

MÉTODO RÁPIDO Y ECONÓMICO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO EN LA BROCA DEL CAFÉ Y SU USO EN PCR

Flor E. Acevedo-Bedoya*; Lucio Navarro-Escalante*; Luis M. Constantino-Chuaire**;
Zulma N. Gil-Palacio**; Pablo Benavides-Machado***

RESUMEN

ACEVEDO B. F.E.; NAVARRO E., L.; CONSTANTINO C., L.M.; GIL P., Z.; BENAVIDES M., P. Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. Cenicafé 58(2): 134-141. 2007.

Se evaluaron seis métodos de extracción cruda de ADN con el objetivo de seleccionar un método rápido y económico para amplificar fragmentos de ADN genómico en la broca del café, mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. Estos métodos fueron comparados con dos técnicas de extracción con purificación de ácidos nucleicos: *Dneasy Tissue Kit* (Qiagen Inc. Valencia, CA) y fenol cloroformo. Los tratamientos que incluyeron purificación de ácidos nucleicos y el ADN crudo extraído con los *buffers* TE y STE permitieron la amplificación de un fragmento de 208pb en la totalidad de las muestras mediante PCR; con este último además, se logró amplificar una región del gen receptor GABA_A mediante PCR en tiempo real, después de precipitar las muestras con etanol. Estos métodos de extracción cruda fueron 54 veces más económicos que el *kit* de Qiagen. Se concluye que el método de extracción de ADN con el *buffer* STE permitió la extracción de ADN de calidad para PCR a partir de un solo individuo, el cual fue diez veces más rápido que los métodos convencionales y más económico que la técnica de Qiagen, por lo cual resulta especialmente útil en estudios de genética de poblaciones que involucran el uso de marcadores moleculares y el análisis de un alto número de muestras.

Palabras clave: *Hypothenemus hampei*, *buffer* STE, PCR en tiempo real, ácidos nucleicos.

ABSTRACT

Six different methods for the isolation of DNA from *H. hampei* were tested in order to find a quick and inexpensive strategy to obtain DNA for its amplification through conventional PCR and real time PCR. These methods were compared against two isolation techniques that involve purification of nucleic acids: *Dneasy Tissue Kit*, (Qiagen Inc. Valencia CA) and phenol-chloroform. The DNA obtained with methods involving purification of nucleic acids and non purified DNA isolated with buffers TE and STE, amplified a sequence of 208bp in all samples tested by PCR. STE DNA extraction allowed amplification of region at the GABA_A receptor gene by real time PCR. These non-purified techniques were 54 times less expensive than the commercial kit Qiagen. We selected the extraction method of DNA using the buffer STE for allowing extraction of high quality DNA for PCR from single individuals, being 10 times faster than conventional methods, and less expensive than Qiagen kit. This result will be useful in population genetics studies with molecular markers that involve high numbers of samples.

Keywords: *Hypothenemus hampei*, STE buffer, Real Time PCR, nucleic acids.

* Ingeniero Agrónomo y Biólogo, respectivamente. Investigadores Asociados. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

** Asistente de Investigación. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé.

*** Investigador Científico II. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La broca del café, *Hypothenemus hampei*, es la plaga de mayor importancia para este cultivo en Colombia; desde su llegada al país en 1988, se han adoptado medidas para realizar un manejo integrado del insecto (3, 4). Estudios recientes involucran el uso de herramientas moleculares para llegar a conocer aspectos básicos de la heredabilidad de los caracteres genéticos en este insecto; no obstante, la extracción de ADN para estos estudios resulta costosa, cuando se emplean *kits* comerciales, y dispendiosa cuando se utiliza fenol-cloroformo, dada la gran cantidad de muestras que se requieren analizar.

Aunque la mayoría de los protocolos incluyen la purificación orgánica del ADN para utilizarlo en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se han reportado métodos de extracción cruda que permiten la amplificación de fragmentos y pueden usarse en la detección de marcadores de ADN nuclear y mitocondrial (8). Black *et al.* (2), al extraer ADN con un *buffer* de lisis compuesto por TE y proteinasa K, detectaron polimorfismos en ácidos. Ffrench-Constant *et al.* (5), al extraer ADN con el *buffer* STE, amplificaron secuencias del gen de la subunidad A del receptor GABA en *Hypothenemus hampei*. Rose *et al.* (8), extrajeron ADN para PCR por homogeneización de las muestras con el *buffer* Tris EDTA (TE); y Grevelding *et al.* (6) amplificaron secuencias de ADN mediante repetidas desnaturalizaciones de larvas y adultos enteros de *Drosophila melanogaster* y de *Schistosoma mansoni*. Estos estudios demuestran que no es un requisito esencial la purificación previa de los ácidos nucleicos para obtener copias de fragmentos de ADN.

El presente estudio se realizó con el objetivo de seleccionar una técnica de extracción de ADN rápida y económica para amplificar fragmentos de ADN genómico en la broca del café, mediante PCR y PCR en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, entre mayo del 2005 y mayo del 2007.

Material biológico. Se utilizaron adultos de broca suministrados por la unidad de cría “Biocafé”, a partir de poblaciones de broca provenientes de cafetales localizados en Chinchiná (Caldas).

Tratamientos. Se evaluaron ocho métodos de extracción de ADN de adultos de broca, de éstos dos se usan convencionalmente (T1 y T8) y los otros seis corresponden a métodos de extracción cruda. Cada tratamiento (T) se evaluó con 15 unidades de muestreo, donde cada unidad estuvo compuesta por diez adultos de broca. Los adultos se maceraron en tubos de 1,5mL, con pistilos de polipropileno (Sigma), esterilizados en autoclave. Los tratamientos fueron los siguientes:

T1. Kit comercial. Se utilizó el *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen INc. Valencia CA), y se siguió el protocolo para la extracción de ADN de tejidos animales.

T2. Agua destilada. Cada unidad de muestreo se depositó en tubos de 1,5mL y se maceró en 100µL de agua destilada, desionizada y filtrada; luego, se centrifugó a 12.000rpm por 3min, y se utilizaron 2µL de ADN como plantilla para la reacción de PCR.

T3. Buffer TE (8). Las muestras se maceraron en 100µL del *buffer* TE (10mM de tris-HCl y 1mM de EDTA, pH 8,0). En este *buffer* se almacenaron las muestras a 4°C durante 8 horas, y luego se centrifugaron a 12.000rpm por 3min. El sobrenadante se usó para la reacción de PCR.

T4. Buffer TE más proteinasa K (2). Las muestras se maceraron en 100µL del *buffer*

de lisis (10mM de tris-HCl, pH 8,0, 1mM de EDTA, 100µg.mL⁻¹ de proteinasa K) y se desnaturalizaron a 95°C por 5min.

T5. Buffer de PCR más proteinasa K. Las muestras se maceraron en 100µL del buffer 10X PCR (100mM tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl y 1% de tritón X-100) más 20µL de proteinasa K (100µg.mL⁻¹), y se desnaturalizaron a 95°C por 5min.

T6. Buffer STE (5). Las muestras se maceraron en 100µL del buffer STE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0; 0,1M NaCl), se desnaturalizaron a 95°C por 5min., y luego, se colocaron en hielo para usarlas posteriormente en reacciones de PCR.

T7. Desnaturalización de brocas completas (6). Las muestras se colocaron en tubos de 1,5mL con 100µL de agua destilada y se sometieron a ebullición en un baño de agua por 30min.

T8. Fenol cloroformo (9). Las muestras se maceraron en 500µL de buffer de extracción (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, Sucrosa 0,2M, EDTA 0,05M, SDS 0,5%), se adicionaron 25µL de RNase A (1mg.mL⁻¹) mezclándolos mediante vortex y se incubaron en un baño de agua a 65°C por 30min. Posteriormente, se adicionaron 120µL de KOAc (5M), se centrifugó la muestra por 5min. a 13.000rpm y se recuperó el sobrenadante. El ADN se purificó dos veces, con la adición de un volumen de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (24:24:1 pH 8,0) y la solución se centrifugó a 13.000rpm por 5min. Se tomó el sobrenadante, y se precipitó el ADN en un tubo nuevo con la adición de un volumen de etanol frío al 95%, y una décima de volumen de acetato de amonio, durante 12 horas a 4°C. Luego, se centrifugó a 14.000rpm por 10min., se descartó el sobrenadante, se secó el pellet en una cámara de vacío por

45min., y finalmente, se suspendió en 50µL del buffer TE.

Técnicas empleadas

Técnica de PCR. Para evaluar la calidad del ADN de las muestras aisladas mediante los métodos anteriores, se amplificó el marcador monomórfico STS P8 (208pb) de *H. hampei*, utilizando los primers P8F (5'GAATTCATATTCAATGCGTGGC3') y P8R (TGGATTTCGCTTGTCTTCTCAGTTAA3'), diseñado previamente por Benavides *et al.* (1). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25µL, que contenía ~ 40ng de ADN plantilla, 0,5µM de cada *primer*, 0,2mM de dNTPs, 1X de PCR *buffer*, 1,5mM de MgCl₂, y 0,125U de *Taq* polimerasa. La amplificación consistió de un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 3min., seguida de 30 ciclos de denaturación por 30s a 94°C, alineamiento por 60s a 50°C y extensión por 90s a 72°C.

PCR en tiempo real. Se empleó el *kit DyNAmo HS SYBR Green qPCR* (Finnzymes Oy, Finlandia) para amplificar secuencias del gen de la subunidad A del receptor GABA, reportado en *Hypothenemus hampei* (5). Las reacciones de PCR contenían ~40ng de ADN plantilla, 0,3µM de cada *primer* y 1X del *kit DyNAmo*, en un volumen final de 10µL. La amplificación consistió de un ciclo inicial de 95°C por 11min., seguida por 35 ciclos de 96°C por 10s, 50°C por 15s y 72°C por 20s. Adicionalmente, se realizó una extensión a 72°C por 10min. y una curva de denaturación entre 75 y 85°C.

Parámetros evaluados. Los parámetros de interés fueron: a). El porcentaje de muestras por tratamiento que amplificaron el fragmento P8 en reacciones de PCR, evaluado mediante la observación del amplificado por coloración con bromuro de etidio, en geles de agarosa al

1%; b). El costo y el tiempo requerido en la extracción con cada uno de los tratamientos; c). La presencia de bandas de alto peso molecular mediante la visualización del ADN en geles de agarosa al 1%; d). La concentración de ADN, cuantificada por espectrofotometría con la siguiente expresión:

$$[\text{Concentración} = \text{Absorbancia (260nm)} \times 50\text{ng/mL} \times \text{Dilución}^{-1}]$$

Con el propósito de mejorar la amplificación y minimizar la presencia de impurezas en las muestras extraídas con el *buffer* STE, se incluyó la precipitación del ADN con etanol frío, seguido de un proceso de centrifugación durante 10min. a 14.000rpm, finalmente el *pellet* se secó y se suspendió nuevamente en agua.

La calidad del ADN extraído con el *buffer* STE se evaluó mediante amplificaciones por PCR cada seis meses, durante dos años, a partir de muestras almacenadas a -20°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las técnicas de extracción convencionales con el *kit* comercial de Qiagen (T1) y fenol cloroformo (T8), que incluyeron purificación de ácidos nucleicos, fueron las únicas técnicas que presentaron bandas de alto peso molecular, que indican ADN de alta calidad, mientras que con los otros métodos se observó la presencia de ADN degradado, excepto en el tratamiento 7, donde no se visualizó material genético (Figura 1). Cabe anotar que en el 100% de las muestras se amplificó el fragmento P8, tanto a partir del ADN extraído con el *kit* de Qiagen (T1) como con los *buffers* TE (T3) y STE (T6). No obstante, la mejor calidad del amplificado se observó en las muestras extraídas con el *kit* comercial (Figura 2). Con el *buffer* TE más proteinasa K (T4) y fenol cloroformo (T8), se amplificaron el 73 y 80% de las muestras, respectivamente. En los demás tratamientos evaluados no se lograron amplificados del fragmento de interés, probablemente debido a

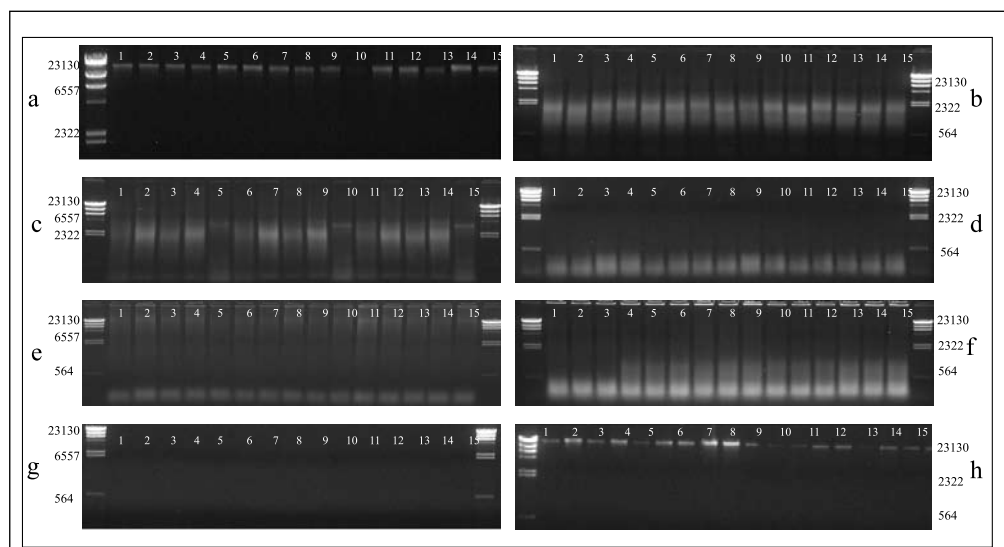


Figura 1. ADN de adultos de broca extraído con: a) Qiagen (T1); b) Agua destilada (T2); c) *Buffer* TE (T3); d) *Buffer* de lisis (T4); e) *Buffer* de PCR más proteinasa K (T5); f) *Buffer* STE (T6); g) Desnaturalización de brocas completas (T7); h) Fenol cloroformo (T8).

que las impurezas presentes en las muestras inhibieron la reacción de PCR.

Los métodos de extracción con los *buffers* TE (T3) y STE (T6) fueron los más económicos, mientras que el método más rápido fue el T4 (*buffer* TE + Proteinasa K) seguido del T6 (STE) (Tabla 1). Con el método de extracción con fenol cloroformo

se necesitó mayor tiempo para la extracción, debido a que el procedimiento es dispendioso y requiere un gran número de pasos; de otro lado, la técnica más costosa fue la del *kit* de Qiagen, debido a que es un producto importado.

En cuanto a la cantidad de ADN evaluado mediante absorbancia, se encontró mayor

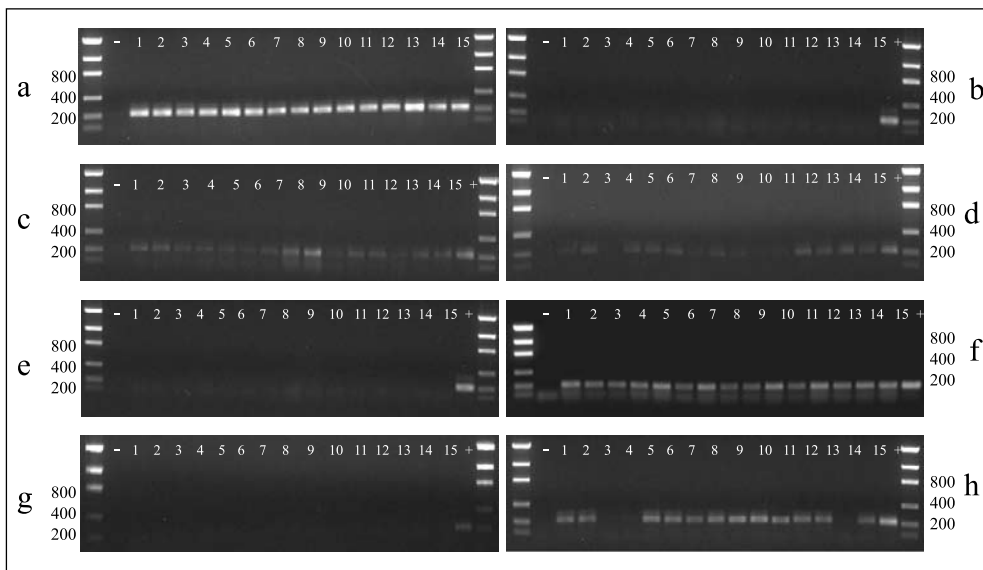


Figura 2. Amplificación mediante PCR de ADN de broca extraído con: a) Qiagen (T1); b) Agua destilada (T2); c) *Buffer* TE (T3); d) *Buffer* de lisis (T4); e) *Buffer* de PCR más proteinasa K (T5); f) *Buffer* STE (T6); g) Desnaturalización de brocas completas (T7); h) Fenol cloroformo (T8); (+) Control positivo.

Tabla 1. Costo y tiempo requerido para la extracción de ADN genómico de broca con diferentes tratamientos.

Técnica	Costo por muestra (en pesos)	Tiempo por muestra
T1 - Kit comercial de Qiagen	10.285	3-4 horas
T3 - <i>Buffer</i> TE	190	10 horas
T4 - <i>Buffer</i> TE + proteinasa K	191	15 minutos
T6 - <i>Buffer</i> STE	190	20 minutos
T8 - Fenol-cloroformo	2.985	8-16 horas

concentración en las muestras extraídas con el *kit* Qiagen (52,67ng/μL) comparada con el tratamiento fenol-cloroformo (22,5ng/μL), debido a que la extracción con este último pudo ocasionar pérdidas de ADN durante los pasos de purificación orgánica. Con respecto a los métodos de extracción cruda, no fue posible realizar una cuantificación debido a la gran cantidad de proteínas e impurezas presentes en las muestras.

De acuerdo con el costo, el tiempo requerido para la extracción y la calidad de los amplificados, se seleccionó la técnica de extracción de ADN con el *buffer* STE como el mejor método de extracción de ADN para ser usado en estudios de genética y ecología poblacional de la broca del café; aunque el *buffer* TE (T3) amplificó el 100% de las muestras y resultó ser tan económico como el STE, no se seleccionó por requerir un largo tiempo en el procedimiento (Tabla 1).

El ADN extraído con el *buffer* STE y posteriormente precipitado con etanol mostró una mejor calidad de los amplificados mediante PCR, e incluso permitió su uso en reacciones de PCR cuantitativo en tiempo real (Figura 3); esto es útil debido a que esta técnica en genotipificación de SNP's (*Single Nucleotide Polymorphism*) y otras mutaciones, permite la búsqueda de polimorfismos en organismos con baja variabilidad genética, como la broca del café. El ADN extraído con *buffer* STE y almacenado a -20°C, se ha utilizado exitosamente en amplificaciones mediante PCR durante dos años sin observarse deterioro en la calidad (Figura 4).

Con el fin de evaluar la utilidad del método de extracción con el *buffer* STE en otros insectos, se extrajo el ADN de áfidos para amplificar regiones de ADN ribosomal con los *primers* ITS1 e ITS4 mediante PCR. El método permitió amplificar un fragmento

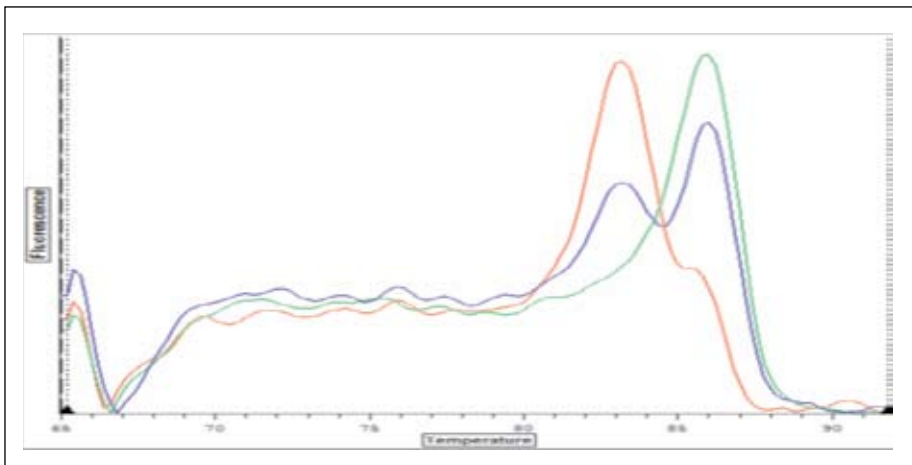


Figura 3. Identificación de un SNP del alelo para la subunidad A del receptor GABA, mediante la amplificación alelo-específica por PCR en tiempo real (Real Time PCR), empleando ADN crudo de *H. hampei* precipitado con etanol. La gráfica ilustra la curva de temperatura de Melting (T_m) usada para la identificación de los alelos: homocigoto para el alelo 1 (línea roja), homocigoto para el alelo 2 (línea verde) y heterocigoto (línea azul).

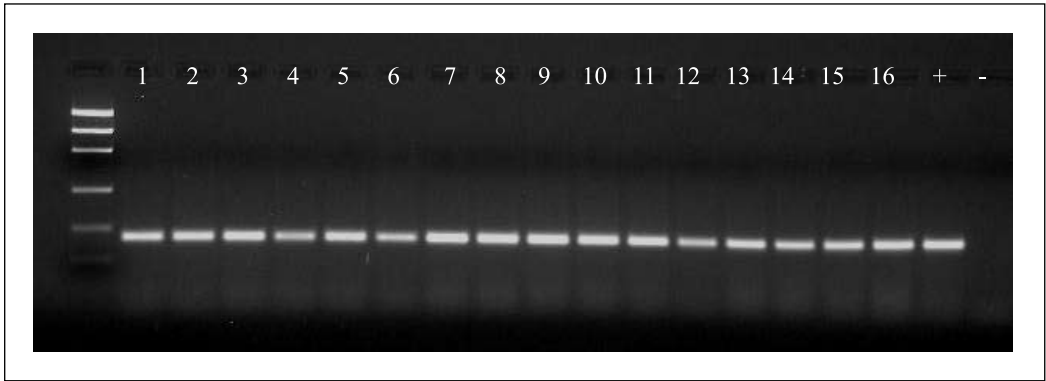


Figura 4. Amplificado de PCR a partir de ADN de broca extraído con STE (T6) y almacenado durante dos años a -20°C. Controles positivos y negativos se indican con los signos + y -, respectivamente.

de 600pb, lo cual sugiere que podría ser empleado con éxito en la extracción de ADN de otros insectos (Datos no mostrados).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que existen métodos de extracción cruda que permiten la amplificación de fragmentos de ADN genómico de insectos mediante PCR, de manera rápida y sin incurrir en mayores costos, lo cual confirma lo reportado por Grevelding *et al.* (6).

La extracción de ADN de muestras biológicas es un paso crucial en los diagnósticos moleculares, ya que el éxito de los subsecuentes procesos depende de la cantidad y calidad del mismo; es por ello que la mayoría de los protocolos incluyen la purificación de los ácidos nucleicos en la cual se remueven proteínas, residuos orgánicos y sales, que pueden interferir en la reacción de PCR. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este estudio, se demuestra que los métodos de extracción cruda permiten la amplificación de secuencias de ADN en reacciones de PCR, siendo más económicos que los *kits* comerciales y con procedimientos más rápidos y menos dispendiosos que los que emplean fenol cloroformo. Estos resultados demuestran que no es requisito esencial

la purificación previa del ADN para la obtención de copias de fragmentos de ADN mediante PCR, aspecto que coincide con lo reportado por Loxdale y Lushai (7), y que se constituyen en herramientas valiosas en estudios de dispersión y variación genética de poblaciones.

AGRADECIMIENTOS

A Jhon Fredy Betancur por su asesoría en métodos de extracción y a Jhon Jairo García por el mantenimiento de las crías de broca. A la doctora Esther Cecilia Montoya de la Disciplina de Biometría, por su asesoría. Esta investigación fue financiada por el Convenio de Cooperación Técnica y Científica celebrado entre el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia - Convenio 100/2004.

LITERATURA CITADA

1. BENAVIDES M., P.; VEGA, F.E.; ROMERO S., J.; BUSTILLO P., A.E.; STUART, J. Biodiversity and biogeography of an important inbred pest of coffee, the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Annals of the Entomological Society of America* 98 (3):359-366. 2005.

2. BLACK IV, W. C.; DU TEAU, N. M.; PUTERKA, G. J.; NECHOLS, J. R.; PETTORINI, J. M. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82 (2): 151-159. 1992.
3. BUSTILLO P., A.E. Perspectivas de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* en Colombia. Medellín, Sociedad Colombiana de Entomología - Socolen, 1991. p. 106-118. (Miscelánea No. 18)
4. BUSTILLO, P., A.E. El manejo de cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia. *Boletín Técnico Cenicafé*. No. 24:1-40. 2002.
5. FFRENCH- CONSTANT, R. H.; STEICHEN, J.C.; BRUN, L. O. A molecular diagnostic for endosulfan insecticide resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bulletin of Entomological Research* 84 (1): 11-15. 1994.
6. GREVELDING, C.G.; KAMPKÖTTER, A.; HOLLMANN, M.; SCHÄFER, U.; KUNZ, W. Direct PCR on fruitflies and blood flukes without prior DNA isolation. *Nucleic Acids Research* 20 (24): 4100-4101. 1996.
7. LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88 (6): 577-600. 1998.
8. ROSE, O.C.; BROOKES, M. I. ; MALLETT, L. B. A quick and simple nonlethal method for extracting DNA from butterfly wings. *Molecular Ecology* 3: 275. 1994.
9. SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 Vols.