

Análisis de la biodiversidad genética del algodón peruano usando marcadores moleculares: Avances en el 2004

José Olórtegui⁽¹⁾ jaol_1@hotmail.com; Marco Espinoza⁽¹⁾ mespinoza@ipen.gob.pe; José Espinoza⁽¹⁾; Ysabel Montoya⁽¹⁾ ymontoya@ipen.gob.pe

(1) IPEN, PRDT, Dirección de Biología, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

Resumen

Tres mini preparaciones de extracción de ADN de algodón fueron comparadas en términos de calidad y rendimiento. El método de extracción de ADN usando CTAB fue el más eficiente (30 ug) en comparación con un kit comercial de extracción (20 ug) a partir de 100 mg de hojas cotiledonarias. La óptima calidad del ADN fue evaluada con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Msel*. El ADN preparado será usado para iniciar el análisis de la biodiversidad genética del algodón peruano, usando marcadores moleculares tales como Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Amplificación (AFLP) y el de Repeticiones de Secuencias Simples (SSR).

1. Introducción

Durante muchas décadas, el cultivo del algodón fue uno de los principales cultivos tradicionales de exportación del Perú; sin embargo, su importancia en la economía rural y como producto de exportación ha ido decreciendo en los últimos años. En el 2002, la producción de algodón se redujo considerablemente hasta tan sólo constituir el 3.5% de la superficie total sembrada en el país (Ministerio de Agricultura, 2005).

En nuestro país, el algodón se cultiva en la costa y en la selva. El algodón Tangüis es el responsable del 70% de la producción nacional, el algodón Pima del 20% y los otros algodones representan el 10%. El algodón Tangüis y Pima son reconocidos por la buena calidad de su fibra (Ministerio de Agricultura, 2005).

El algodón Tangüis (*Gossypium barbadense* L.) crece principalmente en la costa central y sur del país (desde Santa-Ancash a Acari–Arequipa), presenta fibras largas. El algodón Pima (*Gossypium barbadense* L.) se cultiva a lo largo de la costa norte del Perú, principalmente en Piura, el cual se distingue por su fibra extra larga.

En la literatura, existe un amplio número de metodologías para la extracción de algodón (Li et al. 2001, Chaudhry et al., 1999; & Permingeat, 1998). Algunos son métodos que pueden ser preparados en los laboratorios tal como el procedimiento basado en el uso de bromuro de cetil trimetil amonio descrito por Zhang &

Stewart., 2000. Otros laboratorios prefieren usar kits comerciales para la extracción de ADN de plantas; sin embargo, los costos son más altos. Los métodos de extracción de ADN para algodón varían en el uso de altas concentraciones de sales con el fin de remover los polisacáridos así como el uso de Polivinilpirrolidone (PVP) el cual se une a los polifenoles y los captura (Porebski et. al. 1997 & Lodhi, 1994). Además, otros autores incluyen el uso del β -mercaptoetanol como antioxidante (Patterson et al., 1993) y fenantrolina, como el agente caotrópico y quelante de metales que ayuda a reducir las uniones intermoleculares, el cual a su vez inhibe la degradación de ADN, protegiéndolo del efecto dañino de los iones hierro en suspensión (Wajahatallah et. al. 1997).

El objetivo del presente reporte es realizar un estudio comparativo de métodos de extracción de ADN de algodón.

El ADN preparado será usado para el análisis de la biodiversidad del algodón peruano usando los marcadores moleculares conocidos como Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Amplificación (AFLP) y Repeticiones de Secuencias Simples SSR o microsatélites.

2. Método Experimental

Material biológico

Semillas de algodón de la variedad Tangüis fueron proporcionadas gentilmente por la Estación Experimental de Cañete de la Asociación de Agricultura de Cañete. Las semillas fueron germinadas en almacigo de

arena de cuarzo, por un período de 10 días, y luego sometidas a un proceso de crecimiento de un día en un cuarto oscuro, con la finalidad de reducir la producción de carbohidratos, que alteren el proceso de extracción del ADN.

Extracción de ADN de algodón

Las extracciones de ADN de algodón fueron realizadas a partir de 100 mg de hojas cotiledonarias de algodón. Estas hojas fueron pulverizadas con nitrógeno líquido y posteriormente fueron colocados en microviales hasta su uso.

La extracción de ADN de las Muestras 1, 2, 3 & 4 fue realizada usando el Método de mini preparación usando CTAB reportado por Zhang & Stewart., 2000. Sin embargo, a la Muestra 3 y la Muestra 4 se le añadió el Buffer de Limpieza (0.05 M Tris HCl pH=8; 0.05 M EDTA pH=8; 2% CTAB; 2% NaCl y 0.02% de 1,10 Fenantrolina.

Simultáneamente, el ADN de la Muestra 5 fue extraído usando el kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor.

Cuantificación de ADN

El ADN de algodón obtenido en cada una de las Muestras resuspendido en agua fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm.

Digestión de ADN con enzima de Restricción: *EcoRI* y *MseI*

250 ng de ADN de algodón de cada una de las Muestras que aparecen en la Tabla 1 fue digerido con 5U de la enzima *EcoRI*. Asimismo, en tubos separados fueron digeridos 250 ng de las muestras de la Tabla 1 con 5U de la enzima *MseI* respectivamente. Cada una de ellas fue digerida a 37°C durante 3 horas. Además, se incluyeron los controles respectivos del sistema.

Posteriormente, 5 ul de cada uno de los tubos fueron colocados en un gel de agarosa al 1%. Al final de la electroforesis, las bandas de ADN fueron visualizadas con luz ultravioleta previa tinción con bromuro de etidio.

3. Resultados

El método de extracción de ADN usando CTAB fue el más eficiente

El ADN de algodón obtenido de las cinco muestras biológicas fue de óptima calidad. Cada uno de los procedimientos usados brindo buen rendimiento de ADN.

El procedimiento que brindo el mejor rendimiento fue el método de CTAB sin necesidad inclusive de usar el Buffer de Limpieza reportado en la literatura.

En la Tabla 1 se muestra la cantidad de ADN obtenido a partir de 100 mg de tejido fresco. El método de extracción usando CTAB brindo un rendimiento de 20 a 30 ug de ADN (Muestra 1, 2, 3 & 4). El ADN obtenido usando el kit de extracción brindo 20 ug de ADN de algodón (Muestra 5).

EL ADN de algodón es de buena calidad

Todas las preparaciones de ADN fueron cortadas exitosamente con la enzima de restricción *EcoRI* y la enzima *MseI* respectivamente.

Tabla 1. Cantidad de ADN obtenido a partir de 100 mg de tejido fresco.

<i>Preparación de ADN</i>	<i>Método</i>	<i>Rendimiento</i>
Muestra 1	Método CTAB	40 ug
Muestra 2	Método CTAB	35 ug
Muestra 3	Método CTAB Con Buffer	30 ug
Muestra 4	Método CTAB Con Buffer	30 ug
Muestra 5	Kit Qiagen	30 ug

El método de extracción de algodón usando CTAB, sin incluir el Buffer de Limpieza, fue el más eficiente.

4. Discusión

En la actualidad, existe gran variedad de metodologías para la extracción del ADN en plantas. Las características especiales con las que cuenta los tejidos vegetales de donde se extrae el ADN han exigido que se realicen algunas modificaciones, con la finalidad de reducir la captación de polisacáridos y fenoles, compuestos que perturban el proceso de extracción. Estos compuestos impiden la digestión por enzimas de restricción y otras técnicas moleculares tales como AFLP (Vos, 1995) que será usada.

Esta mini preparación de ADN exitosa en términos de calidad y rendimiento usando el método de CTAB es un procedimiento muy económico y rápido, el cual permitirá realizar preparaciones de ADN inclusive a mayor escala. La presencia o ausencia de sustancia (s) que inactiven o disminuyan la actividad de las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* fue usada como indicador de la calidad del ADN.

En el Perú, es muy importante conocer la biodiversidad de los algodones peruanos desde que los cultivos disponibles podrían tener una muy limitada base genética que restringiría la habilidad del algodón para realizar avances en fitomejoramiento. El fitomejoramiento exitoso de líneas genéticas de algodón es importante para asegurar el mantenimiento/incremento del germoplasma con el fin de lograr mejores resultados.

5. Conclusiones

Las condiciones para la extracción de ADN de algodón están optimizadas para proseguir con el análisis del algodón usando las técnicas de AFLP y el de SSR.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto recibió financiamiento parcial del Concejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONCYTEC).

Bibliografía

1. Ministerio de Agricultura. 2005. www.minag.gob.pe/algodon.shtml
2. Li, H. Jlu, J. Hemphill, Jau-Tay Wan & J. Gould. 2001. A Rapid and High Yielding DNA Miniprep for Cotton (*Gossypium* spp.) Plant Mol. Biol. Report. 19: 1–5.
3. Chaudhry, B.; Afshan. Y., H. Tayyab & Riazuddin S. 1999. Mini-scale Genomic DNA Extraction from Cotton. Plant Mol. Biol. Reporter 17: 1–7.
4. Permingeat, H.; Romagnoli M. & R. Vallejos. 1998. Simple Method for Isolating High Yield and Quality DNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Leaves. Plant Mol. Biol. Report 16: 1–6.
5. Zhang, J.; & J. McD. Stewart. 2000. J. Cotton Sci. Economical and Rapid Method for Extracting Cotton Genomic DNA. J. Cotton Sci. 2000. 4:193-201.
6. Porebski, S.; L. Bailey, and B. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol. Biol. Report. 15: 8-15.
7. Lodhi, M.; D. Ye, D.; Wwden N.; and Reisch, B. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. Plant Mol. Boil. Report. 12: 6-13.
8. Patterson A.H.; Brubaker C.L. & Wendel J.F. 1993. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* ssp) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. Plant Mol. Biol. Rep. 11(2): 122-127.
9. Wajahatallah, M.; Khan M., Hoyt J., & McD. Steward J. 1997. A method of DNA isolation and purification from *Gossypium* species for molecular studies. P. 156-159. In Proc. Cotton research meeting and summaries of cotton research in progress. Spec. Rep. 193. Arkansas Agric. Exp. Station, Fayetteville.
10. Vos, P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Fijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M.. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.