

Dirección General de Sanidad Vegetal

Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario

Departamento de Fitopatología

Laboratorio de Bacteriología

Generalidades

Las técnicas moleculares son fundamentales en el diagnóstico de bacterias fitopatógenas, por lo que la obtención del ácido desoxirribonucleico (DNA) íntegro y puro es fundamental para tener resultados confiables y reproducibles.

La extracción de DNA total consiste en el aislamiento y purificación de la molécula, tomando en cuenta sus características fisicoquímicas. En general, los protocolos de extracción consisten de cinco etapas principales: homogeneización de la muestra, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación e hidratación del DNA (Alejos et al., 2014).

Método de extracción de DNA total con CTAB 2 %

A) La extracción del DNA total se debe realizar a partir de material vegetal que presente síntomas característicos. En caso de no observar síntomas, tomar la muestra aleatoriamente de las zonas del material vegetal que pudiera contener una infección latente (semillas, brotes, bulbos, cormo, estolón, fruto, nervadura, peciolo, pedúnculo, rizoma, tallo).

Nota: pesar en una balanza analítica de 300 a 500 mg de tejido vegetal.

Colocar la muestra (*item*) en un mortero estéril y macerar con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo. En caso de no contar con nitrógeno líquido, la muestra puede ser congelada a -80 °C y posteriormente macerar.

B) Para la extracción de DNA total a partir de insectos vectores (caso *Xylella fastidiosa*), tomar la cabeza de insecto y remover los ojos para evitar inhibición en la reacción de PCR.

C) En caso de trabajar a partir de una cepa bacteriana, utilizar la cepa pura. Tomar tres porciones del cultivo puro con un asa bacteriológica y mezclar con 1.5 mL de agua grado biología molecular estéril. Trabajar en condiciones de asepsia.

Nota: se sugiere emplear también las metodologías propuestas en los protocolos de diagnóstico específicos de bacterias fitopatógenas de la IPPC (*International Plant Protection Convention*, por sus siglas en inglés) y EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) que se encuentran en las referencias.

Procedimiento

1. Depositar la muestra (material vegetal, insecto o cepa bacteriana) en un tubo estéril de 2 mL y agregar 1.5 mL de *buffer* CTAB 2 % (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) previamente calentado a 80 °C y 100 µL de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 10 %.
2. Incubar en baño María a 80 °C por 30 minutos.
3. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugar 5 minutos a 16 000 x g.
4. Transferir 1 mL del sobrenadante a un tubo estéril de 2 mL y agregar 1 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y 30 µL de acetato de sodio 3 M. Mezclar por inversión.
5. Centrifugar a 16 000 x g durante 10 minutos.

6. Transferir 850 µL del sobrenadante a un tubo estéril de 2 mL, agregar 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y mezclar por inversión.

7. Centrifugar a 16 000 x g durante 10 minutos.

8. Transferir 850 µL del sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 mL. Agregar 500 µL etanol absoluto o 2-propanol y mezclar por inversión (dejar toda la noche a 4 °C o 20 min a -20 °C).

9. Centrifugar a 16 000 x g por 10 minutos.

10. Decantar el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla y lavarla con 1 mL de etanol al 70 %

11. Centrifugar a 16 000 x g por 10 minutos.

12. Decantar el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla y dejarla secar.

13. Resuspender en 100 a 150 µL de agua grado biología molecular.

Cuantificación del DNA total por espectrofotometría

Cuantificar 1 µL del DNA total extraído mediante espectrofotometría para conocer su concentración en ng/µL. Utilizar un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad.

Realizar las diluciones correspondientes del DNA para trabajar con concentraciones entre 20 y 30 ng/µL.

La pureza del DNA total extraído, deberá presentar valores de absorbancia (A) entre 1.7 y 2.0 para la relación A_{260}/A_{280} . Una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas.

Nota: en caso de que las muestras no cumplan con el rango óptimo de pureza, se recomienda realizar una nueva extracción de DNA o comprobar mediante amplificación de algún gen endógeno que el DNA es amplificable.

Verificación de la integridad del DNA total en gel de agarosa

Verificar la integridad del DNA en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con GelRed, sumergido en *buffer* TAE 1X.

Cargar en el gel 5 µL de DNA mezclado con 3 µL de *buffer* de carga (naranja G 6X).

Correr la electroforesis por 30 minutos a 95 V y observar el gel en luz UV.

Deben observarse bandas definidas, sin impurezas ni degradación (barrido), de lo contrario, se recomienda realizar una nueva extracción de DNA o comprobar mediante amplificación de algún gen endógeno que el DNA es amplificable.

Preparación de soluciones

Buffer CTAB 2 %

Mezclar los reactivos en un matraz Erlenmeyer y agregar lentamente 750 mL de agua destilada. Si permanecen grumos, calentar en microondas o en parrilla, hasta ebullición y seguir agitando. Aforar a un litro y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 115 lb/in².

Buffer CTAB 2 %

| Reactivo | Cantidad |
|----------------|----------|
| CTAB | 20.0 g |
| NaCl | 82.0 g |
| Tris base | 2.42 g |
| EDTA | 1.46 g |
| Agua destilada | 1 000 mL |

Acetato de sodio 3M

| Reactivo | Cantidad |
|-----------------------|----------|
| Acetato de sodio | 180.55 g |
| Ácido acético glacial | 45.7 mL |
| Agua destilada | 1 000 mL |

Disolver el acetato de sodio en 500 mL de agua y posteriormente agregar lentamente el ácido acético glacial. Ajustar el pH a 5.2 y aforar a 1 L.

Buffer de carga naranja G 6X

| Reactivo | Cantidad |
|-----------|----------|
| Naranja G | 60 mg |
| Glicerol | 18 mL |
| Agua | 40 mL |

Aforar la mezcla a 50 mL y almacenar a 4 °C.

REFERENCIAS

- Alejos V. L. P., Aragón M. M. C., Cornejo R. A. (2014) Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-Semarnat)
- EPPO. European Plant Protection Organization (2013). PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *Bulletin EPPO*. 43, 7–20. ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12018
- EPPO. European Plant Protection Organization (2016). PM 7/127 (1) *Acidovorax citrulli*. *Bulletin EPPO*. 46(3), 444–462. ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12330
- EPPO. European Plant Protection Organization. (2016). PM 7/128 (1) *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Bulletin EPPO*. 46(3), 429–443. ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12329
- IPPC. International Plant Protection Convention. (2014). NIMF 27. Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas. PD 6: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. pp. 1–28. https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2016/01/ISPM_27_2006_WithoutAppendix2_Es_2016-01-14.pdf
- IPPC. International Plant Protection Convention (2016). ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 27: *Xanthomonas fragariae*. pp. 1–26. https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2016/11/DP_14_2016_En_2016-11-01_RopTWae.pdf
- IPPC. International Plant Protection Convention. (2018). ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 25: *Xylella fastidiosa*. pp. 1–32. https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2018/09/DP_25_2018_Xylellafastidiosa_2018-09-21.pdf
- IPPC. International Plant Protection Convention. (2018). ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 13: *Erwinia amylovora*. pp. 1–36. https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2018/12/DP_13_2016_Es_2018-11-05_LRGRRev.pdf
- EPPO. European Plant Protection Organization (2016). PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bulletin EPPO*. 46(2), 202–225. ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12302
- EPPO. European Plant Protection Organization (2005). PM 7/44 (1) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Bulletin EPPO*. 35, 289–294. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2338.2005.00835.x>
- EPPO. European Plant Protection Organization (2006). PM 7/59 (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Bulletin EPPO*. 36, 99–109. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/>

Forma recomendada de citar:

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2020. Ficha Técnica: Metodologías para la extracción de DNA total. [Versión 1.0]. Autor.

Contacto para información adicional

Correo: lab.bacteriologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 55 5905 1000, Ext. 51314 y 51333