

Extracción *in situ* de ADN genómico para el análisis por PCR de regiones de interés en cuatro especies vegetales y un hongo filamentososo

Luis E. Rojas^{1*}, Maritza Reyes¹, Naivy Pérez-Alonso¹, María I. Olóriz¹, Laisyn Posada-Pérez¹, Bárbara Ocaña¹, Orelvis Portal², Borys Chong-Pérez¹, Jorge L. Pérez Pérez *Autor para correspondencia

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: luis@ibp.co.cu

²Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuaria, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara, Cuba. CP 54 830.

RESUMEN

Los métodos de extracción de ADN genómico son generalmente trabajosos y peligrosos para la salud humana y el medio ambiente por el uso de solventes orgánicos (cloroformo y fenol). En este trabajo se valida un protocolo de extracción *in situ* de ADN genómico por lisis alcalina. Se empleó con el objetivo de amplificar regiones del ADN en cuatro especies de plantas y de un hongo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó material vegetal de *Saccharum officinarum* L., *Carica papaya* L., *Digitalis purpurea* L. de los cuales se logró extender diferentes regiones del genoma a través de PCR. Fue posible amplificar un fragmento del gen *avr-4* de ADN purificado a partir de micelio liofilizado de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Adicionalmente, se logró amplificar la región del transgen *ap24* insertado en el genoma de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA).

Palabras clave: *Carica papaya* L., *Digitalis purpurea* L., lisis alcalina, *Musa*, *Saccharum officinarum* L.

In situ genomic DNA extraction for PCR analysis of regions of interest in four plant species and one filamentous fungi

ABSTRACT

The extraction methods of genomic DNA are usually laborious and hazardous to human health and the environment by the use of organic solvents (chloroform and phenol). In this work a protocol for *in situ* extraction of genomic DNA by alkaline lysis is validated. It was used in order to amplify regions of DNA in four species of plants and fungi by polymerase chain reaction (PCR). From plant material of *Saccharum officinarum* L., *Carica papaya* L. and *Digitalis purpurea* L. it was possible to extend different regions of the genome through PCR. Furthermore, it was possible to amplify a fragment of *avr-4* gene DNA purified from lyophilized mycelium of *Mycosphaerella fijiensis*. Additionally, it was possible to amplify the region *ap24* transgene inserted into the genome of banana cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA).

Key words: alkaline lysis, *Carica papaya* L., *Digitalis purpurea* L., *Musa*, *Saccharum officinarum* L.

INTRODUCCIÓN

Los métodos de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) han evolucionado desde protocolos manuales extremadamente largos y fatigosos hasta los llamados kit de extracción que son cómodos y rápidos para el que los ejecuta. Estos sistemas de extracción tienen la desventaja de ser costosos y por ello cuando se necesita hacer estudios moleculares a elevadas cantidades de muestras, los costos pueden llegar a ser prohibitivos. Por estos motivos muchos investigadores incursionan en protocolos más sencillos y de fácil ejecución como son

los llamados sistemas de extracción *in situ*. Estos tienen varias ventajas tales como: son rápidos y efectivos cuando se quiere extraer ADN de pequeñas muestras frescas o liofilizadas, no se necesita el uso de nitrógeno líquido ni el empleo de solventes orgánicos, en poco tiempo se pueden procesar gran número de muestras y el costo es mínimo (Xin *et al.*, 2003).

El protocolo utilizado en este trabajo fue referido por Xin *et al.* (2003). Estos autores lo aplicaron en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), algodón (*Gossypium arboreum* L.), musgo (*Polytrichum*

commune), *Arabidopsis* y pino (*Pinus* L.) con el objetivo de procesar grandes cantidades de muestras y se obtuvieron resultados satisfactorios en los PCR ejecutados posteriormente. Consta de un paso inicial de lisis alcalina con hidróxido de sodio y el detergente Tween 20. Posteriormente el pH de la solución se neutraliza con un tampón de Tris-HCl pH 2 y EDTA y así se logra el pH requerido para las reacciones de PCR. Este protocolo ha sido empleado por otros autores en diferentes especies vegetales (Pan, 2010; Hao *et al.*, 2011). Sin embargo, no se ha informado de su uso para la extracción de ADN de *Digitalis purpurea* L., ni en hongos.

Este trabajo persiguió como objetivo validar el protocolo de extracción de ADN *in situ* en cuatro especies vegetales y un hongo filamentoso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon hojas de plantas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) transformado con el gen *ap24* de tabaco que crecieron en casa de cultivo por tres meses, hojas de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) cv. 'B-4362' cultivadas durante cinco meses en vivero, plantas *in vitro* de papaya (*Carica papaya* L.) cv. 'Maradol rojo' en fase de multiplicación y plantas *in vitro* de *Digitalis purpurea* L. en fase de multiplicación.

Todas las plantas utilizadas procedían de material vegetal propagado por cultivo *in vitro* según los procedimientos establecidos en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP).

Cepa de hongo filamentoso

Se empleó micelio liofilizado de la cepa *Mycosphaerella fijiensis* Morelet CCIBP-Pf83 perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el protocolo propuesto por Xin *et al.* (2003). Se tomaron segmentos de 5 mm² de tejido fresco de cada una de las especies vegetales y del micelio liofilizado de *M. fijiensis* y se introdujeron en tubos de 200 µl. Posteriormente, se añadieron 50 µl del tampón A (100 mM NaOH, 2% Tween 20). Este tampón se prepara en el momento de utilizarse a partir

de las soluciones de NaOH 10 M y Tween 20 al 20%. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a 95°C y a continuación se añadieron 50 µl del tampón B (150 mM Tris-HCl pH 2, 2 mM EDTA), se mezclaron moderadamente para homogenizar los tampones A y B y se tomaron 2 µl de cada muestra para la reacción de PCR.

Condiciones de PCR

La reacción se realizó en un volumen total de 20 µl, que contenía 1X del tampón *Dream Taq*. (10X) (20 mM de MgCl₂, 200 µM de la mezcla de dNTPs, 0.4 mM de los cebadores específicos para cada región del genoma analizado) (Tabla 1) y 1U de la enzima polimerasa *Dream Taq* (5U µl⁻¹). Todos los ingredientes de la reacción provenían de Fermentas. Además, se incluyó en la reacción de PCR, 0.1% de BSA (m/v) y 1% de PVP 44 000 (m/v) para contrarrestar efectos inhibitorios en el PCR de diferentes compuestos comunes en los extractos crudos.

Las bandas obtenidas en el PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y posteriormente fueron visualizadas en un transiluminador ultravioleta previa tinción en solución de bromuro de etidio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el método de extracción empleado fue posible amplificar las regiones de interés en el genoma de cada uno de los materiales vegetales analizados y la cepa de hongo filamentoso (Figura 1).

Con la adición de 1% de PVP 44 000 (m/v) y 0.1% de BSA (m/v) se contrarrestaron los efectos inhibitorios en la reacción de PCR. En experimentos previos (datos no mostrados) estos compuestos no se utilizaron y la amplificación de las secuencias diana no fue efectiva. Esto se debe en general a que en los extractos crudos que se obtienen con los métodos de lisis alcalina existe una gran variedad de compuestos contaminantes que inhiben la acción de la enzima Taq polimerasa (Klimyuk *et al.*, 1993). Posteriormente, al añadir PVP y BSA en la reacción los resultados fueron los esperados (Figura 1). Estos resultados coinciden con los informados por Xin *et al.* (2003) en otros cultivos. Es un método de extracción fácil de ejecutar, reduce costos y permite monitorear regiones de interés en el genoma de diferentes especies. Con este protocolo no se utilizan

solventes orgánicos que son dañinos para la salud, se prescinde del uso de nitrógeno líquido, de equipamiento costoso y es posible culminar la tarea de extracción en 15 minutos por muestra.

Tabla 1. Cebadores utilizados para las regiones de interés del ADN genómico.

Cultivo	Secuencia del cebador	Región que amplifica
Banano 'Grande naine' (<i>Musa</i> AAA) transformado con el gen <i>ap24</i> de tabaco	5'-TAAACCACCAAACACCTTGGCTGAATACGC-3' F 5'-TTAGCCACTTCATCACTTCCAGGCATTTC-3' R	Transgen <i>ap24</i> de plantas de tabaco
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.) cv. 'B-4362'	5'- CCCTAAGGGTGACAGAAGCTGAT-3' F 5'- GTCCCTCTGTTGGGTTCACTAC -3' R	Región <i>NAM</i>
Plantas <i>in vitro</i> de papaya (<i>Carica papaya</i> L.) cv. Maradol rojo	W11 5'-CTGATGCGTGTGTGGCTCTA-3' F 5'-CTGATGCGTGATCATCTACT-3' R T1 5'-TGCTCTTGATATGCTCTCTG-3' F 5'-TACCTTCGCTCACCTCTGCA-3' R	Regiones <i>sex1</i> He y <i>sex1</i> H
Plantas <i>in vitro</i> de <i>Digitalis purpurea</i> L.	5'-CCC GGGATGTATACCGACACAACGAC-3' F 5'-CTGCAGTCAAGGGACAAATC-3' R	Región <i>P5BR2</i>
Micelio liofilizado de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	<i>AVR-4</i> 5'- TAACACTGCTCGCCACATTC-3' F 5'- GGACGATTCCCGTCGTATAA-3' R Cyt b intrón 5'- TCTTATTTTTCCGCTTGATTAGTAG-3' F 5'- GAGCATTTGTGTTGGTAGTCGC-3' R	Regiones <i>Cytb</i> y <i>AVR-4</i>

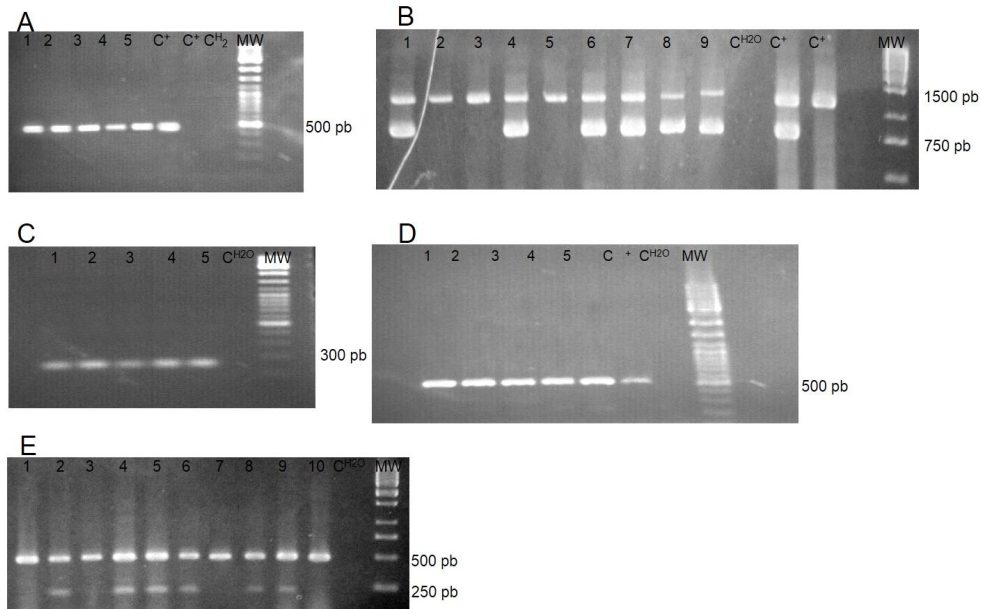


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. **A.** Bandas amplificadas correspondientes a un fragmento del gen *ap24* de tabaco en plantas transformadas de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA). **B.** Bandas amplificadas de las regiones *sex1* He y *sex1* H para determinar el sexo en plantas de *Carica papaya* L. cv. 'Maradol rojo' (dos bandas corresponden a las hermafrodita y una banda a las hembras). **C.** Bandas que corresponden al gen *NAM* en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) cv. 'B-4362'. **D.** Bandas amplificadas del gen *P5BR2* en *Digitalis purpurea* L. **E.** Bandas amplificadas que corresponden a los genes *Cyb* (500 pb) y *AVR-4* (250 pb) en *Mycosphaerella fijiensis*.

CONCLUSIONES

Se demostró que mediante el protocolo propuesto por Zim *et al.* (2003) fue posible realizar extracciones de ADN genómico por lisis alcalina para el análisis por PCR de regiones de interés en cuatro especies vegetales y un hongo filamentoso.

REFERENCIAS

Klimyuk, VI, Carroll BJ, Thomas CM, Jones JD (1993) Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant J.* 3: 493-494

Ma Hao, Congfeng Song, Wayne Borth, Diane Sether, Michael Melzer, John Hu (2011) Modified

expression of alternative oxidase in transgenic tomato and petunia affects the level of tomato spotted wilt virus resistance. *Biotechnology* 11: 96

Pan Yong-Bao (2010) Databasing Molecular Identities of Sugarcane (*Saccharum* spp.) Clones Constructed with Microsatellite (SSR) DNA Markers. *American Journal of Plant Sciences* 1: 87-94

Zhang Xin, Jeff PV, Melvin JO, John JB (2003) High-Throughput DNA Extraction Method Suitable for PCR. *BioTechniques* 34: 820-826

Recibido: 05-05-2014

Aceptado: 08-07-2014