

Análisis comparativo de dos protocolos de aislamiento de ADN en hojas secas de mango (*Mangifera indica* L.) para uso en técnicas moleculares

Comparative analysis of two DNA isolation protocols in dried leaves of mango (*Mangifera indica* L.) for use in molecular techniques

Enrique Pardo-Pérez^{1*} ; Leandro Anaya-Palmera¹ ; Teodora Cavadía-Martínez¹ 

¹Universidad de Córdoba. Montería - Córdoba, Colombia; e-mail: epardop@correo.unicordoba.edu.co; leandroanayap@correo.unicordoba.edu.co; tcavadia@correo.unicordoba.edu.co

*autor de correspondencia: epardop@correo.unicordoba.edu.co

Cómo citar: Pardo-Pérez, E.; Anaya-Palmera, L.; Cavadía-Martínez, T. 2024. Análisis comparativo de dos protocolos de aislamiento de ADN en hojas secas de mango (*Mangifera indica* L.) para uso en técnicas moleculares. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 27(2):e2403. <http://doi.org/10.31910/rudca.v27.n2.2024.2403>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada en Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional

Recibido: abril 10 de 2023

Aceptado: agosto 31 de 2024

Editado por: Helber Adrián Arévalo Maldonado

RESUMEN

La obtención de ADN genómico de alta calidad es fundamental para la preservación de los recursos genéticos, especialmente, en especies de valor importante en la economía popular; sin embargo, la presencia de contaminantes, como polisacáridos, polifenoles y metabolitos secundarios en árboles frutales, dificulta la extracción de ADN puro. En este trabajo, se compararon dos métodos de extracción de ADN en tejido seco: un kit comercial y el método modificado de Doyle & Doyle. La cantidad y calidad del ADN extraído se evaluaron utilizando un espectrofotómetro y mediante electroforesis en gel de agarosa. Es importante señalar que el ADN obtenido con el kit comercial mostró presencia de compuestos aromáticos y proteínas, mientras que el método modificado de Doyle y Doyle logró obtener ADN de alta calidad, sin contaminantes, lo cual, se corroboró por la posterior amplificación, mediante PCR del ADN obtenido con cebadores SSR, mostrando bandas nítidas y bien definidas.

Palabras clave: Árboles frutales; Extracción de ADN; Diversidad genética; Preservación de recursos genéticos; Técnicas moleculares.

ABSTRACT

The extraction of high-quality genomic DNA is essential for the preservation of genetic resources, particularly in species of significant value to the popular economy. However, the presence of contaminants such as polysaccharides, polyphenols, and secondary metabolites in fruit trees complicates the extraction of pure DNA. In this study, two DNA extraction methods in dried tissue were compared: a commercial kit and the modified Doyle & Doyle method. The quantity and quality of the extracted DNA were assessed using a spectrophotometer and agarose gel electrophoresis. It is important to note that the DNA obtained with the commercial kit showed the presence of aromatic compounds and proteins, while the modified Doyle & Doyle method successfully yielded high-quality, contaminant-free DNA, as confirmed by subsequent PCR amplification using SSR primers, which showed clear and well-defined bands.

Keywords: DNA extraction; Fruit trees; Genetic diversity; Molecular techniques; Preservation of genetic resources.

INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es una reconocida fruta tropical de origen en el Noreste de la India, la región Indo-Birmánica y las montañas de Bangladesh (Mukherjee, 1957). El mango se destaca por su gran diversidad, pulpa carnosas, particular sabor y aroma, amplia aceptación y creciente demanda en los mercados internacionales (Maldonado *et al.* 2016).

En la actualidad, el perfeccionamiento de herramientas genéticas para el mango son escasas, por lo que muy poco han contribuido al mejoramiento genético de estos frutos, a nivel mundial. La diversidad genética es esencial para la producción agrícola sostenible, puesto que reduce la vulnerabilidad ante plagas y enfermedades (Zhou *et al.* 2002; Lobo, 2006); sin embargo, el fitomejoramiento depende de la riqueza genética del material utilizado para este fin (Cooper *et al.* 2001).

Las técnicas moleculares son fundamentales para la identificación y la diferenciación de plantas, integrando taxonomía, genética y evolución (Riley *et al.* 2023); no obstante, la extracción de ADN a partir de tejidos vegetales presenta desafíos, ya que muchas plantas contienen altos niveles de metabolitos secundarios (Avalos & Pérez-Urria, 2009; Lawal & Agbator, 2021), que pueden interferir con la PCR. La eliminación de estos metabolitos, a menudo, requiere una purificación adicional del ADN, mediante el uso de disolventes orgánicos. Los métodos moleculares empleados en estudios de diversidad genética de especies dependen de la obtención de ADN íntegro, puro y de la más alta calidad (Roudsary *et al.* 2022).

Para poder desarrollar eficientemente las herramientas moleculares es fundamental contar con protocolos de obtención de ADN, de buena concentración, alta pureza, baratos, sencillos y que no produzcan desechos tóxicos (Pommer & Murakami, 2009; Healey *et al.* 2014; Sánchez *et al.* 2021).

Para el aislamiento y la purificación de ADN de buena calidad, se utilizan métodos basados en la técnica de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), debido a su bajo costo (Pardo-Pérez *et al.* 2021; Asha *et al.* 2023). Por otro lado, existen kits comerciales, que permiten una extracción rápida de ADN; aunque son reproducibles y proporcionan material de alta pureza, una limitación de estos kits es su alto costo y la baja cantidad de ADN recuperado (Ríos *et al.* 2016).

Las hojas de mango tienen presencia de fenoles (Carrillo-Tomalá *et al.* 2020), los cuales, son compuestos químicos inhibidores (Sánchez *et al.* 2021), que se unen y precipitan el ADN (Azmat *et al.* 2012; Pardo-Pérez *et al.* 2021). Para el caso de la extracción de ADN en hojas tiernas de mango, Saldaña & Salazar (2007) reportan que, de los cuatro métodos usados, el descrito por Doyle & Doyle (1990), como el mejor en obtención de cantidad de ADN intacto.

Dada la dificultad para el procesamiento de las muestras en fresco y teniendo en cuenta la ausencia de un protocolo de extracción de ADN en tejido seco de mango, se hace necesario implementar

un método para aislar ADN en tejido seco, pues la mayoría de estas técnicas están estandarizadas para extraer ADN en tejido fresco (Kumari *et al.* 2018; Kumar *et al.* 2020). Por tal razón, el presente estudio tuvo como objetivo el análisis comparativo de dos protocolos de extracción de ADN en hojas secas de mango (*Mangifera indica* L.), para uso en técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de material biológico: Se colectaron hojas en fase madura de 15 árboles de mango, ubicados en la Vereda Km 12 de Montería (N 8°40'41.7", O 75°48'07.0"), las cuales, se colocaron en una bolsa resellable, que contenía gel de sílice y se almacenaron a temperatura ambiente.

Extracción de ADN: Se examinaron dos métodos de extracción de ADN: el kit comercial de extracción Wizard Genomic de Promega® (USA, Promega A1120), que se ejecutó atendiendo las indicaciones del fabricante y el método de Doyle & Doyle (1990), con las siguientes modificaciones: se reemplazó alcohol isoamílico 24:1, en vez de octanol, se centrifugó a 13.500rpm y se precipitó el ADN con una solución de etanol absoluto en reemplazo del isopropanol.

Concentración y pureza del ADN: La concentración (ng/μL) y la pureza del ADN obtenido se evaluaron espectrofotométricamente a 260 y 280 nm y la relación A260/A280, se utilizó para evaluar la contaminación con proteínas, empleando la espectrofotometría Colibri Microvolume Spectrometer (TitertekBerthold, Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstrasse, Pforzheim, Germany), descrita por Brondmann (2008). Para verificar la integridad del ADN, se corrieron 5μL de ADN en una cámara de electroforesis (Clase II Owl separation Systems, Inc. Portsmouth, USA modelo B1A), en un gel de agarosa al 1,5 de (p/v), con TBE 1X como buffer y a un voltaje constante de 120 V, durante 90 min. Se hizo el ténido del ADN con Gelred Nucleic Acid 10000X water Merk y se visualizaron las bandas en un transiluminador DyNA Light™ UV (Labnet International Inc.).

Amplificación del ADN: Se hizo en un termociclador Bioard T100 #1861096 (Los Ángeles, USA), de los marcadores *MiIHR12a*, *MiIHR23a* y *MiIHR34b* (Ravishankar *et al.* 2011). El protocolo PCR se efectuó en un volumen final de 20μL, así: de 10μL de 2x DreamTaq HotStart PCR Master Mix (Thermo Scientific Lithuania); 2μL de cada primer; 7μL de agua estéril (Water Nuclease-free (Thermo Scientific Lithuania) y 1μL de ADN (100ng/μL). El programa empleado es 3 min a 95 °C; 30 s a 60 °C; 30 s a 56 °C; 2 min a 72 °C, repitiendo 23 ciclos del paso 2 al 4 y un paso final de extensión de 10 min a 72 °C.

Análisis estadístico: Los resultados fueron procesados con ayuda del paquete estadístico SPSS para Windows, versión 22.0 (SPSS Inc., 2018). En cada uno de los dos métodos de extracción utilizados, se determinaron medias y desviaciones estándar (s). En la determinación del método que muestra diferencias significativas en la concentración y calidad de ADN, se utilizaron las pruebas de Tukey y Dunnet (Miller, 1996). Para la estimación de la proporción

de éxito de las amplificaciones de los marcadores utilizados, se determinó mediante la prueba de Chi-cuadrado (Halos *et al.* 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar las metodologías utilizadas para la extracción de ADN a partir de hojas secas de mango (*Mangifera indica* L.), la que mejor resultados evidenció, en términos de concentración y de pureza, fue Doyle & Doyle (1990) con modificaciones, en donde la relación entre la cantidad de absorción resultante en 260 y 280 nm fue 1,9, lo que indica que la mayor parte de la absorción la realizan los ácidos nucleicos y, por tanto, el ADN extraído está bien calificado y su pureza es adecuada, mientras la relación para el kit Promega fue de 1,42, valor sensiblemente inferior, lo cual, puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes, que se absorben fuertemente a 280 nm o cerca de ellos (Russo *et al.* 2022).

Además, el ADN extraído con el Kit presentó una coloración turbia durante el proceso de incubación, lo que muestra que para los ácidos nucleicos la turbidez revela presencia de compuestos aromáticos (fenoles) y proteínas (Sahu *et al.* 2012; Sánchez *et al.* 2021), los cuales, en sus formas oxidadas, se unen al ADN covalentemente, lo que resulta en un ADN inadecuado para la mayoría de las aplicaciones moleculares (Pommer & Murakami, 2009 y Sánchez *et al.* 2021), mientras que para el protocolo Doyle y Doyle modificado, resultó un ADN traslúcido, que se ajusta a lo reportado por Sánchez *et al.* (2021), donde obtuvieron, por el método Doyle y Doyle, para hojas liofilizadas de guayaba (*Psidium guajava* L.), un ADN incoloro. Asimismo, el ADN traslúcido revela una extracción limpia y de calidad, evidenciado en la relación de absorbancia A260/A280.

Los resultados mostraron para el rendimiento de ADN y la pureza del ADN utilizando un espectrofotómetro UV, un mayor

rendimiento de ADN con el método de Doyle y Doyle modificado (289,7±42,0 ng/μL), mientras que el menor se obtuvo con el método Kit Promega (95,9±31,8 ng/μL) (Tabla 1).

En la prueba de comparación entre medias de Tukey, el método Doyle y Doyle modificado fue el que obtuvo la mayor concentración de ADN, lo que indica que, en este caso, sí fue posible obtener buena cantidad de ADN. Al comparar los resultados mediante la prueba de Dunnett, se encontraron diferencias significativas y mayores concentraciones de ADN para el método Doyle y Doyle modificado (Tabla 1)

En la tabla 2, se observa que el mayor porcentaje de efectividad en la amplificación se obtuvo a partir del ADN extraído por el método de Doyle y Doyle modificado, siendo del 90 %, para cada uno de los tres marcadores. Este resultado se podría relacionar con la calidad del ADN que se obtuvo mediante el protocolo, debido a que las muestras extraídas con el método Doyle & Doyle modificado evidenciaron un valor promedio de 1,9, lo cual, se ajusta a lo reportado por Russo *et al.* (2022) y Pérez *et al.* (2011), quienes argumentaron que muestras de ADN con valores entre 1,8 y 2,0 son más estables en cuanto a calidad y pureza, por ser poco susceptibles a contaminantes, siendo este ADN óptimo para amplificar con la mayoría de marcadores. También, se puede observar que el porcentaje efectivo de amplificaciones para ADN extraído por el método de Kit de Promega evidenció 0 % en los tres marcadores, lo cual, se pudo deber a la contaminación por metabolitos secundarios, resultado que se ajusta a lo indicado por Pardo-Pérez *et al.* (2021) y Ferreira & Grattapaglia *et al.* (1998), quienes expresaron que la presencia de estos metabolitos en ácidos nucleicos inhibe la acción de la Taq polimerasa.

Tabla 1. Comparación de medias para la eficiencia de dos métodos diferentes de extracción de ADN, mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P \leq 0,01$), en muestras de hojas secas de *Mangifera indica* L.

Concentración y pureza	Kit Promega	Método <i>Mini-prep</i>
	μ ($\pm s$)	
Índice de calidad 260/280	1,42 (0,04)	1,9 (0,108)
Rendimiento de ADN (ng/μL)	95,9 (31,8)	289,7 (42,0)

Tabla 2. Eficiencia de amplificación de los protocolos de extracción de ADN evaluados.

Locus	Metodologías evaluadas	Amplificaciones efectivas	Porcentaje de amplificaciones
<i>MiIIHR12a</i>	A	9	90%
	B	0	0%
<i>MiIIHR23a</i>	A	9	90%
	B	0	0%
<i>MiIIHR34b</i>	A	9	90%
	B	0	0%

A: Kit de extracción Wizard de Promega®; B: Mini-prep modificado.

Agradecimientos: La presente investigación se realizó gracias al financiamiento de la Universidad de Córdoba.

Conflicto de intereses: El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe conflicto de interés que pondría en peligro la validez de los resultados presentados. **Contribución de los autores:** Teodora Cavadía Martínez: conceptualización, metodología, obtención de datos; Leandro Anaya Palmera: metodología, escritura, revisión, edición; Enrique Pardo Pérez: conceptualización, validación, análisis formal, escritura, revisión y edición. Todos los autores participaron en la redacción, revisión, edición del manuscrito y aprueban la versión final.

REFERENCIAS

- ASHA, K.I.; ASWANI S.A.; KRISHNA RADHIKA N.; PRAKASH KRISHNAN, B.S. 2023. Genetic variability and diversity analysis of Chinese potato (*Solenostemon rotundifolius* (poir.) J. K. Morton) germplasm using morphological and molecular markers. South African Journal of Botany. 155:171-177. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.02.014>
- AVALOS, A.; PEREZ-URRIA, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3):119-145.
- AZMAT, M.A.; KHAN, I.A.; CHEEMA, H.M.N.; RAJWANA, I.A.; KHAN, A.S.; KHAN, A.A. 2012. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. Journal of Zhejiang University: Science B. 13(4):239-243. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.B1100194>
- BRONDMANN, P. 2008. DNA extraction from different matrices. Molecular Biology Methods for Traceability Purposes, BfR Berlin, Germany. p.18-19.
- CARRILLO-TOMALÁ, C.; DÍAZ-TORRES, R.; GUERRA-GUAMÁN, K.; ROMÁN-SALMERÓN, A. 2020. Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de hojas de dos variedades de *Mangifera indica* L. Revista Ciencia UNEMI. 13(32):69-77. <http://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol13iss32.2020pp69-77p>
- COOPER, H.D.; SPILLANE, C.; HODGIN, T. 2001. Broadening the genetic base of crops: an overview. En: Broadening the genetic base of crop production. Cooper, H.D.; Spillane, C.; Hodgin, T. (eds.). CABI Publishing. Estados Unidos. p.1-23.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12(1):13-15.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa-Cenargem. Brasília D.F. 220p.
- HALOS, L.; JAMAL, T.; VIAL, L.; MAILLARD, R.; SUAUA, A.; LE MENACH, A.; BOULOUIS, H.J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. 2004. Determination of an efficient and reliable method for ADN extraction from ticks. Veterinary Research. 35:709-713. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004038>
- HEALEY, A.; FURTADO, A.; COOPER, T.; HENRY, H.J. 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. Plant Methods. 10:1-8. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>
- KUMAR, C.; KUMAR, R.; SINGH, S.; GOSWAMI, A.K.; PALIWAL, R.; SINGH, R. 2020. Development of novel g-SSR markers in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda and their application in genetic diversity, population structure and cross species transferability studies. PLoS ONE. 15(8):e0237538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237538>
- KUMARI, S.; ARUMUGAM, N.; SINGH, R.; SRIVASTAV, M.; BANOTH, S.; MITHRA, A.C.; ARUN, M.B.; GOSWAMI, A.K.; KHAN, A.J. 2018. Diversity analysis of guava (*Psidium guajava*) germplasm collection. Indian Journal of Agricultural Sciences. 88(3):489-497. <https://doi.org/10.56093/ijas.v88i3.78740>
- LAWAL, A.; AGBATOR, V.E. 2021. Extraction of high-quality genomic DNA from mansonia altissima for microsatellite analysis. Journal of Research in Forestry, Wildlife and Environment. 13(4):115-119.
- LOBO, M. 2006. Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: Una visión conceptual. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 7(2):40-54. https://doi.org/10.21930/rcta.vol7_num2_art:68
- MALDONADO, Y.I.; NAVARRETE, H.A.; ORTIZ, Ó.D.; JIMÉNEZ, J.; SALAZAR, R.; ALIA, I.; ÁLVAREZ, P. 2016. Physical, chemical and antioxidant properties of mango varieties grown at the Guerrero coast. Revista Fitotecnia Mexicana. 39(3):207-214.
- MILLER, R.G. 1996. Simultaneous Statistical Inference. McGraw-Hill. New York, Estados Unidos. 272p.
- MUKHERJEE, S.K. 1957. Cytology of some Malayan species of *Mangifera*. Cytologia. 22:239-241.
- PARDO-PÉREZ, E.; CORONADO-GONZÁLEZ, J.L.; BEGAMBRE-HERNÁNDEZ, M. 2021. Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de hojas secas de guayaba (*Psidium guajava* L.) para estudios moleculares. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 24(1):e1504. <https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1504>

- PÉREZ, I.; ANGULO, L.; OSORIO, G.; RAMIS, C.; BEDOYA, A.M., FIGUEROA, R.; MOLINA, S.; INFANTE, D. 2011. Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.): para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*. 23:(1)27-34.
- POMMER, C.V.; MURAKAMI, K.R.N. 2009. Breeding Guava (*Psidium guajava* L.). En: Jain, S.M.; Priyadarshan, P.M. (eds). Breeding plantation tree crops: Tropical species. Springer. Estados Unidos. pp.83-120 https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7_3
- RAVISHANKAR, K.V.P.; BELLAM, H.R.M.; LALITHA, A.; MAKKI, R.D. 2011. Development of new microsatellite markers from mango (*Mangifera indica*) and cross-species amplification. *American Journal of Botany*. 98(4):e96-e99. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000263>
- RILEY, I.J.; DIBATTISTA, J.D.; STEWART, J.; SCHILLING, H.T.; SUTHERS, I.M. 2023. Using integrative taxonomy to distinguish cryptic halfbeak species and interpret distribution patterns, fisheries landings, and speciation. *Marine and Freshwater Research*. 74:125-143. <https://doi.org/10.1071/MF22048>
- RÍOS, E.; CALLEROS, E.; GONZÁLEZ, A.; MARTÍNEZ, O.; MARTÍNEZ, A.; HERNÁNDEZ, S.; PÉREZ, R. 2016. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Multidisciplinary Scientific Journal Acta Universitaria*. 26(4):56-65.
- ROUDSARY, L.J.; JAFARI, A.; VAEZI, J.; KARIMI, E. 2022. A simple and efficient DNA extraction protocol for old herbarium leaves of *Bellevalia* (*Asparagaceae*, *Scilloideae*). *Nova Biologica Reperta*. 9(2):124-131. <http://dx.doi.org/10.52547/nbr.9.2.124>
- RUSSO, A.; MAYJONADE, B.; FREI, D.; POTENTE, G.; KELLENBERGER, R.T.; FRACHON, L.; COPETTI, D.; STUDER, B.; FREY, J.E.; SCHLÜTER, P.M.; GROSSNIKLAUS, U. 2022. Low-input high-molecular-weight DNA extraction for long-read sequencing from plants of diverse families. *Frontiers in Plant Science*. 13:1494. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.883897>
- SAHU, S.K.; THANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *Molecular Biology*. 6:1-6. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>
- SALDAÑA, G.; SALAZAR, E. 2007. Aislamiento de ADN de calidad para la amplificación al azar de ADN polimórfico de mango. *Agronomía Tropical*. 57(4):281-286.
- SÁNCHEZ, E.; MORA, E.; BARRANTES, W. 2021. Aislamiento de ADN de alta calidad en *Psidium guajava* L. para estudios genómicos. Nota técnica. *Revista Agronomía Mesoamericana*. 32(2):638-649. <https://doi.org/10.15517/am.v32i2.41606>
- SPSS. 2018. SPSS for Windows. Release V.22.0 Chicago, 1: SPSS Inc, Disponible desde Internet en: <https://www.ibm.com/support/pages/spss-statistics-220-available-download>
- ZHOU, X.; CARTER, T.E.; ZHANGLIN, CUI.; MIYAZAKI S.; BURTON, J. 2002. Genetic diversity patterns in Japanese soybean cultivars based on coefficient of parentage. *Crop Science*. 42:1331-1342. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1331>