

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DEL DNA DE *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLECTADOS EN MAÍZ EN GUASAVE, SINALOA

Jesús Alicia Chávez-Medina¹✉, Cristino Baruch García-Negroe², Fausto de Jesús Soto-López¹, Andrés Martín Góngora-Gómez¹, Gabriela Lizbeth Flores-Zamora, Rosa Luz Gómez-Peraza y José Luis Martínez-Carrillo³

¹CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Guasave, Sinaloa, México, C. P. 81101.

²ITSL, Carretera Sinaloa de Leyva- León Fonseca kilómetro 3.5, Sinaloa de Leyva, Sinaloa, C. P. 81900.

³ITSON, 5 de Febrero No. 818 Sur, Centro, Ciudad Obregón, Sonora, México, C. P. 85000.

✉ Autor de correspondencia: aliciachavez@hotmai.com

RESUMEN. La extracción de DNA es un factor limitante en estudios genéticos que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por lo que es importante utilizar protocolos que permitan obtener cantidades suficientes de DNA con una pureza y concentración elevada. En el presente trabajo se evaluaron tres métodos de extracción de DNA a partir de larvas *Spodoptera frugiperda* basados en CTAB, H. Guanidina y Buffer STE; las cantidades promedio obtenidas fueron 1157, 1564 y 611 ng/μL respectivamente, las cuales son suficientes para la amplificación por PCR de algún tipo de marcador molecular; las diferencias estadísticamente fueron significativas. El DNA obtenido con el método que usa Buffer STE presentó mayor contaminación con proteínas ($A_{260}/A_{280} = 1.37$) que con los métodos con H. Guanidina y Buffer CTAB (2.12 y 1.8). El DNA obtenido con el método CTAB aunque no fue el de mayor concentración, sí presentó menor degradación que el obtenido con los métodos Guanidina y STE, por lo que el método de CTAB es el mejor método de extracción con alta concentración y calidad de DNA de *S. frugiperda* para estudios de variabilidad genética.

Palabras clave: Extracción de ADN, calidad de ADN, CTA, H. Guanidina. STE.

Technical standardization of DNA extraction of *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Maiz collected in Guasave, Sinaloa

ABSTRACT. DNA isolation has been a limiting step for genetic studies based on polymerase chain reaction PCR, because of that it is important to use protocols which help to achieve good DNA quality and quantity. In the present study, two protocols based on CTAB, H. guanidin and STE were evaluated to obtain DNA from *Spodoptera frugiperda*, obtaining 1157, 1564 y 611ng/μL from CTAB, H, Guanidin and STE methods; significant differences between methods were found. The DNA purity was higher by using the CTAB protocol ($A/A = 1.8$) than using STE and H. Guanidin protocols (1.37-2.12). The use of CTAB to isolate DNA from *S. frugiperda* allows obtaining this substance in an adequate quantity and quality for studies of genetic variability.

Key words: DNA extraction, DNA quality, CTAB, DNA Guanidin, STE.

INTRODUCCIÓN

Spodoptera frugiperda, es una especie polifitófaga nativa del trópico con amplia distribución geográfica, desde Argentina y Chile, hasta el sur de Estados Unidos, prefiere hojas y brotes tiernos, especialmente los cogollos (Sosa, 2002). Este insecto ataca a los cultivos de maíz, sorgo, cacahuate, algodón, soya, higuera, tomate y tomatillo, alfalfa, cebolla, caña de azúcar, ajonjolí, arroz, melón y al girasol (Zenner *et al.*, 2007 y Casmuz *et al.*, 2010). Algunos de los hospederos descritos para la plaga son: zacate grama (*Cynodon dactylon*), mijo perla (*Pennisetum glaucum*), festuca alta (*Festuca arundinacea*), ballica (*Lolium sp.*), centeno (*Secale cereale*), avena (*Avena sativa*), pasto elefante (*Miscanthus giganteus*) entre otros (Casmuz *et al.*, 2010).

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en sus características fisicoquímicas de la molécula (Alejos *et al.*, 2010). Por tal motivo se pueden utilizar distintos protocolos para extraer los ácidos nucleicos de células de animales y vegetales, abriendo posibilidades de evaluación de la técnica con relación en los resultados obtenidos en una misma especie. Para su evaluación se utilizan herramientas como cuantificación mediante NanoDrop y Electroforesis en gel de agarosa.

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener cantidad y calidad de ADN adecuados, así como, garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula (Alejos *et al.*, 2010). En la actualidad con el avance de la ciencia nace la necesidad de la búsqueda de alternativas más simples y mejores que generen resultados confiables al momento de extraer ácidos nucleicos de las células y que lleven consigo mejoras tanto en la calidad y cantidad de ADN extraído. Cuyo resultado será de vital importancia en estudios posteriores, ya sea para la búsqueda y creación de estrategias de control y combate, así como para la colaboración acerca de la información existente de dicha especie.

El propósito de este estudio fue obtener un método eficiente, reproducible, económico y confiable para la obtención ADN destinado a estudio con marcadores moleculares.

MATERIALES Y MÉTODO

Se colectaron larvas de *S. frugiperda* en campos de maíz de Guasave, Sinaloa, durante el ciclo agrícola 2015-2016. La colecta en forma manual y con muestreos completamente al azar en los diferentes lotes visitados y mediante la toma manual de la plaga, basándose en avistamientos de heces frescas o en la búsqueda de daños generados por la plaga. Prestando suma importancia a los rasgos morfológicos de larvas para evitar e colectar especies distintas a *S. frugiperda*. El manejo de los especímenes de campo a laboratorio se realizó de forma individual en frascos del No. 1, etiquetados con el nombre de la localidad, fecha y cultivo y se transportaban al laboratorio. Con el fin de corroborar la especie de los ejemplares, se revisaron bajo un estereoscopio y con la ayuda de claves taxonómicas se observaron las principales características de la especie (Tood y Poole 1980). Los especímenes colectados se colocaron en tubos eppendorf con alcohol al 70 % con el etiquetado correspondiente y almacenados a -20 °C. Se evaluaron tres métodos de extracción de ADN de *S. frugiperda*, en el cual se utilizó la parte posterior de las larvas del segundo a quinto instar. Los insectos fueron previamente lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente. (T1). Método CTAB (Stewart, 1993, Sambrook y Rusell, 2001), (T2) Método Guanidina (Pramanick, 1976), (T2) Método STE (Acevedo *et al.*, 2007). Para cada método (tratamiento T) se emplearon treinta insectos. Para evaluar la integridad del DNA se realizó electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. La calidad y concentración de las muestras se verificó mediante un Nanodrop 2000c (Thermoscientific®). Para examinar los datos se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron 216 larvas de insectos, las cuales fueron almacenadas en tubos eppendorf con alcohol al 70 %. La identificación se llevó a cabo mediante rasgos morfológicos característicos de la especie y en base a literatura consultada. (Fig. 1). En las imágenes presentadas se muestra el color verde oscuro presente en el costado de las larvas, las tres líneas blancas, los cuatro puntos característicos de la especie y la cabeza con la “Y” invertida de color blanco. Dichos datos concuerdan con lo reportado por Tood y Poole (1980) y Gutiérrez (1984).



Figura 1. Muestra los rasgos morfológicos característicos del gusano *plaga S. frugiperda*.

En total se analizaron 30 individuos de *S. frugiperda* de los cuales el 100 % de las muestras se logró extraer el DNA de los insectos con los tres métodos. El tiempo promedio de extracción para el protocolo CTAB fue alrededor de cuatro horas, tres para Hidrocloruro de Guanidina y para el método STE media hora. Las concentraciones de ADN y las relaciones de absorbancia entre A_{260}/A_{280} , se presentan en la figura 2a, b y c.

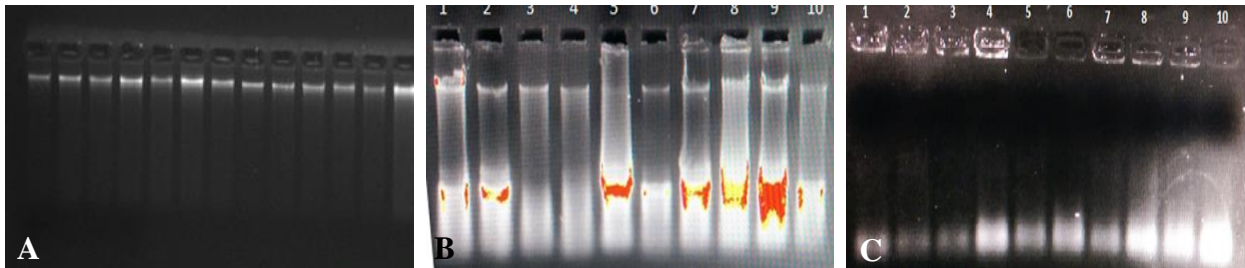


Figura. 2 ADN extraído de larvas de *S. frugiperda* por los tres métodos. a) CTAB, b) H. GUANIDINA, c) STE.

En cuanto a la cantidad de DNA evaluado mediante geles de agarosa, absorbancia y al análisis estadístico aplicado, se encontró mayor concentración en las técnicas de extracción convencionales como el Buffer de CTAB (T1) y el buffer HG (T2) con un promedio de 1158.49 ± 343 ng/ μ l y 1564.74 ± 368 ng/ μ l respectivamente, que incluyeron purificación de ácidos nucleicos, las cuales presentaron bandas de alto peso molecular, mientras que con el método STE (T3) un promedio de 610.93 ± 215 ng/ μ l, aun cuando se observó la presencia de DNA estos fueron en menor concentración (Fig. 3A y B).

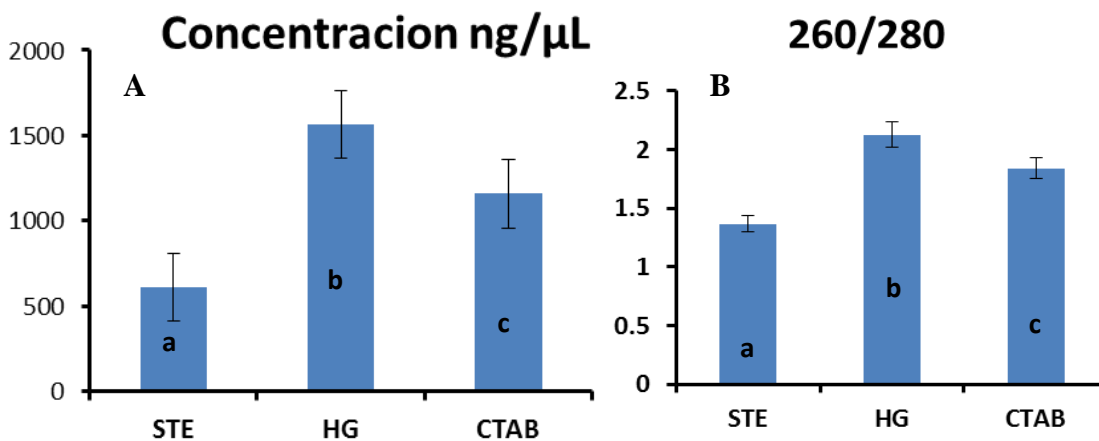


Figura 3. A) Geles de agarosa de DNA de larvas de *S. frugiperda* extraído con los diferentes métodos de extracción: a) CTAB (T1); b) Guanidina (T2); c) *Buffer* STE (T3). B) Determinación de la concentración (ng/ μ L) y la calidad de los DNAs obtenidos mediante las lecturas obtenidas el Nanodrop 2000c (Thermoscientific®)

En base a los datos obtenidos de la absorbancia a 260/280 nm para el método de extracción con buffer STE, los valores mostraron ser los más bajos con un promedio de 1.36 ± 0.03 , mostrando la presencia de proteínas en exceso, lo que significa además que podría haber presencia de basuras, proteínas o restos celulares en las muestras que pudo haber actuado como inhibidores o simplemente degradarlo, mientras que con el método de CTAB, al no ser específica para insectos si no para plantas, resultó con una alta calidad de 1.8 ± 0.07 en su relación A_{260}/A_{280} , comparado con el método HG donde se obtienen DNAs de altas concentraciones, los resultados obtenidos en la absorbancia sobrepasan los límites que indican la ausencia de contaminantes de 2.13 ± 0.03 en su relación A_{260}/A_{280} , además de la presencia de RNA para lo cual sería necesario hacer modificaciones al protocolo y así obtener DNA de una mejor calidad.

Las concentraciones de DNA (ng/ μ l) mediante el método de CTAB son mayores que las que se han reportado en *Boopedon nublium* donde se obtuvieron 286 ng/ μ l como mejor resultado y una pureza de 1.46 en su relación A_{260}/A_{280} (Torres *et al.*, 2012). Sin embargo los valores obtenidos en este estudio son compatibles con los que se han reportado para diferentes especies del género *Diabrotica* y en el cual las cantidades de ADN fueron de 827 y 926 ng/ μ l con una pureza de 1.9 en su relación de A_{260}/A_{280} (Barragan-Valencia *et al.*, 2009., y Torres *et al.*, 2012).

No obstante en trabajos previos se ha demostrado que métodos de extracción como el STE, puede ser utilizado con mayor éxito en técnicas moleculares como PCR para la amplificación de fragmentos de ADN genómico, además recomiendan dicho método para ser utilizado en insectos (Acevedo *et al.*, 2007).

CONCLUSIÓN

Los métodos de extracción evaluados permiten obtener cantidades suficientes de la molécula de DNA para estudios posteriores, debido a que el 100 % de las muestras reflejó presencia del ácido nucleico.

En cuanto a la cantidad de DNA evaluado mediante geles de agarosa, absorbancia y al análisis estadístico aplicado, se encontró mayor concentración en las técnicas de extracción como el Buffer de CTAB (T1) y el buffer HG (T2), las cuales presentaron altas concentraciones, a diferencia del método STE (T3).

La metodología de extracción con buffer STE demostró obtener buenas cantidades de DNA, sin embargo los valores de absorbancia a 280/260 nm mostraron ser los más bajos de los tres métodos evaluados.

Por otra parte la metodología de CTAB se logró obtener buenas concentraciones y una alta pureza, pero no mostró ser el método que presenta las más altas concentraciones de DNA a diferencia del método de H. Guanidina donde obtiene mayor cantidad de DNAs pero con presencia de contaminantes además de RNA.

La metodología que incluye el uso de buffer CTAB fue escogido como el mejor método de extracción de DNA comparado con el buffer de H. Guanidina y STE. Sin embargo, queda pendiente los resultados que se obtengan mediante la realización de la reacción en cadena de la polimerada (PCR) para confirmar el método de extracción más adecuado para la identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* la cual es la finalidad de este trabajo.

Agradecimientos

Al instituto Politécnico Nacional por su apoyo del proyecto.

Literatura Citada

- Acevedo, B., Navarro, E., Constantino, C., Gil, P. y M. Benavides. 2007. Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. *Cenicafé*, 58(2): 134–141.
- Alejos-Velazquez, L. P., Aragón-Martinez, M. del C. y A. Cornejo-Romero. 2010. Extracción y purificación de ADN. Pp. 1–26. *In: Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B. y M. G. Rocha-Munive (Comps.). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y práctico.* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Gutiérrez, M. 1984. Factores interferentes en la captura de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) probando dos tipos de trampas de feromonas (Z)-9-DODECEN-1-OL-ACETATO. Tesis profesional de licenciatura. Villaflores, Chiapas, México.
- Casmuz A., Juárez, M., Socías, M., Murua, M., Prieto, S., Medina, S., Willink, E. y G. Gastaminza 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica de Argentina*, 69: 209–231.
- Pramanick, D. K., Forstová, J. and L. Pivec. 1976. 4M Guanidine hydrochloride applied to the isolation of DNA from different sources. 62(1): 81–84.
- Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. 3^a edition Cold Spring Harbor Laboratory Press. 44 p.
- Sosa, M. 2002. *Daño por Spodoptera frugiperda (Lepidóptera: Noctuidae) en maíz bajo siembra directa en diferentes épocas en el noreste santafesino.* INTA-Estación Experimental Agropecuaria Reconquista, Santa Fe, Argentina. 5 p.
- Stewart, N. and L. Via. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique for RAPD fingerprint and other PCR applications. *Biotechniques*, 14: 748–749.
- Tood, E. and W. Poole. 1980. Keys and illustrations for the Armyworm Moths of the Noctuid genus *Spodoptera* Gueene from the Western Hemisphere. *Annals of the Entomological Society of America*, 73: 722–738.
- Torres, R. 2012. *Comparación de dos métodos de extracción de ADN de Boopedon nublium para estudios de variabilidad genética.* CIIDIR- IPN Unidad Durango. Tesis Doctorado. 100 p.
- Zenner, I., Arévalo, H. y R. Mejía 2007. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1 (1): 103–113.