



## ESTANDARIZACION Y OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE CAOBA (*Swietenia macrophylla*) SIN NITRÓGENO LIQUIDO CON LA TÉCNICA DE CTAB, PARA ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Bautista Alor Martín<sup>1,2</sup>, Huijara Vasconcelos José J.<sup>1,2</sup>, Osorio Prieto Imelda<sup>1</sup>, Florentino Rodríguez Damaris<sup>1</sup>, Quiroz Adriana<sup>2</sup>, Peña Ramirez Yuri Jorge<sup>1</sup>, González Rodríguez José A.<sup>1</sup>, Robert Manuel<sup>2</sup>, Sánchez Teyer Lorenzo F.<sup>2</sup>. 1 Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Carr. Costera del Golfo km 216.4, C.P. 96026, Acayucan, Veracruz. 2. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Tel. (999) 9 813923 ext. 123 mail: santey@cicy.mx

*Palabras clave: Maderables, DNA, biología molecular*

**Introducción.** la caoba (*Swietenia macrophylla*) es una especie maderable muy cotizada a nivel mundial por su uso en ebanistería y elaboración de muebles, así como de instrumentos de precisión; la sobre explotación y el ataque de plagas como el gusano *Hypsypyla grandella zeller*, y la corta selectiva han ocasionado que esta especie este en vía de extinción. Es de suma importancia conocer el status genético de la especie con el fin de orientar en un futuro programas de mejoramiento genético basados en la disponibilidad de la información genética que guarda la especie en las pocas poblaciones naturales que aun quedan.

Hasta la fecha se desconoce en gran medida la variabilidad genética de las poblaciones naturales de caoba que se encuentran en el estado de Veracruz para contrastarlo con información generada en el estudio de otros estados e inclusive países mesoamericanos. Para lograr estos objetivos es indispensable contar con un método de extracción de ADN en el que la calidad, concentración tiempos y costos sean los óptimos para realizar estudios moleculares, aunado a lo anterior, se requiere que los protocolos de extracción puedan ser realizados de manera rutinaria en lugares donde la disponibilidad de nitrógeno líquido es difícil. Por lo tanto, este trabajo tiene por objetivo estandarizar y optimizar un método rápido y de bajo costo de extracción de ADN de *Swietenia macrophylla*.

**Metodología.** se probaron dos protocolos de extracción :CTAB(1) y el método de silica(2). El tejido utilizado fueron hojas de árboles adultos obtenidos de poblaciones naturales de Veracruz. La cantidad de tejido fue de .3g. MÉTODO SÍLICA: se maceró tejido fresco con N<sub>2</sub> líquido y se añadió el búfer de extracción y SDS al 20%, se incubó a 65 °C , se adicionó acetato de sodio 5 M se incubó en hielo. Luego se centrifugó y se tomo el sobrenadante para luego mezclarlo con silica agitando levemente por 3 minutos. Se centrifugó para formar la pastilla que fue lavada 2 veces con etanol al 75 %, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 50 µl ddH<sub>2</sub>O. se incubó a 55° C para tomar el sobrenadante que contiene el ADN. METODO CTAB: Se maceró el tejido fresco con N<sub>2</sub> líquido aplicando 1 ml de buffer de extracción de CTAB al 2 % y 100 µl 100 µM de B-mercaptoetanol. Incubar a 65°C por 2 horas con agitación frecuente. se realizaron 2 enjuagues con 600 µl de cloroformo: alcohol isoamflico (24:1)

centrifugando y tomando el sobrenadante de cada lavado se precipito con 500 µl de isopropanol preenfriado y 50 µl de acetato de Sodio 3M. Se incubo por 15 minutos a -20 grados centígrados. Se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Se lavó la pastilla 2 veces con etanol al 75% y se secó la pastilla resuspendiéndose posteriormente en 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Una vez escogido el protocolo de mejor resultado se ajustaron las condiciones para no utilizar N<sub>2</sub> liquido variando la cantidad de tejido de (.5 ,1 y 1.5 g ; .13 y .3 g) de tejido y el volumen de buffer (1,2 y 3 ml) . se calentó el material (mortero y pistilos) y el buffer de extracción y se prosiguió con el protocolo de CTAB. La integridad del ADN se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Para determinar si el ADN puede ser utilizado para análisis de marcadores moleculares, se sometió a una digestión con enzimas de restricción (MseI y EcoRI) una ligación de adaptadores específicos a los sitios de restricción y una preamplificación.

**Resultados y discusión.** de los protocolos ensayados : el método sílica fue descartado debido a que no se logró obtener ADN. Sin embargo, con la técnica de CTAB si se logró obtener ADN con una concentración promedio de 800 a 900 ng pero con la variante de que contiene RNA y para ello hay que tratar con RNAsas. De las modificaciones que se realizaron para no utilizar N<sub>2</sub> líquido: el experimento que mejor resultados nos dió y por comodidad de manipulación fue de .3 g de tejido fresco con 2 ml de buffer de extracción. El ADN fue digerido y amplificado sin ningún problema.

**Conclusiones.** Se optimizó el protocolo de CTAB sin la utilización de N<sub>2</sub> líquido reduciendo el costo. Se comprobó que el ADN puede ser utilizado para estudios de Biología Molecular, además el método puede ser utilizado en laboratorios que carezcan de N<sub>2</sub> líquido.

**Agradecimiento.** Instituto Tecnológico Superior de Acayucan, Centro de Investigación Científica de Yucatán; por el financiamiento.

### **Bibliografía.**

- (1) Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. FOCUS 12:13-15.
- (2) Echevarria-Machado, L., Sánchez-Cach, L.A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, and Moreno-Valenzuela. (2005) A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. Molecular Biotechnology 31:129-135.