

## Aislamiento y purificación del ADN genómico del guayabo (*Psidium guajava* L.) para análisis molecular.

Narciso Nerdo Rodríguez<sup>1</sup>, Juliette Valdés-Infante Herrero<sup>1</sup>, Dieter Becker<sup>2</sup>, Bárbara Velázquez<sup>1</sup> y Wolfgang Rohde<sup>2</sup>.

1. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Ave. 7ma No. 3005 entre 30 y 32, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Telefax : (53-7) 246794, teléfono : (53-7) 293585. E mail: [iicit@ceniai.inf.cu](mailto:iicit@ceniai.inf.cu)
2. Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ), Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln, Germany

### INTRODUCCIÓN:

La presencia de polisacáridos y de muchos otros tipos de metabolitos secundarios que forman complejos insolubles con los ácidos nucleicos, influye negativamente en la extracción y calidad del ADN en algunos tipos de plantas. Guillermaut y Marechal-Drouard (1992) y Pandey *et al.* (1996) describieron lo difícil que resulta el aislamiento del ADN en diferentes frutales tropicales debido a esta problemática.

El objetivo del presente trabajo es establecer un protocolo de extracción que posibilite la obtención de ADN de buena calidad para la aplicación de marcadores moleculares en el guayabo (*Psidium guajava* L.).

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1- Material vegetal utilizado

Se colectaron hojas jóvenes de las accesiones de guayabo (*Psidium guajava* L.) N6, Suprema Roja, Belic L-207, y 3 plantas de Enana Roja Cubana; pertenecientes a la colección de germoplasma de Myrtaceae del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, localizada en Alquízar, La Habana. Estas muestras fueron conservadas a -20°C hasta su extracción o se emplearon en fresco o liofilizadas en algunos casos.

#### 2- Extracción y Purificación del ADN genómico.

En la tabla 1 se muestran los métodos de aislamiento y purificación de ADN y el tipo de material empleado.

Tabla 1. Métodos de extracción y Purificación empleados en las accesiones de guayaba (*Psidium guajava* L.).

	Protocolos de Extracción y Purificación de ADN	Tipo de material vegetal
1	Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde <i>et al.</i> (1995)	Fresco y liofilizado
2	Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde <i>et al.</i> (1995) + gradiente de CsCl	Fresco
3	Mini kit QIAGEN DNeasy para extracción de ADN en plantas (QIAGEN, 1999a)	Congelado a -20°C
4	QIAGEN para purificación de ADN genómico procedente de material foliar (las 2 opciones) (QIAGEN, 1995)	Congelado a -20°C

5	Murray y Thompson (1980) modificado por Lavi <i>et al.</i> (1991)	Congelado a -20°C
6	Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde <i>et al.</i> (1995). Buffer de extracción de ADN modificado por la adición de PEG <sub>6000</sub> (1%) y β-mercaptoetanol (50μl/20 ml). Se incluyeron además las siguientes enzimas (NOVOZYM): liticasa (2,5 mg/50 ml), enzimas de lisis (2,5 mg/50 ml), celulasa (1%), esterasa (1%), lipasa (1%), gluconasa (0,25%) individualmente y una mezcla de ellas.	Congelado a -20°C
7	Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde <i>et al.</i> (1995). Buffer de extracción de ADN modificado por la adición de PEG <sub>6000</sub> (1%), β-mercaptoetanol (50μl/20 ml) y celulasa (1%). Se probaron tres tiempos de incubación (0', 30' y 60')	Congelado a -20°C
8	<b>Doyle y Doyle (1990). Método del CTAB modificado por K. Aradhya (UC Davis) + Método NucleoSpin (Macherey &amp; Nagel, 2002)</b>	<b>Fresco</b>

3- Verificación de la calidad del ADN con la utilización de diferentes marcadores de ADN basados en la PCR.

Se utilizaron las siguientes técnicas de marcadores de ADN, bajo condiciones de reacción estándar, con cebadores de PCR marcados radioactivamente con P<sup>33</sup>: análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (AFLP; Vos *et al.* 1995) y Repeticiones de Secuencias Inversas Marcadas (ISTR; Rohde, 1996).

La secuencia de algunos cebadores empleados se muestra a continuación:

AFLP:

E32: GAC TGC GTA CCA ATT CAA C

M33: GAT GAG TCC TGA GTA AAA G

M36: GAT GAG TCC TGA GTA AAC C

ISTR:

B3: ATT CCC ATC TGC ACC AAT

F7A: TGC TAG GAC TTT CAC AGA

Se analizaron alícuotas de estas mezclas de reacción en un gel de secuenciación de poliacrilamida al 4%. Los fragmentos de ADN amplificados se revelaron autorradiográficamente.

4. Análisis de los datos.

Los autorradiogramas fueron visualizados para determinar la ausencia (0) o la presencia (1) de bandas polimórficas, con el objetivo de establecer un matriz binaria de datos moleculares.

Con todos estos datos se realizó un análisis de agrupamiento, basado en una matriz de distancias euclidianas, con el programa estadístico NTSYS (versión 2.1; Rohlf, 2001) suministrado por Eexeter (Setauket, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la tabla 2 se muestran todos los métodos de aislamiento y purificación de ADN y el resultado obtenido para cada caso.

Tabla 2. Métodos de aislamiento y purificación empleados en las accesiones de guayaba (*Psidium guajava* L.).

	Protocolos de Extracción y Purificación de ADN	Resultado de la extracción
1	Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde <i>et al.</i> (1995)	Rendimiento y calidad inferior a lo normal. ISTR(-)
2	Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde <i>et al.</i> (1995) + gradiente de CsCl	Poco ADN pero de buena calidad. ISTR(+)
3	Mini kit QIAGEN DNeasy para extracción de ADN en plantas ( <b>QIAGEN, 1999a</b> )	Poco ADN de baja calidad. ISTR(-)
4	QIAGEN para purificación de ADN genómico procedente de material foliar (las 2 opciones) ( <b>QIAGEN, 1995</b> )	Mejora un poco la calidad pero ISTR con éxito parcial.
5	Murray y Thompson (1980) modificado por Lavi <i>et al.</i> (1991)	Mejora un poco la calidad pero ISTR con éxito parcial.
6	Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde <i>et al.</i> (1995). Buffer de extracción de ADN modificado por la adición de PEG <sub>6000</sub> (1%) y β-mercaptoetanol (50μl/20 ml). Se incluyeron además las siguientes enzimas (NOVOZYM): liticasa (2,5 mg/50 ml), enzimas de lisis (2,5 mg/50 ml), celulasa (1%), esterasa (1%), lipasa (1%), gluconasa (0,25%) individualmente y una mezcla de ellas.	Bastante ADN de calidad aceptable pero no es reproducible la reacción con otras muestras. AFLP e ISTR (+)
7	Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde <i>et al.</i> (1995). Buffer de extracción de ADN modificado por la adición de PEG <sub>6000</sub> (1%), β-mercaptoetanol (50μl/20 ml) y celulasa (1%). Se probaron tres tiempos de incubación (0', 30' y 60')	Bastante ADN de calidad aceptable pero no es reproducible la reacción con otras muestras. AFLP e ISTR (+)
8	<b>Doyle y Doyle (1990). Método del CTAB modificado por K. Aradhya (UC Davis) + Método NucleoSpin (Macherey &amp; Nagel, 2002)</b>	ADN de buena calidad y concentración. AFLP, ISTR y SSR (+).

Con el protocolo del CTAB (Tabla 1, No. 1), se obtiene un ADN de buena calidad y concentración para el caso del coco y el mango y listo para usar en las técnicas basadas en la PCR, no siendo así para el caso de la guayaba donde el rendimiento y la calidad es significativamente menor y poco confiable, tanto para material fresco como liofilizado (Datos no mostrados).

A pesar de esto, se le realizó un ISTR al ADN purificado por este método. La reacción de PCR no mostró ningún producto de amplificación, obteniéndose resultados positivos sólo cuando estas muestras fueron purificadas adicionalmente por centrifugación en un gradiente de CsCl (Tabla 1, No. 2).

El material liofilizado no dio buenos resultados ni aún con esta purificación adicional (datos no mostrados), por lo que decidimos seguir trabajando con material en fresco o conservado a -20°C. Estos resultados coinciden con los obtenidos en coco y aguacate con material liofilizado.

Se decidió utilizar otros protocolos de extracción atendiendo a lo caro, tóxico y laborioso del procedimiento de la purificación con gradientes. Se probó el mini kit para aislamiento de ADN procedente de tejido vegetal (QIAGEN, 1999a; Tabla 1, No. 3) en hojas de guayaba. Nuevamente el análisis de ISTR falló al no observarse presencia de bandas amplificadas en el gel. Además, con las 2 opciones del método CTAB (Tabla 1, No. 4), sugeridas por QIAGEN (1995) y seguidas por una purificación con una columna de intercambio aniónico (QIAGEN Tip- 100; QIAGEN, 1999b), solo se obtuvo un éxito parcial (Fig. 2). Problemas similares fueron observados con el protocolo de Murray y Thompson (1980) modificado por Lavi *et al.* (1991)(Tabla 1, No. 5).

Con la adición de enzimas termoestables que rompen la pared celular al buffer de extracción CTAB (Tabla 1, No. 6, 7) los resultados mejoraron, ya que se obtuvo una amplificación satisfactoria al aplicar las técnicas AFLP e ISTR a 6 muestras de guayaba. No obstante, estos resultados no fueron reproducibles cuando se utilizaron otras muestras y se llegó a la conclusión que de los tres tiempos de incubación analizados, el tiempo 0 (no incubación) fue el mejor, ya que con más tiempo se extraen, junto con el ADN, toda una serie de inhibidores de la reacción de PCR.

Los mejores resultados se obtuvieron usando una modificación de la composición del buffer de extracción CTAB (K. Aradhya, comun. personal; Tabla 1, No. 8) en combinación con el kit NucleoSpin (Macherey & Nagel, 2002) para ADN de alto peso molecular

El ADN obtenido tuvo la concentración y la calidad requerida para aplicación de las técnicas de AFLP, ISTR y SSR.

En esta etapa se analizaron diferentes métodos de purificación de ADN para guayaba. Nuestros resultados demuestran que puede haber diferencias en la calidad y concentración del ADN entre los diferentes protocolos. El hecho de que el protocolo tan universal Doyle y Doyle (1990) modificado por Rohde *et al.* (1995; Tabla 1, No. 1), muy bueno para coco y mango, no trabajara con la misma eficiencia para guayaba, puede deberse a diferencias entre estos cultivos. Las hojas de guayaba son altamente sensibles a la oxidación producida por polifenoles (De la Cruz *et al.*, 1995).

Un problema mucho más serio es el extremadamente alto contenido de polisacáridos que co-precipitan con el ADN en los pasos de la purificación. Esto también fue reportado por Guillermaut y Marechal-Drouard (1992) y Pandey *et al.* (1996), quienes describieron como notablemente difícil el aislamiento de ADN de los frutales tropicales, debido a la gran cantidad de polisacáridos y muchos otros tipos de metabolitos secundarios que forman complejos insolubles con los ácidos nucleicos cuando se produce la lisis de las células durante la extracción.

La eficiencia del método del CTAB de Doyle y Doyle (1990) modificado por K. Aradhya (UC Davis), seguido por el kit NucleoSpin (Macherey & Nagel, 2002)

sobre todos los otros protocolos evaluados pudiera ser explicado por la composición del buffer de extracción. Este buffer es rico en compuestos antioxidantes tales como: ácido dietilditiocarbámico (DIECA), ascorbato de sodio y bisulfito de sodio. Es probable que estas sustancias desempeñen un papel importante en la prevención de la oxidación por fenoles y/o la consecuente acumulación del complejo polisacáridos/ácidos nucleicos. Todos nuestros resultados muestran que este método es el más confiable para el aislamiento de ADN de frutales tropicales que sean ricos en polisacáridos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aradhya, M.K. 2001. UC Davis, personal communication.
2. De la Cruz, M.; Whitkus, R. and Mota-Bravo, L. Tropical fruit tree DNA isolation and amplification. *Molecular Ecology*, 1995, vol. 4, p. 787-789.
3. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, vol. 12 p. 13-15.
4. Guillermaut, P. and Marechal-Drouart, L. Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1992, vol. 10, p. 60-65.
5. Lavi, U. *et al.*. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of avocado. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1991, vol. 116, p. 1078-1081.
6. Litt, M. and Luty, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, vol. 44, p. 397-401.
7. Macherey & Nagel. NucleoSpin<sup>R</sup> Extract 2 in 1 Protocol. Germany, 2002, p. 3-13.
8. Murray, M. G. and Thompson, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, p. 4321-4325.
9. Pandey, R. N.; Adams, R. P. and L. Flournoy, E. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1996, vol. 14, No.1, p. 17-22.
10. QIAGEN. Dneasy<sup>TM</sup> Plant Mini Handbook for DNA isolation from plant tissue. Germany, 1999a, p. 4-22.
11. QIAGEN. Genomic DNA Purification from Plant Leaves. Genomic PB. Germany, 1995.
12. QIAGEN. QIAGEN<sup>R</sup> Plasmid Purification Handbook. Germany. 1999b, p. 3-78.
13. Rohde, W. *et al.*. Genetic analysis of *Cocos nucifera* L. by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of *copia*-like *EcoRI* repetitive elements. *J. Genet. & Breed.*, 1995, vol. 49, p. 179-186.
14. Rohde, W. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *J. Genet & Breed.*, 1996, vol. 50, p. 249-261.
15. Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, p. 6463-6471.
16. Vos, P. *et al.*. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 1995, vol. 23, p. 4407-4414.

17. Weber, J. K. and May, P. E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993, vol. 44, p. 388-396.