



CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

**Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Micología**

REPORTE TÉCNICO:

Evaluación de métodos de extracción de DNA para cultivos *in vitro* de *Phytophthora spp.*

Elaboró:

M. en C. Adrián González Saucedo

Participó:

M. en C. Nayeli Carrillo Ortiz
M. en C. Lervin Hernández Ramos

Revisó:

Dra. Magnolia Moreno Velazquez
Dr. Angel Ramírez Suárez

Marzo 2022



Evaluación de métodos de extracción de DNA para cultivos *in vitro* de *Phytophthora* spp.

Resumen Ejecutivo

Un aspecto importante a considerar en la defensa contra la introducción de patógenos regulados y cuarentenados es su detección oportuna; esto requiere desarrollar protocolos de diagnóstico rápidos y eficaces. Para hongos fitopatógenos, el diagnóstico molecular cobra relevancia en la identificación de parásitos de difícil aislamiento y especies crípticas. Es necesaria la evaluación de protocolos de extracción de DNA que aseguren la obtención de ácidos nucleicos en la cantidad, pureza e integridad que requiere su diagnóstico molecular.

Como parte del desarrollo del protocolo de diagnóstico para la detección de *Phytophthora* spp. en cultivos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.), zarzamora (*Rubus ulmifolius* Schott.) y fresa (*Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne.); se evaluaron cinco protocolos de extracción de DNA a partir de cultivos monosporicos *in vitro*.

Los protocolos evaluados fueron: Cenís, (1992), Wizard® Genomic DNA Isolation Kit de Promega, Plant DNAzol™ Reagent de Thermo Fisher, DNeasy® Plant Mini Kit de QIAGEN y PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit de Thermo Fisher. De estos, se determinó la concentración de ácidos nucleicos en ng/μL; la pureza del DNA por espectrofotometría UV/Vis de la relación de absorbancias 260/280 y 260/230 comparada con la concentración de DNA obtenida; la integridad del producto de extracción en gel de agarosa; y la amplificación por PCR punto final de gen endógeno con los oligos DC6 e ITS4.

De acuerdo a los resultados obtenidos:

Los protocolos Wizard® y DNAzol™ empleados bajo las condiciones de esta evaluación, no son eficientes en la recuperación de DNA a partir de cultivos *in vitro* de *Phytophthora* spp.

Se recomienda el uso del protocolo de Cenís, (1992) para la obtención de DNA a partir de cultivos *in vitro* de *Phytophthora* spp.; siempre y cuando sea verificada la integridad del DNA recuperado.

Se recomienda el uso de los protocolos DNeasy® y PureLink™ para la obtención de DNA a partir de cultivos *in vitro* de *Phytophthora* spp; esto para muestras mayores a 0.1g.



I. Objetivo

Evaluar los protocolos Cenis, (1992), Wizard®, DNAzol™, DNeasy® y PureLink™ para la obtención de ácidos nucleicos a partir de cultivos *in vitro* de *Phytophthora* spp.; en términos de recuperación de DNA, pureza, integridad y amplificación de gen endógeno en PCR punto final.

II. Materiales y métodos

Material biológico

Como modelo de estudio y representante del genero *Phytophthora* spp. se empleó una cepa de *Phytophthora capsici* aislada de cultivo de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) en el estado de Veracruz, México. Dicho aislamiento fue donado al Laboratorio de Micología en enero el 2022 por la Dra. Olga Gómez Rodríguez, profesora investigadora del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.

Para la obtención de cultivos *in vitro*, se inoculó cajas Petri de 90mm con medio de cultivo PARPH (agar, harina de maíz, himexazol, pimaricina, ampicilina, rifampicina, pentacloronitrobenzeno), colocando al centro un disco de micelio de 5mm. Estas cajas se incubaron por 7 días a $24 \pm 3^\circ\text{C}$ en ausencia de luz (Figura 1).

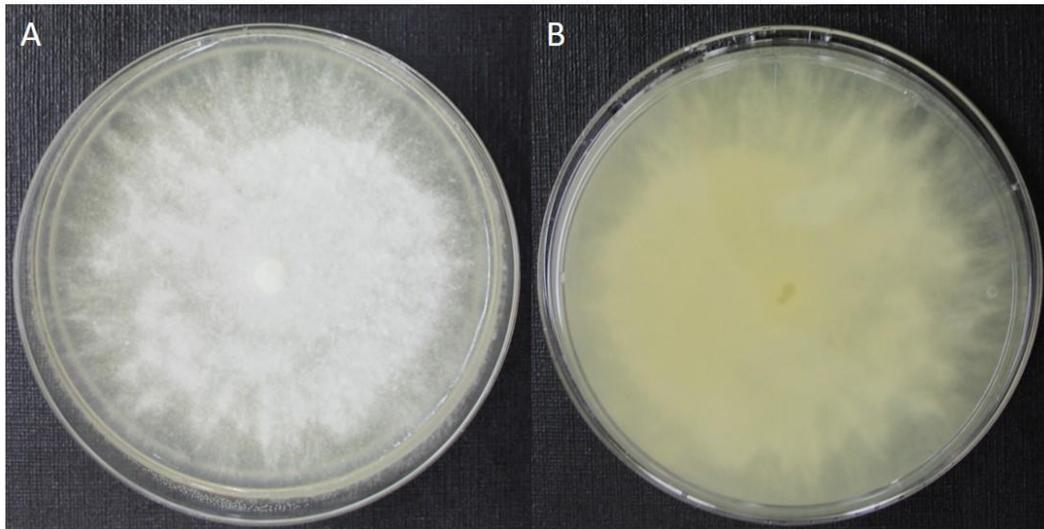


Figura 1.- Cultivo *in vitro* de *Phytophthora capsici* en medio de cultivo PARPH con 7 días de incubación a $24 \pm 3^\circ\text{C}$ en ausencia de luz; A) anverso, B) reverso.

Extracción de ADN

Se ejecutaron cinco protocolos para la extracción de ADN a partir de cultivos *in vitro*; cuatro protocolos comerciales que se hicieron de acuerdo a las instrucciones de trabajo proporcionadas por los fabricantes (Cuadro 1); y un protocolo no comercial diseñado para la obtención de ADN a partir de hongos filamentosos (200mM Tris-HCL pH 8.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA y 0.5% dodecil sulfato de sodio), siguiendo el procedimiento descrito en Cenis, (1992).

Para todos los protocolos, incluidos los comerciales se usó una muestra de 0.01 g de micelio por repetición. Se incluyeron seis repeticiones realizadas por tres técnicos (n=18).

Cuadro 1. Protocolos de extracción comerciales incluidos en la evaluación.

| Nombre | Fabricante | Catálogo |
|--|---------------|----------|
| Wizard® Genomic DNA Isolation Kit | Promega | A1125 |
| Plant DNAzol™ Reagent de | Thermo Fisher | 10978021 |
| DNeasy® Plant Mini Kit | QIAGEN | 69204 |
| PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit | Thermo Fisher | A29790 |

Pureza y cuantificación del DNA

La concentración de DNA fue calculada por el espectrofotómetro (NanoDrop Thermo Scientific) usando la Ley de Beer-Lambert a una absorbancia de 260nm.

Se cuantifico la relación de las absorbancias 260, 280 y 260, 230nm, de una muestra de 2µL de cada repetición (n=18), se usó agua grado biología molecular como blanco para la calibración en un espectrofotómetro UV/Vis (NanoDrop Thermo Scientific).



La relación 260/280 se usó como indicador de la pureza del DNA, se tomaron como parámetro de pureza valores de ~1.8. Así mismo, se determinó la relación 260/230 comparada con la concentración de DNA de la muestra (Lucena-Aguilar et al., 2016).

Integridad del DNA

La integridad del DNA se observó en electroforesis de gel de agarosa al 2%, teñida con 1X de Gel Red (Biotum Cat. 41003). Se cargaron seis repeticiones del DNA extraído en cada protocolo a una concentración de 10ng/μL y un marcador molecular de 100pb (Invitrogen Cat. 10488058) como referencia, pasando a 100V durante 60min. La visualización del gel se realizó en un fotodocumentador (Gel Doc EZ, BioRAD).

Los resultados se compararon visualmente con la escala gráfica de integridad propuesta por Seeker et al., (2016); donde Clase 1 se refiere a DNA íntegro y Clase 5 a DNA degradado.

Gen endógeno en PCR punto final

El DNA obtenido en cada protocolo se amplificó usando los oligos universales DC6 (5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Bonants et al., 1997), el protocolo de amplificación consistió en 2.5 μL de 10x PCR buffer, 0.5 μL de 0.2mM dNTPs, 0.75 μL de 1.5mM MgCl₂, 1.25μL de 0.5μM de cada oligo, 0.1μL de Taq DNA polimerasa (5U/μL) (Invitrogen Cat. 10342053), y 16.9 μL de agua destilada estéril; finalmente se agregaron 2 μL de DNA (10 ng/μL) para un volumen final de 25 μL.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100 (Biorad). El programa térmico consistió en una desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 segundos, anillamiento a 55 °C por 60 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos; y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Como control positivo se empleó material genético de *Phytophthora capsici* clonado con los oligos DC6 e ITS4.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 2%, teñida con 1X de Gel Red (Biotum Cat. 41003). Se usó un marcador molecular de 100pb (Invitrogen Cat. 10488058) como referencia del tamaño de bandas, el gel se corrió a 100V durante 70min. La visualización del gel se realizó en un fotodocumentador (Gel Doc EZ, BioRAD).

Análisis estadístico



Los datos obtenidos de la cuantificación y relación de absorbancias 260/280 del DNA se analizaron con un test de normalidad Shapiro-Wilk ($p < 0.05$). Se aplicó un análisis de varianza Kruskal-Wallis ($p < 0.001$) para datos no paramétricos; y una prueba de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

La relación de absorbancias 260/230 se comparó contra la cuantificación de DNA obtenido, calculando la tendencia logarítmica de la relación entre ambas para cada protocolo.

III. Resultados

Cuantificación de DNA

En la Figura 2 se muestran los resultados de la cuantificación de ácidos nucleicos a una absorbancia de 260nm. Se encontró una correlación positiva entre el protocolo empleado y la cantidad de DNA obtenido. Todos los protocolos se llevaron a cabo partiendo de la misma cantidad de muestra (0.01g), para hacer esta comparación.

El protocolo de Cenis, (1992) mostró las mayores lecturas de ácidos nucleicos, con un valor medio de 258.45 ng/ μ L; seguido de DNAzol™ con 60.80 ng/ μ L, Wizard® con 22.55 ng/ μ L; y finalmente PureLink™ y DNeasy®, los cuales presentaron las menores cuantificaciones con 4.25 y 3.2 ng/ μ L, respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de DNA obtenido entre los protocolos Wizard® y DNAzol™, así como tampoco entre PureLink™ y DNeasy®.

Pureza de DNA

La presencia de proteínas y sales actúan como inhibidores en la amplificación por PCR (Demeke & Jenkins, 2010). La relación de absorbancias 260/280 y 260/230 se usan como indicadores preliminares para inferir la contaminación por dichos componentes.

La relación de absorbancias 260/280 en valores de ~ 1.8 indican DNA de pureza aceptable y valores ≤ 1.6 la presencia de contaminantes como proteínas y compuestos fenólicos. Por otro lado, la relación de absorción 260/230 en el intervalo de 2.0 a 2.2 indican pureza y lecturas inferiores a estos valores señalan la presencia de sales contaminantes (Gallagher, 1998).

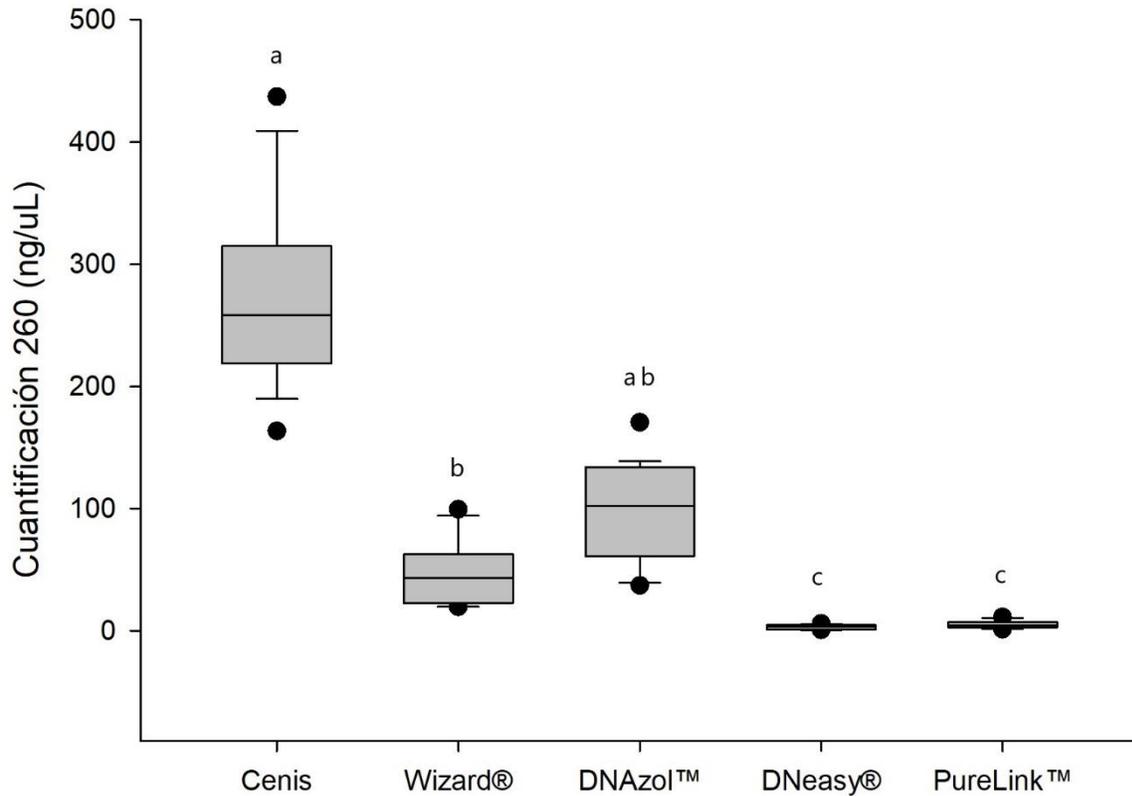


Figura 2. Cuantificación de ácidos nucleicos a 260nm, calculada por Lambert-Beer. Las cajas muestran la mediana y los percentiles 10, 25 y 75. Letras minúsculas representan diferencias estadísticas entre protocolos por Tukey ($p < 0.05$).

Las relaciones de absorbancias 260/280 para los protocolos evaluados se muestran en la Figura 3. En general, no se encontró correlación entre las absorbancias 260/280 y los protocolos empleados; de acuerdo al análisis, solo el kit de PureLink™ mostró valores de absorbancia significativamente diferentes respecto al resto de los protocolos, con una tendencia a valores medios por debajo de 1.6.

En cuanto a la distribución de lecturas obtenidas, el protocolo DNeasy® mostró una mayor amplitud de intervalo, con lecturas desde 1.4 a 4.6, mientras que los protocolos Cenis, (1992), Wizard® y DNAzol™ presentaron valores medios de 2.0 en intervalos de 1.7 a 2.4.

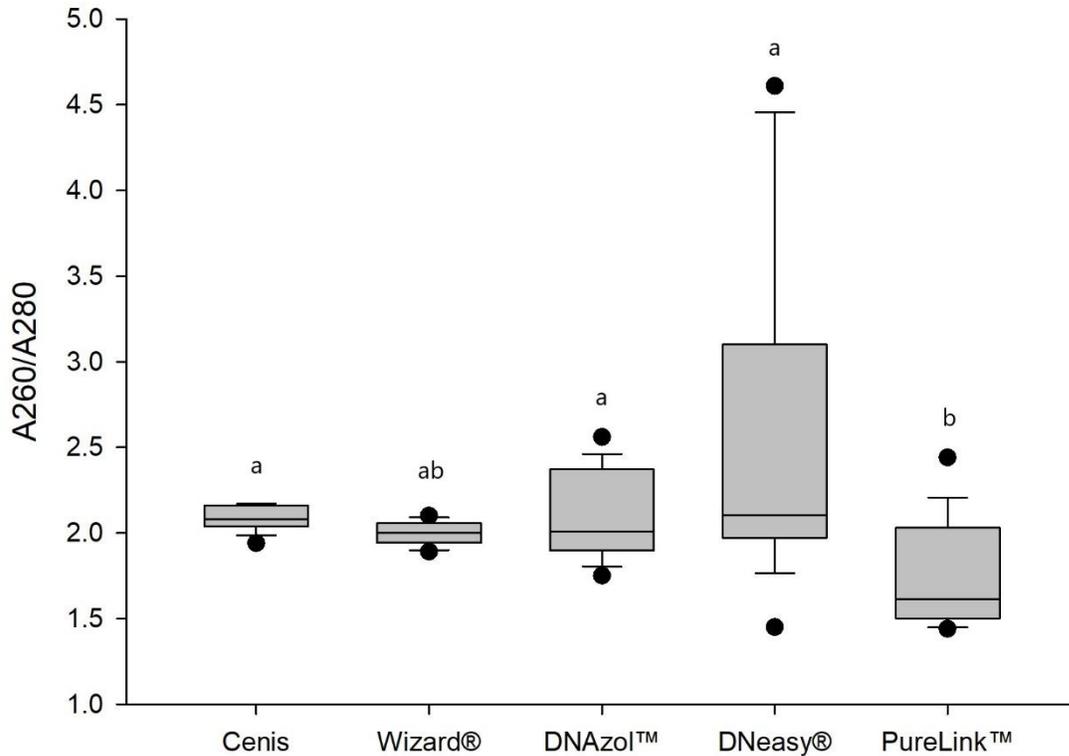


Figura 3. Relación de absorbancias 260/280. Las cajas muestran la mediana y los percentiles 10, 25 y 75. Letras minúsculas representan diferencias estadísticas entre protocolos por Tukey ($p < 0.05$).

Muestras con lecturas de ácidos nucleicos cercanas al límite de detección del equipo ($< 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$), presentan variaciones en la relación de absorción 260/230, sin que esta esté relacionada directamente con la presencia de contaminantes (Seeker et al., 2016). Por esta razón, en la Figura 4 se muestra la relación de absorbancias 260/230 contrastadas con su cuantificación de ácidos nucleicos.

De los protocolos evaluados, solo el protocolo de Cenis, (1992) presento absorbancias 260/230 por encima de 1.6, en un intervalo de 2.1 a 2.5. Esto puede estar relacionado a la concentración de ácidos nucleicos presentes en las muestras. En el caso particular de PureLink™ y DNeasy®, se observó una variación > 0.5 , donde las concentraciones de DNA fueron inferiores a $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

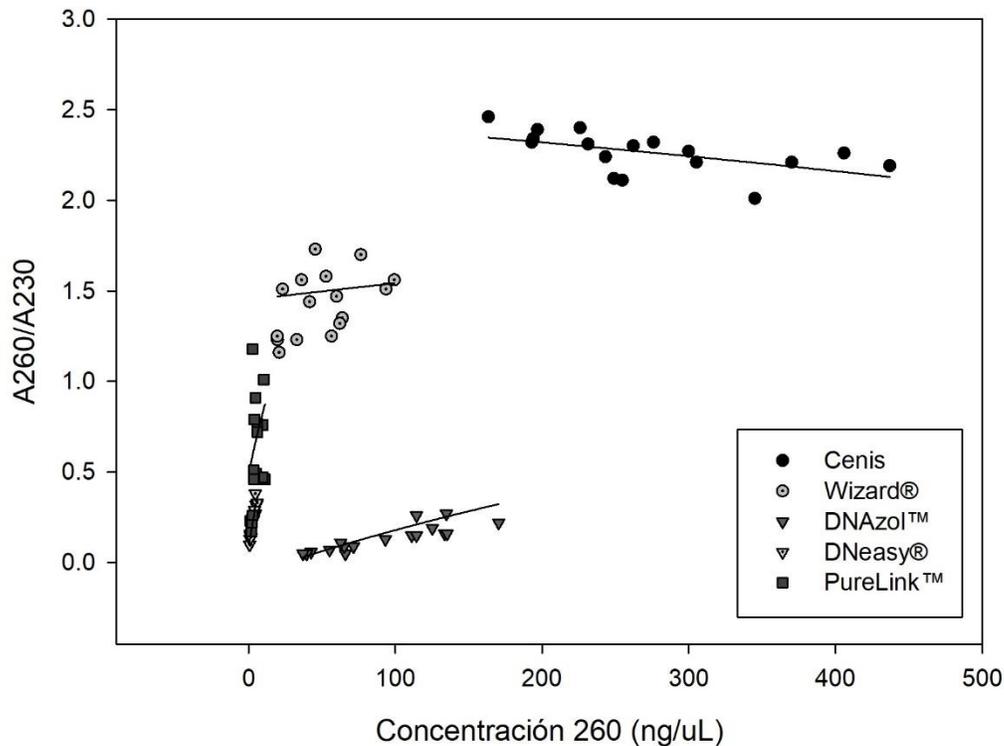


Figura 4. Relación de absorbancias 260/230 comparada con la concentración de ácidos nucleicos calculada por Lambert-Beer a 260nm. Líneas continuas indican la tendencia logarítmica de los datos para cada protocolo.

Integridad del DNA

Los protocolos evaluados mostraron variaciones en la integridad de los ácidos nucleicos obtenidos. El gel de integridad se muestra en la Figura 5.

De acuerdo con la escala de integridad de Seeker et al., (2016), los protocolos DNeasy® y PureLink™, mostraron un nivel 1 de integridad, con bandas claras y sin señales de barrido o desintegración de DNA. El protocolo de Cenis, (1992) presentó una integridad nivel 2, con bandas claras pero un ligero barrido de estas. Por último, Wizard® y DNAzol™ tuvieron una integridad nivel 4 y 5, respectivamente; sin bandas claras y un barrido de DNA a lo largo de todo gel.

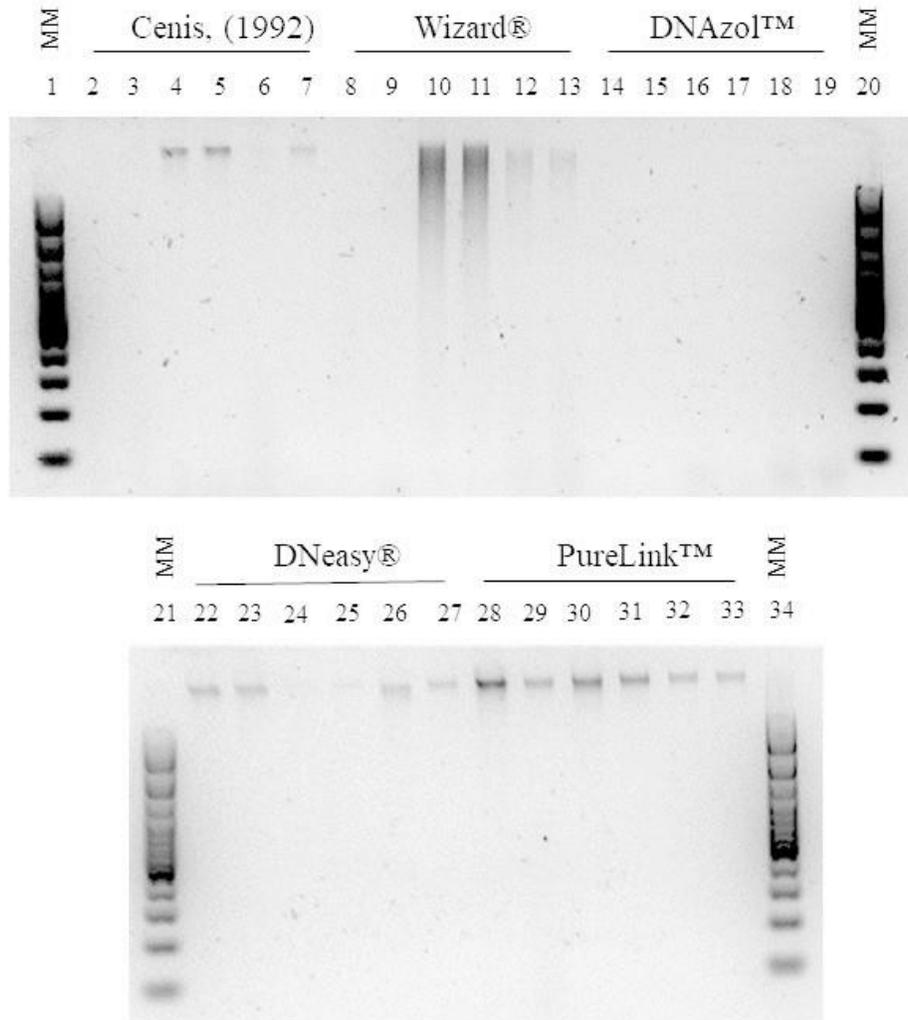


Figura 5. Integridad de DNA. Muestras de DNA a 10ng/μL en gel de agarosa al 2% teñida con 1X de Gel Red, marcador molecular (MM) 100pb.

Gen endógeno en PCR punto final

La prueba de gen endógeno, asegura la viabilidad del DNA para ser utilizado en análisis basados en amplificación por PCR. En la Figura 6 se muestra el gel de amplificación por gen endógeno con los oligos DC6 e ITS4, los cuales se usan como gen endógeno para Oomycetes (Bonants et al., 1997).

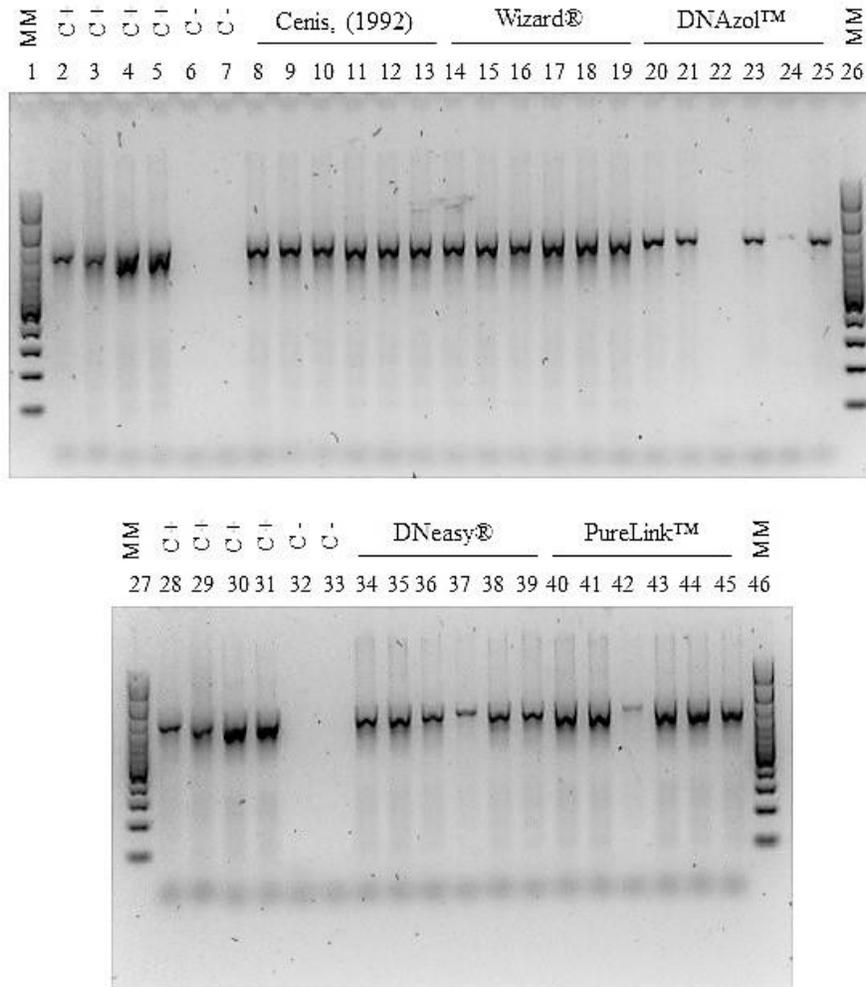


Figura 6. Amplificación de gen endógeno con oligos DC6 e ITS4. C+, control positivo *Phytophthora capsici*; C-, control negativo. Gel de agarosa al 2% teñida con 1X de Gel Red, marcador molecular (MM) 100pb.

Las muestras de los protocolos Cenis, (1992) y Wizard® mostraron una amplificación del 100%, con bandas homogéneas en intensidad. Por otro lado, DNeasy® y PureLink™ presentaron una amplificación del 100% pero con ligeras variaciones en la intensidad de sus bandas. Finalmente, DNAzol™ mostró repeticiones sin amplificar y una mayor variación en la intensidad de bandas.



IV. Discusión

Los resultados observados para DNAzol™ son congruentes, en el ensayo de amplificación por gen endógeno algunas repeticiones no amplificaron y se observó variación en la intensidad de las bandas; las lecturas de absorbancia 260/230 son muy inferiores a las esperadas, indicando la presencia de sales contaminantes; mientras que el gel de integridad presentó ácidos nucleicos degradados, lo cual compromete los resultados de las pruebas que se lleven a cabo con ellos (Seeker et al., 2016).

Es importante tomar con discreción los valores de relación de absorbancias 260/280 y 260/230, ya que estas pueden variar por factores independientes a la pureza misma del DNA. Por ejemplo, la precisión del espectrofotómetro, que lleva a variaciones de ± 0.4 ; el tipo de proteínas en la muestra, que a una longitud de 280nm absorben en intervalos de 0.7 a 3.4; el pH en la solución, con cambios en el orden de ± 0.3 , donde soluciones ácidas muestran valores subrepresentados, mientras que soluciones básicas tienden a sobrerrepresentados; y la composición de bases nitrogenadas en los ácidos nucleicos, donde el RNA típicamente tiene una mayor absorbancia 260/280 debida al uracilo (Hassan et al., 2015; Wilfinger et al., 1997).

Los protocolos DNeasy® y PureLink™ presentaron una distribución muy similar en valores de absorción 260/230; sin embargo, estos no indican necesariamente la presencia de sales contaminantes, están más relacionados a la baja recuperación de ácidos nucleicos, la cual es muy cercana al límite de detección del espectrofotómetro.

Muchos kits comerciales se componen de detergentes, proteinasa K, agentes quelantes, RNAsas, solventes orgánicos o cloroformo; los cuales son usados con el fin de obtener extracciones más puras. Esto involucra la adición de un mayor número de componentes (buffers), el establecimiento de condiciones de incubación específicas y la dilución significativa de la muestra por la repetida centrifugación y desecho de sobrenadantes (Demeke & Jenkins, 2010).

La baja recuperación de ácidos nucleicos con DNeasy® y PureLink™ está relacionada con la cantidad de material biológico de partida (0.01g) y los múltiples enjuagues a la muestra. Para estos protocolos y cuando la muestra lo permita, es recomendable incrementar la cantidad de material biológico para extracción. De acuerdo a la información del fabricante es posible incluir de 0.01 a 0.1 g de material biológico por repetición sin hacer modificaciones sustanciales al protocolo.



DNeasy® y PureLink™ mostraron los valores de absorbancia 260/280 y 260/230 más bajos, como se mencionó anteriormente esto puede estar relacionado a otros factores diferentes a la presencia de proteínas o sales en la muestra. Esto se confirma al observar los resultados de amplificación con gen endógeno, donde ambos protocolos mostraron la correcta y homogénea amplificación del DNA en todas sus repeticiones.

Protocolos como Cenis, (1992) poseen la característica de emplear agentes surfactantes como el dodecilsulfato sódico (SDS) en medios salinos creados con NaCl o acetato de sodio. La precipitación de proteínas debida a la presencia de estas sales es efectiva en la recuperación de DNA en diversas muestras de tejidos (Seeker et al., 2016; Suguna et al., 2014).

En cuanto a pureza determinada por la relación de absorción 260/280, los protocolos Cenis, (1992) y Wizard® obtuvieron los valores más cercanos a 1.6; sin embargo, ambos mostraron una baja en la integridad de los ácidos nucleicos recuperados; esto independientemente a que ambos amplificaron correctamente por gen endógeno.

De los protocolos no comerciales como Cenis, (1992) se conoce la totalidad de sus componentes, por lo que es posible estandarizar sus condiciones de operación para hacerlos más eficientes en la recuperación de ácidos nucleicos; haciendo que el costo de procesamiento por muestra sea hasta dos tercios menor a protocolos con kits comerciales.

V. Conclusiones

Los protocolos Wizard® y DNAzol™ empleados bajo las condiciones de esta evaluación, no son eficientes en la recuperación de DNA a partir de cultivos *in vitro* de *Phytophthora* spp.

Se recomienda el uso del protocolo de Cenis, (1992) para la obtención de DNA a partir de cultivos *in vitro* de *Phytophthora* spp.; siempre y cuando sea verificada la integridad del DNA recuperado.

Se recomienda el uso de los protocolos DNeasy® y PureLink™ para la obtención de DNA a partir de cultivos *in vitro* de *Phytophthora* spp; esto para muestras mayores a 0.1g.



VI. Referencias

- Bonants, P., Hagenaar-de Weerd, M., van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D., & Duncan, J. (1997). Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, 103(4), 345–355. <https://doi.org/10.1023/A:1008640227432>
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2380. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>
- Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 1977–1990. <https://doi.org/10.1007/S00216-009-3150-9>
- Gallagher, S. (1998). Quantitation of Nucleic Acids with Absorption Spectroscopy. *Current Protocols in Protein Science*, 13(1), A.4K.1-A.4K.3. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA04KS13>
- Hassan, R., Husin, A., Sulong, S., Yusoff, S., Johan, M. F., Yahaya, B. H., Ang, C., Ghazali, S., & Cheong, S. K. (2015). Guidelines for nucleic acid detection and analysis in hematological disorders. *The Malaysian Journal of Pathology*, 37(2), 165–173. <http://www.mjpath.org.my/2015/v37n2/index.html>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264. <https://doi.org/10.1089/BIO.2015.0064>
- Seeker, L. A., Holland, R., Underwood, S., Fairlie, J., Psifidi, A., Ilska, J. J., Bagnall, A., Whitelaw, B., Coffey, M., Banos, G., & Nussey, D. H. (2016). Method Specific Calibration Corrects for DNA Extraction Method Effects on Relative Telomere Length Measurements by Quantitative PCR. *PLoS ONE*, 11(10), 164046. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0164046>
- Shokrzadeh, M., & Mohammadpour, A. (2018). Evaluation of a modified salt-out method for DNA extraction from whole blood lymphocytes: A simple and economical method for gene polymorphism. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 4(2), 28–32. <https://doi.org/10.18502/PBR.V4I2.218>
- Suguna, S., Nandal, D. H., Kamble, S., Bharatha, A., & Kunkulol, R. (2014). Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 198–199.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/97223ST01>