
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN
DIFERENTES TEJIDOS DE TRES ESPECIES DE PINOS
BLANCOS (*Pinus spp.*)**

**TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE
T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A

VERÓNICA PALOMERA AVALOS

Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio de 2002

185333 / 622191
B.26
7



CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
PRESENTE.

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN DIFERENTES TEJIDOS DE TRES ESPECIES DE PINOS BLANCOS (*Pinus* spp)", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora de dicho trabajo la DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA y como Asesoras la DRA. ANNE SANTERRE LUCAS y M.C. PATRICIA CASTRO FÉLIX.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Aguas, Zapopan, Jal., 11 de abril del 2002

DRA. MÓNICA ELIZABETH RÍOS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

p.a.

M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. DRA- ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA.-DIRECTORA DEL TRABAJO.
c.c.p. DRA. ANNE SANTERRE LUCAS.- ASESORA DEL TRABAJO.
c.c.p. M.C. PATRICIA CASTRO FÉLIX.- ASESORA DEL TRABAJO.
c.c.p. Expediente del alumno

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ.
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVESIDAD DE GUADALAJARA.
PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de TESIS que realizó la pasante VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS, con el título COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN DIFERENTES TEJIDOS DE TRES ESPECIES DE PINOS BLANCOS (*Pinus spp.*), consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Las Agujas, Zapopan, Jal., a 1 de febrero de 2002.



DIRECTOR DEL TRABAJO.

Alma Rosa Villalobos
Dra. Alma Rosa Villalobos
Arámbula

ASESOR.

A. Santerres
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
Dra. Anne Santerre
Lucas

ASESOR.

Patricia Castro
M. en C. Patricia Castro
Félix

SINODALES.

- 1.- DR. AARÓN RODRÍGUEZ CONTRERAS
SINODAL TITULAR.
- 2.- DR. JORGE A. PÉREZ DE LA ROSA
SINODAL TITULAR.
- 3.- DR. DANIEL ORTUÑO SAHAGÚN
SINODAL TITULAR.
- 4.- DRA. ANNE SANTERRE LUCAS
SINODAL SUPLENTE.

Aarón Rodríguez
FIRMA.

Jorge Pérez de la Rosa
FIRMA.

Daniel Ortuño Sahagún
FIRMA.

A. Santerres
FIRMA.

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara; dentro del proyecto CONACYT número 33129 B, titulado: Pinos Blancos Mexicanos: Diversidad Genética, Química y Ubicación Taxonómica, con la beca número 3159.

Dirigida por:

Dr. Alma Rosa Villalobos Arámbula

CUCBA



AGRADECIMIENTOS

BIBLIOTECA CENTRAL

A la Dra. Alma Rosa Villalobos por todas sus enseñanzas y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. A Paty Castro por su gran ayuda y apoyo en este trabajo, pero sobre todo por ser una gran persona y por tener siempre palabras de aliento. A la Dra. Anne Santerre por sus observaciones y comentarios atinados para este tesis y por ser como es. Al Dr. Gustavo Moya por su apoyo en la elaboración de esta tesis. A mis compañeros de laboratorio Reno y Luis por comprenderme y tolerarme en los momentos de presión, pero sobre todo por hacer de un día de trabajo algo muy agradable.

DEDICATORIA

A mis padres

Aurora Avalos y José Palomera por darme todo en la vida y por creer en mí en cada momento.

A mi novio

Jorge Juárez por su enorme cariño, pero sobre todo por estar siempre a mi lado.

A mis amigos

Irwin, Silvina, Devora, Marcela, Demi y Rodolfo por su valiosa amistad y por estar siempre en el momento indicado con las palabras indicadas.

RESUMEN

México con sus 47 taxa es el país con mayor diversidad de pinos en el mundo. Entre las especies más importantes por sus dimensiones (fustes rectos de hasta 40 m) y buen índice de aprovechamiento, se encuentran los pinos blancos mexicanos; que incluye el complejo *Pinus ayacahuite-strobiformis* y *P. strobus* var. *Chiapensis* en donde la mayoría de las poblaciones se encuentran disminuidas, aisladas y fragmentadas. Por consiguiente, es importante obtener información y herramientas útiles para su aprovechamiento y conservación. Los marcadores moleculares proveen las bases para realizar estudios de genética de poblaciones y filogenia a nivel molecular. La etapa de extracción de ADN es imprescindible para todo el proceso de análisis molecular, ya que algunas técnicas requieren cantidades considerables de material genético de buena calidad y otras, aunque se pueden realizar con cantidades muy pequeñas de ADN, requieren de una alta calidad que pueda garantizar la reproducibilidad de las mismas.

A pesar de que se han utilizado varios métodos para aislar ADN genómico a partir de acículas y semillas de varias especies de pinos, no se ha reportado una comparación de su efectividad. Se desconoce si existe un método único adecuado para la extracción de ADN de tejidos que difieran en la composición bioquímica. El presente trabajo compara cinco métodos de extracción de ADN para acículas, megagametofitos y embriones y se describe un método de extracción de ADN eficaz en los tres tipos de tejidos, de tres especies de pinos blancos, así como las condiciones de manejo y almacenamiento de las muestras.

INDICE

Pag

I. Introducción	1
II. Antecedentes	
II.1. Taxonomía y distribución del complejo <i>Pinus ayacahuite</i> – <i>P. strobiformis</i> y de <i>Pinus strobus</i> var. <i>chiapensis</i>	3
II.2. Características morfológicas, bioquímicas y genéticas de acículas y semillas	4
II.3. Extracción de ADN en plantas	5
II.4. Métodos CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio).....	6
II.5. Métodos SDS (lauril sulfato de sodio)	6
II.6 Factores que determinan la elección de un método de extracción de ADN en pinos	8
II.6.1. Manejo y almacenamiento del material biológico	8
II.6.2. Tipo de tejido	8
II.6.3. La técnica molecular a utilizar	8
III. Justificación	10
IV. Objetivos	11
V. Material y métodos	
V.1. Colecta, obtención y almacenamiento de las muestras	12
V.2. Métodos de extracción de ADN	12
V.3. Material biológico	13
V.4. Análisis cuantitativo y cualitativo de ADN por espectrofotometría	14
V.5. Análisis cuantitativo y cualitativo de ADN por electroforesis en geles de agarosa	15
V.6. Amplificación de ADN por PCR-RAPDs	15
V.7. Análisis de datos	16

VI. Resultados	
VI.1. Análisis cualitativo y cuantitativo por espectrofotometría	
VI.1.1 Extracción de ADN de acículas a partir de 1 g de tejido	17
VI.1.2 Extracción de ADN de acículas a partir de miligramos de tejido	18
VI.1.3 Extracción de ADN de megagametofito	18
VI.1.4 Extracción de ADN de embrión	20
VI.1.5 Extracción de ADN por especie	20
VI.2. Análisis cuantitativo y cualitativo por electroforesis	21
VII. Discusión	25
VIII. Conclusiones	28
IX. Literatura citada	29
X. Anexo I. Métodos de extracción de ADN	33
Anexo II. Preparación de reactivos	39



I. INTRODUCCIÓN.

Los pinos (Pinaceae : *Pinus*) son importantes fuentes de madera en muchas regiones, como un recurso forestal natural o en poblaciones cultivadas. Existen más de cien especies comúnmente reconocidas por los taxónomos, todas originarias de los países del Hemisferio Norte. Norteamérica es especialmente rica con un total de 65 especies, de estas 38 se distribuyen al norte de México y 43 existen en México y América Central (Farjon *et al.*, 1997).

Los bosques de pinos en México y América Central están amenazados por la sobreexplotación, los desmontes para otras formas de uso de la tierra, el sobrepastoreo, el incremento en la frecuencia de fuegos y otras presiones que generalmente coinciden con el incremento en la población humana (Richardson, 1998). Las especies de pinos blancos en México, entre las que se encuentran el complejo *Pinus ayacahuite-strobiformis* y *P. strobus* var. *chiapensis*, no son una excepción, la mayoría de las poblaciones se encuentran disminuidas, aisladas y fragmentadas. Debido a sus fustes rectos, grandes dimensiones y su madera de buena calidad, estos pinos representan un recurso económico importante para nuestro país (Pérez de la Rosa, 1993). Hasta ahora, los estudios de variación realizados en pinos blancos se han basado principalmente en características morfológicas (Pérez de la Rosa, 1993). Se desconocen los niveles de variación molecular, una disminución en los mismos pondría en riesgo su capacidad de respuesta a enfermedades y predadores, disturbios o cambios climáticos.

El proyecto de investigación "Pinos blancos mexicanos: diversidad genética, química y ubicación taxonómica" apoyado por el CONACYT (# 33129-B) que actualmente se realiza en el núcleo universitario de las Agujas, Zapopan, pretende, entre otras cosas, investigar la diversidad genética a través de marcadores moleculares como amplificación al azar de ácido desoxirribonucleico (ADN) polimórfico (RAPDs) y espaciadores internos transcritos (ITS), con el fin de obtener información y herramientas útiles para su ubicación taxonómica, aprovechamiento y conservación. En un estudio que incluye la utilización de marcadores moleculares es esencial determinar las mejores condiciones de almacenamiento y manejo de las muestras y encontrar un(os) método(s) de extracción de ADN en pinos

blancos a partir de diferentes tipos de órganos (acículas, semillas) con el que se obtengan cantidades adecuadas de ADN y de calidad suficiente para su uso en técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente en otras técnicas de biología molecular.

II. ANTECEDENTES

II.1. Taxonomía y distribución del Complejo *Pinus ayacahuite* – *P. strobiformis* y de *Pinus strobus* var. *chiapensis*.

El complejo taxonómico *Pinus ayacahuite* – *P. strobiformis*, *P. strobus* var. *chiapensis* pertenece al subgénero *Strobus*, sección *Strobus*, subsección *Strobi* (Little y Critchfield, 1969). *Pinus ayacahuite* y *P. strobiformis* se encuentran distribuidos ampliamente en México; *Pinus strobiformis* se ubica principalmente en estados del norte y *P. ayacahuite* se encuentra en estados del centro y sur del país. La distribución de *P. strobus* var. *chiapensis* es mas reducida ya que se localiza solamente en algunos estados del sur del país (Farjon & Styles, 1997) (Figura 1). La caracterización morfológica reconoce tres variedades de *Pinus ayacahuite*: *Pinus ayacahuite* Schlechtendal var. *ayacahuite*, *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw (Perry, 1991) y *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw (Martínez, 1948). Con respecto a la última variedad existen diferencias en cuanto a su ubicación taxonómica ya que algunos la consideran una especie afín pero diferente al complejo ayacahuite: *Pinus strobiformis*.

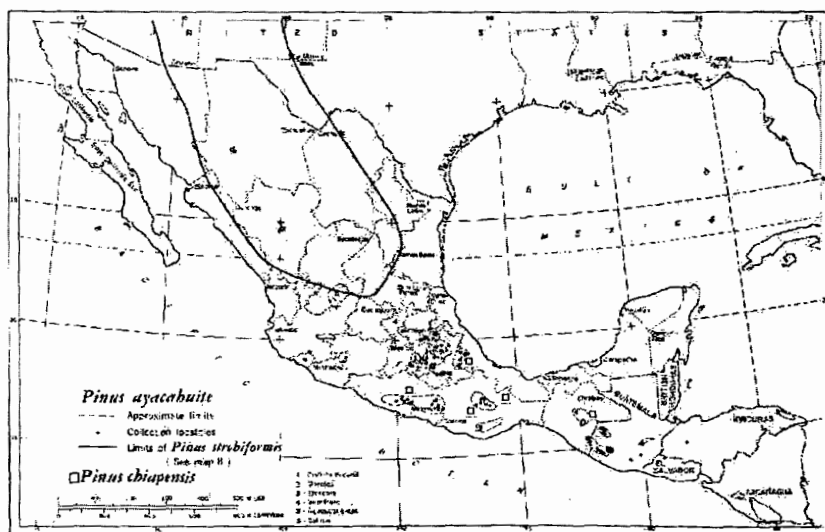


Figura 1. Mapa de distribución de *Pinus ayacahuite* – *P. strobiformis* y *P. strobus* var. *chiapensis* (Critchfield y Little, 1966)

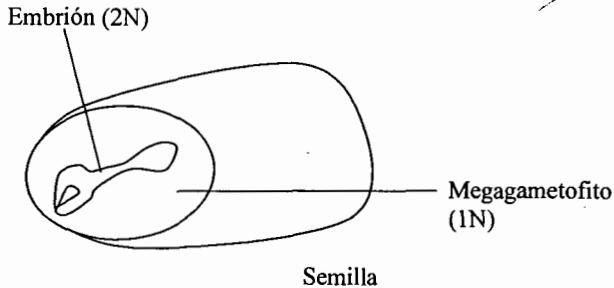
II.2. Características morfológicas, bioquímicas y genéticas de acículas y semillas

La caracterización taxonómica de los pinos se basa principalmente en la morfología de conos, acículas y semillas. La Tabla 1, detalla las principales características de acículas y semillas de las tres especies de pinos blancos; la morfología de las acículas es muy parecida, las semillas se diferencian principalmente por su tamaño, *P. strobiformis* presenta además diferencias en el tamaño del ala de la semilla (Farjon & Styles, 1997). La composición química varía considerablemente en los dos tejidos (Tomback, 2001; Rogers, 1994). El material genético del megagametofito es haploide a diferencia del de las acículas (Richardson, 1998). En la Figura 2, se representa la ubicación y el tamaño del megagametofito y del embrión en relación a la semilla (O'Malley *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999).

Tabla 1. Principales características de acículas y semillas de *Pinus strobus* var. *chiapensis* y del complejo *P. ayacahuite-strobiformis*.

TEJIDO	MORFOLÓGICAS	BIOQUÍMICAS	GENÉTICAS
Acículas	Acículas en fascículos de 5, de 6 - 15 cm de longitud y desde 0,6-1,1 mm de ancho, márgenes escasamente aserrados.	3 % del material fresco son polifenoles, resinas, terpenoides y polisacáridos.	Genoma diploide 2n= 24
Semillas	Semillas de <i>P. ayacahuite</i> miden de 8-10 x 6-8 mm, las de <i>P. chiapensis</i> 7-9 x 4-5 mm, el ala de las semillas en las dos especies mide en promedio 25 mm x 9 mm. Semillas <i>P. strobiformis</i> mide 12-18 x 8-11 mm, vestigios de ala o alas muy pequeñas.	Aproximadamente 50% del megagametofito son grasas, 20% carbohidratos, 20% proteínas.	Megagametofitos: genoma haploide n = 12 Embriones: genoma diploide 2n= 24

Figura 2. Esquema general de la semilla de pino



II.3. Extracción de ADN en plantas

Existen varios métodos clásicos de extracción de ADN de plantas, que se han utilizado para aislar eficientemente ADN de una gran cantidad de taxa (Dellaporta *et al.*, 1983; Doyle & Doyle, 1987, 1990; Guillemaut & Marechal-Drouard, 1992; Murray & Thompson, 1980). Sin embargo, los métodos no son reproducibles entre diferentes grupos de plantas y proporcionan ADN en cantidad y calidad variable (Sytsma, 1994).

En general, los métodos de extracción de ADN vegetal incluyen cuatro pasos. Primero, las células se lisan al macerar el tejido con nitrógeno líquido o hielo seco, en el caso de semillas la maceración se realiza sin congelación. En el segundo paso, las enzimas y compuestos secundarios, como polisacáridos y fenoles, se desactivan y eliminan al formar un homogenizado del tejido con un amortiguador de extracción que puede ser una combinación de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (para quelar los iones Mg^{2+} , cofactor de nucleasas), detergente (para romper membranas) y calor. Los detergentes más utilizados son el bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), lauril sulfato de sodio (SDS) y tritón (X-100). En el siguiente paso, las proteínas unidas al ADN se eliminan con fenol o cloroformo. Finalmente, el ADN se precipita cambiando la concentración de sales y/o al agregar etanol o isopropanol (Rogers, 1994).

II.4. Métodos CTAB

Existen diferentes protocolos que se basan en la utilización de CTAB para la extracción de ADN. El CTAB es un detergente catiónico que ayuda a la lisis de la membrana celular y se une fuertemente al ADN formando un complejo, desplazando a las proteínas, lo que evita así su degradación (Valadez, 2000). Debido a que el detergente interfiere con el uso posterior del ADN en el estudio de marcadores moleculares, es necesaria su eliminación; el CTAB, las proteínas y los restos celulares, se eliminan en una interfase con extracciones con solventes orgánicos y el material genético permanece en fase acuosa y listo para su precipitación (Rogers, 1994).

Entre los protocolos que utilizan CTAB se encuentran: Sanghai-Marroof (1984) y Doyle & Doyle (1987, 1990). Sanghai-Marroof utiliza un amortiguador a base de CTAB (bromuro de alquiltrimetil amonio-mezcla) para la lisis celular y posteriormente elimina el detergente, las proteínas y los restos celulares con una mezcla de cloroformo:octanol. Este método reporta un rendimiento promedio de 0.25-1 mg de ADN por 300-400 mg de tejido fresco en angiospermas. En contraste, Doyle & Doyle utiliza en su amortiguador CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) para lisar las células y elimina el CTAB y los residuos orgánicos con cloroformo:alcohol isoamílico. El uso de polivinilpirrolidona (PVP) durante el proceso de extracción, protege al ADN de degradación a través de la inhibición de la polifenol oxidasa y otras actividades enzimáticas (Doyle & Doyle, 1987). En angiospermas es frecuente obtener un rendimiento cercano a 1 mg de ADN por gramo de tejido fresco y la relación espectrofotométrica 260/280 varía de 1.4 a 1.7.

II.5. Métodos SDS

El SDS es un detergente aniónico que solubiliza todos los componentes celulares manteniendo el ADN en solución. Los protocolos que utilizan SDS son muy parecidos a los de CTAB. La principal diferencia es que la separación de la fase orgánica y la precipitación del ADN se llevan a cabo aumentando la concentración de sales. Entre los protocolos basados en la utilización de SDS para la extracción de ADN en pinos, se encuentran los de Dellaporta *et al.*, (1983) y Kim *et al.*, (1997). La principal ventaja del método de Dellaporta es el uso de pequeñas cantidades de material y en algunos casos, dependiendo de

la composición química del tejido, no es necesaria la extracción con solventes orgánicos. La eficiencia que este método reporta es de 50-100 $\mu\text{g/g}$ de tejido foliar fresco en maíz. El método de Kim es básicamente una modificación del método de Dellaporta ya que utiliza bajas concentraciones de SDS, incluye PVP para evitar la degradación del ADN por los compuestos fenólicos y para la extracción utiliza cloroformo:alcohol isoamílico. Kim reporta que a partir de 50 mg de tejido en angiospermas y gimnospermas se obtienen 7.5-15 μg de ADN de alta calidad y una relación espectrofotométrica de 1.8-2.0.

Existen paquetes comerciales para la extracción de ADN en diferentes tipos de material que utilizan el detergente SDS. Por ejemplo, el paquete de extracción de Amersham Pharmacia Biotech, remueve las proteínas citoplasmáticas y nucleares por precipitación con sales. La eficiencia de ADN reportada es de 15-150 μg por 100-200 mg de material fresco (GenomicPrepTM Cells and Tissue DNA Isolation Kit, Amersham pharmacia biotech, Catálogo No. 27-5237-01). Se han utilizado paquetes comerciales para las extracciones de material genético tanto en acículas como en megagametofitos de pinos (Furman, 1997; Mitton *et al.*, 2000; Isoda *et al.*, 2000; Keys *et al.*, 2000; Remington & O'Malley, 2000).

Métodos CTAB y métodos SDS han sido ampliamente utilizados para extraer ADN en pinos para realizar estudios con marcadores moleculares (Sperisen *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1997; Bousquet *et al.*, 1989; Tulsieram *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1986; Mosseler *et al.*, 1992).

II.6. Factores que determinan la elección de un método de extracción de ADN en pinos

II.6.1. Manejo y almacenamiento del material biológico

La forma en que se conserven las acículas (congeladas a -20°C o -80°C , liofilizadas o secadas con gel de sílice) influye en el rendimiento y calidad del ADN extraído y limita su uso posterior en técnicas moleculares (Rogers, 1994). Las semillas pueden almacenarse a temperatura ambiente hasta su germinación, una vez germinadas se pueden conservar en refrigeración por dos o tres semanas (Sytsma, 1994).

II.6.2. Tipo de tejido

A pesar de la gran cantidad de protocolos de extracción disponibles, no todos pueden utilizarse con éxito en los diferentes grupos de plantas y órganos, ya que existe una gran diversidad en los compuestos secundarios que interfieren con los métodos particulares de extracción de ADN (Doyle & Doyle, 1987, 1990). Las acículas y brotes jóvenes frescos son los materiales más usados para la extracción de ADN en pinos. También, es posible obtener ADN a partir de megagametofitos y embriones. La composición química y la cantidad del material, determinará la elección del método de extracción. En acículas se prefiere emplear métodos que eliminen polifenoles, polisacáridos y compuestos terpenoides, la extracción se puede realizar a partir de miligramos (micrométodos) o gramos de material. En el caso del megagametofito es importante considerar la separación de grasas y polisacáridos, en embriones y megagametofito la extracción se realiza a partir de miligramos de material.

II.6.3. La técnica molecular a utilizar

El tipo de metodología que se utilizará en el análisis del ADN extraído, determinará tanto la elección del método de extracción como la manera en que se almacenarán y trabajarán las muestras. Así, el análisis por enzimas de restricción en polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs: restriction fragment length polymorphism) requiere de 0.5-5 μg de ADN (Sinclair *et al.*, 1998; Remington *et al.*, 1999). En contraste, las técnicas que utilizan PCR sólo necesitan de 25-50 ng (Lu *et al.*, 1995). Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados al azar (AFLPs: amplified fragment length

polymorphism), microsátélites y PCR-RFLP aproximadamente 100 ng (Gernadt & Liston, 1999). Estas técnicas, sin embargo, requieren de un ADN de excelente calidad no degradado y con buenos niveles de pureza. La reproducibilidad y confiabilidad de técnicas como RAPDs dependen en gran medida de la calidad del ADN (Williams *et al.*, 1990).

III. JUSTIFICACIÓN

El amplio uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: Polymerase Chain reaction) y el rápido desarrollo de marcadores moleculares proveen las bases para realizar estudios de genética de poblaciones y filogenia a nivel molecular. La etapa de extracción de ADN es imprescindible para todo el proceso de análisis molecular, ya que algunas técnicas requieren cantidades considerables de material genético de buena calidad y otras, aunque se pueden realizar con cantidades muy pequeñas de ADN, requieren de una alta calidad que pueda garantizar la reproducibilidad de las mismas.

A pesar de que se han utilizado varios métodos para aislar ADN genómico de pinos (Sperisen *et al.*, 2000; Bousquet *et al.*, 1990; Tulsieram *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1997), no se ha reportado una comparación de su efectividad. Se desconoce si existe un método único, adecuado para la extracción de ADN de órganos que difieran en la composición bioquímica. Lo que nos condujo a realizar una comparación de protocolos de extracción de ADN clásicos para seleccionar y optimizar el método(s) que nos permitan extraer ADN, a partir de acículas, embriones y megagametofito de tres especies de pinos blancos, con un buen rendimiento y de calidad suficiente para utilizarse en técnicas que se basan en la amplificación del ADN por PCR.

Finalmente en el presente trabajo se utilizaron muestras de pinos blancos que pertenecen a uno de los complejos taxonómicos más interesantes del género para México aún por caracterizar, por lo tanto es importante disponer de suficiente cantidad de material genético para la realización del proyecto "Pinos blancos mexicanos: diversidad genética, química y ubicación taxonómica", que actualmente se lleva a cabo en la Universidad de Guadalajara.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN en diversos órganos de tres especies de pinos blancos (*Pinus ayacahuite*, *P. strobiformis* y *P. strobus* var. *chiapensis*).

Objetivos Particulares

1. Optimizar cinco protocolos de extracción de ADN.
2. Obtener un protocolo de extracción único y eficiente en acículas, megagametofito y embriones de las tres especies de pinos blancos.



V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Colecta, obtención y almacenamiento de las muestras

Se colectaron acículas, brotes jóvenes y conos con semillas (si se encontraban disponibles) de tres especies de pinos blancos mexicanos: *Pinus ayacahuite* Schlechtendal var. *ayacahuite*, *Pinus strobiformis* Engelman y *Pinus strobus* var. *chiapensis* Martínez, fueron colectados en áreas representativas de su distribución en México, por el Dr. Jorge Pérez de la Rosa del Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA de la Universidad de Guadalajara. Las muestras se colocaron en bolsas de papel etiquetado y se mantuvieron en un lugar fresco a temperatura ambiente hasta su transporte al laboratorio. Las muestras de follaje se almacenaron en el laboratorio en bolsas de plástico a -80°C hasta la extracción de ADN, las semillas se mantuvieron en bolsas de plástico a 4°C .

Para llevar a cabo la germinación, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron remojando en agua durante 12 horas. Se repitió el procedimiento anterior dos veces. Se añadió agua oxigenada comercial al 50%, después de 30 minutos las semillas se lavaron y se mantuvieron 2 horas en el último lavado. Se almacenaron en bolsas de plástico a 4°C por 1 o 2 semanas.

Los megagametofitos se obtuvieron de semillas germinadas. Se disectó la semilla con un bisturí, se localizó y se extrajo el megagametofito con ayuda de pinzas de disección, durante el procedimiento se separó también el embrión. Ambos órganos se pesaron y almacenaron en microtubos y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

V.2. Métodos de Extracción de ADN

Se probaron cinco métodos de extracción de ADN descritos como útiles en pinos (Anexo 1), coníferas y/o cualquier taxa (Doyle & Doyle, 1987; Shagai-Marooof *et al.*, 1987; Dellaporta *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 1997; paquete de extracción de ADN para plantas - Amersham Pharmacia Biotech). Como se menciona antes, los dos primeros protocolos utilizan CTAB como detergente. Mientras que los tres siguientes están basados en el uso del detergente SDS. Además se realizaron tres modificaciones del protocolo de Doyle &

Doyle (1990); las cuales consistieron en añadir PVP 10 al 1 y 2%, además de agregar una etapa de purificación con fenol (Tabla 2).

V.3. Material Biológico

La Tabla 2 detalla el material utilizado en cada uno de los métodos de extracción. Se especifica, además, la cantidad de material a partir de la cual se aisló el ADN.

Tabla 2. Cantidad de tejido utilizado en métodos de extracción.

Método	Órgano	Cantidad de material	
		gramos	miligramos
Doyle & Doyle (1987)	Acículas	1g	-
Modificaciones de Doyle & Doyle PVP 10 1%	Acículas	1g	300 mg
	Megagametofito		100 mg
	Embriones		20 mg
PVP 10 2%	Acículas	1g	
	Megagametofito		100 mg
Purificación con Fenol	Acículas		300 mg
	Megagametofito		100 mg
Shagai Maroof (1984)	Acículas	1 g	-
Kim (1997)	Megagametofito		100 mg
Dellaporta (1983)	Acículas	1g	300 mg
	Megagametofitos		100 mg
	Embriones		20 mg
Kit (Pharmacia)	Megagametofitos		100 mg
	Embriones		20 mg

V.4 Análisis cuantitativo y cualitativo del ADN por espectrofotometría

Los fundamentos para este análisis se basan en que el ADN absorbe luz 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 $\mu\text{g/ml}$ de doble cadena de ADN. Las proteínas absorben luz UV a 280 nm y la relación entre la lectura de absorbancia $A_{260}:A_{280}$ de una solución de ADN se utiliza como indicador de contaminación de proteínas o ARN. Así la relación en $A_{260}:A_{280}$ 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).

Para calcular la concentración de ADN en $\text{ng}/\mu\text{l}$ las muestras se diluyeron 1:100 en agua destilada y se leyeron a 260 nm (Espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis). La cantidad del ADN en la muestra se obtiene aplicando la fórmula:

$$[\text{ADN}_{\text{ng}/\mu\text{l}}] = DO_{260} \times 100 (\text{factor de dilución}) \times 50 \mu\text{g/ml} (\text{factor constante}).$$

Para obtener el rendimiento se consideró la cantidad total en μg de ADN genómico extraído y el peso de tejido utilizado:

$$[\text{ADN} (\text{ng}/\mu\text{l}) \times \mu\text{l de TE}^* / 1000] / \text{peso de tejido}$$

La pureza de las muestras de ADN es indicada automáticamente en las lecturas del espectrofotómetro con la relación de absorbancia $A_{260}:A_{280}$.

* (Trizma base / EDTA) en los que esta resuspendido el ADN

Algunas muestras fueron tratadas con la enzima RNasa A (Sigma) con una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Doyle & Doyle, 1987) para determinar la proporción real de ADN contenido en la muestra y la posible intervención del ARN con la amplificación del ADN en PCR (Rogers, 1994).

V.5. Análisis Cuantitativo y Cualitativo por Electroforesis en Geles de Agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa es un método utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos. El análisis de la(s) banda(s) de ADN permite obtener una aproximación de su concentración y determinar su integridad. Una banda bien definida en la parte superior del gel, a poca distancia de los puntos de aplicación, indica un ADN de alto peso molecular. También, si se forma un barrido de fragmentos a lo largo del carril, es posible inferir si el material está parcialmente o altamente degradado (Andrews, 1996; Valadez, 2000).

Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 0.8 % en amortiguador TBE 1X (Anexo 2). El gel se colocó en el soporte de la cámara de electroforesis (equipo de electroforesis submarina Bio-Rad) y se añadió solución amortiguadora de corrimiento TBE 1X hasta cubrir el gel. Se aplicaron las muestras (6 µl de ADN genómico y 4 µl de buffer de carga) en los pozos. Se aplicó además un marcador de ADN de alto peso molecular (ADN del bacteriófago lambda digerido con *Hind* III). Las muestras corrieron hacia el polo positivo, aplicando un voltaje constante de 90 voltios por 90 minutos. El gel se tiñó sumergiéndolo en solución de bromuro de etidio (concentración final de 0.5 mg/ml) durante 15 minutos, se enjuagó en agua destilada aproximadamente durante 1 hora y se visualizó con un transiluminador de UV (UVP), se fotografió con cámara Polaroid (Fotodyne) y se analizaron los resultados.

V.6. Análisis de la calidad del ADN amplificado por PCR-RAPDs

Las muestras de ADN se amplificaron por PCR-RAPDs. Se utilizaron tres cebadores OPBB-19 (5'TTGCGGACAG3'), OPB-15 (5'GGAGGGTGT3') y OPB-03 (5'CATCCCCCTG3'), OPERON Technologies, Inc., que se conoce amplifican en las tres especies de pinos estudiadas (Arvizu, com. pers.). Se seleccionaron dos muestras al azar de cada método incluyendo las tres modificaciones del método de Doyle & Doyle y muestras tratadas con RNasa.

La amplificación se llevó a cabo, en un volumen de 25 µl, siguiendo el método de Williams *et al.*, (1990), con algunas modificaciones. La reacción contenía 0.75 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Perkin Elmer); 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8.3 a 25°C); 2.5 mM

MgCl₂; 0.01% de gelatina (p/v); 150 μM de dNTPs (Amersham); 0.3 μM del cebador de oligonucleótidos y 20 ng de ADN.

Las muestras fueron amplificadas en un termociclador (MJ Research, Inc.) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min. 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación a 36°C por 2 min. y elongación a 72°C por 2 min. Elongación prolongada final a 72°C por 10 min. Los fragmentos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1.8% y las muestras se corrieron con un promedio de 55 voltios por 3 horas y se tiñeron con bromuro de etidio.

V.7. Análisis de datos

Para llevar a cabo la comparación de los rendimientos y la calidad obtenida con cada uno de los métodos de extracción de ADN se utilizó la prueba estadística de ANAVA (análisis de varianza). La prueba estadística de ANAVA analiza si hay o no hay diferencias significativas entre las medias de los grupos de datos. Después de aplicar ANAVA se efectuó la separación entre las medias con la prueba de las mínimas diferencias significativas (LSD) (Fry, 1996). La prueba LSD es una prueba a priori, estas pruebas son mas sensibles pues detectan diferencias que las pruebas posteriori no detectan. La prueba LSD detecta la diferencia mas pequeña entre dos medias que son estadísticamente significativas (Fry, 1996). Ambas pruebas estadísticas se efectuaron en el programa "STATISTICA" (1995).

VI. RESULTADOS

VI.1. Análisis cualitativo y cuantitativo por espectrofotometría.

VI.1.1. Extracción de ADN de acículas a partir de 1 g de tejido.

De los tres métodos de extracción probados en acículas a partir de 1g de tejido, solamente se logró obtener ADN con dos métodos, Doyle & Doyle y Dellaporta. Como se muestra en la Tabla 3, estos métodos mostraron diferencias estadísticamente significativas en rendimiento (ANAVA, $F = 9.06$, $gl = 3.74$, $p < 0.001$). En donde el método de Doyle & Doyle - PVP10 1 % produjo el mayor rendimiento ($340 \mu\text{g/g} \pm 179$). Además la prueba de las mínimas diferencias (LSD) indicó que el método de Doyle & Doyle - PVP10 1 % es diferente a Doyle & Doyle PVP10 2 % ($p = 0.007$), a Dellaporta ($p = 0.001$) y a Doyle & Doyle sin PVP ($p = 0.04$). Es importante señalar que al incluir en el proceso de extracción el tratamiento con RNasa, el rendimiento disminuyó un 65 % en el método de Doyle & Doyle - PVP 10 1 % y un 32 % cuando se utilizó una concentración de PVP10 al 2%.

La Tabla 3 muestra, además, que los métodos de extracción de ADN en acículas mostraron diferencias estadísticamente significativas en la relación espectrofotométrica 260/280 (ANAVA, $F = 11.22$, $gl = 3.74$, $p < 0.001$). El método de Doyle & Doyle sin PVP produjo el valor más alto (1.7 ± 0.05) al compararlo con la modificación de Doyle & Doyle - PVP10 1% y 2 % y Dellaporta. La prueba de las mínimas diferencias (LSD) indicó que el método de Doyle & Doyle - PVP10 1% es diferente a Doyle & Doyle - PVP10 2 % ($p = 0.001$).

Tabla 3. Rendimiento en $\mu\text{g/g}$ de acículas y relación espectrofotométrica 260/280 de absorbancia.

Métodos	N	Rendimiento $\mu\text{g/g}$	\pm DS	Relación	\pm DS
D&D sin PVP	8	220	± 103	1.7	± 0.05
D&D - PVP 10 1%	40	340	± 179	1.67	± 0.1
D&D - PVP 10 2%	15	152	± 112	1.44	± 0.2
Dellaporta	15	159	± 94	1.64	± 0.1
D&D - PVP 10 1% y RNasa	9	118	± 61	1.67	± 0.4
D&D - PVP 10 2% y RNasa	8	104	± 70	1.52	± 0.2

DS = Desviación Estandar, N = Número de individuos

VI.1.2. Extracción de ADN de acículas a partir de miligramos de tejido.

En acículas, la comparación de los métodos de extracción utilizando miligramos de tejido mostró diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento ($F = 8.27$, $gl = 2.18$, $p < 0.002$), Tabla 4. El mayor rendimiento se obtuvo con el método de Doyle & Doyle extracción con fenol ($10 \mu\text{g}/100 \text{ mg} \pm 5$). La prueba de LSD indicó que el método de Dellaporta es diferente a Doyle & Doyle con fenol ($p = 0.009$) y a Doyle & Doyle con cloroformo ($p = 0.012$).

Los métodos de extracción de ADN mostraron diferencias estadísticamente significativas en la relación espectrofotométrica ($F = 8.50$, $gl = 2.18$, $p < 0.002$). El valor más alto (1.64 ± 0.1) se obtuvo con el método de Dellaporta. La prueba de LSD indicó que el método de Dellaporta es diferente al método de Doyle & Doyle con fenol ($p = 0.003$) y Doyle & Doyle con cloroformo ($p = 0.001$).

Tabla 4. Rendimiento en $\mu\text{g}/300 \text{ mg}$ de acículas y relación 260/280.

Métodos	N	Rendimiento $\mu\text{g}/300\text{mg}$	\pm DS	Relación	\pm DS
Doyle & Doyle (fenol)	9	10	± 5	1.42	± 0.1
Doyle & Doyle (cloroformo)	5	9	± 2	1.36	± 0.05
Dellaporta	7	4	± 2	1.64	± 0.1

DS = Desviación Estandar, N = Número de individuos

VI.1.3. Extracción de ADN de megagametofito.

Todos los métodos utilizados en la extracción de ADN del megagametofito revelaron resultados positivos. Sin embargo, se observó un mayor rendimiento en el método de Dellaporta en relación al de Kim (Rendimiento en $21 \mu\text{g}/100 \text{ mg} \pm 17$ y Relación 1.26 ± 0.1), por lo que se determinó trabajar un mayor número de muestras con el primero y llevar a cabo la comparación estadística.

Los métodos de extracción de ADN en megagametofito mostraron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento (ANAVA, $F = 8.48$, $gl = 3.53$, $p < 0.001$) Tabla 5. El método de Doyle & Doyle extracción con fenol produjo el mayor rendimiento ($87 \mu\text{g}/100 \text{ mg} \pm 53$) en relación a Doyle & Doyle extracción con cloroformo, Dellaporta y el Kit comercial (Amersham Pharmacia Biotech). La prueba de LSD indicó que el método de Doyle & Doyle con fenol es diferente al método de Doyle & Doyle con cloroformo ($p = 0.007$), a Dellaporta ($p = 0.007$) y al Kit comercial ($p = 0.008$). La extracción con el método de Doyle & Doyle con fenol en presencia de la enzima RNasa produjo una disminución de un 40 % en el rendimiento.

La comparación de las relaciones espectrofotométricas en los diferentes métodos de extracción indica que la relación más alta (1.72 ± 0.1) se obtuvo con el método de Doyle & Doyle con fenol (ANAVA, $F = 14.37$, $gl = 3.53$, $p < 0.001$). La prueba de las mínimas diferencias muestra que el método de Doyle & Doyle con fenol es diferente al método de Doyle & Doyle con cloroformo ($p = 0.009$), a Dellaporta ($p = 0.006$) y al Kit comercial ($p = 0.001$).

Tabla 5. Rendimiento en $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ en megagametofito y relación 260/280.

Métodos	N	Rendimiento $\mu\text{g}/100\text{mg}$	\pm DS	Relación	\pm DS
D&D (fenol)	18	87	± 53	1.72	± 0.1
D&D (cloroformo)	8	45	± 20	1.43	± 0.2
Dellaporta	15	52	± 34	1.53	± 0.2
Kit comercial	16	26	± 14	1.28	± 0.2
D&D (fenol) y RNasa	13	52	± 50	1.65	± 0.1

DS = Desviación Estandar, N = Número de individuos

VI.1.4. Extracción de ADN de embrión.

Como se muestra en la Tabla 6, cuando se utilizó tejido embrionario los métodos de extracción de ADN no produjeron diferencias en el rendimiento (ANAVA, $F = 1.99$, $gl = 2.44$, $p < 0.1489$). Sin embargo, la relación 260/280 más alta (1.67 ± 2) se obtuvo con el método de Dellaporta ($F = 14.48$, $gl = 2.44$, $p < 0.0001$). La prueba de las mínimas diferencias indicó que el Kit comercial es diferente al método de Doyle & Doyle ($p = 0.020$) y al método de Dellaporta ($p = 0.003$).

Tabla 6. Rendimiento en $\mu\text{g}/18 \text{ mg}$ en embriones y relación 260/280.

Métodos	N	Rendimiento $\mu\text{g}/18 \text{ mg}$	$\pm\text{DS}$	Relación	$\pm \text{DS}$
D&D	8	127	± 75	1.51	± 0.1
Dellaporta	23	52	± 31	1.67	± 0.2
Kit	16	128	± 213	1.28	± 0.3

DS = Desviación Estandar, N = Número de individuos

VI.1.5. Extracción de ADN, método Doyle & Doyle PVP 10 1 %, análisis por especie.

Como se observa en la tabla 7, el análisis por especies, utilizando el método de Doyle & Doyle PVP 10 1 %, no mostró diferencias en el rendimiento (ANAVA, $F = 2.60$, $gl = 2.36$, $p < 0.08$). Se observa además que *Pinus strobiformis* obtuvo el mayor rendimiento de ADN ($386 \mu\text{g/g} \pm 136$). El análisis de la relación 260/280 tampoco mostró diferencias entre las tres especies de pinos ($F = 0.39$, $gl = 2.36$, $p < 0.6806$).

Tabla 7. Rendimiento en $\mu\text{g}/\text{g}$ de acículas por especie y relación 260/280.

Especies	Método	N	Rendimiento $\mu\text{g}/\text{g}$	$\pm \text{DS}$	Relación	$\pm \text{DS}$
<i>P. ayacahuite</i>	D&D c/PVP 10 1 %	28	360	± 171	1.69	± 0.09
<i>P. strobiformis</i>	D&D c/PVP 10 1 %	5	386	± 136	1.66	± 0.15
<i>P. chiapensis</i>	D&D c/PVP 10 1 %	6	190	± 47	1.65	± 0.14

DS = Desviación Estandar, N = Número de individuos

VI.2. Análisis cuantitativo y cualitativo por electroforesis del ADN extraído

La concentración de las muestras de ADN obtenidas por espectrofotometría coincidieron aproximadamente en un 80 % con la intensidad de las bandas observadas en el gel de agarosa y al comparar con las bandas del marcador de referencia. Como se muestra en la Tabla 8, en la mayoría de los casos las bandas de ADN migraron muy cerca del punto de aplicación indicando la presencia de ADN genómico de alto peso molecular; además bajo ciertas condiciones se obtuvieron bandas intensas de ARN. Se muestra también el tiempo aproximado de obtención de ADN con cada método y el análisis por PCR. Las bandas de ADN se clasificaron de acuerdo al nivel de degradación que presentaron en el corrimiento electroforético (Rogers, 1994).

Tabla 8. Análisis cualitativo de la extracción de ADN. (1) Doyle & Doyle, Modificaciones de D&D; (2) PVP 10 1%, (3) PVP 10 1% - Fenol, (4) PVP 10 2%, (5) Dellaporta, (6) Kit.

	1	2	3	4	5	6
Amplificación por PCR	-	+	+	+	+	+
Condiciones de ADN	MD	LD	LD/ND	LD	LD/ND	LD/ND
Presencia de RNA	-	+	+	+	-	-
Promedio del tiempo de obtención	5 h	5 h	5 h	5 h	3 h	4 h

ND = No Degradado, LD = Ligeramente Degradado y MD = Muy Degradado.
+ = Presente, - = Ausentes.

La Figura 2 muestra el corrimiento electroforético del ADN aislado con el método de Doyle & Doyle a partir de diferentes órganos y modificaciones. Es evidente que en ausencia de PVP, el ADN aislado está altamente degradado (Figura 2a). La degradación disminuyó considerablemente al incluir PVP en el amortiguador de extracción como se observa en la Figura 2b, donde se observa también la presencia de bandas intensas de ARN. La digestión con RNasa es considerada también como una prueba cualitativa (Rogers, 1994) en el análisis de los resultados de extracción de ADN genómico, ya que algunos

protocolos inhiben la digestión con RNasa, al incluir RNasa en este método las bandas de ARN no estuvieron presentes (Figura 2c). Con respecto a los resultados obtenidos al utilizar miligramos de tejido (Figura 2d) puede observarse sólo ADN de alto peso molecular.

La electroforesis del ADN obtenido con el método de Dellaporta, a partir de acículas mostró ADN de alto peso molecular y ligeramente degradado, además de ausencia de bandas de ARN (Figura 3a). Resultados similares se obtuvieron al aislar ADN de megagametofitos (Figura 3b). Solo en el caso de la utilización de embriones el ADN aislado se encontraba integro (Figura 3b).

La Figura 3c; muestra los resultados obtenidos con el paquete comercial para extraer ADN, el paquete de extracción se utilizó solamente en embriones y megagametofitos, se obtuvo ADN no degradado en los dos tipos de órganos.

Finalmente, la Figura 4 muestra los resultados obtenidos en la amplificación del ADN extraído por PCR-RAPD con los cebadores OPBB-19, OPB-05 Y OPB-03, se obtuvieron dos bandas bien definidas con cada uno de ellos. El único método en el que no se obtuvo amplificación fue Doyle & Doyle sin PVP.

Figura 2. Electroforesis del ADN genómico aislado con el método de Doyle & Doyle.

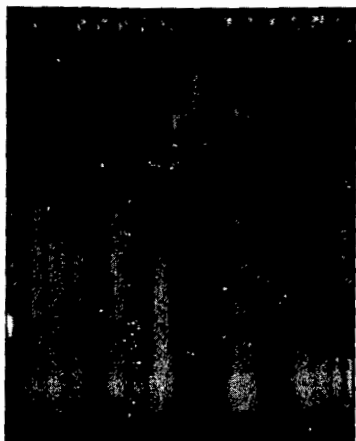


Figura 2a. ADN altamente degradado obtenido en acículas sin PVP.

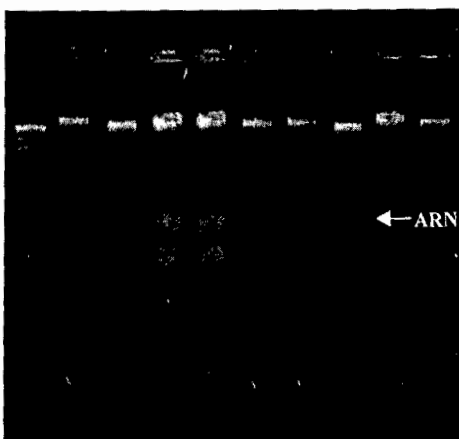


Figura 2b. ADN de alto peso molecular y ligeramente degradado, con bandas intensas de ARN obtenido de acículas con PVP 10 1 y 2% sin RNasa

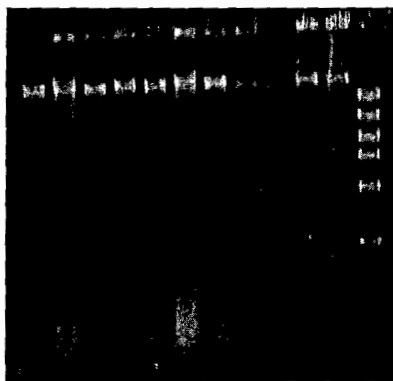


Figura 2c. ADN de alto peso molecular y ligeramente degradado sin bandas de ARN obtenido de acículas con PVP 10 1% y RNasa. Marcador de referencia, High DNA Mass Ladder (Invitrogen)

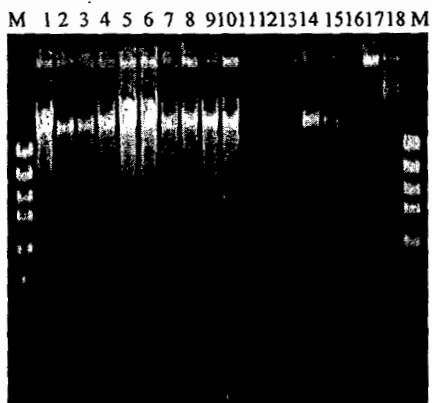


Figura 2d. Bandas de ADN de alto peso molecular y ligeramente degradado, sin bandas de ARN obtenido de megagametofitos con fenol (carril 1-10) y cloroformo (carril 11-18). Marcador de referencia, High DNA Mass Ladder (Invitrogen)

Figura 3. Electroforesis del ADN genómico aislado con el método de Dellaporta y con el Kit de extracción.

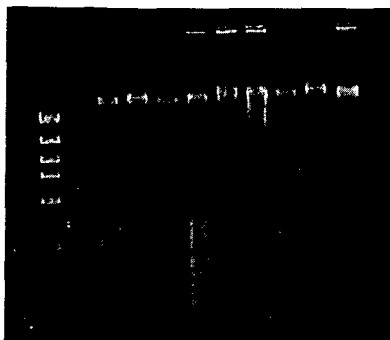


Figura 3a. ADN obtenido de acículas de alto peso molecular y ligeramente degradado sin bandas de ARN, Marcador de referencia, High DNA Mass Ladder (Invitrogen)

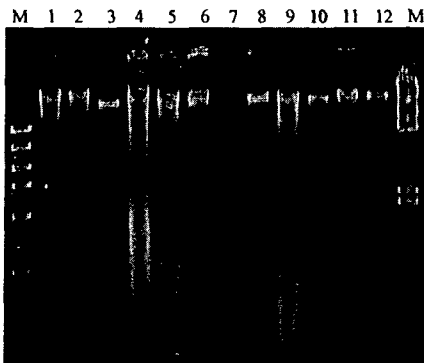


Figura 3b. ADN de alto peso molecular y ligeramente degradado, sin bandas de ARN obtenido de megagametofitos (carril 1-9) y embriones (carril 10 - 12). Marcador de referencia, High DNA Mass Ladder (Invitrogen)

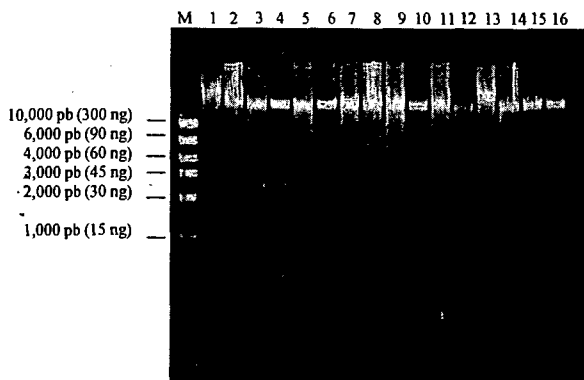
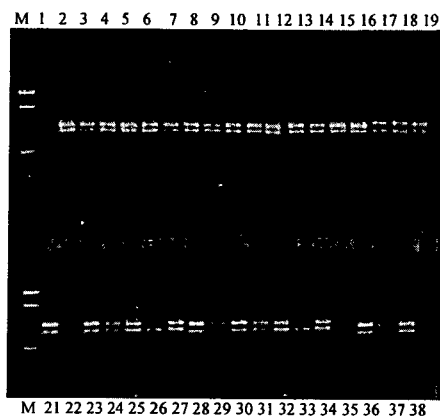


Figura 3c. Paquete de extracción. ADN de alto peso molecular en megagametofitos (carril 1-9) y embriones carril (10-16) Marcador de referencia, High DNA Mass Ladder (Invitrogen)

Figura 4. Amplificación por PCR-RAPDs del ADN aislado con los diferentes métodos de extracción a partir de diferentes tipos de tejidos



**Figura 4. Amplificación con OPBB-19 (carril 1-16) y con OPB-05 (carril 17-38).
Marcador de referencia, 100 bp (Gibco)**

VII. DISCUSIÓN

Durante la optimización de los protocolos de extracción se observó que el mantener las acículas a -20°C y evitar la manipulación prolongada del material fueron factores importantes que favorecieron la calidad de ADN obtenido. También se observó que el utilizar follaje fresco (acículas y brotes jóvenes) y macerar las muestras con nitrógeno líquido en morteros congelados a -20°C fueron condiciones que aumentaron el rendimiento de la extracción en pinos. En el caso de megagametofitos y embriones el conservarlos a -20°C hasta el momento de la extracción y la adecuada homogeneización del tejido fueron condiciones críticas para obtener una producción óptima.

De los métodos CTAB utilizados en este estudio, Shagai-Marooof no fue eficaz en la extracción de ADN de pinos. Se trataron 24 muestras de acículas y se obtuvieron rendimientos altos por espectrofotometría, sin embargo la electroforesis no reveló presencia de ADN, por lo que se puede concluir que muy probablemente las proteínas interfirieran con la separación del ADN y las lecturas en el espectrofotómetro. Se realizaron algunas modificaciones del método y se determinó que el uso de octanol en la separación de la fase orgánica es el factor que determina el éxito de la extracción.

El método de Doyle & Doyle produjo un alto rendimiento y una calidad del ADN aceptable en acículas, la adición de PVP 10 al 1 % fue esencial para evitar la degradación del material genético. En el caso del megagametofito el uso de fenol mejoró de manera considerable el rendimiento y la calidad de la extracción. El rendimiento promedio obtenido a partir de 1 g de acículas fue menor al reportado por Doyle & Doyle en angiospermas, sin embargo, la calidad del ADN extraído de acículas se encuentra en el límite alto reportado. La desviación estándar tan alta obtenida en las muestras trabajadas sin RNasa podría ser resultado de diferencias en la calidad del tejido empleado en la extracción ($0.36 \text{ mg} \pm 0.17$).

De los tres métodos trabajados con el detergente SDS, el método de Dellaporta fue el que produjo mejores resultados. El rendimiento promedio obtenido en 1 g de acículas fue mayor al obtenido por Dellaporta en maíz (Dellaporta, 1983). A pesar de que Dellaporta

no reporta pureza, la calidad del ADN extraído de acículas fue buena. La desviación estandar fue menor en comparación a los demás métodos de extracción probados. Aunque Kim reporta buenos rendimientos y una excelente calidad del ADN de acículas de coníferas, en nuestro caso el rendimiento fue mucho menor que el obtenido por el método de Dellaporta y la calidad fue considerablemente inferior. De los métodos SDS, el kit de extracción, sorpresivamente, produjo el menor rendimiento.

Al analizar los métodos de extracción por tejidos, se observó que el método más eficaz, cuando la extracción se realizó a partir de 1 g de acículas, fue el método de Doyle & Doyle con la modificación de PVP al 1 %. El micrométodo de Doyle & Doyle con PVP 1%, produjo resultados similares en cuanto al rendimiento, sin embargo la relación espectrofotométrica fue menor en relación al método de Dellaporta. Mientras que Bousquet et al. 1989, reportan 100 µg de ADN por gramo de acículas con el mismo método sin PVP, nuestro rendimiento fue aproximadamente tres veces mayor. En megagametofito los resultados obtenidos con la modificación de Doyle & Doyle con fenol fueron evidentemente mucho mejores que en el resto de los métodos. En embriones el método de Doyle & Doyle original y el Kit de extracción produjeron los rendimientos más altos, sin embargo el primero reflejó una mejor calidad del material genético y una menor desviación estandar. Tulsieram *et al.*, (1992), utilizando Doyle & Doyle reporta de 300-500 ng de ADN por megagametofito y Bousquet *et al.*, (1990), reporta 10 µg por 100 mg de megagametofito y embrión, nuestro rendimiento en ambos órganos fue mucho mayor.

La mayoría de los métodos de extracción producen grandes cantidades de ARN. Sin embargo, esta no interfiere con las amplificaciones del ADN por PCR, por lo que el tratamiento con RNasa durante la extracción no es indispensable para trabajar con marcadores moleculares que se basan en PCR. Aunque en el análisis de amplificación se observó que todas las muestras de ADN, con excepción de la muestra obtenida de acículas con el método de Doyle & Doyle, amplificaron con los oligonucleótidos probados, consideramos importante utilizar de preferencia un solo método de extracción cuando se trabaja con tejidos diferentes, la reproducibilidad y confiabilidad de marcadores moleculares como RAPDs y AFLPs podría mejorar. Es frecuente sin embargo, que se

utilice un método de extracción para acículas y otro para megagametofito y embriones (Dvorack, 2000; Keys, 2000).

Finalmente, es importante considerar que el número de muestras que se pueden trabajar por día es bajo en comparación con métodos de extracción en masa en los cuales se pueden procesar decenas de muestras (Langridge *et al.*, 1991). Sin embargo, la extracción en masa frecuentemente disminuye en el rendimiento y calidad del ADN.

CONCLUSIONES

En la extracción de ADN en pinos, el material foliar y los morteros deben permanecer congelados a -20°C para evitar la degradación del ADN. Además, la homogeneización adecuada de todos los tipos de muestras es una etapa crítica para un rendimiento óptimo de material genético de buena calidad con todos los métodos probados.

En la extracción de ADN a partir de acículas con todos los métodos es indispensable utilizar PVP para eliminar los compuestos fenólicos que degradan el material genético.

En el caso de los megagametofitos es importante utilizar fenol en la separación de la fase orgánica para eliminar el alto contenido de grasas, en todos los métodos probados.

El método de Doyle & Doyle fue el más eficaz para la extracción de ADN a partir de acículas, megagametofitos y embriones, al agregar PVP 10 - 1%; fenol y con el protocolo original, respectivamente. El rendimiento y la calidad del ADN obtenido con este método fue similar en las tres especies de pinos blancos estudiadas. En general, se obtiene un mayor rendimiento al trabajar con brotes jóvenes que con acículas maduras.

VIII. LITERATURA CITADA

- Andrews AT (1986): Electrophoresis. theory, techniques and biochemical and Clinical Applications. Clarendon Press, Oxford.
- Bousquet J, Simon L, Lalonde M (1990): DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal Forest Research* **20**: 254-257.
- Critchfield WB y Little EL (1966): Geographic distribution of the pines of the world. Washington, D.C.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983): A Plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 19-21.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Dvorack WS, Jordon AP, Hodge GR, Romero JL (2000): Assessing evolutionary relationships of pines in the *Oocarpae* and *Australes* subsections using RAPD markers. *New Forests* **20**: 163-192.
- Fry JC (1996): Biological data analysis, a practical approach. Oxford ; IRL Press.
- Farjon A y Styles BT (1997): *Pinus*. Flora Neotropica Monograph 75. The New York Botanical Garden, New York .
- Farjon A, Perez de la Rosa JA, Styles BT (1997): Guía de campo de los pinos de México y America Central. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Furman BJ, Grattapaglia D, Dvorack WS, O'Malley DM (1997): Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology* **6**: 321-331
- Gernandt DS, Liston A (1999): Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *American Journal of Botany* **86**:711-723.
- Guillemaut P, Maréchal-Drouard L (1992): Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter* **10**: 60-65.
- Isoda K, Shiraishi S, Watanabe S, Kitamura K, (2000): Molecular evidence of natural hybridization between *Abies veitchii* and *A. homolepis* (Pinaceae) revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Molecular Ecology* **9**: 1965-1974.

- Keys RN, Autino A, Edwards KJ, Fady B, Pichot C, Vendramin GG, (2000): Characterization of nuclear microsatellites in *Pinus halepensis* Mill. and their inheritance in *P. halepensis* and *Pinus brutia* Ten. *Molecular Ecology* **9**: 2155-2234.
- Kim CS, Lee CH Shin JS, Shung YS, Hyung NI (1997): A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research* **25**: 1085-1086.
- Langridge U, Schwall M, Langridge P (1991): Squashes of plant tissues as substrate for PCR. *Nucleic Acids Research* **19**: 6954
- Little EL y Critchfield WB (1969): Subdivisions of the genus *Pinus*. U. S. Forest Serv. Misc. Publ. 1144. Washington, D. C. 51 p.
- Lu M, Szmidt AE, Wang X (1995): Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *pinus sylvestris* (L.). *Heredity* **74**:582-589.
- Martínez, M. (1948). Los Pinos Mexicanos, 2^a edición. Ediciones Botas, México.
- Mitton, JB, Kreiser BR, Rehfeldt (2000): Primers designed to amplify a mitochondrial *nad* 1 intron in ponderosa pine, *Pinus ponderosa*, limber pine, *P. flexilis*, and Scots pine, *P. sylvestris*. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 1269-1272.
- Mosseler A, Egger KN, Hughes GA (1992): Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal Forest Research* **22**: 1332-1337.
- Murray MG, Thompson WF, (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **19**: 4321-4325.
- O'Malley DM, Grattapaglia D, Chaparro JX, Wilcox PI, Amerson HV, Liu BH, Whetten R, McKeand S, Kuhlman EG, McCord S, Crane S, Sederoff R. (1996): Molecular Markers, Forest Genetics and Tree Breeding. En *Genomes of Plants and Animals: 21st Stadler Genetics Symposium*. Plenum Press, New York.
- Perez de la Rosa, JA (1993): Taxonomía de *Pinus ayacahuite* y *Pinus strobiformis*. Tesis Maestría. Colegios de Postgraduados. Montecillos, México. 100 p.
- Perry, JP (1991). The Pines of Mexico and Central America. The Timber Press, Inc. Portland, Oregon.
- Remington DL, Whetten RW, Liu BH, O'Malley DM (1999): Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theoretical and Applied Genetics* **98**:1279-1292.
- Remington DL, O'Malley MD, (2000): Whole-genome characterization of embryonic stage inbreeding depression in a selfed loblolly pine family. *Genetics* **155**: 337-348.

Richardson DM, (1998): Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press.

Rogers SO. Phylogenetic and taxonomic information from herbarium and mummified DNA. En Adams RP, Miller RP, Golenberg EM, Adams JE (1994): Conservation of plant genes II: Utilization of ancient and modern DNA. Missouri Botanical Garden.

Saghai-Marooof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984): Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Science, USA **81**: 8014-8018.

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor.

Sinclair WT, Morman JD, Ennon RA (1998): Múltiple origins for Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Scotland: evidence from mitochondrial DNA variation. Heredity **80**:233-240.

Sperisen C, Gugerli F, Bucher U, Mátyás G (2000): Comparison of two rapid DNA extraction protocols for gymnosperm for application in population genetic and phylogenetic studies. Forest Genetics 7: 133-136.

Statistica, 1995. STATISTICA for windows, Tulsa, OK.

Sytsma K: DNA extraction from recalcitrant plants: long, pure and simple?. En Adams RP, Miller RP, Golenberg EM, Adams JE (1994): Conservation of plant genes II: Utilization of ancient and modern DNA. Missouri Botanical Garden.

Tomback DF. Clark's nutcracker: Agent of regeneration. En Tomback DF, Arno SF, Keane RE (2001): Whitebark pine communities. Ecology and Restoration. Island Press.

Tomback DF Arno SF, Keane RE (2001). The Compelling Case for Management Intervention. En Whitebark Pine Communities. Ecology and Restoration. Island Press.

Tulsieram LK, Glaubitz JC, Kiss G, Carlson JE (1992): Single tree genetic linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. Biotechnology **10**: 686-690.

Valadez ME, Kahl G (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi Prensa. Universidad Autónoma de Chapingo.

Wagner DB, Furnier GR, Saghai-Marooof MA, Williams SM, Dancik BP, Allard RW (1987): Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. Proceedings of the National Academy of Science, USA **84**: 2097-2100.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**:66531-6535.

Wu RL, O'Malley DM, McKeand SE (1999): Understanding the genetic architecture of a quantitative trait in gymnosperms by genotyping haploid megagametophytes. *Theoretical and Applied Genetics* **99**:1031-1038.

Ziegenhagen B, Guillemaut P, Scholz F (1993): A procedure for mini-preparation of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Plant Molecular Biology Reporter* **11**: 117-121.

ANEXO I**Método Doyle y Doyle (1987) para acículas**

1. Moler 1 g de acículas 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 de 50 ml que contenga **8 ml de amortiguador CTAB 2X** (previamente calentado a 60°C).
2. Incubar en baño maría a 60°C por 60 minutos; se puede optar por hacerlo con agitación suave.
3. Agregar **7.5 ml de solución cloroformo-álcool isoamílico (24:1)**, mezclar por inversión suavemente 2 o 3 veces y permitir que el gas escape.
4. Centrifugar a 8,500 rpm por 10 minutos ó 4,000 rpm por 15 minutos.
5. Transferir la fase acuosa (aprox. 6 ml), con ayuda de una micropipeta, a un tubo de 50 ml limpio. Añadir **6 ml de isopropanol frío** y mezclar suavemente por inversión para precipitar el ADN.
6. Mantener a -20°C por 30 minutos. Transferir el ADN precipitado a un tubo de 50 ml limpio, en caso de no obtener precipitado (hebra) centrifugar dos minutos a 2,500 rpm para formar una pastilla y decantar el sobrenadante.
7. Añadir **15 ml de amortiguador de lavado** al precipitado o pastilla y agitar por inversión lentamente para resuspender el ADN.
8. Mantener por 20 min. en el buffer de lavado y recuperar la hebra de ADN o centrifugar a baja velocidad (2,500 rpm por 2 minutos).
9. Decantar y secar con aire por un tiempo corto. Añadir **1 ml de amortiguador TE** (buffer de resuspensión).
10. Agregar **5 μl de RNasa (1:5)** e incubar por 30 minutos a 37°C .
11. Agregar **2 ml de agua destilada** y **1.5 ml acetato de amonio 7.5 M**. Mezclar suavemente.
12. Inmediatamente añadir **10 ml de etanol frío**, mezclar por inversión suavemente hasta que el ADN precipite.
13. Recuperar la hebra de ADN o centrifugar a 8,500 rpm por 10 min para formar la pastilla.
14. Lavar con **5 ml de etanol al 70%**, centrifugar a 2,500 rpm por 2 min.
15. Decantar, secar con aire y resuspender en **500 μl de TE**.

Método Doyle & Doyle (1987) para megagametofitos y embriones

1. Triturar el megagametofito en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 200 μ l de amortiguador de extracción.
- Macerar 300 mg de acículas en mortero con nitrógeno líquido, añadir 950 μ l de **amortiguador** de extracción y 50 μ l de **PVP 20%**.
2. Añadir 800 μ l de **amortiguador** de extracción y mezclar con vortex.
 3. Incubar a 60°C de 30 a 45 min.
 4. Dejar que los tubos tomen la temperatura ambiente.
 5. Añadir 1 ml de la **mezcla fenol-cloroformo-isoamilico**. (24:24:1), mezclar por inversión varias veces.
 6. Centrifugar por 5 minutos a 14,000 rpm.
 7. Recuperar el sobrenadante que contiene el ADN y transferirlo a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml .
 8. Agregar 1 ml de isopropanol absoluto **frío**, mezclar por inversión suavemente hasta obtener la hebra de ADN. Dejar a -20°C por 30 min.
 9. Transferir la hebra de ADN o centrifugar por 5 min a 4,500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
 10. Añadir 1 ml de **etanol al 70%** e invertir suavemente. Eliminar el alcohol con la pipeta de 1000 μ l, cuidando de no tocar el precipitado o centrifugar.
 11. Resuspender en 200 μ l de **amortiguador TE**. Agregar 2 μ l de **RNAse** (1:15). Incubar 30 minutos a 37°C.
 12. Añadir 70 μ l de **agua destilada** y 130 μ l de **acetato de amonio 7.5M** (c.c final 2.5M), mezclar suavemente.
 13. Añadir 850 μ l de **etanol absoluto frío**, mezclar para precipitar el ADN.
 14. Centrifugar por 5 min a 4 500 rpm. Decantar el etanol.
 15. Lavar con 1 ml de **etanol al 70%**. Centrifugar por 10 min a 4 500 rpm. Decantar el etanol.
 16. Resuspender en 200 μ l de **TE**. Disolver durante toda la noche a temperatura ambiente.

Almacenar el ADN genómico obtenido en congelación a -20°C hasta su uso.

Saghai-Marroof (Modificado por D. Hoisington y J. Gardiner) 1984

1. Pesar de 500 mg a 1 g de acículas y triturarlas con nitrógeno líquido.
2. Colocar el tejido pulverizado en un tubo de 50 ml y añadir **9 ml del amortiguador de extracción** precalentado (añadir previamente al amortiguador **20 µl de β-mercaptoetanol**). Mezclar cuidadosamente por inversión.
3. Incubar las muestras de 60 a 90 minutos a 65°C, mezclar ocasionalmente por inversión.
4. Dejar que las muestras se enfríen colocando los tubos en agua a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Centrifugar las muestras por 10 minutos a 4,000 rpm a temperatura ambiente.
6. Tomar la solución acuosa y colocarla en otro tubo limpio. Añadir **20 µl de RNasa** (10 mg/ml). Mezclar las muestras lentamente por inversión hasta que aparezca un precipitado (aprox. imadamente un minuto).
7. Después de 3 minutos remover el precipitado de ADN con una pipeta o centrifugar a 4,000 rpm por 5 minutos.
8. Añadir **8 ml de etanol al 76% frío** y **acetato de sodio 0.2 M**. Esperar 20 minutos y centrifugar a 4,000 rpm por 5 minutos.
9. Lavar con **8 ml de etanol al 70%**, centrifugar.
10. Resuspender en **1 ml de TE**. Ayudarse para disolver con la pipeta.
11. Dejar las muestras de ADN a 4°C toda la noche.
12. Si la solución de ADN permanece turbia, calentar la muestras a 65°C por 10 minutos. Invertir cada 3 minutos. El material insoluble puede removerse centrifugando 5 minutos a 4,000 rpm.

CUBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Dellaporta modificado 1983, para megagametofito

1. Triturar el megagametofito en un tubo eppendorf de 2.0 ml con **200 µl de amortiguador de extracción SDS**, después añadir **800 µl de buffer** y mezclar por inversión.
2. Incubar a 65°C por 10 minutos
3. Añadir **1 ml de cloroformo-alcohol isoamilico** (24 - 1), mezclar suavemente.
4. Centrifugar a 8,500 rpm por 10 minutos a 4°C.
5. Recuperar el sobrenadante que contiene el ADN y transferirlo a otro tubo eppendorf. Adicionar **700 µl de cloroformo-alcohol isoamilico** (24-1), mezclar suavemente y repetir la centrifugación.
6. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo eppendorf de 1.5 ml. Adicionar **700 µl de etanol frío** e invertir suavemente varias veces hasta que el ADN precipite.
7. Transferir el ADN precipitado a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo o eliminar el etanol cuidando de no llevarse la hebra de ADN o centrifugar por 2 minutos a 2,500 rpm para formar la pastilla y posteriormente decantar.
8. Añadir **1 ml de etanol al 70%** e invertir suavemente. Eliminar el etanol cuidando de no tocar el precipitado y repetir el lavado.
9. Eliminar el exceso de etanol dejando el tubo abierto sobre una gasa por unos minutos para que el etanol se evapore.
10. Añadir **200 µl de amortiguador TE**. Disolver durante toda la noche a temperatura ambiente.

Almacenar el ADN genómico obtenido en congelación a -20°C hasta su uso.

Dellaporta modificado (1983) para acículas

1. Moler 1 g de acículas en un mortero utilizando nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino y transferir a un tubo de 50 ml que contenga **8 ml del amortiguador de extracción SDS con PVP 10 al 1%**.
2. Incubar a 60°C por 10 minutos.
3. Añadir **7.5 ml de cloroformo-alcohol isoamilico** y mezclar suavemente.
4. Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 8,500 rpm.
5. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a un tubo limpio. Adicionar **5 ml de etanol** y mezclar suavemente hasta que el ADN precipite.
6. Eliminar el etanol o centrifugar.
7. Añadir **5 ml de etanol 70%** e invertir suavemente. Eliminar el etanol cuidando de no tocar el precipitado. Repetir el lavado.
8. Eliminar el etanol y dejar el tubo abierto sobre una gasa hasta que el etanol se evapore.
9. Disolver el ADN en **500 µl de amortiguador de TE**.

Almacenar el ADN genómico obtenido en congelación a -20°C hasta su uso.

Kim et al. 1997.

1. Triturar el megagametofito (100-150 mg) en un tubo de 1.5 ml con 5 μ l (1 gota) de β -mercaptoetanol 1%. Añadir 300 μ l de amortiguador de extracción, mezclar golpeando ocasionalmente el fondo del tubo para mantener la mezcla. Incubar a temperatura ambiente por una hora (mezclar cada 20 minutos).
2. Añadir 100 μ l de PVP concentrado (recién preparado) y 200 μ l de acetato de amonio 7.5 M.
3. Incubar la muestra en hielo por 30 minutos.
4. Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 6,500 rpm.
5. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a otro tubo de 1.5 ml.
6. Adicionar un volumen igual de isopropanol frío, mezclar suavemente por inversión hasta que precipite el ADN. Dejar a -20°C por 30 minutos para precipitar el ADN.
7. Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 6,500 rpm.
8. Decantar el isopropanol y eliminar el exceso sobre una gasa.
9. Resuspender la pastilla en 500 μ l de amortiguador TE. Añadir 2 μ l de RNasa (1 mg/ml) e incubar a 37°C por 15 minutos.
10. Añadir 500 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) Mezclar por inversión. Centrifugar a 6500 rpm a 4°C por 5 minutos.
11. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo eppendorf y añadir 500 μ l de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) mezclar por inversión. Centrifugar a 6,500 rpm por 10 minutos.
12. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo eppendorf y añadir un volumen de isopropanol frío. Dejar a -20°C por 10 minutos.
13. Transferir el ADN precipitado a un tubo nuevo eppendorf o centrifugar a 6,500 rpm por 10 minutos.
14. Añadir 1 ml de etanol al 80% e invertir suavemente varias veces para lavar el ADN, eliminar el etanol con una pipeta o por decantación.
15. Repetir el lavado con etanol al 80%. Eliminar el etanol con la pipeta o decantarlo. Eliminar el exceso sobre una gasa.
16. Disolver la pastilla en 30 μ l de amortiguador TE.

ANEXO II

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Para la extracción de ADN

1. Solución amortiguadora de extracción CTAB 2X (pH 8)

CTAB	2 %	(2g / 0.1L)
Tris (PM 121.1 g)	100 mM	(1.21g / 0.1L)
NaCl (PM 58.44 g)	1.4 M	(8.18g / 0.1L)
EDTA (PM 372.2 g)	20 mM	(0.744g / 0.1L)
PVP 10	1%	(1g / 0.1 L)

Preparar el buffer en $\frac{3}{4}$ partes del volumen final y ajustar a pH 8 con NaOH o HCl, después aforar con agua destilada. El PVP se añade al amortiguador hasta el momento de la extracción. Almacenar a temperatura ambiente indefinidamente.

2. Solución cloroformo : alcohol isoamilico (24:1)

24 partes de cloroformo

1 parte de alcohol isoamilico

Agitar ambos reactivos dentro de un frasco ámbar y almacenar en congelación a -20°C .

3. Solución Fenol : Cloroformo : Alcohol Isoamílico (24:24:1)

24 partes de fenol

24 partes de cloroformo

1 parte de alcohol isoamilico

Nota: El fenol es un reactivo de alta toxicidad, corrosivo y al menor contacto con la piel puede causar fuertes quemaduras, también puede causar toxicidad con los vapores generados, así que debe trabajarse bajo una campana de flujo laminar con guantes, cubre bocas y bata de laboratorio. Mezclar todos los reactivos dentro de un frasco color ambar y almacenar a 4°C .

4. Solución amortiguadora de Lavado

Etanol Absoluto	76%	(76ml / 0.1L)
Acetato de amonio (PM 77.08 g)	10 mM	(0.07g / 0.1L)

Aforar con agua destilada y almacenar a -20°C .

5. Solución amortiguadora de resuspensión (TE)

Tris (PM 121.1 g)	10 mM	(0.121g / 0.1L)
EDTA (PM 372.2 g)	1 mM	(0.0186g / 0.1L)

Preparar el amortiguador en $\frac{3}{4}$ del volumen final, ajustar a pH 8 con NaOH y aforar con agua destilada. Almacenar a 4°C .

6. Acetato de amonio 7.5 M

Acetato de amonio (PM 77.08)	7.5 M	(57.81g / 0.1L)
------------------------------	-------	-----------------

Nota: Disolver el acetato de amonio en $\frac{3}{4}$ del volumen final y después aforar con agua destilada. Almacenar a 4°C .

7. Dilución de la RNasa (1:15)

RNasa (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	(10 μl RNasa / 140 μl agua)
---------------------------------------	-----------------------------	---

Nota: Preparar la dilución de la enzima en un tubo estéril de 0.5 ml y almacenar a -20°C .

8. Solución amortiguadora de extracción SDS (pH 8)

Tris (PM 121.1 g)	200 mM	(2.42g / 0.1L)
EDTA (PM 372.2 g)	100 mM	(3.72g / 0.1L)
NaCl (PM 58.44 g)	1 M	(5.8g / 0.1L)
β -mercaptoetanol	20 mM	(140 μl / 0.1L)
SDS	2.5 %	(2.5g / 0.1L)

Preparar el amortiguador en $\frac{3}{4}$ del volumen final e incubar en baño maría a 60°C hasta disolver. Ajustar el pH 8 con NaOH y aforar con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente. No esterilizar este amortiguador porque contiene β -mercaptoetanol. **Para extraer ADN de tejido foliar es necesario añadir PVP 10 1% en el amortiguador antes de la extracción.**

Para electroforesis en geles de agarosa

1. Solución amortiguadora TBE 10X

EDTA (PM 372.2 g)	25 mM	(9.3g / 1L)
Tris (PM 121.1 g)	0.89 M	(108g / 1L)
Ácido Bórico (PM 61.844 g)	0.89 M	(55g / 1L)

Nota: La concentración de uso del amortiguador es 1X, diluyendo 10 veces en agua destilada.

2. Jugo azul 6X

Azul de bromofenol	0.25 %	(25 mg / 10 ml)
Xilencianol	0.25 %	(25 mg / 10 ml)
Glicerol	30 %	(3 ml / 10 ml)

Nota: Mezclar ambos colorantes con el glicerol y aforar a 10 ml con agua destilada.

3. Gel de agarosa al 0.8 %

Pesar agarosa de acuerdo al volumen del molde a utilizar para una concentración del 0.8 %. Adicionar TBE 1X y fundir la agarosa hasta que no se observen grumos. Bajar la temperatura y vaciar en el molde evitando la formación de burbujas. Esperar al menos 30 minutos para que la agarosa gelifique a temperatura ambiente antes de usar.

4. Solución de bromuro de etidio

Para la tinción de los geles, se prepara una solución stock a una concentración de 10 mg/ml disuelto en agua destilada y se coloca en un frasco protegido de la luz. La solución de uso contiene 4 μ l de la solución stock por cada 100 ml de agua destilada.

Nota: El bromuro de etidio es un compuesto CARCINOGENICO, por lo que se debe tener un gran cuidado al utilizarlo, usando guantes y bata de laboratorio al manejarlo y desechando adecuadamente el material que haya tenido contacto con el, en un recipiente especial.