ISBN: 978-607-00-2083-4

Obtención de ADN de cactáceas: comparación de dos métodos de extracción en *Ferocactus histrix*

Brenda Díaz Cárdenas [1], Liliana Gómez Flores Ramos[1], Verónica Carolina Rosas-Espinoza [2], Laura Izascum Pérez Valencia [2] y Patricia Castro-Félix[1]

[1] Departamento de Biología Celular y Molecular.
[2] Departamento de Ecología.
CUCBA, Universidad de Guadalajara. Km 15. Carretera a Nogales, Las Agujas Nextipac, Zapopan, Jalisco. México. C. P. 45110.
Correo electrónico: pcastro@cucba.udg.mx

Introducción

México es el más importante centro de concentración de cactáceas en el mundo, con un total de 48 géneros y 563 especies reconocidas. Aproximadamente el 75 % de las cactáceas mexicanas son endémicas (Hunt 1999; CONABIO 2006). Debido principalmente a una explotación irracional, a partir de la última década, cerca del 38% de estas especies presentan problemas de conservación y el 11% se encuentran en peligro de extinción (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002).

El éxito en la conservación de la biodiversidad depende en gran medida del conocimiento de las especies o sistemas que se pretende conservar. Así, uno de los grandes desafíos es el generar y organizar un acervo de información básica indispensable que incluya los aspectos genéticos (Hernández y Godinez 1994). Los niveles de variación genética y la distribución de la misma en el espacio y en el tiempo son factores que deben considerarse en los planes de conservación biológica. En los últimos años se han desarrollado una serie de marcadores moleculares que facilitan este tipo de estudios (Avise 2004).

La extracción de ADN genómico es un paso crucial cuando se desean realizar estudios con marcadores moleculares. En particular, la extracción de ADN a partir de tejido vegetal de cactáceas, se considera un procedimiento relativamente difícil, debido a que este tipo de plantas contienen una gran cantidad de polisacáridos y metabolitos secundarios, que forman complejos insolubles con los ácidos nucleicos durante el proceso de extracción (De la Cruz et al. 1997). Estos contaminantes inhiben la acción de las enzimas de restricción y de la *Taq* polimerasa. Los mucílagos que presentan estas plantas, por su viscosidad, dificultan el proceso de extracción y complican la amplificación genómica por PCR (Primark 1995). Entre los protocolos reportados para extraer ADN de tejido vegetal rico en polisacáridos se encuentran el de de Cota-Sánchez et al. (2006) que se basa en el uso de CTAB para producir la lisis celular y el método de Keb-Llanes et al. (2002) que utiliza CTAB-SDS (Cuadro 1).

Ferocactus histrix (DC) Lindsay, es una cactácea endémica de México (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991). La especie, conocida comúnmente como *biznaga*, es una de las más requeridas por la industria confitera, se utiliza como planta ornamental y medicinal y como alimento para el ganado caprino (Del Castillo y Trujillo 1991; Huerta-Martínez y Escobar-Santos 1998). En la última actualización de la Norma Oficial Mexicana, *F. histrix* aparece en el apéndice de especies en riesgo de extinción (Secretaría

de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2002). Se desconocen los niveles y la estructuración de la diversidad genética que presenta esta especie, por lo que es necesario contar con ADN en suficiente cantidad y calidad para analizar estos aspectos con herramientas moleculares.

El objetivo de este estudio es modificar y comparar dos métodos de extracción para obtener ADN de alta calidad de *F. histrix*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se colectaron muestras de material vegetal de *F. histrix* en la localidad El Rayo, Zacatecas. Las muestras fueron colocadas en un tubo con 5 ml de una solución de CTAB 2X y se mantuvieron en un ambiente fresco. Se retiró la cutícula y la mayor parte de la corteza de tejido y se almacenó a -20°C. Para la extracción de ADN se utilizaron de 400 a 500 mg de tejido, el cual fue congelado con nitrógeno líquido y pulverizado en un mortero.

Micrométodo de extracción de ADN basado en CTAB

Reactivos:
Amortiguador CTAB 2X (Tris HCl 100mM pH8, EDTA 20mM, NaCl 1.4M, PVP40 1%)
2-β mercaptoetanol
Cloroformo- alcohol isoamílico 24:1
Isopropanol frío
Amortiguador TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8)
Acetato de Sodio (NaOAc) 3M pH 5.2
Etanol al 70% y absoluto

Protocolo:

1. Colocar el tejido vegetal en un mortero y pulverizar con ayuda de nitrógeno liquido.
2. Añadir 750 µl de amortiguador CTAB 2X y 3 µl de 2-β mercaptoetanol a un tubo eppendorf.
3. Agitar vigorosamente la solución y el tejido vegetal. Incubar a baño maría a 65°C por 1 h, mezclar cada 15 minutos.
4. Añadir 700 µl de cloroformo:isoamílico y agitar vigorosamente. Centrifugar a 8000 g por 45 minutos a 4°C. Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo.
5. Añadir 350 µl de isopropanol a -20°C y refrigerar a -20°C al menos una hora.
6. Centrifugar a 8000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante sin perder la pastilla.
7. Resuspender la pastilla en 400 µl de TE e incubar a 37°C por 15 min.
8. Añadir 34 µl de NaOAc 3M y 1ml de etanol a -20°C al 95%. Enfriar a -20°C durante 1 hora, centrifugar a 8000 g durante 5 minutos y descartar el sobrenadante.
9. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. Centrifugar por 5 minutos y dejar secar.
10. Resuspender la pastilla en 100 µl de TE y almacenar a -20°C.

Micrométodo de extracción de ADN basado en CTAB-SDS
Reactivos:
Amortiguador de extracción A: (CTAB 2X: Tris HCl 100mM pH8, EDTA 20Mm, NaCl 1.4M, PVP40 4%, ácido ascórbico 0.1% y 2 β–mercaptoetanol 10mM).
Amortiguador de extracción B:(Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 50mM, NaCl 100mM , 2 β–mercaptoetanol 10mM).
Amortiguador TE: Tris 10mM, EDTA 1mM.
SDS 20%.
Acetato de potasio 5M (-20°C).
Acetato de sodio 3M pH5.2.
Etanol 70% (-20°C).
Isopropanol absoluto (-20°C).

Protocolo:

1. Colocar el tejido vegetal en un mortero y pulverizar con ayuda de nitrógeno liquido. Transferir a un tubo eppendorf. Añadir 300 µl de amortiguador A, 900 µl de amortiguador B y 100 µl de SDS.
2. Agitar e incubar en baño maría a 65°C por 30 minutos.
3. Añadir 410 µl de acetato de potasio frío, agitar vigorosamente. Centrifugar a 8000 g durante 15 minutos a 4°C.
4. Transferir 1ml de sobrenadante a un tubo eppendorf limpio. Añadir 800-900 µl de Isopropanol frío. Incubar a -20°C por 20 min.
5. Centrifugar a 6 000 g por 10 minutos. Descartar el sobrenadante, lavar la pastilla con 500 µl de etanol al 75% y dejar secar.
6. Resuspender la pastilla en 800 µl de amortiguador TE. Incubar a 37°C durante 15 minutos..
7. Añadir 800 µl de cloroformo:isoamílico (24:1) y agitar vigorosamente.
8. Centrifugar a 6000 g por 10 minutos a 4°C.
9. Recuperar el sobrenadante y añadir 70 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 500 µl de isopropanol frío. Incubar a -20°C por 1 hora.
10. Centrifugar a 6000 g por 10 minutos.
11. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 75% y dejar secar.
12. Disolver en 100 µl de TE.

Cuadro 1. Comparación de dos micrométodos de extracción de ADN.

Paso en el protocolo	Keb Llanes et al. (2002) *	Cota-Sánchez et al. (2006) *
Lisis celular		
CTAB	2X	2X
SDS	1.5%	No aplica
Extracción orgánica	Cloroformo:Isoamílico **	Cloroformo:Isoamílico

Primera precipitación	Isopropanol	Isopropanol
Resuspensión	TE incubar a 37ºC 15 min	TE incubar a 37ºC 15 min
Segunda precipitación	NaOAc-Isopropanol	NaOAc-Etanol

* Protocolos modificados ** Después de la primera precipitación

Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN

Se cuantificó la cantidad total de ADN por espectrofotometría ($A2_{280}$). Se determinó la calidad de ADN por la relación $A1_{260}/A2_{280}$ y por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Sambrook et al. 1989). Las muestras de ADN se utilizaron para la amplificación por PCR de los espaciadores internos transcritos de ADN ribosomal (ITS) con los iniciadores ITS1 e ITS4 (Guzmán et al. 2003).

Resultados y discusión

Las cactáceas son consideradas plantas recalcitrantes para la extracción de ADN. Aunque se han aplicado protocolos estándares y desarrollado protocolos específicos para tejido vegetal rico en compuestos mucilaginosos, generalmente estos son laboriosos y requieren de grandes cantidades de tejido y reactivos (Doyle y Doyle 1987; De la Cruz et al. 1997; Griffith y Porter 2003). En este trabajo se obtuvo ADN de 15 muestras de *F. histrix* con el protocolo de Griffith y Porter (2003) con buenos resultados: ADN de alto peso molecular, un promedio de la relación $A1_{260}/A2_{280}$ de 1.76 (una relación $A1_{260}/A2_{280}$ de 1.8 a 2 es indicativa de alta calidad) y niveles de 95 a 505 ng/µl. Sin embargo la cantidad necesaria de tejido, así como el alto gasto en reactivos lo hacen un método impráctico y poco costeable cuando se tiene poco material vegetal.

Los protocolos empleados en este trabajo son considerados micrómetodos ya que requieren de miligramos de tejido y pequeños volúmenes de reactivos, de tal manera que facilitan el manejo de un gran número de muestras. El protocolo que se basa en el uso de CTAB es una ligera modificación del método de Cota-Sánchez et al. (2006). Este método produjo ADN de alto peso molecular y de buena calidad (promedio $A1_{260}/A2_{280}$ = 1.77) en niveles de 25 a 172 ng/µl, con una eficiencia promedio de 6.2 µg (Figura 1) (Cuadro 2). La concentración promedio obtenida en *F. histrix* con este método es moderada en relación a los 300 ng/µl reportados en tejido fresco (0.5-1 g) de otras especies ricas en mucílagos.

El protocolo de Keb-Llanes et al. (2002), que se basa en el uso de CTAB-SDS, es muy similar al protocolo reportado por De la Cruz et al. (1997). Este método produjo ADN de *Ferocactus* de mala calidad y en bajas concentraciones. La eficiencia promedio fue de 2.6 µg y la relación $A1_{260}/A2_{280}$ promedio de 1.5. Por lo tanto, se realizaron modificaciones al método original, basadas en el protocolo de Sánchez-Hernández y Gaytán-Oyarzún (2006), que aumentaron la concentración y la calidad del ADN. El protocolo modificado produjo un ADN de alto peso molecular y de excelente calidad (promedio $A1_{260}/A2_{280}$ = 1.86), en niveles de 21 a 138 ng/µl con una eficiencia promedio de 3.4 µg (Figura 2) (Cuadro 2). La concentración promedio obtenida en *F. histrix* con

este método es baja en relación a los valores reportados en especies de *Agavaceae* (Keb-Llanes et al. 2002).

Cuadro 2. Promedios de las eficiencias y relaciones A_{260}/A_{280} de los micrométodos utilizados en la extracción de ADN de *Ferocactus histrix*.

Protocolo	N	Eficiencia (µg)	Relación A_{260}/A_{280}
Cota-Sánchez et al. (2006) *	29	6.2	1.77
Keb-Llanes et al. (2002)	8	2.6	1.5
Keb-Llanes et al. (2002) *	19	3.4	1.86

N= Número de muestras
*Protocolos modificados

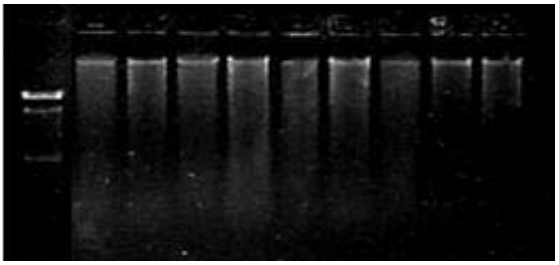

Figura 1. Extracción de ADN de muestras de *Ferocactus histrix* con el protocolo de Cota-Sánchez et al. (2006) modificado.

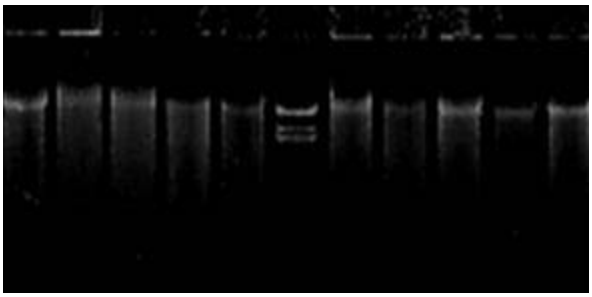

Figura 2. Extracción de ADN del muestras de *Ferocactus histrix* con el protocolo de Keb-Llanes et al. (2002) modificado.

La calidad del ADN es esencial para llevar a cabo estudios moleculares. Un alto contenido de mucílagos en el extracto de ADN de cactáceas inhibe la acción de la *Taq* polimerasa disminuyendo o anulando la amplificación genómica por PCR. La calidad del ADN obtenido con los dos protocolos permitió la amplificación por PCR del ITS del ADN ribosomal (Figura 3).

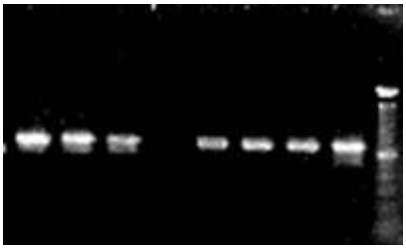

Figura 3. Amplificación por PCR del ITS de ADN ribosomal de *Ferocactus histrix*.

Conclusiones

- Los dos micrométodos utilizados en este estudio produjeron ADN de *F. histrix* de alta calidad.
- El micrométodo basado en CTAB produjo una mayor eficiencia.
- Las modificaciones realizadas al protocolo de Keb-Llanes et al. (2002) mejoraron considerablemente la eficiencia y la calidad del ADN.
- La calidad del ADN de los dos protocolos permite la amplificación del ITS del ADN ribosomal.

Bibliografía

Avise, J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer Associates, Inc., EUA. Pp 487.

Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. *Las cactáceas de México* (Vol. II), 2nd ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 404 pp.

CONABIO. 2006. *Capital natural y bienestar social*. Comisión Natural para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Cota-Sánchez, J. H., K. Remrchuk y K. Ubayasena. 2006. Ready to use DNA extracted with CTAB method adapted for Herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24: 161-167.

Del Castillo, R.F. y **S. Trujillo.** 1991**.** Ethnobotany of *Ferocactus histrix* and *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) in the semiarid Central Mexico: Past, present and future. *Economic Botany*, 45: 495-502.

De la Cruz, M., Ramírez, F. y H. Hernández. 1997. DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 319-325.

Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

Griffith P.M. y J.M. Porter. 2003. Back to the basics: a simple method of DNA extraction for mucilaginous cacti. *Bradleya*, 21: 126-128.

Guzmán-Dávalos, L., G. M. Mueller, J. Cifuentes, A.N. Miller y A. Santerre. 2003. Traditional infrageneric classification of Gymnopilus is not supported by ribosomal DNA sequence data. *Mycología*, 95: 1204-1214.

Hernández, H. M. y H. Godínez A. 1994. Contribución al conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*, 26:33-52

Huerta-Martínez, F.M. y V.E. Escobar-Santos. 1998. Estatus ecológico actual de *Ferocactus histrix* (DC) Lindsay en los llanos de Ojuelos, Jalisco-Zacatecas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 43: 57-63.

Hunt, D. 1999. CITES *Cactaceae* checklist. 2nd ed. Kew, U.K. Royal Botanic Gardens and Internacional Organization for Suculent Plant Studies.

Keb-Llanes, M., G. Gonzalez, B. Chi-Manzanero y D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 299a-299e.

Primarck, R. 1995. *A primer of conservation biology*. Sinauer-Sunderland, U.S.A. Pp 277.

Sambrook J., E. F. Fritish y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, E. U. A. Vol. 1

Sánchez-Hernández, C. y J.C. Gaytán-Oyarzún. 2006. Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with polysaccharide and secondary metabolites. *Africa Journal of Biotechnology*, 5:1864-1867.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-2001, Protección ambiental-especies nativas de México de flore y fauna silvestres- categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff y G. Kahl. 2005. *DNA fingerprinting in Plants: principles, Methods, and Applications*. CRC Press, EUA. Pp 92.