

# V08 - UNIVERSALIDAD DE LAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA *Vitis vinifera* L. DE TECNENOL. APLICACIÓN EN OTRAS ESPECIES VEGETALES

L. Gómez, J. Sabaté, G. Marsal, N. Boronat, JM. Canals, F. Zamora, F.Fort

Universidad Rovira i Virgili, Departamento de Bioquímica i Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Campus Sescelades, C/ Marcel·lí Domingo nº1, 43007 Tarragona, España.  
mariafrancesca.fort@urv.cat

## RESUMEN:

TECNENOL posee dos metodologías para la obtención de ADN en óptimas condiciones diseñado para vides (*Vitis vinifera* L.). La gran rapidez (largo: 2h30'; corto: 1h30'), comodidad (todo el procesado en tubos Eppendorf), polivalencia (hoja, sarmiento, semilla, fruto) y bajo coste las convierte en protocolos muy interesantes para ser aplicados a otros tipos de muestras vegetales.

El objetivo de este estudio es demostrar su utilidad, eficacia y universalidad.

**Palabras clave:** ADN, Extracción, Purificación, Plantas, Vegetales

## 1. Introducción

El Grupo de Investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL), en una de sus líneas de investigación dispone de dos métodos de extracción de ADN que, sin lugar a dudas, ofrecen a la comunidad científica claras ventajas respecto al resto protocolos tanto convencionales como comerciales (rapidez, comodidad y precio).

En la propuesta más polivalente encontramos el primer protocolo diseñado: Marsal y col. (2011). Este protocolo ofrece poder extraer ADN puro y casi intacto en unas 2h 30 minutos (temporización del mismo orden que un "kit" comercial pero en este caso sólo extrae a partir de tejido foliar). La polivalencia le viene atribuida porque puede obtener ADN tanto de muestras de hoja joven como adulta, tanto de sarmiento (madera) como de semilla. La propuesta de método de extracción y purificación más rápida tiene una duración de 1h 30 minutos, pero queda restringida al tejido foliar, tanto joven como adulto (Marsal y col. 2013). Esta es una reducción del anterior método, donde el rendimiento y la pureza del ADN extraído no son significativamente inferiores (Figura 1).

Ambos presentan la ventaja de trabajar, en todo momento, con pequeños volúmenes de muestra, lo que hace que todo el protocolo se ejecute utilizando tubos Eppendorf. Esta reducción de volumen de muestra, aparte de hacer más ágil la metodología, lleva implícita una reducción de volúmenes de los reactivos y soluciones utilizados, que junto con la ausencia de la digestión con ARNasa, hace que ambos protocolos resulten verdaderamente económicos. Respecto a los métodos que comparamos, el ahorro en euros va de 2 a 8 veces (Figura 2).

| Method   | Organ       | A <sub>260/280</sub> | Yield (µg/g tissue) | SSR  |       |       |        |         |         |
|--|-------------|----------------------|---------------------|------|-------|-------|--------|---------|---------|
|  |             |                      |                     | VVS2 | VVMD5 | VVMD7 | VVMD27 | VrZAG62 | VrZAG79 |
| Manen <i>et al.</i> (2003)                     | young leaf  | 1.8±0.1              | 411±31              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | mature leaf | 1.8±0.1              | 332±39              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | wood        | 1.9±0.1              | 297±19              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | seed        | 1.9±0.1              | 81±10               | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
| Marsal <i>et al.</i> (2011)                    | young leaf  | 2.0±0.05             | 547±39              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | mature leaf | 1.9±0.1              | 419±41              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | wood        | 1.8±0.1              | 403±24              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | seed        | 1.8±0.1              | 108±24              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
| Modified method of Marsal <i>et al.</i> (2011) | young leaf  | 2.0±0.1              | 560 ± 32            | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | mature leaf | 1.9±0.2              | 330± 9              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | wood        | 1.3±0.1              | 160±24              | -    | -     | -     | -      | -       | -       |
|  | seed        | 1.1±0.1              | 60±11               | -    | -     | -     | -      | -       | -       |
| DNeasy Plant Mini Kit                          | young leaf  | 1.9±0.1              | 405±51              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | mature leaf | 2.0±0.05             | 351±29              | +    | +     | +     | +      | +       | +       |
|  | wood        | 1.1±0.05             | 123±17              | -    | -     | -     | -      | -       | -       |
|  | seed        | -                    | -                   | -    | -     | -     | -      | -       | -       |
| MasterPure Plant Kit                           | young leaf  | 1.5±0.1              | 25±03               | -    | -     | -     | -      | -       | -       |
|  | mature leaf | 1.2±0.1              | 13±01               | -    | -     | -     | -      | -       | -       |
|  | wood        | -                    | -                   | -    | -     | -     | -      | -       | -       |
|  | seed        | -                    | -                   | -    | -     | -     | -      | -       | -       |

**Figura 1:** Fragmento de la Tabla publicada en Marsal y col. (2013): Table 2 - Comparison of results obtained by the different methods studied. Se resalta en rojo el método Marsal y col. (2011) y su modificación publicada en 2013. Ambas publicaciones se centran en la especie *Vitis vinifera* L., de hecho, se diseñaron estos protocolos para esta especie.

**Table 3 - Main economic traits: Final cost for eight samples, cost per mg DNA extracted and estimation of number of samples processed per day.**

| Protocols or commercial kits                   | Cost of reagents (€) |           | Cost handling time per 8 samples (€) |                                   | Final cost per 8 samples | Final cost per mg (€) extracted per 8 samples <sup>(*)</sup> | Estimated DNA samples per day <sup>(*)</sup> |
|--|----------------------|-----------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|--|
|  | A sample             | 8 samples | Estimated extraction time (h)        | Cost hands-on-time <sup>(*)</sup> |                          |  |  |
| Bowers <i>et al.</i> (1993)                    | 20.38                | 163.02    | 8.00                                 | 64.00                             | 227.02                   | 659.94   | 8  |
| Thomas <i>et al.</i> (1993)                    | 3.17                 | 25.37     | 3.00                                 | 24.00                             | 49.37                    | 47.84  | 36   |
| Lodhi <i>et al.</i> (1994)                     | 3.95                 | 31.63     | 3.80                                 | 30.40                             | 62.63                    | 14.74  | 24   |
| Steenkamp <i>et al.</i> (1994)                 | 4.00                 | 32.02     | 3.30                                 | 26.40                             | 58.42                    | 42.46  | 24   |
| Wolf <i>et al.</i> (2001)                      | 0.50                 | 4.01      | 3.00                                 | 24.00                             | 28.01                    | 7.17   | 36   |
| Manen <i>et al.</i> (2003)                     | 0.29                 | 2.36      | 3.50                                 | 28.00                             | 30.36                    | 9.23   | 24   |
| Marsal <i>et al.</i> (2011)                    | 0.63                 | 5.08      | 2.50                                 | 20.00                             | 25.08                    | 5.73   | 48   |
| Modified method of Marsal <i>et al.</i> (2011) | 0.63                 | 5.08      | 1.50                                 | 12.00                             | 17.08                    | 3.81   | 96   |
| DNeasy Plant Mini Kit                          | 4.10                 | 32.80     | 2.50                                 | 20.00                             | 52.80                    | 16.30  | 48   |

(\*) 8€ / h (Tattersall *et al.* (2005)). (+) Samples: young leaves. (°) Calculated on the basis of the column of estimated extraction time

**Figura 2:** Tabla publicada en Marsal y col. (2013), en donde se compara el coste (€) (color rojo) y el tiempo estimado de duración del proceso (color verde) para diferentes metodologías (comerciales o no) de extracción y purificación de ADN diseñadas a partir de *Vitis vinifera* L.

El objetivo de este estudio es comprobar que ambos protocolos funcionan con las mismas ventajas cuando se utilizan otras familias del reino vegetal, demostrando de esta manera la versatilidad de ambas metodologías.

## 2. Material y métodos

Para la universalización de las metodologías diseñadas por TECNENOL (Marsal y col. 2011 y Marsal y col. 2013) usadas exclusivamente en muestras del género *Vitis*, se ha probado la extracción y purificación de ADN de 30 individuos pertenecientes a otras familias vegetales. El material de partida correspondía a hojas jóvenes, hojas adultas, madera (brotes lignificados) y fruto procesado (comercial).

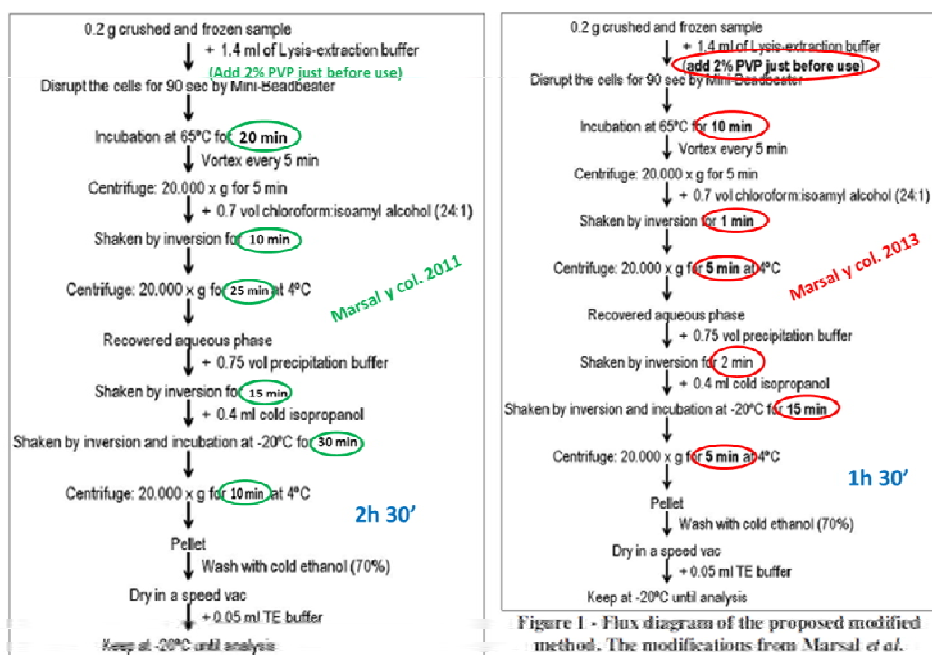


Figure 1 - Flux diagram of the proposed modified method. The modifications from Marsal *et al.* (2011) are shown in bold type.

Figura 3: Diagramas de flujo de los métodos de extracción de ADN diseñados para *Vitis vinifera* L., por TECNENOL. A la izquierda el protocolo Marsal y col. 2011, de 2h 30' de duración que actualmente utiliza siempre un 2% de PVP, y a la derecha el protocolo más corto (Marsal y col. 2013).

### 3. Resultados

En principio para hojas jóvenes y adultas se ha utilizado el protocolo Marsal y col. (2013) (Tabla 1). En caso de que en hojas adultas no se alcanzasen los índices de pureza deseados o bien, el ADN obtenido no reuniese las condiciones de integridad requeridos, se utilizó el protocolo Marsal y col. (2011) con la inclusión del PVP (que ya se usa siempre por defecto) (Tabla 1). Para muestras de madera (material lignificado) y otro tipo de material comercial, se ha usado el protocolo Marsal y col. (2011). En el caso de que el resultado obtenido no fuera satisfactorio, se ha añadido un lavado adicional de cloroformo.

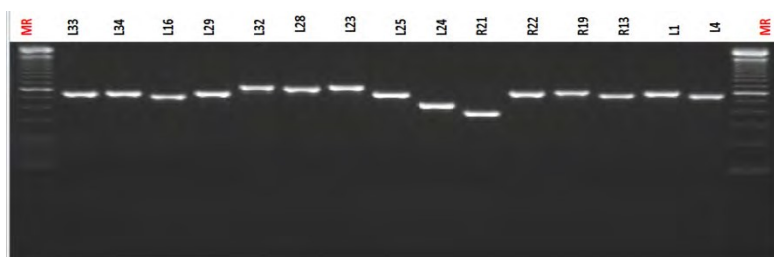
En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para las diferentes especies usadas según el rendimiento (ng/ $\mu$ l) y los índices  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  que nos darán una idea de la efectividad y de la pureza de los protocolos testados. Las muestras entre L12 y L35 (ambas incluidas) corresponden a ejemplares foliares, y tal como hemos comentado anteriormente, se procesaron con el protocolo de Marsal y col. (2013). En cambio, para las muestras comprendidas entre la L1 hasta la L10, se ha utilizado el método de Marsal y col. (2011), ya que presumiblemente serían muestras complicadas por estar procesadas o ser tejidos difíciles (recalcitrantes). Por otro lado, las muestras con código "R", son repeticiones correspondientes a las muestras "L", se trata de tejido foliar que no han alcanzado los índices de pureza requeridos en primera estancia con Marsal y col. (2013) (marcadas en la Tabla 1 con un color grisáceo). Las vitáceas L1 y L27 se incluyeron en el estudio como ejemplares de referencia.

Los resultados son satisfactorios para la mayoría de las especies, siendo los valores óptimos de extracción para  $A_{260}/A_{280}$  y para  $A_{260}/A_{230}$  próximos a 2. Las especies en los que el protocolo no consiguió estos valores, están marcados en color gris en las columnas  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ . En la Figura 4 se presentan los resultados de la electroforesis para comprobar la integridad del ADN obtenido por ambos protocolos.

**Tabla 1:** Relación de índices de pureza y rendimiento obtenido para las 30 muestras objeto de estudio y las vitáceas utilizadas como patrón de referencia.

| Código de Muestra | Género                        | Variedad               | Nombre común     | Tipo de muestra    | Protocolo          | ng/µl   | A260/280 | A260/230 |
|-------------------|-------------------------------|------------------------|------------------|--------------------|--------------------|---------|----------|----------|
| L1                | <i>Vitis Vinifera</i>         | Moscatel de Alejandría | Viña             | Sarmiento          | Marsal y col. 2011 | 262,86  | 2,09     | 1,97     |
| L4                | <i>Solanum lycopersicum</i>   | *                      | Tomate           | Fruto Supermercado | Marsal y col. 2011 | 62,04   | 1,95     | 1,64     |
| L5                | <i>Olea europaea</i>          | *                      | Aceitunas        | Fruto Procesado    | Marsal y col. 2011 | 71,84   | 1,62     | 0,17     |
| L6                | <i>Zea mays</i>               | *                      | Corn flakes'     | Fruto Procesado    | Marsal y col. 2011 | 18,82   | 1,77     | 0,14     |
| L7                | <i>Eruca vesicaria</i>        | *                      | Rúcula           | Hoja Supermercado  | Marsal y col. 2011 | 971,24  | 2,11     | 2,01     |
| L8                | <i>Lactuca</i>                | *                      | Iceberg          | Hoja Supermercado  | Marsal y col. 2011 | 261,84  | 2,07     | 2,10     |
| L9                | <i>Phaseolus vulgaris</i>     | *                      | Judía Verde      | Hoja Supermercado  | Marsal y col. 2011 | 319,74  | 2,08     | 1,95     |
| L10               | <i>Phynus/Musa</i>            | *                      | Plátano desecado | Fruto Procesado    | Marsal y col. 2011 | 230,33  | 2,03     | 0,66     |
| L12               | <i>Juglans regia</i>          | Gales                  | Nogal            | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 1651,07 | 2,08     | 2,20     |
| L13               | <i>Mentha spicata</i>         | *                      | Hierba Buena     | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 393,50  | 1,63     | 1,15     |
| L14               | <i>Cydonia oblonga</i>        | Wranja                 | Membrillo        | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 1451,92 | 2,08     | 2,10     |
| L15               | <i>Ficus carica</i>           | Breva                  | Higuera          | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 131,24  | 1,45     | 0,85     |
| L16               | <i>Malus domestica</i>        | Verde Doncella         | Manzano          | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 411,68  | 2,03     | 2,13     |
| L17               | <i>Pyrus communis</i>         | Ercolini               | Peral            | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 53,70   | 1,56     | 0,92     |
| L18               | <i>Malus domestica</i>        | Golden Delicius        | Manzano          | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 219,47  | 1,71     | 1,00     |
| L19               | <i>Olea europaea</i>          | Manzanilla Real        | Olivo            | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 68,44   | 1,36     | 0,55     |
| L20               | <i>Eriobotrya japonica</i>    | Japón                  | Nispero          | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 372,51  | 2,02     | 1,68     |
| L21               | <i>Magnolia gallisonensis</i> | *                      | Magnolia         | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 415,95  | 2,54     | 0,84     |
| L22               | <i>Quercus robur</i>          | *                      | Roble            | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 262,20  | 1,82     | 0,75     |
| L23               | <i>Acacia comun</i>           | *                      | Acacia           | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 708,73  | 1,94     | 1,74     |
| L24               | <i>Eucaliptus gumi</i>        | *                      | Eucalipto        | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 1624,93 | 2,09     | 2,24     |
| L25               | <i>Corylus</i>                | *                      | Avellano         | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 1861,69 | 2,04     | 2,18     |
| L26               | <i>Prunus armeniaca</i>       | Moniqui                | Albaricoquero    | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 811,74  | 1,88     | 1,86     |
| L28               | <i>Prunus arium</i>           | Burlat                 | Cerezo           | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 706,77  | 2,11     | 1,99     |
| L27               | <i>Vitis vinifera</i>         | *                      | Viña             | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 243,68  | 2,01     | 1,52     |
| L29               | <i>Prunus dulcis</i>          | Marcona                | Almendro         | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 702,43  | 2,05     | 2,09     |
| L30               | <i>Prunus dulcis</i>          | Vairo                  | Almendro         | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 691,58  | 2,07     | 1,95     |
| L31               | <i>Allium sativum</i>         | *                      | Ajera            | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 376,03  | 1,68     | 1,02     |
| L32               | <i>Rosa</i>                   | *                      | Rosal            | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 579,44  | 1,90     | 1,73     |
| L33               | <i>Solanum lycopersicum</i>   | *                      | Tomatera         | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 1829,68 | 2,09     | 2,13     |
| L34               | <i>Solanum tuberosum</i>      | *                      | Patata           | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 4566,78 | 1,88     | 1,97     |
| L35               | <i>Citrus limon</i>           | *                      | Limonero         | Hoja               | Marsal y col. 2013 | 2329,18 | 1,51     | 1,33     |
| R13               | <i>Mentha spicata</i>         | *                      | Hierba Buena     | Hoja               | Marsal y col. 2011 | 558,51  | 2,08     | 1,64     |
| R15               | <i>Ficus carica</i>           | *                      | Higuera          | Hoja               | Marsal y col. 2011 | 413,15  | 1,74     | 1,12     |
| R17               | <i>Pyrus communis</i>         | Ercolini               | Peral            | Hoja               | Marsal y col. 2011 | 74,89   | 1,77     | 2,13     |
| R19               | <i>Olea europaea</i>          | Manzanilla Real        | Oliva            | Hoja               | Marsal y col. 2011 | 353,24  | 2,04     | 2,21     |
| R18               | <i>Malus domestica</i>        | Golden Delicius        | Manzano          | Hoja               | Marsal y col. 2011 | 652,11  | 2,06     | 2,17     |
| R21               | <i>Magnolia gallisonensis</i> | *                      | Magnolia         | Hoja               | Marsal y col. 2011 | 663,10  | 1,96     | 1,87     |
| R22               | <i>Quercus robur</i>          | *                      | Roble            | Hoja               | Marsal y col. 2011 | 2012,28 | 2,03     | 2,23     |

\* No se dispone de esos datos.



**Figura 4:** Gel de electroforesis donde se presenta la integridad del ADN extraído (solamente para algunas muestras).

## 4. Conclusiones

- Ambos protocolos funcionan para todas las muestras objeto de estudio (universalidad)

## 5. Bibliografía

- Marsal, G., Baiges, I., Canals, J.M., Zamora, F., Fort F. (2011). A Fast, Efficient Method for Extracting DNA from Leaves, Stems, and Seeds of *Vitis vinifera* L. *Am. J. Enol. Vitic.*, 62, 376-381 (2011)
- Marsal, G., Boronat, N., Canals, J.M., Zamora, F., Fort F. (2013). Comparison of the Efficiency of some of the most usual DNA Extraction Methods for Woody Plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 47, 227-237