

Optimización de protocolos para extracción de ADN de especies vegetales de importancia regional

Medina, María¹; Severgnini Poggio María¹; Da Silveira Chiacchiera, Andrea¹; Pietrantrueno, María¹; Cuelho, Abril¹; Benítez, Avril¹; Candel, Nancy¹; Lagadari, Mariana^{1,2}; Rodríguez, Viviana^{1,2}.

Autores: ¹Laboratorio GenBio. Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos. Mons. Tavella 1450. Concordia, Entre Ríos, Argentina.

²Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Entre Ríos- ICTAER (UNER-CONICET)

Contacto: viviana.rodriguez@uner.edu.ar

ARK: <http://id.caicyt.gov.ar/ark://tsgkwl0gd>

Resumen

Entre Ríos posee gran diversidad en su sector productivo siendo actualmente arándano, citrus, arroz y pecán las especies vegetales de mayor importancia económica. Prioriza variedades de cultivares por su buena adaptación al clima y al suelo permitiendo una amplia ventana de producción, como así también libres de enfermedades, razón por la cual se ubica entre las primeras provincias productoras y exportadoras a nivel nacional.

La puesta a punto de la extracción de ADN es importante en estos programas de mejora ya que es el punto de partida de estudios para desarrollar variedades con características favorables y altos rendimientos. La variabilidad observada en las especies vegetales de importancia económica hace imposible la estandarización de una única metodología, y por otro lado, la calidad del material resulta fundamental para iniciar proyectos exitosos y arribar a resultados fiables. En el presente trabajo se estandarizaron tres métodos de extracción de ADN, con sus modificaciones, en las variedades de interés analizadas.

Palabras claves: Arándano, arroz, pecán, citrus, ADN, genética

Objetivos propuestos y cumplidos

Objetivo general

Puesta a punto de la extracción de ADN de origen vegetal de especies de importancia económica en la región.

Objetivos específicos

- Poner a punto técnicas de extracción ADN, utilizando como matriz tejidos de especies vegetales cultivadas en la región.
- Comparar el ADN resultante de las metodologías de extracción realizadas.
- Establecer si la calidad del ADN es apta para posteriores estudios moleculares.

Marco teórico y metodológico (síntesis)

Marco teórico

Entre Ríos es una provincia que tiene mucha diversidad en su sector productivo, siendo el arándano, el citrus, el arroz y el pecán las especies vegetales de mayor importancia económica. Los productores buscan continuamente obtener mejores rindes y aceptabilidad por parte de los consumidores. Estas variables pueden modificarse para desarrollar nuevas y mejores variedades de plantas recurriendo a la combinación de diversas disciplinas: biología, genética molecular, biometría y fitopatología entre otras. El principal objetivo de la mejora vegetal es asegurar la producción y calidad de los cultivos para poder responder al aumento constante en la población (Griffiths et al., 2013).

Históricamente, en la región de Salto Grande, Concordia y Federación se han caracterizado por su producción citrícola. Hace algunos años cobró vigencia además el cultivo del arándano, debido a las buenas condiciones agroclimáticas y excelentes suelos asociado a un aumento de la demanda de los consumidores consecuencia de sus reconocidos beneficios para la salud (Zafra-Stone et al., 2007; Johnson et al., 2013 & Yang et al., 2015). En arándano, hay diversas especies y variedades comerciales entre las cuales se selecciona de acuerdo a las condiciones climáticas y de suelo de la zona de establecimiento considerando factores como: requerimientos de frío, rendimientos, períodos de floración y cosecha. En Argentina, las especies cultivadas son: *V. corymbosum* (*high-bush* o arándano alto) y *V. ashei* (*rabbiteye* u ojo de conejo); siendo las variedades más elegidas por los productores de la región *Emerald, Star, Snowchaser, Flicker, Chickadee* y *Kestrel* que además de adaptarse al clima y suelo permiten una amplia ventana de tiempo de producción (Dell'Acqua et al., 2019). Estas y otras variedades locales y nativas son las que actualmente están siendo sometidas a estudios a campo en la constante búsqueda de diversidad y calidad que satisfaga al mercado (Cui et al., 2022, Gordó, 2011). En el caso del citrus, se busca obtener árboles adaptados y libres de enfermedades (Catalano et al., 2021; Gonzalez-Ibea et al., 2021). Particularmente, en la Estación Experimental Agropecuaria Concordia de INTA, existe un banco de germoplasma que mantiene unas 219 variedades comerciales, que asegura la calidad genética y sanitaria, así como la disponibilidad del material de propagación de variedades comerciales para satisfacer las necesidades de la industria citrícola. Por otro lado, la producción de arroz (*Oryza sativa* L.) integra la economía regional del litoral argentino, concentrándose el 50% de la producción en la provincia de Corrientes y un 32% en Entre Ríos

(www.acpaarrozcorrientes.org.ar). Esta especie vegetal también es sometida a constante estudio para la búsqueda y desarrollo de variedades que posean características favorables para lograr altos rendimientos ante un amplio rango de factores adversos (Huang et al., 2022). El cultivo de pecán es otro cuya adaptación es foco de estudio continuo debido a su potencial en las industrias farmacéuticas y alimenticias (Cervantes et al., 2023). En la provincia de Entre Ríos actualmente alcanza el 70 % de la producción nacional de nuez pecan producto de las 12.000 hectáreas plantadas (<https://www.entrerios.gov.ar/minpro/index.php?modulo=noticia>). Estos estudios se enmarcan dentro del Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, titulado Argentina Innovadora 2020. Este plan impulsa políticas focalizadas en el sector agroindustria, que se orientan a un conjunto de núcleos socio productivos estratégicos dentro de los que se encuentra el referido al mejoramiento de cultivos y producción de semillas que pretende la incorporación de valor a los granos a partir del mejoramiento genético para generar una fuerte industria nacional que abastezca a la producción de los cultivos mayores y secundarios, buscando dotar a la Argentina de autonomía en esta área y un aumento en las exportaciones de mayor contenido tecnológico (<https://www.argentina.gob.ar/ciencia/argentina-innovadora-2030/plan-argentina-innovadora-2020>).

El objetivo del mejoramiento vegetal ha sido desde sus orígenes seleccionar genotipos superiores. El proceso de caracterización y/o selección se vuelve más eficiente a través del uso de marcadores genéticos, definidos como caracteres que presentan polimorfismo o variabilidad experimentalmente detectable en individuos de una población segregante y un tipo de herencia predecible según las leyes de Mendel (Griffiths et al., 2008). Esta variación puede considerarse a diferentes niveles biológicos, y estudiarse mediante biomarcadores, desde aquellos que implican cambios fenotípicos heredables significativos (marcador morfológico) hasta la variación de un solo nucleótido de ADN (marcador molecular). Los marcadores moleculares son herramientas poderosas para analizar la diversidad del genoma dentro de una especie y evaluar las relaciones genéticas entre individuos y poblaciones. La aplicación de métodos moleculares en los programas de selección y mejora proporcionan las bases para selección de individuos nuevos, que podrían utilizarse para la ampliación del germoplasma de los cultivos comerciales. Es así que existe una búsqueda de nuevos materiales vegetales con mejoras significativas en caracteres de calidad y agronómicos a través del desarrollo y aplicación de metodologías aplicadas a la mejora, incluyendo nuevos métodos de análisis de componentes de la calidad, marcadores moleculares y aproximaciones genómicas. La puesta a punto de la extracción de ácidos nucleicos de variedades vegetales de importancia económica para la región a partir de tejidos foliares, frutos o semillas así como la detección de polimorfismos cobra gran importancia a la hora de comenzar con los programas de mejora dado que la calidad del material de partida de estos estudios resulta fundamental para arribar a resultados contundentes fiables, representativos y reproducibles. Incursionar en el área de mejoramiento genético vegetal permitirá el desarrollo de proyectos que evalúen por ejemplo el impacto de agroquímicos y del efecto de los cambios ambientales sobre el acervo genético en una sociedad cada vez más preocupada por la falta de alimentos, por su cultivo y consumo consciente.

Marco metodológico

Obtención y preparación de muestras

Se realizaron tomas de muestras en distintos establecimientos del departamento Concordia y la región. Se obtuvieron hojas de arándano en tres quintas de la zona norte de la ciudad de Concordia, muestras de hojas de pecán, naranjo, limón y mandarinas en quintas ubicadas en las inmediaciones de Colonia La Argentina, departamento Federación y muestras de hojas arroz en plantaciones ubicadas en General Campos.

Se recorrieron las quintas con los encargados de campo y se estableció contacto también con los ingenieros agrónomos responsables de las plantaciones. Se recolectaron muestras de 10 ejemplares por variedad, tomando un pie por línea. Las plantas se eligieron al azar. Se priorizaron hojas jóvenes, brotes verdes, sin daños ni enfermedades observables a simple vista.

Una vez recolectadas, las muestras fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio. Allí, se retiraron las hojas de los tallos, se lavaron con agua destilada, secaron y colocaron en bolsas plásticas de vacío. El mismo tratamiento se llevó a cabo para los frutos de arándano. Se almacenaron en ultra freezer a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Caracterización de las muestras analizadas

La caracterización de las variedades con las que se trabajó estuvo a cargo de los ingenieros agrónomos responsables de las quintas dónde se han tomado las muestras. Así se determinó que de arándano o *blueberry* (*Vaccinium corymbosum* L.) se han tomado muestras de las variedades *Kestrel*, *Snow Chaser* y *Emerald*. De citrus, se tomaron muestras de *Citrus sinensis*, conocida como naranja "Valencia", de *Citrus limon* "Eureka", que es una variedad que da frutos todo el año y de mandarina, mandarina común o *Citrus unshiu* "Satsuma Okitsu". De arroz, *Oryza sativa* L., se muestreó la variedad *Basmati* y de pecán (*Carya illinoensis*) de una variedad local desarrollada en el INTA Castelar.

Puesta a punto de técnicas analíticas

Se efectuaron extracciones de ADN y ARN a partir de muestras de hojas jóvenes. Con la finalidad de optimizar recursos se las subdividieron en diferentes pretratamientos y/o protocolos utilizados.

Las extracciones realizadas mediante los kits comerciales *PuriprerV* (INBIO HIGHWAY) y *PuroPlant DNA* (PBL Productos BioLógicos) se realizaron según especificaciones de los fabricantes. Se emplearon además los protocolos de extracción de ADN mediante CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio) de Green y Sambrook (2012) y el recomendado por las OEPP/EPPO (2014; *Normes OEPP EPPO Standards, Efficacy evaluation of plant protection products Evaluation biologique des produits phytosanitaires*). Este último protocolo, que en su metodología incorpora PVP 40 (Polivinilpirrolidona) fue incorporado en el transcurso del trabajo al observar la dificultad de establecer la técnica en especies cuyos frutos y hojas son ricos en polifenoles, lípidos y proteínas que obstaculizan la extracción del ADN. Para la obtención de ADN de arándano se realizó además, la modificación sugerida por Quintero y col., en 2015. Estos autores propusieron mantener la muestra durante 24 horas a -20°C en freezer luego del agregado de isopropanol y posteriormente, continuar con la extracción.

Las muestras fueron subdivididas según los tratamientos aplicados en:

- (A) Realizadas a partir de hojas frescas:
 - (A1) Maceradas con nitrógeno líquido
 - (A2) Maceradas sin nitrógeno líquido.
- (B) Con hojas almacenadas en bolsas de vacío, a -80°C y maceradas con nitrógeno líquido;
 - (B1) Con adición de 1% de PVP 40 al *buffer* de extracción del kit comercial.
 - (B2) Sin adición de 1% de PVP 40 al *buffer* de extracción del kit comercial.
- (C) Con frutos maduros almacenadas en bolsas de vacío, a -80°C y maceradas con nitrógeno líquido;
A su vez, se realizaron extracciones de ARN mediante TransZol® (AP-Biotech), según indicaciones del fabricante partiendo de hojas sometidas al tratamiento B.

Metodología

A medida que iban ingresando las muestras al laboratorio se realizaban las distintas extracciones.

En el transcurso del trabajo se llevaron a cabo un total de 151 extracciones de ADN de las especies propuestas.

Se realizaron 80 extracciones a partir de arándano, las primeras 40 con la finalidad de evaluar los kits comerciales de extracción (mediante los tratamientos B1 y B2) y la adición de RNasa A, β -mercaptoetanol en los protocolos que emplean CTAB (tratamiento B).

Se efectuaron también, siete extracciones a partir de frutos maduros (tratamiento C) de las variedades *Emerald* y *Snow Chaser*, utilizando el protocolo con CTAB de Green y Sambrook (2012).

Se desestimó continuar con las extracciones de ADN de arándano a partir de kits comerciales debido a que los resultados no fueron satisfactorios.

A partir de las observaciones realizadas se propuso trabajar con los protocolos que utilizan CTAB de Green y Sambrook y con el descrito en las OEPP/EPPO adicionando en ambos casos RNasa A y en el último β -mercaptoetanol y 1% de PVP 40 al mix de extracción debido a la mejora en la calidad y cantidad de ADN obtenido. Posteriormente, se realizaron extracciones considerando las variedades estudiadas, 13 en hojas de la variedad *Emerald*, 13 en hojas de la variedad *Kestrel* y 7 en hojas de la variedad *Snow Chaser*, cuyos tratamientos y protocolos utilizados se encuentran descritos en la tabla 1.

En total se llevaron a cabo 41 extracciones de ADN de hojas de citrus, 25 mediante CTAB y 16 mediante kits comerciales. De éstas, 15 fueron realizadas a partir de hojas de limón *Eureka*, 16 a partir de hojas de naranja Valencia y 10 a partir de hojas de mandarina Común (Tabla 1).

Se realizaron 12 extracciones de ADN de arroz variedad *Basmati*, 4 de ellas mediante kits comerciales y 8 mediante CTAB (Tabla 1).

Por último fueron hechas 18 extracciones de ADN a partir de hojas de pecán, 4 de ellas mediante kits comerciales y 14 mediante CTAB (Tabla 1).

Las extracciones realizadas con éxito y la elección y estandarización de los métodos según las especies analizadas dan respuesta a los dos primeros objetivos específicos planteados. Basados en la experiencia previa y los resultados obtenidos en cuanto a la

relación cantidad/calidad del ADN extraído, se estimó que ADN obtenido es apto para llevar a cabo técnicas moleculares como PCR, PCR-RFLP y Microsatélites.

Por último se propuso poner a punto la técnica de extracción de ARN vegetal. Con tal motivo, se realizaron 4 extracciones de ARN mediante TransZol con el *kit* de TransGen Biotech por variedad de citrus estudiado.

Evaluación de los ácidos nucleicos extraídos

Después de las extracciones, la cantidad del ADN y del ARN fue estimada con espectrofotómetro. Además, se verificó su calidad mediante el sembrando de 5 µl del producto de la extracción en gel de agarosa al 1%, con 0,1 µg/ml de Bromuro de Etidio, durante 30 min a 100 voltios. Fue visualizado con Transiluminador UV y fotografiado. Según la presencia, integridad y calidad del ADN extraído se evaluaron y compararon los resultados de los diferentes protocolos de extracción y tratamientos de las muestras.

Síntesis de resultados y conclusión

Como resultado del presente trabajo se logró estandarizar protocolos de extracción de ADN de variedades vegetales de importancia económica regional. A seguir se transcriben los protocolos que evidenciaron mejor relación cantidad:calidad de ADN extraído:

A)- Técnica de extracción de ADN mediante método con CTAB empleada con éxito para arroz, limón, naranja, mandarina y pecan (OEPP/EPPO, 2014):

1. Triturar el tejido foliar vegetal con nitrógeno líquido en un mortero estéril.
2. Pesar inmediatamente en tubo tipo *Eppendorf* de 1,5-2ml aproximadamente 0,1 gr de la muestra.
3. Adicionar 600 µl de *buffer* CTAB, 1,5 µl de RNasa A y 1 µl de β-mercaptoetanol.
4. Mezclar con vórtex y moler con espátula hasta obtener un color homogéneo, volver a mezclar con vórtex.
5. Incubar a 65°C durante 15 minutos, agitando el tubo tipo *Eppendorf* cada 5 minutos.
6. Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y añadir 400 µl de cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar bien las dos fases hasta obtener una emulsión.
8. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y añadir 250 µl de isopropanol frío.
10. Mezclar y mantener a -20°C durante 30 minutos.
11. Centrifugar a 13000 rpm por 20 minutos, luego remover el sobrenadante.
12. Añadir 500 µl de etanol al 70% y resuspender, mezclar con vórtex.
13. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
14. Lavar 3 veces con 500 µl de etanol 70% y centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
15. Vaciar el tubo y dejar secar el *pellet*.
16. Añadir 15 µl de *buffer* TE y resuspender el *pellet*. Almacenar en heladera.

B)- Técnica de extracción de ADN mediante método con CTAB empleada exitosamente para arándano: se realiza la técnica descrita en A, modificando solamente el

paso N° 10. A la muestra, luego del agregado de isopropanol frío, se la mantiene en freezer a -20°C durante 24 horas (Método de CTAB de la OEPP/EPPO, 2014 modificado por Quintero et al., 2015).

Las extracciones de ADN con kits comerciales han demostrado resultados satisfactorios para todas las variedades analizadas, excepto para arándanos. No se observaron diferencias en cuanto a la calidad y cantidad de ADN según la marca del kit comercial utilizado.

Los resultados de las cuantificaciones de ADN de citrus a partir del protocolo propuesto por la OEPP/EPPO que utiliza en el *buffer* de extracción 1% de PVP y β - mercaptoetanol fueron mayores en promedio a las obtenidas sin la utilización de estos reactivos, hecho observable en todas las especies y variedades de analizadas. Sin embargo, fue sólo en naranja Valencia dónde se observó una mejor calidad de la extracción, dado que la mayoría de los valores de la relación Abs260/Abs280 nm estuvo en el intervalo 1,8-2,0; es decir valores más estables en pureza e integridad.

Si bien a partir de hojas de citrus se logró obtener una buena concentración de ADN en todos los tratamientos realizados, el protocolo que empleó el tratamiento A1 y las OEPP/EPPO arrojó mejores resultados en términos calidad/cantidad. Por lo que será el utilizado en futuras aplicaciones como PCR y en el estudio de marcadores moleculares para variedades cítricas.

En todas las variedades de citrus, los protocolos realizados con el tratamiento B indicaron una relación Abs260/Abs280 nm muy baja, indicativo de contaminación con ARN, proteínas u otras sustancias que pueden afectar la pureza del ADN. Las extracciones realizadas con kits comerciales evidenciaron buena relación entre la concentración y la calidad del ADN mediante corrida electroforética, no siempre correspondidas con las cuantificaciones observadas (Figuras 1, 2 y 3).

Posteriormente de los citrus analizados se extrajo ARN según protocolo propuesto por el fabricante, obteniendo resultados óptimos de acuerdo a la literatura consultada para la extracción mediante kits comerciales en hojas sometidas al tratamiento A1 (Vennapusa et al., 2020) (Figura 4).

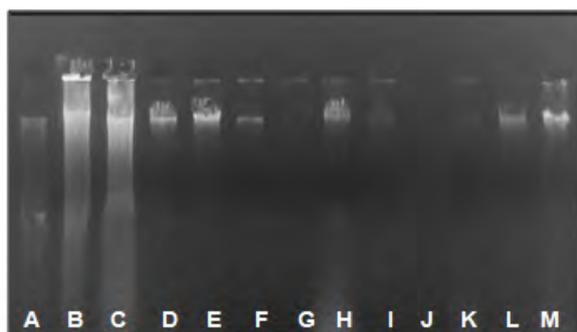


Fig. 1. Corrida electroforética, ADN de naranja. Calle A: kit PuriprerV. B y C: CTAB según Green y Sambrook, 2012. D a M: CTAB según OEPP/EPPO, 2014.

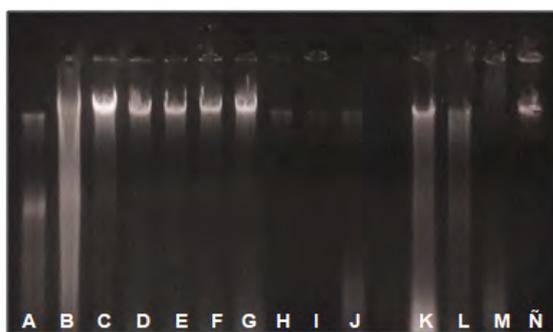


Fig. 2. Corrida electroforética, ADN de limón. Calle A: kit PuriprerV, B: kit PuroPlant DNA, C a Ñ: CTAB CTAB según OEPP/EPPO, 2014.

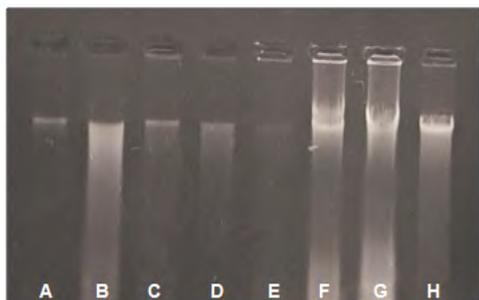


Fig. 3. Corrida electroforética, ADN de mandarina. Calles A a F: CTAB según OEPP/EPPO, 2014. G y H: kit PuriprerV y PuroPlant DNA, respectivamente.

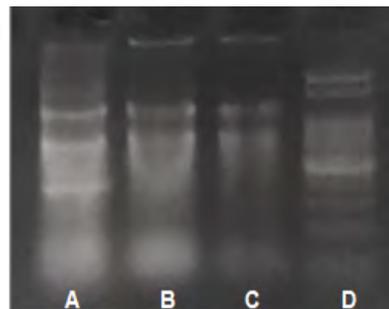


Fig. 4. Extracción de ARN mediante kit TranZol. A. Limón, B Naranja, C. Mandarina. D. Marcador 100 pb.

En pecán, las mayores concentraciones promedio se observaron en las extracciones realizadas a partir del protocolo de la OEPP/EPPO y en las realizadas mediante kits comerciales con el tratamiento B2. Con respecto a las extracciones realizadas mediante kits y tratamiento B1 si bien presentaron baja concentración demostraron mejoras en la calidad del ADN, por lo que podría considerarse su implementación en los trabajos de rutina. La relación cantidad/calidad de ADN en esta especie es importante para el desarrollo de técnicas futuras, como la PCR, la cual es interferida con la gran cantidad de aceites presentes en estas muestras (Figura 5).

Posteriormente, las extracciones de ADN de arroz mediante los métodos que utilizan CTAB evidenciaron elevadas concentraciones promedio de ADN, sin embargo se observó una mejor relación de Abs260/Abs280 en las realizadas a partir del tratamiento B (Figura 6).

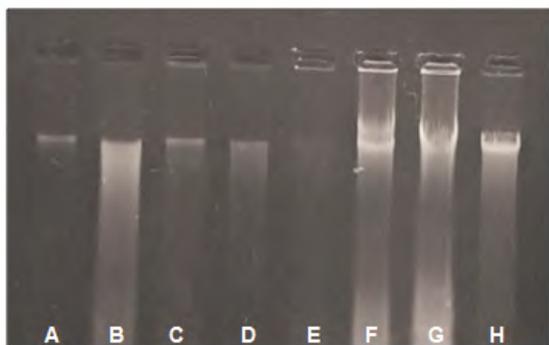


Fig. 5. Corrida electroforética, ADN de pecán. Calles A y B: kit PuroPlant DNA. C y D: Kit PuriprerV. E: CTAB según Green y Sambrook, 2012. F a H: CTAB según OEPP/EPPO, 2014.

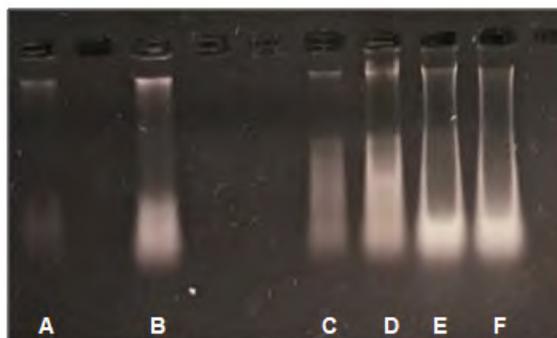


Fig. 6. Corrida electroforética, ADN de arroz. Calles A y B: kit PuroPlant DNA. C y D: kit PuriprerV. E: CTAB según Green y Sambrook, 2012. F a H: CTAB según OEPP/EPPO, 2014.

Por último se observó que el ADN extraído a partir de hojas de arándano se encontraba más puro y menos degradado que el extraído a partir de frutos maduros, por lo que de no ser necesario para posteriores estudios de expresión se recomienda la extracción de ADN a partir de hojas. Al analizar las extracciones realizadas en éstas últimas, se determinó que las desarrolladas mediante CTAB según OEPP/EPPO presen-

taron concentraciones promedio elevadas, a excepción de la variedad *Snow Chaser*, donde se observaron mejores relaciones de Abs260/Abs280 mediante el protocolo de Green y Sambrook (Figuras 7, 8 y 9). Las extracciones realizadas a través de kits comerciales fueron muy pobres tanto en concentración como en calidad de ADN para esta especie en todas sus variedades analizadas y fueron imposibles de observar mediante gel de agarosa. Al constatar que tanto la calidad y la cantidad de ADN extraído aún no era la óptima se propuso implementar la modificación sugerida por Quintero y col, (2015) en su manual de extracción, dejando en incubación a -20°C durante 24 hs en la etapa de extracción con alcohol isoamílico (paso 10 de la técnica propuesta). Esta modificación se implementó en los dos métodos que utilizan CTAB, observándose la mejor relación entre la concentración y la calidad del ADN extraído para la obtenida mediante el protocolo según OEPP/EPPO, 2014 (Figura 10).

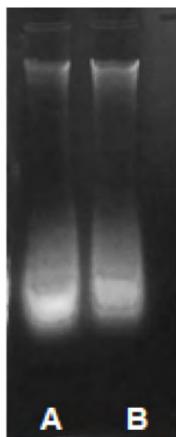


Fig 7. Corrida electroforética ADN de arándano. Calles A *Snow Chaser*, B *Kestrel* CTAB según OEPP/EPPO, 2014.



Fig. 8. Corrida electroforética. ADN de arándano. Calles A *Snow Chaser*, B y C *Kestrel* CTAB OEPP/EPPO, 2014.

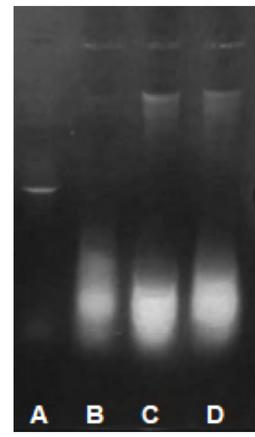


Fig. 9. Corrida electroforética. ADN de arándano *Emerald*. Calles A a D CTAB según Green y Sambrook, 2012

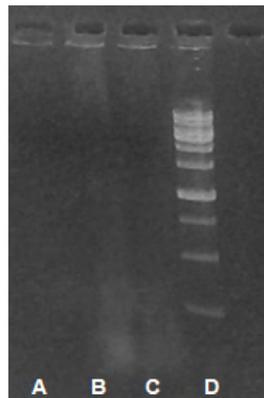


Fig. 10. ADN de arándano. Calles A, B y C: CTAB según OEPP/EPPO, 2014 (modificado); D: Marcador de 1kb.

Tabla1. Valores promedios de la concentración y pureza de los ADNs obtenidos mediante diferentes protocolos de extracción según la especie analizada.

Especie/variedad	Metodología de extracción de ADN	Concentración promedio ADN extraído (ng/μL)	Relación Abs 260/280
<i>Citrus limon</i> , variedad Eureka	Green & Sambrook, 2012 (B)	191,25	1,559
	OEPP/EPPO, 2014 (B)	256	1,3126
	Kits comerciales (B1)	15,3125	1,2595
	Kits comerciales (B2)	85,5	1,4734
	Kits comerciales (A1)	35,75	1,017
<i>Citrus sinensis</i> , variedad Valencia	Green & Sambrook, 2012 (B)	386,75	1,16
	OEPP/EPPO, 2014 (A1)	515	1,9821
	Green & Sambrook, 2012 (A1)	18,5	1,06
	Kits comerciales (B1)	56,925	1,5558
	Kits comerciales (B2)	8,341	1,906
<i>Citrus unshiu</i> , variedad Satsuma Okitsu "Común"	Green & Sambrook, 2012 (B)	49,625	1,1976
	OEPP/EPPO, 2014 (B)	166	1,3147
	Kits comerciales (B2)	44,5	1,2007
<i>Carya illinoensis</i> , variedad pecán INTA Castelar	Green & Sambrook, 2012 (B)	92	1,1164
	OEPP/EPPO, 2014 (B)	306,25	1,2395
	Kits comerciales (B1)	49,05	1,6597
	Kits comerciales (B2)	262,1875	1,3736
<i>Oryza sativa</i> , variedad Basmati	Green & Sambrook, 2012 (B).	203,75	1,9029
	OEPP/EPPO, 2014 (B).	215	1,828
	Green & Sambrook, 2012 (A1).	280	1,214
	OEPP/EPPO, 2014 (A1).	307	1,4247
	Kits comerciales (B1)	98	1,3309
	Kits comerciales (B2)	15,5	1,2590
<i>Vaccinium corymbosum</i> L., variedad Kestrel	Green & Sambrook, 2012 (B)	48,2083	1,1222
	OEPP/EPPO, 2014 (B)	128,6667	1,6216
	Kits comerciales (B2)	35	1,1222
<i>Vaccinium corymbosum</i> L., variedad Snow Chaser	Green & Sambrook, 2012 (B)	43	1,4388
	OEPP/EPPO, 2014 (B)	68,4	0,985
	Kits comerciales (B2)	32	1,1238
<i>Vaccinium corymbosum</i> L., variedad Emerald	Green & Sambrook, 2012 (B)	101,5	1,4821

	OEPP/EPPO, 2014 (B)	119,5	0,9515
	Kits comerciales (B1)	30,5	0,841
	Kits comerciales (B2)	42	0,898
<i>Vaccinium corymbosum</i> L	OEPP/EPPO, 2014 (modificado) (B)	50	1,9066
	Green & Sambrook, 2012 +24 hs (B)	40	1,0717

Fuente: Elaboración propia. (A1) Realizadas a partir de hojas frescas, (B) Con hojas almacenadas en bolsas de vacío, a -80°C y maceradas con nitrógeno líquido; (B1) Con adición de 1% de PVP 40 al buffer de extracción del kit comercial, (B2) Sin adición de 1% de PVP 40 al buffer de extracción del kit comercial.

De todo lo analizado se destaca que se lograron estandarizar tres métodos de extracción de ADN, con sus modificaciones, en las variedades de interés económico analizadas.

Bibliografía

- CATALANO, C.; DI GUARDO, M.; DISTEFANO, G.; CARUSO, M.; NICOLOSI, E.; DENG, Z.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.G. (2021). Biotechnological Approaches for Genetic Improvement of Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) against *Mal Secco* Disease, en: *Plants* 10, 1002.
- CERVANTES, K.; VELASCO-CRUZ, C.; GRAUKE, L.J.; WANG, X.; CONNER, P.; WELLS, L.; BOCK, C.H.; PISANI, C.; RANDALL, J.J. (2023). Influence of Geographical Orchard Location on the Microbiome from the Progeny of a Pecan Controlled Cross, en: *Plants*, 12;12(2):360.
- CUI, F.; YE, X.; LI, X.; YANG, Y.; HU, Z.; OVERMYER, K.; BROSCHE, M.; YU, H.; SALOJÄRVI, J. (2022). Chromosome-level genome assembly of the diploid blueberry *Vaccinium darrowii* provides insights into its subtropical adaptation and cuticle synthesis, en: *Plant Communications*, 3(4)100307.
- DELL'ACQUA, A.; MOYANO, M.; GALVÁN, J.; RÍOS, L.; PAZ, C. (2019). Comercialización y competitividad del arándano argentino. Ed. INTA.
- GONZALEZ-IBEAS, D.; IBANEZ, V.; PEREZ-ROMAN, E.; BORREDÁ, C.; TEROL, J.; TALON, M. (2021). Shaping the biology of citrus: II. Genomic determinants of domestication, en: *The Plant Genome*, 14(3):e20133.
- GORDÓ, M. (2011). Guía práctica para el cultivo de Arándanos en la zona norte de la provincia de Buenos Aires. INTA EEA San Pedro, en: www.acpaarrozcorrientes.org.ar
- GREEN, M.; SAMBROOK, J. (2012). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROL, S.B. (2008). Introducción al análisis genético. 9th edición. en: McGraw-Hill Interamericana.
- Huang, P.; Gu, Q.; Hu, Y.; Li, H.; Wu, Z.; Liu, W.; Zhu, Z.; Yuan, P.; Duan, L.; Zhou, Y.; Luo, H.; Kou, S.; Liu, L. (2022). Genetic Analysis of a Collection of Rice Germplasm (*Oryza sativa* L.) through High-Density SNP Array Provides Useful Information for Further Breeding Practices, en: *Genes*. 6;13(5):830.
- JOHNSON, S.A.; ARJMANDI, B.H. (2013). Evidence for anti-cancer properties of blueberries: a mini review, en: *Anticancer Agents Med Chem*. 13: 1142–1148.
- Ministerio de Producción, Turismo y Desarrollo Económico de Entre Ríos. <https://www.entrerios.gov.ar/minpro/index.php?modulo=noticia>.

- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. (1980). Rapid isolation of higher weight DNA en: *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
- OEPP/EPPO. (2014). PM 7/121 (1) 'Candidatus Liberibacter africanus', 'Candidatus Liberibacter americanus' and 'Candidatus Liberibacter asiaticus', 44 (3), 376-389.
- Plan Argentina Innovadora 2020, <https://www.argentina.gob.ar/ciencia/argentina-innovadora-2030/plan-argentina-innovadora-2020>.
- QUINTEIRO, J.; MANENT, P.; ASSUNÇÃO, P.; MEDINA, C.; SARMIENTO, R.; GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ, N.; REY-MÉNDEZ, M. (2015). Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas. Ed: 1^a. Editor: Nieves González-Henríquez & Manuel Rey-Méndez.
- VENNAPUSA, A.R.; SOMAYANDA, I.M.; DOHERTY, C.J.; KRISHNA JAGADISH, S.V. (2020) A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. En: *Sci Rep* **10**, 16887.
- YANG, B.; KORTESNIEMI, M. (2015) Clinical evidence on potential health benefits of berries, en: *Cur Op Food Sci*. 2: 36-42.
- ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M.; CHATTERJEE, A.; VINSON, J.A.; BAGCHI, D.; (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention, en: *Mol Nutr Food*. 51: 675-683.

PID 8124 Denominación del Proyecto

Optimización de protocolos para extracción de ADN de especies vegetales de importancia regional

Directora

Rodríguez, Viviana Rita

Codirectora

Lagadari, Mariana

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ciencias de la Alimentación

Contacto

viviana.rodriguez@uner.edu.ar

Cátedra/s, área o disciplina científica

Laboratorio de Genética y Biología Molecular Aplicada a Alimentos (GENBIO-MAL). Cátedra de Biología. Área Biología molecular, Genética.

Integrantes del proyecto

Docentes: Varela, Roberto Alfredo. Estudiante de grado: Zdanovicz, Lara Azul. Becarios: Becarias Belgrano vinculadas al PID 8124: Candel, Nancy; Cuelho, Abril Emiliana; Benitez, Avril Justina; Medina, María Belén. Becaria CIN asociada a las actividades del laboratorio Genbio: Severgnini Poggio, María Jazmín. Becaria RRHH UNER, asociada al PID 8124: Da Silveira Chiacchiera, Andrea Belén

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

01/07/2021 y 30/06/2023

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 513/23 (21-12-2023)