

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MANÍ CULTIVADO (*A. hypogaea L.*)

Pozzi, F.I.¹; Moreno, M.V.¹; Etchart, V.²; Díaz, D.²; Gioco, J.O.¹.

1-Laboratorio de Biotecnología en Cultivos EEA-INTA Manfredi

2-Laboratorio de Biología Molecular-Instituto de Genética Ewald A. Fravret-INTA Castelar
florenciapoz@hotmail.com

Introducción

Diversos autores han resaltado la importancia de la selección de un método de extracción de ADN adecuado para obtener resultados confiables en los estudios de variabilidad molecular en plantas. En este sentido, existen varios aspectos a tener en cuenta, entre ellos la capacidad de procesar el elevado número de muestras empleadas en los programas de mejoramiento, la implementación de métodos de purificación que provean ADN de alta calidad y en cantidad apropiada, además de una extracción rápida, simple y de bajo costo.

El objetivo específico del presente estudio fue implementar una metodología de extracción de ADN eficiente para un conjunto de materiales de germoplasma de maní cultivado seleccionados por su buen comportamiento en campo y sus diversos orígenes geográficos, comparando dos métodos: 1) el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987) modificado, y 2) el *kit* de extracción *NucleoSpin Plant II* (Macherey-Nagel, Alemania).

Materiales y métodos

Material vegetal

Se seleccionaron 7 entradas (Tabla 1) pertenecientes al Banco Activo de Germoplasma de Maní de la EEA Manfredi. Esta selección se basó en el buen comportamiento agronómico de los materiales frente a Viruela Temprana (*Cercospora arachidicola*) y Tardía (*Cercosporidium personatum*), a *Aspergillus spp.*, siendo representativas de las dos subespecies del cultivo (subesp. *fastigiata* y subesp. *hypogaea*) y provenientes de diversos orígenes geográficos de muestreo. La muestra vegetal dentro de cada entrada se tomó a partir de 12 individuos (1 hoja/planta o individuo), considerando aquellas hojas jóvenes sin lesiones, ni signos de ataque por patógenos. Las hojas fueron liofilizadas, molidas y almacenadas en freezer a -80°C hasta la extracción de ADN genómico.

Métodos de extracción de ADN

Método 1. La extracción de ADN se realizó mediante el empleo del protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987) modificado. Estas modificaciones correspondieron a: 1) la cantidad de material liofilizado a extraer (de 400 mg en el protocolo original a 44-45 mg), 2) los tiempos de incubación, de centrifugación y de lavado fueron reducidos y 3) el volumen del *buffer* de extracción fue disminuido de 910 μ l en el protocolo original a 800 μ l. El agente extractivo utilizado fue el Bromuro de Cetiltrimetilamonio (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*: CTAB).

Método 2. La extracción de ADN también se realizó mediante el empleo del *kit NucleoSpin Plant II*.

La extracción de ADN de los materiales analizados se verificó mediante geles de agarosa al 0,8%(p/v). La cuantificación se realizó empleando un fluorómetro Versaflúor (Biorad) mediante el uso del reactivo Hoechst 33258, estableciendo una curva patrón con estándares de ADN de timo de ternero (Biorad) de concentraciones conocidas. Se corroboró la calidad del ADN extraído mediante la amplificación vía PCR de 5 marcadores microsatélite: PM201, PM3, PM204, PM36 y PGP01B09. Las reacciones de amplificación fueron efectuadas en un volumen final de 15 μ L, conteniendo 1 μ L de ADN (60 ng/ μ L), 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Fermentas), 1X *buffer* de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,75 μ L de cebador *forward* y 0,75 μ L de cebador *reverse* en 9,78 μ L de agua grado HPLC estéril. Las amplificaciones fueron efectuadas en un termociclador GeneAmp System 9700 (Applied Biosystems). El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 61°C (rampa de descenso de 1°C/ciclo) y 60 segundos a 72°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 60 segundos a 72°C, finalmente 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Para el par de cebadores de PM36, cuya temperatura de hibridación es de 50°C, la rampa de temperatura se inició a partir de 54°C. Se detectó la presencia o ausencia de productos de amplificación mediante la utilización de geles de agarosa al 2%(p/v).

Resultados

El protocolo de extracción de ADN con *kit NucleoSpin Plant II* evidenció una deficiente cantidad de ADN obtenido y dificultad para amplificar fragmentos de PCR por la baja calidad del mismo (Figura 1-B). Posteriormente se probó el método de extracción con CTAB descrito por Doyle y Doyle (1987) modificado según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos con éste mostraron una alta eficiencia dado que se obtuvo ADN en cantidad suficiente y de alta calidad (Figura 1-A).

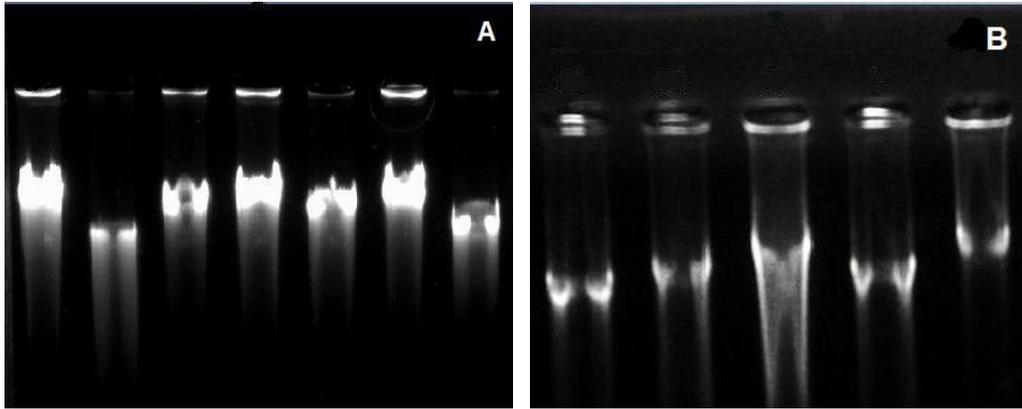


Figura 1. A. Fotografía del ADN de 7 entradas de maní cultivado extraídas con el método de Doyle y Doyle (1987) modificado. **B.** Fotografía del ADN de 5 entradas de maní cultivado extraídas con *kit NucleoSpin Plant II*.

Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la extracción mediante el método con CTAB descrito por Doyle y Doyle (1987) modificado a partir de material liofilizado fue la más adecuada para las entradas de *A. hypogaea* estudiadas, dado que permitió obtener mejor calidad y mayor cantidad de ADN. Además, el costo efectivo por muestra es menor que en el caso del empleo del *kit* de extracción mencionado. Estos resultados fueron coincidentes con lo reportado en diversos estudios moleculares de *A. hypogaea*, dado que diferentes autores han utilizado la extracción de ADN basada en el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con diversas modificaciones. Por otro lado, existe concordancia también con lo reportado en 6 tipos distintos de tejido de zanahoria, en *Pinus hartwegii* Lindl y con comparaciones previas de los métodos de extracción de Doyle y Doyle (1987) con el *kit Qiagen MagAttract Plant DNA* y con el *kit Qiagen DNeasy*.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que el protocolo de extracción de ADN de Doyle y Doyle (1987) con las modificaciones descritas, resultó el más eficiente para las entradas de la especie de *A. hypogaea* analizadas en este estudio.