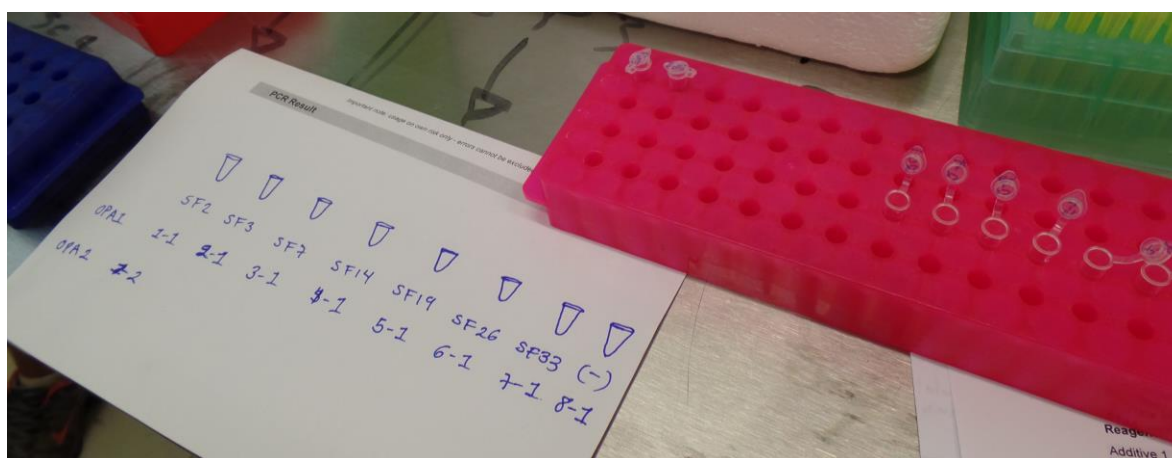


Figura 1. ADN de *Fusarium* spp para realizar el RAPD-PCR de cepas.

Para ajustar la metodología de la técnica de Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), se probaron diferentes iniciadores, diferentes temperaturas de alineamiento, diferentes colorantes aplicando el Gel Red TM Nucleic Acid Gel Stain, 10000X in water (0.5 mL) y el bromuro de etidio 0.5 µg/mL. Se prepararon las mastermix con un programa de Biometra dependiendo del número de muestras como se muestra en la **Figura 2**.

Important note: usage on own risk only - errors cannot be excluded! 10/11/2016

Protocol: RAPDS **Biometra**

PCR mastermix setup

No. of reactions: 10 rxn
Reaction volume per rxn: 25 µl
Safety margin: 0 %

Biometra - your source for Biometra products in Germany.
You're located elsewhere?
Find your local distributor at www.biometra.com

Reagent	Stock conc.	Final conc. in reaction
Additive 1		
Additive 2		
PCR Buffer	10 X	1.0 X
Mg conc of buffer	mM	1.0 mM Mg total
separate Mg solution	50 mM	
dNTPs	10 mM each	0.2 mM each
Forward primer	10 µM	1.0 µM
Reverse primer	10 µM	µM
Polymerase	5.0 U/µl	1.0 U
Template	100 ng/µl	100 ng
PCR grade water		

Mastermix setup (µl)

Additive 1	
Additive 2	
25.00 µl	PCR Buffer
5.00 µl	separate Mg sol.
5.00 µl	dNTPs
25.00 µl	Forward primer
	Reverse primer
2.00 µl	Polymerase
178.00 µl	PCR grade water
240.00 µl	TOTAL MASTERMIX

Aliquot per single rxn 24 µl of Mastermix per tube and add 1 µl of Template

Important note: usage on own risk only - errors cannot be excluded!

PCR Result

Figura 2. Preparación del Mastermix para *Fusarium* spp para realizar el RAPD-PCR.

Se probó también un programa ajustado para *Fusarium equiseti* en el termociclador bajo el siguiente programa y se fue ajustando de acuerdo a diferentes tipos de temperatura de alineamiento.

Programa para RAPDS del Termociclador

Inicio: 12:30

Finaliza: 3:30

Desnaturalización a 95 °C por 2 min

Desnaturalización 30 ciclos

94 °C por 1 min

54 °C por 30 seg
72 °C por 1 min
Extensión Final a 75 °C por 5 min
Almacenamiento a 4 °C

Como no se obtuvieron amplificaciones favorables y no hubo formación de bandas en la electroforesis, se procedió a obtener extracción de ADN de las colonias con 7 días de crecimiento de las cepas SF3, SF10, SF11, SF13, SF14, SF45, SF48 y SF49 como se muestra en el **Cuadro 3** y **Figura 3**.

Cuadro 3. Cepas de *Fusarium* spp., en los viveros forestales de la región centro.

Clave del aislamiento	Hospedante	Fuente	Vivero	Estado
SF3	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Los Insurgentes	Puebla
SF10	<i>P. greggii</i>	Semilla	VF_Ixtlahuaca	Puebla
SF11	<i>P. greggii</i>	Raíz	VF_Monte_Noble	Hidalgo
SF13	<i>P. montezumae</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. De México
SF14	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_Ixtlahuaca	Puebla
SF45	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Temamatla	Edo. De México
SF48	<i>P. pseudostrobis</i>	Raíz	VF_DiCiFo	Edo. De México
SF49	<i>P. greggii</i>	Raíz	VFM_Morelos	Morelos

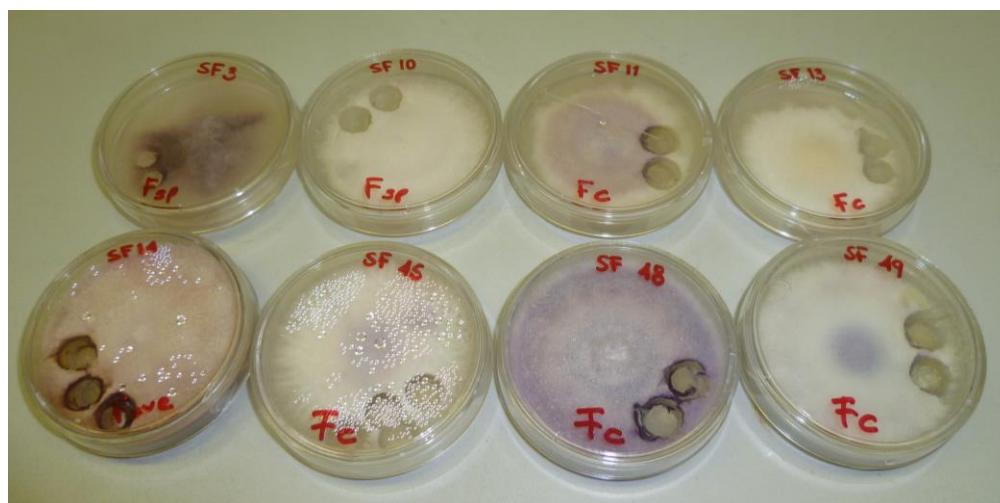


Figura 3. Cepas de *Fusarium* spp. para realizar extracción de ADN y realizar nuevos RAPDS-PCR.



Se realizó la extracción de ADN de los aislamientos de hongos SF3, SF10, SF11, SF13, SF14, SF45, SF48 y SF49 según el siguiente protocolo y el kit:

Protocolo del kit ZRFungal/Bacterial DNA MiniPrep TM

- 1.- Adicionar 200 mg de micelio en el tubo con perlitas (Tubo 1) y añadir 750 μ L de solución lisis (Sol. 1)
- 2.- Llevar a vortex hasta homogenizar la solución (Sol. 1) con el contenido del tubo (Tubo 1)
- 3.-Centrifugar a 10,000 rpm por 1 min
- 4.- Transferir 400 μ L del sobrenadante del Tubo 1 al Tubo 2 (Tubo de tapa naranja con el Tubo colector, previamente roto la base) y centrifugar a 7,000 rpm por min
- 5.-Añadir 1, 200 μ L de Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer en el Tubo 2 y mezclar suavemente
- 6.- Transferir 800 μ L a la Columna dentro de un tubo colector y centrifugar 10,000 rpm por 1 min
- 7.-Descartar la solución del tubo colector y repetir el paso 6
- 8.-Transferir la columna a un nuevo tubo colector adicionar 200 μ L de Buffer Pre-wash y centrifugar 10, 000 rpm por 1 min
- 9.- Adicionar 500 μ L de Buffer de lavado (Wash) y centrifugar a 10, 000 rpm por 1 min
- 10.- Transferir en un tubo de microcentrífuga de 1. 5 Ml estéril la columna, agregar 50 μ L de Buffer de Elución directo a la columna y centrifugar a 10, 000 rpm por 30 s.

Se realizó la electroforesis a 80 voltios por 30 minutos y se preparó el gel agarosa al 1.4 %, los geles se visualizaron en un fotodocumentador BIO RAD.

RESULTADOS

Las muestras de ADN de los aislamientos de *Fusarium* spp., con las cepas SF2, SF3, SF7, SF14, SF19, SF26 y SF33; con el colorante Gel Red, después de realizar el RAPD-PCR por 4 horas y media, no amplificó con el iniciador OPA-01 y OPA-02, al visualizar el gel no formo bandas e incluso el marcador molecular 1 KB no se observó, por lo cual se tuvo que cambiar de colorante (**Figura 4**).

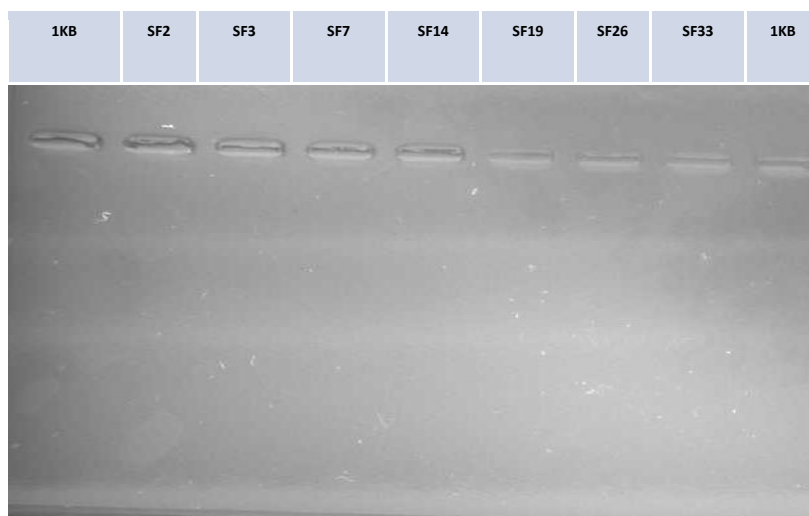


Figura 4. Gel de electroforesis de las cepas de *Fusarium* spp., para observar la formación de bandas con RAPDS-PCR.

Se repitió otro proceso para RAPD-PCR con las mismas muestras cambiando la temperatura de alineamiento pues la anterior fue muy alta de 54 se cambió a 36 °C, otra modificación fue se cambió el colorante por bromuro de etidio. Repitiendo los mismos iniciadores OPA-01 y OPA-02 al visualizar el gel no amplificaron los primers, pero ya se pudo observar el marcador molecular 1 KB (**Figura 5**).

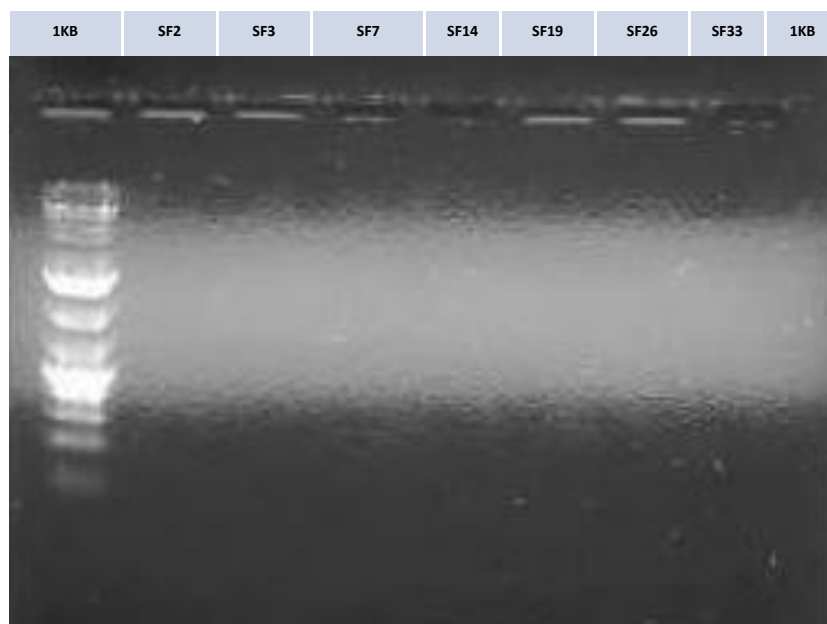


Figura 5. Gel de electroforesis de las cepas de *Fusarium* spp., para observar la formación de bandas con RAPDS-PCR (note que únicamente amplifico el marcador molecular).

Se repitió otro proceso con las cepas SF2, SF3, SF7, SF14, SF19, SF26 y una cepa como positivo con *Fusarium equiseti* (Fe), para RAPD-PCR con las mismas muestras cambiando la temperatura de alineamiento a 37 °C, se utilizó el colorante bromuro de etidio. El iniciador POH13, al visualizar el gel no amplificó el primers, ni con la cepa que se utilizó como positivo de *F. equiseti* que ya se había probado con este iniciador, por lo cual no hubo formación de bandas, pero se observó la amplificación del marcador molecular 1 KB (Figura 6).

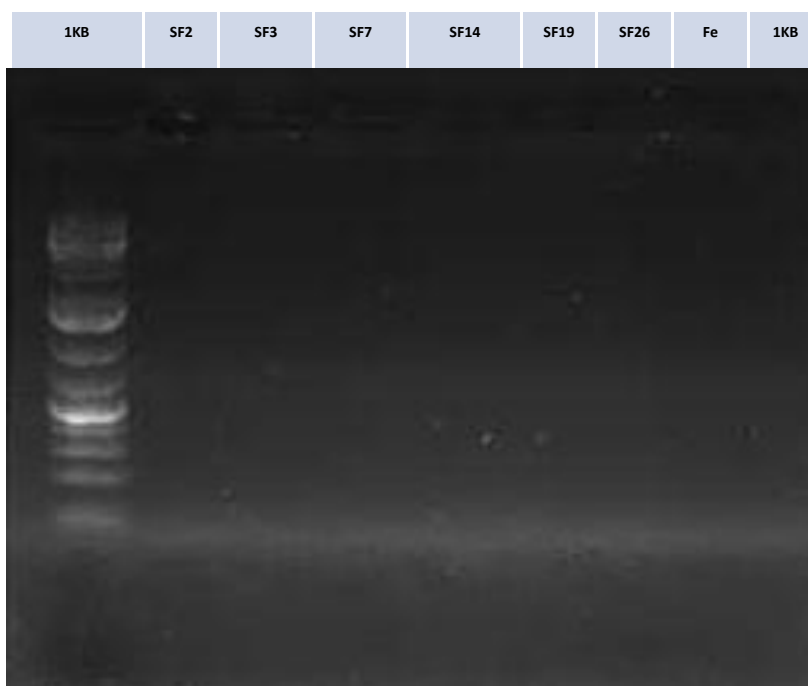


Figura 6. Gel de electroforesis de las cepas de *Fusarium* spp., para observar la formación de bandas con RAPDS-PCR (note que únicamente amplifico el marcador molecular).

Al no tener amplificaciones con las extracciones de ADN se realizaron nuevas extracciones de cepas SF3, SF10, SF11, SF13, SF14, SF45, SF48 y SF49 con el protocolo del kit ZRFungal/Bacterial DNA MiniPrepTM, para obtener una buena cantidad y calidad de ADN y descartar que fuera el ADN el que ya estaba fallando, posiblemente ya se hubier degradado, como se muestra en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Cuantificación con el Nanodrop de la cantidad y calidad del ADN de las cepas de 7 días de crecimiento de *Fusarium* spp., de los viveros forestales.

Cepa	Unidades ng/μL	260/280	260/230
SF3	8.6	1.68	0.172
SF10	13.7	1.39	0.275
SF11	29.9	1.72	0.598
SF13	41.3	1.78	0.826

SF14	35.9	1.81	0.718
SF45	23.9	1.69	0.479
SF48	28.0	1.29	0.560
SF49	27	1.6	0.541

Se realizó una electroforesis para observar la presencia del ADN de las muestras y se pudo observar la presencia de bandas que indican la existencia de ADN, donde no se pudo observar una buena calidad de ADN fue en las cepas SF14 y SF49.

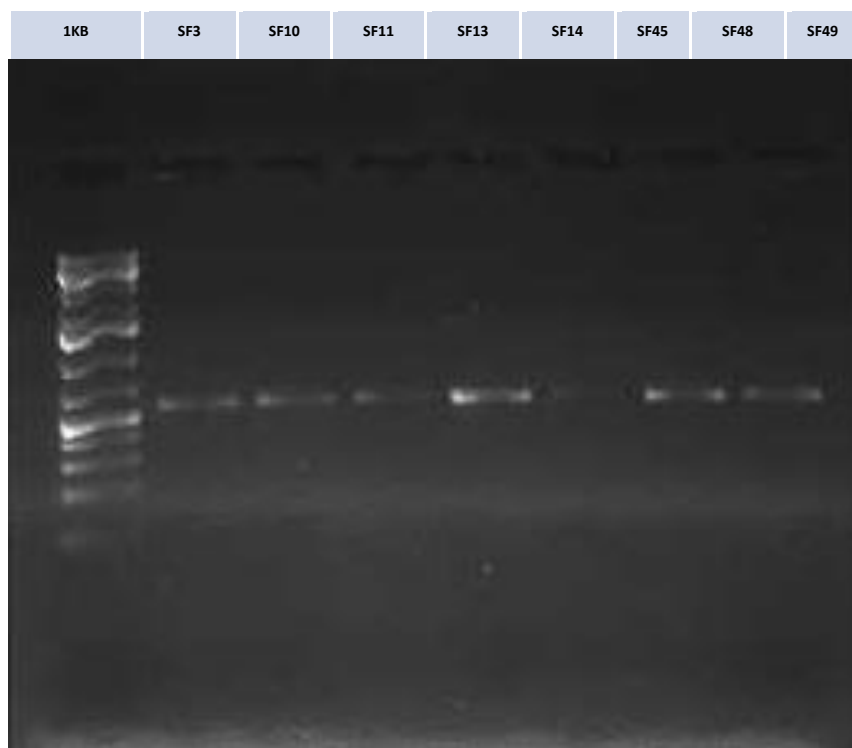


Figura 7. Gel de electroforesis de las cepas de *Fusarium* spp., para observar la cantidad y calidad de ADN.

Se realizó una PCR normal con las cepas SF3, SF10, SF11, SF13, SF14, SF45, SF48 y SF49 (Figura 8) para observar si había amplificación, observando que las cepas SF3 y SF10 formaron una banda muy débil e incluso en el trabajo de investigación, se ha tenido mucha dificultad con estas dos cepas. Una vez realizado la extracción de ADN, se había cuantificado la cantidad y calidad de ADN con el Nanodrop y con la electroforesis, se tenía la garantía de que no podía haber problemas con el ADN de las cepas de *Fusarium* spp. y poder probar nuevamente el iniciador para realizar un RAPDS-PCR nuevamente.

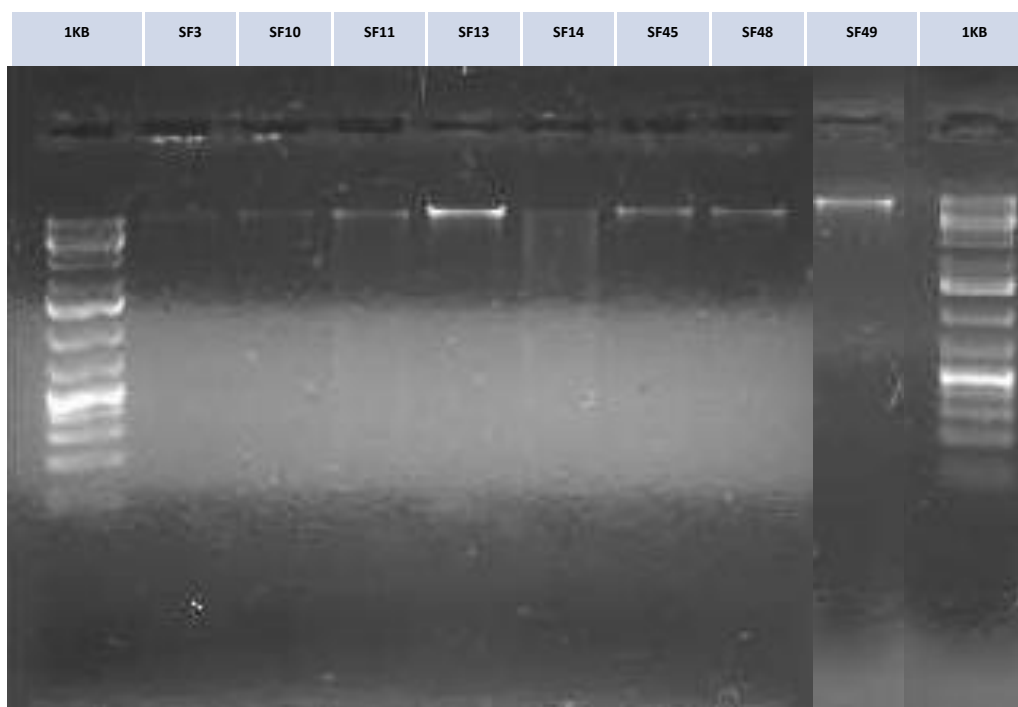


Figura 8. Gel de electroforesis de las cepas de *Fusarium* spp., para observar la formación de bandas en la PCR.

Se realizó nuevamente una RAPD-PCR con las muestras con temperatura de alineamiento de 36 °C, con el colorante bromuro de etidio. Repitiendo los mismos iniciadores OPA-01 y OPA-02 al visualizar el gel no amplificaron los primers, únicamente se pudo observar el marcador molecular 1 KB. Es necesario seguir probando más Primers específicos a *Fusarium* como el primer CGA GGT TCG C, el cual se manda sintetizar y se realizan más pruebas hasta estandarizar el protocolo para las cepas de *Fusarium* spp. de viveros forestales de la región centro.

Los polimorfismos esperados con la técnica RAPD para *Fusarium* spp., se denominan marcadores RAPD, y pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde. Como regla general, el tamaño de las variantes se detecta muy escasamente y los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus (**Figura 9**). En los estudios de herencia, los productos de amplificación se comportan como marcadores dominantes, esto era parte de los resultados esperados al ajustar la metodología pero se requería mayor tiempo (3 a 6 meses) para ajustar la técnica y poder estandarizar el protocolo de RAPD-PCR y la movilidad solo fue de dos semanas.

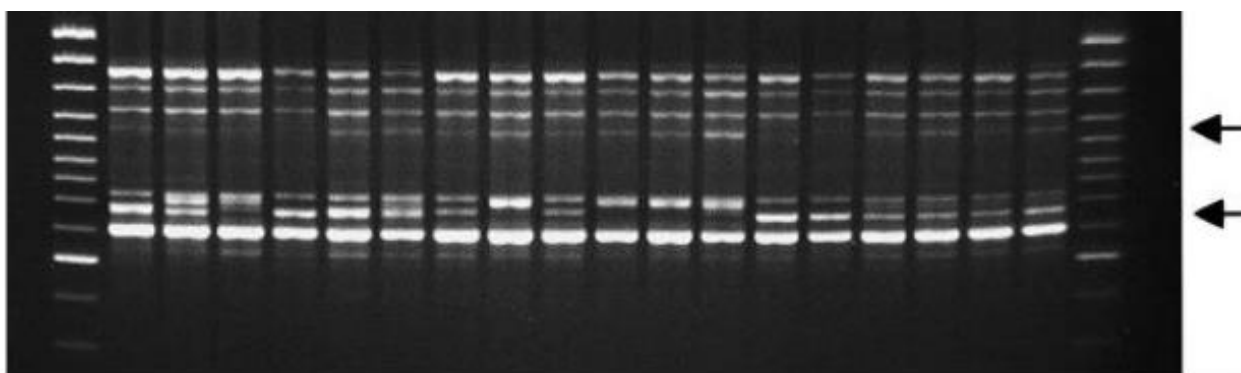


Figura 9. Resultados de la amplificación de los RAPDS (note la formación de bandas donde se presenta polimorfismo en las muestras) que permite estimar la variabilidad genotípica de muestras muy parecidas.

Durante la estancia se tuvo el conocimiento y la formación para continuar con el ajuste de la técnica y metodología para continuar trabajando en un futuro con la variabilidad de las cepas de *Fusarium circinatum* de los viveros forestales de la región centro. En la **Figura 10** se muestra un esquema de la metodología de RAPD-PCR.

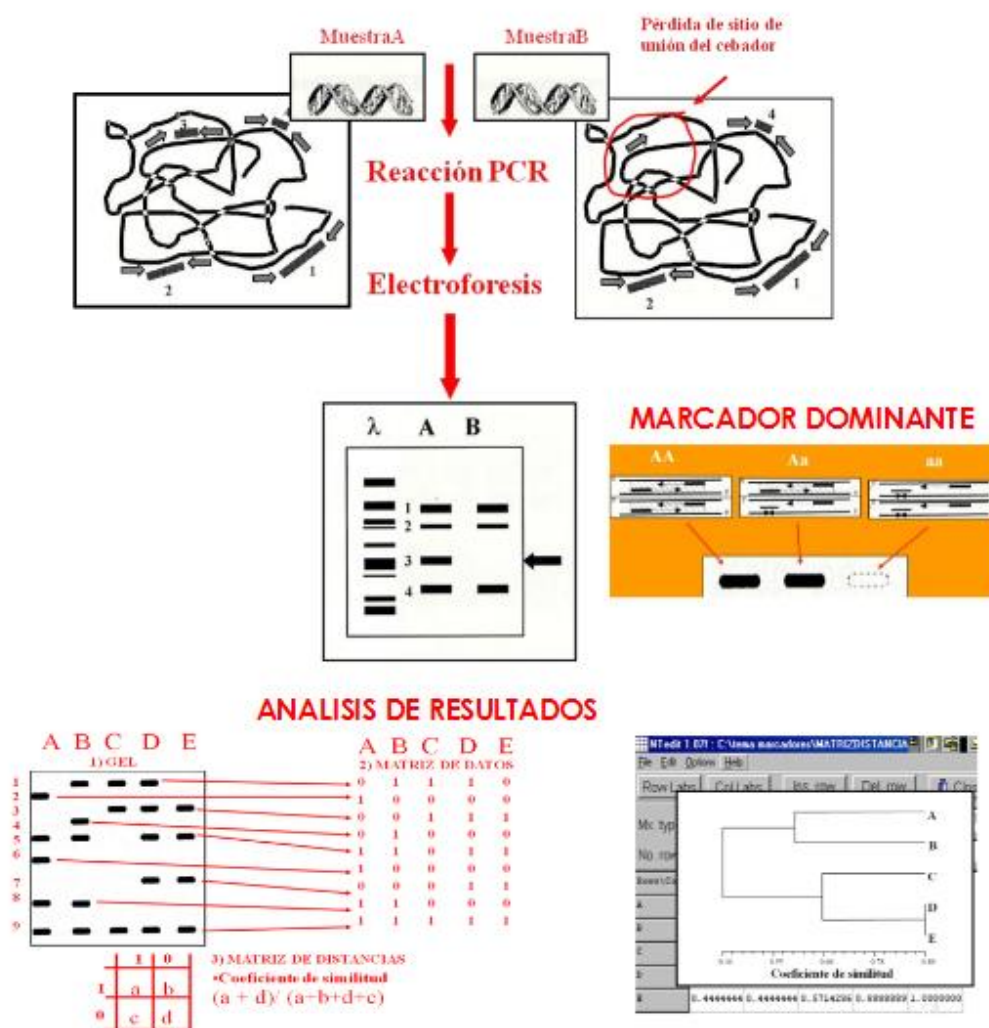


Figura 10. Esquema del resumen de la metodología de los RAPDS. Universidad Politécnica de Valencia.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se dio una plática de cómo realizar el análisis de resultados se crea una matriz binaria o doble estado, de presencia (1) ó ausencia (0). **Cuadro 5.** Luego se calcula la cantidad de alelos presentes y se obtiene el número de bandas polimórficas. Por ultimo se construye un dendrograma UPGMA.

Cuadro 5. Matriz binaria.

Muestra	Locus 400	Locus 200	Locus 170
M1	1	0	1
M2	0	0	1
M3	0	0	1
M4	1	0	0

CONCLUSIONES

- a) A pesar de que las amplificaciones resultaron negativas con los iniciadores probados (OPA4, OPA1, OP24, POH13 y AO3), se cumplió con el objetivo de conocer la técnica de RAPD (Random amplified polymorphic DNA), para encontrar variabilidad entre cepas aisladas de *Fusarium* spp. de los viveros forestales de la región centro y posteriormente continuar con la estandarización para este trabajo de investigación.
- b) No se logró evaluar el polimorfismo de *Fusarium circinatum* de los viveros forestales de la región centro, debido a que solo se realizó la estancia por dos semanas y este trabajo requiere de un tiempo mínimo de 4 a 6 meses para el proceso de estandarizar la técnica de RAPD-PCR y RFLPS.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto 271546, Red Temática de Investigación en Salud Forestal apoyada por CONACYT-CONAFOR, por su apoyo para la movilidad y conocimientos adquiridos para la técnica de RAPD (Random amplified polymorphic DNA).



GASTOS DE LA MOVILIDAD

ACTIVIDAD	MONTO	OBSERVACIÓN
Hospedaje por 10 días	\$ 11,474.70	El hotel se cubrió a partir del 9 de noviembre de 2016
Alimentación	\$ 4,573.95	
Material de Laboratorio	\$ 24,823.80	
Peajes Locales	\$ 395	
Monto total	\$ 41, 267.45	

LITERATURA CONSULTADA

Black, W. C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. Insect Molecular Biology 2: 16.

Brown, T. A. 2010. The Polymerasa Chain Reaction. Pp:117-120. In Gene cloning & ADN analysis an Introduction. Ed. Sixth. Wiley - Blackwell. University of Manchester. Manchester.

Woo, S. L., F. Scala, M. Ruocco, and M. Lorito. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp, pathogenic fungi, and plants. Phytopathology 96: 181-185.

ANEXO FOTOGRÁFICO



