

NOTA TÉCNICA - GENÉTICA

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE ADN DE HOJAS DE *Theobroma cacao* L. PARA ESTUDIOS DE GENÉTICA POBLACIONAL CON MICROSATÉLITES (STR)

Eva Chávez C.¹, Daniela Arteaga V.² & Marinés Giraldo C.

¹ Unidad Académica Campesina Tiahuanaco (UAC-T), Universidad Católica "San Pablo", La Paz, Bolivia.

² Centro de Investigación Genética, IITCUP, Universidad Policial, Policía Boliviana.

INTRODUCCIÓN

Las muestras obtenidas a partir de plantas están entre las más complejas para lograr una adecuada purificación de material genético de alta calidad, el cual es necesario para los subsecuentes análisis poblacionales o filogenéticos, como estudios de microsatélites o de secuencias. Además, en la mayoría de los casos, esto involucra el uso de nitrógeno líquido en el tejido, para luego molerlo utilizando un mortero; nitrógeno líquido que es difícil y riesgoso de manipular, incluso en laboratorio. Por esta razón, a continuación se presenta un protocolo simple para la obtención de ADN a partir de tejido foliar previamente desecado, en la consideración de que el ADN debe ser purificado previniendo su degradación y asegurando diferentes usos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Se colectaron muestras de hojas frescas y sanas de 262 plantas adultas de *T. cacao* L. (cacao Nacional Boliviano) a partir de 8 poblaciones de cacao cultivadas y 12 comunidades de cacao silvestre localizadas en el Norte del Departamento de la Paz (Bolivia): comunidades silvestres ubicadas en el cauce del Río Beni, el cauce del Río Madidi y el noroeste de La Paz, municipio de Guanay. Asimismo, también se analizaron muestras previa-

mente desecadas y conservadas en sílica gel durante un periodo de tres años proporcionadas por Wildlife Conservation Society (WCS). Finalmente, se incluyeron en la muestra hojas desecadas que presentan contaminación por hongos.

Extracción de ADN

Las muestras de hojas previamente colectadas fueron desecadas en sílica gel de la siguiente manera: una hoja de *T. cacao* L. colocada en papel absorbente introducida en una bolsa de cierre hermético (ziploc) con 10 g de sílica gel, en consideración de que por la alta humedad del ambiente de la zona de colecta, se realizaron al menos tres reemplazos de la sílica gel presente en las bolsas para asegurar el secado completo de las hojas.

Una vez que las hojas se encontraban completamente desecadas, se procedió a pulverizarlas en mortero con el fin de producir la lisis celular hasta obtener al menos 100 mg de un fino polvo, al que se añadieron 700 µl de buffer CTAB al 2% (20 g de CTAB, 10 g de PVP, 100 ml de 1M Tris-Cl pH 8,0; 40 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0, 280 ml de 5 M NaCl para un volumen final de 1000 ml) precalentado a 65 °C, de acuerdo al método propuesto por Borsch *et al.* (2003). Los tubos se incubaron a 65 °C durante 30 minutos realizando vórtex ocasionalmente, centrifugando posteriormente a 10.000 rpm durante 10 minutos, prosiguiendo una se-

gunda y tercera extracción con buffer CTAB después de la que se realiza una centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos recuperando el sobrenadante, al que se le añaden 700 μ l de la mezcla cloroformo y alcohol isoamílico (24:1). Después de mezclar vigorosamente, se incuba a 4°C durante 20 minutos, centrifugando a 12.000 rpm durante 10 minutos, de esta manera se obtiene tres fases: una superior acuosa, una intermedia con flóculos y proteínas, y otra inferior de cloroformo. Transferir cuidadosamente la fase superior a un tubo de 1,5 ml, añadiendo 1 volumen de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1). Una vez realizada la centrifugación, transferir cuidadosamente la fase superior a un nuevo tubo de 1,5 ml, al que se le añaden 0,08 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M frío y dos volúmenes de etanol al 95%, incubando después de una vigorosa mezcla a -20 °C durante 1 hora. Centrifugar a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Descartar cuidadosamente el sobrenadante evitando la pérdida del precipitado. Realizar un lavado con 500 μ l de etanol al 70%, centrifugando a 12.000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y retirando el exceso de etanol con un papel absorbente. Secar el precipitado de ADN y re-suspender en 50 μ l de agua ultra pura. Añadir 25 μ l de acetato de sodio 3M pH 5,5 y precipitar lavando con dos volúmenes de etanol absoluto. Mezclar vigorosamente e incubar a -20°C durante 30 minutos (la incubación también puede ser O.N.). Centrifugar a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, descartar cuidadosamente el sobrenadante para no perder el precipitado y dejar secar por 15 minutos a 65 °C. Re-suspender con 100 μ l de agua ultra pura.

La calidad del ADN extraído se verificó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se cuantificó en espectrofotómetro UV/visible a 260, 280 y 320 nm, determinándose el grado de dilución adecuado para cada muestra hasta alcanzar

una concentración final de 0,8ng/ μ L para posteriormente realizar el análisis de los extractos con tres marcadores microsátélites: CIR-33, CIR-37 y CIR-12 de acuerdo al protocolo propuesto por Lambert *et al.* (2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 262 muestras procesadas se obtuvo ADN apto para PCR de 248 hojas (94,66%). Cabe mencionar que los extractos obtenidos varían significativamente en cuanto a calidad y cantidad, encontrándose entre 17 y 260 ng/ μ l (Figura 1), observándose bandas relativamente intensas con poca degradación, lo que indica que el protocolo permite obtener ADN genómico intacto de muestras de tejido foliar, incluyendo muestras conservadas por un periodo de tres años. Por otro lado, de 15 de las 17 muestras que presentaban mala conservación, incluyendo la presencia de hongos, no se obtuvo material genético analizable, visualizándose óptimos resultados únicamente en dos muestras cuyo grado de contaminación era significativamente bajo.

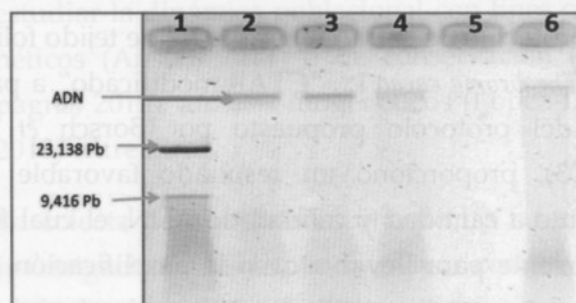


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, mostrando productos de extracción de ADN de *Theobroma cacao L.*

Así, de acuerdo a lo establecido en otros estudios, en que las concentraciones de ADN de tejido vegetal varían entre 30 y 1802 ng/ μ l con un promedio de 248 ng/ μ l, el protocolo propuesto recupera concentraciones de ADN que se acercan al promedio, aunque es claro que en muestras dañadas esta concentración puede ser menor (Chia, 2009;

Rosero, 2013), pero suficiente para realizar análisis de microsatélites (Figura 2). Por otro lado, el protocolo propuesto no se ve afectado por la alta tendencia a la fenolización del tejido foliar de cacao.

Por otro lado, la evaluación de los extractos de ADN obtenidos con los 3 marcadores microsatélites resultó en tres bandas de buena calidad y cantidad, separadas en función a su peso molecular (Figura 2).

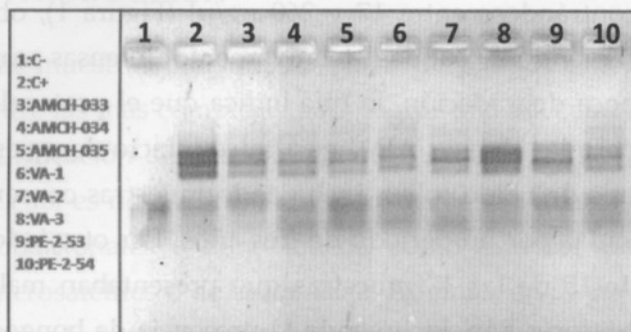


Figura 2. Electroforesis de los productos de amplificación de PCR multiplex para tres marcadores microsatélites: CIR-33, CIR-37 y CIR-12.

CONCLUSIÓN

El protocolo de extracción de ADN de tejido foliar de *Theobroma cacao* L., "CTAB modificado" a partir del protocolo propuesto por Borsch *et al.* (2003), proporcionó un resultado favorable en cuanto a cantidad y calidad de ADN, el cual fue suficiente para llevar a cabo la amplificación de marcadores microsatélites mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

AGRADECIMIENTOS

A Wildlife Conservation Society (WCS) por el trabajo desarrollado en la colecta de las muestras de tejido foliar y a Helvetas Swiss Cooperation por haber financiado la presente investigación.

REFERENCIAS

- Borsch, T.; Hilv, K.; Quandt, D.; Wilde, V., Neinhuis, C. & Barthlott, W. 2003. **Non-coding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well supported phylogeny of basal angiosperms.** *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 558 – 576.
- Chia, J. 2009. **Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo Maria.** (Tesis de Maestría). UNAS, Tingo Maria, PR.
- Lambert, A.; Dapeng, Z.; Pathmanathan, U.; Mischke, S.; Michel, B. & Stephen, P.. 2009. **Increasing Accuracy and Throughput in Large-Scale Microsatellite Fingerprinting of Cacao Field Germplasm Collections.** *Tropical Plant Biology*, 2: 23 – 37.