

**Universidad de Costa Rica**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Análisis comparativo de tres diferentes protocolos de extracción de ácidos nucleicos totales de ayote (*Cucurbita moschata*) para el diagnóstico de geminivirus**

**Tesis sometida para optar por el título de Licenciado en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología**

**Eduardo Hernández Jiménez**

**Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”  
San José, Costa Rica**

**2008**

Esta tesis fue aceptada por el Tribunal de Trabajo Final de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciado en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología.



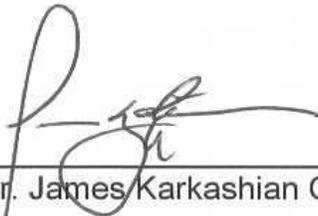
Dr. Federico Albertazzi Castro –Representante del Decano de la Facultad de Ciencias.



Dra. Pilar Ramírez Fonseca –Directora de Tesis.



Dra. Floribeth Mora Umaña –Asesora.



Dr. James Karkashian Córdoba –Asesor.



M.Sc. Federico Bolaños Vives –Director *a.i.* de la Escuela de Biología.



Bach. Eduardo Hernández Jiménez –Postulante.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi tía Ode y a doña Mirna, quienes dejaron huella en mi corazón por la intensidad con que vivieron, su fuerza y entereza al transitar el camino hacia la luz.

A mi padre, por su ejemplo de superación.

A mi madre, por su enorme apoyo y esfuerzo.

A mi esposa Yis, por su tolerancia y amor incondicional, ella es pilar en mi vida.

## RECONOCIMIENTOS

Agradezco a Dios, fuerza propulsora del universo.

A la Dra. Pilar Ramírez por darme el privilegio de ser parte de su grupo de trabajo y permitirme un aprendizaje integral.

A la Dra. Floribeth Mora por su apoyo y dedicación.

Al Dr. James Karkashian por sus valiosos aportes.

Al Dr. Federico Albertazzi por su consejo desinteresado y amable.

A todos los investigadores, compañeros, estudiantes de pre y postgrado, así como a todas aquellas personas que de algún modo dieron su aporte para alcanzar esta meta.

# ÍNDICE GENERAL

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Hoja de aprobación	ii
Dedicatoria	iii
Reconocimientos	iv
Índice general	v
Índice de ilustraciones	vii
Índice de cuadros	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	x
<b>I. Estado actual del conocimiento</b>	
A. Geminivirus en ayote	1
B. Los geminivirus y su variación genética	2
C. Extracción de ácidos nucleicos totales	4
D. Principales problemas para la extracción de ácidos nucleicos	6
E. Protocolos de extracción de ADN geminiviral	7
<b>II. Justificación de la investigación</b>	9

<b>III. Objetivo general</b>	<b>10</b>
<b>IV. Objetivos específicos</b>	<b>10</b>
<b>V. Materiales y métodos</b>	
A. Descripción de la estrategia metodológica	11
B. Extracción de ácidos nucleicos	13
C. Análisis electroforético de los ácidos nucleicos totales	17
D. Cuantificación del ADN	17
E. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
F. Hibridación molecular por “dot blot”	19
G. Análisis por “Southern blot”	20
<b>VI. Resultados</b>	
A. Extracción de ácidos nucleicos	22
B. Análisis electroforético de los ácidos nucleicos totales	22
C. Cuantificación de ADN	23
D. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	26
E. Hibridación por “dot blot”	28
F. Hibridación por “Southern blot”	29
<b>VII. Discusión</b>	<b>31</b>
<b>VIII. Literatura citada</b>	<b>35</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura	Descripción	Página
<b>Figura 1.</b>	Organización genética de los <i>Begomovirus</i> , género que pertenece a la familia <i>Geminiviridae</i> . Las flechas indican la localización en el genoma de las secuencias codificantes y su dirección.	3
<b>Figura 2.</b>	Diagrama de flujo de los protocolos de extracción de ácidos nucleicos y su análisis posterior. La totalidad de la estrategia se realizó por duplicado (dos réplicas del experimento).	12
<b>Figura 3.</b>	Muestra del sistema utilizado para realizar la transferencia de ácidos nucleicos a la membrana de nylon (Tomado de Sambrook <i>et al.</i> 1989).	21
<b>Figura 4.</b>	Análisis electroforético en gel de agarosa 1% de los ANT resultantes por los métodos de CTAB y Dellaporta, teñido con bromuro de etidio a 1 mg/ml. Los carriles 2 a 7 contienen las extracciones por el método CTAB almacenado en SG (2, 3 y 4) y congelado a -70°C (5, 6 y 7). A la derecha, en los carriles 9 a 14 se cargó los del método Dellaporta almacenado en SG (9, 10 y 11) y congelado a -70°C (12, 13 y 14). Los carriles 1, 8 y 15 corresponden al marcador de peso molecular (MPM): fago lambda digerido con enzima <i>Hind III</i> . Se muestran los tamaños de banda del MPM en los extremos de la figura.	23
<b>Figura 5.</b>	Distribución de medianas y promedios obtenidos de la cuantificación de ADN por fluorometría. <b>(A)</b> Mediana (línea horizontal) y distribución de los datos por percentiles (cajas) de la cantidad de ADN según el método de extracción, se muestra además el valor máximo y mínimo (líneas punteadas). <b>(B)</b> Promedio de ADN por método de extracción para las dos réplicas del experimento. <b>(C)</b> Promedio de ADN por modo de almacenamiento para las dos réplicas del experimento. <b>(D)</b> Mediana y distribución de los datos por percentiles según el modo de almacenamiento, se muestra además los valores máximo y mínimo.	25
<b>Figura 6.</b>	Resumen de los resultados obtenidos por PCR utilizando los iniciadores para CP e hibridación por "dot blot". De izquierda a derecha la concentración varía de 300, 30, 12, 6, 3, 1.2, 0.6 y 0.3 ng/μl de ANT utilizados en los experimentos. Para el experimento de hibridación se utilizó 3 μl de ANT a la concentración mencionada. Como sonda se utilizó el extremo 3' del gen <i>cp</i> del BGYMV-[GT].	27
<b>Figura 7.</b>	PCR utilizando los iniciadores para la parte superior del genoma A. De izquierda a derecha la concentración varía de 300, 30, 12, 6 y 3 ng/μl.	28
<b>Figura 8.</b>	Hibridación por "Southern blot" de los ANT que se obtuvo de los tres métodos de extracción y los dos diferentes modos de almacenamiento. Las flechas señalan las isoformas del genoma viral: en la parte superior el ADNdb circular abierto (OC), el ADNsb (SS) en la parte media y en la parte inferior el ADNdb superenrollado (SC). Como sonda se utilizó el extremo 3' del gen <i>cp</i> del BGYMV-[GT].	30

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
<b>Cuadro 1.</b>	Valores de probabilidad ( $p$ ) generados por el ANDEVA corregido, en el cual se resaltan en negrita los valores significativos para cada factor e interacción entre ellos.	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Rep	Proteína relacionada con la replicación
TrAP	Proteína vinculada a la activación de la replicación
REn	Proteína que incrementa la eficiencia de la replicación
CP	Proteína de cubierta
ORF	Encuadre abierto de lectura
MPB	Proteína de movimiento entre células, codificada en el genoma B
NSP	Proteína de movimiento hacia fuera del núcleo
RC	Región común
ANT	Ácidos nucleicos totales
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
SG	Sílica gel
Tris-HCl	Tris- Ácido clorhídrico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
NaCl	Cloruro de sodio
SDS	Duodecilsulfato de sodio
M	Molar
PCI	Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico
CI	Cloroformo: Alcohol isoamílico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
NaOH	Hidróxido de sodio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
BrEt	Bromuro de etidio
ANDEVA	Análisis de varianza
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
pb	Pares de bases
ARN	Ácido ribonucleico
MPM	Marcador de peso molecular
ADNdb	ADN doble banda
ADNsb	ADN simple banda
OC	ADNdb circular abierto
SS	ADNsb
SC	ADNdb superenrollado
RNasa	Ribonucleasa
ADNccc	ADN circular cerrado covalentemente

## RESUMEN

Hernández Jiménez, Eduardo

Análisis comparativo de tres diferentes protocolos de extracción de ácidos nucleicos totales de ayote (*Cucurbita moschata*) para el diagnóstico de geminivirus

Tesis de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San José.

Los geminivirus constituyen un importante grupo de patógenos de plantas, caracterizados por una morfología inusual de la partícula viral y su ADN. Poseen una cubierta icosaédrica pareada y un pequeño genoma circular de ADN simple banda que se replica mediante ADN doble banda en el núcleo de la célula infectada de la planta. Debido a los rápidos avances en biología molecular durante la segunda mitad del siglo XX e inicio del siglo XXI, y a que la extracción y purificación del ácido nucleico es el primer paso en buena parte de los procedimientos en ésta área, muchos investigadores se han enfocado en el desarrollo y optimización de protocolos para obtener el ADN o ARN de interés. Este trabajo tuvo como objetivo comparar mediante técnicas moleculares la purificación de ADN en ayote a partir de diferentes modos de almacenamiento y protocolos de extracción de ácidos nucleicos totales de la planta, para mejorar la calidad y cantidad del material genético con que se realiza la detección y caracterización de geminivirus. Se compararon tres métodos: i.- Dellaporta y colaboradores (1983), ii.- Doyle y Doyle (1990) y iii.- Jose y Usha (2000). Se

evaluó el funcionamiento de los tres métodos escalados hacia abajo (15 miligramos de tejido foliar) y dos modos de almacenamiento: 1.- tubos con sílica gel (SG, un desecante) y 2.- congelado a -70 grados Celsius (-70°C). El método de Jose y Usha (2000) presentó dificultades técnicas que no permitieron se pudiera escalar, por lo que se debió trabajar con la purificación a partir de un gramo de tejido foliar. Mediante electroforesis en geles de agarosa se verificó que la integridad del ADN total fue superior en el material almacenado a -70°C para todos los métodos, además de que el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) tiende a enriquecer los ARN. Al cuantificar el ADN total se evidenció que para los métodos de Dellaporta *et al.* (1983) y Doyle y Doyle (1990) las lecturas fueron similares, y que se extrae al menos un 36% más de ADN a partir del material en el desecante con respecto al congelado. Sin embargo, al diluir los ácidos nucleicos totales y someterlos a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtiene una mayor sensibilidad con las muestras del material congelado, excepto para el método de Jose y Usha (2000). En el experimento de hibridación por “dot blot” los resultados fueron similares. Finalmente, la transferencia por “Southern blot” reveló que el ADN del virus mantiene mayor integridad cuando el tejido se almacena congelado y que el método de Jose y Usha (2000) no es efectivo en ayote, debido a que no fue posible detectar ADN íntegro, ni siquiera cuando el material se congeló.

## I. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

### A. Geminivirus en ayote

El ayote (*Cucurbita moschata* Duchesne L.) es uno de los cultivos de mayor relevancia en los países tropicales. En Costa Rica su importancia económica y social ha ascendido, se produce a mediana escala con fines de exportación, así como para el consumo interno. Se cosecha durante todo el año y no requiere de conocimientos complejos ni de grandes extensiones para su producción (<http://www.pima.go.cr>).

Desde el punto de vista fitopatológico, esta cucurbitácea es susceptible a diversas enfermedades, es hospedero de virus transmitidos por insectos, hongos y bacterias, que causan severas pérdidas en la producción e incrementan el uso de insumos agrícolas, con los consecuentes efectos detrimentales en el agroecosistema y por ende en la salud de los seres vivos. (Gutiérrez 2002).

Karkashian y colaboradores (2002) reportaron la presencia de un nuevo geminivirus del género begomovirus infectando cucurbitáceas (entre ellas ayote) y papaya (*Carica papaya*). Posteriormente, Mora-Umaña *et al.* (en prensa) informan sobre la amplia distribución de este virus en el territorio nacional e incluso se le ha detectado infectando frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Ramos-Reinoso 2004) y pipián (*Cucurbita argyrosperma*) en Nicaragua (Ala-Poikela *et al.* 2005).

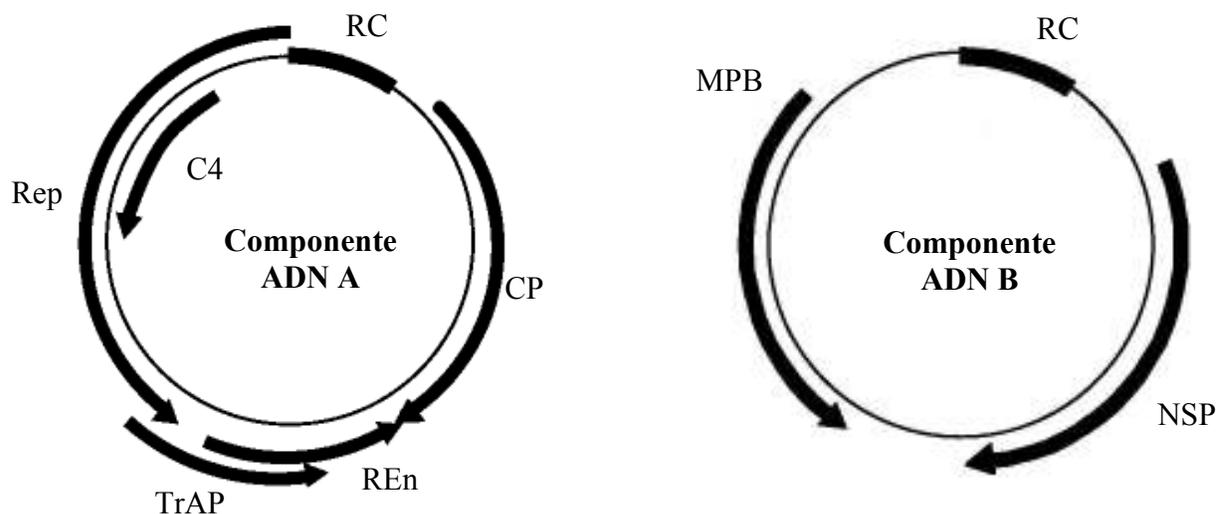
## B. Los Geminivirus y su variación genética

Los geminivirus constituyen un importante grupo de patógenos de plantas, caracterizados por una morfología inusual de la partícula viral y su ácido desoxirribonucleico (ADN). Poseen una cubierta icosaédrica pareada (Mumford 1974, Bock *et al.* 1974) y un pequeño genoma circular de ADN simple banda que se replica mediante ADN doble banda en el núcleo de la célula infectada de la planta (Goodman 1977a, b).

Los miembros de esta familia de virus, que desde 1978 se clasifican dentro de la familia *Geminiviridae* (Matthews 1979), se catalogan en cuatro géneros de acuerdo a su constitución genómica y características biológicas ([www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)). El género de los begomovirus incluye aquellos que son transmitidos por medio de la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) y que además son bipartitas (con algunas excepciones monopartitas), es decir, poseen dos componentes (denominados como A y B) del genoma e infectan plantas dicotiledóneas (Lazarowitz 1992).

La caracterización genómica de los geminivirus en general, se ha venido trabajando arduamente durante las últimas tres décadas debido a su importancia agroeconómica y al mejoramiento de técnicas de laboratorio (Gilbertson *et al.* 1991, Lazarowitz 1992), también porque el conocimiento de la diversidad permite diseñar estrategias de control. En los virus bipartitos (Fig. 1), se encuentran de modo general cuatro genes que codifican para proteínas involucradas en los

procesos de replicación (Rep), activación de la replicación (TrAP), eficiencia de la replicación (REn) y estructura de la cápside (CP), además de C4 (un encuadre abierto de lectura u ORF), esto para el componente A. En el componente B se encuentran los genes que codifican proteínas relacionadas con el movimiento de célula a célula (MPB) y del movimiento hacia afuera del núcleo (NSP). Los genes se encuentran en la secuencia viral (sentido de las agujas del reloj) o la complementaria (sentido contrario de las agujas del reloj). El genoma incluye una región común (RC), que es idéntica cuando los componentes pertenecen a la misma especie y dentro de la cual se encuentra la secuencia de reconocimiento para el inicio de la replicación. Por su parte, los virus monopartitas poseen seis ORF y codifican esencialmente proteínas para las mismas estructuras y funciones que los primeros (Gutiérrez 2002).



**Figura 1.** Organización genética de los *Begomovirus*, género que pertenece a la familia *Geminiviridae*. Las flechas indican la localización en el genoma de las secuencias codificantes y su dirección.

La fuente de la variación genética de los begomovirus aún no está muy clara, algunos investigadores sugieren mecanismos como las mutaciones, recombinación (Stenger y MacMahon 1997, Faria y Maxwell 1999, Garrido-Ramírez *et al.* 2000) y pseudo-recombinaciones (Stanley *et al.* 1985). Las mutaciones probablemente sean la causa principal de divergencias entre aislados virales (Noris *et al.* 1998, Harrison y Robinson 1999).

La mayoría de virus son grupos de genotipos de los cuales nuevas especies pueden emerger con potenciales cambios de patogenicidad y diferentes eficiencias de transmisión o ámbitos de hospederos; es por ello que es necesaria la identificación constante, ya que los nuevos virus deben ser combatidos con nuevas estrategias de manejo (Zhou *et al.* 1998). El conocimiento de la identidad y distribución de los begomovirus, utilizando técnicas moleculares, permite identificar aislamientos más agresivos, además que por inoculaciones controladas en variedades conocidas, se puede evaluar su resistencia (Pietersen y Smith 2002).

### **C. Extracción de ácidos nucleicos totales**

Debido a los rápidos avances en biología molecular durante la segunda mitad del siglo XX e inicio del siglo XXI, y a que la extracción y purificación del ácido nucleico es el primer paso en buena parte de los procedimientos en esta área (Ligozzi y Fontana 2003, Somma 2007), muchos investigadores se han

enfocado en el desarrollo y optimización de protocolos para obtener ADN (Csaikl *et al.* 1998, Drábková *et al.* 2002). La variedad de métodos de que se dispone actualmente, surge como respuesta al hecho de que no existe un método común de extracción para las células eucarióticas, sino que cada tipo de tejido requiere de un proceso y preparación particular (Aljanabi y Martínez 1997).

En general, para la extracción de ácidos nucleicos es necesario que haya lisis celular, seguido de la inactivación de nucleasas y finalmente la separación del material de interés de los restos celulares. La lisis celular se convierte en un dilema, pues debe ser rigurosa como para degradar el material inicial, pero a la vez suave de modo que no dañe el material genético.

Se debe considerar algunos criterios al momento de elegir un protocolo: a.- tipo de ácido nucleico que se desea aislar, b.- organismo que actúa como fuente del material genético, c.- tejido del que se obtendrá, d.- los resultados deseados (en términos de rendimiento, pureza y/o tiempo), y e.- las aplicaciones a las que será sometido el material posteriormente (Somma 2007).

Cuando se realiza una extracción de ácidos nucleicos se espera obtener como resultado, una buena calidad y cantidad del producto (Cheng *et al.* 2003); sería muy beneficioso si además permite manipular un alto número de muestras en poco tiempo y si el ADN puede almacenarse de forma estable durante largos periodos (Hill-Ambroz *et al.* 2002). La calidad del ADN está dada principalmente por la pureza y factibilidad del material para ser sometido a diferentes metodologías de análisis molecular, es por ello que muchos protocolos

representan formas diferentes para eliminar las sustancias contaminantes, entre éstas se incluyen compuestos que se encuentran de manera natural en la planta, pero que varían en tipo y cantidad de acuerdo al grupo taxonómico (Rogstad 2003) y también a las trazas de reactivos que se podrían incluir durante el procedimiento de extracción (Somma 2007).

Los métodos recomendados y utilizados para cumplir con los requisitos mencionados, son muy laboriosos (Stein *et al.* 2001), consumen mucho tiempo y en algunos casos no funcionan del modo deseado con todas las especies. Por lo anterior y debido a las exigencias de la época actual, en que los proyectos de investigación involucran el análisis de un gran número de muestras, es que se requiere de metodologías mucho más rápidas (Csaikl *et al.* 1998) y con procedimientos que prueben ser universales (Aljanabi y Martínez 1997).

#### **D. Principales Problemas para la Extracción de Ácidos Nucleicos**

Probablemente el principal problema al extraer ácidos nucleicos de material vegetal consiste en la presencia de compuestos secundarios, esencialmente de polifenoles y polisacáridos en la planta. Este ha sido un reto para los investigadores desde hace muchos años, debido a que posee dos componentes: a.- presencia de sustancias que hace difícil el intento de extracción del material genético (Csaikl *et al.* 1998) y b.- en presencia de trazas de los compuestos utilizados para la extracción, se inhiben muchas aplicaciones moleculares

posteriores basadas en el uso de enzimas (Saha *et al.* 1997, Cheng *et al.* 2003, Rogstad 2003).

Se ha generado una especie de círculo vicioso en que se desarrollan nuevos métodos para eliminar los restos celulares, pero que a la vez pueden dejar residuos de las sustancias que se emplean e inhibir reacciones posteriores de interés (Somma 2007). Existe gran variedad de procedimientos para aislar ácidos nucleicos que son dependientes de la especie con la que se desee trabajar y las pruebas que se espera realizar.

#### **E. Protocolos de Extracción de ADN Geminiviral**

Es muy común que para realizar análisis moleculares de virus infectando plantas, se empleen procedimientos de extracción de ácidos nucleicos totales a partir del material vegetal. Entre los métodos más ampliamente utilizados por su rapidez, buen rendimiento y pureza de los ácidos nucleicos totales (ANT) (Huang *et al.* 2000), se puede mencionar el desarrollado por Doyle y Doyle (1990) que utiliza el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), un detergente que es particularmente útil para eliminar polisacáridos y compuestos polifenólicos que de otra manera afectarían la pureza y por ende la calidad del ADN (Somma 2007).

Buena parte de la investigación molecular que se ha realizado en begomovirus en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Virus del CIBCM-UCR se hizo empleando el protocolo de Dellaporta y colaboradores

(1983), que comparado con el método descrito anteriormente, es más rápido. Sin embargo, se debe ser muy cauteloso al trabajar con los ácidos nucleicos extraídos, ya que se ha sugerido que el ADN que se obtiene no es de calidad óptima (Csaikl *et al.* 1998, Jose y Usha 2000).

Además de los trabajos mencionados, recientemente José y Usha (2000) combinan el uso del citrato como detergente, con la lisis alcalina publicada por Birnboim y Dolly (1979) para la extracción de plásmidos. Con esto concluyen que el protocolo descrito es útil para obtener ADN viral de buena calidad, a partir de tejido foliar de especies mucilaginosas.

## II. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los geminivirus se han esparcido por el mundo entero durante las pasadas tres décadas causando enfermedades severas en diferentes cultivos (Rojas *et al.* 2005), lo que finalmente se traduce en elevados costos de producción debido a la necesidad de insumos agrícolas para tratar y/o controlar la enfermedad.

La variación genética presente en estos organismos da una idea de su rápida evolución; determinada por presiones de selección diferenciadas según el área geográfica (Harrison y Robinson 1999). Por lo tanto, debemos ser capaces de caracterizar los virus a los que nos enfrentamos en poco tiempo y con mucha certeza, que nos permita tomar medidas eficaces para la erradicación del patógeno de acuerdo al contexto en que se encuentra y optimizar también el uso de recursos monetarios mediante la selección de métodos que provean los mejores resultados.

Con la utilización de técnicas moleculares se puede diagnosticar presencia y a la vez caracterizar al patógeno, para lo cual se requiere de ANT de excelente calidad, ello con el objetivo fundamental de diseñar estrategias de manejo. Los protocolos que se utilizan actualmente fueron diseñados para extraer la totalidad del genoma de la planta de interés, por lo tanto se hace necesario evaluar cuál método es más eficiente en la extracción de ácidos nucleicos virales en un grupo particular de plantas.

### III. OBJETIVO GENERAL

Comparar mediante técnicas moleculares la extracción y posterior purificación de ADN en ayote, a partir de diferentes modos de almacenamiento y protocolos de extracción de ácidos nucleicos totales, para mejorar la calidad y cantidad del material genético con que se realiza la detección y caracterización de geminivirus en el Laboratorio 6 del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.

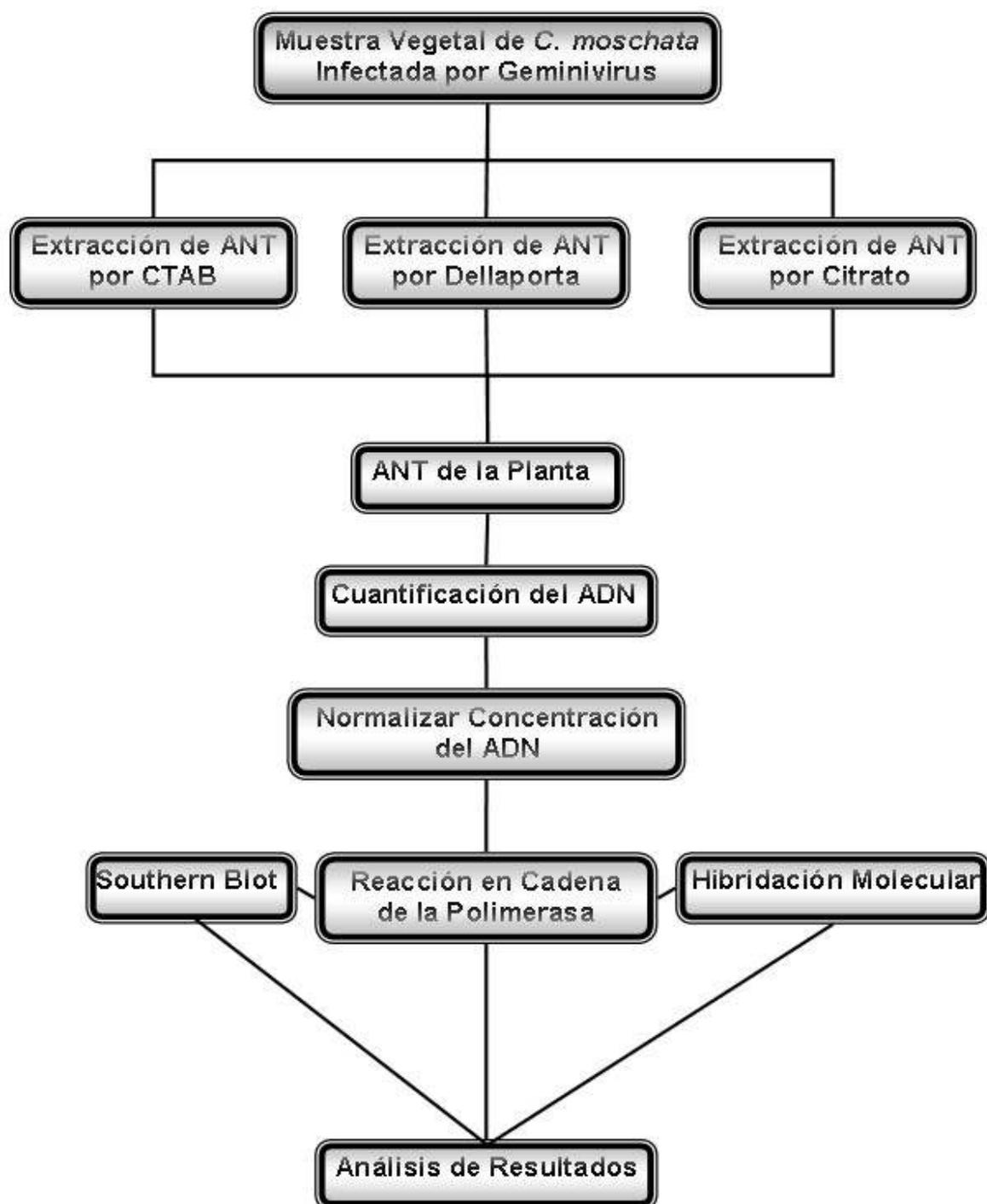
### IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los ácidos nucleicos totales de tejido vegetal de ayote almacenado en sílica gel y congelado a  $-70$  grados Celsius, implementando tres protocolos diferentes.
2. Cuantificar los ácidos nucleicos extraídos por medio de fluorometría.
3. Evaluar la calidad de los productos mediante a) el análisis electroforético, b) pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e c) hibridación molecular por “dot blot” y “Southern blot” a los ácidos nucleicos obtenidos por los diferentes métodos.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Descripción de la estrategia metodológica

Se colectó una única muestra de una planta de ayote infectada con geminivirus en San Jerónimo de Naranjo, el material se dividió en dos: la primera se almacenó congelada y la segunda se deshidrató con un desecante. Se realizó la extracción de ANT (Fig. 2) utilizando tres diferentes protocolos: 1) Dellaporta y colaboradores (1983), 2) un método que utiliza CTAB (Doyle y Doyle 1990) y 3) el protocolo con citrato reportado por Jose y Usha (2000), que fue desarrollado para aplicaciones con ADN de geminivirus. Se evaluó la viabilidad de los tres métodos escalados hacia abajo (15 miligramos de tejido foliar en lugar de un gramo, de modo que todo el procedimiento se pudiera realizar en tubos para microcentrífuga de 1,5 ml) y en dos modos de almacenamiento: en tubos con sílica gel (SG) (Fermentas, Hanover, MD) y congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se diseñó un número variable de repeticiones para cada método de extracción y forma de almacenamiento, se dispuso de al menos tres y no más de cinco (excepto con el método de citrato cuando se extrajo a partir de un gramo de material). La totalidad de los experimentos se realizó por duplicado (réplicas 1 y 2).



**Figura 2.** Diagrama de flujo de los protocolos de extracción de ácidos nucleicos y su análisis posterior. La totalidad de la estrategia se realizó por duplicado (dos réplicas del experimento).

La cantidad de ADN que resultó a partir de cada uno de los métodos se cuantificó mediante fluorimetría, posteriormente se normalizó la concentración de los mismos y además se analizó la calidad e integridad de los ANT con electroforesis en geles de agarosa, la PCR de un segmento corto y otro largo del genoma del virus, hibridación molecular por “dot blot” y finalmente hibridación por “Southern blot”. Este trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

## **B. Extracción de ácidos nucleicos**

B.1. Extracción de ANT por el método de Dellaporta *et al.* (1983) modificado (Maxwell D.P.)

1. Tomar 15 mg de material vegetal y colocar en un tubo para microcentrífuga de 1,5 ml que contenga 500  $\mu$ l de solución tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl y 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). Macerar bien con un pistilo.
2. Agregar 33  $\mu$ l de SDS al 20% e invertir el tubo. Incubar a 65°C por 10 minutos.
3. Agregar 160  $\mu$ l de acetato de potasio 5 M, agitar con vórtex y centrifugar por 10 minutos a 12000 x g. Transferir el sobrenadante a otro tubo para microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

4. Agregar 500  $\mu$ l de PCI (Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico, en la proporción de 25:24:1), mezclar y centrifugar por 8 minutos a 12000 x *g*. Tomar la fase acuosa y transferirla a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml limpio.
5. Añadir un volumen de isopropanol. Mezclar bien volteando el tubo y centrifugar por 10 minutos a 12000 x *g*.
6. Aspirar el sobrenadante y añadir 500  $\mu$ l de etanol al 70%. Dejar reposar por dos minutos. Aspirar el sobrenadante con la pipeta y dejar secar el precipitado al aire por 10 minutos.
7. Resuspender el precipitado en 50  $\mu$ l de agua bidestilada estéril y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

B.2. Extracción de ANT por el método de Doyle y Doyle (1990) modificado (Villalobos H.M. y F.J. Albertazzi) y algunas modificaciones extra.

1. Precalentar 0.5 ml de solución tampón de extracción CTAB (2% m/v CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) en baño maría a  $65^{\circ}\text{C}$ .
2. Macerar 15 mg de tejido en la solución tampón de extracción precalentada.
3. Incubar la muestra por 30 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$  con mezclas suaves ocasionales (opcional).

4. Extraer una vez con Cloroformo-Alcohol Isoamílico (CI 24:1; v/v), mezclar con suavidad pero completamente.
5. Centrifugar a 7700 x g por 20 minutos a temperatura ambiente para separar las fases.
6. Remover la fase acuosa y transferirla a un tubo limpio, agregar 2/3 de volumen de isopropanol frío y mezclar suavemente para precipitar los ácidos nucleicos. Dejar reposar por 30 minutos.
7. Centrifugar a 1000 x g por 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Descartar el sobrenadante y agregar 500 µl de la solución tampón de lavado (76% v/v etanol, 10 mM acetato de amonio). Lavar por un mínimo de 20 minutos.
9. Centrifugar a 7700 x g por 10 minutos.
10. Descartar cuidadosamente el sobrenadante, dejar secar el botón al aire a temperatura ambiente.
11. Resuspender el botón en 50 µl de agua desionizada estéril.

### B.3. Extracción de ADN por el método de Jose y Usha (2000)

1. Colectar y macerar un gramo de tejido vegetal (hoja) en 6 ml de solución tampón de extracción (100 mM citrato de sodio pH 6.0, conteniendo β-mercaptoetanol 50 µl/10 ml). Macerar bien usando un mortero y pistilo.
2. Agregar 2 ml de CI (24:1) y mezclar vigorosamente para formar una emulsión.

3. Transferir a un tubo de centrifuga y luego centrifugar a 15000 x g por 15 minutos a 4°C.
4. Transferir la fase superior acuosa a un beaker que contenga NaCl y PEG 6000 (para una concentración final de 0.2 M y 7% respectivamente). Revolver por 3 horas a 4°C usando pastilla magnética.
5. Decantar el mucílago y transferir a un tubo de polipropileno. Centrifugar a 18000 x g por 25 minutos a 4°C.
6. Drenar el sobrenadante y dejar secar el precipitado para evitar cualquier traza de PEG. Tomar el precipitado y disolverlo en 600 µl de solución tampón de citrato 0.1 M pH 6.0 que no contenga β-mercaptoetanol. Centrifugar brevemente a 1100 x g para remover materiales insolubles.
7. Dividir la parte superior igualmente en tres tubos para centrifuga y agregar 400 µl de solución SDS 1% y NaOH 0.2 M fresca a cada uno, mezclar suavemente y mantener en hielo por 15 minutos.
8. Agregar 300 µl de acetato de sodio 3M (pH 5.2) a cada tubo, mezclar suavemente y mantener en hielo por 30 minutos.
9. Centrifugar a 10000 x g por 10 minutos a 4°C.
10. Agregar 2.5 volúmenes de alcohol absoluto al sobrenadante, mezclar por inversión y refrigerar a -20°C por 2 horas.
11. Centrifugar a 12000 x g por 10 minutos a 4°C para precipitar los ácidos nucleicos.

12. Retirar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol 70%. Aspirar los restos del líquido y resuspender el precipitado en 20  $\mu$ l de agua. Transferir la fase acuosa (60  $\mu$ l) a un tubo nuevo de microcentrífuga y agregar un volumen y medio de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 volúmenes de alcohol absoluto, mezclar y dejar toda la noche a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
13. Centrifugar a 12000 x g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Aspirar el sobrenadante y lavar el botón con etanol 70% frío. Secar el botón, resuspender inmediatamente en 15  $\mu$ l de agua.

### **C. Análisis electroforético de los ácidos nucleicos totales**

La integridad de los ANT extraídos se evaluó cargando 3  $\mu$ l en un gel de agarosa al 1% con solución tampón de corrida TAE 1X durante 45 minutos y se tiñó con bromuro de etidio (BrEt) a la concentración de 1 mg/ml.

### **D. Cuantificación del ADN**

La cantidad de ADN en las extracciones de ANT de los diferentes métodos y modos de almacenamiento se cuantificó mediante fluorimetría (Quantech™ Fluorometer, Barnstead International). Para cada método de extracción y modo de almacenamiento se procesó simultáneamente un número variable de muestras

(repeticiones) y se tomaron varias lecturas con el fluorómetro, razón por la cual se analizaron los datos con un análisis de varianza (ANDEVA) de parcelas divididas desbalanceado, éste requiere de una corrección mediante un modelo lineal de efectos mixtos (Crawley 2007). Lo anterior se analizó con el programa R versión 2.7.1 (2008-06-23).

### **E. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Cada mezcla de reacción se preparó en un tubo de 0.2 ml con 2.5  $\mu$ l de solución tampón para *Taq* polimerasa 10X, 2.5  $\mu$ l de cloruro de magnesio 25 mM, 2.5  $\mu$ l de dNTP's 2.5 mM, 0.1  $\mu$ l de enzima *Taq* polimerasa (5 U/ $\mu$ l) (Fermentas, Hanover, MD), 0.5  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores 10  $\mu$ M (seleccionados para amplificar una región específica), 1  $\mu$ l del ADN molde y 15.4  $\mu$ l de agua, para un volumen total de 25  $\mu$ l por reacción. Luego se amplificó utilizando un termociclador programable (PTC-100™, MJ Research, Inc.). Los iniciadores utilizados amplifican la secuencia que corresponde al núcleo del gen *cp*, que codifica la proteína que forma la cápside proteica del virus (PAV494-PAC1048) (Wyatt y Brown 1996) (aproximadamente 550 pares de bases: pb); y la parte superior del genoma A (PARc715-PAL1v1978) (aproximadamente 1400 pb) (Rojas *et al.* 1993).

La amplificación se produce durante 30 ciclos repetitivos, en cada uno de los cuales ocurre:

- La desnaturalización del ADN (95°C)
- El alineamiento de los iniciadores (55°C)
- Extensión del iniciador (72°C)

Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% con solución tampón TAE de corrida por 35 minutos y tinción con BrEt a 1 mg/ml.

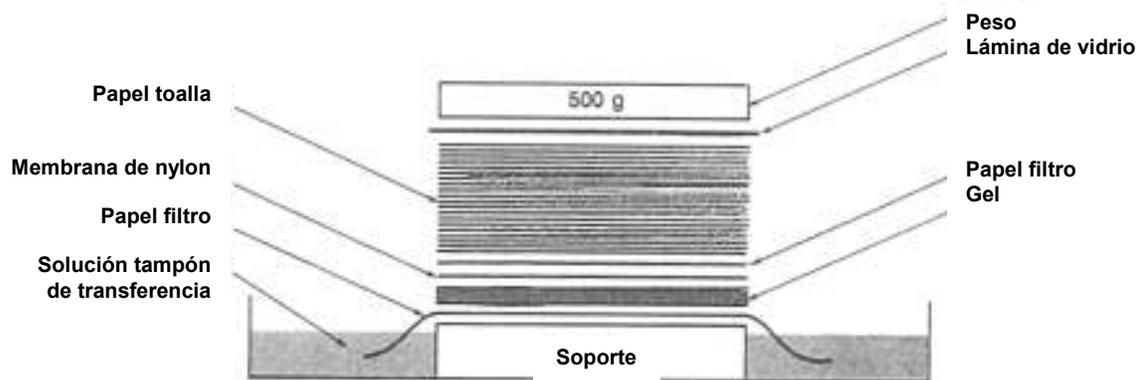
#### **F. Hibridación Molecular por “dot blot”**

Se realizó mediante el sistema de hibridación no radioactivo Alk Phos Direct Labelling and Detection System with CDP-*Star* (Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare UK). Se colocaron 3 µl de ANT que se extrajo en una membrana de nylon tipo A (Pall Corporation, Glen Cove, NY), a la cual se fija el material genético mediante radiación con luz ultravioleta (50 mJoules) (GS Gene Linker® UV Chamber, BIO-RAD). La sonda con que se hibridó corresponde a una secuencia muy conservada en el extremo 3' del gen que codifica la proteína CP del virus del mosaico dorado del frijol (BGYMV-[GT]), amplificado por PCR con los iniciadores específicos PBGGTv647 y PBGGTc1048 (400 pb)(Potter *et al.* 2003) y que fue marcado con la enzima fosfatasa alcalina. Se hibridó toda la noche a 55°C.

La sonda que no híbrido fue removida mediante lavados (siguiendo las recomendaciones del fabricante), la que sí lo hizo, fue detectada mediante quimioluminiscencia. Este paso utiliza el reactivo CDP-Star™, el cual contiene el sustrato de la fosfatasa alcalina y que al reaccionar produce la emisión de fotones en poco tiempo, que se puede capturar como una autoradiografía.

### **G. Análisis por “Southern blot”**

Esta prueba se realizó mediante transferencia por capilaridad de ADN a membranas de nylon en condiciones alcalinas, descrito por Sambrook y colaboradores (1989). La electroforesis se realizó cargando 15 ul de ANT a 300 ng/ul en gel de agarosa al 1%, solución tampón de TAE, a 90 V durante 40 minutos. Luego de la electroforesis, se desnaturalizaron los ácidos nucleicos en una solución de NaOH (0.4 N) / NaCl (1 M) en agitación leve. Simultáneamente, la membrana de nylon fue humedecida en agua desionizada y luego inmersa en esta misma solución. Para transferir el ADN, se utilizó el sistema que se observa en la Fig. 3. Se dejó toda la noche, y luego la membrana se lavó con una solución 0.5 M Tris-HCl (pH 7.2) y NaCl 1 M, se sacó y dejó secar al aire, finalmente los ácidos nucleicos unidos a la membrana se fijaron con luz ultravioleta (150mJoules). Posterior a ello, se utilizó la metodología descrita para hibridación molecular por “dot blot”.



**Figura 3.** Muestra del sistema utilizado para realizar la transferencia de ácidos nucleicos a la membrana de nylon (Tomado de Sambrook et al. 1989).

## VI. RESULTADOS

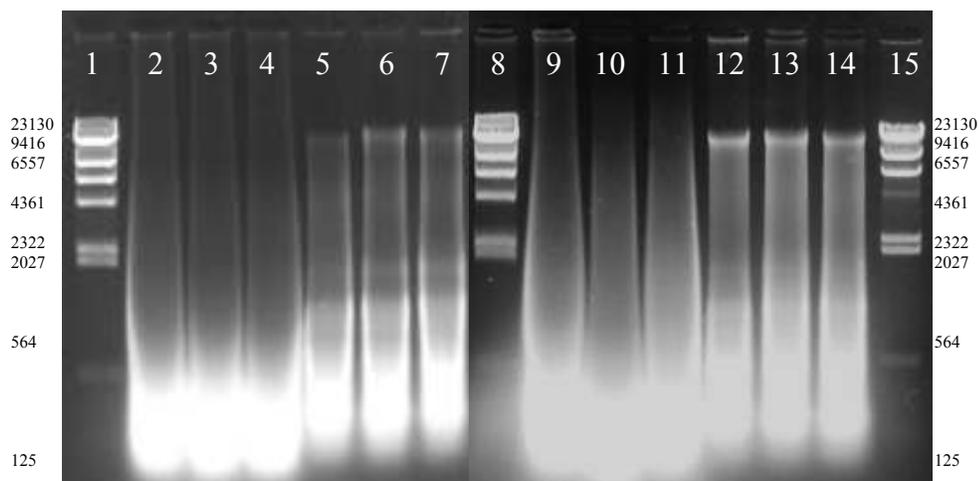
### **A. Extracción de ácidos nucleicos**

La primer réplica del experimento se realizó utilizando 15 mg de tejido foliar almacenado en SG y congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La observación principal resultante, fue la dificultad que presentó el método del citrato para ser escalado hacia abajo, pues obligó a trabajar con volúmenes difíciles de pipetear e insuficientes para someterlo a todas las pruebas que fueron planeadas. Por lo tanto, para los métodos de Dellaporta y CTAB siempre se realizó la extracción de ANT a partir de los 15 mg, para el método del citrato se hizo la extracción en la primera réplica a partir de 15 mg y en la segunda de un 1 g. A pesar de este ajuste, la cantidad de ANT resultante de la extracción de tejido almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  fue baja, y no permitió el análisis electroforético para este método.

### **B. Análisis electroforético de los ácidos nucleicos totales**

Tanto para el método Dellaporta como para el CTAB se hizo evidente que la integridad del ADN fue superior cuando el material se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  comparado con SG. La principal diferencia que se observó fue que el método de

Dellaporta enriquece los ARN en la planta (Fig. 4) al compararse con el de CTAB, esto aplica independientemente del modo de almacenamiento.



**Figura 4.** Análisis electroforético en gel de agarosa 1% de los ANT resultantes por los métodos de CTAB y Dellaporta, teñido con BrEt a 1 mg/ml. Los carriles 2 a 7 contienen las extracciones por el método CTAB almacenado en SG (2, 3 y 4) y congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  (5, 6 y 7). A la derecha, en los carriles 9 a 14 se cargó los del método Dellaporta almacenado en SG (9, 10 y 11) y congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  (12, 13 y 14). Los carriles 1, 8 y 15 corresponden al marcador de peso molecular (MPM): fago lambda digerido con enzima *Hind III*. Se muestran los tamaños de banda del MPM en los extremos de la figura.

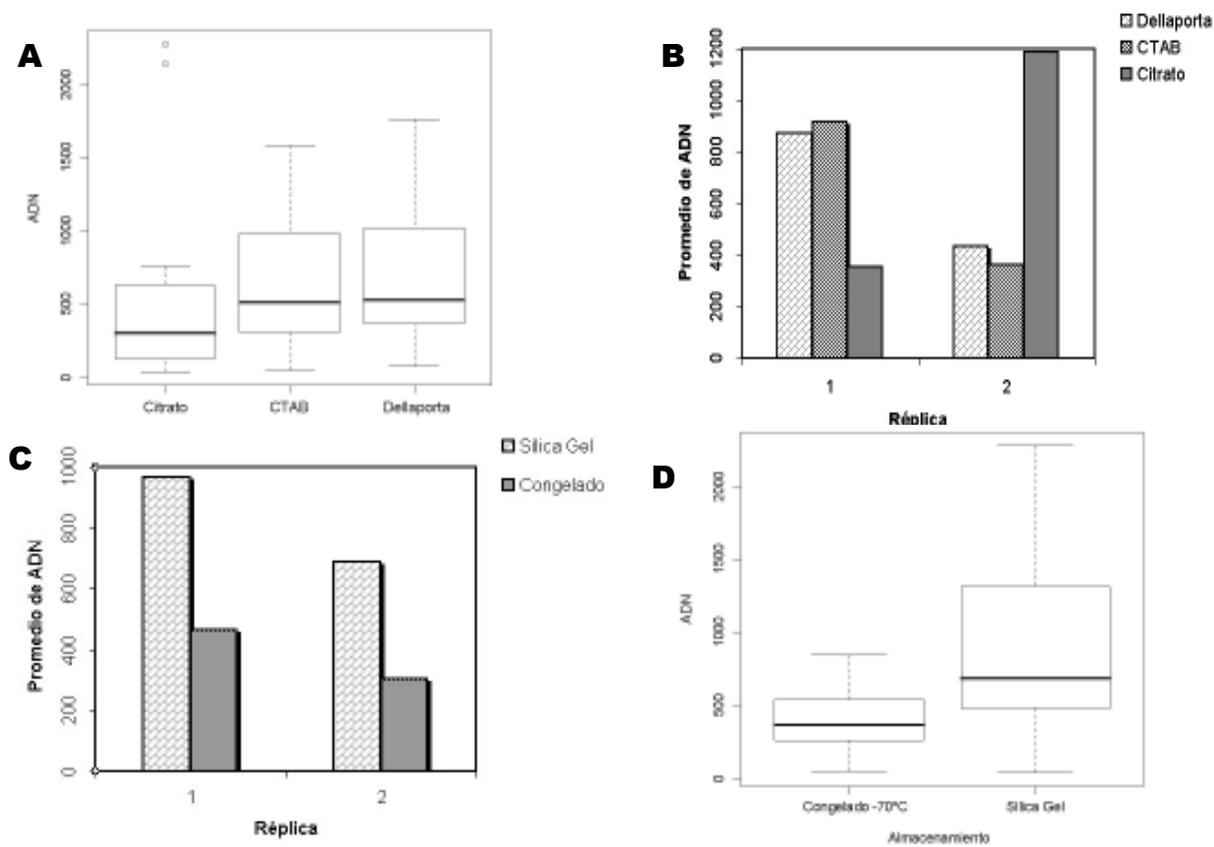
### C. Cuantificación de ADN

Ésta se hizo por fluorometría, del análisis de los datos se observa que la mediana en la cantidad de ADN de los protocolos de Dellaporta y CTAB es muy similar entre ellas, ligeramente mayor a los  $500\text{ ng}/\mu\text{l}$ , y son superiores en  $\sim 200\text{ ng}/\mu\text{l}$  a la mediana que se obtuvo para el citrato (Fig. 5A). El promedio de la cantidad de ADN en la primera réplica del protocolo de citrato es inferior al de los otros métodos y su desviación estándar muy alta (cuando se extrajo a partir de material almacenado en SG), razón por la cual se decidió no escalar este

protocolo y trabajar a partir de un gramo de tejido foliar en la segunda réplica, lo que produjo un incremento drástico en el promedio (principalmente por el aporte de las lecturas en las extracciones de material almacenado en SG –puntos fuera del límite de confianza en Fig. A-) (Fig. 5A, B).

Independientemente de la réplica, la cantidad de ADN que se obtuvo a partir de las extracciones de material almacenado en SG fue superior a la que se obtuvo de material a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Fig. 5C, D). Para la segunda réplica los datos fueron mucho menos dispersos (esta información no se muestra), e incluyen la lectura del método del citrato a partir de un gramo de tejido vegetal congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Las diferencias en la cantidad de ADN que se obtiene por los métodos de extracción y en los dos modos de almacenamiento son significativas, para cada uno de ellos como factor individual, como para su interacción (Cuadro 1). La aparición de la réplica (muestras que se extrajeron con el mismo método y modo de almacenamiento a la vez) y la repetición (lecturas al fluorómetro de la misma muestra) como otros factores significativos, son indicativos de que se trabajó con una enorme variabilidad de los datos.



**Figura 5.** Distribución de medianas y promedios obtenidos de la cuantificación de ADN por fluorometría. **(A)** Mediana (línea horizontal) y distribución de los datos por percentiles (cajas) de la cantidad de ADN según el método de extracción, se muestra además el valor máximo y mínimo (líneas punteadas). **(B)** Promedio de ADN por método de extracción para las dos réplicas del experimento. **(C)** Promedio de ADN por modo de almacenamiento para las dos réplicas del experimento. **(D)** Mediana y distribución de los datos por percentiles según el modo de almacenamiento, se muestra además el valor máximo y mínimo.

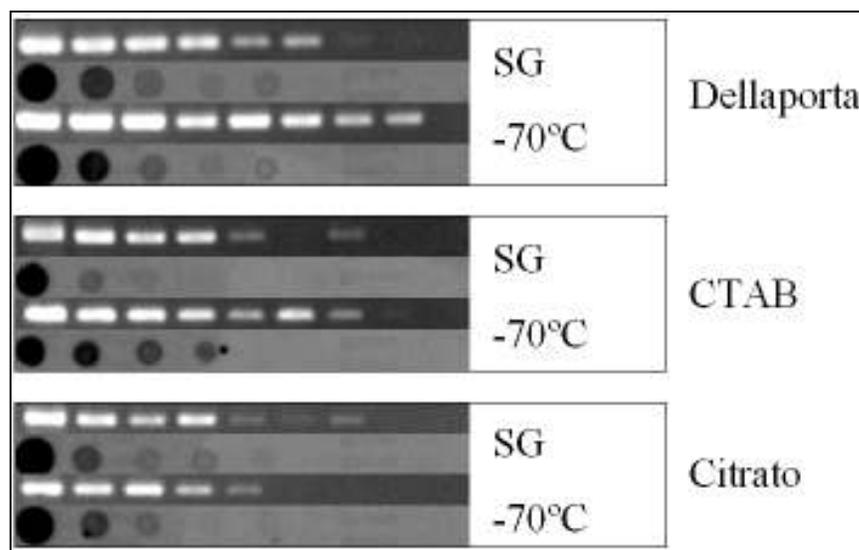
**Cuadro 1.** Valores de probabilidad ( $p$ ) generados por el ANDEVA corregido, en el cual se resaltan (negrita) los valores significativos para cada factor e interacción entre ellos.

	numDF	denDF	Valor de F	Valor de $p$
(Intercept)	1	72	1449.1394	<.0001
Almacenamiento	1	1	207.6135	<b>0.0441</b>
Método	2	4	15.3442	<b>0.0133</b>
Réplica	1	21	65.2627	<.0001
Repetición	1	72	7.1795	<b>0.0091</b>
Almacenamiento:Método	2	4	15.9720	<b>0.0124</b>
Almacenamiento:Réplica	1	21	8.9449	<b>0.0070</b>
Método:Réplica	2	21	95.1907	<.0001
Almacenamiento:Repetición	1	72	0.2379	0.6272
Método:Repetición	2	72	8.6517	<b>0.0004</b>
Réplica:Repetición	1	72	1.6194	0.2073
Almacenamiento:Método:Réplica	2	21	86.3258	<.0001

#### D. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

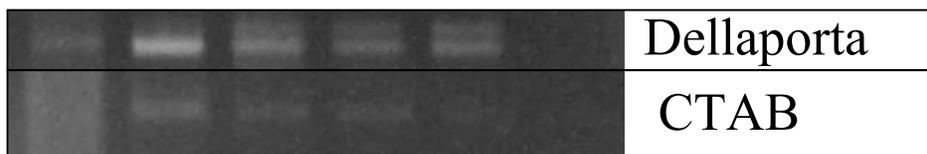
Todos los protocolos de extracción de ANT utilizados en este trabajo y los modos de almacenamiento mostraron ser aptos para PCR cuando se utilizaron los iniciadores del gen *cp*, que amplifican un fragmento corto (aproximadamente 550 pb). Luego de haber cuantificado el ADN de las muestras se normalizó la concentración a 300 ng/ $\mu$ l y a partir de ésta se prepararon diluciones a 30, 12, 6, 3, 1.2, 0.6 y 0.3 ng/ $\mu$ l. De este modo se evaluó la sensibilidad de cada método y modo de almacenamiento cuando se someten a PCR. La sensibilidad mínima se detectó cuando se extrajo de material a -70°C por el método del citrato (3 ng/ $\mu$ l), y la máxima se alcanzó para este mismo modo de almacenamiento pero utilizando el método Dellaporta (0.3 ng/ $\mu$ l). Para este último método y el CTAB, se aprecian

bandas más intensas y definidas cuando se trabaja con los ANT a partir de material a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Fig. 6).



**Figura 6.** Resumen de los resultados obtenidos por PCR utilizando los iniciadores para CP e hibridación por "dot blot". De izquierda a derecha la concentración varía de 300, 30, 12, 6, 3, 1.2, 0.6 y 0.3 ng/μl de ANT utilizados en los experimentos. Para el experimento de hibridación se utilizó 3 μl de ANT a la concentración mencionada. Como sonda se utilizó el extremo 3' del gen *cp* del BGYMV-[GT].

En el caso en que se utilizaron los iniciadores para la parte superior del genoma A del virus, únicamente amplificaron las muestras que provenían de los métodos de Dellaporta y CTAB almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La concentración más baja a la que funcionó el experimento fue de 3 ng/μl en ambos casos, las bandas fueron más intensas cuando los ANT se extrajeron con el protocolo de Dellaporta (Fig. 7).



**Figura 7.** PCR utilizando los iniciadores para la parte superior del genoma A. De izquierda a derecha la concentración varía de 300, 30, 12, 6 y 3 ng/μl.

### E. Hibridación por “dot blot”

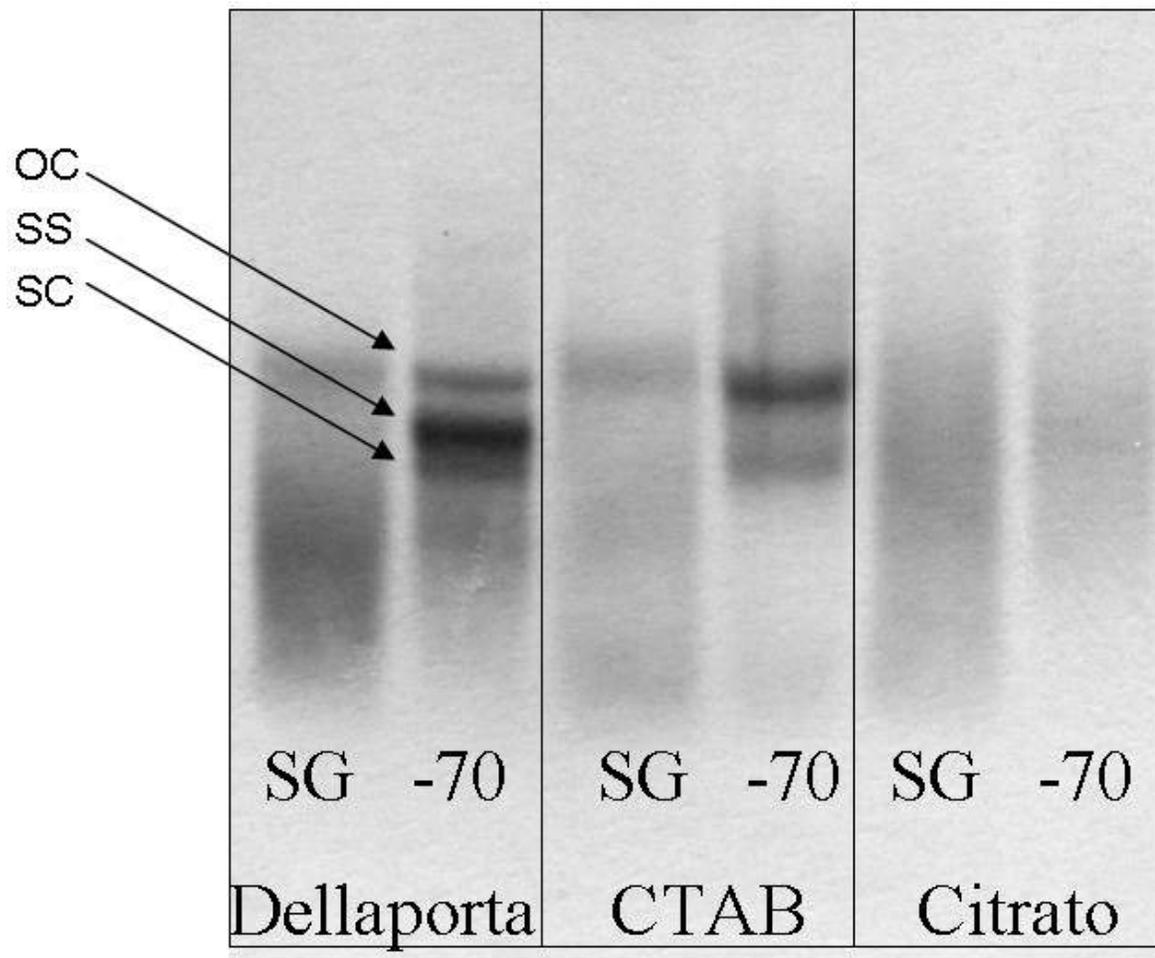
Los resultados en este caso son consistentes con los que se obtuvieron para la prueba de PCR con iniciadores para el gen *cp* (Fig. 6). Se presenta la mayor sensibilidad (3 ng/μl) con el método de Dellaporta en los dos modos de almacenamiento, la misma que mostró el protocolo del citrato pero ligeramente menos clara. El procedimiento que mostró mayor limitación fue el CTAB, que tuvo su mayor sensibilidad con 6 ng/μl cuando se almacenó congelado a -70°C y a 12 ng/μl en SG.

De nuevo el Dellaporta mostró los mejores resultados (Fig. 6), independientemente del modo de almacenamiento. Mientras que el método CTAB fue más efectivo cuando se utilizó de material congelado a -70°C, el del citrato lo fue (levemente) con el almacenado en SG.

## F. Hibridación por “Southern blot”

La electroforesis en gel de agarosa permite dar una idea general de la integridad de los ANT, mediante esta prueba se puede ser mucho más específico y evaluar el estado del ADN del virus. La observación inicial reafirma que cuando se extrae de material congelado, se obtiene mayor integridad del ADN (Fig. 8). La degradación del material genético cuando se utiliza el protocolo del citrato es contrastante con respecto a los otros métodos.

Este tipo de hibridación permite apreciar las isoformas del genoma viral (Fig. 8): en la parte superior el ADNdb circular abierto (OC), el ADNsb (SS) en la parte media y en la parte inferior el ADNdb superenrollado (SC) (Azzam *et al.* 1994). Es debido al enriquecimiento de una u otra de estas isoformas que se hace difícil señalar entre los métodos de Dellaporta y CTAB al idóneo para la obtención de ADN geminiviral íntegro.



**Figura 8.** Hibridación por "Southern blot" de los ANT que se obtuvo de los tres métodos de extracción y los dos diferentes modos de almacenamiento. Las flechas señalan las isoformas del genoma viral: en la parte superior el ADNdb circular abierto (OC), el ADNsb (SS) en la parte media y en la parte inferior el ADNdb superenrollado (SC). Como sonda se utilizó el extremo 3' del gen *cp* del BGYMV-[GT].

## VII. DISCUSIÓN

Por practicidad y para hacer buen uso del material vegetal valioso es preferible trabajar con unos pocos miligramos de tejido foliar. El método de extracción de ANT de Jose y Usha (2000) se torna complicado al escalar hacia abajo y se obtienen rendimientos muy bajos, por lo que se dispone de poco material genético con que trabajar, si se desea hacer varias pruebas moleculares.

La degradación de los ácidos nucleicos de material desecado está relacionada con el tiempo que se dure en secar la muestra (Drábková *et al.* 2002). En este caso, entre los factores que podrían afectar la calidad de los ANT al tomar y procesar el tejido foliar se pueden mencionar: el tiempo transcurrido entre la toma de este en el campo y el momento en que la muestra se pone en tubos con SG, muestras tomadas a campo abierto en un día lluvioso, la proporción de tejido foliar que se coloca en el tubo con respecto a la cantidad de SG y no cerrarlo herméticamente o no dar el mantenimiento requerido (cambiar el desecante cuando se haya hidratado). Además, según Taylor y Swann (1994) es preferible secar con aire que hacer uso de agentes desecantes para preservar el material.

El enriquecimiento de los ARN que se observa en las extracciones con el método Dellaporta podría estar relacionado con la alta velocidad a la que se centrifuga, especialmente en la etapa de precipitación de los ANT con isopropanol.

Al cuantificar el ADN por espectrofotometría cuando no se han realizado tratamientos con RNasa es muy probable que se produzca una sobreestimación, como lo reporta Csailk *et al.* (1998) y Drábková *et al.* (2002), además los residuos de detergente CTAB y metabolitos secundarios de la planta inducen este error. Por esta razón se decidió realizar la cuantificación por fluorometría para comparar las metodologías, también porque Jose y Usha (2000) aislaron una cantidad pequeña de ANT (1.12  $\mu\text{g}$  a partir de un gramo de muestra) y esta ha sido considerada otra limitante del procedimiento espectrofotométrico.

El principio utilizado en la lisis alcalina (Birnboim y Dolly 1979) permite la separación de ADN, proteínas y ARN de alto peso molecular, de ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc), lo que explica el motivo por el cual las extracciones con el protocolo del citrato son las que dan un menor rendimiento (Fig. 5A, B). Por su parte, los métodos de Dellaporta y CTAB fueron diseñados para el aislamiento de ANT, con especial interés en el ADN genómico de la planta. El aumento abrupto en la cantidad de ANT de una réplica general a otra con el protocolo de citrato, es debido al efecto que tuvo el pasar de extracciones a partir de 15 mg a una de un gramo.

Cuando se mide la masa del material almacenado en SG, se trabaja con peso seco, a diferencia del congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Sin la contribución a la masa que hace el agua, para alcanzar un peso deseado, se haría necesario incluir un mayor número de células; por lo tanto, habría disponible una mayor cantidad de ANT para aislar (Fig. 5C, D). La variabilidad de las lecturas podría deberse a la alta

sensibilidad de la técnica de cuantificación, que permite detectar cambios de un pipeteo a otro, por presencia de tejido vascular en la muestra, eficiencia del proceso de maceración y obviamente las variables con que se trabajó, en especial el método y modo de almacenamiento (Fig. 5A, B, C y D).

El método de Dellaporta ha sido utilizado por el grupo de trabajo del Laboratorio 6 del CIBCM-UCR desde hace varios años, aunque la literatura no siempre le favorece (Drábková *et al.* 2002, Ndunguru *et al.* 2005, Shepherd *et al.* 2008), en este caso particular mostró ser el protocolo más efectivo para la detección de geminivirus en ayote. Aunque el método de CTAB arroja resultados similares, el procedimiento requiere de más tiempo y tal como se presentó en este trabajo, hace dificultoso el proceso de la maceración de la muestra. Este paso es determinante para muchos autores (Drábková *et al.* 2002), por lo que en nuestro contexto se hace poco funcional. Contrario a lo que se esperaba, el protocolo de citrato expuso las mismas bondades que los otros dos métodos y en algunos casos menos. Si se toma en consideración que es el procedimiento más laborioso y que no se puede escalar hacia abajo, definitivamente se excluiría al momento de tomar una decisión en el laboratorio.

Al someter los ANT a experimentos de PCR se evidenció que hay mayor probabilidad de que se pueda amplificar segmentos de ADN cortos (Scott y Playford 1996, Saha *et al.* 1997, Huang *et al.* 2000), a diferencia de otros más largos. Esto es un efecto de la integridad del ADN, pues como se comprobó en

esta investigación, la banda de 1400 pb si amplificó en las extracciones provenientes de material congelado, que son las más íntegras (Fig. 4, Fig. 8).

El resultado se repite en los experimentos de hibridación, el “dot blot” permite una buena sensibilidad de detección para los tres métodos, ya que la sonda utilizada corresponde a una secuencia corta (~400 pb) y conservada. Al comparar estos resultados con los obtenidos para la hibridación por “Southern blot”, se concluye que el protocolo del citrato no ofrece ventaja alguna.

Recientemente se han realizado algunas investigaciones que involucran una nueva tecnología (Ndunguru *et al.* 2005, Shepherd *et al.* 2008), la cual proporciona ventajas respecto a almacenamiento, tiempo de toma de muestras y extracción de ANT, y adaptabilidad para varias aplicaciones moleculares.

En conclusión, a pesar de que se obtiene mayor cantidad de ANT de las extracciones almacenadas en SG, el material genético muestra poca integridad y esto lo hace apto exclusivamente para detección de geminivirus utilizando la técnica de PCR con iniciadores que amplifiquen un segmento corto o hibridación molecular con sondas cortas (400 pb). Las muestras almacenadas a -70°C son idóneas para estas pruebas y otras más sensibles. El método de extracción de Dellaporta, además de ser el que menos tiempo demanda, fue competente para todas las pruebas en consideración.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Ala-Poikela, M., E. Svensson, A. Rojas, T. Horko, L. Paulin, J.P.T. Valkonen, y A. Kvarnheden. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology* 54: 448-459.
- Aljanabi, S.M. e I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Azzam, O., J. Frazer, D. de la Rosa, J.S. Beaver, P. Ahlquist y D.P. Maxwell. 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204: 289-296.
- Birnboim, H.C. y J. Dolly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Bock, K.R., E.J. Guthrie y R.D. Woods. 1974. Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugarcane and *Panicum maximum*. *Annals of Applied Biology* 77: 289-296.
- Cheng, Y.J., W.W. Guo, H.L. Yi, X.M. Pang y X.X. Deng. 2003. An efficient protocol for genomic DNA extraction from citrus species. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 177a-177g.
- Crawley, M.J. 2007. *The R Book*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England. 949 p.
- Csaikl, U.M., H. Bastian, R. Brettschneider, S. Gauch, A. Meir, M. Schauerte, F. Scholz, C. Sperisen, B. Vornam y B. Ziegenhagen. 1998. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maximization of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 69-86.
- Dellaporta, S., J. Wood y J. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

- Drábková, L., J. Kirschner y C.V. Cek. 2002. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 161-175.
- Faria, J. y D.P. Maxwell. 1999. Variability in geminivirus isolates associated with *Phaseolus spp.* in Brazil. *Phytopathology* 89: 262-268.
- Garrido-Ramírez, E.R., M.R. Sudarshana, W.J. Lucas y R.L. Gilbertson. 2000. Bean dwarf mosaic virus BV1 Protein is a determinant of the hypersensitive response and avirulence in *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1184-1194.
- Gilbertson, R., J. Faria, S. Hanson, F. Morales, P. Ahlquist, D.P. Maxwell, y D. Russell. 1991. Cloning of the complete DNA genomes of the four bean-infecting geminiviruses and determining their infectivity by electric discharge particle acceleration. *Phytopathology* 81: 980-985.
- Goodman, R.M. 1977a. Infectious DNA from a whitefly-transmitted virus of *Phaseolus vulgaris*. *Nature* 266: 54-55.
- Goodman, R.M. 1977b. Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology* 83: 171-179.
- Gutiérrez, A. 2002. Investigación para la producción y manejo de germoplasma de ayote de excelentes características agronómicas y comerciales. Ministerio de Agricultura y Ganadería (eds). San José, Costa Rica. 83 p.
- Gutiérrez, C. 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60: 219-230.
- Harrison, B. y D. Robinson. 1999. Natural genomic and variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomovirus). *Annual Review of Phytopathology* 37: 369-398.
- Hill-Ambroz, K.L., G.L. Brown-Guedira y J.P. Fellers. 2002. Modified rapid DNA extraction protocol for high throughput microsatellite analysis in wheat. *Crop Science* 42: 2088-2091.
- Huang, J., G. Xuejun y S. Mei. 2000. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA. *BioTechniques* 28: 432-434.

- Jose, J. y R. Usha. 2000. Extraction of geminiviral DNA from a highly mucilaginous plant (*Abelmoschus esculentus*). *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 349-355.
- Karkashian, J.P., D.P. Maxwell y P. Ramírez. 2002. Squash yellow mottle geminivirus: a new cucurbit-infecting geminivirus from Costa Rica. *Phytopathology* 92: S125.
- Lazarowitz, S. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11: 327-349.
- Ligozzi, M. y R. Fontana. 2003. Isolation of total DNA from bacteria and yeast. *African Journal of Biotechnology* 2: 251-253.
- Matthews, R.E.F. 1979. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 12: 129-296.
- Mora-Umaña, F., F. Borge y P. Ramírez. 2008. Distribución geográfica del virus SYMMoV en *Cucurbita moschata* en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas* (en prensa).
- Mumford, D.L. 1974. Purification of curly top virus. *Phytopathology* 64: 136-139.
- Ndunguru, J., N.J. Taylor, J. Yadav, H. Aly, J.P. Legg, T. Aveling, G. Thompson y C.M. Fauquet. 2005. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. *Virology Journal* 2: 45.
- Noris, E., A.M. Vaira, P. Caciagli, V. Masenga, B. Gronenborn y G.P. Accotto. 1998. Amino acids in the capsid protein of Tomato Yellow Leaf Curl Virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *Journal of Virology* 72: 10050-10057.
- Pietersen, G. y M.F. Smith. 2002. Tomato yellow leaf curl virus resistant tomatoes show resistance to Tomato curly stunt virus. *Plant Disease* 86: 528-534.
- Potter, J.L., M.K. Nakhla, L. Mejía y D.P. Maxwell. 2003. PCR and DNA hybridisation methods for specific detection of bean-infecting begomovirus in the Americas and Caribbean. *Plant Disease* 87: 1205 –1212.
- Ramos-Reinoso, E.D. 2004. Identificación de geminivirus que infectan frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Nicaragua. Tesis de maestría en ciencias. Universidad de Costa Rica, San José.

- Rogstad, S.H. 2003. Plant DNA Extraction Using Silica. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 463a-463g.
- Rojas, M., R. Gilbertson, D. Russell y D. Maxwell. 1993. Use of degenerate initiators in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347.
- Rojas, M.R., C. Hagen, W.J. Lucas y R.L. Gilbertson. 2005. Exploiting chinks in the plant armor: evolution and emergence of geminivirus. *Annual Review of Phytopathology* 43: 361-394.
- Saha, S., F.E. Callahan, D.A. Dollar y J.B. Creech. 1997. Effect of lyophilization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA, and protein. *The Journal of Cotton Science* 1: 10-14.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York. E.U.A.
- Scott, K.D. y J. Playford. 1996. DNA Extraction technique for PCR in rain forest plant species. *BioTechniques* 20: 974-978.
- Shepherd, D.N., D.P. Martin, P. Lefeuvre, A.L. Monjane, B.E. Owor, E.P. Rybicki, y A. Varsani. 2008. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of Virological Methods* 149: 97-102.
- Somma, M. 2007. Extraction and Purification of DNA. *En Querci*, M., M. Jermini y G. Van den Eede (eds.). *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. World Health Organization, Regional Office for Europe. 238 p.
- Stanley, J., R. Townsend y S. Curson. 1985. Pseudo recombinants between cloned DNAs of two isolates of cassava latent virus. *Journal of General Virology* 66: 1055-1061.
- Stein, N., G. Herren y B. Keller. 2001. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* 120, 354-356.
- Stenger, D. y C. MacMahon. 1997. Genotypic diversity of beet curly top virus populations in the western United States. *Phytopathology* 87: 737-744.

- Taylor, J.W. y E.C. Swann. 1994. Dried samples: soft tissues, DNA from herbarium specimens. *En* Herrmann, B. y S. Hummel (eds.). Ancient DNA. Springer Verlag, Nueva York, E.U.A.
- Wyatt, S. y J. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminiviruses isolates in leaf extracts by degenerate initiators and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288–1293.
- Zhou, X., Y. Liu, D. Robinson y B. Harrison. 1998. Four DNA-A variants among pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *Journal of General Virology* 79: 915-923.