



ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Cedrela odorata*, PARA ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Jose J. Huijara^{1,2}, Martin Bautista^{1,2}, Yesenia Murillo¹, Jenny García¹, Imelda Osorio¹, Damaris Florentino¹, Adriana Quiroz², Yuri J. Peña¹, Jose A. González¹, Manuel Robert², Sánchez-Teyer Lorenzo F.²

¹ Unidad de Biotecnología Vegetal. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Dirección. ² Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. correo: santey@cicy.mx

Palabras claves: Maderables, ADN.

Introducción. *Cedrela Odorata* pertenece al Orden Sapindales y a la familia de las Meliaceas. Esta especie es de una gran importancia forestal y su madera tiene un elevado valor comercial, alcanzando hasta \$84 USD el metro cúbico, sin embargo la tala inmoderada y los incendios forestales han disminuido considerablemente el número de poblaciones y actualmente se estima una densidad de 0.2 y 0.5 árboles por hectárea. Aunado a lo anterior, los estudios están encaminados en conocer a nivel genético esta especie. En nuestro grupo, estamos interesados en conocer el nivel de variación genética de ésta especie en la región de Veracruz, lo cual hace necesario contar con un método de extracción de ADN en el que la calidad, concentración, tiempo y costos sean los óptimos para realizar los estudios, considerando que en muchas ocasiones el material joven es difícil de obtener.

El presente trabajo tuvo por objetivo estandarizar y optimizar un método rápido y de bajo costo de extracción de ADN de *Cedrela odorata*.

Metodología. Se probaron dos protocolos de extracción: el CTAB (1) y el método de Sílica (2). El tejido utilizado fueron hojas de árboles adultos muestreados en bosques de Veracruz. La cantidad de tejido para ambos protocolos fue de 500 mg. **Método de CTAB:** Se maceró el tejido fresco con N₂ líquido y se añadió buffer CTAB, incubando 2 hr a 65°C. Se realizaron dos lavados con cloroformo:isoamilico (24:1) centrifugando y tomando el sobre nadante de cada lavado. Se precipitó con isopropanol y acetato de sodio 3M y se incubando a -20°C. Se centrifugó y se decantó el sobrenadante para luego lavar la pastilla 2 veces con etanol al 75%. Se secó y resuspendió la pastilla en 50 µl de Agua.

Método de Sílica: Se maceró el tejido fresco con nitrógeno líquido y se añadió el buffer de extracción y SDS al 20%, se incubó a 65°C, para después adicionar acetato de sodio 5M e incubar en hielo. Posteriormente se centrifugó y se tomó el sobrenadante el cual se mezcló con sílica, con agitación leve durante 3 min. Se centrifugó para formar una pastilla que fue lavada 2 veces con etanol al 75%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en ddH₂O a pH 7.5. Se incubó a 55 °C, y se centrifugó para tomar el sobrenadante que contiene el ADN.

Una vez escogido el protocolo de mejor resultado, se ajustaron las condiciones para no utilizar N₂ líquido, variando la cantidad de tejido (500 y 700 mg) y el volumen del buffer (1 y 2.5 ml). Se calentó el material (morteros y pistilos) y el buffer de extracción y se siguió con el protocolo normal de extracción con sílica. 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 por PCR.

Resultados y discusión. Con ambos protocolos evaluados (CTAB y Sílica) fue posible extraer ADN (Fig. 1A y B), sin embargo aunque en el protocolo de CTAB la cantidad de ADN fue mayor que por Sílica (0.7µg/µl y 0.47µg/µl respectivamente), el ADN se obtiene con más impurezas que se observan en el punto de aplicación en el gel de agarosa además de que presenta una gran cantidad de ARN, lo cual implica la utilización RNAasa para eliminarlo e incluye tres veces el tiempo requerido con respecto al otro protocolo.

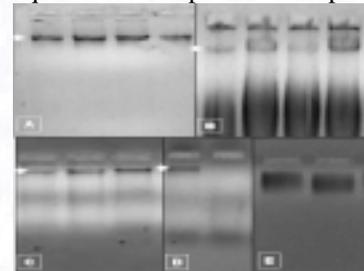


Figura 1. ADN de *Cedrela odorata* en agarosa al 1% (A-D). A) ADN genómico método de sílica. B) ADN genómico método CTAB. C) ADN método sílica sin Nitrógeno líquido D) Carril 1 ADN genómico, carril 2 digestión enzimática. E) Barrido típico de preamplificación de AFLPs en agarosa al 3%. Las puntas de flecha indican la banda del ADN genómico.

De las modificaciones que se realizaron para no utilizar N₂ líquido: en ambas se obtuvo ADN pero la mayor concentración se obtuvo utilizando 700 mg de tejido y 2.5ml de buffer de extracción. El ADN fue digerido y amplificado sin ningún problema (figura 1C,D).

Conclusiones. Se optimizó el protocolo de Sílica sin la utilización de N₂ líquido reduciendo el tiempo y los costos en comparación con la aplicación del protocolo de CTAB. Se comprobó que el ADN puede ser utilizado para estudios de Biología molecular Además el método puede ser usado en laboratorios que carezcan de N₂ líquido.

Agradecimiento. Instituto Tecnológico Superior Acayucan, Centro de Investigación Científica de Yucatán por el financiamiento del proyecto.

Bibliografía.

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