

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE
PLANTAGO MAJOR DIRIGIDA A LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR**

Julio César Gómez González

CARTAGO, 2005

OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE *PLANTAGO MAJOR* DIRIGIDA A LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR

Julio César Gómez González

RESUMEN

Plantago major L. (llantén mayor o común) es una planta medicinal que presenta diversas propiedades, entre ellas la desinfección y cicatrización de heridas, actividad antiinflamatoria y analgésica, debido a que posee una serie de sustancias bioactivas que tienen gran potencial en la fabricación de medicamentos, por lo que la utilización de la especie correcta es crucial.

Una técnica que analiza el ADN de los individuos como la tipificación molecular es más eficiente y confiable que los procedimientos convencionales de identificación. El objetivo de este trabajo es la optimización de un protocolo de extracción de ADN de *P. major* para obtener ADN de calidad, que permita una posterior tipificación molecular de ésta especie.

Se emplearon muestras secas y frescas para valorar seis protocolos de extracción. Las muestras de ADN obtenidas se evaluaron mediante espectrofotometría, electroforesis en geles de agarosa y la amplificación por PCR con iniciadores para RAPDs y para microsatélites específicos. Los mejores resultados se alcanzaron con un protocolo que utiliza un kit de extracción, el cual demostró generar ADN de calidad para ambos tipos de muestra y además que se obtiene ADN amplificable para RAPDs, como el OPA02.

Palabras clave: *Plantago major*, ADN, kit de extracción, PCR, tipificación molecular.

INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005.

OPTIMIZATION OF A DNA EXTRACTION PROTOCOL OF *PLANTAGO MAJOR* DIRECTED TO MOLECULAR TYPIFICATION

Julio César Gómez González

ABSTRACT

Plantago major L. (greater or common plantain) is a medicinal plant that presents diverse properties, among them the disinfection and healing of wounds, antiinflammatory and analgesic activity, because it has a series of bioactive substances that have great potential in the medicine manufacture, reason why the use of the correct species is crucial.

A technique that analyzes the DNA of the individuals as the molecular typification is more efficient and reliable than the conventional procedures of identification. The objective of this work is the optimization of a DNA extraction protocol of *P. major* to obtain quality DNA, that allows a later molecular typification of this one species.

Dry and fresh samples were used to value six protocols of extraction. The obtained DNA samples were evaluated by means of spectrophotometry, electrophoresis in agarose gels and the amplification by PCR with primers for RAPDs and specific microsatellites. The best results were reached with a protocol that uses kit of extraction, which demonstrated to generate DNA of quality for both types of sample and in addition that obtains amplifiable DNA for RAPDs, like the OPA02.

Key words: *Plantago major*, DNA, kit of extraction, PCR, molecular typification.

GRADUATION FINAL WORK REPORT. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005.

**OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE
PLANTAGO MAJOR DIRIGIDA A LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**M.Sc. Johnny Peraza Moraga,
Profesor Asesor**

**M.Sc. Geovanny Garro,
Profesor Asesor**

**Licda. Maelle Dubois,
Lectora**

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su
apoyo durante mis estudios.

Julio César

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

A la empresa Laboratorios Lisan S.A., Poétt Ryan y Maelle Dubois, por el apoyo financiero y la oportunidad para la realización del proyecto.

Al M.Sc. Johnny Peraza y al M.Sc. Geovanny Garro, por su valiosa guía, aportes y la confianza durante la ejecución del trabajo.

A Fabián Echeverría, por su apoyo incondicional en las labores de laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ACREDITACIÓN	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE CUADROS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE ANEXOS	10
INTRODUCCIÓN	11
REVISIÓN DE LITERATURA	13
Descripción de <i>Plantago major</i>	13
Aislamiento del ADN	16
Cuantificación y determinación de la calidad del ADN	17
Determinación espectrofotométrica	17
Determinación mediante electroforesis en geles de agarosa	17
Determinación por medio de la amplificación de ADN	18
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Muestras de <i>Plantago major</i>	21
Protocolos de extracción de ADN	22
Evaluación mediante electroforesis en geles de agarosa	28
Evaluación mediante espectrofotometría	28
Evaluación mediante la amplificación de ADN	28
RESULTADOS	32
Evaluación mediante electroforesis en geles de agarosa	32
Evaluación mediante espectrofotometría	35
Evaluación mediante la amplificación de ADN	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	49

ÍNDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Algunas sustancias bioactivas de <i>Plantago major</i>	14
2	Procedencia, tipo de material y simbología asignada de las muestras de <i>Plantago major</i> utilizadas.	21
3	Comparación de los 6 protocolos utilizados	27
4	Concentraciones de reactivos y perfil térmico para la valoración con RAPDs	29
5	Secuencia de los iniciadores para RAPD	29
6	Concentraciones de reactivos y perfiles térmicos para la valoración con microsatélites	30
7	Secuencia de los iniciadores para microsatélites	31
8	Coloración de los botones de ADN obtenidos y resultado de la electroforesis de cada protocolo.	32
9	Absorbancia a 260 nm y 280 nm, calidad y concentración de las muestras de ADN de las diferentes extracciones.	36
10	Comparación de las concentraciones de ADN obtenidas con el marcador de masa y espectrofotometría	39
11	Resultados del análisis RAPD de los protocolos	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	<i>Plantago major</i>	13
2	<i>Plantago major</i> y <i>Plantago lanceolata</i>	21
3	Muestras de ADN 1-19 en gel de agarosa	33
4	Muestras de ADN 20-38 en gel de agarosa	33
5	Muestras de ADN 39-50 en gel de agarosa	34
6	Muestras de ADN 51-54 en gel de agarosa	34
7	Muestras de ADN 55-57 en gel de agarosa	35
8	Productos PCR con el iniciador OPA02	40
9	Marcador de masa Mass Ruler	53
10	Marcador de peso molecular Fast Ruler	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Procedimientos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa	49
2	Marcadores de masa y peso molecular utilizados	53

INTRODUCCIÓN

Plantago major L. (llantén mayor o común) es una planta medicinal que se ha utilizado durante siglos en muchas partes del mundo, para el tratamiento de problemas y enfermedades relacionadas con la piel como la cicatrización de heridas y el acné. Además se utiliza para el tratamiento de afecciones de la respiración como el asma, y las úlceras en el sistema digestivo. Tiene propiedades analgésica y antiinflamatoria, debido a que presenta diversas sustancias biológicamente activas como alcaloides, heterósidos iridoideos, flavonoides, entre otros (Samuelsen, 2000).

Las especies de *Plantago* han mostrado ser muy útiles en estudios ecofisiológicos, de evolución y genética poblacional. Una de las razones es el amplio rango de sistemas de cruzamiento en el género y el hecho de que muchas de las especies son comunes y ampliamente distribuidas (Hale y Wolff, 2003).

En las últimas décadas ha habido un notorio aumento de los marcadores genéticos disponibles para estudios de diversidad genética. Algunos de ellos tienen diferentes bases moleculares, pero todos están enfocados en determinar la organización de la estructura genética de las poblaciones naturales y cultivadas. Además, ellos muestran la similitud entre poblaciones y entre individuos, ya que evitan el factor ambiental (Becerra y Paredes, 2000).

Conocer la similitud entre los individuos y las poblaciones es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético, pues permite, además de la organización del material, la selección adecuada de los genotipos superiores y la complementación con datos fenotípicos y agronómicos para el desarrollo de una población mejorada (Becerra y Paredes, 2000). Además la diferenciación a nivel molecular permite verificar la utilización de las especies de interés y también determinar la trazabilidad o procedencia de individuos de una misma especie.

La empresa Laboratorios Lisan S.A. utiliza el tamisaje fitoquímico con métodos analíticos como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y la cromatografía en capa fina (TLC), para determinar químicamente los principios activos contenidos en cada planta y asegurar la calidad de la materia prima, además para comprobar la utilización de la especie correcta; sin embargo se requiere de una técnica biotecnológica más eficiente y confiable para la identificación de las especies, como la tipificación molecular, que permita a la empresa asegurar la procedencia de la materia prima y cumplir con requisitos necesarios para una normalización internacional.

El objetivo de este trabajo es la optimización de un protocolo de extracción de ADN de *Plantago major* para obtener ADN de calidad, que permita una posterior tipificación molecular de ésta especie.

REVISIÓN DE LITERATURA

La importancia de las investigaciones sobre la variabilidad genética de plantas con uso medicinal, radica en el impacto que pueden tener sus compuestos derivados una vez que éstas son domesticadas y los métodos de extracción estandarizados, por lo que se puede realizar un mejor aprovechamiento de los recursos fitogenéticos (Lara *et al.*, 2003).

Descripción de *Plantago major*

Plantago major L., llantén mayor o común (fig.1), es una planta perenne que pertenece a la familia Plantaginaceae. Puede alcanzar los 15 cm de altura, pero el tamaño varía según el hábitat. Las hojas crecen en rosetas y son ovaladas o elípticas, con una venación paralela (5-9), son glabras y tienen un margen entero o irregularmente dentado. Las flores son pequeñas, verde oscuro, en espigas largas no ramificadas (Samuelsen, 2000; Arredondo, 2002).



Figura 1. *Plantago major*
Tomado de Arredondo, 2002.

P. major es polinizada por el viento y produce gran cantidad de semillas (alrededor de 20000 por planta). Las semillas son muy pequeñas, con forma ovalada y con un ligero sabor amargo. El endospermo de la semilla tiene paredes celulósicas muy engrosadas y el lumen celular con aceite y proteína. Las semillas se encuentran en cápsulas (8-16 por cápsula) y son pegajosas en clima húmedo debido a los polisacáridos presentes en la cubierta seminal, por lo que son dispersadas por animales y humanos (Samuelsen, 2000; Arredondo, 2002).

Estudios realizados sobre el polen muestran que *P. major* fue introducida a los países nórdicos paralelamente a la introducción de los primeros campos cultivados en la edad de piedra, hace aproximadamente 4 000 años. Fue esparcida por el ser humano desde Europa hacia el resto del mundo. Los indios la llamaron “huella del hombre blanco” porque era encontrada en todos los lugares donde los europeos habían estado. Esto originó el nombre del género *Plantago* que deriva del latín *planta* el cual significa planta del pie (Samuelsen, 2000).

Además contiene compuestos bioactivos que se han encontrado en extractos de las hojas, semillas, flores, tallo, raíz, tales como mucílagos, taninos, ácidos fenolcarboxílicos, heterósidos iridoideos, flavonoides, sales minerales, cumarinas, colina, alcaloides, carbohidratos, derivados del ácido cafeico, vitaminas, entre otros (Samuelsen, 2000; Arredondo, 2002). Algunas de estas sustancias se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Algunas sustancias bioactivas de *Plantago major*.

Carbohidratos	Planteosa, plantaglúcido, PMII (pectina con galactosa, arabinosa, rhamnosa y ácido galacturónico).
Alcaloides	Indicaína, plantagonina.
Derivados ácido cafeico	Plantamajósido, acteósido.
Flavonoides	Baicaleína, hispidulina, plantaginina, escutelareína.
Heterósidos iridoideos	Asperlúsido, aucubina, catapol.
Vitaminas	<i>b</i> - caroteno, ácido ascórbico.

Fuente: Samuelsen, 2000.

Los polisacáridos como el plantaglúcido y el PMII han presentado diferentes actividades biológicas como la reducción de úlceras en ratas, actividad anticomplementaria e inducir la producción del factor alfa para la necrosis de tumores (TNF- α) de monocitos humanos (Samuelsen *et al.*, 1996; 1999; Samuelsen, 2000).

El plantamajósido, sustancia derivada del ácido cafeico, tiene actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacterial, y el acteósido tiene actividad analgésica, antibacterial y efecto antihipertensivo. Los flavonoides como la baicaleína, hispidulina y plantaginina son antioxidantes. Además, la baicaleína puede inducir la muerte de células de carcinoma, y como la escutelareína, tiene actividades antialérgicas y es inhibidor *in vitro* de la HIV reverso transcriptasa. La aucubina (heterósido iridoideo) tiene propiedad antiinflamatoria y de antídoto contra el veneno de hongos amanita (Samuelsen, 2000).

En Turquía un extracto de las hojas con metanol y agua, inhibió la formación de úlceras en un 40%. Además extractos de *P. major* han tenido buenos efectos contra infecciones de herpes en humanos y contra bacterias, especialmente en heridas infectadas las cuales además cicatriza, en comparación con antibióticos. También se ha comprobado su actividad antibacterial y fungicida al producir zonas de inhibición en placas con cultivos de *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *S. dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Fusarium tricinctum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Microsporium gypseum* y *Candida albicans*, entre otros (Samuelsen, 2000).

En México la decocción en solución salina de la planta se ha utilizado contra la diarrea y parásitos como *Giardia duodenalis*, con resultados similares al control positivo tinidazol; además en Guatemala se ha usado como agente diurético (Samuelsen, 2000).

También *P. major* se utiliza como planta medicinal en el tratamiento de un gran número de problemas y enfermedades, tales como: acné, quemaduras, asma, bronquitis, resfríos, gastritis, colitis, desórdenes menstruales, infecciones de ojos (Samuelsen, 2000; Arredondo, 2002).

Debido al potencial de *Plantago major* en la industria farmacéutica la verificación del material que se utiliza es importante para asegurar la calidad de los medicamentos elaborados. Para esta verificación del material se prefiere usar el polimorfismo que contiene el ADN de los organismos con respecto a los marcadores bioquímicos, debido a que los polimorfismos son mucho más abundantes, porque se encuentran distribuidos por todo el genoma, es decir tanto en el ADN codificante como en el no codificante; y además porque su presencia no es afectada por el ambiente o presencia en tejido específico, ya que son estrictamente genéticos. Sin embargo primeramente debe obtenerse ADN de buena calidad que permita un adecuado análisis genético (Valadez y Kahl, 2000).

Aislamiento del ADN

La capacidad de obtener ADN puro de alto peso molecular depende en gran parte del protocolo utilizado para la extracción. Además el aislamiento del ADN puede no ser simple y los métodos no son necesariamente reproducibles para todas las especies (Drábková *et al.*, 2002; Aras *et al.*, 2003).

Las especies de plantas pueden mostrar una gran variabilidad en complejas vías metabólicas, por lo que la composición bioquímica en los tejidos de diferentes especies puede variar considerablemente y no permitir producciones óptimas de ADN a partir de un protocolo, por lo que aún especies muy relacionadas requieren diferentes protocolos de extracción (Khanuja *et al.*, 1999).

Existen diversas técnicas para la extracción de ADN, entre ellas la extracción orgánica con fenol, la extracción alcalina con NaOH, protocolos que utilizan detergentes como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), deodecil sulfato de sodio (SDS), Tritón X-100, enzimas como la proteinasa K y también kits de extracción, entre otros (Valadez y Kahl, 2000).

Los problemas encontrados en el aislamiento y purificación de ADN de alto peso molecular de ciertas especies de plantas aromáticas y medicinales incluyen la degradación del ADN debido a nucleasas, tales como la ADNasa; coaislamiento de polisacáridos altamente viscosos; componentes inhibidores como polifenoles y otros metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, terpenos y quinonas, los cuales interfieren directa o indirectamente con las reacciones enzimáticas (Weising y Kahl, 1998; Khanuja *et al.*, 1999; Valadez y Kahl, 2000; Aras *et al.*, 2003).

Cuantificación y determinación de la calidad del ADN

La calidad y cantidad del ADN extraído puede determinarse de tres maneras: análisis espectrofotométrico, visualización en geles de agarosa y la valoración por PCR.

Determinación espectrofotométrica

Para cuantificar la cantidad de ADN en un espectrofotómetro, la lectura debe hacerse a una longitud de onda de 260 nm, ya que es la longitud de onda que absorbe el ADN. Cuando la absorbancia es igual a 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de ADN doble banda, lo cual permite el cálculo de la concentración del ADN en la muestra (Valadez y Kahl, 2000; Eppendorf, 2005).

Las proteínas absorben la longitud de onda de 280 nm; la relación entre las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm ($DO_{260/280}$) aporta una estimación de la pureza del ADN. Las preparaciones puras del ADN tienen valores de $DO_{260/280}$ de 1.8; valores menores indican contaminación con proteínas y valores mayores señalan presencia de ARN (Valadez y Kahl, 2000; Eppendorf, 2005).

Determinación mediante electroforesis en geles de agarosa

La calidad del ADN puede ser estimada por la electroforesis de una alícuota de la muestra en geles de agarosa. El ADN de alto peso molecular aparece como una 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 pierda su nitidez o no se aprecie (Valadez y Kahl, 2000).

Una forma rápida y confiable de estimar la pureza del ADN, es a través de la fluorescencia que emite el bromuro de etidio cuando está mezclado con él. Este compuesto químico tiene afinidad por las 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 los ácidos nucleicos. La estimación puede llevarse a cabo, debido a que la fluorescencia emitida es proporcional al total de la masa del ADN o ARN (Valadez y Kahl, 2000; Drábková *et al.*, 2002).

La cantidad de ácidos nucleicos en la muestra, puede ser estimada al comparar el campo fluorescente de las bandas respecto al marcador de masa o diluciones de ADN cuantificado previamente en el espectrofotómetro (Valadez y Kahl, 2000).

Determinación mediante la amplificación de ADN

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), es una tecnología que se utiliza para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo. Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadoras llamadas *primers*, una enzima ADN polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un buffer apropiado, magnesio, agua y un equipo llamado termociclador, que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado (Valadez y Kahl, 2000).

La PCR consiste de tres pasos esenciales: el primero es la desnaturalización y sirve para separar mediante temperatura (94⁰C) la molécula doble de ADN a cadenas sencillas, que servirán como moldes para la síntesis del (o los) fragmento respectivo. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el alineamiento de los iniciadores a la secuencia blanco del ADN molde. En el tercero, se lleva a cabo el alargamiento o extensión de la molécula iniciadora mediante la enzima ADN polimerasa a 72⁰C. Estos tres pasos (ciclos) se repiten en el termociclador, permitiendo obtener de manera exponencial el fragmento o fragmentos discretos sintetizados a partir del molde de ADN y poder ser visualizados en un gel de agarosa (Valadez y Kahl, 2000).

La técnica del polimorfismo de ADN amplificado al azar o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) consiste de fragmentos amplificados con el uso de oligonucleótidos sintéticos cortos, con una secuencia aleatoria, que evalúan el ADN total por medio de la PCR para la detección de polimorfismos (Lara *et al.*, 2003).

Provee una buena discriminación intra e interespecífica y permite el análisis de genomas enteros sin información previa de la secuencia del ADN, sin embargo se generan marcadores dominantes que revelan pocos alelos y usualmente se requiere de una cuidadosa optimización para asegurar la reproducibilidad (Vogel y Scolnik, 1998).

K. Wolf y M. Morgan-Richards (1998) obtuvieron patrones polimórficos reproducibles con los iniciadores OPA01, OPA02 y OPA10 en subespecies de *Plantago major*.

Los microsatélites (*Simple Sequence Repeat SSR*) son secuencias altamente variables en el número de las unidades (repeticiones) que las integran, lo que hace que su análisis sea útil en la búsqueda de polimorfismos, ya que difieren de un individuo a otro (Valadez y Kahl, 2000).

El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites ofrecen una buena reproducibilidad. Todo esto los hace ideales para los estudios de poblaciones, mapeo genético, estudios de ligamiento e identificación varietal (Morgante y Olivieri, 1993; Cregan y Quigley, 1998; Becerra y Paredes, 2000).

OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS

Objetivo general: Optimizar un protocolo de extracción de ADN de *Plantago major* para obtener ADN de calidad, que permita una posterior tipificación molecular de ésta especie.

Objetivos específicos:

- Analizar diferentes tipos de muestras para la extracción de ADN como muestras frescas y material seco.
- Comparar la eficiencia de seis protocolos para la extracción de ADN, determinando la calidad y cantidad mediante espectrofotometría.
- Analizar la calidad y cuantificar el ADN de las extracciones mediante la visualización de bandas en geles de agarosa y un marcador molecular de masa.
- Determinar la utilidad de los protocolos a través de la amplificación de fragmentos en la PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de *Plantago major*

Las muestras de *P. major* utilizadas fueron siete, de las cuales cuatro eran material seco procedente de Bulgaria y Peñas Blancas (Costa Rica), suministradas por Laboratorios Lisan S.A y tres muestras de material fresco obtenidas en el Centro de Investigación en Biotecnología (C.I.B.) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (I.T.C.R.).

En el cuadro 2 se presenta la lista y procedencia de las muestras de *Plantago major* utilizadas y la simbología asignada en los procedimientos.

Cuadro 2. Procedencia, tipo de material y simbología asignada de las muestras de *Plantago major* utilizadas.

Procedencia	Tipo de material	Simbología
Peñas Blancas	Hojas trituradas y algunas enteras	PB
Bulgaria (Herba Commers)	Hojas trituradas y algunas enteras	BH
Europa (Amorós)	Hojas trituradas	EA
Bulgaria (Plantafarm S.A.)	Hojas trituradas	BP
I.T.C.R.	Plantas enteras	TV
I.T.C.R.	Plantas enteras <i>in vitro</i>	IV
I.T.C.R.	Plantas enteras	CV



Figura 2. Muestra CV de *Plantago major* (izquierda) y planta de *Plantago lanceolata* (derecha)

Protocolos de extracción de ADN

Se valoraron seis protocolos mediante un análisis electroforético en geles de agarosa, una determinación espectrofotométrica y la amplificación del ADN de muestras obtenidas en catorce extracciones realizadas.

Protocolo Drábková *et al.*, 2002.

Primeramente se precalentó el buffer de extracción a base de CTAB (100 mM Tris pH 8, 1,4 M NaCl, 20mM EDTA y 2% CTAB) a 60⁰C. Después se maceró 100 mg. de las muestras en un tubo de 1,5 mL con 700µL de buffer CTAB y se incubó a 60⁰C por 45 minutos, se mezcló por inversión y se adicionó 600µL de cloroformo-isoamilalcohol (24:1), después de mezclar nuevamente, se centrifugó 15 minutos a 13000 r.p.m. Posteriormente se transfirieron 600µL del sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó 500µL de cloroformo-isoamilalcohol (24:1), se mezcló y se centrifugó 15 minutos a 13000 r.p.m. Se dejaron a -20⁰C por 1 hora y se centrifugó 15 minutos a 13000 r.p.m. Después se descartó el sobrenadante y se lavó el botón con 200µL de etanol 80% y se dejó toda la noche a -20⁰C. Finalmente se centrifugó 10 minutos a 10000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se disolvió el botón de ADN en 40µL de buffer TE (10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA).

Protocolo Aras *et al.*, 2003

Se maceraron 200 mg. de tejido vegetal con mortero y pistilo y se agregó 800µL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 1,4 M NaCl y 2% CTAB) precalentado y se maceró una vez más. Se transfirió a un tubo de 1,5 mL y se agregó 2µL de proteinasa K (20 mg/mL). Se incubó a 65⁰ C por 20 minutos, después de dejar enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 250µL de acetato de potasio 5 M y se incubó sobre hielo por 30 minutos. Se centrifugó a 13200 r.p.m. por 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Después se adicionó 500µL de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1), se mezcló suavemente por inversión 40-50 veces y se incubó sobre hielo por 15 minutos. Luego se centrifugó 5 minutos a 13200 r.p.m. y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó 1 volumen de isopropanol. Después se incubó sobre hielo 15 minutos. Se volvió a centrifugar 5 minutos a 13200 r.p.m. y se añadieron 200µL de etanol 80% al botón. Se centrifugó 10 minutos a 13200 r.p.m. y se lavó el botón con 100µL de etanol 70% y luego se dejó secar al aire. El botón de ácidos nucleicos fue disuelto en 45µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8 y 0,1 mM EDTA). Finalmente se adicionó 3µL de ribonucleasa A (10 mg/mL) y se almacenó a -20⁰ C hasta su uso.

También se realizaron las modificaciones de utilizar mayor cantidad de muestra (400 mg. de material seco y 1 g. de material fresco) y centrifugar 5 minutos adicionales en cada centrifugación.

Protocolo Madriz¹, 2005

Se colocaron 50 mg. de tejido seco y 200 mg. de tejido fresco de la planta en tubos de 1,5 mL y se adicionó 600µL de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8 y 0,5% SDS) y luego se maceró hasta que las muestras estuvieran bien molidas. Después se incubaron a 65⁰ C por 45 minutos. Se adicionó 0,5µL de ribonucleasa A (10 mg/mL) y se mezcló por inversión, posteriormente se incubó a 37⁰ C por 15 minutos. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente se agregó 200µL de acetato de potasio 5 M y se mezcló por inversión. Después se centrifugó a 13200 r.p.m. por 4 minutos y se decantó el sobrenadante en un tubo nuevo con 600µL de isopropanol frío y se mezcló por inversión. Seguidamente se centrifugó a 13200 r.p.m. durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se agregó 600µL de etanol de 70% para lavar el botón, mezclando bien por inversión. Luego se centrifugó 1 minuto a 13200 r.p.m., se descartó el sobrenadante, se secó el botón y finalmente se resuspendió el ADN en 100µL de buffer TE (100 mM Tris-HCl pH 8 y 0,1 mM EDTA). El ADN se almacenó a -20⁰ C.

¹ MADRIZ, K. 2005. Biotécnica Análisis Moleculares S.A. (Comunicación personal).

Protocolo Khanuja *et al.*, 1999

Las muestras (600 mg. de tejido fresco y 100 mg. de tejido seco) fueron maceradas con 100 mg. de cristales de vidrio. El macerado se transfirió a un tubo de 1,5 mL y se agregó 600µL de buffer de extracción recién preparado (100 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 1,5 M NaCl, 2,5% CTAB, 1% PVP y 0,2% mercaptoetanol), y se mezcló por inversión hasta hacer una mezcla pastosa. Posteriormente se incubó a 60⁰C por cuatro horas y media. Luego se añadió 600µL de cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y se mezcló por inversión durante 15 minutos. Después se centrifugó a 8000 r.p.m. por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo nuevo y se agregó 300µL de NaCl 5 M, se mezcló por inversión y se añadió 0,6 volumen de isopropanol frío y se dejó la mezcla a 4⁰C toda la noche. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 10000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se lavó el botón con 200µL de etanol 80%. Se secó el etanol sobre papel absorbente y se disolvió el botón en 100µL de buffer TE (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA). Después se adicionó 1µL de ribonucleasa A (10 mg/mL) y se incubó a 37⁰C por 30 minutos, la cual se extrajo con 100µL de cloroformo-isoamilalcohol (24:1); luego se transfirió la capa acuosa (superior) a un tubo nuevo. Después se agregó 200µL de etanol absoluto frío, se centrifugó 10 minutos a 10000 r.p.m. y se decantó el etanol. Finalmente se lavó el botón con 200µL de etanol 80% y se secó el etanol sobre papel toalla. El ADN fue resuspendido en 25µL de agua bidestilada estéril.

Además se realizaron las modificaciones de utilizar nitrógeno líquido para macerar, incubar por un período mayor de tiempo en el buffer de extracción y utilizar mayores cantidades de muestra.

Protocolo Promega modificado, 2005

Se maceraron las muestras con nitrógeno líquido para hacer un polvo fino y se transfirió 100 mg. del macerado a un tubo de 1,5 mL. Se adicionaron 700µL de *Nuclei Lysis Solution* y se mezcló con vórtex para humedecer el macerado. Luego se incubó a 65 °C por 20 minutos. Después se agregó 4µL de *Rnase Solution*, se mezcló por inversión 5 veces y se incubaron las muestras a 37 °C por 15 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y se adicionó 250µL de *Protein Precipitation Solution*, se mezcló con vórtex vigorosamente a alta velocidad por 20 segundos y se centrifugó 20 minutos a 13200 r.p.m. Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio con 600µL de isopropanol frío y se mezcló por inversión. Después se centrifugó 5 minutos a 13200 r.p.m. y se decantó el sobrenadante. El botón de ADN fue lavado con 600µL de etanol 70% frío mezclando suavemente por inversión. Se centrifugó 5 minutos a 13200 r.p.m. y se decantó el etanol sobre papel absorbente y se dejó secar el botón. Finalmente se resuspendió el ADN en 50µL de *DNA Rehydration Solution* y se almacenó a 4 °C.

También se utilizaron 40 mg. de macerado y se maceró con cristales de vidrio. Además se empleó una muestra de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) como control externo.

Protocolo de Araya *et al.*, 2005

Se colocaron 100 mg. de tejido vegetal en tubo de 1,5 mL, se agregaron 250µL de buffer de extracción (100 mM Tris HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 2% PVP y 0.2% mercaptoetanol) y se maceró el tejido. Luego se añadieron 750µL y se incubó a 65⁰C por 20 minutos. Se dejó enfriar el tubo a temperatura ambiente y se adicionó 750 µL de cloroformo-octanol (24:1), posteriormente se mezcló 20 veces por inversión y se centrifugó 15 minutos a 6000 r.p.m. Se extrajeron 400 µL del sobrenadante y se pasaron a otro tubo de 1,5 mL. Luego se añadió 0.5 volumen de NaCl 5M (200 µL) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (800 µL). Se mezcló bien con vórtex y se incubó a -20⁰C por una hora. Después se centrifugó 10 minutos a 10000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 750 µL de etanol al 70% frío. Se descartó el etanol y se secó el botón en una estufa a 37⁰C. Finalmente se resuspendió el ADN con 100 µL de buffer TE (10 mM Tris HCL pH 8, 1 mM EDTA) y se almacenó a -20⁰C.

Los 6 protocolos de extracción de ADN utilizados difieren en las técnicas de lisis celular, separación y precipitación del ADN, además del tiempo requerido. Predomina el uso del CTAB en los búferes de extracción, y los solventes orgánicos para la separación de las proteínas en lugar de los compuestos salinos como el acetato de potasio. Para la precipitación del ADN generalmente se utiliza el isopropanol (cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de los 6 protocolos utilizados

Protocolo	Extracción	Separación	Precipitación	Tiempo requerido
1. Drábková <i>et al.</i> , 2002	CTAB	Cloroformo-isoamilalcohol	Isopropanol	24 horas
2. Aras <i>et al.</i> , 2003	CTAB	Fenol-cloroformo-isoamilalcohol	Isopropanol	3 horas
3. Madriz, 2005	SDS	Acetato de potasio	Isopropanol	2 horas
4. Khanuja <i>et al.</i> , 1999	CTAB	Cloroformo-isoamilalcohol	Isopropanol	7 horas
5. Promega, 2005	Kit	Kit	Isopropanol	2 horas
6. Araya <i>et al.</i> , 2005	CTAB	Cloroformo-octanol	Etanol absoluto	3 horas

Evaluación de las extracciones mediante electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X con bromuro de etidio para hacer la electroforesis de las muestras de ADN de todas las extracciones y poder hacer la comparación entre ellas y con el marcador de masa Mass Ruler (ver anexo 2). Se cargaron 12µL de la mezcla de 10µL de muestra de ADN + 2µL de buffer de carga 6X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% azul de xilen cianol y 30% glicerol). Los geles se corrieron a 100 voltios por 1 hora.

Evaluación de las extracciones mediante espectrofotometría

El análisis espectrofotométrico se realizó en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 10uv. Las muestras de ADN se diluyeron tomando 5µL de muestra y 995µL de agua destilada estéril (dilución 1/200). Se calibró el blanco de agua destilada estéril y se hizo la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm. Posteriormente se obtuvo la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm ($DO_{260/280}$) para determinar la calidad, y se realizó el cálculo de la concentración de ADN de la siguiente manera:

$$\text{Absorbancia 260 nm} * \text{Factor de dilución (200)} * 50 \mu\text{g/mL}$$

Evaluación de las extracciones mediante la amplificación de ADN

Para la determinación de ADN amplificable se realizaron 14 reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) mediante RAPDs e iniciadores para microsatélites específicos, con diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y sin diluir, de las muestras de ADN de todos los protocolos, excepto del protocolo 2 de Aras *et al.*, 2003.

A. Análisis RAPD: Se realizaron dos procedimientos (ver anexo 1). En el primero se utilizaron los *primers* OPA13 y OPC02. En el segundo procedimiento (modificado) se utilizaron los *primers* OPE01, OPE03, OPA01 y OPA02, además de concentraciones finales mayores de los reactivos (cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones de reactivos y perfil térmico para la valoración con RAPDs

Procedimiento	1^o	2^o
Reactivo	Concentración	Concentración
Buffer PCR	1 X	1,2 X
MgCl ₂	2 mM	4,2 mM
dNTP's	0,1 mM	0,48 mM
Imprimador	0,8 μM	2 μM
Taq polimerasa	1,5 U	5 U

Perfil térmico		
Paso	Tiempo y Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	1 min 30 seg a 94 ^o C	1
Desnaturalización	30 seg a 94 ^o C	
Apareamiento	30 seg a 35 ^o C	40
Extensión	1 minuto a 72 ^o C	
Extensión final	3 minutos a 72 ^o C	1
Almacenamiento	Lo necesario a 4 ^o C	1

En el cuadro 5 se muestra la secuencia de los iniciadores utilizados en los análisis RAPD.

Cuadro 5. Secuencia de los iniciadores para RAPD

Iniciador	Secuencia 5'-3'
OPA01	CAGGCCCTTC
OPA02	TGCCGAGCTG
OPA13	CAGCACCCAC
OPC02	GTGAGGCGTC
OPE01	CCCAAGGTCC
OPE03	CCAGATGCAC

Fuente: OPERON, 2001.

B. Análisis con *primers* para microsatélites específicos: Se utilizaron dos procedimientos (ver anexo 1) con dos parejas de *primers* cuya secuencia fue propuesta por Squirrell y Wolff (2001). Inicialmente se siguió el procedimiento de Squirrell y Wolff; posteriormente se evaluó un procedimiento modificado (cuadro 6).

También se realizaron otras modificaciones como reducir la temperatura de hibridación de los iniciadores, variar el ciclaje y los tiempos de los programas.

Cuadro 6. Concentraciones de reactivos y perfiles térmicos para la valoración con microsatélites

Procedimiento	1^o	2^o		
Reactivo	Concentración	Concentración		
Buffer PCR	1 X	1 X		
MgCl ₂	1,5 mM	2,5 mM		
dNTP's	200 µM	300 µM		
Imprimador 1	0,33 µM	0,5 µM		
Imprimador 2	0,33 µM	0,5 µM		
Taq polimerasa	0,5 U	0,7 U		
Perfil térmico				
Paso	Tiempo y Temperatura	Ciclos	Tiempo y Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	12 min a 95 ^o C	1	12 min a 95 ^o C	1
Desnaturalización	15 seg a 95 ^o C		15 seg a 95 ^o C	
Apareamiento	15 seg a 57 ^o C	20	15 seg a 47 ^o C	10
Extensión	15 seg a 72 ^o C		15 seg a 72 ^o C	
Desnaturalización	15 seg a 89 ^o C		15 seg a 89 ^o C	
Apareamiento	15 seg a 53 ^o C	10	15 seg a 47 ^o C	30
Extensión	15 seg a 72 ^o C		15 seg a 72 ^o C	
Extensión final	30 minutos a 72 ^o C	1	10 minutos a 72 ^o C	1
Almacenamiento	Lo necesario a 4 ^o C	1	Lo necesario a 4 ^o C	1

En el cuadro 7 se muestra la secuencia de los iniciadores utilizados en los análisis para microsatélites.

Cuadro 7. Secuencia de los iniciadores para microsatélites

Iniciador	Secuencia 5'-3'
1.F	GAGCAGAGCAAACCGTTCAC
1.R	TTGCGTTGCTTGATGACATT
2.F	CTTCTCCAAGACGCAACC
2.R	CTGGTTCTAGTTTGGTATCACG

Fuente: Squirrell y Wolff, 2001

Las reacciones de PCR se corrieron en un termociclador BIO-RAD MyCyclerTM y en un termociclador Techne GENIUS.

RESULTADOS

Evaluación de las extracciones mediante electroforesis en geles de agarosa

Los botones de ADN obtenidos en cuatro de los protocolos presentaron una coloración café, sólo los protocolos de Khanuja *et al.*, 1999 (4) y de Araya *et al.*, 2005 (6) mostraron botones blancuzcos. En las electroforesis en geles de agarosa hubo una mayor presencia de ADN degradado y ARN, las bandas de ADN definidas y evidentes fueron escasas (cuadro 8).

Cuadro 8. Coloración de los botones de ADN obtenidos y resultado de la electroforesis de cada protocolo.

Protocolo de extracción	Coloración botones de ADN	Resultado de la electroforesis
1. Drábková <i>et al.</i> , 2002	Levemente café	ADN disperso y muy poco evidente
2. Aras <i>et al.</i> , 2003	Café	Extraños barridos verde-azules
3. Madriz, 2005	Café	Bandas de ADN definidas poco evidentes
4. Khanuja <i>et al.</i> , 1999	Blancuzca	Generalmente bandas definidas en muestras de material fresco y barridos de ADN degradado en las de material seco
5. Promega, 2005	Levemente café	ADN muy evidente parcialmente degradado
6. Araya <i>et al.</i> , 2005	Blancuzca	Barridos de ADN degradado y gran contaminación con ARN

Las figuras 3, 4, 5, 6 y 7 muestran los resultados de la electroforesis realizada de las muestras de ADN obtenidas en las catorce extracciones (numeradas de la 1 a la 57) con el marcador de masa Mass Ruler.

La presencia de barridos extraños de color verde-azul se observaron en la electroforesis del ADN obtenido con el protocolo 2, Aras *et al.*, 2003 (fig. 3 muestra n^o 6).

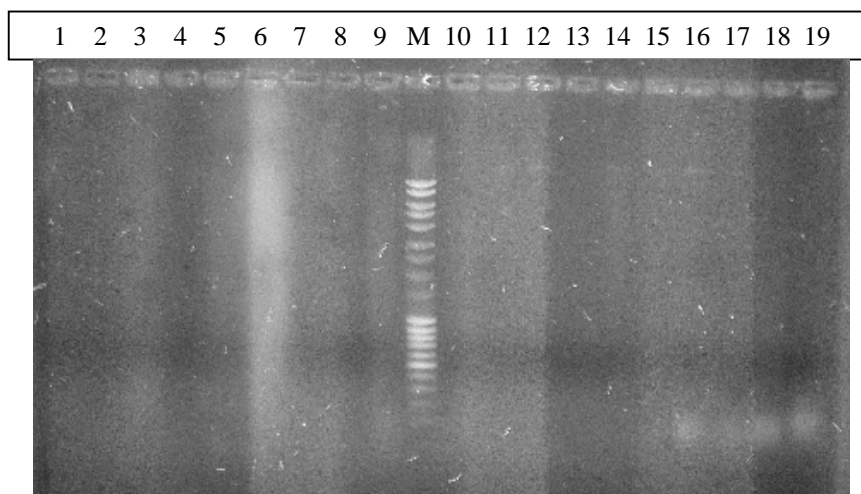


Figura 3. Muestras de ADN en gel de agarosa al 1% (1 y 2) PB y TV, Drábková *et al.*, 2002 (3 y 4) PB y CV, Aras *et al.*, 2003 (5 – 8) PB₁, PB₂, CV₁, CV₂, Aras *et al.*, 2003 (9-12) PB₁, PB₂, CV₁, CV₂, Madriz, 2005 (13 y 14) PB y CV, Khanuja *et al.*, 1999 (15-19) CV₁, CV₂, CV₃, PB₁ y PB₂, Khanuja *et al.*, 1999 (M) Marcador de masa Mass Ruler.

La mayor contaminación con ARN (mancha en la parte inferior del carril) se pudo observar en la electroforesis de las muestras de ADN extraídas con el protocolo 6, Araya *et al.*, 2005 (fig. 4 y 5).

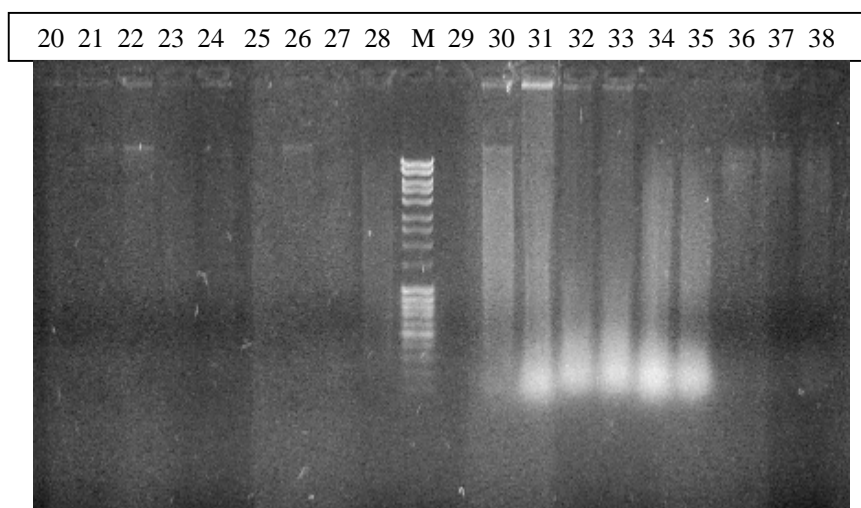


Figura 4. Muestras de ADN en gel de agarosa al 1% (20-24) CVR₁, CVR₂, CVR₃, PBR₁ y PBR₂, Khanuja *et al.*, 1999 (25-29) PB, BH, BP, EA y CV, Khanuja *et al.*, 1999 (30 y 31) CV y PB, Promega, 2005 (32-35) PB, PB₂, CV, CV₂, Araya *et al.*, 2005 (36-38) PB, BH y BP, Promega, 2005 (M) Marcador de masa Mass Ruler.

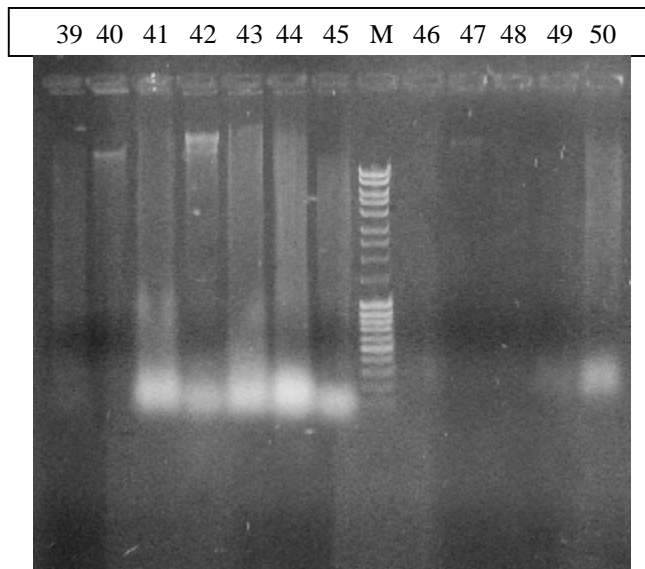


Figura 5. Muestras de ADN en gel de agarosa al 1% (39 y 40) EA e IV, Promega, 2005 (41-45) PB, BH, BP, EA e IV, Araya *et al.*, 2005 (46-50) PB, BH, BP, EA e IV, Khanuja *et al.*, 1999 (M) Marcador de masa Mass Ruler.

Los mejores resultados en la electroforesis se presentaron en las muestras de ADN obtenidas con las modificaciones al protocolo 5 que utiliza el kit de extracción Wizard® de Promega, 2005 (fig. 6 y 7).

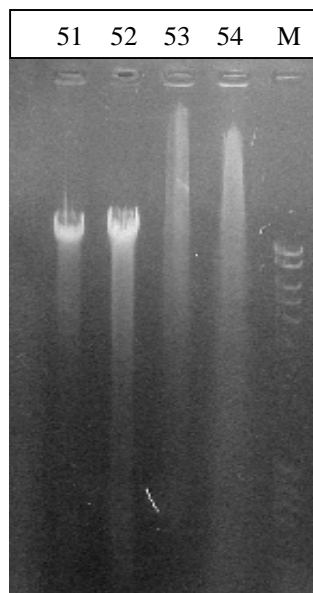


Figura 6. Muestras de ADN extraídas con el kit Wizard® (51) *U. tomentosa*, 40 mg de tejido (52) *U. tomentosa*, 100 mg (53) BH, 40 mg (54) BH, 100 mg (M) Marcador de masa Mass Ruler, en gel de agarosa al 1%

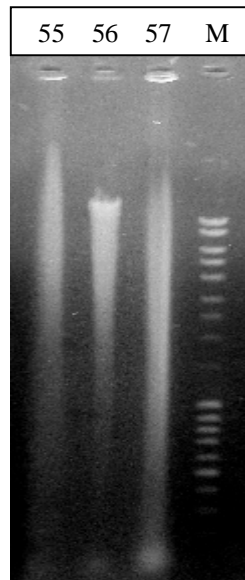


Figura 7. Muestras de ADN extraídas con el kit Wizard® (55) PB_{NL} (nitrógeno líquido) (56) CV (57) PB_{CR} (cristales de vidrio) (M) Marcador de masa Mass Ruler, en gel de agarosa al 1%

Evaluación de las extracciones mediante espectrofotometría

Los protocolos de Aras *et al.*, 2003 (2), Araya *et al.*, 2005 (6) y el de Promega, 2005 (5) presentaron la mayor cantidad de ADN según los datos obtenidos mediante espectrofotometría, y las menores cantidades de ADN se obtuvieron con el protocolo de Khanuja *et al.*, 1999 (4).

Además predominaron los valores menores a 1.8 en la relación para determinar la calidad del ADN y en general, los valores más cercanos a 1.8 se obtuvieron con las muestras de ADN extraídas con el protocolo 5 que utiliza el kit Wizard® de Promega.

En el cuadro 9 se muestran los resultados del análisis por espectrofotometría, la absorbancia a 260 nm, la absorbancia a 280 nm, la relación de estas mediciones que determina la calidad y la concentración en µg/mL.

Cuadro 9. Absorbancia a 260 nm y 280 nm, calidad y concentración de las muestras de ADN de las diferentes extracciones.

Extracción	Muestra	N ^o	A 260 nm.	A 280 nm.	A 260/A 280	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1. Drábková <i>et al.</i> , 2002	PB	1	0,005	0,003	1,67	50
	TV	2	0,010	0,002	5	100
2. Aras <i>et al.</i> , 2003	PB	3	0,156	0,135	1,16	1560
	CV	4	0,170	0,117	1,45	1700
3. Aras <i>et al.</i> , 2003	PB ₁	5	0,351	0,315	1,11	3510
	PB ₂	6	1,315	1,218	1,08	13150
	CV ₁	7	0,052	0,022	2,36	520
	CV ₂	8	0,072	0,049	1,47	720
4. Madriz, 2005	PB ₁	9	0,078	0,057	1,37	780
	PB ₂	10	0,029	0,013	2,23	290
	CV ₁	11	0,010	0,004	2,5	100
	CV ₂	12	0,009	0,004	2,25	90
5. Khanuja <i>et al.</i> , 1999	PB	13	0,011	0,004	2,75	110
	CV	14	0,016	0,009	1,78	160
6. Khanuja <i>et al.</i> , 1999	CV ₁	15	0,014	0,010	1,4	140
	CV ₂	16	0,016	0,011	1,45	160
	CV ₃	17	0,012	0,008	1,5	120
	PB ₁	18	0,024	0,013	1,85	240
	PB ₂	19	0,014	0,008	1,75	140
	CVR ₁	20	0,007	0,003	2,33	70
	CVR ₂	21	0,009	0,005	1,8	90
	CVR ₃	22	0,014	0,009	1,56	140
PBR ₁	23	0,023	0,013	1,77	230	
PBR ₂	24	0,008	0,005	1,6	80	

7. Khanuja <i>et al.</i> , 1999	PB	25	0,005	0,002	2,5	50
	BH	26	0,004	0,002	2	40
	BP	27	0,004	0,002	2	40
	EA	28	0,014	0,007	2	140
	CV	29	0,013	0,008	1,63	130
8. Promega, 2005	CV	30	0,022	0,011	2	220
	PB	31	0,100	0,075	1,33	1000
9. Araya <i>et al.</i> , 2005	PB	32	0,027	0,018	1,5	270
	PB ₂	33	0,025	0,014	1,79	250
	CV	34	0,025	0,015	1,67	250
	CV ₂	35	0,011	0,013	0,85	110
10. Promega, 2005	PB	36	0,009	0,007	1,29	90
	BH	37	0,012	0,007	1,71	120
	BP	38	0,017	0,013	1,31	170
	EA	39	0,015	0,010	1,5	150
	IV	40	0,013	0,010	1,3	130
11. Araya <i>et al.</i> , 2005	PB	41	0,065	0,033	1,97	650
	BH	42	0,123	0,105	1,17	1230
	BP	43	0,039	0,023	1,70	390
	EA	44	0,086	0,076	1,13	860
	IV	45	0,038	0,023	1,65	380
12. Khanuja <i>et al.</i> , 1999	PB	46	0,004	0,007	0,57	40
	BH	47	0,005	0,011	0,45	50
	BP	48	0,007	0,012	0,58	70
	EA	49	0,015	0,018	0,83	150
	IV	50	0,020	0,012	1,67	200
13. Promega, 2005	Unc.40	51	0,135	0,096	1,41	1350

	Unc. 100	52	0,168	0,110	1,53	1680
	BH 40	53	0,109	0,073	1,49	1090
	BH 100	54	0,160	0,110	1,45	1600
	PB _{NL}	55	0,087	0,062	1,40	870
14. Promega, 2005	CV	56	0,070	0,043	1,63	700
	PB _{CR}	57	0,135	0,106	1,27	1350

En el cuadro 10 se comparan las concentraciones de ADN obtenidas con el marcador de masa y espectrofotometría, de las muestras que presentaron bandas definidas o mayor evidencia de ADN. Se presentaron concentraciones mayores según los datos obtenidos mediante espectrofotometría; la mayor cantidad de estas muestras son provenientes de material fresco, además el protocolo de extracción 5 que utiliza el kit Wizard® generó la mayor parte de estas muestras seleccionadas y las mayores cantidades de ADN según el marcador de masa.

Cuadro 10. Comparación de las concentraciones de ADN obtenidas con el marcador de masa y espectrofotometría.

Protocolo	Muestra	N ⁰	Espectrofotometría (ng/μL)	Marcador de masa (ng/μL)
Madriz, 2005	CV ₁	11	100	1,5
	CV ₂	12	90	1,5
Khanuja <i>et al.</i> , 1999	CV	14	160	1,5
	CV ₁	15	140	1,5
	CV ₂	16	160	1,5
	CV ₃	17	120	1,5
	CVR ₂	21	90	0,8
	CVR ₃	22	140	1,5
	BH	26	40	0,8
Promega, 2005	CV	30	220	2,0
	IV	40	130	3,0
Araya <i>et al.</i> , 2005	BH	42	1230	5,0
Khanuja <i>et al.</i> , 1999	BH	47	50	0,8
	Unc. 40	51	1350	> 5,0
	Unc. 100	52	1680	> 5,0
	BH 40	53	1090	> 5,0
	BH 100	54	1600	> 5,0
Promega, 2005	PB _{NL}	55	870	> 5,0
	CV	56	700	> 5,0
	PB _{CR}	57	1350	> 5,0

Evaluación de las extracciones mediante la amplificación de ADN

En el análisis RAPD se obtuvieron amplificaciones con los *primers* OPA01 y OPA02 (procedimiento modificado) de muestras de ADN de PB (material seco) y CV (material fresco) extraídas con el protocolo que utiliza el kit Wizard® (fig. 8), el protocolo 1 de Drábková *et al.*, 2002 y el protocolo 6 de Araya *et al.*, 2005; pero no hubo amplificación de las muestras de ADN de los protocolos 3 y 4 y con los iniciadores OPA13, OPC02, OPE01, OPE03 (cuadro 11).

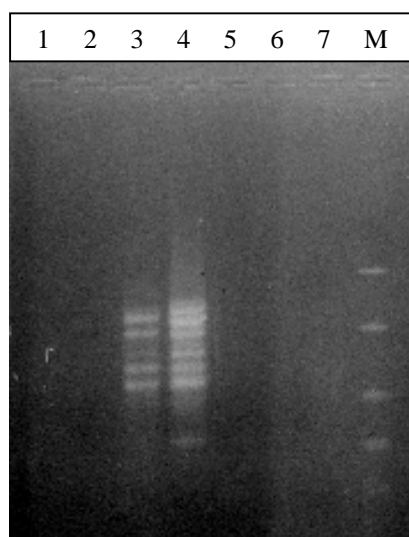


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 80 voltios por 1 hora y 30 minutos de los productos de la RAPD-PCR con el OPA02 de muestras de ADN extraídas con el kit Wizard® (1y 2) 1/10, 1/50 PB_{NL} (3 y 4) 1/10, 1/50 CV (5 y 6) 1/10, 1/50 BH 100 (7) Control negativo (M) Marcador de peso molecular Fast Ruler.

Cuadro 11. Resultados del análisis RAPD de los protocolos

Protocolo	Amplificación	Calidad
1. Drábková <i>et al.</i> , 2002	Sí	Muy poco evidente
3. Madriz, 2005	No	-
4. Khanuja <i>et al.</i> , 1999	No	-
5. Promega, 2005	Sí	Bandas definidas y evidentes
6. Araya <i>et al.</i> , 2005	Sí	Poco evidente

En las PCRs con *primers* para microsatélites específicos no hubo amplificación de las muestras de ADN. Se obtuvo formación de dímeros (los iniciadores se unen entre sí) con el procedimiento de Squirrell y Wolff (2001). Además no hubo amplificación ni presencia de dímeros con el procedimiento modificado.

DISCUSIÓN

El propósito de valorar las muestras de ADN extraídas mediante electroforesis en geles de agarosa, espectrofotometría y amplificación por PCR, es determinar el mejor protocolo para la extracción de ADN de *P. major*.

Generalmente los botones de ADN tienen una coloración blancuzca, sin embargo los botones de ADN obtenidos con la mayoría de los protocolos evaluados, presentaron una coloración café como resultado de la presencia de sustancias viscosas y la oxidación de los polifenoles, lo cual daña el ADN. Además, el alto contenido de polisacáridos y metabolitos secundarios que posee esta especie, pudo ocasionar que la producción y pureza del ADN extraído en general, fueran bajas (Weising y Kahl, 1998; Samuelsen, 2000).

La presencia de estos metabolitos dificultan los procedimientos para la extracción del ADN e interfieren en reacciones como la clonación, amplificación y restricción del ADN, ya que inhiben las enzimas de restricción y las ADN polimerasas (Weising y Kahl, 1998; Khanuja *et al.*, 1999).

Los protocolos 4 y 6 de Khanuja *et al.*, 1999 y Araya *et al.*, 2005 respectivamente, generaron botones de ácidos nucleicos más limpios, ya que utilizan polivinilpirrolidona (PVP) y *b*-mercaptoetanol en el buffer de extracción para reducir los polifenoles y además remueven los polisacáridos con NaCl 5 M. Sin embargo en la electroforesis, las muestras de ADN aisladas con el protocolo de Araya *et al.*, 2005 presentaron gran contaminación con ARN, ya que este protocolo no hace uso de ribonucleasa para degradarlo (Weising y Kahl, 1998; Khanuja *et al.*, 1999).

De acuerdo a las electroforesis en gel de agarosa frecuentemente se obtuvieron pobres y escasas bandas de ADN de alto peso molecular, sin embargo se consiguieron concentraciones altas según la determinación por espectrofotometría, especialmente en las muestras de los protocolos 2, 6 y 5 de Araya *et al.*, 2003, Araya *et al.*, 2005 y Promega, 2005 respectivamente, con una diferencia entre ambas cuantificaciones de más de 300 veces.

El CTAB residual y la contaminación del ADN con otras sustancias que también absorben la radiación UV como el ARN y los metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos y polisacáridos, pueden generar una sobreestimación de la cantidad de ADN determinada por espectrofotometría; además este método no es útil para pequeñas cantidades de ADN ($<1\mu\text{g/mL}$); razón por la cual las muestras extraídas con el protocolo 2 de Aras *et al.*, 2003 presentaron barridos extraños verde-azules y no ADN evidente en la electroforesis, pero tuvieron las mayores concentraciones de ADN según el análisis espectrofotométrico (Valadez y Kahl, 2000; Drábková *et al.*, 2002).

Además en la relación para determinar la calidad del ADN en general se presentaron valores inferiores a 1.8, lo cual indica contaminación con proteínas, aunque la visualización de los geles de agarosa mostró una gran contaminación con ARN (Valadez y Kahl, 2000; Drábková *et al.*, 2002).

Debido a que las mediciones densitométricas no son útiles para la detección de pequeñas cantidades de ADN, la información fluorométrica fue usada para una comparación de la cantidad de ADN de los diferentes protocolos.

Los resultados que se muestran en el cuadro 10 indican que las mejores muestras de ADN se obtuvieron de material fresco. En principio es mejor utilizar material fresco, ya que el aislamiento de ADN íntegro de tejidos secos de plantas es más difícil; pero algunas veces las muestras provienen de lugares remotos y consisten de partes de planta secas o parcialmente secas, como el caso de las muestras provenientes de Peñas Blancas y las de Europa, por lo que los barridos de ADN degradado son usualmente visualizados en los geles (Khanuja *et al.*, 1999; Aras *et al.*, 2003).

La diferencia en el nivel de degradación entre muestras extraídas con nitrógeno líquido y muestras maceradas con cristales de vidrio fue evidente. El nitrógeno líquido facilita la extracción del ADN porque ayuda a romper los tejidos, además ayuda a evitar la degradación por el factor de temperatura e inhibe la acción de enzimas degradadoras como las nucleasas. Es importante mencionar que los haces vasculares de las hojas de *Plantago major* son difíciles de macerar, aún con nitrógeno líquido, lo que puede interferir en el proceso de extracción, como ocurre en especies de *Juncus* (Drábková *et al.*, 2002).

Las muestras aisladas con el kit de extracción Wizard® tuvieron las mayores concentraciones de ADN en relación al marcador de masa en los geles de agarosa, además la calidad del ADN extraído fue mejor en comparación a las muestras obtenidas con el resto de protocolos, aunque las muestras provenientes de material seco también presentaron barridos de ADN. La utilización del kit permitió alcanzar satisfactorios resultados para la mayoría de las muestras con exitosa purificación y bajas cantidades de potenciales contaminantes comparado a otras técnicas. Además es de fácil uso y requiere menos manipulación y menos equipo (Drábková *et al.*, 2002).

Los iniciadores utilizados para microsatélites son específicos, sin embargo posiblemente presentan alguna anomalía en el diseño y la fabricación o en la especificidad con las muestras de Costa Rica ya que no amplificaron. Por otro lado los *primers* para RAPDs al ser cortos y evaluar el ADN total al azar, presentaron una mayor posibilidad de amplificación. Las amplificaciones alcanzadas con la técnica de RAPD-PCR demostraron que con el kit Wizard® y algunas modificaciones al protocolo Promega, 2005 se obtienen muestras de ADN amplificable.

CONCLUSIONES

- El protocolo que utiliza el kit de extracción Wizard® de Promega genera mayor cantidad y calidad en el ADN extraído de muestras de material seco y de material fresco.
- La determinación espectrofotométrica no es útil para cuantificar pequeñas cantidades de ADN. El análisis electroforético en geles de agarosa con marcador de masa es más confiable para valorar los protocolos de extracción de ADN.
- El material fresco produce muestras de ADN de mejor calidad que el material seco.
- Las muestras de ADN provenientes de material seco generan barridos en la electroforesis, pero amplifican iniciadores como el OPA01 y OPA02.
- La utilización de nitrógeno líquido disminuye el nivel de degradación en el ADN obtenido, especialmente en las muestras de material seco.
- El protocolo 5 que utiliza el kit Wizard® permite obtener ADN amplificable.

RECOMENDACIONES

- Utilizar las partes de las hojas con menos haces vasculares y no incluir el pecíolo, para facilitar la maceración.
- Adicionar NaCl 5M antes de precipitar el ADN con el isopropanol, para obtener botones más limpios.
- Utilizar el kit Wizard®, nitrógeno líquido y las modificaciones al protocolo Promega, 2005 para posteriores extracciones.
- Algunas ocasiones, solicitar a proveedores de las muestras de *P. major* material fresco.
- Debido a que es más recomendable el uso de microsátélites, hacer una revisión de los iniciadores para las muestras de Costa Rica.
- Probar la utilización de otras técnicas como AFLPs para la tipificación.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAS, S.; DURAN, A.; YEILMEZ, G. 2003. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. specimens. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 461a - 461f.
- ARAYA, E.; MURILLO, O.; AGUILAR, G.; ROCHA, O. 2005. A DNA extraction protocol and initial primers screening in *Hyeronima alchorneoides* Fr. All. for AFLP applications. *Foresta Veracruzana* 7(1):1-4.
- ARREDONDO, M. 2002. Llantén mayor o común. Disponible en: http://www.herbogeminis.com/llanten_mayor.html (20-08-2005).
- BECERRA, V.; PAREDES, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica* 60 (3).
- CREGAN, P.; QUIGLEY, C. 1998. Simple sequence repeat DNA marker analysis. EN: DNA MARKERS; protocols, applications, and overviews. Editado por Caetano, G. y Gresshoff, P. Editorial John Wiley & Sons, Inc. E.E.U.U. p. 133
- DRÁBKOVÁ, L.; KIRSCHNER, J.; VLCEK, C. 2002. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 161- 175.
- EPPENDORF NORTH AMERICA. 2005. Quantification made easy. Disponible en: http://www.eppendorfna.com/applications/quant_easy.asp (15-12-2005).
- HALE, M.; WOLFF, K. 2003. Polymorphic microsatellite loci in *Plantago lanceolata*. *Molecular Ecology Notes* 3:134-135.
- KHANUJA, S.; SHASANY, A.; DAROKAR, M.; KUMAR, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-7.

- LARA, A.; VALVERDE, R.; ROCHA, O.; GÓMEZ, L. 2003. Variabilidad y diferenciación genética en cuatro poblaciones de la planta medicinal *Psychotria acuminata* en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 27 (2): 29-42.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3 (1): 175-182.
- OPERON. 2001. DNA Research Catalog 2001-2002.
- PROMEGA. 2005. Technical Manual Wizard Genomic DNA Purification Kit. p.13-14
- SAMUELSEN, A.; PAULSEN, B.; WOLD, J.; OTSUKA, H.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; KNUTSEN, S. 1996. Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers* 30: 37-44.
- SAMUELSEN, A.; LUND, I.; DJAHROMI, J.; PAULSEN, B.; WOLD, J.; KNUTSEN, S. 1999. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers* 38: 133-143.
- SAMUELSEN, A. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 1-21.
- SQUIRRELL, J.; WOLFF, K. 2001. Isolation of polymorphic microsatellite loci in *Plantago major* and *P. intermedia*. *Molecular Ecology Notes* 1: 179-181.
- VALADEZ, E.; KAHL, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa México S.A de C.V. 147 p.
- VOGEL, J.; SCOLNIK, P. 1998. Direct amplification from microsatellites: detection of simple sequence repeat-based polymorphisms without cloning. EN: DNA

MARKERS; protocols, applications, and overviews. Editado por Caetano, G. y Gresshoff, P. Editorial John Wiley & Sons, Inc. E.E.U.U. p.173

WEISING, K.; KAHL, G. 1998. Hybridization-based microsatellite fingerprinting of plants and fungi. EN: DNA MARKERS; protocols, applications, and overviews. Editado por Caetano, G. y Gresshoff, P. Editorial John Wiley & Sons, Inc. E.E.U.U. p. 30-32

WOLF, K.; MORGAN-RICHARDS, M. 1998. PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 282-286

ANEXO 1

Procedimientos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Procedimiento para el análisis RAPD-PCR

Nota: Mantenga todos los reactivos y los tubos de PCR en hielo.

1. Preparación de la Master Mix

a) Descongelar las soluciones y centrifugarlas.

b) Adicionar las diversas soluciones según el orden del cuadro siguiente:

Reactivo	1 reacción	Concentración final
Agua PCR	12,95 μ L	
Buffer PCR10 X	2,5 μ L	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L	2 mM
dNTP's (10 mM)	0,25 μ L	0,1 mM
Imprimador (10 μ M)	2 μ L	0,8 μ M
Taq pol. (5 U/ μ L)	0,3 μ L	1,5 U
	20 μL	

La *Taq* polimerasa se debe mantener en el congelador hasta el momento de uso.

2. Se adicionan 20 μ L de la master mix a cada tubo de PCR.

3. Se adicionan 5 μ L de las muestras de ADN en cada tubo.

4. Se adicionan 2 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación

5. Se colocan los tubos de reacción en el termociclador y se corre la reacción de PCR de acuerdo al siguiente perfil térmico:

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
16	Desnaturalización inicial	94 °C	1 min 30 seg	1
17 (1)	Desnaturalización	94°C	30 seg	
17 (2)	Apareamiento	35°C	30 seg	40
17 (3)	Extensión	72°C	1 minuto	
18	Extensión final	72°C	3 minutos	1
19	Almacenamiento	4°C	Lo necesario	1

6. Mientras se lleva a cabo la reacción de PCR, preparar un gel de agarosa al 1,5%.

7. Se pone a correr los productos de las amplificaciones en una electroforesis a 100 voltios por 1 hora 30 minutos.

Procedimiento para el análisis RAPD-PCR modificado

Nota: Mantenga todos los reactivos y los tubos de PCR en hielo.

1. Preparación de la Master Mix

- a) Descongelar las soluciones y centrifugarlas.
- b) Adicionar las diversas soluciones según el orden del cuadro siguiente:

Reactivo	1 reacción	Concentración final
Agua PCR	8,6 μ L	
Buffer PCR10 X	3 μ L	1,2 X
MgCl ₂ (25 mM)	4,2 μ L	4,2 mM
dNTP's (10 mM)	1,2 μ L	0,48 mM
Imprimador (10 μ M)	5 μ L	2 μ M
Taq pol. (5 U/ μ L)	1 μ L	5 U
	23 μL	

La *Taq polimerasa* se debe mantener en el congelador hasta el momento de uso.

2. Se adicionan 23 μ L de la master mix a cada tubo de PCR.
3. Se adicionan 2 μ L de las muestras de ADN en cada tubo.
4. Se colocan los tubos de reacción en el termociclador y se corre la reacción de PCR de acuerdo al siguiente perfil térmico:

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
16	Desnaturalización inicial	94 °C	1 min 30 seg	1
17 (1)	Desnaturalización	94°C	30 seg	40
17 (2)	Apareamiento	35°C	30 seg	
17 (3)	Extensión	72°C	1 minuto	
18	Extensión final	72°C	3 minutos	1
19	Almacenamiento	4°C	Lo necesario	1

5. Mientras se lleva a cabo la reacción de PCR, preparar un gel de agarosa al 1,5%.
6. Se pone a correr los productos de las amplificaciones en una electroforesis a 80 voltios por 1 hora 30 minutos.

Procedimiento para la MP-PCR (Squirrell y Wolff, 2001).

Nota: Mantener todos los reactivos y los tubos de PCR en hielo.

1. Preparación de la Master Mix

a) Descongelar las soluciones y centrifugarlas.

b) Adicionar las diversas soluciones según el orden del cuadro siguiente:

Reactivo	1 reacción	Concentración final
Agua PCR	6,94 μ L	
Buffer PCR 10X	1 μ L	1X
MgCl ₂ (25 mM)	0,6 μ L	1,5 mM
dNTP's (10 mM)	0,2 μ L	200 μ M
Imprimador 1(10 μ M)	0,33 μ L	0,33 μ M
Imprimador 2(10 μ M)	0,33 μ L	0,33 μ M
Taq pol.(5 U/ μ L)	0,1 μ L	0,5 U
Total	9,5 μL	

La *Taq* polimerasa se debe mantener en el congelador hasta el momento de uso.

2. Adicionar 9,5 μ L de la master mix a cada tubo de PCR.

3. Adicionar 0,5 μ L de las muestras (ADN) a cada tubo.

4. Colocar los tubos de reacción en el termociclador y correr la reacción de PCR de acuerdo al siguiente perfil térmico:

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95 ^o C	12 minutos	1
2 (1)	Desnaturalización	95 ^o C	15 segundos	20
2 (2)	Apareamiento	57 ^o C	15 segundos	
2 (3)	Extensión	72 ^o C	15 segundos	
3 (1)	Desnaturalización	89 ^o C	15 segundos	10
3 (2)	Apareamiento	53 ^o C	15 segundos	
3 (3)	Extensión	72 ^o C	15 segundos	
4	Extensión final	72 ^o C	30 minutos	1

5. Preparar un gel de agarosa al 1,5%.

6. Correr los productos de las amplificaciones en una electroforesis a 100 voltios por 1 hora.

Procedimiento para la MP-PCR modificado

Nota: Mantener todos los reactivos y los tubos de PCR en hielo.

1. Preparación de la Master Mix

a) Descongelar las soluciones y centrifugarlas.

b) Adicionar las diversas soluciones según el orden del cuadro siguiente:

Reactivo	1 reacción	Concentración final
Agua PCR	12,26 μ L	
Buffer PCR 10X	2 μ L	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L	2,5 mM
dNTP's (10 mM)	0,6 μ L	300 μ M
Imprimador 1(10 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
Imprimador 2(10 μ M)	1 μ L	0,5 μ M
Taq pol.(5 U/ μ L)	0,14 μ L	0,7 U
Total	19 μL	

La *Taq* polimerasa se debe mantener en el congelador hasta el momento de uso.

2. Adicionar 19 μ L de la master mix a cada tubo de PCR.

3. Adicionar 1 μ L de las muestras (ADN) a cada tubo.

4. Colocar los tubos de reacción en el termociclador y correr la reacción de PCR de acuerdo al siguiente perfil térmico:

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95 ^o C	12 minutos	1
2 (1)	Desnaturalización	95 ^o C	15 segundos	10
2 (2)	Apareamiento	47 ^o C	15 segundos	
2 (3)	Extensión	72 ^o C	15 segundos	
3 (1)	Desnaturalización	89 ^o C	15 segundos	30
3 (2)	Apareamiento	47 ^o C	15 segundos	
3 (3)	Extensión	72 ^o C	15 segundos	
4	Extensión final	72 ^o C	10 minutos	1

5. Preparar un gel de agarosa al 2%.

6. Correr los productos de las amplificaciones en una electroforesis a 80 voltios por 1 hora y 30 minutos.

ANEXO 2

Marcadores de masa y peso molecular utilizados

Marcador de masa Mass Ruler (Fermentas)

El marcador de masa indica la cantidad de nanogramos y el tamaño molecular, en pares de bases, del fragmento presente en cada banda de ADN de las muestras, al compararlas con la intensidad de fluorescencia de las bandas del marcador. En los geles de agarosa para visualizar ADN genómico se cargó 5µL de este marcador. La quinta columna corresponde a los nanogramos de ADN presente en el volumen cargado de muestra cuando se aplica 5µL del marcador.

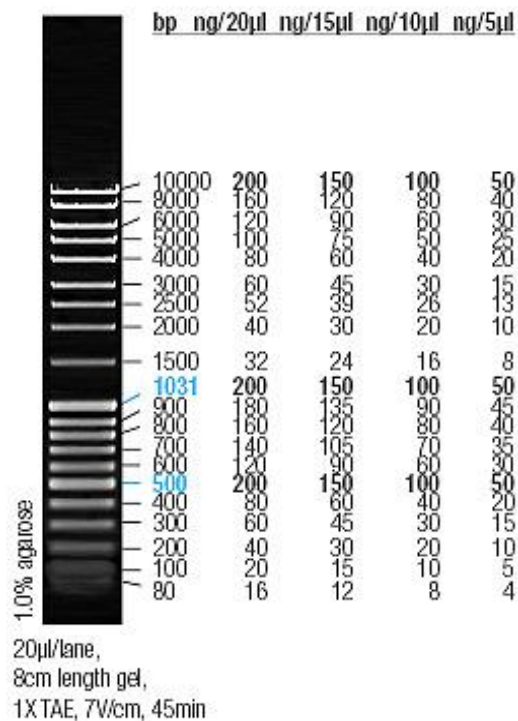


Figura 9. Marcador de masa Mass Ruler

Marcador de peso molecular Fast Ruler (Fermentas)

El marcador de peso molecular Fast Ruler señala el tamaño molecular en pares de bases y la masa (en nanogramos) de los fragmentos de ADN, específicamente productos de PCR, ya que posee fragmentos de bajo peso molecular. En los gels de agarosa para visualizar los productos de las PCR se cargó 3 μ L de este marcador.

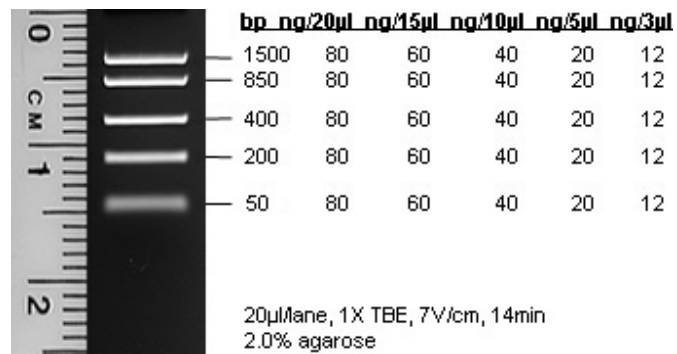


Figura 10. Marcador de peso molecular Fast Ruler