

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
División de Ciencias Agronómicas



**COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN
EN EL GÉNERO *Zea***

TESIS

QUE PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTA:

DELIA ERIKA MORALES PADILLA

Zapopan, Jalisco, Abril de 2006



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
Biológicas y Agropecuarias
CARRERA DE INGENIERO AGRÓNOMO
COMITE DE TITULACIÓN

M.C. SALVADOR MENA MUNGUÍA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
PRESENTE

Con toda atención nos permitimos hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobada la modalidad de titulación TESIS E INFORMES, opción, TESIS, con el título:

**" COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN EL GÉNERO
Zea"**

El cual fue presentado por él (los) pasante(s):

DELIA ERIKA MORALES PADILLA

El Comité de Titulación, designó como director y asesores, respectivamente, a los profesores:

| | |
|---|-----------------|
| M.C. MARTHA ISABEL TORRES MORÁN | DIRECTOR |
| DR. MOISÉS MARTÍN MORALES RIVERA | ASESOR |
| M.C. LINO DE LA CRUZ LARIOS | ASESOR |

Una vez concluido el trabajo de titulación, el Comité de Titulación designó como sinodales a los profesores:

| | |
|---|-------------------|
| DR. JOSÉ RON PARRA | PRESIDENTE |
| DR. SALVADOR MENA MUNGUÍA | SECRETARIO |
| DR. JOSÉ DE JESÚS SÁNCHEZ GONZÁLEZ | VOCAL |

Se hace constar que se han cumplido los requisitos que establece la Ley Orgánica de la Universidad de Guadalajara, en lo referente a la titulación, así como el Reglamento del Comité de Titulación.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal. a 3 de mayo de 2006.

M.C. SALVADOR GONZÁLEZ LUNA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. MARÍA LUISA GARCÍA SAHAGÚN
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DEDICATORIAS

A Dios

Por lo que nos invita a ser y por darme la oportunidad de terminar satisfactoriamente mi carrera profesional.

A mis padres:

María Padilla y José Morales, con respeto, cariño y admiración por enseñarme a luchar, por todos los principios inculcados y por todo aquello que es difícil expresar en unas cuantas líneas..... gracias a los dos.

A mis hermanos:

Juan Manuel, Salvador, Armando y Alma Rosa

A mis dos pequeños sobrinos:

Yenifer y José Antonio Morales Guerrero que espero sembrar la semilla del crecer, personal y profesionalmente.

A todos mis amigos y profesores del CUCBA

A mi compañero y amigo Ing. José Refugio González Onofre, al M.C. Lino de la Cruz Larios por su gran profesionalismo, dedicación, apoyo y amistad brindada.

AGRADECIMIENTOS

A la M.C. Martha Isabel Torres Morán, directora de la presente y al Dr. José de Jesús Sánchez González quienes me dieron la oportunidad y apoyo en lo experimental y estructuración en este trabajo de investigación.

A mis asesores:

Dr. Moisés Martín Morales Rivera, M.C. Lino de la Cruz Larios quienes apoyaron en la parte estadística y revisión precisa de este trabajo.

A los sinodales:

Dr. José Ron Parra, Dr. Salvador Mena Munguía y Al Dr. José de Jesús Sánchez González, por sus puntuales observaciones y correcciones para la mejoría de esta tesis.

A mis compañeros:

Paulina Velasco, Guadalupe Martín, Guadalupe Rodríguez y Moisés Ramírez por su apoyo y participación para la realización de este trabajo.

A la Dr. Anne Santerre L. Por su colaboración en la presente.

A la Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por permitirme obtener las bases de una profesión.

A todos y cada uno de los maestros que fueron participes en mi formación profesional.

INDICE

| | Pág. |
|---|------------|
| INDICE DE CUADROS | <i>i</i> |
| INDICE DE FIGURAS | <i>ii</i> |
| RESUMEN | <i>iii</i> |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Objetivos | 2 |
| 1.2 Hipótesis | 2 |
| | |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Célula y ADN | 3 |
| 2.2 Extracción de ADN genómico | 6 |
| 2.3 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por espectrofotometría | 7 |
| 2.4 Cuantificación de ácidos nucleicos | 9 |
| 2.5 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN electroforesis | 9 |
| 2.6 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis | 10 |
| 2.7 Tinción de geles | 12 |
| 2.8 Factores que determinan la elección de un método de extracción de ADN | 13 |
| | |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 3.1 Colecta de tejido vegetal | 14 |
| 3.2 Métodos de extracción | 14 |
| 3.3 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por espectrofotometría | 16 |
| 3.4 Determinación de la calidad del ADN en geles de agarosa | 16 |
| 3.5 Tinción del gel | 16 |
| 3.6 Análisis estadístico | 17 |
| | |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 18 |
| 4.1 Determinación de la calidad y cantidad por electroforesis | 18 |
| 4.2 Análisis de varianza | 19 |
| 4.3 Caracterización espectrofotométrica de las muestras | 22 |
| 4.4 Elección del método de extracción | 24 |
| | |
| V. CONCLUSIONES | 26 |
| | |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 27 |
| | |
| ANEXO | |
| Protocolos de extracción | |
| Clarke <i>et al</i> | 29 |
| Saghai-Marooof <i>et al</i> | 30 |
| Keb-Llanes <i>et al</i> | 31 |
| Preparación de las soluciones | 32 |

INDICE DE CUADROS

| Cuadro | Título | Pág. |
|--------|---|------|
| 1 | Absorción de luz a las diferentes longitudes de onda específica en el espectro de luz | 8 |
| 2 | Espectro de resolución de fragmentos lineales de ADN | 11 |
| 3 | Plantas del género <i>Zea</i> utilizadas para la extracción de ADN | 14 |
| 4 | Comparación de los pasos utilizados en cada método de extracción de ADN | 15 |
| 5 | Lista de reactivos y concentración utilizados por método | 15 |
| 6 | Datos generales de Concentración de ADN ($\mu\text{g/mL}$) y relación $\text{DO}_{260/280}$ en muestras del género <i>Zea</i> por tres métodos de extracción. | 19 |
| 7 | Análisis de varianza para la variable Concentración de ADN en accesiones del género <i>Zea</i> . | 20 |
| 8 | Medias generales de los factores Métodos de extracción (A) y Accesiones (B) para la variable Concentración de ADN en $\mu\text{g/mL}$ | 20 |
| 9 | Análisis de varianza para la variable Calidad de ADN (DO a 280nm) en Accesiones del género <i>Zea</i> por tres métodos de extracción | 21 |
| 10 | Medias generales de los factores Métodos de extracción (A) y Accesiones (B) para la variable Densidad óptica a 280 nm. | 21 |

INDICE DE FIGURAS

| Figura | Titulo | |
|--------|---|----|
| 1 | Subunidades que componen la molécula de ADN (IPGRI, 2003) | 4 |
| 2 | Esquema operativo de los protocolos de extracción de ADN. | 6 |
| 3 | Gel de agarosa producto de la electroforesis de 8 plantas del género <i>Zea</i> . En la parte superior se indica el marcador de peso molecular 22 kb (M), la repetición (I-III) y el número de muestra (1-8). En la parte izquierda, los métodos utilizados | 18 |
| 4 | Caracterización Espectrofotométrica de ADN de 8 muestras del género <i>Zea</i> obtenido por el método Clarke <i>et al.</i> , 1989 | 23 |
| 5 | Caracterización espectrofotométrica de ADN de 8 muestras del género <i>Zea</i> extraído por el método de Saghai-Marooof <i>et al.</i> , 1984. | 23 |
| 6 | Caracterización Espectrofotométrica de ADN de 8 muestras del género <i>Zea</i> extraído por el método Keb-Llanes <i>et al.</i> , 2002 | 24 |

RESUMEN

La obtención de ADN de buena calidad es el primer paso para la aplicación de técnicas moleculares que persiguen fines específicos, tales como la caracterización molecular de poblaciones o relaciones filogenéticas entre especies.

En el presente trabajo se compararon los métodos de extracción reportados por Clarke *et al.*, (1989), Saghai-Marroof *et al.*, (1984) y Keb-Llanes *et al.*, (2002). Se midió calidad y cantidad del ADN obtenido de todas muestras por medio de electroforénesis y espectrofotometría, además se realizó una caracterización espectrofotométrica de las mismas. Se realizó análisis de varianza para la concentración de ADN en las muestras y para calidad de las mismas.

Se encontró diferencia altamente significativa en la utilización de los métodos de extracción. El método con el cual se obtuvo una mayor concentración de ADN fue el método de Shagai – Marroof, *et al.*, 1984 y la mayor calidad de ADN en las muestras, se obtuvo con el método Keb-Llanes, *et al.*, 2002.

La caracterización espectrofotométrica de las muestras, fue un auxiliar para determinar la calidad y la concentración de ADN en las mismas.

I. INTRODUCCIÓN

A partir de la descripción de la molécula de ADN (ácido desoxirribonucleico) en 1869 por F. Miescher, se sentaron las bases para el entendimiento de la función celular. Sin embargo, la demostración definitiva de su responsabilidad como portador de las características hereditarias, se realizó varios siglos más tarde. La asociación de ésta molécula con las bases químicas de la herencia, se efectuó un poco antes de que J.D. Watson y F.H. C. Crick ofrecieran en 1950 un modelo de su estructura física. Este modelo, también propuso un mecanismo para explicar la replicación del ADN y el origen espontáneo de las mutaciones (Malacinski, 2002).

Después de estos descubrimientos, el campo de la genética molecular sufrió un rápido avance y ha constituido una herramienta de apoyo muy valiosa para diversos campos de las ciencias biológicas. Su éxito inicial y la acumulación de enormes cantidades de información, permitió que desde entonces los investigadores de diversos campos tengan disponibles estas técnicas moleculares para su aplicación en investigación ya que permiten analizar diferencias a nivel molecular en plantas y otros organismos y han demostrado su utilidad en la caracterización e identificación de segmentos específicos del genoma.

Con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), surgieron los llamados en forma genérica Marcadores Moleculares y se ha incrementado considerablemente su uso en el mejoramiento y genética vegetal. Técnicas como RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLPs (Restriction Fragments Length Polimorphism), AFLPs (Amplification Fragment Length Polimorphisms) y SSRs (Simple Sequence Repeats) que han sido aplicadas en varias facetas de investigación y su utilización parte de la posibilidad de contar con la molécula "objetivo" que es el ADN.

La obtención de ADN de buena calidad, es el primer paso para la aplicación de todas esas técnicas moleculares que persiguen fines específicos, tales como la caracterización molecular de poblaciones o relaciones filogenéticas entre especies.

1.1 Objetivo

Los objetivos del presente trabajo son:

- Evaluar la calidad y cantidad de ADN obtenido de plantas del género *Zea* por tres métodos de extracción.

- Realizar una caracterización espectrofotométrica del ADN obtenido por los tres métodos.

1.2 Hipótesis

La hipótesis planteada para el presente trabajo es:

- Pueden encontrarse diferencias significativas en la calidad y cantidad de ADN que se obtiene del género *Zea*, utilizando diferentes métodos de extracción.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Célula y ADN

El concepto de célula ha sido modificado con el tiempo, a medida que se amplían los conocimientos científicos, pero aún puede ser considerada como la unidad biológica más pequeña capaz de realizar las funciones vitales básicas, crecer y dividirse.

En 1838, Robert Brown descubrió la existencia constante del núcleo en células eucariotas, el cual sigue definiéndose como una estructura fundamental constante y definida.

En 1870, el bioquímico Friedrich Meischer obtuvo una sustancia química no conocida a partir del núcleo, un material ácido con muy alto contenido de fósforo. Debido a que estaba en el núcleo y a sus propiedades ácidas, se dio a este material el nombre de ácido nucleico. A principios de 1900, cuando se descubrió que los cromosomas eran los portadores de la información genética, los estudios se enfocaron en el análisis de su composición química. Los bioquímicos descubrieron que un cromosoma eucariótico está compuesto sólo de proteína y una clase específica de ácido nucleico, el ácido desoxirribonucleico (ADN). Por lo tanto, una de estas sustancias debía de contener un plano hereditario de la célula Gama (1997).

En la actualidad, se sabe que los ácidos nucleicos son componentes celulares en los que radica la clave de la transmisión de las características hereditarias. Los ácidos nucleicos son el ADN y el ácido ribonucleico o ARN. Son compuestos de elevado peso molecular y de estructura muy compleja, formada por la condensación de cientos de miles de unidades menores llamadas nucleótidos.

Los ácidos nucleicos son sustancias de enorme significado para la célula y para la vida misma, porque en el acomodo de sus subunidades o nucleótidos radica toda la información hereditaria. Los ácidos nucleicos son largas cadenas de cuatro nucleótidos distintos (Figura 1), los cuales tendrán un lugar preciso en la secuencia que forma la cadena de ADN (IPGRI, 2003).

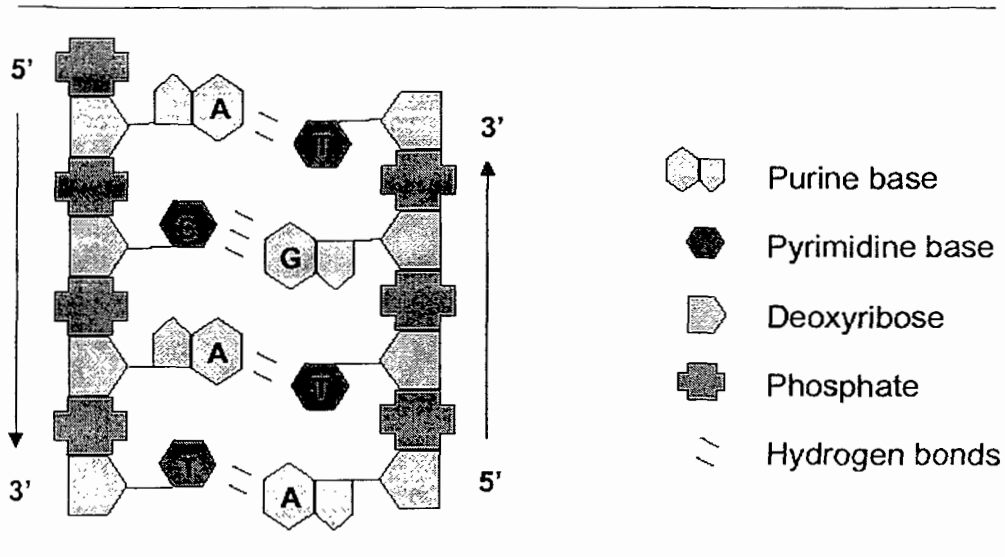


Figura 1. Subunidades que componen la molécula de ADN (IPGRI, 2003)

Los monómeros del ADN y ARN (nucleótidos) constan de una base nitrogenada que puede ser purina o pirimidina, un azúcar pentosa ribosa o desoxirribosa y un grupo fosfato. Para facilitar su estudio, se han numerado los carbonos de los azúcares con los números 1' (uno prima) a 5' (cinco prima). En el primer carbono se encuentra unida la base nitrogenada y las cadenas del ácido nucleico se forman con los enlaces fosfodiéster entre el carbono 5' de un azúcar y el 3' de la siguiente (Figura 1).

Las bases nitrogenadas púricas son la Adenina (A) y la Guanina (G), y las pirimídicas son la Citosina (C), Timina (T) y Uracilo (U).

Dentro del núcleo de la célula eucariota, se encuentra la mayor cantidad de ADN que posee el genoma de un organismo. Generalmente se encuentra en forma de cromatina que aparece como masas densas dentro del jugo nuclear. La cromatina contiene el ADN que posee la información hereditaria y formará el cromosoma en asociación con algunas proteínas cuando la célula va a dividirse.

El principal componente de los cromosomas es el ADN, a su vez el cromosoma está formado por unidades de material hereditario llamados genes.

En la actualidad ha sido debidamente comprobado que el ADN que forma a los genes es el responsable de la transmisión de las características hereditarias. El ARN es el encargado de llevar la información del núcleo a los ribosomas que se encuentran en el citoplasma celular donde está el ARN ribosomal. Los ribosomas son los orgánulos celulares en donde se fabrican las proteínas (Gama, 1997).

En las célula eucariota, existe ADN también en otros organelos, es decir, en la mitocondria, los ribosomas y en el caso de la célula vegetal, el cloroplasto.

ADN DE MITOCONDRIA (mtADN).

Con pocas excepciones, el ADN de las mitocondrias es una molécula doble circular de longitud muy variable en número de pares de bases (200 a 2400 kb). El ADN de las mitocondrias se transmite sin recombinación predominante a través del progenitor femenino. La molécula entera de mtADN se considera como una unidad genética completa con alelos múltiples y puede ser usada para la búsqueda de filogenias maternas. Este mtADN ha sido ampliamente utilizado para resolver relaciones filogenéticas en gran variedad de niveles taxonómicos, analizar patrones de introgresión y ha servido como marcador genético en el análisis de estructura de poblaciones y flujo genético (Sánchez, 2004).

ADN DE CLOROPLASTOS (cpADN).

Este tipo de ADN se transmite a través del progenitor femenino en la mayoría de la plantas aunque existe información de transmisión biparental o paterna (Awise, 1994; citado por Sánchez, 2004). Como en el caso de mtADN, el ADN de cloroplastos puede ser de gran utilidad en estudios de poblaciones de plantas. Por ejemplo cuando el cpADN se hereda por el progenitor femenino, se puede dispersar en semillas pero no en polen. En este caso, es posible contrastar la información del cpADN con un marcador de herencia Mendeliana para evaluar la influencia relativa de dispersión de semillas y polen en el flujo genético total. Varios autores indican que este tipo de marcador es una de las herramientas más poderosas para investigar relaciones filogenéticas en plantas. Una de las principales limitaciones de esta técnica es la necesidad de secuenciar el ADN (Sánchez, 2004).

2.2 Extracción de ADN genómico

En la actualidad se han desarrollado muchos métodos para aislar ADN de alto peso molecular a partir de diferentes tejidos de plantas. Dichos métodos difieren básicamente a partir del tejido que utilizan para la extracción, el cual puede ser fresco, liofilizado, congelado y en cantidades que difieren según la condición del tejido (Hillis *et al.*, 1996). Pueden diferir además en el tipo de compuestos utilizados en los diferentes pasos que constituyen un protocolo de extracción, como es la precipitación de las proteínas y precipitación y lavado del ADN (Valadez *et al.*, 2000).

Debe tomarse en cuenta, que todos los protocolos de extracción de ADN, poseen pasos comunes que se utilizan para realizarla. En la Figura 2, se mencionan los pasos principales que componen los protocolos.

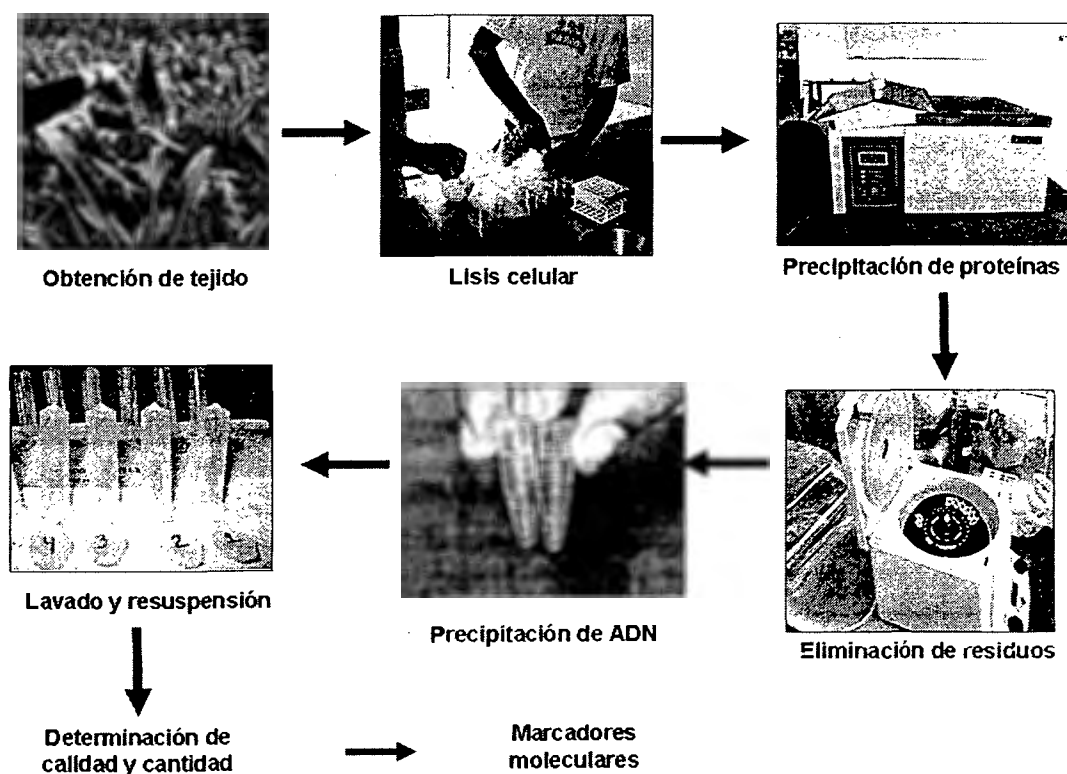


Figura 2. Esquema operativo de los protocolos de extracción de ADN.

Muchos de los protocolos que se han publicado, mencionan la importancia de la purificación del ADN, esto es, la remoción de sustancias contaminantes como polisacáridos y polifenoles cuya presencia en los tejidos varía según la especie de que se trate y que se encuentran presentes en las muestras de ADN extraído. Estas sustancias, a menudo interfieren con los procesos de digestión con enzimas de restricción, electroforesis, secuenciación, PCR, etc. (Murria y Pitas, 1996; Csaikl *et al.*, 1998; Rogstad, 2003).

En el capítulo de materiales y métodos se describen los protocolos utilizados en el presente estudio.

2.3 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por espectrofotometría

Muchos métodos para el análisis cuantitativo de productos biológicos se basan en la formación de soluciones coloreadas en las que la intensidad del color obtenido puede utilizarse como medida de la concentración de la sustancia a determinar, por lo que para la cuantificación de las soluciones se realiza una comparación de la intensidad del color producida por una muestra (muestra a determinar) con la producida por una patrón, conocida como referencia (blanco de calibración). Además, se pueden hacer análisis cuantitativos haciendo un barrido de la solución a determinar sobre una amplitud de longitudes de onda de luz de interés proporcionada por una porción de absorbencia o transmitancia de la muestra.

La intensidad del color se establece en función del grado de absorción de luz de las longitudes de onda específicas del espectro visible (400 y 750nm); las longitudes de onda que están fuera de esta amplitud (ultravioleta o infrarrojo) son invisibles para el ojo humano (Cuadro 1).

Por medición espectrofotométrica se entiende la medición de la intensidad de luz en un estrecho intervalo de longitudes de onda del espectro. Los principios de esto se basan en la ley de Lambert Beer, la cual especifica: “la concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de luz absorbida o inversamente proporcional al logaritmo de la luz transmitida”.

Transmitancia (T) Es la capacidad de una solución para transmitir la luz, es decir, la relación entre la luz transmitida (luz que emerge de una solución) y la intensidad de la luz entrante o incidente.

Absorbencia (1). Es la cantidad de luz absorbida por volumen por una solución como densidad óptica (DO), es decir, el porcentaje de luz absorbida por la solución. En condiciones apropiadas, la densidad óptica o absorbencia es directamente proporcional a la concentración del componente coloreado de la solución. Por tanto, la absorbencia es el logaritmo negativo de la transmitancia ($1 = \log T$).

CUADRO 1. Absorción de luz a las diferentes longitudes de onda específica en el espectro de luz

| Longitud de onda (nm) | Nombre de la región del espectro | Color transmitido | Color absorbido |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| 180-220 | UV lejano | No visible | |
| 220-380 | UV | No visible | |
| 380-430 | Visible | Violeta | Verde amarillento |
| 430-475 | Visible | Azul | Amarillo |
| 475-495 | Visible | Azul-verdoso | Anaranjado |
| 495-505 | Visible | Verde- azuloso | Rojo |
| 505-555 | Visible | Verde | Púrpura |
| 555-575 | Visible | Verde-amarillento | Violeta |
| 575-600 | Visible | Amarillo | Azul |
| 600-620 | Visible | Anaranjado | Azul-verdoso |
| 620-700 | Visible | rojo | Verde- azuloso |

El principio en que se basa la fotometría es el siguiente: se deja pasar la luz de una longitud de onda adecuada a través de una solución de referencia, que es por lo general el disolvente o el reactivo en blanco (testigo o blanco), colocado en un recipiente de dimensiones fijas llamado cubeta. La intensidad de luz que emerge de la solución de referencia se fija en un valor exacto en la escala del espectrofotómetro, el cual es 0 para absorbencia ó 100 para transmitancia. La solución de referencia se reemplaza por la solución problema a cuantificar en una cubeta similar y se mide la intensidad de luz emergente con relación a la establecida para la solución testigo o blanco; con esta relación se mide la transmitancia (Zañudo, 2003)

2.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

Los fundamentos para este análisis se basan en que el ADN absorbe luz Ultravioleta (UV). La absorción máxima es de 260 nm, lo cual permite calcular la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra. Una densidad óptica de uno $DO = 1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de doble cadena de ADN. Las proteínas absorben luz UV a 280nm y la relación entre la lectura de absorbancia A260:A280 de una solución de ADN se utiliza como indicador de contaminación de proteínas o ARN. Así la relación en A260:A280 aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. En general, una preparación pura de ADN de doble hebra presenta una relación de 1.8 o 2.0. Relaciones más altas se deben frecuentemente a contaminación de ARN, mientras que relaciones menores entre 1.4-1.7 pueden indicar la presencia de proteínas o impurezas (Sambrook et al., 1989).

2.5 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por electroforesis

Determinación de la calidad del ADN en geles de agarosa

El grado de degradación del ADN puede ser estimado por la electroforesis de una alícuota de la muestra en geles de agarosa. El ADN de peso molecular alto aparece como banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos, mientras que el material parcialmente degradado, forma un barrido (parecido a una mancha) de fragmentos pequeños a lo largo del carril haciendo que la definición de la banda citada, pierda su nitidez o no se aprecie.

Algunas veces el ADN puede estar contaminado con otras sustancias que también absorben la radiación UV, como por ejemplo compuestos fenólicos y polisacáridos, principalmente. La presencia de estos compuestos, puede evitar la interpretación correcta de la calidad, e incluso, la cantidad del ácido nucleico que está siendo analizado. Una forma rápida de estimar la pureza de estas moléculas, es a través de la fluorescencia que emite el bromuro de etidio cuando está mezclado con ellas. Este compuesto químico tiene afinidad por moléculas del ADN o ARN de doble cadena entre las que se intercala, de manera que al irradiar el gel con una fuente de luz UV se puede apreciar la ubicación, calidad y cantidad de la

molécula en cuestión. La estimación puede llevarse a cabo, debido a que la fluorescencia emitida es proporcional al total de la masa del ADN o ARN.

La cantidad de ácidos nucleicos en la muestra, puede ser emitida al comparar el campo fluorescente de los mismos respecto a la serie de estándares utilizados (por ejemplo, ADN del fago lambda o diluciones de ADN cuantificado previamente en el espectrofotómetro).

2.6 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis

Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN producidos por el corte de las enzimas de restricción es necesario utilizar una matriz inerte y semisólida. Esta matriz o soporte, puede ser de agarosa o poliacrilamida y dependiendo de la longitud esperada de los fragmentos se opta por utilizar alguna de las dos.

La agarosa normalmente separa fragmentos que van desde 200 pb a 30 Kb; mientras que la poliacrilamida resuelve fragmentos inferiores a 200 pb. La movilidad del ADN a través de la matriz está en función de su carga negativa, por lo que los fragmentos tenderán a emigrar hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis.

a. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es un método simple y eficiente para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN de varias longitudes. Los geles estándar de agarosa separan y resuelven fragmentos de 0.1 a 25 Kb. Cuando se requiera resolución de fragmentos mayores de 10 a 2000 Kb, se recomienda el uso de la electroforesis de pulso de campo).

El porcentaje de agarosa con el que se elabora el gel, depende del tamaño de las moléculas de ADN que van a separarse. Normalmente, la agarosa al 0.8% separa fragmentos provenientes de la digestión con enzimas de restricción que reconocen seis pares de bases, mientras que la concentración de 1.0%, se utiliza para separar fragmentos generados por las enzimas que reconocen cuatro pares de bases, debido a que son más pequeños. Sin embargo, el uso de otras concentraciones de agarosa, permiten hacer más eficiente la separación de los

fragmentos. En el Cuadro 2 se muestran las concentraciones óptimas para la agarosa marca METHAPHOR™

CUADRO 2. Espectro de resolución de fragmentos lineales de ADN

| (%) de agarosa | Fragmentos de ADN en kb |
|----------------|-------------------------|
| 0.5 | 30 a 1.0 |
| 0.7 | 12 a 0.8 |
| 1.0 | 10 a 0.5 |
| 1.2 | 7 a 0.4 |
| 1.5 | 3 a 0.2 |

b. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida (geles PAA) se utilizan principalmente para separar fragmentos de ADN de bajo peso molecular (de 50 a 1000 pb), como son los productos de reacciones de amplificación o productos de digestión con enzimas de restricción que requieren de una mayor definición, respecto a la obtenida en geles de agarosa. Dependiendo de la longitud del producto a separar, la concentración de poliacrilamida en el gel puede ser variable; por ejemplo, para resolver fragmentos de 80 a 500 pb la concentración utilizada normalmente es de 5%; para fragmentos de 40 a 200 pb, la concentración es de 12%; para fragmentos de 6 a 100 pb se utiliza 20% de poliacrilamida. Los geles de PAA no desnaturalizantes se utilizan para la separación de bases (productos de DAF, AP-PCR), se recurre a los geles PAA desnaturalizantes que contienen urea o formaldehído.

Los geles PAA se preparan a partir de una mezcla de monoacrilamida, bisacrilamida, TEMED y persulfato de amonio. La proporción de las dos primeras sustancias influyen en el tamaño del poro; el persulfato de amonio y el TEMED inician la polimerización.

c. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante

Este tipo de geles se utiliza para la separación de fragmentos de ADN de cadena sencilla o para asegurar la migración de fragmentos de bajo peso molecular que pudieran verse afectados durante el corrimiento por la formación de estructuras secundarias debido a la complementariedad de bases y la concentración del gel varía desde 4 a 8%.

2.7 Tinción de geles

La visualización de las moléculas de ADN, ARN y proteínas separadas mediante electroforesis, se lleva a cabo mediante el uso de ciertos compuestos químicos en solución que tienen la capacidad de reconocer a estas macromoléculas en el gel e interaccionar con ellas. Dependiendo del tipo de compuesto Químico que se utilice, su visualización puede ser directa o con luz UV. Varios métodos se han desarrollado para tales efectos, pero aquí solo se describen algunos que se utilizan de manera frecuente en la tinción de ácidos nucleicos.

a. Tinción con bromuro de etidio

El ADN puede visualizarse en el gel por previa tinción con una solución de bromuro de etidio (0.4 a 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 15 minutos y posterior observación con luz UV. El bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino-6- etil-5-fenilfenantridio,) es un colorante fluorescente y cancerígeno que se intercala entre los pares de bases de la doble cadena del ADN ó del ARN. La cantidad de ADN que puede visualizarse dependerá del grosor del gel y del tamaño del pozo. En un minigel (de 10 a 11mL de agarosa en una placa de vidrio de 7.5x5 cm.) y un pozo de 0.3 cm., la cantidad mínima de ADN que se puede visualizar es de $\sim 1\text{ng}$. También es posible la detección de los ácidos nucleicos cuando el bromuro de etidio se incorpora a la muestra antes de la electroforesis

b. Tinción con sales de plata

Esta técnica de tinción se utiliza para la visualización de proteínas y ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida, en donde los iones de plata reaccionan con las macromoléculas a un pH mayor de 10 formando complejos. Durante la reacción, las macromoléculas quedan reducidas y la plata se deposita en los sitios de reducción, por lo que el ácido nucleico o las proteínas pueden ser fácilmente visualizados.

Esta técnica de tinción es altamente sensible a impurezas contenidas en las sustancias químicas, Sin embargo la pureza de éstas, proveen tinciones reproducibles sobre todo en geles con productos tipo DAF. Los reactivos citados abajo permiten una tinción confiable del ADN. Nitrato de plata, carbonato deshidratado de sodio, tiosulfato de sodio, ácido acético glacial y Formaldehído 37% (Se pueden utilizar las marcas Roth, Merck y Serva).

2.8 Factores que determinaran la elección de un método de extracción de ADN

Los factores que deben tomarse en cuenta para la elección del mejor método de extracción, son:

Cantidad de ADN Obtenido. La mayoría de las reacciones de amplificación, parten de cantidades que se encuentran en el orden de 50 a 100 ng/μl (Valadez *et al* 2000).

Calidad. Deben tomarse en cuenta la cantidad de polifenoles presentes en la muestra, así como ARN y polisacáridos, que inhiben la acción de enzimas como la polimerasa y las enzimas de restricción, que afectan significativamente los resultados que pueden obtenerse en la utilización de marcadores moleculares (Murray, *et al.*, 1996; Csaikl *et al.*, 1998; Rogstad, 2003).

Facilidad y costos. Estos factores depende de los pasos que se realicen en la extracción, algunos métodos dan énfasis a la precipitación de proteínas, o bien al lavado del ADN y por otra parte, según los diferentes reactivos que utilice cada método, pueden encontrarse residuos de los mismos, que no se eliminan durante los lavados y esto interfiere de igual manera con la acción de las enzimas en la restricción o en la PCR. Los costos dependen de la cantidad de reactivos empleados y del tiempo utilizado en el procesamiento de las muestras.

Reproducibilidad. Debe garantizar la obtención de cantidad y calidad constantes en las muestras procesadas, así como la estabilidad del ADN en almacenamiento.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de tejido vegetal

El material genético usado consistió de dos líneas homocigóticas de maíz, la cruza simple entre dichas líneas y cinco accesiones de tres especies de teocintle (Cuadro 3). Los materiales fueron sembrados durante el ciclo de verano del 2005 en el campo experimental del CUCBA de la Universidad de Guadalajara. Se tomó muestra fresca de cada uno de los materiales para ser procesada por los tres métodos y se realizaron tres repeticiones de cada extracción.

CUADRO 3. Plantas del género *Zea* utilizadas para la extracción de ADN

| No. | Accesión | Especie | Raza/material | Procedencia |
|-----|-----------------|---|---------------|------------------------------------|
| 1 | LUG – 14 | <i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i> | Línea | Programa maíz CUCBA |
| 2 | LUG – 03 | <i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i> | Línea | Programa maíz CUCBA |
| 8 | LUG14 x LUG03 | <i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i> | Híbrido | Programa maíz CUCBA |
| 3 | JSG-RMM-LCL-480 | <i>Zea mays</i> ssp. <i>mexicana</i> | Chalco | Cocotitlán, México |
| 4 | JSG-RMM-LCL-450 | <i>Zea mays</i> ssp. <i>mexicana</i> | Mesa Central | San Agustín del Maíz, Michoacán |
| 5 | JSG-RMM-LCL-500 | <i>Zea mays</i> ssp. <i>parviglumis</i> | Balsas | Zacatlancillo, Guerrero |
| 6 | JSG-RMM-LCL-555 | <i>Zea mays</i> ssp. <i>parviglumis</i> | Balsas | Talpitita, Jalisco |
| 7 | JSG-RMM-LCL-551 | <i>Zea diploperennis</i> | - | Las Joyas, Jalisco |

3.2 Métodos de extracción

En los métodos de extracción utilizados Clarke *et al.*, (1989), Saghai-Marroof *et al.*, (1984) y Keb-Llanes *et al.*, (2002) (Cuadro 5) las diferencias residen en los compuestos utilizados como buffer, tanto de extracción como de precipitación de proteínas, lavado y precipitación de ADN. En el Cuadro 4 se observan las diferencias generales que existen en los métodos, así como los tiempos aproximados de extracción invertidos en cada uno de ellos.

Una vez extraído el ADN, se procedió a la cuantificación espectrofotométrica de la concentración de las muestras y a la observación de la calidad del ADN extraído, utilizando electroforesis en geles de agarosa.

El primer paso para extraer ADN es preparar las soluciones Buffer de extracción según el método a aplicar. Estas deben de ser preparadas poco antes de iniciar la extracción en cualquiera de los métodos (ver anexo).

Los métodos de extracción utilizados, difieren en algunos de sus pasos, las diferencias pueden observarse en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Comparación de los pasos utilizados en cada método de extracción de ADN

| PASOS | Keb-Llanes <i>et al.</i> , (2002) | Saghai-Marroof <i>et al.</i> , (1984) | Clarke <i>et al.</i> , 1989 |
|---|--------------------------------------|--|--------------------------------|
| Lisis celular | | | |
| Triturado de las muestras | N ₂ | N ₂ | N ₂ |
| Buffer de extracción utilizados | 2 | 1 | 1 |
| Precipitación de proteínas | | | |
| Temperatura y tiempo en baño María | 65° C por 10' | 60°C por 30' | 65°C por 40' |
| Eliminación de residuos de tejido | centrifugación | centrifugación | centrifugación |
| Precipitación de ADN | | | |
| Precipitación ADN | isopropanol | isopropanol | Etanol 100% |
| Lavado y resuspensión de ADN | | | |
| Lavados | Etanol 70% | Etanol de 3-4 | Etanol al 70% 3 |
| Resuspensión del ADN | 100µL T.E. | 50-100µL T.E. | 200µL T.E |
| Tiempo total aproximado para 8 muestras | 6 hrs | 4 hrs. | 5hrs |

Por otra parte, en el Cuadro 5 se muestra la lista de reactivos utilizados en cada uno de los métodos.

CUADRO 5. Lista de reactivos y concentración utilizados por método

| Keb-Llanes <i>et al.</i> , (2002) | Saghai-Marroof <i>et al.</i> , (1984) | Clarke <i>et al.</i> , 1989 |
|--|---------------------------------------|-----------------------------|
| 2% Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) (W/V) | CTAB + Bisulfito | CTAB |
| 100 mM Tris-HCL (pH 8) | Cloroformo- Octanol 24:1 | 5 M NaCl |
| 10 mM Tris | Isopropanol (-20°C) | 0.5 M EDTA PH8 |
| 20 mM EDTA | 76% etOH/0.2 M Na-acetato | PVP |
| 50 mM EDTA | 76% etOH/ 10m M Na-acetato | 1M tris pH8 |
| 1mM EDTA (Ph8) | TE (pH 8) | 14 M β-ME |
| 1.4 M NaCl | | |
| 100 mM NaCl | | |
| 4%polyvinylpyrrolidone (PVP-40) (PVP 10) (W/V) | | |
| 0.1% ácido ascórbico (W/V) | | |
| 10 mM β-mercaptoetanol | | |
| 20% Sodium dodecyl sulphate (sds) (W/V) no refrigerado | | |
| 60 mL 5 M acetato de potasio-20°C | | |
| 3 M acetato de sodium pH5.2 | | |
| 70%etanol-20°C | | |
| Isopropanol Absoluto -20°C | | |

3.3 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por espectrofotometría

Para la evaluación de calidad y cantidad de ADN obtenido, se realizaron lecturas de absorbancia de las muestras con espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 y 280 nm . Para la caracterización espectrofotométrica, se realizaron lecturas de 230 a 300 nm, en donde la lectura de 240 nm indica cantidad de carbohidratos presentes en la misma.

Se realizaron las lecturas con espectrofotómetro Jenway 6305 UV/vis.

Las variables medidas fueron: Densidad óptica de las muestras a 260 y 280 nm de donde posteriormente se infiere concentración de ADN y presencia de compuestos fenólicos contaminantes respectivamente.

Para calcular la concentración de ADN en ng/μl las muestras se diluyeron 1:200 en agua destilada y se leyeron a 260nm (espectrofotómetro Jenway 6305). La cantidad del ADN en la muestra se obtiene aplicando la fórmula:

$$ConcADN_{(\mu g / \mu l)} = [DO_{260} \times factor_dilución \times 50 \mu g / ml] / 1000$$

La pureza de las muestras de ADN es indicada en las lecturas del espectrofotómetro con la relación de absorbancia A260:A280.

La relación entre estas lecturas (DO260/280) aporta una estimación de la pureza del ácido nucleico obtenido, las preparaciones puras, muestran valores de entre 1.8 y 2.0 en esta relación (Valadez y Kahl, 2000).

3.4 Determinación de la calidad del ADN en geles de agarosa

Se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% con un grosor de 5mm para observar los fragmentos de ADN obtenidos y determinar su integridad. La corrida de electroforesis se realizó a 80 W durante 1 hora. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 21 Kb (bacteriófago λ/ EcoRI + Hind III).

3.5 Tinción del gel

La tinción del gel se llevó acabo con bromuro de etidio (25 μl de EtBr en 500 ml de agua) durante 20 minutos, posteriormente se hizo un lavado con dH₂O para

eliminar el exceso de BrEt y se colocó en transiluminador donde se tomo una impresión instantánea con película ISO 3000.

3.6 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de las lecturas 260 nm (Concentración de ADN) y 280 nm (Calidad de ADN) se efectuó un análisis de varianza para determinar diferencias significativas entre los métodos, bajo un diseño factorial AXB en donde el factor A son los métodos de extracción utilizados y el factor B son las accesiones. El análisis estadístico se realizó utilizando el Sistema de Análisis Estadístico (SAS). Se realizó una prueba de medias para cada variable medida.

La caracterización espectrofotométrica de las muestras se representa con graficas para las lecturas de absorbancia a longitudes de onda de 230 a 300 nm.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de calidad y cantidad por electroforesis

En la Figura 3, se observa el gel de agarosa donde se realizó la electroforesis (gel de calidad). La banda definida cercana a los puntos de aplicación, indica ADN de alto peso molecular. Puede observarse el tamaño aproximado del ADN genómico extraído, que en todos los casos fue ligeramente menor al primer fragmento del marcador (22,000 pb).

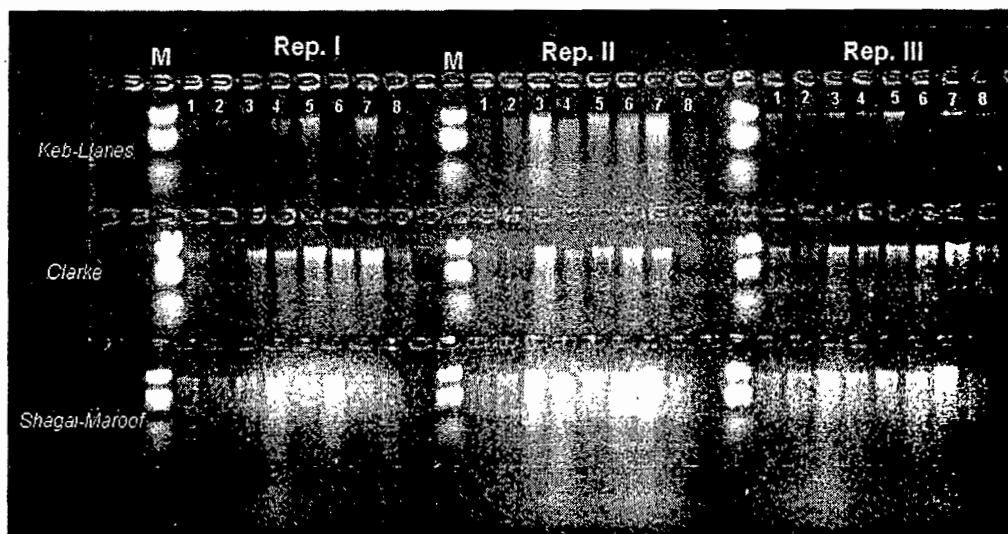


FIGURA 3. Gel de agarosa producto de la electroforesis de 8 plantas del género *Zea*. En la parte superior se indica el marcador de peso molecular 22 kb (M), la repetición (I-III) y el número de muestra (1-8). En la parte izquierda, los métodos utilizados.

Para todos los materiales se encuentra presente la banda, exceptuando para la muestra 6 (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) de la repetición III en el método Keb-Llanes, que no se percibe claramente en la figura, sin embargo, se encuentra presente el ADN debido a que se obtuvo lectura a 260 nm en el espectrofotómetro (Cuadro 6).

Se encontró una correspondencia entre la intensidad de las bandas de ADN que se muestran en el gel (Figura 3) y la concentración de ADN de las muestra del Cuadro 6. Lo anterior muestra la utilidad de la elaboración de geles de calidad, en

donde puede observarse a simple vista una aproximación de la cantidad de ADN presente y también puede observarse en forma de barrido, la presencia de impurezas o de ADN degradado en cada unos de los casos. El índice que indica calidad (relación $DO_{260/280}$) se encuentra reportado en el Cuadro 6.

4.2 Análisis de varianza

CUADRO 6. Datos generales de Concentración de ADN ($\mu\text{g/mL}$) y relación $DO_{260/280}$ en muestras del género *Zea* por tres métodos de extracción.

| | Rep. | Accesión | 1 | 2 | 8 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------|------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Clarke | I | Conc ADN | 1130 | 1420 | 1690 | 1520 | 2200 | 2080 | 1600 | 1440 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.5 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| | II | Conc ADN | 1240 | 1550 | 1300 | 1790 | 1490 | 1880 | 1540 | 1510 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.7 | 1.7 | 1.6 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.6 | 1.7 |
| | III | Conc ADN | 1150 | 2510 | 960 | 1360 | 1640 | 780 | 1110 | 4780 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.4 | 1.7 | 1.7 | 1.6 | 1.3 | 1.6 | 1.7 | 1.7 |
| Keb-Llanes | I | Conc ADN | 870 | 1710 | 700 | 1080 | 1340 | 810 | 1320 | 1730 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.7 | 1.7 | 1.6 | 1.7 |
| | II | Conc ADN | 800 | 1360 | 950 | 1160 | 1220 | 950 | 1570 | 1240 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.8 | 1.7 | 1.6 | 1.7 | 1.8 |
| | III | Conc ADN | 560 | 1270 | 2680 | 1610 | 1000 | 1640 | 1920 | 1130 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.8 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.5 | 1.6 | 1.4 | 1.7 |
| Saghai-Marroof | I | Conc ADN | 1930 | 780 | 780 | 2900 | 480 | 1930 | 480 | 2540 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.7 | 1.7 | 1.6 | 1.7 | 1.8 | 1.6 | 1.8 | 1.7 |
| | II | Conc ADN | 580 | 1140 | 1090 | 1190 | 1090 | 1140 | 1910 | 1430 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.5 | 1.6 | 1.5 | 1.6 | 1.5 | 1.6 | 1.7 | 1.6 |
| | III | Conc ADN | 2020 | 2860 | 2730 | 2760 | 2770 | 3970 | 4080 | 3370 |
| | | $DO_{260/280}$ | 1.8 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.6 | 1.7 | 1.5 | 1.6 |

Con los datos anteriores, se realizó un análisis de varianza (Cuadro 7), que muestra que existe diferencia altamente significativa entre la concentración de ADN de las muestras, según el método utilizado ($P \leq 0.002$).

CUADRO 7. Análisis de varianza para la variable Concentración de ADN en Accesiones del género *Zea*.

| FV | GL | SC | CM | F | P>F |
|-----------------------|----|----------|---------|-------|-------|
| REPETICIONES | 2 | 9102880 | 4551440 | 7.623 | 0.002 |
| FACTOR A (METODO) | 2 | 4949312 | 2474656 | 4.144 | 0.002 |
| FACTOR B (ACCESIONES) | 7 | 5126384 | 732341 | 1.227 | 0.307 |
| INTERACCIÓN | 14 | 4151008 | 296501 | 0.497 | 0.923 |
| ERROR | 46 | 27466704 | 597102 | | |
| TOTAL | 71 | 50796288 | | | |

La comparación de medias que se muestra en el Cuadro 8, indica que el método con el cual se obtuvo una mayor concentración de ADN es el método de Saghai-Marroof (1984), con el cual se obtuvo en promedio 1915 µg/mL. El material del que se obtuvo la mayor cantidad de ADN fue *Zea diploperennis*, con un promedio de 2130 µg/mL, sin embargo, para este factor la diferencia no fue significativa. En la Figura 3, puede observarse que la banda más marcada de ADN genómico que muestra el gel de agarosa es la correspondiente a la muestra 7 (*Zea diploperennis*).

CUADRO 8. Medias generales de los factores Métodos de extracción (A) y Accesiones (B) para la variable Concentración de ADN en µg/µl.

| N o. | Accesión | METODOS | | | MEDIA ESPECIE |
|--------------|-----------------|---------|------------|-------------|------------------|
| | | Clarke | Keb-Llanes | Saghai | |
| 1 | LUG - 14 | 1173 | 743 | 1510 | 1142 |
| 2 | LUG - 03 | 1827 | 1447 | 1593 | 1622 |
| 8 | C. SIMPLE | 1317 | 1443 | 1533 | 1431 |
| 3 | JSG-RMM-LCL-480 | 1557 | 1283 | 2283 | 1708 |
| 4 | JSG-RMM-LCL-450 | 1777 | 1187 | 1447 | 1470 |
| 5 | JSG-RMM-LCL-500 | 1580 | 1133 | 2347 | 1687 |
| 6 | JSG-RMM-LCL-555 | 1417 | 1603 | 2157 | 1726 |
| 7 | JSG-RMM-LCL-551 | 2577 | 1367 | 2447 | 2130 |
| MEDIA METODO | | 1653 | 1276 | 1915 | ** |

** Altamente significativo (P < 0.01)

Se efectuó también un análisis de varianza para la variable calidad de ADN, medida como la densidad óptica (DO) a 280 nm. En el Cuadro 9 se muestra que la diferencia de las mediciones es significativa nuevamente para el Factor A Método (P ≤ 0.017).

CUADRO 9. Análisis de varianza para la variable Calidad de ADN (DO a 280nm) en Accesiones del género Zea por tres métodos de extracción.

| FV | GL | SC | CM | F | P>F |
|---------------------|----|----------|----------|--------|-------|
| REPETICIONES | 2 | 0.035616 | 0.017808 | 8.0103 | 0.001 |
| FACTOR A (METODO) | 2 | 0.019770 | 0.009885 | 4.4466 | 0.017 |
| FACTOR B (ACCESION) | 7 | 0.018660 | 0.002666 | 1.1991 | 0.322 |
| INTERACCIÓN | 14 | 0.016704 | 0.001193 | 0.5367 | 0.898 |
| ERROR | 46 | 0.102264 | 0.002223 | | |
| TOTAL | 71 | 0.193013 | | | |

El cuadro de comparación de medias (Cuadro 10), muestra que el método con el que se obtuvo mejor calidad de ADN, es decir sin presencia de ARN, fenoles y proteínas, es el método de Keb-Llanes (promedio 0.075). Lo anterior puede comprobarse también en el gel de calidad de la Figura 3, en donde puede observarse bandas de ADN genómico de alto peso molecular con mucho menos barridos que indican degradación o presencia de contaminantes.

El promedio más bajo de lectura de DO a 280 nm indica la menor presencia de contaminantes y por lo tanto el ADN más puro. La muestra de la que se obtuvo el ADN con mejor calidad fue Lug 14 (0.069)

CUADRO 10. Medias generales de los factores Métodos de extracción (A) y Accesiones (B) para la variable Densidad óptica a 280 nm.

| Accesión | FACTOR A | | | MEDIA FACTOR B |
|----------------|----------|------------|--------|----------------|
| | Clarke | Keb-Llanes | Saghai | |
| Lug 14 | 0.075 | 0.043 | 0.087 | 0.069 |
| Lug 03 | 0.107 | 0.083 | 0.092 | 0.094 |
| Cruza simple | 0.158 | 0.079 | 0.148 | 0.128 |
| ZM-480 | 0.079 | 0.083 | 0.094 | 0.085 |
| ZM-450 | 0.095 | 0.073 | 0.137 | 0.102 |
| ZP-500 | 0.117 | 0.071 | 0.090 | 0.093 |
| ZP-555 | 0.097 | 0.069 | 0.140 | 0.102 |
| ZD-551 | 0.085 | 0.100 | 0.135 | 0.107 |
| MEDIA FACTOR A | 0.102 | 0.075* | 0.115 | |

*Significativo a $P < 0.05$

La diferencia en calidad y cantidad de ADN obtenido en cada método utilizado, indica que a pesar de que se encuentren disponibles un gran número de protocolos de extracción, debe elegirse para cada caso particular de utilización de esas muestras el protocolo adecuado, tomando en cuenta todos los factores

involucrados en el análisis, como costo, tiempo invertido en la extracción y facilidad de aplicación del método. Además es importante considerar la calidad del ADN con la que debe contarse, ya que algunas técnicas moleculares requieren de muestras muy puras, como es el caso de los marcadores basados en hibridación southern blot.

De acuerdo con Lynne (1998) la calidad del ADN extraído puede afectar directamente el resultado que se obtenga en los experimentos posteriores, debido a la presencia de nucleasas contaminantes y degradación que pueden inhibir la manipulación biológica subsecuente. Esta misma autora menciona que extraer ácidos nucleicos con la calidad requerida, no es un asunto trivial y las técnicas debes ser optimizadas para cada caso particular.

4.3 Caracterización espectrofotométrica de las muestras

La caracterización espectrofotométrica de las muestras de ADN extraído, es un procedimiento que permite ver en forma gráfica la calidad y cantidad que se tiene en las muestras estudiadas y consiste en la medición de la DO en las muestras, en un rango que incluye las tres lecturas principales, es decir 240 nm, 260 nm y 280 nm que indican cantidad de carbohidratos, cantidad (concentración) de ADN y cantidad de fenoles o proteínas respectivamente. Una curva típica de ADN con buena calidad y cantidad, es aquella que muestra valores de DO bajos para las lecturas 240 y 280 nm y altos para la lectura 260 nm.

Para el presente estudio, el resultado con el método Clarke *et al* (1989) se reporta en la Figura 4 en donde se observa que la curva típica solo la presentan las muestras 8 y 2 que corresponden a JSG-RMM-LCL-551 (*Zea diploperennis*) y la línea LUG-03 de maíz.

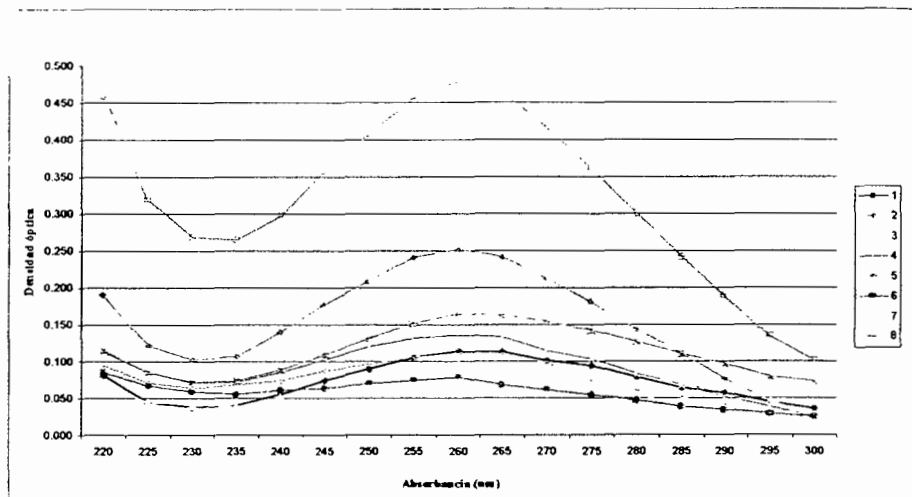


FIGURA 4. Caracterización Espectrofotométrica de ADN de 8 muestras del género *Zea* obtenido por el método Clarke *et al.*, 1989

Para las muestras extraídas por el método Saghai-Marroof *et al.*, (1984) los resultados se presentan en la Figura 5, en donde la gráfica presenta la curva típica para todos los materiales, destacando en cantidad de ADN las muestras 6 y 7 que corresponden a JSG-RMM-LCL-555 (*Zea mays ssp. parviglumis*) y JSG-RMM-LCL-551 (*Zea diploperennis*).

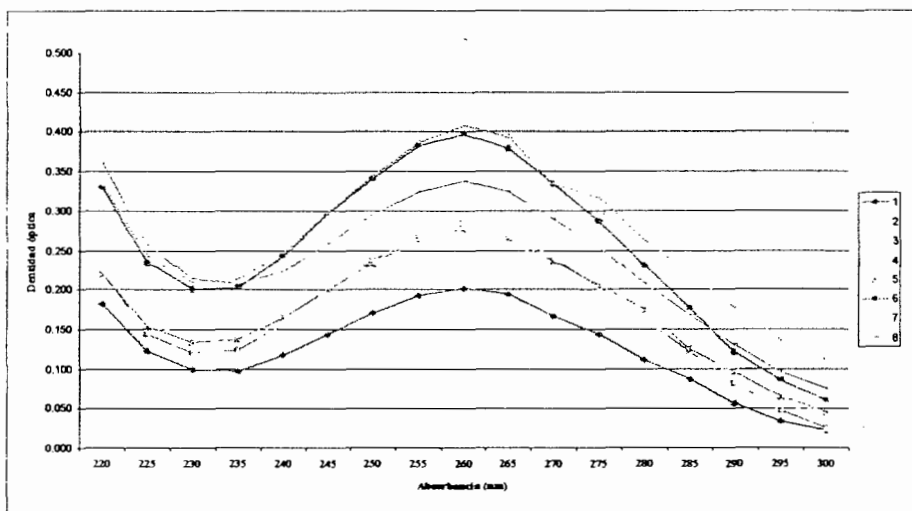


FIGURA 5. Caracterización espectrofotométrica de ADN de 8 muestras del género *Zea* extraído por el método de Saghai-Marroof *et al.*, 1984.

Finalmente, para las muestras extraídas por el método Keb-Llanes *et al.*, (2002), los resultados se muestran en la Figura 6, en donde se observan las menores cantidades de ADN extraído en todas las muestras y las menores lecturas para contaminantes fenólicos y proteínas.

La muestra cuya gráfica describe la curva típica esperada es la 3 que corresponde a la cruce LUG14 x LUG03 de maíz.

Los resultados obtenidos con la caracterización espectrofotométrica de las muestras, confirman los obtenidos anteriormente con el gel de calidad que se muestra en la Figura 3 y en los resultados del análisis de varianza para concentración de ADN y presencia de contaminantes fenólicos, por lo que puede decirse que la caracterización espectrofotométrica es un auxiliar para determinar tanto la pureza como la concentración de ADN en las muestras.

Cabe mencionar que las muestras de las que se obtuvo mayor cantidad de ADN no coinciden para los diferentes métodos, es decir en el método de Clarke, fueron las muestras 8 y 2, en el de Saghai-Marroof 7 y 6 y finalmente, para el método Keb-Llanes fue la muestra 3. Sin embargo, en el análisis de varianza se reportó que no existe diferencia significativa para el Factor B (accesiones).

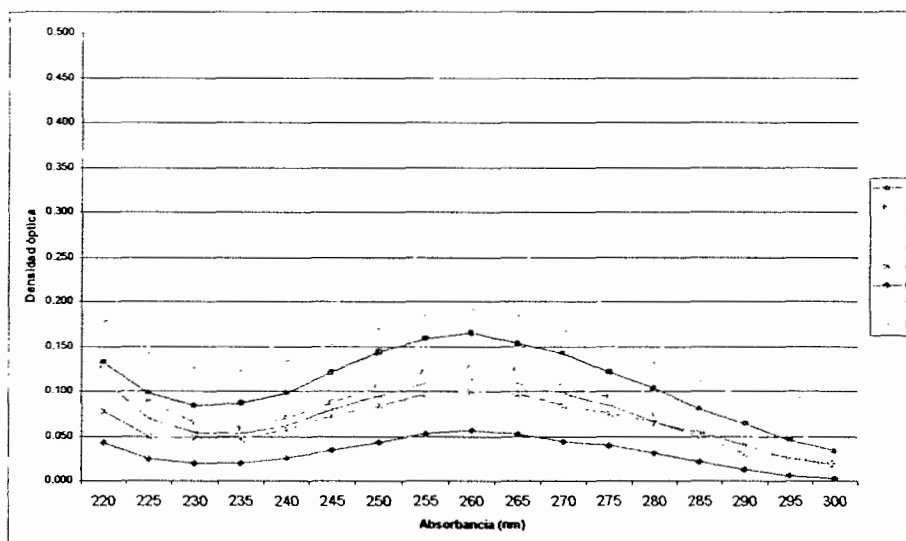


FIGURA 6. Caracterización Espectrofotométrica de ADN de 8 muestras del género *Zea* extraído por el método Keb-Llanes *et al.*, 2002

4.4 Elección del método de extracción

Los resultados anteriores, son elementos que han servido como base para la elección del mejor método de extracción de ADN para las especies involucradas en el presente trabajo.

La cantidad de reactivos utilizados en cada método (Cuadro 5), el tiempo invertido en la extracción (Cuadro 4) y los resultados obtenidos en el análisis de varianza, indican que el método más recomendable para utilizar en este caso particular, es el de Saghai-Marroof, con el cual se obtuvo una buena cantidad de ADN, de una calidad aceptable, siendo un método menos costoso en tiempo y reactivos invertidos.

V. CONCLUSIONES

- Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que se obtienen diferencias marcadas en la calidad y concentración de ADN debido a los métodos de extracción. Dichos métodos difieren en varios aspectos de importancia, particularmente, la cantidad de reactivos utilizados y el tiempo requerido para obtener el ADN; dichos aspectos son fundamentales para elegir el protocolo.
- La mayor concentración de ADN se obtuvo con el método de Saghai-Marroof, mientras que la mayor calidad de ADN obtenido fue la resultante de utilizar el método Keb-Llanes. Por otra parte, el método de Saghai-Marroof es el mejor respecto a costos y rapidez. No se detectaron diferencia en cuanto a concentración y calidad de ADN entre especies del género *Zea* ni efectos diferenciales debido a los métodos, lo cual indica que los resultados de esta investigación se pueden usar de manera amplia en el resto de especies y poblaciones del género *Zea*.
- Los diferentes métodos cualitativos y cuantitativos empleados en este trabajo, como la espectrofotometría y los geles de calidad, fueron consistentes y se complementan como auxiliares en elegir los protocolos apropiados.
- Aún cuando los resultados de este trabajo son suficientes para elegir un método de extracción de ADN en el género *Zea*, es necesario usar el ADN extraído con los diferentes marcadores moleculares de interés (RAPDs, SSRs, ISTRs, AFLPs, etc.) para tomar la decisión final o hacer los ajustes que se requieran.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Clarke, B.C., L.B. Moran and R. Appels. 1989. DNA analyses in wheat breeding. *Genome* 32: 334-339.
2. Csaikl, U.M., H. Bastian, R. Brettschneider, S. Gauch, A. Meir, M. Schauerte, F. Scholz, C. Sperisen, B. Vornam y B. Ziegenhagen. 1998. Comparative Analysis of Different DNA Extraction Protocols: A Fast, Universal Maxi-Preparation of High Quality Plant DNA for Genetic Evaluation and Phylogenetic Studies. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16: 69-86.
3. Gama F., M.A. 1997. *Biología I*. ed. Prentice Hall Hispano-americana, S.A. México. P: 47-51
4. Hillis, D.M., B.K. Mable, A. Larson, S. K. Davis, y E.A. Zimmer. 1996. *Molecular Systematics*. 2a ed. Sinauer Associates, Inc.Sunderland, MA. USA. p 321-344.
5. IPGRI y Universidad de Cornell. 2003. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Modulo de aprendizaje. Documento electrónico.
6. Keb-Llanes, M., G. González, B. Chi-Manzanero, y D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 299.
7. Lynne, S.P.1998. The double helix meets the cristal lattice: the power and pitfalls of nucleic acid approaches for biomineralogical investigation. *American Mineralogist*. Vol.83 p:1593-1607.
8. Malacinski, G.M. 2002. *Essentials of Molecular Biology*. 4th edition Jones and Bartlett Publishers Inc. USA pp 489.
9. Murray, M.G. y J.W. Pitas. 1996. Plant DNA from Alcohol-Preserved Samples. *Plant Molecular Biology Reporter*. 14 (3): 261-265.
10. Palomera A., V. 2002. Comparación de métodos de extracción de ADN en diferentes tejidos de tres especies de pinos blancos (*Pinus* spp.). tesis profesional Licenciatura de Biología. Universidad de Guadalajara.
11. Rogstad, S.H. 2003. Plant DNA Extraction Using Silica. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:463a – 463g.
12. Sánchez G.,J.J. 2004. Apuntes de la clase: Manejo de Recursos Fitogenéticos. CUCBA. Universidad de Guadalajara.
13. Sambrook, J., E.F. Fritsh, y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor.
14. Saghai-Marroof, M.A., K.M.Soliman, R.A. Jorgensen y R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian

inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol 81, pp 8014-8018.

15. Valadez. M., E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundi-Prensa, México, S.A. de C.V. pp 147.
16. Zañudo H. J, Pimienta, B.E. y Ramírez H. B.C. 2003. Manual de prácticas de Fisiología vegetal. Universidad de Guadalajara.

PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN

Clarke *et al.*, (1989)

1. Prender baño María
2. Rotular tubos Eppendorff de 2 ml.
3. Preparar Buffer de extracción se añade 1ml por muestra.
4. Pesar 300 mg de tejido.
5. Triturar tejido en mortero con N₂ y transferirlo al tubo Eppendorff (agregar 1ml de Buffer de extracción inmediatamente).
6. Sumergir las muestras a baño María a 65°C por 40 minutos (agitar cada 5 min.).
7. Dejar enfriar por 5 minutos.
8. Agregar 1ml de cloroformo-octanol 24:1
9. Centrifugar a 3200 rpm por 15 minutos.
10. transferir el sobrenadante de ADN a tubo nuevo
11. Agregar 75µl de NaCl 5M (girar tubo 90° para mezclar).
12. Agregar 1ml de etanol frío (-20°C) (girar tubo a 90° para mezclar).
13. Colocar muestras 20'-30' en congelador (-20°C).
14. Centrifugar (9000rpm) 12000rpm por 15'.
15. Eliminar sobrenadante y esperar unos segundos para que se evapore el etanol.
16. Agregar 500µl de etanol al 70% a cada muestra.
17. Centrifugar a (11000rpm)12000rpm por 5'
18. Repetir paso 15,16,17 (dos veces)
19. resuspender en 200µl de TE pH8

1. Programar baño María a 60°C
2. Triturar 300 mg de tejido con nitrógeno líquido en mortero con pistilo.
3. Agregar 0.5 ml de 2X CTAB buffer y moler nuevamente hasta que la mezcla quede homogénea.
4. Transfiera la mezcla a tubos eppendorff de 2ml e incube 30 minutos a 60°C en baño María.
5. Deje enfriar por 10 minutos para que la mezcla regrese a temperatura ambiente.
6. Agregue un volumen igual de cloroformo-octanol (24:1) e invierta los tubos continuamente por 5 minutos.
7. Centrifugue a 12000 rpm por 10 minutos
8. Recupere el sobrenadante y páselo a un tubo limpio. (utilice tubo de 2ml la primera vez y tubos de 1.5 ml la segunda vez).
9. Repetir pasos 6,7 y 8.
10. Agregue un volumen igual de alcohol isopropílico frío (-20 °C) y mezcle por inversión hasta que el ADN precipite.
11. Centrifugue a 5000 rpm durante 5 min. Decante el isopropanol y agregue 1.0 ml de 76% EtOH/0.2M Na- acetato. Deje el ADN en ésta mezcla por 20 min. (se puede parar en este punto si es necesario y continuar más tarde en el día). Agite por 5 minutos antes de continuar al paso 12. *centrifugar 5000 rpm por 5 min.
12. Decante el 76% EtOH/0.2 Na-acetato y agregue 0.5ml de 76% EtOH/10mM NH₄- acetato. Deje el ADN en ésta mezcla por 1 o 2 min, centrifugue de nuevo y luego decante el 76% EtOH/10mM NH₄- acetato.
13. Agregue 50 a 100µl de TE. La cantidad depende de que tan buena fue su obtención. Coloque a + 4°C durante la noche para que el ADN se resuspenda en la solución.
14. Día siguiente centrifugue por 10 minutos para las partículas no disueltas y transfiera el sobrenadante a un tubo limpio.

1. Moler 0.3g de tejido con nitrógeno líquido, en un mortero previamente enfriado a -20°C , hasta obtener un polvo fino. Transferir la muestra con una espátula a un tubo Eppendorf de 2ml. Agregar 300 μl de Buffer A y 900 μl de buffer B, y 100 μl de SDS. Agitar entre una aplicación y otra.
2. Agitar en vortex e incubar en baño maría a 65°C por 10 minutos (Enfriar y agitar cada 2 minutos).
3. Aplicar 410 μl de acetato de potasio frío (Buffer de lisis). Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos en centrífuga refrigerada a 4°C .
4. Transferir el sobrenadante a dos tubos eppendorff limpios (aprox. 750 μl por tubo). Agregar 540 μl de isopropanol frío a cada tubo. Mezclar. Incubar en congelador (-20°C) por 20 minutos.
5. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos. Descartar el sobrenadante virtiendo con cuidado. Lavar el pellet con 500 μl de etanol al 70% (dar ligeros golpes). (centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos y verter) (cubrir con una gasa). Se deja de 20 a 30 minutos para que se evapore el etanol.
6. Resuspender el pellet en 500 μl de buffer TE, centrifugue con un pulso de 30s a 10,000 rpm y reúna en un tubo. Mezclar. Aplicar 60 μl de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 360 μl de isopropanol frío .Mezclar. Incubar en congelador (-20°C) por 20 minutos.
7. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos . Repetir pasos del 5-7 dos veces. Lavar con 500 μl de Etanol al 70% y centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos, verter y y dejar secar de 20 a 30 minutos.
8. Resuspender el pellet en 50 μl (100 μl) en Buffer TE (dejar una noche a 4°C antes de guardar a -20°C). Cuantificar el ADN en el espectrofotómetro a 260 nm. Verificar que el ADN este integro por electroforesis en gel de agarosa

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Dilución de las muestras para la lectura en espectrofotómetro

Agregar 5µl de muestra de DNA aun tubo que contenga 995 µl de agua ultrapura. Mezclar y leer la absorbancia en el espectrofotómetro A 260 y 280 nm.

Preparación del gel de agarosa

1. Armar la base (portageles) de la cámara donde se prepara el gel.
2. Para preparar un gel de agarosa 0.1%, agregar 1 g de agarosa a 60 mL de amortiguador TBE 1 X.
3. Hervir hasta que la agarosa se disuelva y enfriar la dilución a 60°C
4. Vaciar con cuidado la agarosa disuelta en el portageles y remover las burbujas usando una pipeta Pasteur.
5. Después de que el gel se haya solidificado, remover los extremos del portageles y colocarlo dentro de la cámara de electroforesis.
6. Remover el peine cuidadosamente evitando que se rompa el gel
7. Cubrir el gel con amortiguador TBE 1 X hasta que quede sumergido a 4 mm de profundidad respecto a la superficie del TBE 1X.

Preparación de las muestras de ADN para la electroforesis en gel de agarosa.

1. El amortiguador de carga (Jugo Azul) se compone de Xylen Cyanol, Azul de Bromofenol y Glicerol: el glicerol hace a la muestra más densa que el amortiguador de corrida (TBE 1X), permitiendo que el ADN se mantenga dentro del pozo del gel y la adición de los 2 colorantes hace posible seguir el movimiento de las muestras durante la electroforesis.
2. Colocar cuidadosamente las muestras de ADN en cada uno de los pozos del gel, sin derramarla en los pozos adyacentes. Asegurarse de incluir una línea con el marcador de peso molecular del ADN (por ejemplo, usar 250ng de ADN de lambda cortado con Hind III).
3. Tapar la cámara de electroforesis y colocar los electrodos, asegurarse de que la terminal negativa (negra) está en el mismo extremo del aparato. Encender la fuente de poder a 80 volts.
4. Apagar la fuente de poder cuando el frente del color esté a 2 cm del extremo positivo.

Nota: la cantidad de la muestra que debe ser colocada en los pozos depende del grosor del gel así como de las dimensiones del peine que se utilice.

La documentación del gel se puede llevar a cabo de dos maneras; la primera es utilizando un sistema analizador de geles, que consta de un scanner o cámara fotográfica y un programa de computadora apropiado para este tipo de análisis. La segunda forma, es a través de una cámara fotográfica normal que tenga un filtro color naranja con rollo de alta sensibilidad para fotografías blanco y negro.

Tinción y observación

- Remover el gel del aparato de electroforesis y sumergirlo en una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/L en 500 ml de agua) por 30 minutos.
- Observar el gel sobre un transiluminador de luz UV y documentarlo.

Precaución: El bromuro de etidio es un potente agente mutagénico y cancerígeno por lo que nunca debe manipularse sin guantes. Varios protocolos describen como inactivar esta sustancia (ver Sambrook *et al.*, 1989). La solución una vez preparada, puede utilizarse varias veces siempre y cuando se mantenga en la obscuridad y debe colocarse separadamente de otros desechos de laboratorio en recipientes apropiados cuando sea eliminada.

La luz UV es dañina al exponer los ojos y la piel. Al irradiar el gel, deben usarse anteojos especiales o caretas de protección y bata de laboratorio. También este tipo de luz daña al ADN por lo que no debe de ser expuesto por largos períodos de tiempo, sino solamente lo necesario.

Preparación de soluciones stock

Tris 1 M pH 7.5, 8.0 o 9.5 (P.M. 121.14)

1. Disolver 121 g TRIS-Base en aprox. 750ml dH₂O.
2. Añadir HCl hasta alcanzar el pH deseado (75 ml HCl = pH 7.5; 49 ml HCl = pH 8.0).
3. Aforar a 1000 ml con dH₂O.

Cloruro de sodio (NaCl) 5 M. (PM = 58.44). Este producto puede encontrarse ya preparado como reactivo especial para biología molecular.

EDTA 0.5 M pH 8.0 (PM = 372.24).

1. Disolver 186.12 g de Na₂EDTA•2H₂O en aproximadamente 750ml de dH₂O.
2. añadir pelets de NaOH hasta alcanzar un pH de 8.0.
3. Cuando el EDTA esté disuelto, aforar a 1000 ml con dH₂O.

Una vez preparadas las soluciones stock de TRIS Y EDTA se almacenan en refrigeración y a partir de ellas se procede a preparar el buffer de extracción haciendo cálculos basándose en el número de muestras a extraer y en los datos reportados en el Cuadro 11.

CUADRO 11. Buffer de extracción por el método Clark *et al.*, (1989)

| STOCK | FINAL | 10 ml | 50 ml | 100 ml | 200 ml |
|-----------------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| DH2O | | 1.7 ml | 8.5 ml | 17.0 ml | 34.0 ml |
| 1 M Tris-pH 8.0 | 100mM | 1.0 ml | 5.0 ml | 10.0 ml | 20.0 ml |
| 5M NaCl | 2100mM | 4.2 ml | 21.0 ml | 42.0 ml | 84.0 ml |
| 0.5 M EDTA-8.0 | 150mM | 3.0 ml | 15.0 ml | 30.0 ml | 60.0 ml |
| PVP ¹ | 2% | 0.2 g | 1.0 g | 2.0 g | 4.0 g |
| CTAB ² | 2% | 0.2 g | 1.0 g | 2.0 g | 4.0 g |
| 14 M BME ³ | 140mM | 0.1 ml | 0.5 ml | 1.0 ml | 2.0 ml |

Utilice el buffer recién preparado

¹ Añadir PVP el mismo día de extracción

² CTAB = Mixed Alkyltrimethyl-ammonium bromide (sigma M-7635)

³ Añadir BME (β -mercaptoetanol) justo antes de usar el buffer. (para evitar la inhalación de vapores, usar campana de extracción).

BUFFER A. Keb-Llanes *et al.*, (2002)

2% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) (w/v), 100mM

100 mM Tris- HCL (Ph 8.0)

20 mM EDTA

1.4 M NaCl

4% polyvinylpyrrolidone (PVP-40)(PVP10-agregar el día de la extracción)
(w/v)

10 mM β -mercaptoethanol .

BUFFER B:

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

50 mM EDTA

100 mM NaCl

10 mM β -mercaptoethanol

BUFFER TE:

10 Mm Tris

1mM EDTA (Ph 8.0)

20% sodium dodecyl sulphate (SDS) (w/v) –no refrigerado-

5 M acetato de potasio –20°C Buffer lisis (60mL acetato de potasio 5M,

11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5mL agua (Sambrook *et al.*, 1989).

Acetato de sodio 3 M –20°C

Etanol al 70% -20°C

Isopropanol absoluto –20°C.

2X cTAB + Bisulfito

| Compuesto | Cantidad | Concentración final |
|--------------------------|----------|---------------------|
| Tris-HCl 1M pH 7.5 u 8 | 10 ml | 100 mM |
| cTAB | 2 g | 2 % |
| NaCl 5 M | 28 ml | 700 mM |
| EDTA 0.5 M pH 7.5 u 8 | 4 ml | 20 mM |
| β -mercaptoetanol* | 1 ml | 1 % |
| Bisulfito de sodio | 1 g | 1 % |

*Añadir en el momento usarlo

Aforar con agua destilada a 100 ml

76% ETOH/0.2M Na-acetate

| Compuesto | Cantidad |
|-------------------|-----------------|
| Acetato de sodio | 2.72 g |
| Etanol (ETOH) 95% | 80 ml |
| dH ₂ O | Aforar a 100 ml |

76% ETOH/10mM NH₄-acetate

| Compuesto | Cantidad |
|-------------------|-----------------|
| Acetato de amonio | 0.077 g |
| Etanol (ETOH) 95% | 80 ml |
| dH ₂ O | Aforar a 100 ml |