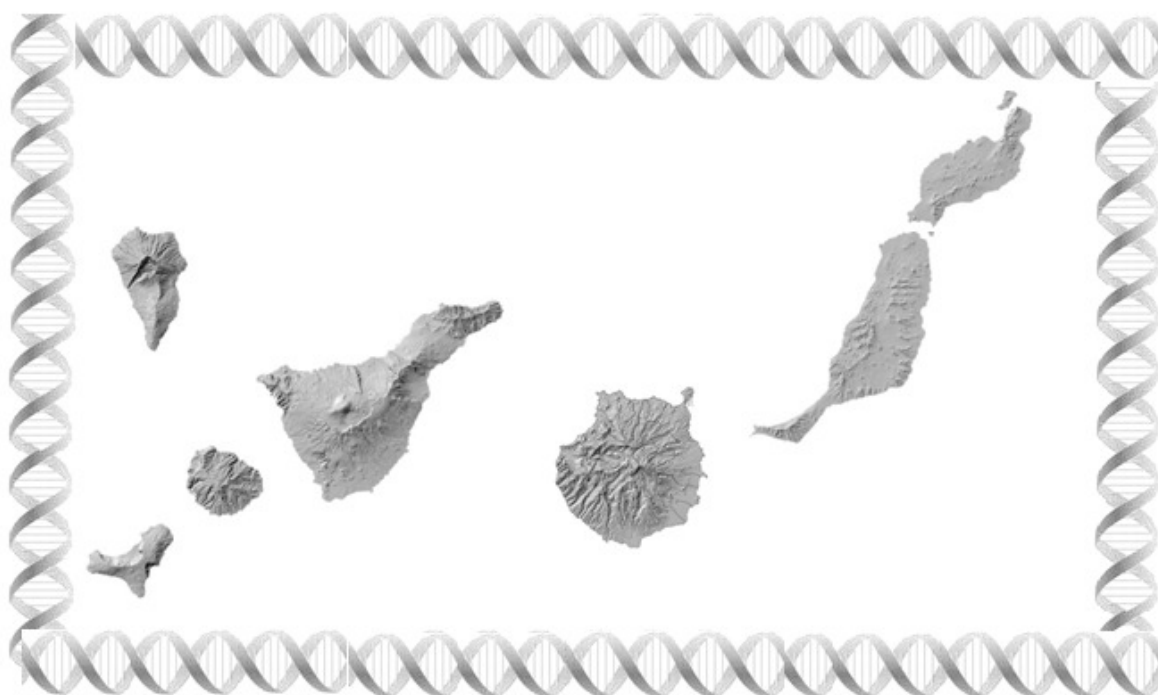


MANUAL DEL BANCO DE ADN DE LA FLORA CANARIA

Departamento de Biodiversidad Molecular
y Banco de ADN de la flora Canaria

Jardín Botánico Canario "Viera y Clavijo"
Unidad Asociada CSIC



Juli Caujapé Castells
Ruth Jaén Molina
Nereida Cabrera García



AGRADECIMIENTOS

El Banco de ADN de la Flora Canaria se inició gracias al proyecto BIOMABANC del Programa de Iniciativa Comunitaria INTERREG IIIB Açores-Madeira-Canarias y al Cabildo de Gran Canaria, que aportaron el 85% y el 15% (respectivamente) de la financiación necesaria. También sirvió para iniciar los Bancos de ADN de la Flora Açorina (residente en la Universidade dos Açores en Ponta Delgada) y de la Flora Maderense (residente en el Jardim Botânico da Madeira). Desde el fin de BIOMABANC en 2007, el Banco de ADN de la Flora Canaria se ha mantenido y enriquecido gracias a las aportaciones del Cabildo de Gran Canaria y a otros proyectos financiados al Departamento de Biodiversidad Molecular del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” – Unidad Asociada CSIC (JBCVCSIC).

Agradecemos la colaboración de todas las instituciones de conservación que están prestando su experiencia y su esfuerzo para el muestreo de endemismos de otras Islas Canarias: la Dirección General de Biodiversidad del Gobierno de Canarias, el área de Medio Ambiente de los Cabildos de Tenerife, La Gomera y Fuerteventura y los Parques Nacionales de Las Cañadas del Teide, Garajonay, Caldera de Taburiente y Timanfaya, los Jardines Botánicos de la Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos (especialmente al de La Cortijuela y Hoya de Pedraza, Jardín Botánico de Córdoba, Jardí Botànic de Barcelona, Jardí Botànic de Sòller y Jardí Botànic Marimurtra-Fundació Karl Faust, que fueron los primeros en ofrecernos su colaboración en el muestreo de taxones de regiones geográficas que poseen vínculos florísticos con Macaronesia). Al Dr. Mark Chase (responsable del Banco de ADN del Jardín Botánico de Kew) y a todo su equipo (en especial Edith Kapinos, técnico de este Banco de ADN), su asesoramiento y su amabilidad al ofrecernos toda su experiencia para solventar algunas cuestiones relativas al procesamiento y almacenamiento de muestras.

Así mismo, es necesario recordar a personas que han aportado muestras al banco de ADN: Alfredo Reyes Betancort (del Jardín de Aclimatación de la Orotava) y Stephan Scholz (biólogo autónomo de Fuerteventura) por su ayuda en los muestreos de este y otros proyectos que se están desarrollando en el JBCVCSIC; Pedro Sosa y Miguel Ángel González Pérez (del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias del Mar de la ULPGC), cuyo grupo de investigación en genética de poblaciones y conservación fue socio del proyecto BIOMABANC y ha depositado ya numerosas muestras en el banco de ADN.

Para terminar, agradecemos a nuestros socios en BIOMABANC (la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, el Jardim Botânico da Madeira y la Universidade dos Açores en Ponta Delgada) sus numerosas aportaciones en aquel y otros proyectos.

Finalmente, a todo el personal del JBCVCSIC su constante colaboración y dedicación a la misión de este centro.

ÍNDICE

Contexto.....	2
Agradecimientos.....	3

INTRODUCCIÓN

Parte I: ADQUISICIÓN DE MUESTRAS

-Fuentes para la adquisición de muestras

- i) Jardines Botánicos
- ii) Proyectos en curso o recientemente finalizados en el Centro
- iii) Colaboraciones Internacionales

-Recolección de muestras

- i) Bolsas de muestreo
- ii) Normas prácticas de muestreo
- iii) Muestras recolectadas por colaboradores

Parte II: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

-Extracción de DNA

- i) Método CTAB 2x a gran escala: Protocolo y procedimiento
- ii) Método CTAB 2x a pequeña escala: Protocolo y procedimiento.

-Cuantificación de DNA

- i) Mediciones con el biofotómetro

-Evaluación cualitativa DNA

- i) Preparación geles de agarosa
- ii) Carga de muestras en el gel

-Organización de las muestras

- i) Etiquetado y clasificación de los tubos
- ii) Etiquetado y clasificación de las cajas

-Envío de muestras.

Parte III: GESTIÓN DE MUESTRAS

-Destino de las muestras

-El código de barras de la vida: motivación y desarrollo.

- i) Los caracteres morfológicos y la Taxonomía
- ii) Los caracteres moleculares y la Taxonomía
- iii) Hacia un código de barras molecular de las plantas
- iv) Amplificación y secuenciación
 - AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN.
 - Amplificación del ADN. Protocolo y procedimiento.
 - Purificación del producto amplificado. Protocolo y procedimiento.
 - Protocolo de purificación con el kit GenElute PCR Clean-up de Sigma
 - SECUENCIACIÓN DEL ADN.
 - Cuantificación del producto amplificado. Protocolo y procedimiento.
 - Reacciones de secuenciación. Protocolo y procedimiento.
 - Precipitación de las muestras. Protocolo y procedimiento.
 - Electroforesis capilar. Protocolo y procedimiento.
- v) Los bancos de ADN y el código de barras de la vida
- v) El futuro ¿lejano?
- vi) Un código de barras para la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

1. Protocolos de preparación de disoluciones para extracción, amplificación y secuenciación del ADN.
2. Material fungible (químico y no químico) utilizado en la extracción, amplificación y secuenciación del ADN.
3. Listado de los científicos que integraron el grupo de discusión de la “1ª Reunión del Plant Working Group” del Consorcio del Código de Barras de La Vida.

INTRODUCCIÓN

En general, un banco de ADN debe consistir en una colección organizada de muestras de material genético cuya pureza y concentración sean adecuadas para utilizarse en el ámbito de cualquier técnica molecular actual o futura. Las muestras del banco de ADN del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” – Unidad Asociada CSIC (JBCVCSIC) están solamente disponibles para acciones orientadas al conocimiento y la investigación del abundante patrimonio natural de Macaronesia, y en ningún caso para aplicaciones prácticas con fines exclusivamente comerciales o lucrativos. Esta restricción se debe al elevado grado de exigencia de nuestra misión: contribuir al conocimiento de la evolución vegetal en la región geográfica con mayor diversidad biológica de Europa (y a su conservación) a través de la información que contiene la molécula de ADN.

Cualquier persona con un mínimo conocimiento de Biología comprenderá que un banco de ADN no puede ser un instrumento directo de conservación: no es posible coger unas muestras de material genético vegetal, plantarlas en el campo y esperar a que crezca un frondoso bosque o un cardonal-tabaibal. Esta es una de las diferencias fundamentales entre un banco de ADN y (por ejemplo) un banco de semillas, que sí contiene individuos en potencia y puede por tanto contribuir directamente a la regeneración de la biodiversidad en la naturaleza.

No obstante, un banco de ADN puede ser un potentísimo instrumento de conocimiento para la conservación de la biodiversidad, y es en este ámbito donde nuestra existencia adquiere pleno sentido. La información necesaria para crear cualquier elemento de la biodiversidad reside físicamente en la secuencia de nucleótidos de su molécula de ADN. Por lo tanto, disponer de una buena colección de material genético es poner los medios para conocer mejor la diversidad genética de la biodiversidad y poder basar su conservación en el conocimiento científico.

La secuencia del ADN tiene una longitud larguísima y está escrita en un alfabeto de solamente cuatro letras: A, T, C, G. El tipo de información más conocido que contiene (y, por cierto, el menos interesante para nuestras investigaciones sistemático-evolutivas) reside en los genes. Como ya casi todo el mundo sabe, los genes son partes de la molécula de ADN que contienen la información necesaria para cada una de las funciones que permiten el funcionamiento y supervivencia de los organismos vivos: hay genes del crecimiento, genes que nos permiten digerir los alimentos, genes que nos predisponen a ciertas enfermedades, genes que se controlan a sí mismos y genes que controlan a otros genes. Genes a la carta.

La secuencia de nucleótidos que contienen los genes es el resultado de millones de años de evolución biológica, que ha dejado en el camino a las infinitas variantes que son inviables o poco competitivas para la vida en la tierra (aunque posibles en términos de combinatoria) y ha seleccionado solamente a las que “funcionan” mejor. Como (por regla general) para cada gen solamente existen unas pocas secuencias de nucleótidos que son funcionales y, dentro de éstas, solo una o dos son óptimas en las condiciones ambientales actuales, las variaciones de la secuencia de un mismo gen en diferentes organismos vivos son mínimas (aunque existen algunas pocas excepciones). Si la variación fuera grande, lo más probable sería que el gen no se expresara adecuadamente en la gran mayoría de organismos, y que éstos tuvieran dificultades para sobrevivir: simplemente no se desarrollarían o vivirían durante un tiempo insuficiente para dejar descendencia. Afortunadamente, la relativa conservación de las secuencias de nucleótidos en los genes garantiza la supervivencia pero, por otro lado, es muy poco informativa sobre la identidad de sus portadores, sus relaciones con congéneres muy cercanos o sobre su historia evolutiva.

Pero no todo en el ADN son genes. En la inmensa longitud del material hereditario existen regiones que no son responsables de ninguna función biológica imprescindible (o, al menos, esto es lo que se piensa actualmente) y cuyas secuencias de nucleótidos varían mucho más que las de los genes. Como investigadores de la evolución de la vida en la tierra, esta variabilidad es nuestra principal herramienta de trabajo, ya que de ella puede extraerse información sobre las relaciones entre organismos, sobre su identidad taxonómica o sobre su historia evolutiva.

El contenido informativo de la molécula de ADN hace pues que un banco de material genético de poblaciones naturales de plantas vasculares pueda también concebirse como una colosal biblioteca sobre diferentes aspectos de la biodiversidad vegetal, que está esperando a ser “leída” por la investigación. Por este motivo, pondremos todos los medios necesarios para que el banco de ADN del JBCVCSIC no esté dedicado simplemente al almacenamiento ordenado de material genético, sino sobre todo a dinamizar la investigación de la diversidad vegetal macaronésica a través de la información contenida en la molécula de ADN.

El Banco de ADN de la Flora Canaria del JBCVCSIC debe ser pues un *banco* en el pleno sentido de la palabra, y su actividad está orientada a *invertir* sus fondos de material genético en actuaciones que generen *beneficios* en forma de un mejor conocimiento de la compleja biodiversidad vegetal canaria a través de proyectos de investigación o programas de formación e intercambio.

Por un lado, el Banco de ADN de la Flora Canaria es una consecuencia directa de las diferentes investigaciones sobre la Flora Canaria que, desde su fundación en 1952, se han desarrollado en el JBCVCSIC. En consecuencia, muchísimas de las muestras iniciales provienen de los diferentes departamentos del JBCVCSIC o de especímenes cultivados en el propio Jardín Canario. No obstante, una fuente importante de material tiene su origen en

otros investigadores (o gestores) de la biodiversidad vegetal canaria, que depositan sus colecciones en nuestras instalaciones.

Como se explica en estas páginas (ver el esquema de la Figura 1 para una noción global de la adquisición, procesado y gestión de muestras), la acción investigadora del Banco de ADN se concentra en dos líneas fundamentales: la filogenia molecular, genética de poblaciones y conservación genética de grupos que contienen linajes endémicos de Canarias, y el desarrollo un código de barras molecular de la Flora Canaria. Esperamos que nuestra institución madre (el Cabildo de Gran Canaria) y los agentes nacionales e internacionales dedicados a la financiación de iniciativas de conservación sigan prestándonos su apoyo incondicional, y les agradecemos lo mucho que han aportado hasta ahora.

Este manual está en constante actualización, y las nuevas versiones se irán añadiendo a la web de nuestro departamento (<http://www.bioclimac.com/mbdna/>).

Departamento de Biodiversidad Molecular y Banco de ADN
Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada CSIC, Octubre de 2010

Dr. Juli Caujapé Castells
Investigador responsable

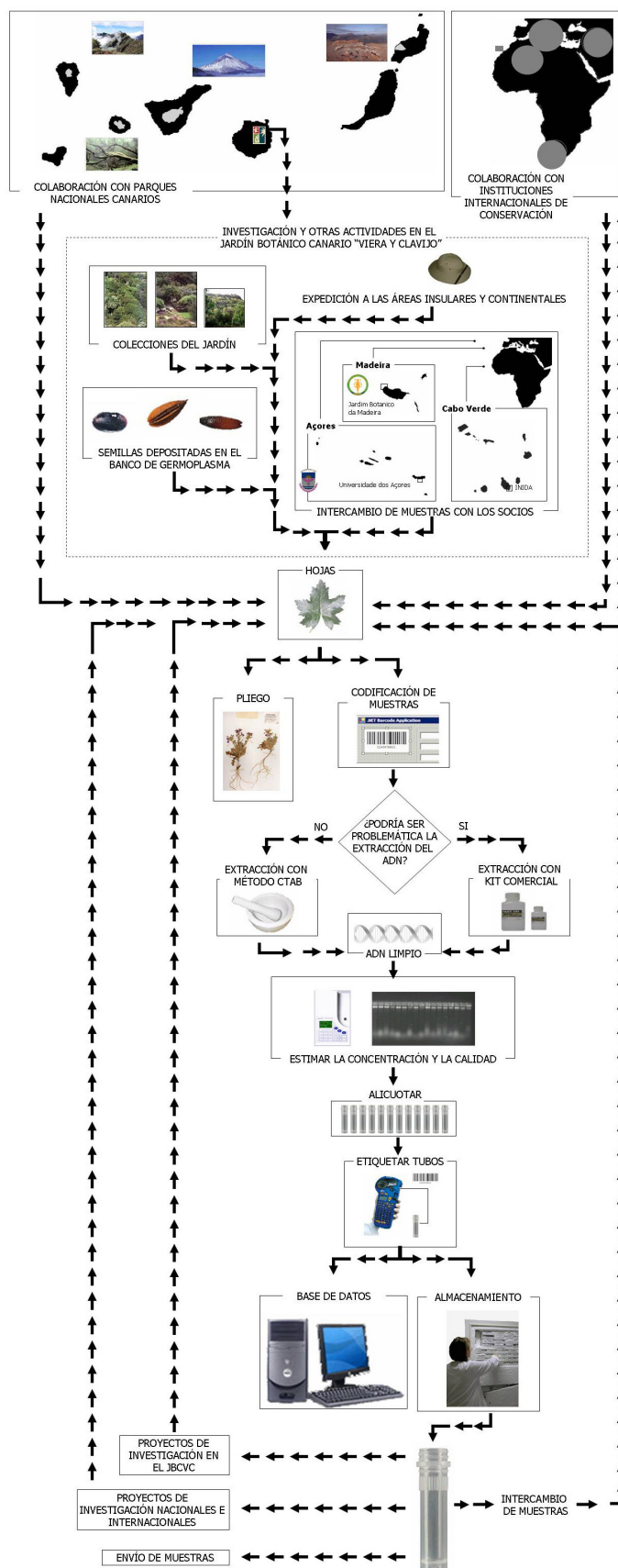


Figura 1. Esquema general (añadir Unidades Medioambientales) de las distintas fases a seguir para la puesta en marcha del Banco de ADN.

PARTE I

Adquisición de muestras



FUENTES PARA LA ADQUISICIÓN DE MUESTRAS

Antes de comenzar a recolectar muestras es importante plantear cuidadosamente los objetivos a cumplir por el Banco de ADN. Esto permitirá la correcta elección no sólo de qué especies se van a incluir en el Banco, sino también qué número de muestras es razonable para que nuestro objetivo sea viable. Una vez definidos los objetivos se deben elegir las fuentes desde las que se va a proveer de muestras el Banco y se deben plantear las fases de recolección de dichas muestras. Para ello hay que tener en cuenta la planificación de aspectos como ¿qué especies vamos a considerar prioritarias?, ¿cuál es la mejor época para llevar a cabo las recolecciones? o ¿qué material necesitamos para las recolecciones?

El objetivo principal del Banco de ADN del JBCVCSIC es incluir representantes de todas las poblaciones posibles (al menos 2 ó 3 individuos por población) de los componentes más emblemáticos de la diversidad de la flora canaria. En una primera fase le damos prioridad a géneros o secciones endémicas canarias y/o macaronésicas y, en una segunda fase, se pretende abarcar especies que, aunque no sean endémicas a Macaronesia, puedan ser importantes para entender el origen y la evolución de la flora de este archipiélago por su ubicación geográfica en zonas cercanas del continente africano o por la historia bioclimática de sus áreas de distribución (principalmente el Noroeste de África, el Mediterráneo, Sudáfrica e Irán).

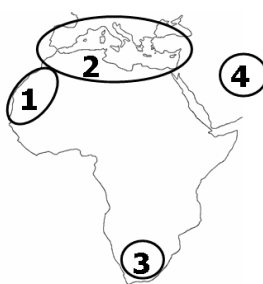


Figura 2. Zonas no Macaronésicas con máximo interés para al Banco de ADN del JBCVCSIC. 1: Mauritania y costa Atlántica de Marruecos, 2: Mediterráneo *sensu lato*; 3: Sudáfrica; y 4: Región Irano-Turaniana.

Como posibles fuentes para la adquisición de las muestras se pueden considerar las siguientes:

i) Jardines Botánicos

Aunque idealmente es conveniente muestrear en las poblaciones naturales de las especies elegidas, una alternativa perfectamente válida, es la recolección de hojas de especímenes cultivados en los Jardines Botánicos, siempre y cuando se cumplan los siguientes requisitos:

- a) Deben ser especímenes que procedan de semillas recolectadas en poblaciones naturales o planta viva traída desde poblaciones naturales.
- b) Los especímenes deben estar perfectamente identificados y conocerse todos sus datos de procedencia u origen.
- c) Se descartarán aquellos especímenes nacidos espontáneamente en el Jardín o los que, por llevar ya muchos años plantados en el mismo, pudieran tener problemas de hibridación o anomalías tras varias generaciones desarrollándose fuera de su hábitat natural.
- d) De cada una de las especies se elegirán varios individuos (3 como mínimo) excepto para aquellos que se hayan obtenido por reproducción vegetativa (esquejes) de los que sólo se cogerán hojas de un individuo pues el resto serían clones o copias idénticas de la planta madre.

La flora vascular de las islas Canarias comprende alrededor de 2.037 especies de las que unas 610 son endémicas del archipiélago canario (Martín Esquivel, J.L. *et al*, 2005; Arnoldo Santos-Guerra, datos sin publicar).

Repartidos por los distintos pisos de vegetación del JBCVCSIC podemos encontrar principalmente endemismos de Gran Canaria (98) pero también representantes de cada una de las otras islas del Archipiélago canario (11 endemismos de Lanzarote, 11 de El Hierro, 25 de La Palma, 26 de La Gomera, 56 de Tenerife y 8 de Fuerteventura) y 39 taxones endémicos de los otros Archipiélagos macaronésicos (Azores, Madeira y Cabo Verde). Por otro lado, en los viveros del Jardín (Vivero Central, Vivero Escolar y Experimental) se propagan, cultivan y almacenan numerosos especímenes de la flora autóctona.

Por ello, y teniendo en cuenta todos los requisitos descritos anteriormente, uno de los lugares donde se están recolectando muestras de hoja para su posterior incorporación al Banco de ADN son las propias instalaciones del JBCVCSIC. Se comenzó con la recolección de especies que se hallaban en el Vivero Central y de las que conocíamos su procedencia y se continuó con especies repartidas por las distintas zonas del JBCVCSIC pero únicamente, aquellas que estaban etiquetadas y que mantenían las características propias de la especie en sus poblaciones naturales.

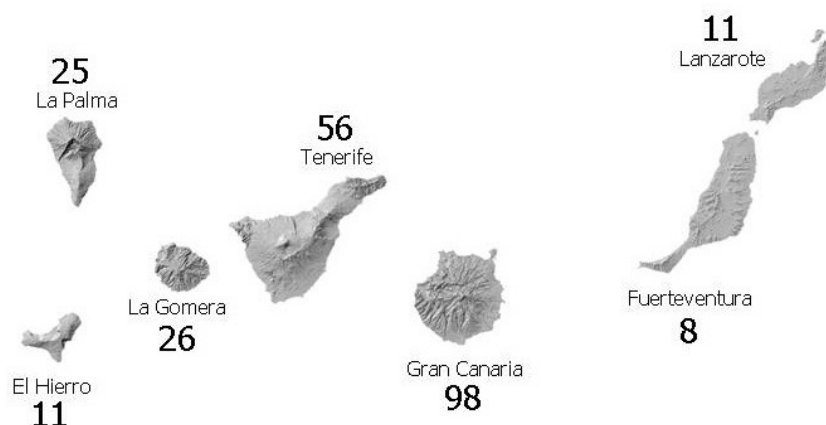


Figura 3. Número de endemismos insulares en las colecciones cultivadas en el Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” cuya procedencia geográfica y Taxonomía no presentan ambigüedades (datos correspondientes a 2004).

ii) Proyectos en curso o proyectos recientemente finalizados en la institución

Aunque hay notables excepciones, la ubicación ideal de un Banco de ADN vegetal es un centro de investigación en el que ya se estén llevando a cabo estudios de, al menos, algunas de las especies que se distribuyen en su zona geográfica. De esta manera, otra de las fuentes directas desde las que se podrá nutrir el Banco de ADN serían los proyectos ya finalizados o que aún estén en curso en dicho Centro.

Si el centro elegido como sede para el Banco de ADN ya tiene una trayectoria científica, entonces es lógico pensar que en él se habrán realizado proyectos en colaboración con otros Centros de investigación desde los que también se podrán donar muestras para el Banco de ADN. La tendencia cuando se finalizan los proyectos es almacenar, por períodos largos de tiempo, el material recogido durante el desarrollo de los mismos. Generalmente, esta situación crea más problemas que beneficios, ya que las muestras suelen ocupar un espacio en congeladores y armarios que suele ser muy demandado en todos los laboratorios. Nos parece que el Banco de ADN puede ser también una forma de recuperar y dar nuevo uso a todo ese material desaprovechado y muchas veces olvidado. Aún así, es importante que el Banco de ADN no se convierta exclusivamente en un lugar de almacenamiento de muestras de material genético. Además, debe servir de impulso para permitir un mejor conocimiento de la biodiversidad vegetal de áreas que aún no estén muy exploradas.

El Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” – Unidad Asociada CSIC es, desde su fundación en 1952, el único centro de Canarias dedicado a la investigación multi-disciplinar del origen, diversificación y conservación de la Flora del archipiélago. Desde varios de los proyectos de investigación recientemente finalizados en el JBCVCSIC se donaron muestras de hojas y/o de ADN ya extraído de las especies estudiadas. Algunos ejemplos son el proyecto BIOTA-GENES (finalizado en 2005) y varios proyectos realizados por biólogos (en su mayoría becarios) del centro que han supuesto el estudio morfológico, reproductivo y/o molecular de representantes de endemismos canarios importantes (*Parolinia*, *Echium*, *Limonium*, *Lotus* y *Argyranthemum* entre otros).

En la actualidad, en el JBCVCSIC se están desarrollando varios proyectos de investigación que contemplan la realización de expediciones para muestrear especies de interés de nuestra flora. Algunos ejemplos son BIOMABANC, BASEMAC y CAVEGEN

(que forman parte del Programa de Iniciativa Comunitaria Interreg III B Azores-Madeira-Canarias 2000-2006), o BIOCLIMAC, DEMIURGO y ENCLAVES, correspondientes a la convocatoria de Proyectos de Cooperación Transnacional Madeira-Azores-Canarias 2007-2013. Se ha establecido un acuerdo con los distintos grupos de investigación para que parte del material recogido en dichas expediciones pueda ser incorporado al Banco de ADN.

A lo largo del desarrollo de los distintos proyectos llevados a cabo en el JBCVCSIC se han establecido colaboraciones o contactos con otros Jardines Botánicos de las Islas Canarias (Jardín de Aclimatación de La Orotava) o peninsulares (Jardines Botánicos de Valencia, de Córdoba, de Gibraltar, de La Cortijuela, de Sóller, Marimurtra de Blanes, Real Jardín Botánico de Madrid); con Universidades como la ULL y ULPGC (Canarias), la Universidad de Palermo, de Barcelona, de Sevilla, de Granada, la Complutense de Madrid o la Universidad de Tehran (en Irán) y con otros Centros del Mediterráneo, Irán y Egipto. Algunos de estos contactos nos han permitido no sólo recibir muestras ya recogidas durante proyectos realizados en conjunto sino lograr más fácilmente su colaboración para el envío de nuevas muestras. Así por ejemplo la ULPGC ha depositado en nuestro Banco de ADN tanto material genético ya extraído como muestras de hoja de especies canarias.

iii) Colaboraciones institucionales

Dentro de las Instituciones consideradas como posibles colaboradores interesan especialmente aquellas que compartan situación geográfica con el Centro donde esté ubicado el Banco de ADN y posean trayectoria consolidada en la investigación o gestión de la flora terrestre. Este aspecto tiene dos importantes aspectos positivos:

- a) El personal que trabaja en estas instituciones conoce de primera mano la problemática de la flora del área geográfica.
- b) El personal que trabaja en estas instituciones es experto en géneros endémicos de dicha zona geográfica.

En nuestro caso, las Islas Canarias cuentan con 4 Parques Nacionales: P.N. de La Caldera de Taburiente, P.N. de Garajonay, P.N. de Las Cañadas del Teide y P.N. de Timanfaya distribuidos en las islas de La Palma, La Gomera, Tenerife y Lanzarote. Además, cada una de las islas cuenta con una Unidad Insular Medio Ambiental (U.I.M.A) dependiente del correspondiente Cabildo Insular. Al inicio del proyecto BIOMABANC, se contactó con cada uno de los Directores de los Parques nacionales y con cada uno de los Jefes de Servicio de las U.I.M.A invitándoles a colaborar en la recolección de material vegetal para su posterior procesamiento e incorporación al Banco de ADN. En todos estos Centros trabaja personal con un gran conocimiento de la flora canaria y muchos de ellos con experiencia en investigación. La mayoría de ellos siguen colaborando con nosotros.

Otro aspecto importante para animar a la colaboración consiste en mostrar de forma más directa la necesidad e importancia del papel que cada una de las distintas instituciones tiene en la puesta en marcha del Banco de ADN. Desde nuestro punto de vista, una manera de lograr esto es organizar visitas a dichas instituciones para exponerles aspectos generales de la organización y la filosofía del Banco de ADN y explicarles con más detalle los objetivos y las etapas de adquisición, procesamiento y gestión de muestras. En dichas visitas se puede facilitar a todos aquellos que muestren interés en colaborar las instrucciones para la recolección de las muestras y el material necesario para llevarla a cabo (bolsas de muestreo etiquetadas, gel de sílice). Además se les entregarán instrucciones para la conservación de las muestras recolectadas hasta su envío.

Por último, para dejar constancia de forma oficial de la colaboración establecida entre cada institución con el Banco de ADN se les entrega un certificado que lo acredita. También es interesante establecer colaboraciones con Centros o Instituciones que por su situación geográfica puedan enviar muestras de parientes próximos a los taxones incluidos en el Banco de ADN.

El JBCVCSIC colabora asiduamente con los 22 *Jardines Botánicos de la Asociación Ibero-Macaronésica* (AIMJB), que se encuentran repartidos por toda la Península Ibérica y en los archipiélagos de Madeira, Azores y Baleares. Casi todos ellos están situados en áreas geográficas donde se distribuyen parientes próximos a los taxones canarios, y muchos colaboran con el Banco de ADN de la Flora Canaria.

Por último, creemos importante fomentar colaboraciones con Centros Internacionales que geográficamente representan zonas donde posiblemente se haya originado la biodiversidad de la flora representada en el Banco de ADN.

El JBCVCSIC estableció contactos con centros del Sur del Mediterráneo que es donde se cree se encuentra el origen de la flora canaria. Así se contactaron Centros en Egipto (Plant Biodiversity Education and Conservation), en Irán (Universidad de Tehrán), en Sudáfrica (National Biodiversity Institute) y en Londres (Jardín Botánico de Kew). Debido a los vínculos existentes entre nuestra flora y la del Norte de África estamos muy interesados en captar algún colaborador en Marruecos o cercanías.

Contar con el apoyo y la experiencia de Bancos de ADN ya existentes es fundamental para lograr con éxito el establecimiento de cualquier nuevo Banco. En nuestro caso, el Banco de ADN residente en el Jodrell Laboratory del Jardín Botánico de Kew fue un importante referente para muchas de las cuestiones que se nos plantearon al principio. Este Banco de ADN (<http://www.kew.org/data/DNABank>) fue el primero a nivel mundial y su objetivo a largo plazo es tener representantes de toda la flora mundial, maneja actualmente, alrededor de 22.000 muestras.

Tabla 1: Socios y Colaboradores del Banco de ADN del JBCVCSIC hasta la fecha.

PERSONAS DE CONTACTO	INSTITUCIÓN	COLABORACIÓN
Mark Chase, Edith Kapinos	Royal Botanic Gardens, Kew	Asesoramiento
Luis Silva, Mónica Moura, Maria Joao Bornes	Universidade dos Açores	Socios BIOMABANC
Teixeira Pereira		
Roberto Jardim, Francisco Fernandes, Jose Carvalho	Jardín Botánico de Madeira	Socios BIOCLIMAC
Joao Melo, Nuno Rodrigues	Jardín Botánico de Faial (Azores)	Socios BASEMAC, BIOCLIMAC
Pedro Sosa, Miguel Angel González	Departamento de Biología, ULPGC	Socios BIOMABANC
Biólogos y técnicos del JBCVCSIC	Cabildo de Gran Canaria	Recolección
Pep Toni Rosselló, Alberto del Hoyo, Nuria Membrives	Jardí Botànic Marimurtra	Recolección y proyecto INSULARIDADES
José Luis Martín Esquivel	Gobierno de Canarias	Recolección
Ángel Fernández y su equipo	Parque Nacional de Garajonay	Recolección
Manuel Durbán Villalonga y su equipo	Parque Nacional del Teide	Recolección
Ángel Palomares y su equipo	P.N de La Caldera de Taburiente	Recolección
Aurelio Centellas Bodas y su equipo	Parque Nacional de Timanfaya	En negociación
Javier Seija Bayon y su equipo	U.I.M.A de la Gomera.	Recolección
Cristóbal Rodríguez Piñero y su equipo	U.I.M.A de Tenerife	Recolección
Miguel Ángel Morcuende y su equipo	U.I.M.A. de la Palma	En negociación
Luis Pascual y su equipo	U.I.M.A de Lanzarote	En negociación
Carlos Alba y su equipo	U.I.M.A de Fuerteventura.	En negociación
Javier Armas y su equipo	U.I.M.A del Hierro	En negociación
Stephan Scholz	Biólogo Autónomo (Fuerteventura)	Recolección
Arnoldo Santos, Alfredo Reyes	Jardín Aclimatación de la Orotava	Recolección y varios proyectos de investigación
Jose María Irurita Fernández	Jardín Botánico de La Cortijuela	Recolección
Josep Lluís Gradaile, Magdalena Vicens	Jardín Botánico de Sóller	Recolección
Esteban Hernández Bermejo	Jardín Botánico de La Mancha	Recolección
John Cortés	Jardín Botánico de Gibraltar	Recolección

El Banco de ADN de Kirstenboch (<http://www.nbi.ac.za/frames/researchfram.html>) surge como una colaboración entre el laboratorio de Sistemática Molecular Leslie Hills y el Jardín Botánico de Kew y está financiado con fondos de la Iniciativa UK Darwin, que promueve la conservación de la biodiversidad y el uso sostenible de recursos. Su objetivo principal es tener al menos un representante de cada género de plantas endémicas de Sudáfrica para construir, a través de estudios filogenéticos, un “árbol de la vida” de géneros sudafricanos e identificar áreas de endemismos y de alta prioridad de cara a la conservación.

En Febrero de 2005 contactamos con los responsables del Banco del JB de Kew y visitamos sus instalaciones para recoger la mayor información posible y facilitar así la puesta en marcha de nuestro banco. La experiencia y asesoramiento que nos facilitó el grupo del Jodrell lab de Kew nos fue de gran valía, especialmente las indicaciones sobre purificación y conservación del ADN suministradas por Mark Chase (hoy Director del Jodrell lab) y Edith Kapinos (técnico del Banco de ADN de Kew). Los socios y colaboradores del Banco de ADN del JBCVCSIC se muestran en la Tabla 1.

En cuanto a las colaboraciones internacionales, es importante conocer los distintos artículos aprobados en La Convención de la Diversidad Biológica (<http://www.biodiv.org/default.shtml>) durante la Cumbre de la Tierra de 1992. Esta Convención de Diversidad Biológica busca un acercamiento al desarrollo sostenible y en su Art.5 regula la soberanía sobre las fuentes naturales y el acceso a las mismas.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

A continuación damos una serie de pautas para facilitar la recolección de las muestras con destino a un Banco de ADN. Muchas de ellas han sido extraídas del “Manual para el muestreo genético de poblaciones naturales de plantas vasculares” (Caujapé-Castells 2004) que, hasta su publicación, puede consultarse previa petición al autor en caso de que se quiera profundizar en aspectos relacionados con la metodología de muestreo y análisis de datos en genética de poblaciones. Antes de que este manual del Banco de ADN estuviera listo, enviábamos un resumen de estas pautas que siguen a las instituciones colaboradoras junto con el “kit de muestreo”. Hoy en día se les envía el manual completo.

i) Bolsas de muestreo

CAMBIAR Y PONER FOTOS DE LAS NUEVAS BOLSAS CON SAQUITOS DE BOLASS DE TÉ

Las bolsas de muestreo son importantes ya que van a contener el material a partir del cual va a extraerse el ADN del banco. Disponer de buenas bolsas correctamente etiquetadas es evitar posibles errores de asignación de muestras. Después de varias pruebas, el método que estamos usando en nuestro banco de ADN para la recolección y el almacenamiento de las muestras se esquematiza en las figuras 4 y 5 (adaptado de Caujapé Castells 2004). Las mayores ventajas de este sistema son que el código de la muestra es siempre visible (con lo que se facilita su rápida localización) y que las bolsas se pueden guardar ordenadamente en una libreta tipo Multifin.

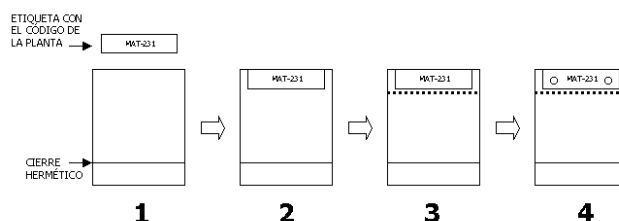


Figura 4. Las cuatro fases para la elaboración de las bolsas de muestreo. (1) etiquetas con los códigos y las bolsas de plástico con cierre hermético en uno de sus extremos; (2) introducir la etiqueta en el fondo de la bolsa; (3) sellar al calor el espacio que contiene la etiqueta; y (4) troquelar dos agujeros a la separación adecuada para ordenar las bolsas en una libreta de anillas tipo Multifin (ver siguiente Figura).

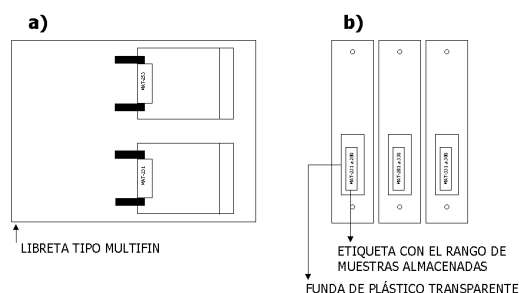


Figura 5. Almacenamiento de las bolsas de muestreo ordenadas correlativamente en una libreta de anillas tipo Multifin. a) Libreta de anillas abierta. Una libreta mediana de 4 anillas puede almacenar dos filas de hasta 25 bolsas conteniendo hojas; b) esquema de las libretas Multifin ordenadas correlativamente según el rango de muestras que contienen. Si fuera necesario, las libretas pueden ser almacenadas vertical u horizontalmente en el congelador, frigorífico o a T.A, facilitando considerablemente la localización de un individuo cualquiera en un tiempo mínimo. En el ultracongelador de -80°C estas libretas se vuelven inservibles rápidamente, ya que se rompen al intentar abrirlas, por lo que se hace más aconsejable mantener las bolsas unidas utilizando bridas de plástico, de venta en cualquier ferretería.

ii) Normas prácticas de muestreo de hojas para extracción de ADN

Debido a que es preferible realizar extracciones a gran escala para tener un número aceptable de alícuotas de cada muestra, se aconseja recolectar el máximo de hojas que se puedan introducir en una de las bolsas de muestreo. En caso de recolectar pocos individuos (aconsejamos un mínimo de 3 por población), es conveniente que estén separados entre sí en el espacio de la población para asegurar que no están muy emparentados e intentar capturar algo de la variabilidad genética poblacional, si la hubiere. Hay también unas cuantas normas básicas que es necesario observar para garantizar una óptima extracción y posterior amplificación del ADN:

- 1) Fijarse bien en que todas las hojas recolectadas corresponden a la especie diana y en que no haya insectos u otros organismos pequeños adheridos a las hojas

Es muy fácil que una aguja de pino o algún trozo de otra planta se cuele en la bolsa de muestreo, por lo cual hay que ser extremadamente cuidadoso al muestrear en zonas muy frondosas. Si todas las hojas de la población mostraran síntomas de infección por parásitos o virus, conviene limpiarlas con un paño limpio empapado en agua destilada y secarlas bien con un trozo de papel higiénico antes de almacenarlas.

- 2) Seleccionar siempre las hojas más limpias de las plantas a muestrear, pero no muestrear exclusivamente las plantas más sanas y vistosas de la población

Aunque las plantas sanas y robustas llaman siempre más la atención, las macilentas y poco conspicuas también forman parte de la población y deben de ser muestreadas en aras de una correcta representatividad. Con frecuencia, las plantas deformes o menos atractivas poseen también alelos raros, por lo cual infra-representarlas podría provocar una estimación sesgada de los niveles de variación genética de la población.

- 3) Coger siempre las hojas más verdes y limpias de entre las disponibles en la planta.

Esta manera de proceder minimizará los posibles problemas de contaminación en las muestras.

- 4) En caso de tener que coger más de una hoja para asegurar la cantidad mínima de material por espécimen, debemos asegurarnos de que se muestrea siempre el mismo individuo.

Frecuentemente varios pies de diferentes plantas se hallan entremezclados, lo cual hace muy fácil equivocarse y representar la variación genética de dos plantas diferentes en una misma muestra.

- 5) Hacer un pliego testigo y depositarlo en el herbario del centro, o en otro herbario

Se debe realizar siempre un pliego testigo recogiendo varias plantas representativas de las diferentes morfologías y tamaños que se hallan en la población e indicando todos los datos relacionados con la recolección (especie, fecha, localidad, altitud y recolector). Si las plantas no estuvieran en flor, sería conveniente regresar al lugar en la época adecuada para recoger plantas con flor y fruto, especialmente si las poblaciones muestreadas plantean dudas a nivel de reconocimiento morfológico.

- 6) Recoger siempre hojas adultas que no hayan empezado la senescencia.

Según la experiencia del Banco de ADN de Kew (Mark Chase y Michael Fay, comunicación personal) el ADN de las hojas jóvenes de algunos grupos de plantas es imposible de amplificar debido a la presencia de compuestos químicos que no se hallan en otros tejidos. Estos compuestos probablemente impidan la predación por parte de insectos o animales antes de que las hojas se hayan endurecido.

- 7) No recolectar hojas crasas ni suculentas, a menos que su extracción pueda efectuarse al día siguiente de su recolección

Quizás el requisito más importante para la buena preservación y amplificación del ADN sea un secado rápido de las hojas. Según Savolainen et al. (1995), si el secado se prolonga demasiado, la planta (que aun está viva) estará sujeta a un estrés hídrico, a la carencia de nutrientes y a heridas (entre ellas, las que hemos ocasionado al desprender la hoja de la planta, al doblarla para introducirla en la bolsa, etc...). Las heridas inducen rápidamente la producción de compuestos fenólicos y radicales libres, que pueden influenciar muy fuertemente el ambiente celular y, en consecuencia, perjudicar la calidad del ADN obtenido en la extracción (McKersie et al. 1988). Además, se ha visto que existe una disminución del contenido en ADN durante los primeros estadios de la senescencia foliar, que puede representar hasta el 20% del ADN total (Scott y Possingham 1983). Las respuestas metabólicas y celulares a la preparación de pliegos de herbario son similares a las debidas a la senescencia. Por todos estos motivos, si no estamos seguros de poder realizar la extracción de este tipo de hojas cuando aun están frescas, es preferible prescindir de muestrearlas.

8) Procurar recolectar las hojas enteras, sin causarles heridas

El tamaño de las hojas de la mayoría de plantas permite depositarlas enteras dentro de la bolsa de muestreo. Hay que procurar desprenderlas del tallo o de la rama causando el mínimo de heridas, ya que en caso contrario se deteriorarían más rápidamente por los factores mencionados en el punto 7.

9) Si las hojas son muy grandes, partirlas en varios trozos

En caso de que las hojas sean exageradamente grandes y no quepan enteras en las bolsas de muestreo, se hace aconsejable partirlas en varios trozos (aunque sea en detrimento de la integridad de la hoja), ya que parece que el secado rápido es más prioritario que las heridas causadas por los cortes de cara a la extracción de ADN en óptimas condiciones. Un rápido secado de la muestra de hoja es prioritario para limitar el impacto de la senescencia, y este es el motivo por el que el gel de sílice es un material idóneo para conservar el tejido de hoja (Chase y Hills 1991).

Las muestras de hoja se depositan en una bolsa cerrada herméticamente que contiene un saquito con gel de sílice.

Al cerrar la bolsa con la muestra hay que procurar que contenga el mínimo de aire posible para evitar la introducción de humedad ambiental o de gérmenes y también porque así se facilita su almacenamiento.

Si se siguen estas indicaciones, las muestras se conservan bien a temperatura ambiente durante un largo tiempo, siempre y cuando se almacenen en un sitio fresco resguardado de la humedad y de la luz. Si el color naranja del gel de sílice seco virara a verde, esto indicaría la presencia de humedad, y es necesario sustituir el saquito de gel por uno seco, y reciclar el que contiene gel húmedo (en la estufa de secado, el tiempo que haga falta para librarse de la humedad).

iii) Muestras recolectadas por colaboradores

Creemos que las instituciones y/o personas que colaboran desinteresadamente con el muestreo deben recibir todo el material necesario para llevar a cabo las recolecciones y unas indicaciones metodológicas para el muestreo de las hojas desde las que posteriormente se va a realizar la extracción del ADN. Es aconsejable preparar lo que podría denominarse un “kit de muestreo” que contenga lo siguiente:

1. Instrucciones para el muestreo y el envío de las muestras al Banco de ADN.
2. Listado especies prioritarias, si las hubiere.
3. Tablas a completar por los recolectores con los datos referentes a las muestras recogidas.
4. 100 Bolsas para muestras ya etiquetadas + 1 bolsa con gel de sílice como ejemplo.
5. Bolsas de muestreo con saquitos de gel de sílice, y saquitos extra para reponer los que hayan virado.

En nuestro caso, el Banco de ADN asume todos los gastos que supongan los envíos de las muestras desde las instituciones colaboradoras. Para evitar el gasto que supondría costear varios envíos, es preferible que los colaboradores guarden las bolsas con las hojas en un lugar fresco, seco y resguardado del sol hasta que se haya recogido al menos un grupo considerable de las mismas (p.e. entre 50 o 100 bolsas) y así realizar el envío en grupos de bolsas.

Junto con las muestras de hoja es deseable recibir un pliego testigo recogidos en cada población muestreada. Si no fuera posible el envío de dichos pliegos, los colaboradores deben suministrar la información sobre el herbario donde se hallan depositadas, y el código que se les haya asignado.

Para disponer de información básica sobre cada muestra (hoja y pliego asociado a la población donde se recolectó) se les hace llegar a los colaboradores una tabla de muestreo (Tabla 2) que debe procurar completarse con el máximo de información disponible. Esta tabla debe incluir datos taxonómicos de la especie, datos de recolección (recolectores, fecha, localidad) y datos relativos a la población (fenología, altitud, UTM, etc.) para los que está destinada la columna de observaciones. Una vez los colaboradores rellenen todos los apartados de dicha tabla, esta se deberá reenviar a los responsables del Banco de ADN junto con las muestras recolectadas.

Para facilitar la toma de datos es conveniente llevar al campo varias hojas impresas de dicha tabla para que en el momento en el que se hace la recolección de las muestras ir anotando toda la información relativa a la misma.



En ocasiones habrá datos (por ejemplo, taxonómicos) que será necesario confrontar y comprobar una vez de vuelta en los laboratorios pero, sin duda, la información relativa a localidad, recolectores, fecha, fenología, altitud, UTM, etc. es aconsejable anotarla durante la visita a las poblaciones naturales.

Por último, es muy aconsejable establecer por escrito las condiciones básicas de colaboración.

Es también conveniente que se cree una página web asociada al Banco de ADN para favorecer su divulgación y facilitar el acceso de muestras al mayor número de científicos o personas interesadas. En caso de disponer de dicha página, cada institución colaboradora debe figurar como tal en la misma, así como en todos los actos oficiales en los que participe la línea del proyecto en el que se incluye la creación del Banco de ADN.

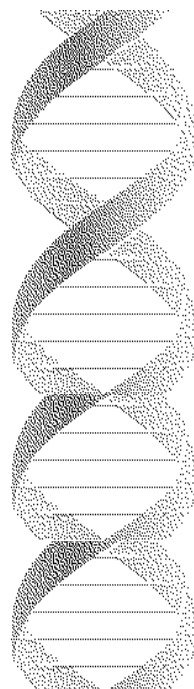
En el caso del Banco de ADN del JBCVCSIC, quizás el aspecto que consideramos más importante es dejar claro que las muestras que nos envíen los colaboradores de otras regiones geográficas están depositadas en nuestro banco en fideicomiso. Esto significa que, en caso de que alguna de las instituciones a las que pertenecen quisiera crear su propio Banco de ADN para su región geográfica, se les enviaría al menos una alícuota del ADN de los especímenes que nos enviaron y se les ofrecería toda nuestra experiencia en el montaje y gestión del Banco de ADN. Una alícuota de dicho material quedará depositada permanentemente en el Banco de ADN por razones de seguridad.

Tabla 2. Ejemplo de tabla enviada a los colaboradores del Jardín Botánico de Córdoba para detallar información relativa a muestras (hojas y pliegos) recolectadas.

 <div> CONSEJERIA DE MEDIO AMBIENTE Y AGUAS JARDÍN BOTÁNICO CANARIO "VIERA Y CLAYJO" </div> 				
Fecha:				
Recolectores:				
Muestra	Especie	Localidad	Pliego	Observaciones
Córdoba 1				
Córdoba 2				
Córdoba 3				
Córdoba 4				
Córdoba 5				
Córdoba 6				
Córdoba 7				
Córdoba 8				
Córdoba 9				
Córdoba 10				
Córdoba 11				
Córdoba 12				
Córdoba 13				
Córdoba 14				
Córdoba 15				
Córdoba 16				
Córdoba 17				
Córdoba 18				
Córdoba 19				
Córdoba 20				
Córdoba 21				
Córdoba 22				
Córdoba 23				
Córdoba 24				
Córdoba 25				

PARTE II

Procesamiento de muestras



EXTRACCIÓN DE ADN

El método empleado por lo general en nuestro laboratorio para la extracción del ADN es el método CTAB 2X (Saghai-Marooof et al. 1984, Doyle y Doyle 1987, Palmer et al. 1989) tanto para las extracciones a pequeña escala como a gran escala. No obstante, para algunas muestras especialmente difíciles, utilizamos a veces el kit Nucleon-Phytopure de Amersham-Pharmacia, que ofrece un buen rendimiento en el caso de micropreparaciones.

En esta sección se detallan los pasos a seguir para llevar a cabo las extracciones con el método CTAB 2X.

El protocolo de extracción de ADN consta de dos fases diferenciadas:

1. Machacado de material vegetal
2. Extracción de ADN

Estas fases pueden también estar distanciadas en el tiempo, dependiendo del tipo de machacado que escogamos y de nuestra organización en el laboratorio.

Antes de empezar el protocolo de extracción hemos de tener claro qué tipo de machacado es el más conveniente, teniendo en cuenta la naturaleza y estado de conservación de las muestras y nuestro plan de trabajo. Los tipos de machacado de muestras posibles en nuestro laboratorio son:

- A) En mortero, sin nitrógeno líquido pero con tampón de extracción (página 20)
Adecuado para muestras frescas (grandes o pequeñas) de hojas frágiles y poco fibrosas
- B) En mortero, con nitrógeno líquido (página 22)
Adecuado para todo tipo de muestras (grandes o pequeñas), especialmente si son fibrosas o duras
- C) En el homogeneizador automático, muestras pequeñas con tampón de extracción (página 23)
Adecuado para todo tipo de hojas frescas
- D) En el homogeneizador automático, muestras pequeñas secas sin tampón de extracción (página 25)
Adecuado para todo tipo de hojas, siempre que estén muy secas
- E) En el homogeneizador automático, muestras grandes con tampón de extracción (página 27)
Adecuado para todo tipo de hojas frescas
- F) En el homogeneizador automático, muestras grandes secas sin tampón de extracción (página 29)
Adecuado para todo tipo de hojas, siempre que estén muy secas (este último es el método que aplicamos con mayor frecuencia).

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR PARA MACHACAR EL MATERIAL VEGETAL

A) MACHACADO DE MUESTRAS EN MORTERO, SIN NITRÓGENO LÍQUIDO PERO CON TAMPÓN DE EXTRACCIÓN

Este procedimiento es adecuado cuando las hojas son tiernas y la extracción de ADN se hace inmediatamente después del machacado. Es el caso también de hojas que no es aconsejable conservar durante mucho tiempo en el ultracongelador, que tardarían demasiado tiempo en secarse con gel de sílice (como las hojas crasas), o que se podrían deteriorar considerablemente con la conservación a largo plazo.

Material Necesario

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	
•Balanza	Pesado de hojas y productos	
•Dispensador de volumen	Obtención rápida del volumen de CTAB	
•Botella de vidrio para el dispensador 2.5l	Almacenar el CTAB para ser dispensado	
•Campana extractora	Manipulaciones con Mercaptoetanol y SEVAG	
•Baño termostático	Calentamiento de reactivos y extracción	
•Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	
Reactivos (en orden de uso)		
•CTAB 2x	Choque hipertónico	TA
•Mercaptoetanol	Se añade al CTAB 2X	TA
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
•Contenedores homologados para residuos	Eliminación residuos tóxicos	
•Resmas	Protección de la poyata	
•Gel de sílice blanco fino	Machacado manual de hojas	TA
•Morteros de porcelana	Autoclavar. Utilizar un mortero por muestra, en su defecto reutilizar los morteros después de su limpieza con jabón y posterior desinfección con alcohol.	TA
•Espátula	Paso del material homogenizado desde el mortero al tubo de 1,5 ml. Hay que lavarla con agua y alcohol después de cada uso	TA
•Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
•48 tubos de 1,5 ml de tapa plana autoclavados	2 tubos de 1.5ml por muestra convenientemente marcados	TA (en un vaso de precipitados tapado)
•Gradilla para tubos de 1,5 ml	Ordenación de tubos	
•Termómetro	Comprobación de la temperatura del baño termostático	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	
•1 punta de 100-1000µl autoclavada	Manipulación del CTAB2X	
•1 punta de 10-100µl autoclavada	Manipulación del Mercaptoetanol	

A1. Conectar el baño termostático para que alcance una temperatura de 65°C. Cubrir la resistencia con agua destilada. De lo contrario, el agua no se calentará y la resistencia puede sufrir daños (Fig.12). El tiempo aproximado que tarda el baño en calentar el agua a 65° C es de 15 minutos.

A2. Introducir en el baño termostático un tubo de 50ml que contenga 12.5ml de CTAB y 50µl de mercaptoetanol (volumen indicado para 25 muestras para corregir el error de pipeteo, correspondiéndose con 500µl de CTAB y 2µl de mercaptoetanol por muestra. Dejarlo en el baño durante el tiempo que tardemos en machacar las muestras. Los 12.5ml de CTAB se añaden al tubo de forma más rápida utilizando un dispensador (ver Fig.13).

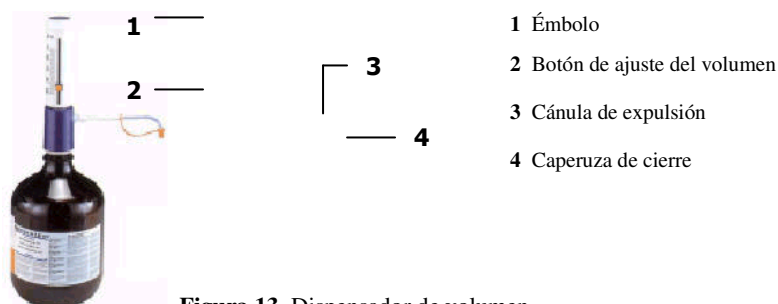


Figura 13. Dispensador de volumen

A3. Pesar el material vegetal en la balanza (0.1g como máximo). Observar que las hojas no presentan partículas extrañas ni insectos antes de su pesada, de ser así, retirar con ayuda de un papel o bisturí.

A4. Introducir el material de hoja que hemos pesado en el mortero y añadir una pequeña cantidad de gel de sílice blanco autoclavado para facilitar la rotura de las hojas al machacar (si la trituración es dificultosa, machacar con la ayuda de nitrógeno líquido como se indica en el apartado B).

A5. Añadir al mortero una parte del CTAB 2X a 65° C y triturar la hoja (ha de quedar lo más fino posible). No permitir la caída de sustancias ajenas en el mortero con el fin de evitar la contaminación del material a extraer.

A6. Pasar el polvo resultante a un tubo de 1,5 ml convenientemente etiquetado. Ver figura 14 para una indicación de la cantidad máxima de material a poner en el tubo de 1,5 ml.

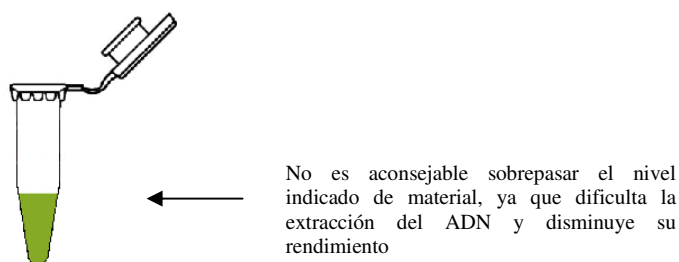


Figura 14. Nivel máximo de material vegetal para las micropreparaciones.

A7. Añadir el resto de CTAB 2X hasta alcanzar un volumen de 500µl

A8. Proseguir con la extracción de ADN a pequeña o gran escala (dependiendo de la cantidad de muestra) desde el punto 4 en adelante.

B) MACHACADO DE MUESTRAS EN MORTERO, CON NITRÓGENO LÍQUIDO

Este procedimiento es especialmente aconsejable para hojas fibrosas y cuando se va a realizar la extracción de un número elevado de muestras donde, por razones de organización, es conveniente empezar las extracciones solamente cuando hayamos machacado todo el material. Es también adecuado si inmediatamente después del machacado se quiere continuar con la extracción.

Material Necesario

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	
•Balanza	Pesado de hojas y productos	
•Campana extractora	Manipulaciones con Mercaptoetanol y SEVAG	
Reactivos (en orden de uso)		
•Nitrógeno líquido	Petrificación de muestras	Canister
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
• Contenedores homologados para residuos	Eliminación residuos tóxicos	
•Resmas	Protección de la poyata	
• Termo	Almacenar N ₂ (l) para machacar 5-10 muestras hojas	TA
•Morteros de porcelana	Autoclavar. Utilizar un mortero por muestra, en su defecto reutilizar los morteros después de su limpieza con jabón y posterior desinfección con alcohol.	TA
•Espátula	Paso del material homogenizado desde el mortero al tubo de 1,5 ml. Hay que lavarla con agua y alcohol después de cada uso	TA
•Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
• Tubos de 1,5 ml de tapa plana autoclavados	1 tubo de 1.5ml por muestra, convenientemente marcado	TA (en un vaso de precipitados tapado)
•Gradilla para tubos de 1,5 ml	Ordenación de tubos	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	

B1. Pesar el material vegetal en la balanza. Observar que las hojas no presentan partículas extrañas ni insectos antes de su pesada. De ser así, retirar con ayuda de un papel o bisturí.

B2. Introducir en el mortero el material de hoja que hemos pesado y triturar con nitrógeno líquido. No permitir la caída de sustancias ajenas en el mortero con el fin de evitar la contaminación del material a extraer.

B3. Depositar el material triturado en un tubo de 1,5 ml previamente etiquetado. (Ver nivel máximo de material en la figura 14).

B4. Continuar la extracción de ADN a pequeña o gran escala (dependiendo de la cantidad de muestra) a partir del punto 1 o almacenar el tubo a -20° C o -80° C hasta la posterior extracción del ADN a pequeña o gran escala (dependiendo de la cantidad de muestra) desde el punto 4 en adelante.

C) MACHACADO DE PEQUEÑAS MUESTRAS FRESCAS CON TAMPÓN DE EXTRACCIÓN EN EL HOMOGENEIZADOR AUTOMÁTICO RETSCH (“MIXER MILL”)

NOTA: estas instrucciones son estándar, y puede haber casos en los que haya que realizar ajustes *ad hoc*. La limpieza escrupulosa del material inmediatamente después de su utilización y el autoclavado de las bolas metálicas es obligatoria e inexcusable. Nunca se usa Nitrógeno líquido con el homogeneizador automático.

Material Necesario

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	
•Balanza	Pesado de hojas y productos	
•Dispensador de volumen	Obtención rápida del volumen de CTAB	
•Botella de vidrio para el dispensador 2.5l	Almacenar el CTAB para ser dispensado	
•Campana extractora	Manipulaciones con Mercaptoetanol y SEVAG	
•Baño termostático	Calentamiento de reactivos y extracción	
•Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	
•Homogeneizador automático Retsch	Machacado de muestras	
Reactivos (en orden de uso)		
•CTAB 2x	Choque hipertónico	TA
•Mercaptoetanol	Se añade al CTAB 2X	TA
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
• Contenedores homologados para residuos	Eliminación residuos tóxicos	
•Resmas	Protección de la poyata	
•2 bolitas metálicas por muestra	Machacado de muestras	
•2 bloques de plástico para 10 tubos de 1,5 ml	Colocación de muestras para el machacado automático	
•Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
•48 tubos de 1,5 ml de tapa plana autoclavados	1 tubo de 1.5ml por muestra, convenientemente marcado	TA (en un vaso de precipitados tapado)
•Gradilla para tubos de 1,5 ml	Ordenación de tubos	
•Termómetro	Comprobación de la temperatura del baño termostático	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	
•1 punta de 100-1000µl autoclavada	Manipulación del CTAB2X	TA
•1 punta de 10-100µl autoclavada	Manipulación del Mercaptoetanol	TA

C1. Conectar el baño termostático para que alcance una temperatura de 65°C. Cubrir la resistencia con agua destilada. De lo contrario, el agua no se calentará y la resistencia puede sufrir daños (Fig.12). El tiempo aproximado que tarda el baño en calentar el agua a 65° C es de 15 minutos.

C2. Introducir en el baño termostático un tubo de 50ml que contenga 12.5ml de CTAB y 50µl de mercaptoetanol (volumen indicado para 25 muestras para corregir el error de pipeteo, correspondiéndose con 500µl de CTAB y 2µl de mercaptoetanol por muestra. Dejarlo en el baño durante el tiempo que tardemos en machacar las muestras. Los 12.5ml de CTAB se añaden al tubo de forma más rápida utilizando un dispensador (ver Fig.13).

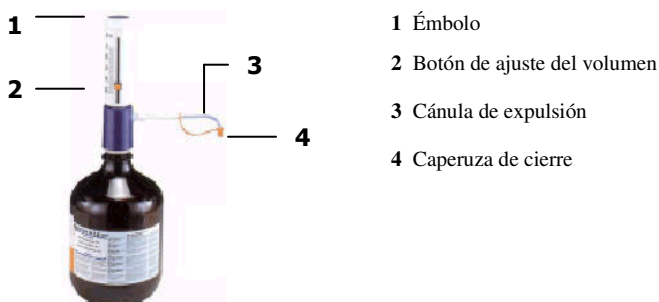


Figura 13. Dispensador de volumen

C3. Rellenar cada tubo de 1,5 ml con:

- • 2 bolitas metálicas (usar solamente las bolitas destinadas a DNA)
- • 500 µl de tampón de extracción
- • muestra de hoja (no mucha cantidad, y partida en trocitos pequeños si es posible. Las muestras deben estar lo más secas posible)

C4. Situar los tubos bien tapados en los recipientes, con el tapón en la parte del receptáculo que se tapa (Foto 1 y 2).



Foto 1



Foto 2

MUY IMPORTANTE: El aparato ha de estar equilibrado, por lo que debemos utilizar **siempre** los 2 receptáculos (ver Foto 3). En caso de tener que procesar menos de 20 muestras, hay que repartirlas y colocarlas de manera que haya el mismo número de tubos en cada receptáculo.

C5. Tapar bien los receptáculos (como en la Foto 2) y colocarlos en los brazos del “mixer mill” en orientación opuesta (como en la Foto 3), fijándose en que encajen perfectamente en las piezas metálicas y apretándolos bien para que no salgan disparados al iniciarse el funcionamiento del aparato. Al terminar esta operación, la muesca del mecanismo de fijación ha de quedar encajada en la posición que se muestra en la Foto 4.

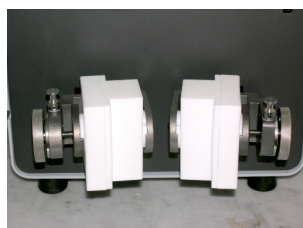


Foto 3

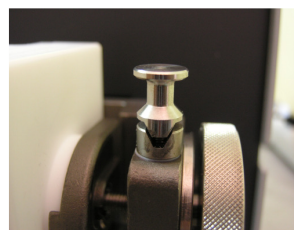


Foto 4

C6. Conectar el aparato por el interruptor trasero.

C7. Seleccionar 3 minutos a una frecuencia de 30.

C8. Pulsar “start” y esperar.

C9. Al terminar el proceso, sacar los tubos de 1,5 ml y comprobar que la calidad del extracto es la deseada. Si es demasiado sólido, puede añadirse una cantidad adicional de tampón de extracción y dar un pulso de vibración para homogeneizar. Si aún hay trozos grandes de hoja, es aconsejable procesar otros 3 minutos.

C10. Puesto que en este tipo de machacado la extracción continúa inmediatamente después, las bolas metálicas se recuperan (para lavarlas y luego autoclavarlas) después de la primera centrifugación del protocolo de extracción.

C11. Al terminar, dejarlo todo limpio, ordenado y en su sitio correspondiente.

C12. Desconectar el aparato por el interruptor trasero.

C13. Continuar la extracción de ADN a **PEQUEÑA ESCALA** (página 31) a partir del punto 4.

D) MACHACADO DE PEQUEÑAS MUESTRAS SECAS SIN TAMPÓN DE EXTRACCIÓN EN EL HOMOGENEIZADOR AUTOMÁTICO RETSCH (“MIXER MILL”)

NOTA: estas instrucciones son estándar, y puede haber casos en los que haya que realizar ajustes *ad hoc*. La limpieza escrupulosa del material inmediatamente después de su utilización y el autoclavado de las bolas metálicas es obligatoria e inexcusable. Nunca se usa Nitrógeno líquido con el homogeneizador automático.

Material Necesario

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
• Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	
• Balanza	Pesado de hojas y productos	
• Homogeneizador automático Retsch	Machacado de muestras	
Utillaje general (en orden de uso)		
• Bata	Protección personal	
• Guantes de nitrilo	Protección personal	
• Resmas	Protección de la poyata	
• 2 bolitas metálicas por muestra	Machacado de muestras	
• Colador	Recuperar bolitas metálicas	
• 2 bloques de plástico para 10 tubos de 1,5 ml	Colocación de muestras para el machacado automático	
• Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
• 1 tubo de 1,5 ml de tapa plana por muestra, convenientemente marcado	Colocación de las muestras	TA (en un vaso de precipitados tapado)
• Gradilla para tubos de 1,5 ml	Ordenación de tubos	
• Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	

D1. Rellenar cada tubo de 1,5 ml con:

- 2 bolitas metálicas (**usar solamente las bolitas destinadas a DNA**)
- muestra de hoja seca

D2. Situar los tubos bien tapados en los recipientes, con el tapón en la parte del receptáculo que se tapa (Foto 1 y 2).

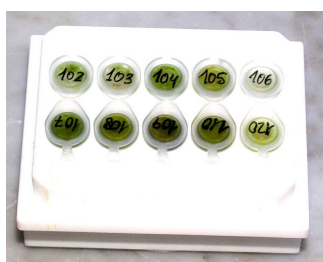


Foto 1



Foto 2

MUY IMPORTANTE: El aparato ha de estar equilibrado, por lo que debemos utilizar **siempre** los 2 receptáculos (ver Foto 3). En caso de tener que procesar menos de 20 muestras, hay que repartirlas y colocarlas de manera que haya el mismo número de tubos en cada receptáculo.

D3. Tapar bien los receptáculos (como en la Foto 2) y colocarlos en los brazos del “mixer mill” en orientación opuesta (como en la Foto 3), fijándose en que encajen perfectamente en las piezas metálicas y apretándolos bien para que no salgan disparados al iniciarse el funcionamiento del aparato. Al terminar esta operación, la muesca del mecanismo de fijación ha de quedar encajada en la posición que se muestra en la Foto 4.

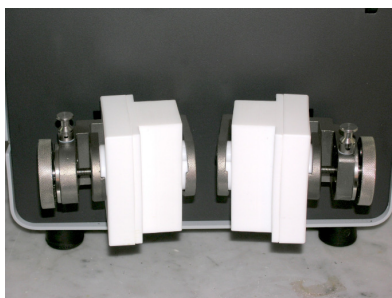


Foto 3

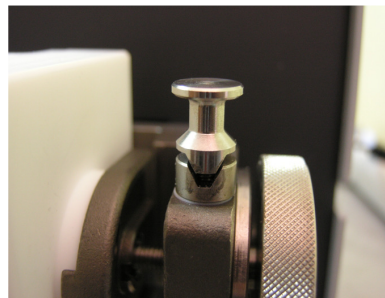


Foto 4

D4. Conectar el aparato por el interruptor trasero.

D5. Seleccionar 3 minutos a una frecuencia de 30.

D6. Pulsar “start” y esperar.

D7. Al terminar el proceso, sacar los tubos de 1,5 ml y comprobar que la calidad del extracto es la deseada. Si es demasiado sólido, puede añadirse una cantidad adicional de tampón de extracción y dar un pulso de vibración para homogeneizar. Si aún hay trozos grandes de hoja, es aconsejable procesar otros 3 minutos.

D8. Procesar los extractos. Limpiar a conciencia los receptáculos con agua y jabón (primero) y con alcohol (después). Secar bien con un trozo de papel higiénico.

D9. Si continuamos con la extracción de ADN inmediatamente después del machacado, las bolas metálicas deben recuperarse utilizando un colador (para lavarlas y luego autoclavarlas) después de la primera centrifugación del protocolo de extracción. En caso de que queramos almacenar los extractos secos en el ultracongelador por un tiempo indefinido, debemos antes recuperar las bolas de cada tubo (con unas pinzas limpias, evitando contaminaciones). Luego, limpiar las bolitas a conciencia con agua y jabón (primero) y con alcohol (después), dejándolas secar a temperatura ambiente o en la estufa de secado. Si han de utilizarse a continuación, secar rápidamente con la ayuda de un papel o de resmas. Si no, autoclavarlas.

D10. Al terminar, dejarlo todo limpio, ordenado y en su sitio correspondiente.

D11. Desconectar el aparato por el interruptor trasero.

D12. Almacenar las muestras a -20° C o -80° C o continuar la extracción de ADN a **PEQUEÑA ESCALA** (página 31) partir del punto 1.

E) MACHACADO DE GRANDES MUESTRAS FRESCAS CON TAMPÓN DE EXTRACCIÓN EN EL HOMOGENEIZADOR AUTOMÁTICO RETSCH (“MIXER MILL”)

NOTA: estas instrucciones son estándar, y puede haber casos en los que haya que realizar ajustes *ad hoc*. La limpieza escrupulosa del material inmediatamente después de su utilización y el autoclavado de las bolas metálicas es obligatoria e inexcusable. Nunca se usa Nitrógeno líquido con el homogeneizador automático.

Material Necesario

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	
•Balanza	Pesado de hojas y productos	
•Dispensador de volumen	Obtención rápida del volumen de CTAB	
•Botella de vidrio para el dispensador 2.5l	Almacenar el CTAB para ser dispensado	
•Campana extractora	Pipeteado del Mercaptoetanol	
•Baño termostático	Calentamiento de reactivos y extracción	
•Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	
•Homogeneizador automático Retsch	Machacado de muestras	
Reactivos (en orden de uso)		
•CTAB 2x	Choque hipertónico (10 ml por muestra)	TA
•Mercaptoetanol	Se añade al CTAB 2X (40 µl por muestra)	TA
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
•Resmas	Protección de la poyata	
•1 bola metálica por muestra	Machacado de muestras	
•2 recipientes metálicos Retsch de 50 ml	Colocación de muestras para el machacado automático	
• Colador	Recuperar bola metálica	
•Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
•2 tubos de 50 ml autoclavados	1 tubo de 50 ml por muestra, convenientemente marcado	TA (en un vaso de precipitados tapado)
•Gradilla para tubos de 1,5 ml	Ordenación de tubos	
•Termómetro	Comprobación de la temperatura del baño termostático	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	
•1 punta de 100-1000µl autoclavada	Manipulación del CTAB2X	TA
•1 punta de 10-100µl autoclavada	Manipulación del Mercaptoetanol	TA

E1. Conectar el baño termostático para que alcance una temperatura de 65°C. Cubrir la resistencia con agua destilada. De lo contrario, el agua no se calentará y la resistencia puede sufrir daños (Fig.12). El tiempo aproximado que tarda el baño en calentar el agua a 65° C es de 15 minutos.

E2. Introducir en el baño termostático 2 tubos de 50ml, que contengan cada uno 10ml de CTAB y 40µl de mercaptoetanol. Dejar durante aproximadamente 10 minutos para que los reactivos alcancen la temperatura de 65°C. Los 10ml de CTAB se añaden al tubo de forma más rápida utilizando un dispensador (Fig. 13).

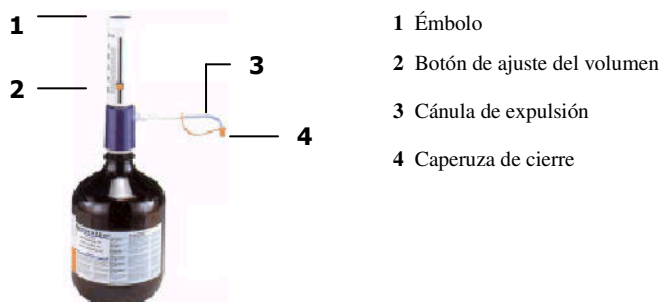


Figura 13. Dispensador de volumen

E3. Rellenar cada recipiente metálico Retsch de 50 ml con (en este orden):

- • muestra de hoja
- • 1 bola metálica
- • el contenido de los tubos de 50 ml (CTAB 2X + Mercaptoetanol)

E4. Situar los recipientes Retsch de 50 ml bien cerrados en los brazos del “mixer mill” como se muestra en la Foto 3, fijándose en que encajen perfectamente en las piezas metálicas y apretándolos bien para que no salgan disparados al iniciarse el funcionamiento del aparato. Al terminar esta operación, la muesca del mecanismo de fijación ha de quedar encajada en la posición que se muestra en la Foto 4.



Foto 3



Foto 4

E5. Conectar el aparato por el interruptor trasero.

E6. Seleccionar 3 minutos a una frecuencia de 30.

E7. Pulsar “start” y esperar.

E8. Al terminar el proceso, sacar los recipientes Retsch de 50 ml y comprobar que la calidad del extracto es la deseada. Si es demasiado sólido, puede añadirse una cantidad adicional de tampón de extracción y dar un pulso de vibración para homogeneizar. Si aún hay trozos grandes de hoja, es aconsejable procesar otros 3 minutos.

E9. Procesar los extractos y recuperar las bolas metálicas utilizando el colador. Limpiar a conciencia los recipientes con agua y jabón (primero) y con alcohol (después). Secar bien con un trozo de papel higiénico.

E10. Al terminar, dejarlo todo limpio, ordenado y en su sitio correspondiente.

E11. Desconectar el aparato por el interruptor trasero.

E12. Continuar la extracción de ADN a **GRAN ESCALA** (página 35) a partir del punto 4.

F) MACHACADO DE GRANDES MUESTRAS SECAS CON TAMPÓN DE EXTRACCIÓN EN EL HOMOGENEIZADOR AUTOMÁTICO RETSCH (“MIXER MILL”)

NOTA: estas instrucciones son estándar, y puede haber casos en los que haya que realizar ajustes *ad hoc*. La limpieza escrupulosa del material inmediatamente después de su utilización y el autoclavado de las bolas metálicas es obligatoria e inexcusable. Nunca se usa Nitrógeno líquido con el homogeneizador automático.

Material Necesario

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	
•Balanza	Pesado de hojas y productos	
•Homogeneizador automático Retsch	Machacado de muestras	
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
•Resmas	Protección de la poyata	
•1 bola metálica por muestra	Machacado de muestras	
•2 recipientes metálicos Retsch de 50 ml	Colocación de muestras para el machacado automático	
•Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
•1 tubo de 50 ml por muestra, autoclavado	Colocación de las muestras	TA (en papel de aluminio)
•Gradilla para tubos de 50 ml	Ordenación de tubos	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	

F1. Rellenar cada recipiente metálico Retsch de 50 ml con:

- • 1 bola metálica
- • muestra de hoja

F2. Situar los recipientes Retsch de 50 ml bien cerrados en los brazos del “mixer mill” como se muestra en la Foto 3, fijándose en que encajen perfectamente en las piezas metálicas y apretándolos bien para que no salgan disparados al iniciarse el funcionamiento del aparato. Al terminar esta operación, la muesca del mecanismo de fijación ha de quedar encajada en la posición que se muestra en la Foto 4.

MUY IMPORTANTE: El “mixer mill” ha de estar siempre equilibrado, por lo que debemos utilizar **siempre** los 2 receptáculos (ver Foto 3). En caso de tener que procesar menos de 20 muestras, hay que repartirlas y colocarlas de manera que haya el mismo número de tubos en cada receptáculo



Foto 3



Foto 4

F4. Conectar el “mixer mill” por el interruptor trasero.

F5. Seleccionar 3 minutos a una frecuencia de 30.

F6. Pulsar “start” y esperar.

F7. Al terminar el proceso, sacar los tubos de 1,5 ml y comprobar que la calidad del extracto es la deseada. Si es demasiado sólido, puede añadirse una cantidad adicional de tampón de extracción y dar un pulso de vibración para homogeneizar. Si aún hay trozos grandes de hoja, es aconsejable procesar otros 3 minutos.

F8. Procesar los extractos y recuperar las bolitas metálicas utilizando el colador. Limpiar a conciencia los receptáculos con agua y jabón (primero) y con alcohol (después). Secar bien con un trozo de papel higiénico.

F9. Si continuamos con la extracción de ADN inmediatamente después del machacado, las bolas metálicas deben recuperarse después de la primera centrifugación del protocolo de extracción. En caso de que queramos almacenar los extractos secos en el ultracongelador por un tiempo indefinido, debemos antes recuperar las bolas de cada tubo (con unas pinzas limpias, evitando contaminaciones). Hay que limpiar las bolas a conciencia con agua y jabón (primero) y con alcohol (después), dejándolas secar a temperatura ambiente o en la estufa de secado. Si han de utilizarse a continuación, secar rápidamente con la ayuda de un papel o de resmas.

F10. Al terminar, dejarlo todo limpio, ordenado y en su sitio correspondiente.

F11. Desconectar el “mixer mill” por el interruptor trasero.

F12. Almacenar las muestras a -20° C o -80° C o continuar la extracción de ADN a **GRAN ESCALA** (página 35) a partir del punto 1.

EXTRACCIÓN DE ADN A PEQUEÑA ESCALA

MUY IMPORTANTE: Antes de comenzar con la extracción, comprobar que se dispone de todo el material necesario en cantidad suficiente y que los aparatos que se van a utilizar funcionan correctamente (ver Tabla 3). Así mismo, tener preparados tantos tubos de 1,5 ml como muestras vayamos a procesar, y marcarlos y ordenarlos correctamente. Este protocolo se ha redactado considerando que extraemos el ADN de 24 muestras.

Tabla 3. Material mínimo necesario para la extracción de ADN de 24 muestras a pequeña escala.

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	
•Balanza	Pesado de hojas y productos	
•Dispensador de volumen de 2,5 l	Obtención rápida del volumen de CTAB	
•Botella de vidrio para el dispensador 2,5l	Almacenar el CTAB para ser dispensado	
•Campana extractora	Manipulaciones con Mercaptoetanol y SEVAG	
•Baño termostático	Calentamiento de reactivos y extracción	
•Pipeta de 100-1000µl	Manipulación de disoluciones	
•Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	
•Vórtex	Agitación	
•Microcentrífuga para 24 tubos de 1,5 ml	Separación de fases durante la extracción	
•Congelador -20°C	Almacenamiento Etanol 70% e Isopropanol	
•Botella de vidrio 0,5l autoclavada	Almacenamiento del SEVAG	
•Botella de vidrio 0,5l autoclavada	Almacenamiento de la disolución de TE stock	
•Frigorífico	Almacenamiento TE	
•Etiquetadora	Marcaje de tubos y alícuotas	
Reactivos (en orden de uso)		
•CTAB 2x	Choque hipertónico	TA
•Mercaptoetanol	Se añade al CTAB 2X	TA
•SEVAG	Eliminación de impurezas del ADN	Campana extractora
•Isopropanol (2-propanol)	Precipitación del ADN	Congelador (-20° C)
•Etanol 70%	Limpieza del ADN	Congelador (-20° C)
•Tubos con TE autoclavado	Almacenamiento de TE para resuspensión del ADN	Frigorífico
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
•Resmas	Protección de la poyata	
•Papel higiénico	Secado rápido y/o limpieza de elementos	TA
•24 tubos de 1,5ml de <u>tapa plana</u> , autoclavados	2 por muestra convenientemente marcados	TA (en vaso tapado)
•Gradilla para tubos de 1,5 ml	Ordenación de tubos	
•Termómetro	Comprobación de la temperatura del baño termostático	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	
•28 puntas de 100-1000µl autoclavadas	Manipulación de disoluciones	TA
•3 puntas de 10-100µl autoclavadas	Manipulación de disoluciones	TA
•Temporizador	Control de tiempos	
•Tubos de 1,5ml de <u>tapa de rosca</u> autoclavados	Alícuotas para el Banco de ADN	TA (en vaso tapado)
•Caja de cartón para 100 tubos de 1,5ml	Almacenamiento ordenado de alícuotas	TA

PROCEDIMIENTO CTAB 2X DE EXTRACCIÓN DE ADN A PEQUEÑA ESCALA

NOTA: Tener en cuenta que, si hemos utilizado los métodos de machacado A o C, este protocolo debe empezar en el punto 4.

1. Conectar el baño termostático para que alcance una temperatura de 65°C. Cubrir la resistencia con agua destilada. De lo contrario, el agua no se calentará y la resistencia puede sufrir daños (Fig.12). El tiempo aproximado que tarda el baño en calentar el agua a 65°C es de 15 minutos.



Nivel de la resistencia que debe ser cubierto con agua destilada antes de encender el baño termostático

Figura 12. Indicación del nivel mínimo de agua destilada que debe contener el baño termostático para su correcto funcionamiento.

2. Introducir en el baño termostático un tubo de 50ml que contenga 12.5ml de CTAB y 50µl de mercaptoetanol (volumen indicado para 25 muestras para corregir el error de pipeteo, correspondiéndose con (500µl de CTAB y 2µl de mercaptoetanol por muestra). Dejarlo en el baño durante el tiempo que tardemos en machacar las muestras. Los 12.5ml de CTAB se añaden al tubo de forma más rápida utilizando un dispensador (Fig.13).

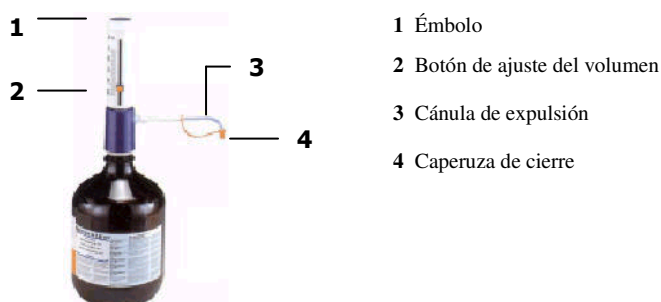


Figura 13. Dispensador de volumen para CTAB. Seleccionar el volumen con el botón de ajuste, retirar la caperuza de cierre y subir el émbolo lentamente para obtener el volumen fijado. Colocar un tubo debajo de la cánula de expulsión y bajar lentamente el émbolo.

3. Pipetear 500 µl de CTAB 2X a 65° C en los tubos de 1,5 ml que contiene la muestra (en la campana extractora).

4. Mezclar con el vórtex hasta homogenización total.

NOTA Toda la muestra ha de entrar en contacto con la solución añadida (si queda alguna parte del material seco se puede intentar mezclar utilizando como ayuda puntas de micropipetas autoclavadas, una por muestra).

5. Incubar en el bloque térmico a 65°C durante 15 minutos, con agitación suave a intervalos. Al finalizar el tiempo de calentamiento, apagar el bloque térmico (en la foto inferior).



6. Añadir 500µl de SEVAG y mezclar bien por inversión varias veces durante aproximadamente 15 minutos, pues la mezcla tiende a separarse. Abrir y cerrar los tubos una o dos veces durante este tiempo para dejar escapar el gas procedente del SEVAG (en la campana extractora).

7. Centrifugar a 9.000 rpm durante 10 minutos. Después de este tiempo, la separación de fases en el tubo de 1,5 ml ha de ser parecida a la figura 15.

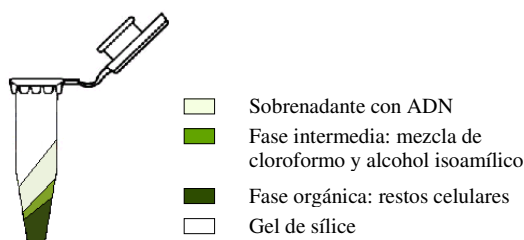


Figura 15. Muestra de la separación de las fases durante la extracción de ADN.

8. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio previamente etiquetado utilizando una pipeta de 100-1.000µl (se obtienen aproximadamente 500µl de sobrenadante). Desechar el tubo con el pellet en el recipiente de seguridad correspondiente.

NOTA SI HEMOS USADO EL MIXER MILL PARA MACHACAR LAS MUESTRAS, recuperar las bolas metálicas (que habrán quedado en el fondo de los tubos) después de haber transferido todos los sobrenadantes. Hay que lavar estas bolas (agua con jabón, y luego alcohol) y luego esterilizarlas y dejarlas preparadas para posteriores extracciones.

9. Precipitar el ADN añadiendo a cada tubo 500µl de isopropanol (2-propanol) guardado a -20°C (esta cantidad corresponde aproximadamente al volumen de sobrenadante recolectado en el paso 7). Invertir cuidadosamente el tubo hasta que el ADN precipite.

NOTA: Si la concentración de ADN es alta se podrá ver al mezclar por inversión la presencia de filamentos blanquecinos correspondientes al ADN.

10. Dejar las muestras a -20°C durante 30 – 60 minutos.

NOTA: Para aumentar la precipitación del ADN se pueden dejar las muestras durante la noche a -20°C . Si hemos de interrumpir la extracción por cualquier causa, podemos hacerlo en este punto, dejando las muestras a -20°C hasta reanudar la extracción.

11. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.

12. Desechar el líquido en el recipiente de seguridad correspondiente, con muchísimo cuidado de no arrastrar el pellet de color blanquecino que se adhiere al fondo del tubo y que contiene el ADN.

13. Añadir 500µl de etanol al 70% almacenado a -20°C para lavar el ADN.

14. Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 minutos.

15. Desechar el líquido con cuidado de no arrastrar el pellet.

16. Secar el etanol remanente en las paredes del tubo con papel, sin tocar el ADN extraído.

17. Dejar los tubos destapados en la estufa a $37-40^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora aprox. para permitir la evaporación total del etanol.

18. Añadir 100µl de TE y tapar el tubo. Dejar en la estufa hasta que el ADN se resuspenda totalmente, agitando suavemente de vez en cuando para facilitar la resuspensión que, en algunos casos, puede llevar varios días.

19. Almacenar los 100µl en un tubo de rosca autoclavado, etiquetarlo convenientemente y almacenar a -20°C o -80°C , según destino del ADN.

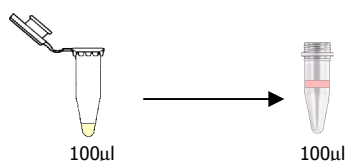


Figura 16. Representación gráfica de la forma de alícuotar el ADN extraído para almacenarlo en el Banco de ADN.

EXTRACCIÓN DE ADN A GRAN ESCALA

MUY IMPORTANTE: Antes de comenzar con la extracción, comprobar que se dispone de todo el material necesario en cantidad suficiente y que los aparatos que se van a utilizar funcionan correctamente (ver Tabla 4). Asimismo, tener los dos tubos de 50 ml por muestra correctamente marcados y ordenados. Es mejor marcar estos tubos con cinta blanca y rotulador, ya que así no quedan restos de tinta en el tubo y pueden reciclarse fácilmente.

Tabla 4. Material mínimo necesario para la extracción de ADN gran escala (6 muestras).

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	
•Balanza	Pesado de hojas y productos	
•Dispensador de volumen	Obtención rápida del volumen de CTAB	
•Botella de vidrio para el dispensador 2.5l	Almacenar el CTAB para ser dispensado	
•Campana extractora	Manipulaciones con Mercaptoetanol y SEVAG	
•Baño termostático	Calentamiento de reactivos y extracción	
•Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	
•Pipeta de 100-1000µl	Manipulación de disoluciones	
•Pipeta de 1000-5000µl	Manipulación de disoluciones	
•Homogeneizador Retsch	Machacado automático	
•Vórtex	Agitación	
•Centrífuga para 6 tubos de 50ml	Separación de fases durante la extracción	
•Congelador -20°C	Almacenamiento Etanol 70% e Isopropanol	
•Botella de vidrio 0,5l autoclavada	Almacenamiento del SEVAG	
•Botella de vidrio 0,5l autoclavada	Almacenamiento de la disolución de TE stock	
•Frigorífico	Almacenamiento TE	
•Etiquetadora	Marcaje de tubos y alícuotas	
Reactivos (en orden de uso)		
•CTAB 2x	Choque hipertónico	TA
•Mercaptoetanol		
•SEVAG	Eliminación de impurezas del ADN	Campana extractora
•Isopropanol (2-propanol)	Precipitación del ADN	Congelador (-20°C)
•Etanol 70%	Limpieza del ADN	Congelador (-20°C)
•Tubos con TE autoclavado	Almacenamiento de TE para resuspensión del ADN	Frigorífico
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
•Resmas	Protección de la poyata	
•N ₂ líquido	Machacado manual de hojas	Deware
•Gel de sílice blanco fino	Machacado manual de hojas	TA
•Morteros de porcelana	Autoclavar. Utilizar un mortero por muestra. Reutilizar los morteros después de su uso limpiándolos con jabón y luego con alcohol.	TA
•Espátula	Paso del material homogenizado desde el mortero al tubo de 50 ml. Lavarla con agua y alcohol después de cada uso	TA
•Papel higiénico	Secado rápido y limpieza de elementos	TA
•12 tubos de 50ml, autoclavados	2 tubos por muestra, convenientemente marcados	TA (en vaso tapado)
•Gradilla para tubos de 50ml	Ordenación de tubos	
•Termómetro	Comprobación de la temperatura del baño termostático	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	
•7 puntas de 10-100µl autoclavadas	Manipulación de disoluciones	TA
•6 puntas de 100-1000µl autoclavadas	Manipulación de disoluciones	TA
•10 puntas de 1000-5000µl autoclavadas	Manipulación de disoluciones	TA
•Temporizador	Control de tiempo	
•Tubos 1,5ml de tapón de rosca autoclavados	Alícuotas para el Banco de ADN	TA (en vaso tapado)
•Caja de cartón para 100 tubos de 1,5ml	Almacenamiento ordenado de alícuotas	TA

PROCEDIMIENTO CTAB 2X DE EXTRACCIÓN DE ADN A GRAN ESCALA

NOTA: Tener en cuenta que, si hemos utilizado los métodos de machacado A o C, este protocolo debe empezar en el punto 4.

1. Conectar el baño termostático para que alcance una temperatura de 65°C. Cubrir la resistencia con agua destilada. De lo contrario, el agua no se calentará y la resistencia puede sufrir daños (Fig.12). El tiempo aproximado que tarda el baño en calentar el agua a 65°C es de 15 minutos.



Nivel de la resistencia que debe ser cubierto con agua destilada antes de encender el baño termostático

Figura 12. Indicación del nivel mínimo de agua destilada que debe contener el baño termostático para su correcto funcionamiento.

2. Introducir en el baño termostático 6 tubos de 50ml, que contengan cada uno 10ml de CTAB y 40µl de mercaptoetanol. Dejar durante aproximadamente 10 minutos para que los reactivos alcancen la temperatura de 65°C. Los 10ml de CTAB se añaden al tubo de forma más rápida utilizando un dispensador (Fig. 13).

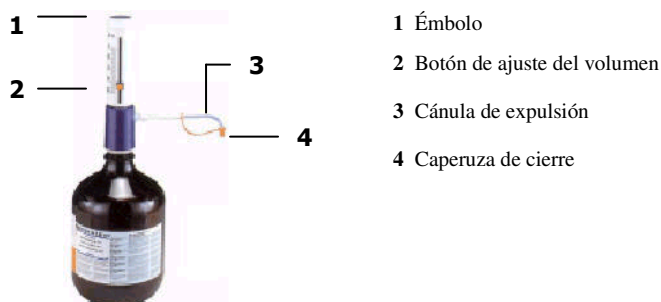


Figura 13. Dispensador de volumen para CTAB. Seleccionar el volumen con el botón de ajuste, retirar la caperuza de cierre y subir el émbolo lentamente para obtener el volumen fijado. Colocar un tubo debajo de la cánula de expulsión y bajar lentamente el émbolo.

3. Mezclar con el vórtex hasta homogenización total.

NOTA Toda la muestra ha de entrar en contacto con la solución añadida (si queda alguna parte del material seco se puede intentar mezclar utilizando como ayuda puntas de micropipetas autoclavadas, una por muestra).

4. Incubar en el baño termostático a 65°C durante 15 minutos, con agitación suave a intervalos. Al finalizar el tiempo de calentamiento, apagar el baño termostático.

5. Añadir 10ml de SEVAG y mezclar bien por inversión varias veces durante aproximadamente 15 minutos pues la mezcla tiende a separarse. Abrir y cerrar los tubos una o dos veces durante este tiempo para dejar escapar el gas procedente del SEVAG.

6. Centrifugar a 7.500 rpm durante 15 minutos.

7. Pasar el sobrenadante (ver Figura 20) a un tubo limpio previamente etiquetado utilizando una pipeta de 1.000-5.000µl (se obtienen aproximadamente 5.000µl de sobrenadante). Desechar el tubo con el pellet en el recipiente de seguridad correspondiente.

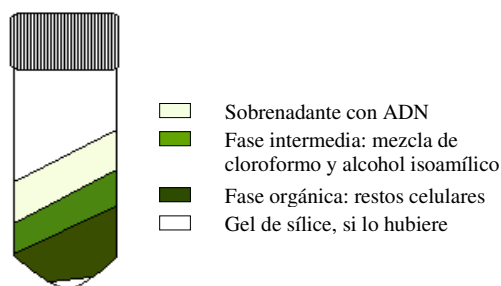


Figura 20. Muestra de la separación de las fases durante la extracción de ADN.

8. Precipitar el ADN añadiendo a cada tubo 5ml de isopropanol (2-propanol) guardado a -20°C . Invertir cuidadosamente el tubo varias veces para ayudar a que el ADN precipite.

NOTA Si la concentración de ADN es alta se podrá ver al mezclar por inversión la presencia de filamentos blanquecinos correspondientes al ADN.

9. Dejar las muestras a -20°C durante 30 – 60 minutos.

NOTA Para aumentar la precipitación del ADN se pueden dejar las muestras durante la noche a -20°C . Si hemos de interrumpir la extracción por cualquier causa, podemos hacerlo en este punto, dejando las muestras a -20°C hasta reanudar la extracción.

10. Centrifugar a 4.000 rpm durante 5 minutos.

11. Desechar el líquido en el recipiente de seguridad correspondiente, con muchísimo cuidado de no arrastrar el pellet de color blanquecino que se adhiere al fondo del tubo y que contiene el ADN.

12. Añadir 5ml de etanol al 70% almacenado a -20°C para lavar el ADN.

13. Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos.

14. Desechar el líquido con cuidado de no arrastrar el pellet.

15. Secar el etanol remanente en las paredes del tubo con papel, sin tocar el ADN extraído.

16. Dejar los tubos destapados en la estufa a $37-40^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora aprox. para permitir la evaporación total del etanol.

17. Añadir 3ml de TE y tapar el tubo. Dejar en la estufa hasta que el ADN se resuspenda totalmente, agitando suavemente de vez en cuando para facilitar la resuspensión. En algunos casos la resuspensión puede llevar varios días.

18. Almacenar los 3ml en tubos de rosca autoclavados, etiquetarlos convenientemente y almacenar a -20°C o -80°C , según destino del ADN. Realizar alícuotas (en tubos de 1.5ml de tapa de rosca: 1 alícuota de 100 μl , 5 alícuotas de 100 μl cada una; y el resto en tubos de 1.5ml, donde almacenaremos un volumen máximo de 1ml), etiquetarlas convenientemente y almacenar a -20°C o -80°C , según destino del ADN.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN EXTRAÍDO

Una vez extraído el ADN se requiere conocer su concentración y pureza, porque muchos de los protocolos de amplificación empleados en las técnicas moleculares requieren esta información.

Mediciones con el biofotómetro.

La evaluación cuantitativa del ADN la realizamos mediante un espectrofotómetro (Figura 15), que hace incidir un haz de luz monocromática a través de una muestra y mide la cantidad de luz que ésta absorbe.

Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260nm (debido a la presencia de bases nitrogenadas aromáticas a lo largo de las cadenas de ADN) y dado que se conoce que 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50µg/ml en el caso del ADN bicatenario, el aparato puede calcular de forma fiable la concentración del ADN midiendo la absorbancia a 260nm.



Figura 22. Biofotómetro de Eppendorf utilizado en el Banco de ADN del JBCVCSIC

Tabla 6. Material mínimo necesario para la cuantificación del ADN.

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	
•Pipeta de 0.5-10µl	Manipulación de disoluciones	
•Biofotómetro Eppendorf	Medir la concentración de ADNds	
Reactivos (en orden de uso)		
• TE autoclavado	Diluir el ADN para medir su concentración y enjuague final de la uvette	Frigorífico
•H ₂ Odd	Limpieza de la uvette	
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
•Resmas	Protección de la poyata	
•Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
•Tubo de 1.5ml autoclavado	1 tubo por muestra para realizar la dilución del ADN. Marcar el tubo con el número de la muestra.	TA (en un vaso de precipitados tapado)
•Gradilla para tubos de 1.5ml	Ordenación de tubos	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	
•Cubeta Uvette	Cubeta para medir la concentración (lavar con H ₂ Odd entre cada muestra y realizar un lavado final con TE)	TA
•Puntas de 0.5-10µl autoclavadas	Medición del ADN a(1 punta por muestra)	
•Puntas de 10-100µl autoclavadas	Manipulación de disoluciones	TA

NOTA IMPORTANTE: La medición de la concentración del ADN debe realizarse en la misma cubeta donde se mide el blanco para evitar errores; por ello la cubeta se puede lavar al cambiar de muestra (lavar con agua destilada y un último enjuague con TE). Utilizar como diluyente y blanco TE ya que la utilización de H₂Odd puede provocar variación en las mediciones.

PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN EXTRAÍDO CON EL BIOFOTÓMETRO EPPENDORFF

MUY IMPORTANTE: Antes de comenzar con la cuantificación, comprobar que se dispone de todo el material necesario en cantidad suficiente y que los aparatos que se van a utilizar funcionan correctamente (ver Tabla 6).

1. Homogeneizar correctamente la muestra de ADN extraído.
2. Preparar diluciones: 60µl de TE más 5µl de ADN. Mezclar.
3. Conectar el biofotómetro (Fig. 22) y seleccionar el método de cuantificación “dsADN” (del inglés “double stranded ADN”).
4. Anotar la dilución realizada y colocar 65 µl de TE en la cubeta de medición (Fig. 23). La cubeta debe colocarse con la parte inferior cerrada de cara al operario.
Pulsar la tecla blank para que el aparato procese el TE como blanco (para que la lectura obtenida sea la verdadera absorbancia de la muestra, es necesario corregir las lecturas con un blanco que no contenga ADN). En la pantalla debe aparecer 0.000.

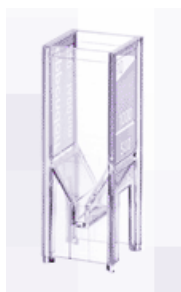


Figura 23. Cubeta Uvette para la cuantificación del ADN

5. Desechar el TE e introducir la dilución con ADN (ver punto 2) en la cubeta de medición, evitando la presencia de aire. Los resultados aparecen en la pantalla del aparato al pulsar “sample”.

EVALUACIÓN CUALITATIVA DEL ADN EXTRAÍDO

Para comprobar la calidad del ADN extraído se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. A continuación se detalla el material y los pasos necesarios para elaborar un gel de agarosa, para cargar las muestras de ADN en el mismo y para su tinción en Bromuro de Etidio.

Tabla 7. Material mínimo necesario evaluación cualitativa ADN.

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	ALMACENAMIENTO
Aparataje (en orden de uso)		
•Cubeta de electroforesis	Realización de la electroforesis en gel horizontal	
•Balanza	Pesaje de la agarosa	
•Microondas	Disolver el gel de agarosa	
•Agitador magnético	Mantener en movimiento el gel de agarosa mientras alcanza una temperatura de 55-57°C	
•Fuente de alimentación	Poner en marcha la electroforesis	
•Pipeta 0.5-10µl	Cargar el gel	
Reactivos (en orden de uso)		
•TBE 1x	Disolver la agarosa y mantener inmerso el gel durante la electroforesis	TA
•H ₂ Odd	Diluir el TBE10x	TA
•Agarosa	Preparar el gel	TA
•Jugo azul	Precipita el ADN en el gel y permite observar las bandas mediante su coloración	Frigorífico
•Bromuro de etidio	Tinción del gel	
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	
•Guantes de nitrilo	Protección personal	
•Resmas	Protección de la poyata	
•Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
•Cinta blanca de laboratorio	Sellado del soporte del gel	
•Nivel	Comprobar que el soporte del gel esté nivelado	
•Probeta	Medir el volumen de TBE	
•Matraz aforado	Disolver el gel de agarosa	
•Guantes ignífugos o manoplas	Evitar quemaduras al sacar el matraz del microondas	
•Vaso de precipitado	Atemperar el gel añadiendo agua en el vaso (lo suficientemente grande como para que quepa el matraz que utilizemos)	
•Termómetro	Medir la temperatura del gel	
•Imán	Movimiento del gel mediante el agitador magnético	
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	
•Puntas de 0.5-10µl autoclavadas	Medición del ADN (1 punta por muestra)	
•Fiambrera de plástico	Tinción con bromuro de etidio	

PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN CUANTITATIVA DEL ADN EXTRAÍDO EN GEL DE AGAROSA

MUY IMPORTANTE: Antes de empezar, comprobar que se dispone de todo el material que se lista en la Tabla 7.

NOTA: Si ya hay Agarosa de la concentración adecuada en un Erlenmeyer tapado y etiquetado con una fecha de elaboración no muy antigua, el procedimiento empieza a partir del punto 6.

1. Secar el soporte del gel, eliminar posibles restos de polvo e impurezas y precintar los extremos abiertos con cinta adhesiva de laboratorio (Fig.24). Comprobar que la cinta esté bien pegada a la bandeja.

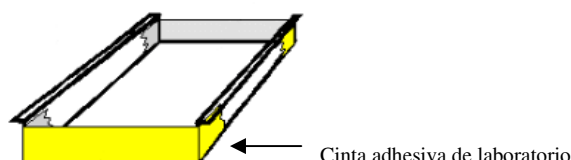


Figura 24. Bandeja precintada con cinta de laboratorio por los extremos.

2. Poner el peine en su lugar correspondiente y colocar la bandeja en una zona plana ayudándonos con un nivel (Fig.25). Comprobar que el peine este perfectamente limpio y que no contiene ningún resto de agarosa seca de geles elaborados anteriormente.

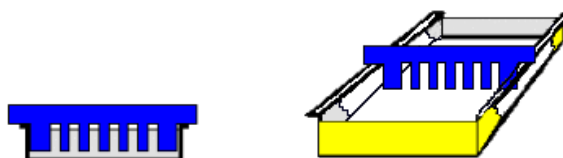


Figura 25. Colocación del peine en la bandeja.

3. Diluir el tampón TBE 10X con H₂Odd hasta alcanzar una concentración 1X. El volumen de TBE 1X necesario depende de la cubeta que se utilice (Tabla 8).

Tabla 8. Volúmenes de tampón TBE y de gel necesarios en función del tamaño de las cubetas de electroforesis.

CUBETA DE ELECTROFORESIS	VOLUMEN TAMPÓN TBE	VOLUMEN GEL
Cubeta Ecogen 10 pocillos	250ml	30ml
Cubeta Ecogen 40 pocillos	1.500ml	125ml
Cubeta Fisher 40 pocillos	2.000ml	150ml
Cubeta ecogen 108 pocillos	2.000ml	500ml

4. Añadir el tampón en el Erlenmeyer junto con un imán.

5. Pesar la agarosa necesaria (para un gel al 0,8% se pesan 0,8g por cada 100ml de TBE 1X) e introducirla en el Erlenmeyer.

6. Llenar un vaso de precipitado con un poco de agua corriente fría para acelerar el enfriamiento del gel de agarosa después de su calentamiento. Hay que ajustar el nivel del agua con el Erlenmeyer que contiene la disolución de TBE 1X y agarosa, de forma que el agua llegue justo al nivel máximo de la disolución y el Erlenmeyer no flote. Poner el vaso sobre un agitador magnético y colocar al lado el termómetro.

7. Disolver la agarosa en el microondas. Calentar hasta que se disuelva totalmente, evitando que la mezcla ascienda por el matraz y se vierta al exterior durante el calentamiento. Es conveniente agitar la disolución de vez en cuando. Una vez disuelta totalmente (se debe ver totalmente transparente, sin grumos traslúcidos en su interior) apagar el microondas y sacar el erlenmeyer.

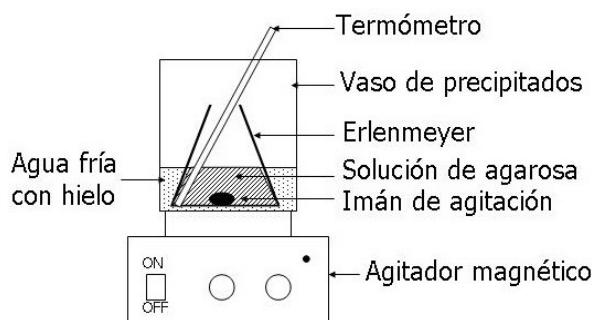


Figura 26. Esquematzación del enfriamiento de geles de agarosa previo al vertido en el soporte del gel. Debe observarse que el nivel del agua con hielo sea igual al de la disolución de agarosa, para lo cual es conveniente realizar el ajuste antes de calentar la disolución de agarosa (ver paso 6). Es imprescindible que el agitador magnético esté conectado a una velocidad baja para garantizar un enfriamiento uniforme de la disolución de agarosa sin generación de burbujas de aire.

8. Introducir el Erlenmeyer en el vaso de precipitados con el agua. Poner en marcha el agitador magnético seleccionando una velocidad de agitación lenta (para evitar la formación de burbujas de aire) e introducir el termómetro en el interior del Erlenmeyer, según describe la Figura 26.

9. Una vez que la disolución de agarosa alcanza una temperatura de 55° C, retirar el termómetro y verter la agarosa en el soporte del gel. Limpiar el termómetro con papel secante. Si observamos burbujas en el gel, eliminarlas con una punta de pipeta autoclavada (se deben retirar lo más rápido posible, ya que al enfriarse se solidifica el gel).

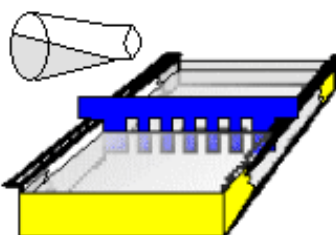


Figura 27. Vertido del gel de agarosa sobre la bandeja.

10. Dejar enfriar el gel hasta que se endurezca (aproximadamente 20-30 minutos dependiendo del tamaño; comprobar la dureza con el dedo antes de proceder al paso 11)

11. Retirar la cinta adhesiva de laboratorio y el peine con mucho cuidado. Introducir el soporte y el gel en la cubeta de electroforesis, asegurándose de que el tampón cubre el gel.

PROCEDIMIENTO PARA LA CARGA DE MUESTRAS EN EL GEL DE AGAROSA

1. Partir un trozo de Parafilm y colocar 3µl de jugo azul por muestra sobre él. En caso de haber muchas muestras, repartir las gotas de forma que no sea posible que se fusionen al ejecutar el paso 2.
2. Pipetear 5µl del ADN extraído y ponerlo sobre la correspondiente gota de jugo azul.
3. Mezclar varias veces hasta observar un color homogéneo. El pipeteo del ADN debe ser lo más cuidadoso posible para evitar su rotura o degradación.
4. Cargar los 8µl en el pocillo. Al cargar la mezcla no introducir demasiado la punta de la pipeta para evitar la rotura de los pocillos. Intentar depositar las muestras en los pocillos lo más rápido posible.
5. Al finalizar la carga de muestras, colocar el soporte del gel en el centro de la cubeta para que toda la superficie de agarosa reciba la misma corriente. Los pocillos de las muestras deben estar más cercanos al polo negativo, ya que el ADN está cargado negativamente y migra hacia el polo positivo.
6. Verificar que el tampón de electrodo (TBE 1X) cubre el gel.
7. Cerrar la tapa de la cubeta y colocar los electrodos.
8. Conectar la fuente de alimentación de forma que la intensidad de corriente no supere los 90mA.
9. Dejar migrar las muestras el tiempo que corresponda al tamaño y concentración del gel.
10. Una vez finalizado el tiempo de migración apagar la fuente de alimentación y retirar los electrodos para sacar el gel de agarosa.

PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DE GELES DE AGAROSA CON BROMURO DE ETIDIO

MUY IMPORTANTE: Hay ocasiones en que las personas que se encuentran en los laboratorios no tienen conciencia de muchas de las sustancias que se utilizan en ellos, es el caso, por ejemplo del personal de limpieza. Siendo esto así, el único procedimiento responsable es tratar el Bromuro de Etidio o cualquier otra sustancia potencialmente peligrosa con las máximas precauciones y minimizar la contaminación local. Por este motivo, forzamos el lavado del gel con agua destilada después de la tinción, ya que de esta forma evitamos el riesgo de respirar partículas de sales de Bromuro de Etidio que quedarían en el trans-iluminador y que podrían ser movilizadas e inhaladas por el personal de limpieza o por el personal de laboratorio. Aunque recientes investigaciones muestran que el riesgo del Bromuro de Etidio puede no ser tan grave como se dice, estas partículas sí serían especialmente peligrosas.

1. Colocar el gel dentro de la bandeja de tinción que contiene la *disolución de uso* de bromuro de etidio y cerrar la tapa.

2. Poner la bandeja sobre un agitador orbital y dejar tiñéndose durante 20-30 minutos.

El papel y los guantes utilizados en la zona de tinción deben ser desechados en el contenedor de residuos de dicha zona.

3. Cambiar el gel a una bandeja que debe contener agua destilada y dejar durante 10-15 minutos.

4. Transcurrido el tiempo de lavado, colocar el gel sobre el iluminador de luz ultravioleta. Antes de encender la luz ponerse las gafas protectoras e intentar estar expuesto el menor tiempo posible a la luz ultravioleta.

NOTA: Si nos aseguramos de que la ventana de luz ultravioleta está totalmente cubierta por la campana de la cámara, entonces no hacen falta las gafas protectoras, ya que el gel puede visualizarse a través del visor digital de la cámara.

5. Seleccionar el contraste deseado en el visor de la cámara digital pulsando el símbolo “+”. Normalmente una pulsación (correspondiente a un contraste de 800) o dos (correspondiente a un contraste de 1600) son suficientes.

6. Introducir un disquette en la ranura y fotografiar el gel (pulsando dos veces seguidas el botón “freeze”).

NOTA: Dejar el gel en la fuente de luz UV hasta comprobar en el ordenador que la foto es buena.

7. Sacar el disquette, comprobar en un ordenador que la foto ha salido bien, y guardarla en el archivo correspondiente con un nombre adecuado.

8. Desechar el gel en el contenedor de residuos de la zona de tinción solamente después de comprobar que la foto ha salido bien y se ha descargado satisfactoriamente en el ordenador.

PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DE GELES DE AGAROSA CON SYBRSAFE

1. Colocar el gel dentro de la bandeja de tinción que contiene la *disolución de uso* de bromuro de etidio y cerrar la tapa.
2. Poner la bandeja sobre un agitador orbital y dejar tiñéndose durante 20-30 minutos.
El papel y los guantes utilizados en la zona de tinción deben ser desechados en el contenedor de residuos de dicha zona.
3. Cambiar el gel a una bandeja que debe contener agua destilada y dejar durante 10-15 minutos.
4. Transcurrido el tiempo de lavado, colocar el gel sobre el iluminador de luz ultravioleta. Antes de encender la luz ponerse las gafas protectoras e intentar estar expuesto el menor tiempo posible a la luz ultravioleta.

NOTA: Si nos aseguramos de que la ventana de luz ultravioleta está totalmente cubierta por la campana de la cámara, entonces no hacen falta las gafas protectoras, ya que el gel puede visualizarse a través del visor digital de la cámara.

5. Seleccionar el contraste deseado en el visor de la cámara digital pulsando el símbolo “+”. Normalmente una pulsación (correspondiente a un contraste de 800) o dos (correspondiente a un contraste de 1600) son suficientes.
6. Introducir un disquette en la ranura y fotografiar el gel (pulsando dos veces seguidas el botón “freeze”).

NOTA: Dejar el gel en la fuente de luz UV hasta comprobar en el ordenador que la foto es buena.

7. Sacar el disquette, comprobar en un ordenador que la foto ha salido bien, y guardarla en el archivo correspondiente con un nombre adecuado.
8. Desechar el gel en el contenedor de residuos de la zona de tinción solamente después de comprobar que la foto ha salido bien y se ha descargado satisfactoriamente en el ordenador.

ORGANIZACIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL BANCO DE ADN

Una vez extraído y repartido en alícuotas, el ADN genómico es almacenado en ultracongeladores a -80°C o, en su defecto, en congeladores de -20°C . Existen hoy en día sistemas de almacenamiento en seco que de momento nosotros no utilizamos. Una alícuota por cada muestra de ADN quedará almacenada por seguridad como depósito permanente en el Banco. El resto del total del volumen de ADN extraído (aproximadamente 3mL por muestra) se repartirá en varias alícuotas que irán a formar parte del “stock” de distribución y fideicomiso.

i) Etiquetado y organización de los tubos.

Los tubos de rosca que contienen el ADN se identifican con una etiqueta en la que se incluyen los siguientes datos (ver figura 31):

- Nombre del taxón. (p.e *Salvia canariensis*)
- Código del vial asignado en el Banco de ADN. (p.e CODE: 1468))
- Logotipo del Banco de ADN y de Interreg.
- Código de barras con número equivalente al que le corresponde a la especie en la base de planta viva del JBCVCSIC (p.e 7370//0005)



Figura 31: Ejemplo de etiqueta con la que identificamos los tubos del Banco de ADN.

Para la elaboración de las etiquetas empleamos una etiquetadora automática (Brother P-touch 9600) que comercializa cintas en un material cuya adherencia resiste tanto altas como bajas temperaturas y que nos permite imprimirlas de forma automática a través de un ordenador.

NOTA: Las primeras etiquetas del Banco de ADN del JBCVCSIC se realizaron manualmente sobre cinta blanca de laboratorio y con rotuladores permanentes. Este procedimiento sigue usándose en caso de urgencia.

Estos tubos conteniendo las alícuotas de ADN se reparten de 100 en 100 (10 filas de 10 tubos) en cajas de cartón de la casa comercial Sarstedt (ver tabla para ref.) que se ordenarán y colocarán en los cajones y estantes del ultracongelador del Banco de ADN.

ii) Etiquetado y organización de las cajas.

Las cajas conteniendo los tubos con las alícuotas de ADN se han ordenado, a su vez, de 3 formas diferentes (cajas C, V y S) en función del volumen de ADN que contenga los tubos almacenados en las mismas.

Cada caja estará perfectamente etiquetada de forma que se facilite la localización de las muestras dentro del ultracongelador. El color de la etiqueta varía en función del tipo de alícuotas que se incluya en la caja (roja para cajas C con alícuotas de 100µL, verde para cajas V con alícuotas de 20µL y azul para cajas S con alícuotas de 1mL). Tanto los tubos dentro de las cajas (filas de 1- 10) como las cajas dentro de los cajones del ultracongelador son ordenadas de forma correlativa, es decir, la primera caja (C1) contendrá los tubos con los códigos (Vial Code) del 1 al 100 (ambos inclusive).

En cada etiqueta aparece el logo identificativo del Banco de ADN, el tipo de alícuotas almacenado en la caja y el número de caja correspondiente (p.e. C12). Se ha realizado un registro en Excel al que llamamos “Alícuotas del Banco de ADN” en el que se indica el número de caja y el número de alícuotas de cada tipo que hay almacenado por muestra en el ultracongelador del Banco de ADN. De esta forma, para conocer en qué caja está cada muestra se debe buscar en el archivo de “Alícuotas del Banco de ADN” donde está registrado el número de caja en el que se encuentran las alícuotas del volumen concreto para la muestra que se quiera localizar.

Por ejemplo, si quisiéramos localizar la especie *Sideritis soluta subsp. soluta* (identificada con el código 671) veríamos al mirar en el archivo que de dicha muestra se han almacenado 1 alícuota de 100 μ L en la caja C7, 5 alícuotas de 20 μ L en la caja V30 y 2 alícuotas de 1 ml en la caja S6.

Fig 32. Ejemplo de una de las muestras del archivo “Alícuotas del Banco de ADN”

VIAL	TAXON	ALÍCUOTAS	VOLUMEN	Nº CAJA
671	<i>Sideritis soluta subsp. soluta</i>	1	100 μ L	C7
		5	20 μ L	V30
		2	1ml	S6

- Las **cajas etiquetadas de color rojo** contienen las alícuotas de 100 μ L. Existe una alícuota por cada muestra extraída, tanto a gran escala como a pequeña escala, en el Banco de ADN, por lo que están organizadas de acuerdo con el Vial Code.

En el ejemplo se muestra la caja número 12 (C12) que incluye los tubos de rosca correspondientes a las muestras con los códigos desde 1101 hasta la 1200.

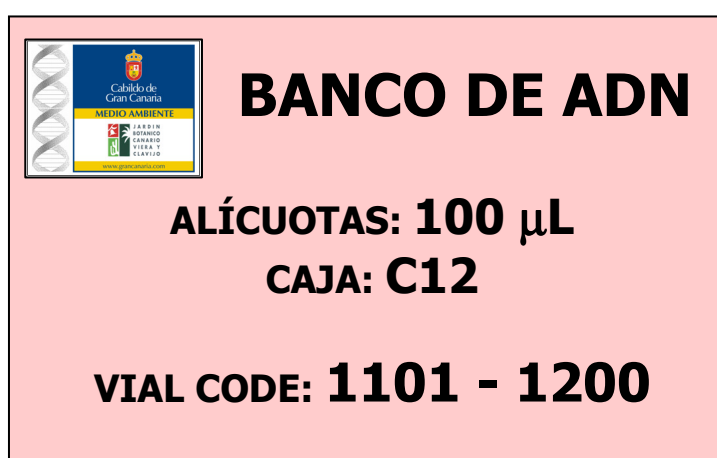


Fig 33. Ejemplo de etiqueta de color rojo para cajas con alícuotas de 100 μ L

- En las **cajas etiquetadas de color verde** se organizan las alícuotas de 20 μ L. Para aquellas muestras que se han podido extraer con el método CTAB a gran escala se realizarán 20 alícuotas por muestra y para las que se han extraído a pequeña escala 5 alícuotas.

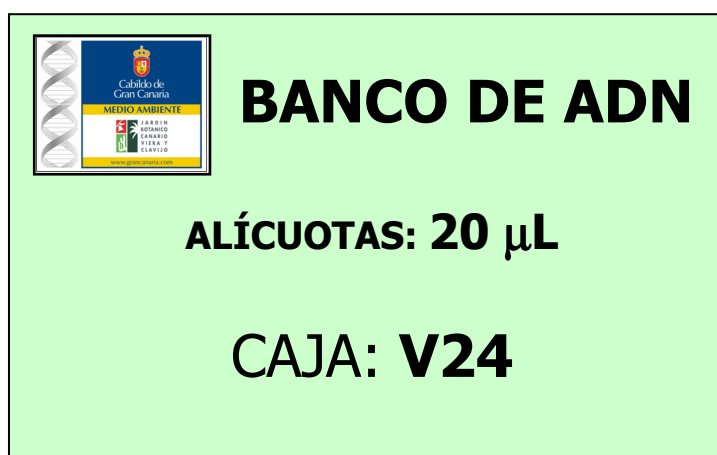


Fig 34. Ejemplo de etiqueta de color verde para cajas con alícuotas de 20 μ L

- En **las cajas etiquetadas de color azul** se organizan las alícuotas de 1mL. Sólo aquellas muestras que se han podido extraer con el método CTAB a gran escala estarán incluidas en esta caja. Se deben realizar 3 alícuotas por muestra.



Fig 35. Ejemplo de etiqueta de color azul para cajas con alícuotas de 1mL

En la actualidad existen otras alternativas para almacenar el ADN una vez extraído, de hecho la empresa WHATMAN HISPANICA, S.L. está comercializando unos kits para conservar muestras de tejido vegetal en seco en lo que ellos han llamado tarjetas FTA. Esto supone una gran ventaja sobre todo en cuanto a espacio necesario para su almacenamiento, ya que en un simple armario y a temperatura ambiente se podrían almacenar en las mencionadas tarjetas un volumen de muestras probablemente equivalente al que se puede almacenar en varios ultracongeladores. Además dejaría de existir el riesgo de perder muestras por problemas de descongelación en los casos en los que por fallos eléctricos los ultracongeladores dejan de funcionar como es debido.

NOTA: Desde el Banco de ADN del JBCVCSIC hemos hecho el pedido del kit FTA Starter Pack (WB 120061) que incluye todo lo necesario para poder hacer pruebas tanto de extracción del DNA por presión, del almacenaje de DNA en seco y de recuperación de dicho DNA por elución. Además Whatman tiene un servicio de personalización de tarjetas con lo cual se podría poner un código de barras a cada una de las tarjetas FTA y así tener las muestras perfectamente identificadas. Por todo esto, nos parece una alternativa interesante a probar y en función de los resultados a utilizar en nuestro Banco de ADN.

ENVIO DE MUESTRAS

Las muestras que sean solicitadas al Banco de ADN serán siempre tomadas desde el stock de distribución (alícuotas de 20µL) y se prepararán para su envío de forma que se encuentren en tubos perfectamente etiquetados y que se acompañen de toda la documentación necesaria (Anexos 3 y 4).

Dicho envío consistirá en un número razonable de alícuotas por muestra, con el único e importante condicionante de que vayan a ser empleadas exclusivamente en proyectos de investigación, para lo que el receptor deberá firmar un documento aceptando dichas condiciones (ver anexo 4).

Cuando el envío sea a centros internacionales se deberá incluir en el paquete de envío un certificado fitosanitario en el que se indica la ausencia de productos tóxicos en las muestras y por tanto su completa inocuidad (para evitar problemas de aduana).

Todos los envíos realizados desde el Jardín Canario van acompañados de un documento que deberá ser devuelto con la firma del receptor de las mismas, de forma que acepta el compromiso a hacer un uso responsable y sin ánimo de lucro de las muestras. El documento presentado está inspirado en el documento que el Banco de ADN de Kew envía junto con las muestras, siendo prácticamente idéntico al mismo (Anexo 4).

Junto con las muestras se debe adjuntar una hoja con la información relacionada a la recolección, cuantificación y purificación del ADN (Anexo 5):

- a) Población donde se recolectó.
- b) Fecha y nombre de los recolectores.
- c) Código del pliego testigo.
- f) Código del vial/es enviado/s.

Debido a que el volumen de muestras que se manejan desde un Banco de ADN es bastante considerable, es importante llevar un registro de cada una de las muestras enviadas, la fecha y el receptor del envío. Además se deben crear una base de datos con la información de todas las especies almacenadas en el Banco, su procedencia, datos acerca de su recolección, extracción, purificación y cuantificación de las mismas.

En el breve período de tiempo desde el que el Banco de ADN se ha puesto en marcha, se han solicitado muestras desde 4 instituciones diferentes (el Jardín Botánico de Kew, la Universidade dos Açores, la ULPGC y la Universidad de Zaragoza), enviándose un total de 56 alicuotas de 4 especies distintas.

PARTE III

Gestión de las muestras



DESTINO DE LAS MUESTRAS DEL BANCO.

La gestión de las muestras del Banco de ADN del JBCVCSIC está orientada principalmente a la investigación, ya que el material genético almacenado es una herramienta valiosísima para estudios filogenéticos y de genética a nivel poblacional.

Lógicamente, parte de las muestras se utilizan en proyectos financiados y desarrollados en el propio centro donde se encuentre el Banco de ADN, pero consideramos que el objetivo principal debe ser llevar a cabo proyectos financiados y desarrollados en colaboración con otras instituciones tanto nacionales como internacionales.

Ya en los primeros momentos de funcionamiento del Banco de ADN del JBCVCSIC le dimos prioridad a formar parte de la Iniciativa del Consorcio del Código de Barras de La Vida (<http://www.barcoding.si.edu>), que fue creada para estimular la creación de una base de datos con secuencias que sirva como una biblioteca universal para la comparación de especies. En sus inicios en 2004, este Consorcio estaba constituido por 46 instituciones de las que el Jardín Canario era la única representante española. Las regiones de ADN elegidas inicialmente como candidatas a códigos de barras de plantas (*psbA-trnH* e *ITS*, Fig. 36-37 y Tabla 26) han sido reemplazadas por *rbcl* y *matK* (PWG 2009), aunque la discusión sobre la utilidad de las primeras y otras continúa.

Es importante divulgar la información relativa a las muestras ya incluidas en el Banco de ADN, así como el listado con las especies que se consideran como prioritarias. Esto facilitará tanto la recolección de muestras como la solicitud de muestras por parte del mayor número de investigadores posible. El listado de especies prioritarias debe estar abierto a las propuestas que lleguen desde los distintos grupos colaboradores del Banco, de forma que se muestrearán más intensivamente las especies en las que ellos tengan más interés.

El Banco de ADN del JBCVCSIC contempla entre sus objetivos disponer de una página web con toda la información concerniente al Banco de ADN para llegar al mayor número posible de investigadores.

Actualmente el Banco de ADN del JBCVCSIC cuenta con más de 7000 muestras correspondientes a más de 50 familias distintas. El listado un poco más detallado de las muestras residentes en el Banco de ADN y los formularios para eventuales peticiones de material están a disposición de cualquier investigador interesado en <http://www.bioclimac.com/mbdna/>

EL CÓDIGO DE BARRAS DE LA VIDA. MOTIVACIÓN Y DESARROLLO.

i) Los caracteres morfológicos y la Taxonomía

La Taxonomía es la rama de la Biología que trata del descubrimiento, descripción, identificación y clasificación de las especies de organismos vivos. Puesto que todas las disciplinas de la Biología dependen de una identificación correcta y sin ambigüedades de las Unidades Biológicas a las que se refieren, la Taxonomía se hace indispensable para llevar a cabo cualquier investigación, estrategia de gestión o plan de conservación de la diversidad biológica. Debemos saber qué es lo que hemos de investigar o conservar antes de ponernos manos a la obra.

Desde los tiempos de Linneo hasta hace relativamente poco, la Taxonomía utilizaba solo caracteres morfológicos como referencia, pero este tipo de variables presenta diversos problemas para la caracterización sin ambigüedades de los organismos vivos. Entre los más frecuentes, podemos citar:

1. Las adaptaciones a diferentes ambientes inducen ambigüedades taxonómicas

En muchas ocasiones, organismos de la misma especie que viven en diferentes ambientes presentan características morfológicas también diferentes. Este hecho, debido a la facilidad de aclimatación de la vida, dificulta la identificación taxonómica y muy frecuentemente resulta en la definición de “especies” nuevas sin ninguna base biológica.

2. Muchos organismos cambian su morfología radicalmente a lo largo de su ciclo vital

Existen organismos que sufren metamorfosis y son muy diferentes en estado adulto y estado joven (pensemos en los cambios que sufre un gusano de seda hasta llegar a convertirse en mariposa). Las morfologías cambiantes dificultan en extremo la identificación de los organismos, hasta el punto de que diferentes estadios vitales de una misma especie han sido erróneamente asignados a especies diferentes en muchas ocasiones.

3. La variabilidad intra-específica hace a veces difícil la identificación taxonómica

Nunca todos los individuos de una especie son idénticos en todas sus características morfológicas, sino que frecuentemente presentan rangos de variación bastante amplios dependiendo de las características ecológicas de su área de distribución y de la variación connatural a la vida. Además, en muchas ocasiones, las características morfológicas son biométricas, con lo que dependen de la edad y el estado de salud del individuo. Si esta variabilidad intrínseca está distribuida de manera

sesgada en el espacio (es decir, si las características extremas se dan solamente en un o unas pocas poblaciones) el taxónomo puede asignar la categoría de “nueva especie” a una población que, en realidad, solamente debería ser considerada representante de uno de los rangos de variación extremos de la especie a la que pertenece.

4. El análisis matemático de las variables morfológicas es confuso

Las variables morfológicas están influidas por multitud de genes que, en la inmensa mayoría de casos, no se conocen. Además, en muchas ocasiones, un mismo carácter morfológico (por ejemplo, el color de la flor) puede estar determinado por genes diferentes en diferentes organismos, aunque sean con-específicos. Estos y otros inconvenientes limitan la validez del análisis estadístico con variables morfológicas a una aproximación fenotípica. Llevarlo más allá conllevaría el riesgo de sesgar nuestras conclusiones, porque nunca podríamos asegurar que estamos comparando diferentes individuos en base a información de las mismas regiones del genoma.

ii) Los caracteres moleculares y la Taxonomía

Los avances científico-técnicos de los últimos tiempos han permitido incorporar nuevas variables que, junto a las utilizadas por la aproximación clásica, pueden facilitar la identificación taxonómica sin ambigüedades. Recientemente, los caracteres moleculares han representado una gran ayuda para la Taxonomía, porque se mantienen invariables a lo largo de la vida de un organismo desde su nacimiento hasta incluso después de su muerte (siempre que el estado de conservación haya sido adecuado) y, por tanto, pueden permitir la identificación en cualquier estadio del desarrollo, o solamente a través de una las partes del organismo. Además, en el caso de variables genéticas asociadas a secuencias de ADN, sabemos con exactitud que analizamos las mismas regiones del genoma en todos los organismos considerados y podemos establecer las comparaciones nucleótido a nucleótido después de haber alineado las secuencias (en virtud de lo que se denomina “homología posicional”), con lo cual garantizamos la total validez científica de las comparaciones.

Estas ventajas de las secuencias del ADN respecto de las variables morfológicas apoyan la idea de que podría ser posible utilizar la información molecular para identificar a todas las especies de organismos vivos. La posibilidad de asignar un “código de barras de la vida” basado en secuencias de ADN fue postulada explícitamente por primera vez por el Dr. Paul Herbert, de la Universidad de Guelph (Canadá), en trabajos con invertebrados (P.D.N, Hebert et al, 2003).

En esencia, un código de barras de ADN consiste en el uso de una secuencia corta y estandarizada del genoma como herramienta molecular precisa y fiable para ayudar a caracterizar, distinguir o descubrir especies y para asignar individuos (o partes de individuos no identificadas) a sus especies correctas.

A diferencia de los códigos de barras usados para identificar productos y bienes materiales (que son arbitrarios al estar definidos por el usuario), el código de barras de la vida es parte de la constitución genética de los organismos o, de forma más precisa, de la secuencia de nucleótidos de ciertas regiones de su ADN que son informativas a este nivel. Esta diferencia implica que la implementación de un “código de barras de la vida” no es obvia y exige un riguroso trabajo de investigación, ya que primero se deben descubrir las regiones del ADN que sean más adecuadas para identificar a los organismos y luego verificar que su secuencia no coincide con la de ningún otro organismo vivo para esa misma región del genoma.

El Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CCBV de aquí en adelante) es la iniciativa internacional dedicada a desarrollar códigos de barras basados en secuencias de ADN (<http://barcoding.si.edu/>). El CCBV se creó en 2004 con el apoyo de la Fundación Alfred P. Sloan (aunque su secretariado reside en el Museo de Historia Natural de la Smithsonian Institution de Washington) y agrupa a:

- Jardines Botánicos, Museos de Historia Natural, Herbarios y Zoos.
- Organizaciones de investigación dedicadas a la biodiversidad, conservación, bioinformática, genética y actividades relacionadas.
- Agencias gubernamentales, ONGs y otras organizaciones que basan su actividad en la información taxonómica
- Compañías privadas

El laboratorio de biodiversidad molecular y Banco de ADN del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” fue el primer grupo de investigación español en formar parte del CCBV y es hasta hoy el único representante de nuestro país en el consorcio.

iii) Hacia un código de barras molecular de las plantas

En Febrero de 2005 una comisión de expertos en ADN vegetal (Anexo 3) se reunió en el Jardín Botánico de Kew para discutir los pros y contras de la aplicabilidad de la idea de un código de barras en vegetales y decidir qué regiones del genoma de las plantas eran las más idóneas para empezar a investigar. Según se debatió en esta reunión, los tres criterios generales que deben satisfacer las regiones que son potenciales candidatas a funcionar como código de barras de la vida son:

1. Presentar considerable variabilidad y divergencia entre especies

Puesto que la identificación que se pretende es a nivel específico, el rango de variabilidad de las secuencias escogidas ha de ser lo suficientemente elevado como para discriminar a este nivel de la jerarquía biológica. No obstante, es más que posible que las secuencias escogidas (especialmente las del ADN nuclear) presenten diferentes grados de variabilidad intra-específica en diferentes linajes, por lo cual habrá que secuenciar varios individuos por especie y establecer el rango de variabilidad que delimita el umbral entre individuos con-específicos e individuos de diferentes especies.

2. Tener una secuencia relativamente corta

En muchos casos, los especímenes secuenciados van a ser organismos muertos o partes de organismos conservados en colecciones de museo o pliegos de herbario. Estas muestras son valiosísimas, porque muchas de ellas contienen los tipos a partir de los que fueron definidas las especies. No obstante, por su antigüedad (pueden tener más de 100 años) y su estado de conservación (que puede haber sido malo en términos de temperatura, humedad o exposición a agentes químicos) pueden estar muy deterioradas. Si el ADN de estas muestras está degradado y utilizáramos regiones de secuencia larga, entonces se correría el riesgo de que estuvieran fragmentadas en cuyo caso se dispondría de información incompleta y por tanto inválida. Por el contrario, un tamaño grande del amplicón (la región amplificada) y un elevado número de copias en el genoma propugna un mayor éxito de las amplificaciones, presumiblemente porque se incrementa la probabilidad de que la secuencia deseada haya sido preservada (Deguilloux et al. 2002). La longitud idónea de las regiones a utilizar se estableció alrededor de los 700 bp.

3. Disponer de secuencias flanqueantes conservadas

Aunque pueden existir regiones de interés potencial para ciertos géneros o especies, la idea del código de barras se refiere a todos los organismos, y solamente si existen cebadores universales podremos estandarizar los datos y garantizar comparaciones adecuadas.

En base a un trabajo del grupo de investigación de John W. Kress (Kress et al. 2005), las regiones escogidas por el grupo del código de barras de las plantas en la reunión de Londres de Febrero de 2005 fueron la región *ITS* (ADN nuclear) y la región *trnH-psbA* (ADN cloroplástico). No obstante, a raíz de la generación y mata-análisis de datos más representativos, se han propuesto recientemente las regiones cloroplásticas *matK* y *rbcL* como códigos de barras universales para Angiospermas (Hollingsworth et al. 2009). Se están explorando actualmente nuevas regiones de potencial interés en el contexto, y parece que a estas regiones pueden añadirse otras. Estos cambios representan un motivo más por el que es necesario tener el ADN perfectamente organizado en un banco, ya que solamente de esta manera será posible generar (para las mismas muestras) nuevas secuencias correspondientes a otras regiones del genoma de mayor interés potencial. Las nuevas regiones propuestas como candidatas son, *accD*, *rpoB*, *rpoCl*, e *YCF5*.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Las reacciones de amplificación del ADN están basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Mullis, 1985), que permite la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN cuando son sometidas a ciclos de alta y baja temperatura. La *Thermus aquaticus* o Taq es la polimerasa más utilizada pues es termófila, es decir, capaz de resistir temperaturas superiores a 45°C, pero en la actualidad existen otras variantes como la “Phusion DNA polymerase” o la “Platinum Taq DNA polymerase” que parecen ser más eficientes y precisas pero que también son menos económicas.

La Taq polimerasa para iniciar la reacción necesita además de deoxinucleótidos (dNTPs) que va añadiendo a un ADN molde, de dos *cebadores* (o Primers), que son secuencias cortas de unos veinte nucleótidos, que actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada. Los ciclos de temperatura (desnaturalización-hibridación-extensión) se repetirán un número de veces variable dependiendo de la cantidad de fragmentos amplificados que deseemos y del tamaño de la región del ADN que queramos amplificar. Finalizada la PCR tendremos múltiples copias del fragmento de ADN elegido con las que podremos llevar a cabo distintas técnicas moleculares como la secuenciación.

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DEL ADN.

Tabla 21. Material mínimo necesario para la amplificación del ADN.

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	CONSERVACIÓN
Aparataje (en orden de uso)		
• Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	TA
• Pipeta de 100-1000µl	Manipulación de disoluciones	TA
• Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	TA
• Pipeta de 0.5-10µl	Manipulación de disoluciones	TA
• Vórtex	Agitación	TA
• Máquina de Hielo	Reacciones de PCR	TA
• Frigorífico	Almacenamiento TE, H ₂ O ₂ y muestras ADN.	TA
• Congelador -20°C	Almacenamiento alícuotas de amplificación ADN	TA
• Termociclador	Reacciones de PCR	TA
Reactivos (en orden de uso)		
¹ H ₂ O ₂	Alícuotas de amplificación ADN	Frigorífico
¹ Primer	Alícuotas de amplificación ADN	Congelador (-20°C)
^{1,2} BSA	Alícuotas de amplificación ADN	Congelador (-20°C)
^{1,3} Tampón 10X	Alícuotas de amplificación ADN	Congelador (-20°C)
^{1,3} MgCl ₂	Alícuotas de amplificación ADN	Congelador (-20°C)
^{1,3} dNTPs	Alícuotas de amplificación ADN	Congelador (-20°C)
^{1,3} Taq polimerasa	Alícuotas de amplificación ADN	Congelador (-20°C)
* “master mix”	Kit comercial	Frigorífico
^{1,4} Aceite mineral estéril	Alícuotas de amplificación ADN	Frigorífico
Utillaje general (en orden de uso)		
• Bata	Protección personal	TA
• Guantes de nitrilo	Protección personal	TA
• Resmas	Protección de la poyata	TA
• Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
• Papel de aluminio	Pesado de agarosa	TA
• Rotulador permanente	Rotulado de tubos y soluciones	TA
• Puntas ajustables a cada pipeta	Dispensado de soluciones	TA
• tubos de 0,2 ml de tapa plana autoclavados o placa de 96 pocillos	1 x muestra convenientemente marcados en el caso de los tubos y 1 para 96 muestras en el 2º caso.	TA
• Gradilla para tubos 0.2 mL	Colocación y ordenación de tubos	TA
• Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	TA
• Bandeja para hielo	Montaje PCR en frío	TA
• tubos de 1,5 ml de tapa plana autoclavados	Preparación cóctel reacción	TA
• Gradilla para tubos de 1,5 ml	Colocación tubos cóctel y alícuotas	TA

NOTAS IMPORTANTES:

¹ Cada investigador habrá de tener una caja personal en el congelador conteniendo las alícuotas de amplificación. Esto es importantísimo porque evita la contaminación de las disoluciones que son de uso común con ADN ajeno. No utilizar NUNCA alícuotas de otra persona. También es recomendable utilizar pipetas específicas para ADN (es decir, no las mismas que se utilicen para otras técnicas).

² El BSA (Bovine serum albumin) es optativo y se suele añadir para muestras en las que se sospecha que componentes secundarios pudieran estar interfiriendo en la reacción.

³ La adición de estos componentes al cóctel de reacción se simplifica mucho con la utilización de los denominados ““master mix”” que distintas compañías comercializan y en los que ya vienen todos estos componentes premezclados y a unas concentraciones adecuadas para la amplificación del ADN.

⁴ La adición del aceite mineral es para evitar la evaporación de las muestras pero con los termocicladores actuales que incluyen cubiertas calefactoras esto ya no ocurre y, por lo tanto, la adición del aceite no es necesaria.

PROCEDIMIENTO

1. En primer lugar se deben preparar las alícuotas de los distintos reactivos que se van a utilizar en la amplificación del ADN (ver apartado preparación diluciones). Dichas alícuotas se van a almacenar en el congelador de -20°C en una caja que llamaremos: “CAJA DE ALICUOTAS PARA AMPLIFICACION”.

Las alícuotas son importantes porque nos permiten minimizar el número de congelaciones/descongelaciones que van a sufrir los productos de amplificación. Ello redundará en un menor riesgo de deterioro de estos productos y en un ahorro de tiempo. Especialmente los desoxinucleótidos (dNTPs) y los oligos o primers (10 ó más nucleótidos) y, por supuesto, la Taq polimerasa son muy sensibles a los cambios bruscos de temperatura.

Cuando hay muchas personas trabajando en el laboratorio, es conveniente que haya una persona encargada de hacer las alícuotas. No tiene que ser siempre la misma, sino que se pueden establecer turnos. El sentido de esta estrategia es minimizar el riesgo de contaminaciones y, sobre todo, tener a quién preguntar en caso de que no salga nada.

2. Calcular concentración ADN y hacer diluciones en función de los valores obtenidos.

Una vez extraído el ADN, se calcula la concentración del mismo antes de preparar la reacción de amplificación o PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Hay que tener en cuenta que la estimación mediante marcadores de tamaño (DNA size markers or ladders) en los geles de agarosa es orientativa y, solamente proporciona información acerca de qué muestras han dado mayor rendimiento en la extracción y cuáles menor. Normalmente, 10 ng de ADN por reacción suelen ser suficientes. No obstante hemos de hacer diluciones porque no podemos disponer de una medida precisa de la concentración de ADN.

Por lo tanto, para asegurar una amplificación óptima de todas las muestras hay que:

a) Escoger individuos representativos de cada clase de concentración, guiándose por la intensidad de las bandas en el gel de agarosa.

b) Realizar diferentes diluciones en función de la concentración estimada y amplificarlas con el mismo primer utilizando el cóctel básico y las instrucciones que se muestran en los siguientes apartados (preferiblemente con un PRIMER-1X que haya funcionado previamente). Incluir siempre un control negativo (tubo con mezcla de reacción pero sin ADN).

3. Elaboración del cóctel de amplificación

Debe prepararse un cóctel con todos los componentes que intervienen en la reacción de amplificación que son: tampón 10X, MgCl₂, dNTPs, Primers, H₂O y la Taq polimerasa. Para ello, se deben calcular los volúmenes de los diferentes componentes del cóctel ajustándolos en función de los microlitros de ADN que vayamos a amplificar. Para paliar los inevitables errores de pipeteo es conveniente que se hagan los cálculos para 2 ó 3 muestras extras de las que realmente vamos a amplificar. A cada uno de los tubos de 0.2mL (o placas de 96 pocillos) conteniendo los microlitros estimados de ADN (normalmente de 1 a 5µl es suficiente) se le añadirá el volumen correspondiente del cóctel para alcanzar el volumen final establecido para la reacción (normalmente de 20 a 50µl). Así, si vamos a amplificar 5 µl de ADN para un volumen final de 50 µl debemos añadir 45 µl de cóctel a cada uno de los tubos-

Existen kits comerciales que incluyen todos los componentes de la reacción con la excepción del H₂O, los primers y en ocasiones de la Taq polimerasa. Esto facilita muchísimo la preparación del cóctel, pues la premezcla que incluyen estos kits contiene ya el tampón 10x, el MgCl₂ y los dNTPs conjuntamente. Los que usamos con más frecuencia en el Laboratorio de Biodiversidad Molecular del JBCVCSIC son Reddy MixTM PCR Master Mix (Termo Scientific) o Red TaqTM ReadyMixTM PCR Reaction Mix (Sigma). Los kits contienen un protocolo en el que se indica el volumen de “master mix” (premezcla) que hay que añadir, así como el volumen de ADN, primers y H₂O al que hay que ajustarse.

Algunos de estos “master mix” incluso incorporan el tampón de carga de forma que, una vez finalizada la amplificación, las muestras pueden ser cargadas directamente en el gel de agarosa para la comprobación de la amplificación.

PREPARACIÓN CÓCTEL:**Cóctel base para amplificar de 1-5µl de ADN:**

Producto	Volumen
DNA (20-50ng)	1-5µl
H ₂ Odd	Xµl
Tampón 10X	5µl
BSA (20mg/mL)	2.5µL
MgCl ₂ (2.5 mM)	5µl
dNTPs (10mM)	4µl
Primer (20µM)	0.5µl
Taq polimerasa (5U/µl)	0.1µl
Vfinal	50µl

Cóctel base utilizando el kit Red Taq ReadyMix (SIGMA):

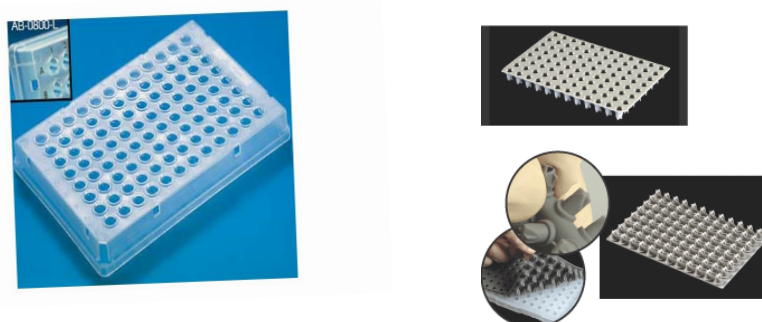
Producto	volumen
DNA (20-50ng)	2µL
Ready Mix	25µL
BSA (20mg/mL)	2.5µL
Primer (20µM)	0.5µl
H ₂ Odd	19.5 µl
Vfinal	50µl

CONSEJOS A SEGUIR:

- Elaborar el cóctel siguiendo el orden indicado arriba.
- Cargar la Taq justo antes de colocar los tubos o placa en el termociclador, en caso de no utilizar “mastermix”.
- Una vez cargada la Taq y/o el “master mix”, agitar en vórtex para uniformizar la disolución.
- Se debe incluir un control positivo (muestra que ya ha amplificado anteriormente) para comprobar que no hay ningún componente del cóctel degradado o que algo haya fallado en la amplificación.
- Se debe incluir un control negativo para comprobar que no hay ningún componente del cóctel contaminado.

TRUCOS:

- Si hay que hacer muchas amplificaciones, puede acelerarse el proceso cargando con antelación el ADN en placas de 96 pocillos, que se guardarán a -20°C convenientemente selladas y etiquetadas hasta su uso.

**Figura 28.** Placa de 96 pocillos y cubierta de silicona para sellarlas.

- Para facilitar la carga del ADN en las placas (sobre todo si hay más de una especie o población) es aconsejable delimitar con rotulador los pocillos correspondientes a cada tipo de ADN.
- Los cócteles pueden también elaborarse con antelación incluyendo todos los productos **MENOS LA Taq POLIMERASA** (cuando no se utilizan “master mix”) y guardar en congelador hasta su uso. Para no tenerlos demasiado tiempo en el congelador, es aconsejable hacer solamente los cócteles para las reacciones planificadas para una semana.
- Etiquetar convenientemente estos cócteles para evitar confusiones que ocasionarían una grave pérdida de tiempo.

4. Reacción de PCR.

Una vez tenemos cada uno de los tubos de 0.2 ml (o placas de 96 pocillos) con la mezcla formada por el ADN y los componentes del cóctel, se les da un vórtex (para evitar que la Taq se quede en el fondo del tubo) y se cargan los mismos en el termociclador. Se amplificarán las muestras con el programa que se considere más adecuado (según la T_m de los primers y según el tamaño de la región a amplificar).

NOTA: En ocasiones es interesante realizar un “HOTSTART” en la cual la única diferencia es que en lugar de añadir la Taq a los tubos de PCR, como un componente más del cóctel, lo hacemos después de poner los tubos previamente en el termociclador y realizar los siguientes 2 pasos: 2’ a 94°C seguido de 5’ a 80°C. Durante los 5’ del paso final, se abre la cubierta del termociclador y se levantan las tapas de los distintos tubos, para añadir entre 0.1 y 0.2µl de la Taq, a cada uno de ellos.

Un ejemplo de programa utilizado para la amplificación de regiones del ADN cloroplástico en los laboratorios del JBCVCSIC es:

94°C	3 minutos	
94°C.....	1 minuto	} 25- 30 ciclos (dependerá tamaño fragmento a amplificar)
Ta (45°C-55°C).....	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C.....	5 minutos	

NOTA: La Ta debe ser aproximadamente la T_m estimada para el primer que se vaya a utilizar. Se suele recomendar 2-4°C por encima o por debajo de la T_m . Además, cuando la T_m es menor de 70°C se recomienda dividir la PCR en 3 fases, donde la última debe consistir en un paso de extensión a 72°C. Cuando la T_m es superior a 70°C, se recomienda realizar una rampa para la Ta. Si el fragmento a amplificar es muy largo, se recomienda un último paso de 10 minutos a 72°C para garantizar la finalización de todas las elongaciones en el último ciclo.

PROTOCOLO PARA LA COMPROBACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN:**Tabla 22.** Material mínimo necesario para la comprobación de que la amplificación del ADN ha sido exitosa.

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	CONSERVACIÓN
Aparataje (en orden de uso)		
• Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	TA
• Pipeta de 100-1000µl	Manipulación de disoluciones	TA
• Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	TA
• Pipeta de 0.5-10µl	Manipulación de disoluciones	TA
• Frigorífico	Almacenamiento TE, H ₂ Odd y muestras ADN.	TA
• Congelador -20°C	Almacenamiento alícuotas de amplificación ADN	TA
• Microondas o agitador magnético-calefactor	Preparación gel de agarosa	TA
• Fuentes de alimentación electroforesis	Electroforesis producto amplificado.	TA
• Transiluminador de luz UV	Fotografiar geles teñidos con Bromuro de Etidio	Cuarto oscuro
• Cámara fotos	Fotografiar geles teñidos con Bromuro de Etidio	Cuarto oscuro
• Botellas de vidrio 0,5l autoclavada	Almacenamiento de disoluciones stock (TE y TBE)	TA
Reactivos (en orden de uso)		
• Agarosa estándar (Grado Biología Molecular)	Geles de electroforesis	TA
• PCR 100bp Low Ladder	Marcador de tamaño electroforesis	Frigorífico (4°C)
• TBE	Tampón electroforesis	TA
⁴ Bromuro de Etidio	Tinción de geles de agarosa	Cuarto oscuro
Utillaje general (en orden de uso)		
• Bata	Protección personal	TA
• Guantes de nitrilo	Protección personal	TA
• Resmas	Protección de la poyata	TA
• Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
• Papel de aluminio	Pesado de agarosa	TA
• Rotulador permanente	Rotulado de tubos y soluciones	TA
• Contenedores homologados residuos	Protección personal y medio ambiente	TA
• Puntas ajustables a cada pipeta	Dispensado de soluciones	TA
• Espátula	Pesado de agarosa	TA
• Cinta blanca	Etiquetado disoluciones/bordes soportes gel agarosa	TA
• Soportes gel electroforesis	Electroforesis	TA
• Matraz Erlenmeyer e imán magnético	Preparación gel electroforesis (agarosa y TBE)	TA
• Nivel	Gel agarosa	TA
• Gafas protectoras de luz UV	Visualización bandas en gel de agarosa	TA

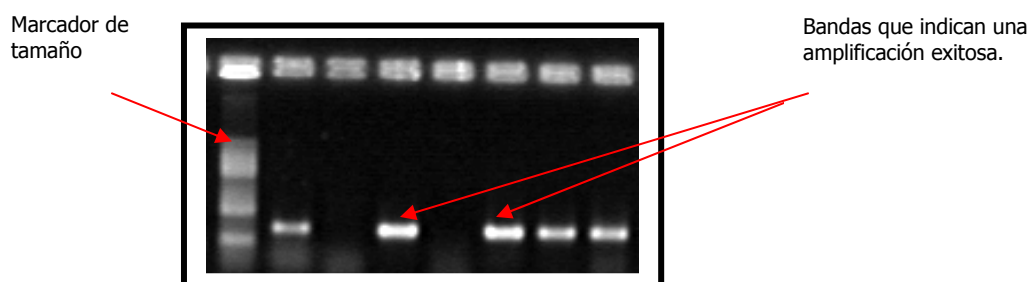
NOTA: ⁴ La preparación y el manejo del Bromuro de Etidio se describe en apartados anteriores.

PROCEDIMIENTO**1. Realizar la electroforesis de los productos amplificados.**

Mientras la amplificación se está desarrollando, se preparará un gel de agarosa al 0,8%, 1% o al 1.8% (ver figuras 26-28). Una vez la amplificación finalice se cargará el ADN amplificado en el gel. Se deja correr a unos 100 voltios durante 25 o 30' (hasta que el marcador se haya separado varios cm de los pocillos).

2. Teñir el gel en Bromuro de Etidio y fotografiarlo (ver apartado preparación disoluciones y el procedimiento en la pág 33).

Según sean las bandas que observemos en el gel sabremos si la amplificación ha sido exitosa o no. En la figura 29 se muestra un gel con muestras cuya amplificación ha sido exitosa (banda única, brillante y a la altura del tamaño que le corresponde respecto al marcador) y muestras que no han amplificado (donde no se observa banda ninguna).

**Figura 29.** Gel con productos amplificación

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DEL ADN.

Tabla 23. Material mínimo necesario para la purificación del ADN.

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	CONSERVACIÓN
Aparataje (en orden de uso)		
•Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	TA
•Pipeta de 100-1000µl	Manipulación de disoluciones	TA
•Pipeta de 10-100µl	Manipulación de disoluciones	TA
•Pipeta de 0.5-10µl	Manipulación de disoluciones	TA
•Vórtex	Agitación	TA
•Frigorífico	Almacenamiento TE, H2O y muestras ADN.	TA
•Microcentrífuga para 24 tubos de 1,5 ml	Purificación del ADN amplificado	TA
•Botellas de vidrio 0,5l autoclavada	Almacenamiento de disoluciones stock (TE y TBE)	TA
•Estufa	Evaporación del Etanol 70% y resuspensión en TE	TA
•Biofotómetro	Cuantificación muestras	TA
Reactivos (en orden de uso)		
•Columnas y reactivos de purificación	Limpieza del ADN	Congelador (-20°C)
•Etanol al 70%	Limpieza del ADN	TA
•TE	Resuspensión del ADN para su almacenamiento	Frigorífico (4°C)
Utillaje general (en orden de uso)		
•Bata	Protección personal	TA
•Guantes de nitrilo	Protección personal	TA
•Resmas	Protección de la poyata	TA
•Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
•Papel de aluminio	Pesado de agarosa	TA
•Rotulador permanente	Rotulado de tubos y soluciones	TA
•Contenedores homologados residuos	Protección personal y medio ambiente	TA
•Puntas ajustables a cada pipeta	Dispensado de soluciones	TA
•Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	TA
•tubos de 1,5 ml de tapa plana autoclavados	1 tubo por muestra convenientemente marcados	TA
•Gradilla para tubos de 1,5 ml	Ordenación de tubos	TA
•Cubetas biofotómetro		TA

PROCEDIMIENTO

1. Purificación del ADN amplificado.

Tras la reacción de PCR, se eligen las muestras para las que se hayan obtenido una banda intensa y bien definida en el gel de agarosa. Para eliminar los restos de dNTPs y cualquier otro de los componentes del cóctel que nos pueda dificultar o “contaminar” la reacción de secuenciación se deben purificar las muestras de ADN amplificado. Para ello se suelen emplear kit comerciales que incluyen columnas de purificación. Algunos de estos kit son: “GFX PCR ADN and Gel Band Purification” de la casa comercial Amersham o “GenElute PCR Clean-Up” de la casa comercial Sigma (ver tabla 18 para referencias).

NOTA: Todos los kits comerciales de purificación contienen productos y protocolos similares y con una eficiencia similar. En nuestro caso es el precio el que nos ha hecho decantarnos por un kit sobre el resto. Es el kit “GenElute PCR Clean-Up” de la casa comercial Sigma el que utilizamos en el laboratorio del JBCVCSIC porque es el que ofrece mejor relación calidad-precio.

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN CON EL KIT GenElute PCR Clean-Up DE SIGMA

Material necesario

Este kit está diseñado para la purificación rápida de productos de amplificación de doble cadena o de cadena sencilla de un tamaño comprendido entre 100 bp y 10Kb. Permite la separación del ADN de los otros componentes de reacción como el exceso de primers, nucleótidos, la DNA polimerasa y sales. Este kit tiene la ventaja de que no necesita de resinas o de componentes tóxicos orgánicos como el fenol o el cloroformo y de que es además económico. El kit se almacena a temperatura ambiente.

Reactivos y componentes que contiene el kit (para unas 70 purificaciones):

Producto	volumen
Column Preparation Solution	60ml
Binding Solution	40ml
Wash Solution Concentrate	12ml
Elution Solution	8ml
GenElute Miniprep Binding Column	70 columnas
Collection Tubes 2 ml	2 x 70 tubos

NOTA: Para evitar la confusión entre los reactivos se rotula cada uno de ellos en función del orden en el que los usaremos. Así tendremos Solución 1, 2 y 3.

Reactivos y Equipamientos necesarios pero no incluidos en el kit:

- Etanol absoluto
- Microcentrífuga
- Tubos 1.5 ml para Microcentrífuga
- H₂Odd para Biología Molecular
- Micropipetas y puntas estériles

PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE ADN AMPLIFICADO CON EL KIT GenElute PCR Clean-Up DE SIGMA

1. Comprobar que ninguno de los reactivos ha precipitado. En caso de que se haya formado algún precipitado de los reactivos, calentar a 55-65° C hasta que el mismo se disuelva y dejar que vuelva a temperatura ambiente antes de utilizarlo.
2. Diluir la solución de lavado (Wash Solution Concentrate) añadiendo 48 ml de etanol 100%. Después de cada uso cerrar bien el tubo para prevenir la evaporación del alcohol.
3. Colocar las columnas del kit que necesitemos en los tubos colectores correspondientes (1 por columna).
4. Añadir 500 µL de la “**Solución 1**” (Column Preparation Solution).
5. Centrifugar a 12.000g durante 1 minuto.
6. Descartar el eluyente (en este paso se prepara la columna para maximizar la unión del ADN a la misma)

NOTA: Asegurarse de que se ha añadido el Etanol absoluto antes de usarlo. Para evitar contaminaciones es importante que entre paso y paso de centrifuga cada vez que se descarta las soluciones que precipitan en el tubo colector, que las mismas no toquen la base de la columna.

7. Añadir 5 volúmenes de la “**Solución 2**” (Binding Solution) por cada volumen de producto amplificado (hasta un máximo de 100 µl).
Así tenemos que:
Reacciones con un Vf= 50 µL añadiremos 250 µL de Solución 2
Reacciones con un Vf= 25 µL añadiremos 125 µL de Solución 2.
8. Pipetear varias veces dentro del tubo para mezclar bien y transferir la mezcla a la columna.
9. Centrifugar a máxima velocidad (16.000g) durante 1 minuto.
10. Descartar el eluyente pero se mantiene el tubo colector (en este paso se produce la unión del DNA a la membrana del interior de la columna).
11. Añadir 500 µL de la solución que llamaremos “**Solución 3**” (Wash Solution) a la columna.
12. Centrifugar a máxima velocidad (16.000g) durante 1 minuto. Eliminar el eluyente pero mantener el tubo colector (este paso lava el DNA unido a la columna).
13. Colocar de nuevo la columna en el tubo colector.
14. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos.
15. Eliminar el tubo colector con todos los residuos que haya en su interior.
En este paso se continúa con la limpieza del DNA unido a la columna de forma que se elimina el exceso de Etanol.
16. Colocar la columna con el DNA en un tubo de 1.5 ml.
17. Añadir 40-50µL de TE (o de la “Elution Solution” incluida en el kit, o de H₂Odd) al centro de la columna.
18. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.

NOTA: En caso de eluir con agua asegurarse de que tiene un pH entre 5.5 y 8.5. La dilución se puede realizar también con la Elution Solution diluida 10 veces con agua. El DNA debe ser recuperado con una solución baja en sales.

19. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

Después de este último paso, el producto de DNA amplificado pasará al tubo de 1.5 ml y estará preparado para usarse o para almacenarlo a -20°C.

SECUENCIACIÓN DEL ADN

Las reacciones de secuenciación consisten en una PCR, con la particularidad de que se utiliza uno sólo de los dos primers empleados en la amplificación. Otra particularidad es que, además de los cuatro deoxinucleótidos (dNTPs), se emplean dideoxinucleótidos (ddNTPs) que están marcados con diferentes fluorocromos (Big Dye o Rhodaminas). Cuando la polimerasa incorpora un ddNTPs se interrumpe la elongación de la cadena, de forma que al término de la reacción habremos obtenido tantos fragmentos como nucleótidos tenga la región a secuenciar. A continuación las muestras son sometidas a una electroforesis capilar, donde los fragmentos se separarán de forma ordenada según su tamaño.

PROTOCOLO PREPARACIÓN REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.

Tabla 24. Material mínimo necesario para secuenciar ADN.

ELEMENTOS	UTILIZACIÓN	CONSERVACIÓN
Aparataje (en orden de uso)		
• Autoclave	Esterilización de material y disoluciones	TA
• MiliQ	Esterilización del agua	TA
• Pipeta de 0.5-2µl	Reacción de secuenciación	TA
• Pipeta de 10-100µl	Precipitación ADN	TA
• Pipeta de 0.5-10µl	Precipitación ADN	TA
• Vórtex	Agitación	TA
• Máquina de Hielo	Reacción de secuenciación	TA
• Frigorífico	Almacenamiento H ₂ Odd	TA
• Congelador -20°C	Almacenamiento reactivos secuenciación	TA
• Termociclador	Reacción de secuenciación	TA
• Microcentrífuga para 24 tubos de 1,5 ml	Purificación del ADN amplificado	TA
• Estufa	Evaporación del Etanol 70%	TA
• Secuenciador ABI 3100	Electroforesis capilar	TA
Reactivos (en orden de uso)		
• H ₂ Odd	Alícuotas de amplificación ADN	4°C
*Primer (5pmol/µL)	Alícuotas reacciones de secuenciación	-20°C
• BIG DYE Terminator Sequencing kit v3.1	Reacciones de secuenciación	-20°C
• Etanol absoluto	Precipitación del ADN	TA
• Ácido Acético 3M	Precipitación del ADN	TA
• Etanol al 70%	Precipitación del ADN	TA
• Formamida	Resuspensión del ADN	-20°C
Utillaje general (en orden de uso)		
• Bata	Protección personal	TA
• Guantes de nitrilo	Protección personal	TA
• Papel de filtro (Resmas)	Protección de la poyata	TA
• Papel higiénico	Secado y limpieza de elementos	TA
• Contenedores homologados para residuos laboratorio	Protección personal y medio ambiente	TA
• tubos de 0,2 ml de tapa plana autoclavados o placas de 96 pocillos	1 por muestra convenientemente marcados	TA
• Gradilla para tubos 0.2 mL	Colocación y ordenación de tubos	TA
• Rotulador indeleble	Marcaje de tubos y disoluciones	TA
• Bandeja para hielo	Montaje PCR en frío	TA
• tubos de 1,5 ml de tapa plana autoclavados	1 tubo por muestra convenientemente marcados	TA
• Gradilla para tubos de 1,5 ml	Ordenación de tubos	TA
• Puntas estériles.	Ajustables a cada una de las pipetas listadas	TA
• Botellas de vidrio 0,5l autoclavada	Almacenamiento de disoluciones stock (Etanol 100% y 70%)	TA
• Placas especiales para el secuenciador	Cargar muestras en el secuenciador	TA

PROCEDIMIENTO PARA AMPLIFICAR EL ADN PARA SECUENCIACIÓN

NOTA Antes de empezar, comprobar que se dispone de todos los productos de la lista de la Tabla 19. y cuantificar el ADN purificado por espectrofotometría para ver su grado de pureza y estimar el número de microlitros a añadir en la reacción de secuenciación a partir de su concentración (ver apartado evaluación cuantitativa del manual para detalles sobre este procedimiento).

1. Preparación del cóctel para la reacción de secuenciación.

Se aconseja previamente a montar la reacción descongelar los componentes del kit de Big Dye a oscuras (la mezcla de nucleótidos marcados con fluorocromos y la Taq polimerasa es fotosensible) y mantenerlos en frío hasta el momento de añadirlos al cóctel.

Cuando el número de muestras sea bajo, lo mejor es añadir los componentes individualmente a cada uno de los tubos o pocillos en la placa

Cóctel base Secuenciación:	
Producto	volumen
ADN	2µl
Primer (5pmoles/ µl)	1µl
Big Dye	2 µL
Volumen final	5µl

2. Montar la reacción de secuenciación

La concentración de ADN por reacción que se va a utilizar es en función del tamaño del fragmento a secuenciar, tomándose la siguiente tabla como referencia:

Volumen de ADN a añadir según longitud fragmento a secuenciar.

Longitud del fragmento de ADN	Cantidad de ADN
Producto de PCR (100-200 pb)	5-10 ng
Producto de PCR (200-500 pb)	10-25 ng
Producto de PCR (500-1000 pb)	25-50 ng
Producto de PCR (1000-2000 pb)	50-100ng
Producto de PCR (2000 pb)	100-200 ng

Del kit de Big Dye se añadirán 0.5 µL de solución 1 y 1.5 µL de solución 2 para alcanzar el total de 2 µL que mostramos en la tabla con el cóctel.

3. Reacción de PCR

Una vez realizada la mezcla de todos los componentes de la reacción se les da un vórtex a cada uno de los tubos y un pulso en la centrifuga antes de ponerlos en el termociclador e iniciar el siguiente programa:

- 94° C durante 3 minutos
- 96° C durante 10 segundos
- 50° C durante 5 segundos } 25 CICLOS (paso 2 al 4)
- 60° C durante 4 minutos

- 4° C durante un tiempo indefinido, hasta que sacamos las muestras para precipitarlas en etanol.

Si la precipitación en etanol no se hace inmediatamente una vez finalizada la reacción, el producto de amplificación obtenido se puede guardar en el frigorífico hasta el día siguiente o a -20° C si se va a esperar un período mayor de tiempo.

PROTOCOLO DE PRECIPITACIÓN DE LAS MUESTRAS EN ETANOL.

Una vez finalizada la reacción de secuenciación se procede a la precipitación en Etanol del producto resultante para su posterior electroforesis capilar en el secuenciador ABI 3100. La finalidad de la precipitación es eliminar los componentes sobrantes de la reacción para que no afecten negativamente a la secuenciación.

PROCEDIMIENTO

1- Colocar en tubo de 1.5 mL los siguientes productos:

- 14.843 µL de etanol absoluto
- 4.4 µL de H₂O
- 0.5 µL de acetato sódico 3M pH5
- 5 µL de muestra

2- Darle al tubo un vórtex, un pulso de centrifuga y colocarlo 15' a temperatura ambiente.

3- Centrifugar a máxima velocidad (aprox. 13.000 r.p.m) durante 25'

4- Retirar todo el sobrenadante, apoyando la punta de la pipeta por la pared del tubo en la que sabemos que no descansa el pellet.

NOTA: El pellet apenas es visible por lo que la toma del sobrenadante se debe hacer suavemente pero se recomienda eliminar el máximo posible para evitar que queden restos de etanol que nos meterían mucho ruido en la línea basal de las secuencias. Se toma pestaña del eppendorf como referencia para saber sobre que pared está apoyado el pellet (a veces a tras luz se puede ver) y se retira con pipeta todo el sobrenadante ¡! SIN MIEDO !!

5- Añadir 62.5 µl de etanol al 70% (se recomienda prepararlo al momento) y darle un pulso en el vórtex.

6- Centrifugar nuevamente a máxima velocidad durante 5-10'.

7- Retirar todo el sobrenadante, apoyando la punta de la pipeta por la pared del tubo en la que vemos que no descansa el pellet.

8- Centrifugar nuevamente para eliminar posibles restos de etanol.

9- Retirar con pipeta el sobrenadante y dejar a temperatura ambiente durante al menos 10' ó 5' en la estufa a 37°C.

10. Las muestras se pueden conservar en congelación en este punto o prepararlas para la electroforesis capilar según las instrucciones del apartado siguiente.

PROTOCOLO DE PREPARACIÓN MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS CAPILAR.

Llegados a este punto las muestras están preparadas para su electroforesis capilar. Únicamente debemos seguir una serie de pasos antes de cargarlas en el secuenciador.

PROCEDIMIENTO

1- Resuspender con formamida (debe congelarse pues si no se congela nos indicaría que está deteriorada) en un volumen de 10 µl.

NOTA: este volumen puede ser mayor, lo que nunca debe es ser menor porque es lo que el capilar necesita cargar.

2- Pasar las muestras una vez resuspendidas a las placas especiales del termociclador.

3- Desnaturalizar en el termociclador a 95°C durante 3´.

4- Colocar la placa en hielo al menos 1 minuto.

5- Tras comprobar que no existen burbujas en los pocillos y que no hay restos de agua en el exterior de la placa, se coloca la misma en el secuenciador.

6- Comenzar la electroforesis. La electroforesis se llevará a cabo durante 2 horas para cada 16 muestras.

Las referencias y los fabricantes tanto de los productos utilizados en la secuenciación y precipitación del ADN como del fungible no químico y del material inventariable utilizado en la amplificación y secuenciación del ADN en nuestro laboratorio los mostramos en los Anexos 1 y 2. Fabricantes hay muchos por lo que la decisión de elegir uno respecto a otro dependerá de las condiciones de cada laboratorio (presupuesto, localización, etc).



Figura 30. Secuenciador automático ABI 3100.

v) Los bancos de ADN y el código de barras de la vida.

Si existen regiones en el ADN vegetal que puedan operar como códigos de barras, los bancos de ADN adquirirán un papel determinante en la gestión de la biodiversidad, ya que serán los depositarios del material genético que contiene esa información tan importante para elaborar el censo de los seres vivos que habitan nuestro planeta. En este sentido, una de las misiones del Banco de ADN del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” es la de generar y almacenar información molecular relevante para la identificación, la investigación y la gestión de la Flora de las Islas Canarias.

Merece la pena hacer hincapié en que las consecuencias de contener las claves de la identidad de cualquier planta tendrán implicaciones de gran calado para la gestión de la biodiversidad, no solamente desde el punto de vista taxonómico y de la investigación del origen y relaciones entre los elementos de la biodiversidad, sino también desde un punto de vista legal: las secuencias “código de barras” permitirán identificar rápidamente y sin ambigüedades el tráfico de plantas endémicas o amenazadas y podrán detectar fraudes en la composición biológica de productos comerciales.

vi) El futuro ¿lejano?

En caso de que las regiones propuestas como código de barras molecular funcionen, habrá que realizar un arduo trabajo de catalogación, alineación y almacenamiento de secuencias para generar una enorme base de datos que contenga los códigos de barras para todos los organismos que se conocen en la actualidad. También habrá que evaluar la posible variabilidad intra-específica, estandarizar todas las secuencias en la creciente base de datos (para eliminar el factor de variación de longitud para la misma secuencia en diferentes organismos) y perfeccionar algoritmos de búsqueda que permitan encontrar secuencias coincidentes o parecidas con la mayor rapidez posible. Se trata de un constante trabajo multi- e interdisciplinar que requerirá un elevado grado de coordinación internacional.

A largo plazo, el objetivo de la iniciativa del código de barras de la vida es construir un aparato portátil que, en cuestión de pocos minutos y desde cualquier región del planeta, secuencie las regiones de interés para cualquier organismo y nos permita saber el nombre de este organismo (en caso de que su secuencia se halle depositada en la base de datos del código de barras de la vida), o nos diga si se puede tratar de un organismo nuevo para la ciencia que hay que describir. Aunque este objetivo puede parecer muy lejano por los diferentes y complicados frentes en los que hay que trabajar, los avances técnicos y científicos asociados a la tecnología del ADN podrían hacerlo realidad antes de lo que esperamos.

vii) Un código de barras para la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria

Las Reservas de la Biosfera son porciones del territorio de un país asociadas a un proyecto de conservación y manejo ambientalmente sostenibles. Éstas son propuestas por los gobiernos nacionales y, en su caso, aprobadas por el Programa MAB de la UNESCO. La investigación científica ha sido un importante componente a lo largo de las dos décadas de existencia de este Programa, de forma que los resultados y la experiencia obtenidos se han traducido en conocimientos y prácticas innovadoras en el área de la ecología y el medio ambiente. La UNESCO y el MAB, en cooperación con otros programas internacionales, han llevado a cabo acciones en diversos campos, desarrollando iniciativas como el MAB Fauna y MAB Flora para el inventario de especies o el programa Diversitas para la investigación científica sobre biodiversidad. Por otro lado, se han desarrollado un conjunto de redes regionales e interregionales como el Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), iniciativa que alcanza a más de 19 países de América Latina, España y Portugal, y que comprende la Red Iberoamericana de Reservas de Biosfera. Además en 1996 la UNESCO-MAB inicia el Proyecto de Estrategias de Diversidad Biológica para Islas y Áreas Costeras (IBSICA) enfocado especialmente en aquellos países que tienen o que planean tener Reservas de Biosfera en islas y/o zonas costeras y cuyos gobiernos han ratificado el Convenio sobre Diversidad Biológica. IBSICA patrocina una red recientemente establecida llamada “REDBIOS” (Red de Reservas de la Biosfera del Atlántico Este) entre las Islas Canarias, Cabo Verde, Marruecos y Senegal.

Dentro de los objetivos que se contemplan en la Red Mundial de Reservas de la Biosfera y del Proyecto IBSICA están: aumentar las capacidades locales de investigación, formación y gestión del uso sostenible de los recursos renovables; establecer el intercambio de información, de resultados de investigación y científicos, particularmente en lo que se refiere a la preservación y uso sostenible de la biodiversidad y, por último, la difusión de conocimientos adquiridos en la investigación comparativa a través de publicaciones y bases de datos en red.

Las Reservas de la Biosfera deben combinar las siguientes tres funciones básicas, de forma que se debería procurar que fueran lugares de excelencia para el ensayo y la demostración de métodos de conservación y desarrollo sostenible:

1. Conservación de la diversidad genética, de especies, ecosistemas y paisajes y de la diversidad cultural.
2. Desarrollo ambientalmente sostenible de las poblaciones humanas de la Reserva y de su entorno.
3. Apoyo logístico para respaldar y fomentar las actividades de investigación básica y aplicada, de educación, de formación y de monitoreo relacionadas con las actividades de interés local, nacional e internacional.

Estas tres funciones y en especial la primera y la tercera muestran el importante rol que la investigación científica juega en las Reservas de la Biosfera. (Santiago Karez, C. et al. 1998)

Se podría decir que las Reservas de la Biosfera son conjuntos de unidades de territorio distribuidas a nivel planetario en las que el manejo y conservación están asociados a muy diversas condiciones biogeográficas y ecológicas, a la historia natural y cultural de las mismas y a los distintos usos que de los recursos naturales se realicen en ellas.

La declaración de una parte de Gran Canaria como Reserva de La Biosfera (30 de Junio de 2005) es una oportunidad única para poder apostar por el uso racional de la biodiversidad canaria para el beneficio de las poblaciones locales, en primera instancia, pero también de las Islas Canarias en particular y del resto de España en general. Desde nuestro punto de vista, la participación de científicos y de la propia administración de la Reserva, así como de otras organizaciones locales, en la regulación y prioridades de la investigación en la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria es más que recomendable.

El Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada CSIC, a través de la coordinación entre su Departamento de Flora Amenazada, su Herbario y su Laboratorio de Biodiversidad Molecular, está desarrollando un proyecto (co-financiado por el Ministerio de Medio Ambiente y el Cabildo de Gran Canaria) para aplicar la investigación del código de barras de la vida a la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria y ayudar así a caracterizar y evaluar su diversidad vegetal. Este objetivo se hace indispensable para conseguir un mejor conocimiento taxonómico de la diversidad vegetal de la isla de Gran Canaria, ya que las zonas elegidas como parte de la Reserva de la Biosfera contienen las mejores representaciones de la biodiversidad de la Isla, abarcando Reservas Naturales (como la de Inagua o la Reserva Especial de Güi-Güi), Parques Naturales (Tamadaba y Pílancones), Monumentos Naturales (como el del Risco de Tirajana, el del Roque Nublo o el de Tauro), y LICs (como el macizo de Amurga).

La biodiversidad funciona como una compleja red de interacciones en la que la supervivencia de una sola especie depende de las aportaciones de muchas de las demás. Aplicaremos este principio a la gestión de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria para convertirla en un escenario de gestión multi-disciplinaria de la biodiversidad donde se supere el (biológicamente incoherente) esquema clásico de priorizar los casos más críticamente amenazados o “emblemáticos”, para implantar un modelo holístico y sostenible que escoja las estrategias más adecuadas de gestión y conservación basándose en datos fiables sobre cada problemática. La primera fase de acción de este proyecto está prevista para 2011, e incrementará el conocimiento actual sobre la biodiversidad vegetal de la Reserva, incidiendo en:

- (a) la geo-referenciación, herborización y genotipado de los 228 endemismos de especial interés con dos marcadores de secuencia (*rbcL* y *matK*),
- (b) la recolección sostenible de germoplasma en los 29 endemismos en peligro crítico de extinción, cuyos recursos intrínsecos de supervivencia podrían estar prácticamente agotados, y donde la generalizada escasez de poblaciones hace prescindibles algunos estudios, y
- (c) el muestreo intensivo de ADN en otros endemismos menos amenazados para posibilitar futuras investigaciones que maximicen la diversidad genética representada en las recolecciones de germoplasma y aporten variables de selección de poblaciones para eventuales reforzamientos y reintroducciones.

Nuestros objetivos al final de esta primera fase son:

1. Asignar valores de complejidad evolutiva por cada unidad de territorio para detectar “santuarios de biodiversidad” en la Reserva,
2. Testar el impacto humano en la biodiversidad vegetal comparando la información obtenida en las dos zonas núcleo, las de transición y amortiguación,
3. Aportar nuevos datos a las estimaciones de la diversidad filogenética de la Flora Canaria en curso, y
4. Facilitar futuras acciones de divulgación e investigaciones multi-disciplinarias coordinadas desde el Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada CSIC (Cabildo de Gran Canaria).

Protocolos de preparación de disoluciones para extracción, amplificación y secuenciación de ADN.



CONSEJOS BÁSICOS SOBRE MANIPULACIÓN GENERAL DE PRODUCTOS QUÍMICOS

Existen varias recomendaciones elementales para una manipulación segura de productos de laboratorio, a saber:

1. Evitar el contacto directo con los productos químicos y su inhalación utilizando guantes de látex y mascarillas. Fijarse en los pictogramas de las etiquetas de los productos para conocer el grado de peligrosidad de éstos.
2. Actuar como si todos los productos fueran peligrosos, asumiendo siempre la máxima protección en caso de desconocer las propiedades de los productos o disoluciones que estamos manipulando.
3. Nunca manipular productos químicos altamente peligrosos (Nitrógeno líquido, ácidos concentrados, soluciones con elevada toxicidad por inhalación) si no hay otras personas en el laboratorio o en sus alrededores.
4. Nunca almacenar los ácidos y productos inflamables en el exterior, sino en un compartimento aislado con puertas. En nuestro laboratorio, este compartimento se halla debajo de las balanzas.
5. Al elaborar disoluciones, etiquetar siempre el recipiente de almacenamiento con un rotulador indeleble especificando su contenido, el nombre de la disolución, su composición, la fecha de elaboración y las iniciales de la persona que la haya hecho. Todo esto es importante para estimar cuando hay que cambiar un producto o disolución y a quién hay que preguntar en caso de que se tengan dudas sobre una disolución nueva. Marcar el nombre de la disolución también en las probetas, especialmente si van a dejarse sobre la poyata durante cierto tiempo, para evitar accidentes y/o confusiones.

BROMURO DE ETIDIO

Tabla 9. Material mínimo necesario para preparación disolución Bromuro de Etidio.

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización del H ₂ Odd
Resmas	Protección de la poyata
Balanza	Pesado del Bromuro de Etidio
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Frasco pequeño opaco	Almacenamiento de la disolución stock
Fiambra de plástico opaca o envuelta en papel de aluminio	Almacenamiento de la disolución de uso
Pipeta de 10-100 µl	Dilución de la disolución stock
Punta de pipeta de 10-100 µl	Dilución de la disolución stock
Probeta de 500 ml	Medida del volumen necesario de H ₂ Odd
Productos	
H ₂ Odd autoclavada	5 ml
Bromuro de etidio	50 mg

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 9. En caso de disponer ya de disolución stock, solamente deberemos preparar la disolución de uso. En caso contrario deberemos preparar ambas.

Disolución stock

Tiene una concentración de 10mg/ml, puede guardarse durante bastante tiempo y sirve de base para la solución de tinción.

1. Añadir 5ml de H₂Odd autoclavada en un frasco opaco envuelto en papel de aluminio para evitar el contacto del producto con la luz
2. Pesar 50mg de bromuro de etidio y añadirlo al H₂Odd (evitar el uso de espátula, intentar pesar el producto vertiéndolo directamente desde el bote al papel de aluminio de la platina de la balanza).
3. Mezclar agitando en el mismo frasco opaco.
4. Etiquetar convenientemente y guardar a TA, en sitio resguardado de la luz

Disolución de uso

1. Diluir 50µl de la solución stock en 500ml de H₂Odd autoclavada dentro de una fiambra opaca o recubierta con papel de aluminio (esta bandeja será el recipiente donde se lleven a cabo las tinciones).
2. Tapar la fiambra y dejar en el agitador orbital a velocidad 3 hasta la homogeneización total de la disolución. Esta disolución debe cambiarse cada cierto tiempo, depositando la disolución vieja en el recipiente homologado correspondiente.
3. Etiquetar convenientemente en sitio visible de la fiambra y guardar a TA, en sitio resguardado de la luz.

NOTA: Evitar la contaminación de material al elaborar esta disolución, ya que pueden quedar trazas de bromuro de etidio.

CTAB 2X

Tabla 10. Material mínimo necesario para la preparación disolución CTAB 2X.

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Resmas	Protección de la poyata
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización del H ₂ Odd
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador indeleble	Etiquetado de las disoluciones
Vaso de precipitados de 2l	Preparación de la disolución
Agitador magnético e Imán	Agitación magnética de la disolución
Balanza	Pesaje de productos
Espátula	Añadir productos para pesar
Probeta de 250ml	Medición de las disoluciones
Probeta de 1l	
Dispensador de volumen	Obtención rápida del volumen de CTAB
Botella de vidrio opaco para el dispensador 2.5l	Almacenar el CTAB para ser dispensado
Productos	
H ₂ Odd autoclavada	Para enrasar a 2,5 litros
Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)	50 g
Tris 1M pH8	250 ml
NaCl	204,75 g
EDTA 0,25 M	200 ml

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 10.

1. Disolver los reactivos y las disoluciones en los volúmenes indicados en la Tabla 10 en unos 2 litros de agua destilada y autoclavada.
2. Dejar la disolución agitándose mientras añadimos los productos.
3. Una vez añadimos todos los productos, hay que dejar reposar la disolución ya que esta genera espuma. Con el reposo, la espuma se deposita en la parte superior y observamos que los reactivos se han disuelto totalmente.
4. Enrasar a 2,5 litros e introducir en la botella de vidrio opaco para el dispensador 2,5 litros.
5. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución. Después de un tiempo de reposo en la botella, la espuma desaparece totalmente.
6. Guardar a temperatura ambiente.

EDTA 0.25M pH8

Tabla 11. Material mínimo necesario para la preparación disolución EDTA 0.25M.

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Resmas	Protección de la poyata
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Balanza	Pesado del EDTA
Vaso de precipitados de 1l	Mezclar la disolución
Agitador magnético e Imán	Agitación magnética de la disolución
Probeta de 1l	Medida del volumen final de la disolución
Frasco de 1l	Almacenamiento de la disolución
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Productos	
H ₂ Odd autoclavada	Para enrasar a 1 litro
EDTA	93,05 g
NaOH	100 lentejas

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 11.

1. Pesar 93.05g de EDTA.
2. Disolver en 800ml de H₂Odd y autoclavada. Para diluirlo, calentar mientras se agita.
3. Dejar enfriar la disolución para ajustar el pH.
4. Añadir aproximadamente 100 lentejas de NaOH. Esperar a que se disuelvan midiendo el pH y ajustar finalmente a 8 (CON QUÉ? MAS LENTEJAS? DISOLUCIÓN DE NaOH
5. Enrasar a 1 l e introducir en una botella previamente autoclavada.
6. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
7. Almacenar en frigorífico, a 2-8°C.

EDTA 0.5M pH8

Tabla 12. Material mínimo necesario para la preparación disolución EDTA 0.5M

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Resmas	Protección de la poyata
Balanza	Pesado del EDTA
Vaso de precipitados de 0.5l	Mezclar la disolución
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Probeta de 0.5l	Medida del volumen final de la disolución
Frasco de 0.5l	Almacenamiento de la disolución
Productos	
H ₂ Odd autoclavaza	Para enrasar a 200 ml
EDTA	93,05 g
Tris	Indeterminado, para ajustar la disolución

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 12.

1. Pesar 93.05g de EDTA.
2. Disolver en 200ml de H₂Odd y autoclavada.
3. Ajustar el pH con Tris en polvo. Una vez que la disolución adquiere un pH aproximado a 8 el Tris se disuelve totalmente.
4. Enrasar a 0.5l e introducir en una botella previamente autoclavada.
5. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
6. Almacenar en frigorífico a 2-8°C.

ETANOL 70%

Tabla 13. Material mínimo necesario para la preparación disolución Etanol al 70%.

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Resmas	Protección de la poyata
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Probeta de 0.5l	Medida del volumen final de la disolución
Frasco de 0.5l	Almacenamiento de la disolución
Productos	
H ₂ Odd autoclavada	Para enrasar a 500 ml
Etanol 100%	350 ml

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 13.

1. Medir 350 ml de etanol en una probeta de 0.5 l
2. Enrasar a 0.5 l con H₂Odd y autoclavada e introducir en una botella previamente autoclavada.
3. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
4. Almacenar a -20°C.

JUGO AZUL

Tabla 14. Material mínimo necesario para la preparación disolución Jugo Azul.

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Resmas	Protección de la poyata
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Vaso de precipitados de 250ml	Mezclar la disolución
Probeta de 250ml	Medida del volumen final de la disolución
Probeta de 25ml	Medida del volumen final de la disolución
Probeta de 10ml	Medida del volumen final de la disolución
5 Tubos Falcon autoclavados	Almacenamiento de la disolución
Tubos de 1.5ml	Almacenamiento de alícuotas de la disolución
Productos necesarios para 250 ml de disolución	
Glicerina	190ml
TBE 10X	12.5ml
EDTA 0.25M	20ml
SDS 20%	2.5ml
Azul de bromofenol	Una pizca
H ₂ Odd autoclavada	25ml

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 14.

1. Mezclar y disolver los reactivos en las cantidades que aparecen en la Tabla 14.
2. Repartir la disolución en 5 tubos Falcon.
3. Etiquetar los tubos con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
4. Realizar alícuotas de 1ml en tubos de 1,5 ml para su utilización rutinaria.
5. Almacenar en frigorífico a 2-8°C.

SDS 20%**Tabla 15.** Material mínimo necesario para la preparación disolución SDS 20%.

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Resmas	Protección de la poyata
Balanza	Pesaje de SDS
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Probeta de 0.5l	Medida del volumen final de la disolución
Frasco de 0.5l	Almacenamiento de la disolución
Productos	
H ₂ Odd autoclavada	Para enrasar a 500 ml
SDS (Laurel Sulfate)	100 g

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 15.

1. Disolver 100g de SDS en unos 450 ml de H₂Odd y autoclavada
2. Enrasar a 500 ml con H₂Odd y autoclavada e introducir en una botella previamente autoclavada.
3. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
4. Almacenar a temperatura ambiente.

SEVAG

Tabla 16. Material mínimo necesario para la preparación disolución SEVAG

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Resmas	Protección de la poyata
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Probeta de 100 ml	Medición de Alcohol isoamílico
Frasco de 2.5l	Almacenamiento de la disolución
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Productos	
Cloroformo	1.500 ml
Alcohol isoamílico (3 –methylbutanol) u octanol	62,5 ml

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 16.

1. Introducir 3 botellas de 500ml de cloroformo en el frasco de 2.5 litros.
2. Añadir 62.5ml de alcohol isoamílico en el frasco de 2.5 litros.
3. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
4. Almacenar a temperatura ambiente.

TBE 10X

Tabla 17. Material mínimo necesario para la preparación disolución de TBE 10X

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Resmas	Protección de la poyata
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Probeta de 100 ml	Medición de Alcohol isoamílico
Frasco de 2.5l	Almacenamiento de la disolución
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Productos	
H ₂ Odd autoclavada	Para enrasar a 1 litro
Sigma 7-9	108 g
Ác. Bórico	55 g
EDTA 0.5 M ph8.0	40 ml

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 17.

1. Disolver los productos en H₂Odd autoclavada y enrasar a 1L, no se ajusta el pH.
2. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
3. Almacenar a temperatura ambiente.

NOTA: Este tampón se prepara al 10X ya que a esta concentración se mantiene más estable.

TE (Tampón Tris-EDTA pH 8)

Tabla 18. Material mínimo necesario para la preparación disolución de TE

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Resmas	Protección de la poyata
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Probeta de 100 ml	Medición de Alcohol isoamílico
Frasco de 2.5l	Almacenamiento de la disolución
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Productos	
H ₂ Odd autoclavada	Para enrasar a 1 litro
Tris 1M	100 ml
EDTA 0.5 M ph8.0	2 ml

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 18.

1. Disolver los productos en H₂Odd autoclavada y enrasar a 1 litro, no se ajusta el pH. El tampón se prepara al 10X ya que se mantiene más estable.
2. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
3. Guardar en frigorífico a 2-8°C.

Tris1M pH 8

Tabla 19. Material mínimo necesario para la preparación disolución de TE.

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Resmas	Protección de la poyata
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
Probeta de 100 ml	Medición de Alcohol isoamílico
Frasco de 2.5l	Almacenamiento de la disolución
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Productos	
H ₂ Odd autoclavada	Para enrasar a 1 litro
Trizma base	121,1 g
EDTA 0.5 M pH8.0	2 ml

PROCEDIMIENTO

Antes de empezar, verificar que se dispone de todo el material y los productos de la Tabla 19.

1. Añadir 121.1g de Trizma base a 400 ml de agua (destilada y autoclavada) hasta que se disuelva totalmente.
2. Ajustar a pH = 8 con HCl concentrado y enrasar hasta litro con agua destilada y autoclavada
3. Etiquetar el frasco con el nombre, la concentración, la fecha y las iniciales de la persona que preparó la disolución.
3. Guardar en frigorífico a 2-8°C.

Alícuotas componentes del cóctel de amplificación y secuenciación:

Tabla 20. Material mínimo necesario para la preparación de alícuotas cóctel de amplificación.

ELEMENTOS NECESARIOS	UTILIZACIÓN
Utillaje general (en orden de uso)	
Bata	Protección personal
Guantes de nitrilo	Protección personal
Resmas	Protección de la poyata
Destilador de agua	Obtención de H ₂ Odd
Autoclave	Esterilización de H ₂ Odd y frasco
tubo de 1.5ml estéril	Alícuotas MgCl ₂ , dNTPs y tampón 10X
tubo de 0.5ml estéril	Alícuotas Taq polimerasa
Cinta blanca	Etiquetado de las disoluciones
Rotulador	Etiquetado de las disoluciones
Pipetas electrónicas	Pipeteado de soluciones
Productos	
MgCl ₂ 25mM	Preparar alícuotas de trabajo
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Preparar alícuotas de trabajo
Tampon 10X	Preparar alícuotas de trabajo
Taq polimerasa	Preparar alícuotas de trabajo
Primers	Preparar alícuotas de trabajo
H ₂ Odd autoclavada	Diluciones de primers

PROCEDIMIENTO

-Alícuotas de *MgCl₂*

Pipetear en un tubo de 1.5ml estéril 150µl de MgCl₂ 25mM del tubo stock. Cada tubo de Perkin Elmer da para unas 10 alícuotas de 150µl. Guardar en el congelador.

-Alícuotas de *dNTPs*

Pipetear en un tubo de 1.5 ml estéril igual cantidad de cada uno de los nucleótidos (A, T, C, G). Es aconsejable hacer alícuotas para usar solo una vez o dos (para descongelar pocas veces). Guardar en el congelador.

-Alícuotas de *TAMPON 10X*

Pipetear en un tubo de 1.5ml estéril 150µl de tampón 10X del tubo stock. Cada tubo de Perkin Elmer da para unas 10 alícuotas de 150µl. Guardar en el congelador.

-Alícuotas de *Taq polimerasa*

Algunos tubos de Taq polimerasa están especialmente diseñados para hacernos gastar mucho más enzima del necesario. Por tanto, hay que hacer alícuotas de Taq en tubos de 0.5ml, que ofrecen mucha mejor visibilidad y facilidad de pipeteo.

Pipetear unos 15µl de Taq polimerasa en tubos de 0.5 ml. Realizar las alícuotas rápidamente para evitar el deterioro de la Taq polimerasa. Guardar en el congelador.

-Alícuotas de *Primers amplificación*.

Pipetear en un tubo de 1.5ml estéril 40µl de la solución stock de cada uno de los primers (100mM) y 10µl de H₂Odd autoclavada para lograr tener una solución de trabajo a 20µM. Preparar unas 10 alícuotas de 50µl de cada uno de los primers. Guardar en el congelador a -20°C.

-Alícuotas de *Primers secuenciación*.

Pipetear en un tubo de 1.5ml estéril 30µl de la solución de trabajo de cada uno de los primers de amplificación (20µM) en 10µl de H₂Odd autoclavada para lograr una concentración final de 5 pmol

BIBLIOGRAFÍA (REVISAR Y ORDENAR ALFABÉTICAMENTE)

- Cabrera García, N. et al (2005).** Creación de un Banco de ADN para la Flora Canaria. II Congreso de Biología de La Conservación de Plantas. 21-23 de Septiembre de 2005. Jardín Botánico Alántico (Gijón).
- Caujapé-Castells, J. et al (2006).** El Banco de ADN de la flora canaria: creación, progresos y líneas futuras de desarrollo. Bot. Mac. 26, en prensa.
- Chase MW, Hills HH (1991).** Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for ADN studies. Taxon 40: 215-220.
- Doyle and Doyle.** Phytochem. Bull. 19: 11—15 (1987);
- United Nations Educational, Scientific and Cultural organization** (www.unesco.org/mab).
- Gran Canaria: Reserva Mundial de la Biosfera.**
(http://www.grancanaria.com/patronato_turismo/fileadmin/PDF/grancanaria_reserva_biosfera.pdf)
- Hebert, P.D.N, et al, (2003).** “Barcoding animal life; cytochrome C oxidase (ADNmt) subunit 1 divergences among closely related species” Proc. Royal Society London B270: 596-599.
- Kress, W.J. et al. (2005).** Use of ADN barcodes to identify flowering plants. PNAS, vol. 102, nº 23. 8369-8374.
- Martín J.L., M. Marrero, N. Zurita, M. Arechavaleta & I. Izquierdo. (2005).** Biodiversidad en gráficas. Especies Silvestres de las Islas Canarias. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias, 56 pp.
- McKersie BD, Senaratna T, Walker MA, Kendall EJ, Hetherington PR (1988)** Deterioration of the membrane during aging in plants: evidence for free radical mediation. In Noodeon LD, Leopold AC (eds) Senescence and aging in plants, pp. 441-464. Academic Press, San Diego.
- Ministerio de Medio Ambiente de Colombia, la FAO y la UICN. (1997).** Primer congreso Latinoamericano de Parques Nacionales y otras áreas protegidas. Santa Marta, Colombia (21-28 Mayo, 1997). Taller sobre Reservas de Biosfera UNESCO-MaB. (27 y 28 de mayo de 1997) Marta, Colombia.
- Mummenhoff, K. et al. (1997).** Molecular phylogenetics of *Thlaspi* s. l. (Brassicaceae) based on chloroplast ADN restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal ADN. Can.J.Bot 75: 469-482.
- Naranjo Suárez, J. et al (2004)** Atlas de la Flora de Gran Canaria. Bot. Macaronésica 25: 189-196 (2004).
- Palmer, et al. (1989).** Ann. Miss. Bot. Gard. 75: 1180—1206
- Programa de la iniciativa europea INTERREG IIIB Açores-Madeira-Canarias 2000-2006.**
- Proyecto BIOMABANC:** Bancos de la biodiversidad de la flora Macaronesica (Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo”-Unidad Asociada CSIC, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, el Jardín Botánico de Madeira y la Universidad de Açores).
- Savolainen V, Cuénoud P, Spichiger R, Martínez MDP, Crèvecoeur M, Manen JF (1995)** The use of herbarium specimens in ADN phylogenetics : evaluation and improvement. Pl Syst. Evol. 197: 87-98.
- Scott ME, Possingham JV (1983)** Changes in chloroplast ADN levels during growth of spinach leaves. J. Exp. Bot. 34: 1756-1767.
- Saghai-Marroof et al., PNAS 81: 8014—8018 (1984);**
- Santiago Karez, C. et al. (1998).** Las Reservas de Biosfera y el rol de la investigación científica. Revista de La Asociación Peruana de Ecología.
- Suárez Mayorga, A. M. (2001).** Uso de tecnologías de información en el monitoreo de la Biodiversidad para el establecimiento y la conservación de áreas protegidas. Arango N. (ed) Memorias V Congreso Interno Instituto Alexander von Humboldt. 229p.

ANEXOS

ANEXO 1.

Material fungible (químico y no químico) utilizado en la amplificación y secuenciación del ADN

PRODUCTO	FABRICANTE	REFERENCIA	CANTIDAD	T°C	USO
Fungible no químico y utillería inespecífica					
Bata laboratorio					
Botella de vidrio de 0.5L					Almacenamiento SEVAG
Botella de vidrio de 0.5L					Almacenamiento TE Stock
Botella de vidrio 0.5mL					Almacenamiento Etanol al 70%
Botella de vidrio 1L					Almacenamiento EDTA 0.25M
Botella de vidrio de 2.5 L					Almacenamiento de CTAB
Cajas de cartón	SARSTEDT				Almacenamiento 100 tubos rosca 1.5mL
Cinta blanca	SIGMA	L-8394	5 uds	TA	Marcaje
Cinta de autoclave	SIGMA	A2549-6EA	6 uds	TA	Autoclavado
Contenedores homologados residuos líquidos (25L)				TA	Eliminación residuos tóxicos
Contenedor homologado residuos sólidos (30L)				TA	Eliminación residuos tóxicos
Contenedor homologado residuos sólidos (60L)				TA	Eliminación residuos tóxicos
Cubetas desechables para el biofotómetro (Uvette)	Eppendorf	952-01-005-01	80uds	TA	Cuantificación ADN
Cubetas electroforesis (10 pocillos)	ECOGEN	-----	1	TA	Geles de Agarosa
Cubetas electroforesis (40 pocillos)	ECOGEN				Geles de Agarosa
Cubetas electroforesis (108 pocillos)	ECOGEN				Geles de Agarosa
Cubetas electroforesis (40 pocillos)	FISHER				Geles de Agarosa
Erlenmeyer					
Espátula					
Filtros para máscara de seguridad					
Fiambarrera de plástico					Almacenamiento Bromuro de Etidio
Frasco pequeño opaco					Almacenamiento stock Bromuro Etidio
Gafas para luz UV					Fotografía de geles de agarosa
Gradillas para tubos hasta 40 mm Ø	AISI	0191004024	24 tubos	TA	Extracción a gran escala
Gradillas para tubos de 0.2ml					
Gradillas para tubos 1.5 ml					
Guantes de nitrilo					Protección personal
Guantes ignifugos					
Imán magnético agitación					
Máscara de seguridad					Protección personal
Mano de mortero					
Matraz aforado					
Morteros de porcelana					

Nivel					
Láminas para el sellador térmico	Eppendorff				Amplificación ADN
Papel higiénico					
Papel de aluminio					
Placas 96 pocillos	Eppendorf	0030- 127-307	25 placas	TA	Amplificación DNA
Placas especiales para secuenciador ABI 3100					
Probeta 25 mL					
Probeta 10 mL					
Probeta 100 mL					
Probetas 250 mL					
Probeta 500 mL					
Probeta de 1L					
Puntas pipeta 0.1-10µl	MβP	3500	1000 und	TA	Dispensación de disoluciones
Puntas pipeta 0.5-10µl					
Puntas pipeta 0.5-200µl	MβP	3552	96 uds	TA	Dispensación de disoluciones
Puntas pipeta 10-100µl					
Puntas pipeta 100-1000µl	MβP	3580	1000 und	TA	Dispensación de disoluciones
Puntas pipeta 100-5000µl (sin filtro)	Eppendorf	2337	100	TA	Dispensación de disoluciones
Puntas pipeta 1000-5000µl (con filtro)	MβP	2180B	50 und	TA	Dispensación de disoluciones
Rack para 40 tubos autoclavable	NUNC	376589	10 unidades	TA	Extracción a gran escala
Recipiente hielo					
Resmas					
Rotuladores indelebles					Marcaje
Temporizador					
Termómetro					
Tubos 0.2 ml	ECOGEN	Z316121	1000 uds	TA	Amplificación DNA
Tubos 0.5mL					
Tubos 1.5ml	ECOGEN	505-FT-Q	500 uds	TA	Usos varios
Tubos rosca 1.5mL	SARSTEDT				Almacenamiento alícuotas Banco ADN
Tubos 50 ml					Extracción DNA a gran escala
Vasos de precipitado 250 mL					
Vasos de precipitado 1L					
Vaso precipitado 2L					

Fungible químico

Agua bidestilada					
Alcohol Isoamil (3-Methylbutanol)	SIGMA	I-9392	500 ml	TA	Extracción
Agarosa estándar (Grado Biología Molecular)	AG-200	ECOGEN	25g	TA	Elaboración de geles de agarosa
Acetato sódico (3M)	SIGMA	S2404	100mL	TA	
Acético ácido					
Azul de Bromofenol	MERCK	8122	5g	TA	Geles de agarosa (Jugo azul)
BIG DYE Terminator Sequencing kit v3.1	APPLIED BIOSYSTEMS	4337455	100 rxns	-20°C	Secuenciación de ADN
Bórico ácido	PANREAC	141015	1 Kg	TA	
Bovine serum albumin	ROCHE	711454	20mg/ml	-20°C	
Bromuro de Etidio	SIGMA	E-7637	1 g	TA	
Cebadores o primers	SIGMA	-----	3 OD	-20°C	Amplificación de ADN
Cebadores (líoofilizados)	DIAGNOST	-----	3 OD	TA	Amplificación de ADN
Clorhídrico ácido (37%)	PANREAC	471020	1 l	TA	Ajuste de pH
Cloroformo	SIGMA	C-2432	500 ml	TA	Extracción ADN (CTAB-2X)
Cloruro sódico	SIGMA	S 9888	500 g	TA	
CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide)	SIGMA	H-6269	1Kg	TA	Extracción ADN (CTAB-2X)
EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)	SIGMA	E-5134	1 Kg	TA	Extracción ADN (CTAB-2X), TE
Etanol absoluto	PANREAC	161086.1211	1 l	TA	Extracción ADN (CTAB 2X)
Formamida	APPLIED BIOSYSTEMS	4311320	100 rxns	-20°C	
Gel Loading Solution	SIGMA	G-2526	5mL	TA	
GFX PCR ADN and gel Band purification Kit	AMERSHAM	27-9602-01	100 columnas	TA	Limpieza del ADN
Glicerina					Electroforesis de ADN (Jugo azul)
Hidróxido sódico	PANREAC				Ajustar PH
Isopropanol (2-propanol)	SIGMA	I-9516	500 ml	TA	Extracción ADN (CTAB 2X)
Kit de purificación GEN ELUTE PCR	SIGMA	NA 1020	70 columnas.	TA	Limpieza del ADN
Kit de purificación CENTRI SEP (spin columns)	PRINCETON SEPARATIONS	CS-901	100 columnas.	TA	Limpieza del ADN
Kit de purificación PCR (QUIAQUICK)	QIAGEN	28106	250 columnas.	TA	Limpieza del ADN
Lauryl sulfate (SDS)	SIGMA	L-3771	100 g	TA	
Mastermix para amplificación de DNA	SIGMA				Amplificación de ADN
Mastermix para amplificación de DNA	ABGENE				Amplificación de ADN
2-Mercaptoethanol	SIGMA	m-7154	100 ml	TA	Extracción ADN (CTAB 2X)
MgCl ₂	PROMEGA	M1861	750µl	-20°C	Cóctel de amplificación (manual)
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP a 10mM)	PERKIN ELMER	N808-007	320 µl de c/u	-20°C	Cóctel de amplificación (manual)
PCR "master mix" (2.5mM MgCl ₂)	ABGENE	AB- 0619/a	80 rxns	-20°C	
PCR 100bp Low Ladder	SIGMA	P143	100 µL	2-8°C	Marcador de tamaño en geles de agarosa
REDTaq™ ReadyMix™	SIGMA	R2523	100 rxns	-20°C	Amplificación de ADN
Sigma 7-9	SIGMA	T-1378	5 Kg	TA	Tampón de electrodo para gel de agarosa
Silica gel (grade 12, 28-200 mesh) blanco??	SIGMA	214396	5 Kg	TA	Secado rápido y conservación de muestras

Otros silica gel (rojo...)						Secado rápido y conservación de muestras
Sodio hidróxido	PANREAC	131687	1 Kg	TA		Ajuste de pH de disoluciones
Tampón 10X	PROMEGA	M1861	750µl	-20°C		
Taq polimerasa (5units/µL)	PROMEGA	M1861	100U	-20°C		Cóctel de amplificación (manual)
Taq polimerasa (5units/µL)	SIGMA	D4545	100 u	-20°C		Cóctel de amplificación (manual)
Trizma base (Tris)	SIGMA	T-1503	5 Kg	TA		Elaboración de disoluciones
Silica gel blanco						
Nitrógeno líquido						
Aceite mineral						

ANEXO 2.

Material inventariable utilizado en la amplificación y secuenciación del ADN

APARATO	MODELO	FABRICANTE
MICROCENTRÍFUGA (Tubos 1.5ml)	Microfuge 18 Centrifuge	Beckman Coulter
CENTRÍFUGA (Tubos 50ml)	Beckman JS 7.5	Beckman Coulter
ADAPTADORES DE DIFERENTES TUBOS PARA LA CENTRIFUGA		
TERMOCICLADOR	Mastercycler ep	Eppendorf
TERMOCICLADOR	Mastercycler gradient	Eppendorf
BIOFOTÓMETRO	Biofotometer	Eppendorf
SELLADOR TÉRMICO PARA PLACAS	Heat Sealer	Eppendorf
SELLADOR TÉRMICO PARA BOLSAS DE MUESTREO		
VÓRTEX	Reax 2000	Heidolph
BAÑO CALEFACTOR	Unitronic-320	P-Selecta
AGITADOR MAGNÉTICO	Are (Heating magnetic stirrer)	Velp Scientifica
MICROONDAS	LG 800W	LG
BALANZA	TR 602	Cobos precision
MICROPIPETAS	Eppendorf Pro Research	Eppendorf
HOMOGENIZADOR AUTOMÁTICO	Mixer mill 300	Retsch
Pipeta de 0.5-10 µL		
Pipeta de 10-100 µL		
Pipeta de 100-1000 µL		
Pipeta de 1000-5000 µL		
BALANZA DE PRECISIÓN		
MÁQUINA DE HIELO ESCARCHADO		
ETIQUETADORA		
BLOQUES PARA 10 TUBOS MIXER MILL		Retsch
DESTILADOR DE AGUA	MiliQ	
DESTILADOR DE AGUA	Elix 3	
Recipientes metálico de 50 mL Mixer mill		Retsch
SECUENCIADOR ABI 3100		
Bolitas para tubos de 1,5 ml mixer mill		Retsch
Bola metálica grande		Retsch
FUENTES ALIMENTACIÓN	PS 503	Apelex
AUTOCLAVE	Clinoclav-M	Raypa (Sterilmatic)
PH-METRO	pHmeter Basic 20	Crison
ESTUFA (de sobremesa)	P-selecta	P-selecta
CAMPANA EXTRACTORA DE GASES	R-S-900	Burdinola
CONGELADOR -20°C	****	Eurofred
FRIGORÍFICO 4-8°C	****	Corbero
ULTRACONGELADOR -80°C	-86°C Freezer	Forma Scientific
Cámara Fotos para Luz Uv		
TRANSILUMINADOR UV		
Campana para cámara		
AGITADOR		
Termobloque eppendorff		
Cámara UV		
Agitador orbital para tinción en BrEt		
DISPENSADOR DE VOLUMEN CON EMBOLO		
IMPRESORA		Etiquetas

ANEXO 3

Listado de científicos que integraron el grupo de discusión en la “1ª Reunión del Plant Working Group” del consorcio para el Código de Barras de la Vida, en Febrero de 2004. La sesión fue moderada por Robyn Cowan (del Jodrell lab del Jardín Botánico de Kew) y por Santiago Madriñán (de la Universidad de Colombia). Los nombres marcados con un asterisco corresponden a científicos que no pudieron asistir.

Nombre	Institución
Gabriel Ameka	University of Ghana (Ghana)
Ken Cameron	NY Botanical Garden (USA)
Mark Carine	NHM London (Reino Unido)
Juli Caujapé-Castells	Jardin Botánico Canario “Viera y Clavijo” (España)
Mark Chase	RBG Kew (Reino Unido)
Tracy Commock	Institute of Jamaica (Jamaica)
Ferozah Conrad	South African National Biodiversity Institute (Sudáfrica)
Robyn Cowan	RBG Kew (Reino Unido)
Hugh Cross	National Herbarium Nederland, Leiden (Holanda)
Mike Fay	RBG Kew (Reino Unido)
Felix Forest	South African National Biodiversity Institute (Sudáfrica)
Birgit Gemeinholzer	Botanic Garden Berlin-Dahlem (Alemania)
Mary Gibby	RBG Edinburgh (Reino Unido)
Kerstin Gonda	Forensic Institute, Bavaria (Alemania)
Winnie Hallwachs	Univ. Pennsylvannia (USA)
Pete Hollingsworth	RBG Edinburgh (Reino Unido)
Chris Humphries	NHM London (Reino Unido)
Daniel Janzen	Univ. Pennsylvannia (USA)
John Kress	Smithsonian Institution (USA)
Pat Lee	University of Wales, Swansea (Reino Unido)
Santiago Madriñán	Universidad de los Andes (Colombia)
Bob Magill*	Missouri Botanical Garden (USA)
Tom Meagher	Univ. St. Andrews (Reino Unido)
Eimear Nic Lughadha	RBG Kew (Reino Unido)
Gitte Peterson	Institute of Biology (Dinamarca)
Ole Seberg	Institute of Biology (Dinamarca)
Pierre Taberlet	Université Joseph Fourier (Francia)
Cassio van den Berg	Alemania
Michel Veuille*	NMNH Paris (Francia)
Johannes Vogel*	NHM London (Reino Unido)
Ken Wurdack	Smithsonian Institution (USA)
Aron Fazekas	Univ. Guelph (Canadá)
Steven Newmaster	Univ. Guelph (Canadá)