

AISLAMIENTO DE ADN DE CALIDAD PARA LA AMPLIFICACIÓN AL AZAR DE ADN POLIMÓRFICO DE MANGO¹

ISOLATION OF DNA SUITABLE FOR THE RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA OF MANGO¹

Gustavo A. Saldaña* y Efraín G. Salazar*

¹ Trabajo financiado por el INIA y Fundacite- Aragua.

* Investigadores. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Edif. 09. Campo Experimental CENIAP. Unidad de Biotecnología Vegetal. Zona Universitaria, vía El Limón. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.
Email: gsaldana@inia.gob.ve, esalazar@inia.gob.ve

RESUMEN

Con la finalidad de caracterizar los distintos genotipos del Banco de Germoplasma de mango del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) a través de RAPD, fueron ajustadas las condiciones para la extracción de ADN nuclear a partir de tejido foliar. Se realizaron pruebas para calibrar el buffer de extracción, comparándose 4 soluciones de lisis y las condiciones iniciales de incubación del tejido macerado. De igual manera se hicieron pruebas factoriales de niveles de pesos de tejido foliar y volumen de buffer de lisis y las condiciones de precipitación del ADN, lavado del sedimento final y efecto de la liofilización en la resuspensión del sedimento de ADN. De los 4 protocolos distintos de extracción, se obtuvo una mayor cantidad de ADN con la metodología desarrollada por Doyle y Doyle. Los mejores resultados se obtuvieron macerando 250 mg de tejido foliar joven en 900 µl de tampón CTAB 2X con Tris Base calentado a 60 °C, e incubando el macerado por 1 hora a la misma temperatura. El almacenamiento de las muestras a -20 °C hasta el día siguiente mejoró la precipitación del ADN al agregar isopropanol 98% frío. La incubación del ADN a 37 °C con la solución de lavado (etanol 70%) permitió obtener sedimentos blancos. Finalmente la resuspensión del sedimento de ADN se mejora al liofilizar los tejidos a -50 °C durante 3 h. La metodología probó ser eficiente con las variedades de mango, *Mangifera indica* L., estudiadas, permitiendo extraer ADN genómico en concentraciones superiores a 350 ng/µl en todos los casos.

Palabras Clave: *Mangifera indica* L.; mango; ADN genómico; germoplasma; extracción.

SUMMARY

In order to genetically characterize the different genotypes of the Mango Germplasm Collection of the National Center for Agricultural Research (INIA-CENIAP) through RAPD, conditions for DNA isolation from leaf tissue were adjusted. Tests for calibrating buffer extractions were done by comparing four lysis solutions and the initial conditions for incubating macerated tissue. Test to obtain optimal leaf tissue:lysis buffer ratio were performed. Also, DNA precipitation conditions, DNA pellet washing solutions and effect of liophylization on DNA pellet resuspension were studied. Of the four DNA extraction protocols studied, higher amounts of DNA were obtained with the Doyle and Doyle (1990) methodology. Best results were obtained by macerating 250 mg of leaf tissue with 900µl 2X CTAB-TRIS base lysis buffer, preheated at 60 °C. All the solution was incubated at 60 °C for 1 hr. Storing macerate at -20 °C for 24 hrs increased DNA precipitation when using cold 98% isopropanol. Washing pellets at 37 °C with 70% ethanol produced white sediments. Finally, improvements of resuspension of DNA pellet in TE buffer occurred when tissues were liophylized at 50 °C for 3 hrs. Methodology proved efficient to isolate DNA from all the studied varieties. DNA concentration was higher than 350ng/µl in all cases.

Key Words: *Mangifera*; mango; DNA; germoplasma; DNA isolation.

RECIBIDO: mayo 27, 2005

ACEPTADO: agosto 07, 2007

INTRODUCCIÓN

El mango, *Mangifera indica* L., se cultiva en más de 100 países y en todos los continentes, siendo el área plantada superior a 4 millones de hectáreas y la producción para 2005 superior a 29 457 millones de toneladas de fruta, de las cuales Venezuela contribuye con alrededor de 74 540 tm (FAO, 2007). El mango es en el país, el cuarto frutal más importante, y existen condiciones propicias para competir en el mercado internacional a través de la exportación de variedades introducidas como Haden, Tommy Atkins, Smith y otras; e incluso variedades “criollas” como Manga de bocado, Rosita, Manzana, entre otras (Avilán *et al.*, 1992).

Dada la importancia tanto económica, social como cultural de la especie, en el CENIAP se conserva y maneja con fines de investigaciones agronómicas uno de los bancos de germoplasma de mango más importantes de Venezuela y Latinoamérica con alrededor de 240 variedades y cerca de 700 entradas, las cuales se han caracterizado morfológica, agronómica y fisiológicamente.

Se hace necesaria la caracterización molecular de los individuos que allí se mantienen. Las técnicas moleculares han sido relevantes para el estudio de genomas vegetales, ofreciendo niveles de confiabilidad más elevados si se les compara con las que sólo se limitan a estudiar características morfológicas, anatómicas o ecofisiológicas.

Aún cuando existen metodologías para el aislamiento de ADN, Dellaporta *et al.* (1983); Bahl y Pfenninger (1996); Porebski *et al.* (1997) y Doyle y Doyle (1990), que han permitido trabajos en la caracterización molecular de mango (Adato *et al.*, 1995, López-Valenzuela *et al.*, 1997; Ravishankar *et al.*, 2000), se hace necesario ajustar las condiciones para la extracción y purificación de los ácidos nucleicos de las plantas de mango de la colección de germoplasma, para implementar los distintos tipos de técnicas moleculares y facilitar la identificación y caracterización de individuos, estimación de variabilidad genética, así como la identificación de genes de interés agronómico o ecológico.

El objetivo de este trabajo consistió en obtener una metodología de extracción de ADN genómico a partir

de tejido foliar de mango, en cantidades suficientes y en la calidad adecuada para la posterior realización de análisis genéticos mediante técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron al azar y en 3 cuadrantes distintos de la fronda de cada árbol, hojas tiernas y jóvenes de los siguientes cultivares de mango pertenecientes a la colección de germoplasma del CENIAP en Maracay (ver Cuadro).

CUADRO. Variedades de mango de la colección de germoplasma del CENIAP utilizadas en el presente trabajo.

· 'Alphonso'	· 'Harris'	· 'Oscar'
· 'Altagracia'	· 'Hilacha'	· 'Paheri'
· 'Amini'	· 'Haden'	· 'Oliveira Netto'
· 'Bocado'	· 'Irwin'	· 'Palmer'
· 'Bombay'	· 'Julie'	· 'Peter'
· 'Borsha'	· 'Keitt'	· 'Pico e' Loro'
· 'Cambur'	· 'Kent'	· 'Quebrada'
· 'Camphor'	· 'Labich'	· 'Rosa Criolla'
· 'Ceylan'	· 'Langra Bernasi'	· 'Sensation'
· 'Edward'	· 'Llamarada'	· 'Smith'
· 'Fairchild'	· 'Lechosa'	· 'Springfels'
· 'Far'	· 'Mandoe'	· 'Tetenene Manzana'
· 'Ford'	· 'Manga Criolla'	· 'Tommy Atkins'
· 'Fresa'	· 'Manzana'	· 'Turnbull'
· 'Glenn'	· 'Martinica'	· 'Upata'
· 'Graham'	· 'Morada'	· 'Van Dyke'
· 'Zill'		

Además de las variedades de *M. indica* L., se incluyeron muestras de las especies *Mangifera odorata* y *M. altísima*.

Para la extracción del ADN genómico (ADNg) se probaron 4 metodologías: Dellaporta *et al.* (1983) con modificaciones; Bahl y Pfenninger (1996); Porebski *et al.* (1997) y Doyle y Doyle (1990) con modificaciones. En función de los resultados preliminares se calibraron varios factores considerados de importancia para la extracción del ADN(g), utilizándose la metodología de Doyle y Doyle (1990) como la base de la extracción. Para todas las experiencias, de calibración de la metodología se usaron hojas tiernas de las variedades Haden, Smith, Tommy Atkins y Kent.

Para calibrar el buffer de extracción se probaron las soluciones a) CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 2x en Tris -HCl, b) CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 2x en Tris -Base, c) SDS 20% en Tris-HCl 100 mM pH 8,30; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM; β -mercaptoetanol 10 mM y d) Detergente comercial en polvo marca Súper-Líder®, y líquido, marca Brisol®.

De igual manera se calibró la relación masa de tejido foliar (g) *vs.*, el volumen del buffer de extracción, macerándose 150, 250, 350 ó 500 mg de tejido foliar en 700, 800, 900 ó 1000 μ l de buffer de extracción, respectivamente.

A fin de optimizar el proceso de extracción se utilizó el buffer de lisis a temperatura ambiente o calentado a 60 °C. El macerado posteriormente se colocó a incubar a 60 °C ó 70 °C por 15, 30, 60 y 120 min, respectivamente. Para el precipitado del ADN se probó la efectividad de alcohol etílico 98% e Isopropanol 98%, ambas soluciones se probaron a -10 °C y -20 °C, centrifugándose las muestras 10 min, 4 h y 24 h posteriores a agregarse el alcohol.

Del mismo modo, también fueron probadas las temperaturas bajo las cuales se incubó el sedimento de ADN con la respectiva solución de lavado, colocándose las muestras a 25, 37, -10 y -20 °C durante 10, 20 ó 30 min.

Una vez obtenido el sedimento de ADN (g) ya lavado se procedió a la resuspensión del mismo en buffer TE directamente del paso de lavado o previa liofilización a -50 °C. Todas las experiencias fueron realizadas por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 4 metodologías comparadas, la propuesta por Doyle y Doyle (1990) fue la que permitió el aislamiento de una mayor cantidad de ADN genómico intacto en las 4 variedades de mango seleccionadas. Los sedimentos aislados con esta metodología presentaron mayor tamaño y la coloración fue la más clara.

El uso de las soluciones detergentes comerciales no permitió visualizar sedimentos de ADN y en los pocos casos en que sucedió, los sedimentos presentaron longitudes inferiores a 3 mm y una coloración oscura intensa.

Por lo anterior, el resto de las pruebas de calibración se realizaron teniendo como base el protocolo de Doyle y Doyle (1990). Las metodologías de Dellaporta *et al.* (1983) y Bahl y Pfenninger (1996) permitieron aislar sedimentos de ADN (g) de coloración crema, pero al analizarlos electroforéticamente resultaron en ADNs degradados. Es posible que los detergentes comerciales tengan un alto contenido de impurezas y materiales que interfieren con el proceso de extracción.

En la Figura se tienen los resultados obtenidos al comparar las dos soluciones de lisis basadas en CTAB. Como puede observarse el buffer CTAB con Tris base permitió el aislamiento de ADN en todas las variedades estudiadas, resultando en moléculas intactas de ADN(g). El uso de Tris-HCL no fue efectivo para aislar el ADN en algunas variedades y los ADN aislados en algunos casos resultaron degradados.

Puede observarse además que las fracciones ARN están mejor separadas en la parte inferior del gel correspondiente a las muestras extraídas con CTAB-Tris base (ver Figura).

Las pruebas para determinar la relación masa de tejido: vol. de solución amortiguadora que mejor se ajustan a los requerimientos de extracción, permitieron determinar que la cantidad de tejido foliar a ser pesada oscila entre 250 y 270 mg (tejido pulverizado con N₂ líquido), y 900 μ l de la solución tampón. Cantidades menores de masa no fueron efectivas para la formación de un sedimento.

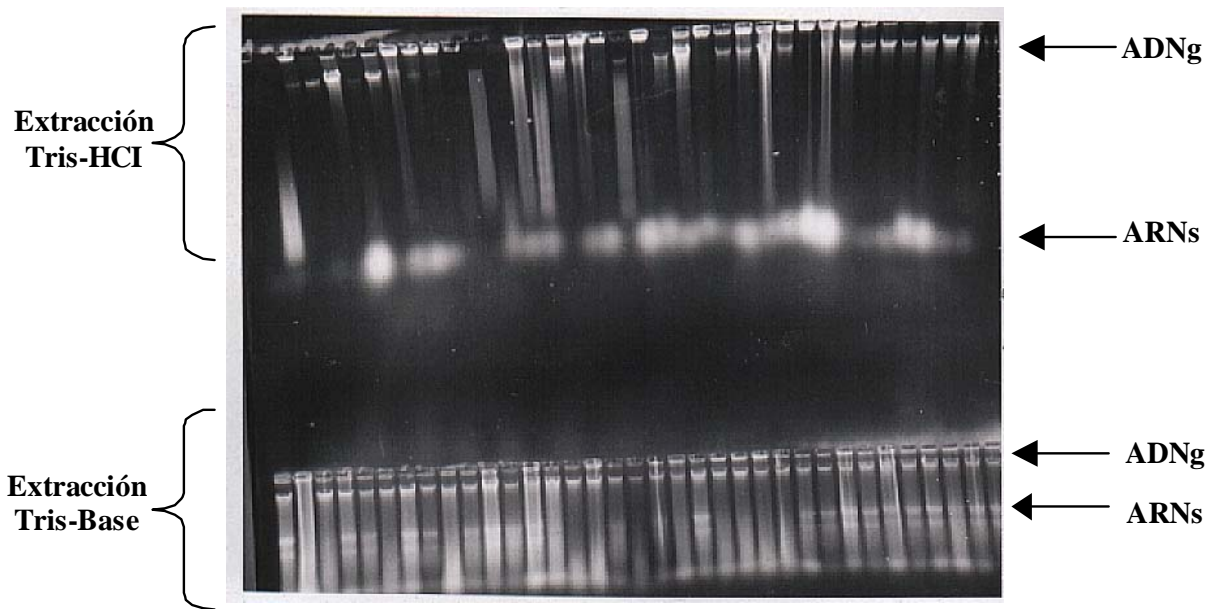


FIGURA. Electroforesis comparativo de protocolo de extracción de ADN según Doyle y Doyle (1990) con modificaciones, mostrando diferencias apreciables entre la utilización de los tampones Tris-HCl y Tris-Base.

El uso de menores cantidades de solución de extracción no permitió la formación de una pasta manejable dificultándose el manejo de las muestras. Estos resultados representan un sustancial ahorro de insumos así como la oportunidad de procesar un número mayor de muestras en menor tiempo. De igual manera, se puede aislar ADN(g) partiendo de cantidades pequeñas de tejido. Para evitar el oscurecimiento de las muestras, se incorporó PVP-40 3% y se incrementó la concentración de NaCl a 5 mM. Igualmente se complementó la solución de extracción con metabisulfito de sodio para un mejor control de la oxidación de los compuestos fenólicos susceptibles de degradación inmediata y que interfieren en la extracción.

El uso del buffer calentado a 60 °C fue más eficiente que al usar la solución a temperatura ambiente. De igual modo, la incubación a 60 °C durante 1 h fue el tratamiento que permitió aislar el sedimento de mayor tamaño y moléculas intactas.

Adicionalmente la incorporación de fenol equilibrado con el cloroformo-alcohol isoamílico provee una mejor limpieza de las muestras durante el proceso de extracción.

El almacenamiento de las muestras a -20 °C hasta el día siguiente fue eficiente para mejorar e incrementar la precipitación de los ácidos nucleicos con isopropanol. Los sedimentos resultaron más blanquecinos al incubarlos a 37 °C con la solución de lavado. De igual manera, la resuspensión de los sedimentos en buffer TE fue más rápida si se liofilizaron a -50 °C durante 3 h. La liofilización, permitió obtener el sedimento como un polvo blanquecino que fue capaz de disolverse de inmediato en la solución de lavado, propiedad relacionada con un proceso de extracción exitoso. Adicionalmente la liofilización minimiza el proceso de degradación de los ADN por nucleasas. La implementación de las modificaciones realizadas a este protocolo (Doyle y Doyle, 1990), permitió obtener cantidades adecuadas de ADN que oscilaron entre 300 – 500 ng / μ L de alta calidad.

CONCLUSIONES

Fue posible adecuar la metodología de Doyle y Doyle (1990) para el aislamiento del ADN genómico a partir de tejido foliar de mango. Así mismo, la metodología permite obtener cantidades de ADN genómico suficientes para realizar análisis moleculares posteriores. La metodología propuesta para el aislamiento del ADN contempla los siguientes pasos:

- Limpiar la hoja joven y verde, de textura suave no coriácea con etanol 70% y posteriormente agua destilada por ambas caras. Eliminar el pecíolo y la nervadura central y cortar la hoja en trozos pequeños.
- Pesar 250 mg de tejido foliar y pulverizarlo con nitrógeno líquido.
- Macerar el tejido pesado con 900 µl de tampón de extracción previamente calentado a 60 °C, e introducir el macerado en tubo Eppendorf® de 1,5 mL y 30 mg de metabisulfito de sodio por 1 h a 60 °C.
- Completar con 1 volumen de fenol (equilibrado) – cloroformo – alcohol -isoamílico o fenol – cloroformo – octanol (24:24:1) y mezclar con delicadeza por inversión del tubo.
- Centrifugar 12000 rpm durante 20 min y transferir sobrenadante a tubo limpio y estéril.
- Precipitar el ADN con 2/3 vol de isopropanol previamente enfriado a -20 °C y mover el tubo invirtiéndolo suavemente hasta que las hebras blancas de ADN se puedan apreciar con claridad.
- Almacenar a -20 °C hasta el día siguiente.
- Volver a balancear el tubo invirtiéndolo suavemente hasta que las hebras blancas de ADN se puedan agregar como un flóculo flotante.
- Centrifugar a 8000 rpm durante 15 min para sedimentar el ADN.
- Agregar 200 µl de solución de lavado (Alcohol etílico 70%) e incubar por 20 min a 37 °C.
- Centrifugar a 7000 rpm durante 10 min.
- Descartar la solución de lavado y liofilizar a -50 °C durante 3 h.
- Resuspender ADN en 30 µl de solución tampón T₁₀E₁ pH 7.1.
- Tratar con ARNasa “A” (20 µg/ml) a 37 °C durante 30 min.
- Verificar en electroforesis.
- Verificar en fluorometría o espectrofotometría.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer al INIA-CENIAP por haber permitido el acceso al Banco de Germoplasma de Mango del cual se tomaron las muestras para la ejecución de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adato, A., D. Sharon, U. Lavi, J. Hillel and S. Gazit. 1995. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analyses of mango (*Mangifera indica* L.) genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(2):259-264.
- Avilán, L., F. Leal y D. Bautista. 1992. Manual de fruticultura. Edit. América C.A. Caracas, Venezuela.
- Bahl, A. and M. Pfenninger. 1996. A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Nucleic Acids Research.* 24(7):1 587-1 588.
- Dellaporta, S. J., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2007. Base de datos estadísticas. **In:** <http://faostat.fao.org/site/336/DesktopDefault.aspx?>

- López-Valenzuela, J., O. Martínez and O. Paredes-López. 1997. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. HortScience. 32(6):1 105-1 108.
- Porebski, S.; G. Bailey and B. Baum 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. Plant Molecular Biology Reporter 15(1):8-15.
- Ravishankar, K., L. Anand and M. Dinesh. 2000. Assessment of genetic relatedness among mango cultivars of India using RAPD markers. Jour. Hort. Sci. Biotech. 75(2):198-201.