

**COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN  
GENÓMICO EN BABOSAS PLAGAS (MOLLUSCA: GASTERÓPODA)**  
**COMPARISON OF DIFFERENT GENOMIC DNA EXTRACTION METHODS FOR  
PESTS SLUG (MOLLUSCA: GASTEROPODA)**

***Luis Angulo Graterol, Ph.D.***

Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Venezuela (Venezuela).  
Docente e Investigador categoría Asistente del Departamento e Instituto de Genética y Jefe del  
Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola de  
la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Venezuela.

luis.r.angulo@ucv.ve

***Guillermo Antonio Perichi Cabrera MSc.***

Magister Scientiarum en Agronomía, Universidad Central de Venezuela (Venezuela).  
Docente e Investigador categoría Agregado del Departamento e Instituto de Zoología Agrícola,  
Jefe de Cátedra de Zoología Agrícola y Coordinador del Laboratorio de Nematología Agrícola  
de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Venezuela.

perichig@hotmail.com

***Luis Dinitri Castro Chacín, Lcdo.***

Licenciado en Agroecología de la Universidad Bolivariana de Venezuela (Venezuela).  
Profesional de Investigación 6-V del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro  
Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maracay, Venezuela.

luiscastro185@gmail.com

***Rosana Figueroa Ruíz, Ph.D.***

Doctora en Mejoramiento Genético de Plantas de la Universidad de Minnesota (EEUU).  
Docente e Investigadora categoría Asociada del Departamento e Instituto de Ingeniería  
Agrícola de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Venezuela.

valleverde2003@gmail.com

**ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN**

Recibido: 26 de junio de 2020.

Aceptado: 30 de julio de 2020.

## RESUMEN

La presente investigación fue planteada con el objetivo de comparar tres métodos de extracción de ADN en muestras de tejido epitelial de babosa (Mollusca: Gasterópoda). Se utilizaron los protocolos: (1) Extracción con SDS (SDS); (2) Extracción con CTAB y 2β-mercaptoetanol (CTAB-β); y (3) Extracción con SDS y proteinasa K (SDSpK); para determinar el método más apropiado de obtención de ADN, de alto peso molecular y pureza, para ser utilizado en análisis genético. Se utilizó la especie de babosa (*Arion subfuscus*) y seis repeticiones, para un total de 18 observaciones. La concentración y pureza del ADN se estimó espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 260 nm y la relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$  nm, respectivamente. Esos datos fueron utilizados para realizar el análisis estadístico, de acuerdo a un diseño completamente al azar con seis repeticiones. En el análisis de la varianza se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) para la cantidad, concentración y pureza entre los protocolos. En la prueba de comparación entre medias de Tukey, el protocolo (SDSpK) permitió obtener ADN con mayor peso molecular ( $2\ 514,90 \pm 291,56$ ) y pureza ( $1,97 \pm 0,02$ ). La calidad del ADN de cada protocolo fue verificada mediante PCR-RAPD. Se observó poca reproducibilidad para el cebador OPA-02, del ADN obtenido mediante el procedimiento de extracción SDS; mientras que en los otros métodos se logró obtener ADN sin degradación y puro, lo cual permitió observar perfiles de amplificación de alta resolución y bandas reproducibles. Se recomienda utilizar el protocolo (SDSpK) para la obtención de ADN genómico de alto peso molecular, calidad y pureza en babosas.

Palabras clave: Extracción de ADN, molecular, tejido epitelial, PCR, RAPD, babosas

## ABSTRACT

This research was raised in order to compare three methods for extracting DNA samples from epithelial tissue slug (Mollusca: Gastropoda). The protocols used: (1) SDS Extraction (SDS); (2) CTAB and 2-βmercaptoetanol Extraction (CTAB-β); and (3) SDS and K proteinase Extraction (SDSpK); to determine the most appropriate method for obtaining DNA, high molecular weight and purity, to be used in genetic analysis. It was used species of slugs (*Arion subfuscus*), six replicates for a total of 18 observations. The DNA concentration and purity were estimated spectrophotometrically by absorbance at 260 nm and the  $Abs_{260}/Abs_{280}$  nm, respectively. These data were used to determine statistical analysis, according to a completely randomized design

with six replications. In the analysis of variance significant differences ( $p < 0.01$ ) for the quantity, concentration and purity between methods it was detected. In comparison test Tukey, protocol (SDSpK) procedure yielded DNA with higher molecular weight ( $2\ 514.90 \pm 291.56$ ) and purity ( $1.97 \pm 0.02$ ). The DNA from each protocol was verified by RAPD-PCR. Poor reproducibility OPA-02 primer was observed DNA obtained by the protocol SDS; lie in the other methods it was possible to obtain pure DNA without degradation, allowing amplification profiles observed with high resolution and reproducible bands. It was recommended to use (SDSpK) protocolo to obtain higher molecular weight, quality and purity in slug genomic DNA.

Keywords: Extraction DNA, molecular, epithelial tissue, PCR, RAPD, slug

## INTRODUCCIÓN

Las babosas *Arion subfuscus* Draparnaud, *Deroceras reticulatum* Müller y *Lehmannia valentiana* Ferussac son gasterópodos pulmonados de origen europeo, introducidos en muchas partes del mundo, asociados como una plaga agrícola y en los últimos 50 años las babosas se han extendidos a muchos otros países del mundo, donde se han considerado como una especie invasiva, con efectos negativos en la biodiversidad nativa de los ecosistemas que invaden (Soroka y Kaluski, 2011 y Morinha *et al.*, 2014). La identificación de estos organismos se ha realizado en base a caracteres morfológicos y anatómicos (color del cuerpo, sistema reproductivo, estructura de la vírgula, forma de los espermatozoides y estructura del óvulo); ecológicos (comportamiento de apareamiento); citogenéticos (número de cromosomas) y bioquímicos (polimorfismo enzimático). Muy pocas diferencias en variabilidad morfológica se han observado en las babosas. Los estudios en biología molecular han sido cada vez más utilizados para la identificación, comprender la filogenia y el conocimiento de la historia de estas especies. Los estudios moleculares combinados con la identificación taxonómica y anatómica constituyen una información crucial en estas especies plagas (Gutiérrez *et al.*, 2013).

El primer paso de la mayoría de los métodos de biología molecular para la amplificación por PCR, es la extracción del ADN. Las babosas, como todos los moluscos tienen grandes cantidades de mucopolisacáridos, cadenas largas de moléculas de azúcar, comúnmente denominadas glucosaminoglucanos (Wraith, 2012). El aislamiento de ADN de alto peso molecular en moluscos gasterópodos y su subsiguiente amplificación por PCR ha resultado difícil, debido a secreción de mucopolisacáridos y proteínas polifenólicas presentes en los fluidos

corporales de estas especies. Estas sustancias precipitan con el ADN y dificultan su amplificación al inhibir la actividad de la ADN polimerasa (Morinha *et al.*, 2014; Jaksch *et al.*, 2016 y Chakraborty *et al.*, 2020).

Generalmente, las babosas deben mantenerse en un medio de preservación, como por ejemplo etanol al 70-100% (v/v), lo que complica aún más los resultados de calidad y cantidad en la extracción del ADN (Mc Donnell *et al.*, 2011).

Uno de los protocolos de extracción de ADN utilizados en el género de moluscos gasterópodos fue descrito por Sambrook *et al.* (1989). Ese protocolo ha sido modificado a un procedimiento estándar de extracción de ADN por disolventes orgánicos, proteinasa K y dodecil sulfato de sodio (SDS).

En otros procedimientos de extracción de ADN se realizan modificaciones en la composición de los reactivos del tampón de lisis, en otros casos se incorporan enzimas para la digestión enzimática y la degradación de las proteínas de los componentes celulares. Los detergentes más frecuentes en la solución de extracción son el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Chakraborty *et al.*, 2020) o SDS (Sambrook *et al.*, 1989 y Mikhailova y Johannesson, 1998), utilizados como agentes para solubilizar las membranas celulares y sales que inactiven las enzimas intracelulares. También, se ha sugerido utilizar métodos comerciales y protocolos manufacturados para obtener ADN en moluscos, como el kit para sangre y tejidos de Qiagen DNeasy® (Blood and Tissue Kit, en inglés) (Chakraborty *et al.*, 2020).

Algunos laboratorios tienen disponibles kits de casa comercial para la extracción del ADN en babosas, pero sus costos los hacen de baja disponibilidad para procesar un gran volumen de muestras y se prefiere preparar los tampones de lisis celular (Ross *et al.*, 2010; Soroka y Skujiené, 2011; Mc Donnell, *et al.*, 2011). Sin embargo, las etapas en la extracción del ADN: lisis celular, la cuantificación y la pureza del ADN pueden variar y afectar los resultados en las técnicas de PCR (Gutiérrez *et al.*, 2013).

Por otra parte, la comparación del ADN genómico obtenido para babosas del género *Arion* en diferentes métodos de extracción, se realiza frecuentemente, a través de amplificaciones PCR, para analizar la eficiencia del ADN, con diferentes técnicas como: RAPD, gen 16S ARN ribosomal y gen citocromo c oxidasa, clase subunidad I y secuenciación, observándose variaciones desde 48% al 64% en la efectividad de amplificación para los ADN, cuyas características de integridad

fueron una banda nítida, intacta, luminosa y de poca degradación (Gutiérrez *et al.*, 2013 y Chakraborty *et al.*, 2020).

El presente estudio fue planteado con el objetivo de comparar tres protocolos de extracción de ADN en muestras de tejido epitelial de babosa (Mollusca: Gasterópoda), con la finalidad de determinar cuál es el método que permite obtener ADN de alto peso molecular y pureza, para realizar estudios de caracterización molecular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material gasterópodo terrestre utilizado fue la especie de babosa *Arion subfuscus*, capturada en varias colectas realizadas en tres localidades productoras de fresas (*Fragaria vesca* L.) de la Colonia Tovar, municipio Tovar, estado Aragua, Venezuela. La información de posición geográfica (latitud y longitud) fue precisada mediante GPS (unidades: grados, minutos y segundos) (Tabla 1).

Tabla 1

*Información de los datos de localización de las especies de babosa colectadas en la Colonia Tovar, estado Aragua, Venezuela*

| Localidad   | Latitud        | Longitud        | Altitud<br>(msnm<br>) |
|-------------|----------------|-----------------|-----------------------|
| La Capilla  | N 10°24'46,8'' | W 067°15'56,4'' | 1 906                 |
| Cruz Verde  | N 10°24'05,1'' | W 067°17'46,7'' | 2 004                 |
| La Lagunita | N 10°23'13,6'' | W 067°19'43,2'' | 2 046                 |

Fuente: Elaboración propia.

Las babosas fueron capturadas en doce trampas – refugios específicos para gasterópodos terrestres en el suelo, de 25 x 25 cm, en un área de superficie de 0,75 m<sup>2</sup>, colocadas cerca del área de siembra de cada localidad, siguiendo la metodología de Córdoba (2009) y Mc Donnell *et al.* (2011).

Los animales capturados fueron colocados en contenedores plásticos y preservados en una solución de etanol al 100%, para ser transportados al Laboratorio de Genética Molecular del

Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.

### **Aislamiento del ADN**

Previamente a la extracción del ADN, los especímenes fueron lavados tres veces con agua destilada grado biología molecular. Se utilizó 150 mg de tejido epitelial de cada individuo, diseccionado con la ayuda de un bisturí y colocado en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Se comparó la efectividad en la obtención de ADN genómico en tres protocolos reportados en la literatura: Protocolo (1) extracción con SDS propuesto por Sambrook *et al.* (1989) (SDS); (2) extracción con CTAB y 2-βmercaptoetanol de Levitan y Grosberg (1993) (CTAB-β); y (3) extracción con SDS y proteinasa K descrito por Mikhailova y Johannesson (1998) (SDSpK). En cada protocolo de extracción se utilizaron seis individuos, para un total de 18 observaciones; considerando cada individuo como una repetición.

A continuación, se describen los pasos seguidos en cada protocolo:

#### **Protocolo (1) Extracción con SDS (SDS)**

1. El tejido diseccionado de las babosas fue lavado con la solución tampón de lisis (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM EDTA, pH 8,0 y 1% de SDS) y transferido a su tubo de 1,5 mL, que contenía 500 µL de tampón de lisis y se aplicó vortex hasta ser homogenizado.
2. Incubar los tubos a 56 °C en un baño seco por 3 horas. A cada tubo se les colocó 500 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico - 25:24:1 (FCA) y fueron agitados horizontalmente durante 6 minutos.
3. Centrifugar los tubos a 6.000 min<sup>-1</sup> por 5 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 mL, que contenga un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico - 24:1 (CA).
4. Colocar los tubos en agitación durante 5 minutos y centrifugar a 6.000 min<sup>-1</sup> por 5 minutos.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo con igual volumen de 25:24:1 (FCA), agitar los tubos y luego centrifugar bajo las mismas condiciones antes mencionadas.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, que contenga dos volúmenes de etanol frío (95%), para precipitar el ADN y centrifugar a 6.000 min<sup>-1</sup> por 5 minutos.

7. Descartar el alcohol y lavar el pelet dos veces con etanol (70%), para remover el exceso de sales.

8. Dejar los tubos a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente, agregar 50  $\mu$ L de TE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) o agua destilada grado biología molecular, para resuspender el ADN.

### **Protocolo (2) Extracción con CTAB y 2- $\beta$ mercaptoetanol (CTAB- $\beta$ )**

1. Cada muestra de tejido diseccionado de la babosa en su tubo fue triturada con la ayuda de una punta de micropipeta estéril.

2. Agregar a cada tubo 500  $\mu$ L de tampón de extracción 2X CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% 2-mercaptoetanol; 20 mM EDTA y 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) y 5  $\mu$ L proteinasa K (25mg.mL<sup>-1</sup>).

3. Incubar los tubos a 65°C por 90 minutos.

4. Extraer cada muestra dos veces con 500  $\mu$ L de solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), seguida por una extracción simple con 500  $\mu$ L de solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).

5. Mezclar bien cada solución con la muestra antes de centrifugar a 8.000 min<sup>-1</sup> por 18 minutos.

6. Luego de cada centrifugación, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 mL.

7. Adicionar al ADN precipitado 1 mL de etanol (95%) y colocar los tubos a -20°C durante 20 minutos.

8. Cuidadosamente mezclar los tubos por inversión y centrifugar a 8.000 min<sup>-1</sup> durante 20 minutos.

9. Descartar el alcohol y lavar el pelet dos veces con etanol (70%).

10. Dejar los tubos toda la noche a temperatura ambiente.

11. Rehidratar el pelet en 50  $\mu$ L TE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0).

### **Protocolo (3) Extracción con SDS y proteinasa K (SDSpK)**

Este procedimiento fue una modificación a la metodología descrita por Sambrook *et al.* (1989), la cual consistió en adicionar al tampón de extracción (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM EDTA,

pH 8,0 y 1% de SDS) 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de proteinasa K. Los pasos para la lisis celular, purificación y extracción del ADN fueron citados en el protocolo original de Sambrook *et al.* (1989).

### **Cuantificación del ADN obtenido**

La concentración del ADN extraído por los diferentes métodos se estimó espectrofotométricamente, en un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA), midiendo su absorbancia a 260 nm y la pureza de las muestras se determinó mediante relación  $A_{260}/A_{280}$  nm, en la Unidad de Biotecnología Vegetal, del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Maracay, estado Aragua, Venezuela.

### **Amplificación**

Para analizar la calidad del ADN fue utilizada la técnica de RAPD. El ADN de las muestras obtenido por los diferentes métodos (25 ng.μL<sup>-1</sup>) fue evaluado mediante su amplificación PCR con dos iniciadores aleatorios RAPD: OPA-02 (TGCCGAGCTG) y OPA-09 (GGGTAACGCC), secuencias decaméricas Operon Technology®.

La mezcla de reacción y los ciclos del termociclador fueron descritos por Williams *et al.* (1990), con modificaciones realizadas por Levitan y Grosberg (1993) y Periche (2014) para un volumen final de 25 μL, la cual consistió en 0,2 U.μL<sup>-1</sup> Taq comercial; tampón 1X; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada uno de los dNTP's; 1,2 μM del cebador. Las reacciones fueron amplificadas en un termociclador PTC-100 BIO-RAD, programadas para 44 ciclos, con un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos y una extensión final a 72°C por 5 min. Cada ciclo de amplificación consistió en 1 minuto a 94°C, hibridación a 35°C por 1 minuto y extensión 72°C por 2 minutos.

La separación de los productos se realizó en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5%, 80 V durante 2 horas, utilizando tampón 1X TBE con bromuro de etidio (0,5 μg.mL<sup>-1</sup>). El gel fue visualizado en un transiluminador UV y fotografiado con un analizador de imágenes BIO-RAD Gel DocTM XRR.

### **Diseño y análisis estadístico**

Los resultados de los valores de las concentraciones del ADN (absorbancia a 260 nm) y de la pureza (relación  $A_{260}/A_{280}$  nm) fueron utilizados para determinar sus medias y las desviaciones

estándares. Los resultados fueron analizados estadísticamente, de acuerdo a un diseño completamente al azar con seis repeticiones, mediante el programa estadístico SAS (Carry, NC). En aquellos casos, donde el análisis de la varianza detectó diferencias significativas a valores de  $p$  menores 0,05, se efectuó la prueba de comparación entre medias de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres métodos de extracción permitieron obtener ADN en diferentes concentraciones. El promedio de las concentraciones obtenidas fue mayor por el método SDS-pK, mientras que la menor fue para el método SDS. Los métodos de extracción de CTAB- $\beta$  y SDS-pK fueron los que presentaron el mejor índice de pureza, dado que la mayoría de los valores de la relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$  nm estuvo en el intervalo 1,8-2,0; es decir valores más estables en pureza, integridad y calidad del ADN. El método SDS fue el que mostró el menor peso molecular del ADN y valores de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  nm menores a 1,8; indicativo de contaminación con ARN, proteínas u otras sustancias que pueden afectar la pureza del ADN (Tabla 2).

Tabla 2

*Comparación entre los valores promedios y desviación estándar de la concentración y pureza de los tres métodos de extracción de ADN*

| Método de extracción | Concentración del ADN (ng. $\mu$ L <sup>-1</sup> ) | Relación $Abs_{260}/Abs_{280}$ |
|----------------------|--|--------------------------------|
| SDS                  | 434,03 $\pm$ 36,55                                 | 1,73 $\pm$ 0,06                |
|                      | 650,57 $\pm$ 40,65                                 | 1,66 $\pm$ 0,15                |
| CTAB- $\beta$        | 773,33 $\pm$ 91,78                                 | 2,01 $\pm$ 0,02                |
|                      | 734,00 $\pm$ 12,00                                 | 2,09 $\pm$ 0,02                |
| SDS-pK               | 2 514,90 $\pm$ 291,56                              | 1,97 $\pm$ 0,02                |
|                      | 1 488,30 $\pm$ 226,77                              | 1,99 $\pm$ 0,07                |

Fuente: Elaboración propia.

Posiblemente, las diferencias entre la pureza y concentración de los ADN obtenidos mediante los protocolos SDS y SDS-pK sean por la incorporación de proteinasa K (0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) al tampón de lisis. En el protocolo SDS, sin proteinasa K, la concentración promedio y pureza del ADN fue

menor al obtenido en SDS-pK. Se ha reportado como un paso inicial en la extracción del ADN en babosa, lavar con agua destilada el tejido epitelial, luego macerarlo; colocarlo en una solución tampón (100 mM EDTA, 20 mM Tris y CTAB 2%), adicionar proteinasa K e incubar toda la noche, para garantizar la degradación de las proteínas, con la finalidad de obtener ADN de alta pureza (Gutiérrez *et al.*, 2013).

La proteinasa K en el tampón de lisis tiene una actividad específica y facilita la degradación de todas las proteínas, actúa en los enlaces débiles del polipéptido, hasta que adquieren su estructura primaria y pierden su funcionalidad. Esto disminuye la degradación del ADN y permite obtener un ADN de alto peso molecular (Tabla 2). En el procedimiento SDS-pK que incorpora proteinasa k permitió contrastar los resultados obtenidos en muestras sin esa enzima (protocolo SDS) e interferir la correcta estimación y cuantificación del ADN, libre de impurezas y agentes contaminantes. Estos resultados confirman la importancia de utilizar proteinasa k en el procedimiento de extracción del ADN, lo cual permitió obtener muestras suficientemente puras (1,97-2,09 relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$ ) en el protocolo SDS-pK.

El protocolo CTAB-  $\beta$  se diferenció de los otros dos procedimientos en la utilización del CTAB en lugar de SDS en el tampón de lisis. Además, se realizaron dos lavados continuos con solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, seguido por un tercer paso de extracción simple utilizando cloroformo: alcohol isoamílico, en la purificación del ADN. Mientras que, la secuencia en la purificación del ADN en los otros dos protocolos fue un primer lavado con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico; segundo lavado con cloroformo: alcohol isoamílico, para finalizar la purificación mediante fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.

Posiblemente, entre las dificultades de aislar ADN de alto peso molecular en especies de moluscos gasterópoda está la excesiva secreción de mucopolisacáridos y la presencia de polifenoles en los tejidos epiteliales del animal, los cuales precipitan con el ADN y pueden afectar la amplificación por PCR, como alternativa se han propuesto otros métodos que incorporar CTAB, para mejorar la calidad y pureza del ADN (Jaksch *et al.*, 2016 y Chakraborty *et al.*, 2020).

En el análisis de la varianza se detectaron diferencias ( $p < 0,01$ ) para la concentración (absorbancia a 260 nm) y los valores de la pureza (relación entre la absorbancia 260/280) entre los protocolos de extracción de ADN (Tabla 3).

Tabla 3

*Cuadrados medios del análisis de la varianza de la concentración y pureza del ADN obtenido de tejido epitelial de babosa mediante tres protocolos*

| Fuente de variación  | gl         | Cuadrados Medios                             |   |
|----------------------|------------|--|---|
|                      |            | Concentración del ADN (ng.µL <sup>-1</sup> ) | Relación Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>280</sub> |
| Método de extracción | 2          | 3731569,96**                                 | 0,21**  |
| Repetición           | 5          | 99921,72                                     | 0,01  |
| Error                | 10         | 144988,34                                    | 0,01  |
| Total                | 17         |  |   |
|                      | <b>%CV</b> | 34,64  | 3,92  |

Nota. Grados de libertad (gl), porcentaje coeficiente de variación (%CV), diferencias significativas (\*\* $p < 0,01$ ). Fuente: Elaboración propia.

En la prueba de comparación entre medias de Tukey, el método SDS-pK fue el que obtuvo la mayor concentración de ADN, mientras que no se detectaron diferencias estadísticas entre las medias para los otros dos procedimientos. Al comparar las medias de la pureza del ADN (relación  $A_{260}/A_{280}$  nm) de los protocolos analizados fue también significativa ( $p < 0,01$ ). Los valores promedios para la pureza del ADN entre los métodos SDS-pK y CTAB-β fueron estadísticamente diferentes al método SDS (Tabla 4).

Tabla 4

*Prueba de comparación entre medias para la concentración del ADN y pureza obtenidos en tres procedimientos de extracción de ADN en babosa*

| Método de extracción | Concentración del ADN (ng.µL <sup>-1</sup> ) | Relación Abs <sub>260</sub> /Abs <sub>280</sub> |
|----------------------|--|---|
| ADN genómico         |  |   |
| SDS-pK               | 2 001,60 <sup>a</sup>                        | 1,98 <sup>a</sup>                               |
| CTAB-β               | 753,67 <sup>b</sup>                          | 2,05 <sup>a</sup>                               |

SDS

542,30<sup>b</sup>

1,68<sup>b</sup>

Nota: Medias con superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (\*\* $p < 0,01$ ), según la prueba de Tukey. Fuente: elaboración propia.

Los resultados anteriores confirman la importancia de elegir un método de obtención de ADN de calidad para ser utilizado en las técnicas y estudios de caracterización molecular. La selección de un procedimiento de extracción de ADN puede ser crítica para lograr obtener ADN de alto peso molecular, alta pureza y adecuado para realizar análisis moleculares, disminuyendo de esta forma, la visualización de falsos resultados o poca calidad de los productos amplificados, como ha sido señalado por Gutiérrez *et al.* (2013)

Al utilizar el ADN genómico obtenido en la prueba de verificación de la calidad del ADN mediante su amplificación, se visualizaron los productos de amplificación (amplicones) en ambos cebadores y con todos los ADN, pero de apreciación visual variable en la intensidad y resolución de los amplicones. RAPD es una técnica muy sensible a las condiciones de la mezcla de reacción PCR y la repetibilidad. Por estas razones, se realizó la amplificación con el mismo ADN molde, de cada protocolo, repetido dos veces, con la finalidad de observar en los resultados, los patrones consistentes entre las repeticiones del mismo individuo y cada protocolo de extracción (Figura 1).

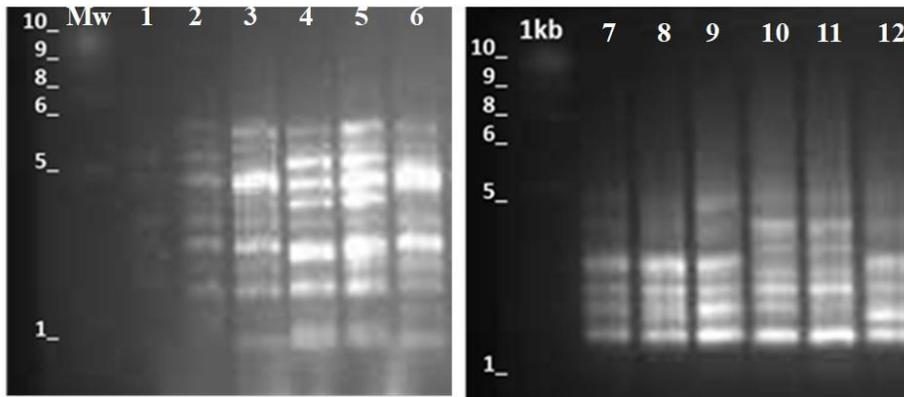


Figura 1. Amplificación PCR-RAPD del ADN obtenido mediante tres métodos de extracción. Carriles 1-6: Cebador OPA-02; 7-12: Cebador OPA-09. Mw: Marcador 1kb (Promega); 1-2 y 7-8 (ADN obtenido utilizando el método SDS); 3-4 y 9-10 (ADN método CTAB-β); 5-6 y 11-12 (ADN método SDS-pK).

En todos los métodos se logró amplificación de patrones de bandas. Sin embargo, el ADN obtenido por los métodos CTAB- $\beta$  y SDS-pK fueron los que presentaron mejor resolución de los perfiles electroforéticos y repetibilidad, posiblemente por la calidad y pureza del ADN ( $A_{260}/A_{280}= 1,98$ ), libre de contaminantes y sin sobreestimación en su cuantificación, si se compara con la metodología SDS, (Figura 1).

Las bandas visualizadas del cebador OPA-02 a partir del procedimiento SDS fueron de baja resolución, con pocos patrones de bandas repetibles, confirmando la poca calidad y pureza de su ADN ( $A_{260}/A_{280}=1,69$ ) en la validación PCR-RAPD.

Es importante señalar que el cebador OPA-02 ha sido utilizado para validar protocolos de obtención de ADN en triatomíneos (Fraga *et al.*, 2004) en un estudio de comparación entre cinco métodos para la extracción de ADN y su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar.

La PCR requiere poca cantidad de ADN molde para su amplificación y un ADN con una relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  óptima con un valor entre 1.8-2.0. La prueba de amplificación por PCR permite verificar la calidad de los ADN obtenidos en cada método (mediante espectrofotometría  $A_{260}/A_{280}$ ), es decir, un ADN de pureza puede ser un indicativo de su capacidad de amplificación (Chakraborty *et al.*, 2020). En los métodos CTAB- $\beta$  y SDS-pK se obtuvo la mayor concentración del ADN y de mejor pureza. Posiblemente, los valores de absorbancia del método SDS pueden inferir la presencia de inhibidores de la PCR que afectan la amplificación de las bandas y la calidad visual (resolución de los productos amplificados) en la electroforesis.

## CONCLUSIONES

Los tres protocolos se iniciaron con la misma cantidad de tejido epitelial, sin la necesidad de utilizar un órgano interno del animal y permitieron obtener ADN. En el primer método de extracción de ADN (método SDS) se cuantificó la menor cantidad y pureza de ADN, en la concentración y relación de absorbancia obtenida a una longitud de onda  $A_{260}$ . En el segundo método (método CTAB- $\beta$ ) se obtuvo una cuantificación de ADN sin diferencias significativas al método SDS y un valor de pureza óptima. El método que permitió obtener ambas características de cuantificación y pureza fue el método SDS-pK, con los mayores valores de alto peso molecular y una relación  $A_{260}/A_{280}$  muy estable y ADN de pureza óptima. Por estas razones, se recomienda

utilizar el método de extracción SDS-pK, por obtener ADN de alto peso molecular, calidad y pureza, para realizar estudios de caracterización molecular. Esta información puede ser utilizada en futuras investigaciones, para la caracterización genética de poblaciones de babosas plagas, como una herramienta molecular en los estudios de caracterización anatómica y morfológica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chakraborty, S.; S. Anwasha and N. Aravind. (2020). Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: Is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits? *Biotech* 10:69. doi.org/10.1007/s13205-020-2051-7
- Córdoba, M. (2009). *Predicción de plagas de gasterópodos terrestres en Galicia*. Tesis doctoral, Universidad Santiago de Compostela Galicia, España, 462.
- Fraga, J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M. y Fernández, A. (2004). Comparación entre cinco métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: Su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. (56), 208-213.
- Gutiérrez, D.; A. Beltramino; R. Vogler; M. Cuezco; V. Núñez; S. Gomes; M. Virgillito; and S. Miguel. (2013). First records of four exotic slugs in Argentina. *American Malacological Bulletin* 31(2): 245-256.
- Jaksch, K.; A. Eschner; T. Rintelen and E. Haring. (2016). DNA analysis of molluscs from a museum 20 wet collection: A comparison of different extraction methods. *BMC Research Notes*. (9):1-12. doi: 10.1186/s13104-016-2147-7
- Levitan, D. and R. Grosberg. (1993). The analysis of paternity and maternity in the marine hydrozoan *Hydractinia symbiolongicarpus* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology*. (2), 315-326.
- Mc Donnell, R.; P. Rugman; T. Backeljau; K. Breugelmans; K. Jordaens; R. Stouthamer; T. Paine and M. Gormally. (2011). Molecular identification of the exotic slug *Arion subfuscus* sensu stricto (Gastropoda: Pulmonata) in California, with comments on the source location of introduced populations. *Biology Invasions*. (13), 61-66.
- Mikhailova, N. and K. Johannesson. (1998). A comparison of different protocols for RAPD analysis of *Littorina*. *Hydrobiologia*. (378), 33-42.

- Morinha, F.: P. Travassos; D. Carvalho; P. Magalhães; J. Cabral and E. Bastos. (2014). DNA sampling from body swabs of terrestrial slugs (Gastropoda: Pulmonata): A simple and non-invasive method for molecular genetics approaches. *Journal of Molluscan Studies*. (80), 99-101. Doi:10.1093/mollus/eyt045
- Perichi, G. (2014). Identificación de la malacofauna de interés agrícola del municipio Tovar, estado Aragua, Venezuela. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. Trabajo de Ascenso. 86 pp.
- Ross, J., Ivanova, E., Spiridonov, S., Waeyenberge, L., Moens, M., Nicol, G. & Wilson, M. (2010). Molecular phylogeny of slug-parasitic nematodes inferred from 18 rRNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (55), 738-743.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory guide*. 2.a edition, Salem, MA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT® User's Guide, Release 6.03 Editions. Carry, NC USA. SAS Institute Inc., 1988. 1028p.
- Soroka, M. and T. Kaluski (2011). Genetic studies on the invasive slug *Arion lusitanicus* Mabilie, 1868 (GASTROPODA: PULMONATA) in Poland. *Folia Malacologica*. Vol. 19(4), 259-265. doi:10.2478/v10125-011-0026-3
- Soroka, M. and G. Skujienė. (2011). Species identification of slugs of genus *Arion* Ferrusac, 1819 (Mollusca, Pulmonata) on the basis of genetics. *Ekologija*. (57), 70-80.
- Williams, J.; A. Kubelik; K. Livak; J. Rafalski and S. Tingey. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. (18), 6531-6535.
- Wraith, J. (2012). Mucopolysaccharidoses and oligosaccharidoses. In: Saudubray, M., Van Den Berghe, G., Walter, J. Editions Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment. 5th edition. New York, NY: Springer; 2012: Chapter 40.