



**Secretaría de Posgrado**  
Facultad de Ciencias Agrarias - UNR

## DOCTORADO EN CIENCIAS AGRARIAS

### **“Técnicas de Biología Molecular para el estudio del genoma vegetal” -2022-**

#### **Cuerpo docente**

**Coordinador:** Dra. Juliana Stein

#### **Docentes**

Dra. Ma. Amalia Chiesa  
Dra. Luciana Delgado  
Dra. Maricel Podio  
Dra. Valeria Perotti  
Dra. Lorena Siena

**Carga Horaria:** 30 horas

#### **Modalidad de aprobación**

Asistencia al 80% de las clases. Examen final presencial. El mismo consistirá en la interpretación y resolución de un caso práctico que será analizado en grupo de dos personas.

#### **Destinado a**

-Graduados de las carreras de Ingeniería Agronómica, Lic. en Recursos Naturales, Lic. en Biotecnología, Bioquímica, Lic. en Genética u otras afines.  
-Estudiantes de doctorados o maestrías relacionados con las ciencias biológicas.

#### **Objetivo general**

Este curso tiene como objetivo presentar una visión práctica de las técnicas de biología molecular utilizadas actualmente de rutina cuando se estudian los genomas de las plantas superiores.

#### **Objetivos específicos en términos de habilidades a adquirir por parte de los estudiantes**

Nos proponemos que al finalizar el cursado los estudiantes hayan:

- comprendido los conceptos básicos y metodológicos de las técnicas de biología molecular que permiten estudiar el genoma vegetal.
- adquirido destreza en el manejo del equipamiento y en la manipulación de muestras biológicas en el laboratorio.
- desarrollado habilidad en el análisis de resultados y pensamiento crítico frente a diferentes situaciones prácticas.

### **Metodología de la enseñanza**

El curso se estructura en 7 (siete) sesiones teóricas de dos horas cada una, dictadas por docentes investigadores especialistas en las áreas abordadas. Las clases teóricas se dictarán con el apoyo de presentaciones de PowerPoint, vídeos y el uso de programas de procesamiento de datos. Además se organizarán 7 (siete) sesiones de Actividades Prácticas: a) 3 (tres) clases de laboratorio y b) 4 (cuatro) clases prácticas: una de bioinformática, dos de discusión de casos bibliográficos y una de discusión integradora.

### **Programación de Contenidos**

#### **Técnicas de Biología Molecular para el estudio del genoma vegetal**

#### **Unidad 1: Introducción al estudio de los genomas vegetales.**

Características particulares del genoma de plantas superiores. El ADN y los cromosomas. Centrómeros y telómeros. Organización de los genes en el genoma nuclear. Genoma de cloroplastos y de mitocondrias. Mutaciones. Banco de mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Genotipado.

**Unidad 2: Técnicas de extracción y purificación de ADN vegetal.** Tipos de muestras biológicas. Métodos: CTAB, Dellaporta, comerciales. Electroforesis de ácidos nucleicos. Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría. Índice de pureza.

**Unidad 3: PCR.** PCR estandar y cuantitativa. Diseño de cebadores. Uso de herramientas informáticas.

**Unidad 4: Genómica.** Secuenciación de ADN. Métodos. Bioinformática: principios necesarios para comprender los fundamentos teóricos del análisis bioinformático, ejemplos de análisis específicos utilizando software web de libre acceso y bases de datos disponibles públicamente.

**Unidad 5: Clonado de genes vegetales en *E. coli*.** Vectores, enzimas de restricción, ligasas, transformación bacteriana, minipreparaciones plasmídicas.

**Unidad 6: Marcadores moleculares.** Técnicas de obtención de marcadores moleculares basados, en PCR y en secuencia (SNPs, GBS). Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal, al estudio de caracteres de interés y en filogenia.

**Unidad 7: Herramientas para un genotipado dirigido.** PCR alelo-específica (ASP y ASQ). Análisis de secuencias polimórficas amplificadas y digeridas (CAPS y dCAPS). Análisis de curvas de melting de alta resolución (HRMA). Descripción general de cada técnica. Análisis comparativo. Ejemplos de aplicación.

#### **Clases de Laboratorio:**

**1º Sesión:** Extracción y purificación de ADN genómico a partir de dos genotipos de *Arabidopsis Thaliana*, obtenidos de un banco de germoplasma TAIR. Método de Edwards.

**2º Sesión:** Genotipado de las líneas mediante PCR.

**3º Sesión:** Visualización de los productos de PCR en gel de agarosa. Elaboración de Informe de los resultados obtenidos.

### **Clases Prácticas:**

**1) Bioinformática:** uso de programas y herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. Bases de datos. Diseño de cebadores para PCR.

**2-3) Clonado de genes vegetales en bacterias / Marcadores moleculares / Genotipado dirigido:** ejemplos bibliográficos, discusión grupal e interpretación de resultados.

**4) Discusión general integradora:** se plantearán interrogantes que surgen durante los proyectos de investigación y se intentará su resolución individual y/o grupal.

### **Bibliografía relacionada**

- Barrantes-Santamaría W et al. (2018) Detection of the Trp-2027-Cys Mutation in Fluazifop-P-Butyl-Resistant Itchgrass (*Rottboellia cochinchinensis*) Using High-Resolution Melting Analysis (HRMA). *Weed science* 66(3): 286-292.
- Brown TA (2010) *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. 6th edition. Blackwell Publishing.
- Brown T (2008) *Genomas*. 3a edición. Ed. Médica Panamericana.
- Chiesa MA et al. (2017) Molecular mapping of the genomic region conferring resistance to soybean stem canker in Hutcheson soybean. *Mol. Breeding* 37:65 (DOI 10.1007/s11032-017-0660-6).
- Choudhuri Supratim (2014) *Bioinformatics for Beginners: Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools*. Book. Ed. Academic Press. ISBN: 9780124104716.
- Ausubel FM et al. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. Copyright © John Wiley & Sons, Inc.
- Edwards K et al. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349.
- Dellaporta SL et al. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Gutiérrez-Hernández et al. (2009) Comparación molecular de la identidad genética de genotipos de maíz de diferente edad. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 01-09. ISSN: 1021-7444.
- Healey et al. (2014) Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods* 10:21.  
<http://www.plantmethods.com/content/10/1/21>.
- <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/301>

- <http://www.gramene.org/>
- [http://www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <https://www.arabidopsis.org/>
- <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
- <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- Källén et al. (1997) *A Laboratory Manual. Plant molecular Biology*. Springer Verlag. Berlin Heidelberg. 1° ed.
- Kaundun, SS et al. (2012). Broad resistance to ACCase inhibiting herbicides in a ryegrass population is due only to a cysteine to arginine mutation in the target enzyme. *PLoS One* 7(6): e39759.
- Lee HB et al. (2016). Allele-specific quantitative PCR for accurate, rapid, and cost-effective genotyping. *Human gene therapy* 27(6): 425-435.
- Little, S. (1995). Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Current protocols in human genetics* 7(1), 9-8.
- Lodish et al. (2016) *Molecular Cell Biology*, 8° Edition, Freeman and Company, New York, USA.
- Permingeat HR et al. (1998) A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 1-6.
- Saghai-Marroof MA et al. (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81: 8014-8018.
- Sahu et al. (2012) DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. Article ID 205049, 6 pages doi:10.5402/2012/205049.
- Sambrook J et al. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2° de. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shi et al. (2012) An Improved Chloroplast DNA Extraction Procedure for Whole Plastid Genome Sequencing. *PLoS ONE* 7(2): e31468. doi:10.1371/journal.pone.0031468.
- Shibata D & Liu YG (2000) Technical Focus-Agrobacterium-mediated plant transformation with large DNA fragments. *Trends in plant science* 5(8): 354-357.
- Stein J et al. (2014) Construcción de un mapa genético preliminar de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Ciencias Agronómicas* Número XXIII – Año 14: 7-15.
- Vu et al. (2010) A simple, high throughput method to locate single copy sequences from Bacterial Artificial Chromosome (BAC) libraries using High Resolution Melt analysis. *BMC Genomics* 11:301.
- Xu Y (2010) *Molecular plant Breeding* (CAB International).