



COMPARACIÓN DE TÉCNICAS PARA EXTRACCIÓN DE DNA METAGENÓMICO DE *Ligusticum porteri* Y *Prosopis* sp.

Daniel R. Hernández-Domínguez, Laura A. Loera-Rascón, Francisco Javier Zavala-Díaz de la Serna, Beatriz Adriana Rocha-Gutiérrez, Blanca E. Rivera-Chavira, Ma. Rosario Peralta-Pérez. Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. C.P. 31130. lloerascon@gmail.com

Palabras clave: DNA metagenómico, endófitos

Introducción. *Ligusticum porteri* es una planta herbácea de tejidos blandos con propiedades medicinales, mientras que *Prosopis* sp. es una planta leñosa de tejidos rígidos utilizada en fitorremediación; la asociación simbiótica con microorganismos endófitos podría proveerles o potenciar estas características⁽¹⁾. Un método adecuado de extracción de DNA metagenómico permitiría conocer los endófitos y la diversidad de cada planta.

El objetivo de este estudio es la comparación de tres métodos de extracción de DNA metagenómico a partir de tejidos de ambas plantas.

Metodología. Los tejidos analizados fueron raíz y tallo de *L. porteri* y tallo de *Prosopis* sp. Los métodos a utilizar fueron de Panigrahy *et al.*⁽²⁾ (A), Márquez *et al.*⁽³⁾ (C) y Sessitsch *et al.*⁽⁴⁾ (B). En los métodos A y C se eliminaron posibles epífitos, de 5 gr de los tejidos, mediante lavados con etanol (70%), NaClO (2.5%), cinco lavados sucesivos con agua destilada estéril, el agua del último lavado se usó como control de esterilidad. Estos protocolos incluyen maceración para romper las paredes del tejido vegetal, para la lisis de microorganismos se utilizó un buffer de lisis (SDS y CTAB, respectivamente) e incubación (65 °C por 1 h). En el método B, la esterilización superficial y liberación de microorganismos se realizó utilizando perlas de vidrio estéril con agitación vigorosa (4 h y 30 min, respectivamente) usando como buffer de lisis CTAB. En los tres casos a la pastilla resultante se le hizo un lavado con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:25:1). La pastilla final se resuspendió en buffer TE. La extracción de DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Finalmente, para comprobar que el DNA obtenido podía utilizarse en un futuro para conocer la biodiversidad de endófitos, se realizó una PCR para amplificar el gen 26s rRNA.

Resultados. Los resultados de las extracciones realizadas con los diferentes métodos se muestran en la figura 1. En la electroforesis se observa que los controles de esterilidad superficial para epífitos no hay contaminación, y el metagenoma extraído se encuentran por encima de 23 kb; excepto en tallo de *L. porteri*, con la metodología A. Al igual que en el estudio realizado por Panigrahy⁽²⁾ se observa DNA metagenómico aparentemente intacto y una banda de alto peso molecular en raíz de *L. porteri* y tallo de *Prosopis* sp. En

la figura 2 se presenta la amplificación del DNA metagenómico, en este caso un fragmento del gen 26s rRNA. Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con lo presentado por Sessitsch⁽⁴⁾ y Márquez⁽³⁾ en cuyos trabajos indican que el DNA obtenido les fue útil para determinar la biodiversidad de endófitos.

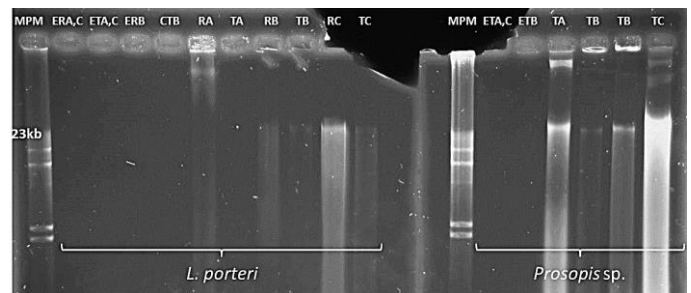


Figura 1. Extracción de DNA metagenómico de *L. porteri* y *Prosopis* sp. R: raíz, T: tallo y E: control de epífitos. A, B y C se refieren a los métodos de extracción utilizados

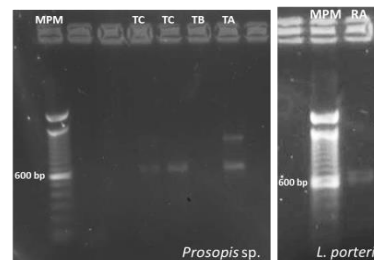


Figura 2. Amplificación del gen 26s rRNA. A partir de DNA metagenómico. R: raíz y T: tallo.

Conclusiones. El mejor método de extracción de DNA metagenómico para *L. porteri* fue el protocolo de Panigrahy, mientras que para *Prosopis* sp. los métodos de Panigrahy y Márquez mostraron los mejores resultados.

Bibliografía.

1. Singh, N. y Chandra, R. (2014). *Handb. Med. Plant Bioact. Comp.*, 1-10.
2. Panigrahy, A., Babu, S., Vivekandhan, G., Subash Kumar, R. y Thayumanavan, T. (2011). *Microbio. Biotech. Res.* 2(1): 11-19.
3. Márquez, H., Hernández, R., Orozco, M., Velázquez, I. y Santoyo, G. (2010). *Genet Mol Res.* 9(4): 2372-2380.
4. Sessitsch, A., hardoim, P., Doring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Fiedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, J. y Reinhold-Hurek, B., (2012). *Am Phytopath Soc.* 25(1): 28-36.