

Extracción de DNA de plántulas de papaya preservadas con silica gel: una alternativa para descartar el uso de nitrógeno líquido.

Introducción

La papaya (*Carica papaya*) es un cultivo propio de zonas tropicales y subtropicales (Ogata, Yamanaka, Shoda, Urasaki, Yamamoto, 2016). México ocupó el cuarto lugar en producción (FAO, 2014), siendo el estado de Oaxaca el principal productor de este fruto (SIAP, 2015). La importancia del cultivo de papaya es debido a los múltiples usos medicinales, nutricionales y farmacológicos (Krishna, Paridhavi, Patel, 2008). Por otro lado es susceptible al ataque de varios agentes fitopatógenos (Ventura, Costa da Silva Tatagiba, 2004). Dada a su importancia económica es necesario realizar investigaciones relacionadas a la caracterización genética de cultivares con ciertas propiedades de resistencia a enfermedades y características organolépticas (Esquivel, Tornet, Aranguren, Ramos, Rodríguez, Pastor, 2008). Como el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), que involucra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y digestión enzimática del ácido desoxirribonucleico (DNA) (Oliveira, Costa, Ferraz, Moraes, Dos Santos y Loyola, 2011); también el análisis de amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD), para la determinación de la variabilidad genética de varios cultivos (Stiles, Lemme, Sondur, Morshidi, Manshardt, 1993) o la identificación temprana de sexo con secuencias caracterizadas de regiones amplificadas (SCAR) (Deputy, Ming, Ma, Liu, Fitch, Wang, Manshardt, Stiles, 2002).

Para poder realizar con éxito estas técnicas moleculares, se requiere de la extracción de DNA íntegro y con una pureza considerable, mediada por kits comerciales (Whitehouse y Hottel 2007) o el uso de

protocolos debidamente estandarizados (Bartlett y Stirling 2003). La variedad de protocolos disponibles son numerosos, debido a la diversidad de compuestos orgánicos propios de cada planta, es por esta razón que se realizan modificaciones a los protocolos ya establecidos (Huang, Wang, Kong, Guo, Guo A, 2013). Al realizar la colecta en lugares remotos se debe procurar no romper la cadena en frío, que comprende desde el congelamiento de la muestra en campo, transporte del tejido congelado y su criopreservación (Abarshi, Mohammed, Wasswa, Hillocks, Holt, Legg, ... Maruthi, 2010). Algunas veces no se puede lograr por circunstancias como la dificultad de adquirir el nitrógeno líquido, la velocidad de evaporación, este tipo de desafíos se agudizan en las zonas tropicales. Por lo tanto se debe de buscar alternativas idóneas para minimizar o eliminar la dependencia del nitrógeno líquido; el uso de silica gel es una alternativa prometedora, ya que se ha reportado para preservar, procesar y extraer DNA de hojas de distintas especies vegetales en diversos protocolos moleculares (Chase y Hills 1991).

Debido a la importancia que tiene el cultivo de papaya en la región Costa es necesario un protocolo adecuado a las condiciones de la región, capaz de lograr la purificación de DNA con calidad adecuada para ser usado en diversas técnicas moleculares; el objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad de DNA obtenido a partir de hojas de plántulas de papaya, preservadas con silica gel como una alternativa en la sustitución del nitrógeno líquido.

Materiales y métodos

Colecta material vegetal.

La colecta se realizó en la localidad de San José Río Verde La Boquilla situada en el Municipio de Santiago Jamiltepec del estado de Oaxaca con las coordenadas (16.055855, -97.801924). Se seleccionó y extrajo una hoja verdadera por plántula de 15 días de edad para ser preservada en silica gel.

Deshidratación de material vegetal y manipulación.

Las hojas seleccionadas fueron lavadas con etanol al 70 % v/v (Meyer®), enjuagadas con agua esterilizada y colocadas en papel filtro (Whatman®) a temperatura ambiente. Las hojas libres de humedad fueron colocadas dentro de un sobre de papel seda de 5 cm x 8 cm, procurando que toda la hoja de papaya quedara en el sobre, posteriormente el sobre de seda conteniendo la hoja se introdujo en una bolsa plástica de 10 cm x 15 cm con cierre hermético, conteniendo en su interior 30 gramos de silica gel (Camen®) en forma de esferas con un diámetro aproximado de 3 milímetros con indicador de humedad, se cerró la bolsa herméticamente procurando eliminar el aire del interior (figura 1). Por último las bolsas empacadas se dejaron a temperatura ambiente durante dos días.

Molienda de tejido vegetal.

Se realizó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, colocando en su interior aproximadamente 0.2 gramos de tejido deshidratado con pinzas de disección y con la ayuda de un pistilo de polipropileno incorporado a un homogenizador mecánico (Virtis modelo: Cyclone®) se procedió al proceso de molienda para la obtención de polvo fino.

Protocolo de extracción.

Se adicionó 600 μ L de la solución de extracción (CTAB 2%, EDTA 35 mM, NaCl 2.5 M, Tris-HCl pH 8.0 150 mM) a los tubos que contenían el tejido molido. Inmediatamente de haber hecho ésto se incubaron en un termoblock (Thermo Fisher Scientific™ modelo: 2000-1CEQ) a 65°C por 30 minutos, Pasado ese lapso se destaparon y se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente, para después agregar a cada tubo 2 μ L de RNAasa (Sigma-Aldrich 50 mg/ml) e incubar nuevamente en el termoblock a 37°C por 1 hora. Posteriormente se agregó 400 μ L cloroformo-octanol (Meyer®) a una relación 24:1 y se homogenizó con vortex (Daigger® Scientific modelo: Vortex-Gennie 2). Inmediatamente los tubos se colocaron en una microcentrífuga refrigerada (Heraeus™ modelo: Biofuge™ Fresco™) y se centrifugaron a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C. Nota: Asegurarse que la centrífuga tenga esa temperatura al momento de centrifugar. Con la ayuda de una micropipeta (Pro-line® Biohit) se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, posteriormente se agregó a cada tubo 200 μ L de acetato de amonio 7.4 M (Meyer®) y 600 μ L de etanol absoluto frío (Meyer®). Después se incubó a -20°C por una hora. Nota: En algunos protocolos incuban toda la noche. Al haber transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C. Al término de la centrifugación se visualizó la formación de una pastilla en el fondo de cada tubo, se descartó el sobrenadante decantando el tubo con mucho cuidado para no perder la pastilla, después se lavó la pastilla adicionando 500 μ L de etanol frío al 70% (v/v), (Meyer®). Nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C. Se dejó secar la pastilla invirtiendo los tubos colocándolos sobre un papel filtro Nota: Caso contrario traerá efectos negativos al momento de cargar la muestra en el gel de agarosa y en las técnicas

Tabla 1. Reactivos necesarios para realizar una PCR múltiple a un volumen final de 25 μ L.

Reactivo	Stock	Concentración final	Volumen a tomar
Amortiguador de la Taq	10X	1X	2.5 μ L
Taq	5 U/ μ L	1 U	0.2 μ L
DNA	10 ng/ μ L	20 ng	2.0 μ L
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 μ L
Oligo T1-sentido	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ L
Oligo T1-antisentido	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ L
Oligo T11-sentido	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ L
Oligo T11-antisentido	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ L
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 μ L
H ₂ O			16.3 μ L
Total			25.0 μ L

moleculares. Al haberse secado la pastilla se disolvió con 100 μL de agua destilada, finalmente se realizó una electroforesis para verificar la integridad del DNA.

Electroforesis.

Para corroborar la integridad del DNA se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa (Invitrogen) al 0.8% (p/v), cargando en el gel 2 μL del DNA genómico y 1 μL de solución de carga 6X (azul de bromofenol 0.25%, azul de xilencianol 0.25% y glicerol) en una cámara de electroforesis (Bio-Rad modelo: Mini-Sub® Cell GT) con solución de corrida TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA pH 8.0) usando una fuente de poder (Bio-Rad modelo: POWER PACTM HC) por 45 minutos a 80 volts, 0.09 Amperes y 7 watts de potencia. Posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador (Vilber Lourmat modelo: Quantum-1000/26M) y fotografiado con una cámara (Canon modelo: G9) previamente teñido con una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich); la calidad del DNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific® modelo: Genesys 6); a 260 nanómetros (nm) y 280 nm.

Protocolo de amplificación por PCR.

Para comprobar la capacidad del DNA obtenido a utilizarse en la técnica de PCR se seleccionó un protocolo de PCR múltiple, con las condiciones reportadas por Deputy et al., (2002). En donde usaron dos parejas de iniciadores denominados: (T1F-T1R) y (T11F-T11R) que amplifican secuencias específicas de DNA genómico papaya. Para la amplificación se utilizó 2 μL de DNA genómico deoxinucleótidos trifosfato (Sigma-Aldrich), Taq polimerasa, amortiguador de PCR 10X, 25 mmol/L MgCl_2 (Biotecmol), los iniciadores fueron sintetizados por OligoT4 a una concentración de 50 nanomoles, el método de purificación fue estándar desalado, la mezcla de reacción fue realizada en tubos para PCR a un volumen final de 25 μL con el uso de un termociclador (Bio-Rad modelo PTC-100®), con el siguiente programa: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, cada ciclo consistió en 30 segundos a 95°C desnaturalización, 30 segundos a 58°C para alineamiento y 90 segundos a 72°C de extensión, realizando un total de 30 ciclos, finalmente una extensión de 7 minutos a 72°C, las concentraciones finales de los reactivos se pueden revisar en la tabla 1, los productos de amplificación fueron observados de manera similar

al DNA genómico con un gel de agarosa al 1.5% (p/v), las condiciones de operación fueron de 80 minutos a 60 volts, 0.09 Amperes y 6 watts de potencia con la incorporación de dos marcadores moleculares; (M_1) 30 fragmentos con un rango de 100 pb hasta 3,000 pb y (M_2) 11 líneas con un rango de 100 pb hasta 1,000 pb con una línea adicional de 1,500 pb.

Protocolo de digestión con enzimas de restricción.

El DNA genómico fue sometido a digestión con tres enzimas de restricción *HindIII*, *EcoRV*, *HaeIII* (Sigma-Aldrich), la mezcla de reacción consistió en 1 μL de amortiguador de la enzima 10X, 1 μL de cada enzima, 7 μL de agua desionizada estéril, 1 μL de DNA genómico, la mezcla se incubó a 37°C por una hora, terminado el tiempo, el DNA digerido fue observado mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa con las mismas condiciones de los productos de PCR.

Resultados y discusión

El presente trabajo de investigación surgió de la necesidad de contar con un protocolo de extracción de DNA apto para las regiones tropicales, la metodología aquí descrita es una modificación al reportado por Porebski, Grant, Bernard, (1997). Al excluir el uso del nitrógeno líquido se descartó los materiales implicados en la molienda que son el mortero y pistilo. La molienda del tejido deshidratado se realizó en un tubo de 1.5 mL con la ayuda de un pistilo de polipropileno.



Figura 1. Deshidratación de la hoja de papaya con silica gel, colocada en sobre papel seda dentro de una bolsa de plástico con sello hermético.

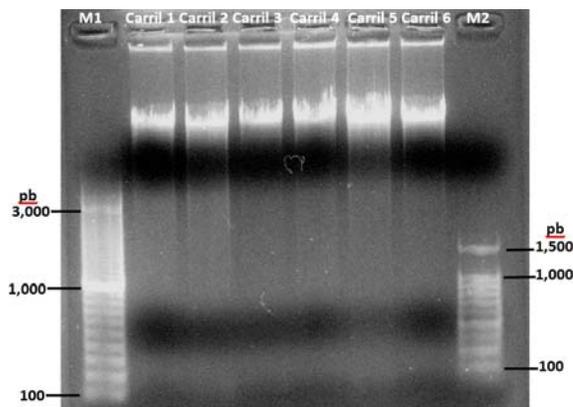


Figura 2. Visualización de DNA genómico por medio de un gel de agarosa al 0.8% p/v teñido con bromuro de etidio; M1 y M2 son marcadores moleculares, carriles 1 al 6 es la separación electroforética de 2 μ L de DNA a partir de 100 mg de tejido deshidratado procesado.

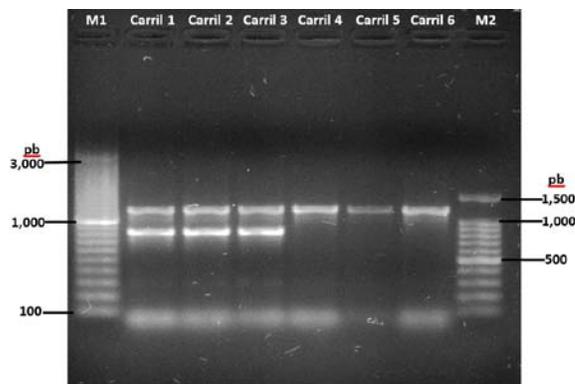


Figura 3. Visualización de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5% p/v teñido con bromuro de etidio de seis muestras de plantas de diversos tipos sexuales; M1 y M2 son marcadores moleculares, carriles 1 al 3 plantas hermafroditas con dos señales de amplificación de 1,300 pb y 800 pb Carriles 4 al 6 plantas femeninas con sólo una señal de aproximadamente 1,300 pb.

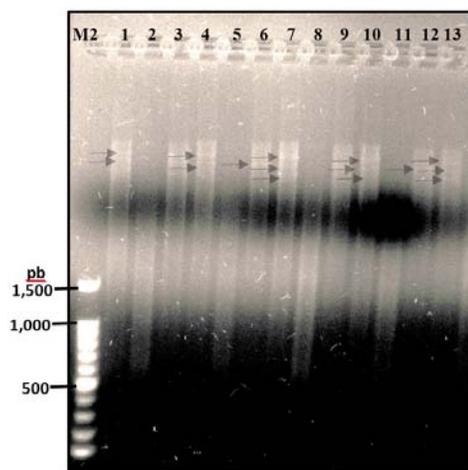


Figura 4. Visualización de los productos de la digestión en un gel de agarosa al 1.5% p/v teñido con bromuro de etidio, carriles 1,4,7,10 DNA digerido con *Hind*III, carriles 2,5,8,11, digeridos por *Eco*RV y carriles 3,6,9,12 digeridos por la acción de *Hae*III. Las flechas indican la señal de las bandas siendo muy débil debido al tipo de cámara usada que no es apta para capturar imágenes en campo oscuro.

Con la deshidratación y preservación del tejido vegetal por silica gel (figura 1), se obtuvo DNA genómico de calidad de acuerdo a la relación de las lecturas de densidad óptica en el espectrofotómetro de λ 260/ λ 280 de 1.85 a 1.94 valores que son considerados apropiados para ser usado en estudios moleculares como se puede apreciar en la figura 2.

El éxito de esta metodología es debido a la correcta preservación del tejido vegetal que se realiza con la silica gel, evitando la degradación de los ácidos nucleicos, la facilidad de moler el tejido. Al adicionar la solución amortiguadora de extracción en el mismo tubo donde se hizo la molienda, se aprovechó la totalidad del tejido vegetal, optimizando así el rendimiento de la extracción de ácidos nucleicos.

Los resultados obtenidos en la reacción en cadena de la polimerasa concuerdan con los reportados por Deputy et al., (2002). Para aquellas plantas de tipo hermafrodita se espera que presenten dos bandas que oscilan entre los 1,300 pb y 800 pb para el caso de las plantas del tipo femenino sólo se espera un producto de amplificación de aproximadamente 1,300 pb ver figura 3, para el análisis con enzimas de restricción del DNA genómico fue adecuado para ser utilizado en el análisis de endonucleasas (figura 4); en el caso del enzima *Hind*III fue capaz de cortar el DNA en varios fragmentos, en cambio la enzima *Hae*III sólo fue capaz de reconocer un sitio de corte, la enzima *Eco*RV no hubo un sitio de reconocimiento.

Conclusiones

Se logró aislar DNA de calidad, integridad y pureza a partir de la deshidratación de hojas de papaya con silica gel cuyas características son óptimas para realizar estudios moleculares, en cuanto a la técnica de PCR se obtuvieron los resultados reportados en la amplificación de bandas de 1,300 pb y 800 pb. En el análisis de restricción enzimática, la enzima *Hind*III reconoció varios sitios de corte en el DNA genómico de papaya. El costo de la herramienta molecular es probablemente menor al descartar el uso del fenol, proteinasa K, polivinilpirrolidona, betamercaptoetanol, nitrógeno líquido y materiales de molienda que normalmente son usados en la mayoría de los protocolos que en conjunto encarecen la extracción. El resto de la hoja preservada en silica gel se puede usar para futuras extracciones.

Los resultados mostrados sugieren que esta técnica, aplicada a las hojas de papaya es apropiada para adoptarla con la sustitución de nitrógeno líquido, ahora bien resulta interesante poder adoptar esta metodología de deshidratación, preservación y extracción de ácidos nucleicos a otras especies vegetales de interés agrícola, forestal y ornamental propias de las regiones tropicales como el mango (*Mangifera indica* L.), limón (*Citrus aurantifolia* Swingle), café (*Coffea arabica* L.), cacao (*Theobroma cacao* L.), caoba (*Swietenia humilis*), cedro (*Cedrela odorata* L), mangle (*Rhizophora mangle* L.), familia *Orchidaceae* entre otros.

Bibliografía

- Abarshi, M., Mohammed, I., Wasswa, P., Hillocks, R., Holt, J., Legg, J., ... Maruthi, M. (2010). Optimization of diagnostic RT-PCR protocols and sampling procedures for the reliable and cost-effective detection of Cassava brown streak virus. *Journal of Virological Methods*. Vol. 163(2). 353-359.
- Bartlett, J. M. y Stirling, D. (2003). PCR Protocols. New Jersey: Humana Press.
- Chase, M. y Hills, H. (1991). Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon*. Vol. 40(2). 215-220.
- Deputy, J., Ming, R., Ma, H., Liu, Z., Fitch, M., Wang, M., Manshardt, R., Stiles, J. (2002). Molecular markers for sex determination in Papaya (*Carica Papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*. Vol. (106). 107-111.
- Esquivel, M., Tornet, Y., Aranguren, M., Ramos, R., Rodríguez, K., Pastor, M. (2008). Caracterización de los frutos de cuatro cultivares de papaya del grupo solo, introducidos en Cuba. *Agronomía costarricense*. Vol. 32(2). 169-175.
- FAO (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. [en línea] Disponible en: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> [Revisado el 6 de junio de 2015].
- Huang, Q., Wang, X., Kong, H., Guo, Y., Guo, A. (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12(19). 2727-2732.
- Krishna, K., Paridhavi, M., Patel, J. (2008). Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Natural product radiance*. Vol. 7(4). 364-373.
- Ogata, T., Yamanaka, S., Shoda, M., Urasaki, N., Yamamoto, T. (2016). Current status of tropical fruit breeding and genetics for three tropical fruit species cultivated in Japan: pineapple, mango, and papaya. *Breeding science*. Vol. 66(1). 69-81.
- Oliveira, E., Costa, J., Santos, L., Carvalho, F., Silva, A., Dantas, J. (2011). Molecular characterization of papaya genotypes using AFLP markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Vol.33(3). 849-858.
- Porebski, L., Grant, B., Bernard, B. (1997). Modification of a CTAB DNA Extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 15 (1). 8-15.
- SIAP (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [en línea] Disponible en: <http://info-siap.siap.gob.mx> [Revisado el 19 septiembre de 2016].
- Stiles, J., Lemme, C., Sondur, S., Morshidi, M., Manshardt, R. (1993). Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 85(6-7). 697-701.
- Ventura, J., Costa, H., da Silva, J. (2004). Papaya diseases and integrated control. *Diseases of Fruits and Vegetables*. Vol. 2. 201-268.
- Whitehouse, A. y Hannah, H. (2007). Comparison of five commercial DNA extraction Kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Molecular and Cellular Probes*. Vol. 21 (2). 92-96.

Cruz-Vázquez J. K¹

Anaya-López J. L²

Montero-Tavera V²

Ruiz-Ruiz Francisco Gumaro¹

¹ Universidad del Mar Campus Puerto Escondido

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias