

OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA AISLAMIENTO DE ADN EN TEJIDO FOLIAR DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA LA AMPLIFICACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES

OPTIMIZING A PROTOCOL FOR DNA ISOLATION OF COCOA (*Theobroma cacao* L.) LEAF TISSUE FOR AMPLIFICATION WITH MOLECULAR MARKERS

Luis Angulo Graterol, Ph.D.

 <https://orcid.org/0000-0002-0749-5750>

Universidad Central de Venezuela (Maracay, Venezuela)
anguloluis2009@gmail.com

Ing. Jenny Ángel Molina

 <https://orcid.org/0009-0007-2356-4174>

Universidad de El Salvador (San Salvador, El Salvador)
Jenny.angel@ues.edu.sv

Rosana Figueroa-Ruiz, Ph.D.

 <https://orcid.org/0000-0001-9760-5943>

Universidad Central de Venezuela (Maracay, Venezuela)
valleverde2003@gmail.com

Fidel Parada Berríos, Mgtr.

 <https://orcid.org/0000-0001-9760-5943>

Universidad de El Salvador (San Salvador, El Salvador)
fidel.parada@ues.edu.sv

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Recibido: 24 de agosto de 2023

Aceptado: 10 de octubre de 2023

RESUMEN

La extracción de ADN libre de polisacáridos, polifenoles, proteínas y ARN de plantas constituye el paso inicial para diversos estudios en Biología molecular. Existen varios métodos de extracción de ADN específicos para cacao (*Theobroma cacao* L.); sin embargo, consumen mucho tiempo, utilizan reactivos y equipos costosos. El objetivo del presente estudio fue optimizar y comparar



dos métodos de extracción de ADN: 2-β-mercaptoetanol (BME) y CTAB modificado en este estudio (CTAB-Mod), para seleccionar el más apropiado, rápido y eficiente para aislar ADN en tejido foliar de cuatro clones de cacao. Se utilizaron técnicas de espectrofotometría, electroforesis en geles de agarosa y marcadores moleculares para evaluar la concentración, pureza y funcionalidad del ADN obtenido mediante los dos métodos. Los valores de las concentraciones del ADN (absorbancia a A_{260} nm) y pureza (relación A_{260}/A_{280} nm) fueron analizados estadísticamente, de acuerdo a un diseño completamente al azar, con arreglo de tratamientos factorial 2x4, el primer factor (método de extracción) a dos niveles y el segundo factor (clones de cacao) a cuatro niveles. La concentración promedio del ADN (A_{260} nm) en el protocolo optimizado CTAB-Mod mostró diferencias significativas ($p \leq 0,01$) y un rendimiento de $3,93 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}/\text{mg}$ de tejido foliar utilizado. La funcionalidad del ADN por amplificación PCR con marcadores SSR generó perfiles de bandas con buena resolución y de fácil interpretación. Se recomienda el uso del protocolo optimizado CTAB-Mod para extraer y obtener ADN de alto rendimiento, calidad y pureza para su aplicación con marcadores moleculares.

Palabras clave: Método de aislamiento, calidad de ADN, simples secuencias repetidas

ABSTRACT

The DNA extraction free polysaccharides, polyphenols, plant protein and RNA is the initial step to several studies in molecular biology. There are various methods of extracting specific DNA of cocoa (*Theobroma cacao* L.). However, are time consuming, expensive equipment and reagents used. The aim of this study was to optimize and compare two methods of DNA extraction: 2-β-mercaptoetanol (BME) and CTAB modified in this study (CTAB-Mod) to select the most appropriate, fast and efficient protocol for extracting DNA from leaf tissue of cocoa. Techniques spectrophotometry, agarose gel electrophoresis and molecular markers to evaluate the concentration, purity and functionality of DNA obtained. The values of DNA concentrations (absorbance A_{260} nm) and purity (ratio absorbance A_{260}/A_{280} nm) were statistically analyzed, according to a completely randomized design, with factorial treatment arrangement 2 x 4 treatment arrangement, the first factor (extraction method) at two levels and the second factor (cocoa clones) at four levels. The concentration DNA (A_{260} nm) CTAB-Mod optimize protocol showed significant differences ($p \leq 0.01$) and performance of $3.93 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}/\text{mg}$ used leaves tissue. Functionality DNA by PCR amplification with SSR markers bands sharp profiles generated good quality and easy to interpret. The use of CTAB-Mod optimize protocol for extracting DNA to obtain high yields of DNA with quality and purity for applications of molecular markers is recommended.

Keywords: Isolation methods, DNA quality, simple repeat sequences

INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo importante y la primera planta perenne domesticada en Mesoamérica. La mayor diversidad y centro de origen se encuentra en la región del Amazonas (Ecuador, Perú, Brasil, Colombia y Venezuela) (Richardson et al., 2015; De Faria, 2022). La mayoría de los países que se encuentran en la zona intertropical cultivan las principales especies para su uso agroindustrial (Zarrillo et al., 2018).

El cacao es diploide ($2n= 2X= 20$) de reproducción alógama, pertenece a la familia Malvaceae, domesticado y consumido desde el año 1500 a.C.; de gran importancia y demanda como materia prima en la industria alimenticia y cosmética; posicionado en el tercer lugar en el mercado mundial, después de la caña de azúcar y el café (Ramos y Gómez 2019). La producción de cacao a nivel mundial, para la temporada 2022/2023, se proyecta a 4.980 millones de toneladas de grano (ICCO, 2023).

El mejoramiento genético del cacao mediante el análisis morfológico, componentes de rendimiento y de calidad puede llevar más de diez años, para lograr un nuevo cultivar. Este proceso puede acelerarse mediante el uso de técnicas moleculares, las cuales han demostrado ser una herramienta útil para la selección de variedades con características cualitativas y cuantitativas importantes, mediante la aplicación de la PCR (Tiwari et al., 2013; Guevara & Salazar, 2015; Ramírez et al., 2018; De Faria, 2022).

El primer paso para la PCR es la extracción del material genético y se requiere un ADN libre de proteínas citoplasmáticas y nucleares. La calidad e integridad del ADN obtenido (sin degradación) se confirma en gel de agarosa y/o por espectrofotometría (concentración y pureza). En los métodos de extracción pueden existir variantes en los resultados de la pureza, cantidad, estabilidad del ADN y la presencia de contaminación residual con sales y solventes (Bhattacharjee et al., 2004).

Las plantas secretan varios tipos de metabolitos secundarios (flavonoides, terpenos, polifenoles, quinonas y alcaloides). Por estas características, es frecuente realizar modificaciones en los protocolos de purificación de ADN, porque no es posible aplicar un método de extracción universal (Bermúdez-Guzmán et al., 2016). El cacao contiene altos niveles de mucilago, polifenoles, polisacáridos y otros componentes en sus tejidos que pueden interferir con la calidad de la extracción, purificación del ADN y disminuyendo la eficacia de acoplamiento e inhibición de la *Taq* polimerasa en la PCR. Esto depende principalmente de la etapa inicial de extracción del ADN, para su liberación en la fase acuosa, que luego es separada de los restos

celulares por centrifugación y de la eliminación de proteínas, carbohidratos y lípidos que son removidos de la fase acuosa con solventes orgánicos, como fenol y/o cloroformo (Osorio-Guarín et al., 2017; Henao et al., 2018; Ramírez et al., 2018).

Posteriormente, el ADN es limpiado, precipitado con etanol, purificado y suspendido en un tampón adecuado. De ahí, la importancia de evaluar protocolos de extracción de ADN, para grandes cantidades de individuos, genotipos o muestras, tiempo de optimización, de acuerdo con la fuente de origen del material vegetal y considerar la presencia de residuos orgánicos durante el proceso de extracción (Ramos y Gómez, 2019; Olivares, 2020 y Suazo et al., 2020).

Generalmente, en la extracción de ADN en cacao suele usarse diferentes matrices vegetales (tejido foliar, semillas, granos, frutos, tallos, entre otros), que difieren en la complejidad de sus compuestos químicos, concentración, sustancias recalcitrantes y al grupo genético (Criollo, Trinitario o Forastero), afectando negativamente la calidad y cantidad de ADN, incluso en la maceración de las muestras por los compuestos fenólicos (Suazo et al., 2020).

Varios métodos de extracción han sido propuestos en cacao para aislar ADN a partir de tejido foliar (Risterucci et al., 2000; Bhattacharjee et al., 2004 y Santos et al., 2014), en los cuales se utiliza MATAB en el tampón de extracción. Otros incluyen algunas soluciones en el tampón de lisis: Polivinil polipirrolidone (PVP) (Michiels et al., 2003; Chávez et al., 2014) y CTAB (Guiraud et al., 2018; Henao et al., 2018; Chandrakant et al., 2019; De Faria, 2022). Algunos emplean kits comerciales como DNeasy Plant kit® (Qiagen, Alemania) (Cadavid et al., 2013; Osorio-Guarín et al., 2017; Acosta, 2017); Wizard Genomic DNA kit (Viet et al., 2015) y peqGOLD Plant DNA Mini Kit (Scharf et al., 2020), pero dado su alto costo puede limitar el número de muestras.

En la actualidad, algunos laboratorios, que procesan un alto número de muestras utilizan el método Doyle & Doyle (1987), porque permite obtener ADN de alta calidad, eliminar los inhibidores que afectan la PCR, es económico, fácil de estandarizar y es efectivo en diversas especies vegetales (Chandrakant et al., 2019). Otros laboratorios, realizan modificaciones y obtienen ADN de alto peso molecular utilizando 2-β-Mercaptoetanol (Cornejo et al., 2018). A nivel experimental, la extracción de ADN de cacao continua con algunas impurezas, componentes secundarios que degradan el ADN o inhiben la PCR. Además, los protocolos son complejos y requieren extensos pasos para su realización (Santos et al., 2014; Henao et al., 2018; Suazo et al., 2020).

El ADN obtenido puede ser amplificado mediante la PCR utilizando marcadores moleculares. Entre los más utilizados están los microsatélites o simples secuencias repetidas (SSR), regiones hipervariables del genoma que contienen arreglos de secuencias simples que se repiten entre 10 y 100 veces. Su principal ventaja es su herencia codominante, permite visualizar los alelos y el aporte de ambos progenitores; conocer de forma clara el estado (homocigoto o heterocigoto) y las regiones específicas dentro de los cromosomas de la especie en estudio. Esta ventaja es de utilidad a los fitomejoradores, para la selección precisa, en menor tiempo de materiales con potencial genético en sus programas de mejoramiento, estudios de diversidad y estructura genética de poblaciones (Santos et al., 2015; De Faria, 2022).

En vista que la información obtenida mediante marcadores moleculares en cacao está en aumento, se requiere procesar un gran número de muestras, el presente estudio se planteó el objetivo de optimizar un protocolo rápido y eficiente para extraer ADN en tejido foliar de cacao (*T. cacao* L.), a partir de la metodología de Risterucci et al. (2000) y comparar los resultados con el método de Doyle & Doyle (1987) y validar su calidad, mediante su amplificación PCR-SSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal consistió en tejido foliar joven sin áreas necróticas, lesiones, daños mecánicos y libre de enfermedades visibles, de cuatro clones de cacao tipo criollo: Clon 23 Tenancingo, CPS-5 N°22 Tenancingo, Clon 35 Ciudad Delgado y Clon 2A UES Polideportivo, del Jardín Clonal de la Universidad de El Salvador, El Salvador (13°71'S, 89°20'W). Las muestras fueron colectadas, identificadas, colocadas en bolsas de papel absorbente y luego en bolsas plásticas de cierre hermético, para ser transportadas a bajas temperaturas (4 °C) hasta el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. En el laboratorio, las mismas fueron almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento. Se realizó la extracción de ADN genómico mediante dos protocolos: Doyle & Doyle (1987) y Risterucci et al. (2000) modificado en este trabajo.

En cada protocolo de extracción se realizaron cuatro repeticiones para cada uno de los cuatro clones de cacao, para un total de 16 observaciones por método. El procedimiento inicial en ambos protocolos, el tejido foliar sin nervadura fue pulverizado con nitrógeno líquido en un mortero, con la ayuda de un mazo, hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se homogenizó con la solución de tampón de lisis. A continuación, se describen los pasos seguidos en cada protocolo.

Método Doyle & Doyle (1987)

Es un método estándar de extracción de ADN basado en CTAB y 2-β-mercaptoetanol (BME).

1. Colocar 200 mg del tejido pulverizado en tubos de microcentrífuga (2,0 mL) y agregar 750 µL del tampón de extracción (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 2% 2-β-mercaptoetanol, se agrega justo antes de usar; 20 mM EDTA y 0,1 M Tris-HCl a pH 8,0).
2. Homogenizar la mezcla en vortex durante 10 s e incubar en baño térmico a 65° C durante 45 min. Mezclar cada 15 min en vortex.
3. Centrifugar los tubos a 12.000 rpm durante 10 min. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1,5 mL.
4. Agregar 500 µL cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) y mezclar los tubos suavemente por inversión por 1 min. Centrifugar los tubos a 12.000 rpm durante 5 min.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 mL y agregar isopropanol frío (-20 °C) (2/3 del volumen del sobrenadante). Mezclar suavemente por inversión de los tubos.
6. Colocar los tubos a -20° C durante 2 h y centrifugar a 12.000 rpm por 5 min.
7. Lavar el precipitado de ADN dos veces con 1 mL de etanol frío 70 % (v/v), colocar los tubos invertidos sobre papel absorbente, para retirar el exceso de etanol y secar el ADN a temperatura ambiente.
8. Agregar 20 µL de agua grado molecular, estéril libre de nucleasas y almacenar los tubos a -20° C.

Método Risterucci et al. (2000)

1. Colocar 1 g del tejido pulverizado en un tubo de 30 mL; agregar 5 mL del tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% MATAB, 1% polietileno-glicol 6.000 y 0,5% de sulfito de sodio), precalentado a 75 °C y homogenizar en vortex por 10 s.
2. Colocar los tubos a 75 °C durante 30 min en baño térmico. Finalizado el tiempo, dejar los tubos enfriar a temperatura ambiente (20 °C).
3. Agregar a cada tubo 5 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) y agitar suavemente por inversión hasta emulsionar.
4. Centrifugar los tubos a 7.000 g durante 30 min; transferir el sobrenadante cuidadosamente a un tubo nuevo con 5 mL de isopropanol frío (-20 °C) y agitar suavemente hasta observar la formación del pellet de ADN. Colocar los tubos un mínimo de 2 h a -20 °C o durante toda una noche.

5. Transferir el pellet de ADN con la ayuda de una pipeta Pasteur moldeada en su punta, a un tubo de microcentrífuga de 2,0 mL, agregar 1 mL de tampón TE 1X (50mM Tris-HCl; 0,7M NaCl y 10mM EDTA, pH 7,0), para hidratar el ADN y almacenar los tubos a -20 °C.

El protocolo original utiliza tubos de 30 mL, 1 g de tejido pulverizado y 2% MATAB, para realizar maxi extracción de ADN, pero requiere mayor cantidad de reactivos y una centrifuga con rotor para tubos de 30 mL. En vista de esto, se realizaron las siguientes modificaciones, para adaptar el procedimiento anterior a una metodología de extracción a pequeña escala de ADN, utilizando tubos de 1,5 y 2,0 mL. En el tampón de extracción se utilizó CTAB, por ser el detergente catiónico ampliamente empleado en especies vegetales, altamente eficiente para la extracción de pequeñas muestras de tejido y se ha reportado buenos resultados de calidad en cacao (Henaó *et al.*, 2018). A continuación, se describen los pasos de las modificaciones:

Método Risterucci et al. (2000) modificado en este estudio (CTAB-Mod)

1. Colocar el tejido pulverizado (200 mg) en tubos de 2,0 mL e incorporar 750 µL de la solución tampón de lisis (100 mM Tris-HCl a pH 8,0; 1.4 mM NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 1% polietileno-glicol y 0,5% de sulfito de sodio) previamente precalentado a 74 °C.
2. Homogenizar la mezcla en vortex durante 20 s y colocar los tubos a incubar durante 60 min a 74 °C (aplicar vortex cada 15 min). Finalizado el tiempo de incubación, dejar los tubos a temperatura ambiente.
3. Agregar a cada tubo 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1 v/v) y agitar por inversión durante 15 min.
4. Centrifugar los tubos a 12.000 rpm, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 mL con 650 µL de isopropanol frío (-20 °C) más 65 µL de acetato de sodio (3M pH 5,2) y mezclar suavemente por inversión hasta observar el ADN.
5. Colocar los tubos a -20 °C al menos 60 min o durante toda una noche, para luego centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C.
6. Descartar cuidadosamente el alcohol y lavar el pélet dos veces con 600 µL de etanol frío 70%. Dejar secar los tubos (inclinados e invertidos sobre papel absorbente) a temperatura ambiente por 60 min, hasta retirar el exceso de etanol.
7. Agregar 50 µL de tampón TE 1X (50 mM Tris-HCl y 10 mM EDTA, pH 7,0) a cada tubo y colocarlos en incubación a 55 °C durante 1 h. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente y almacenarlos a -20 °C.

Determinación de la integridad, concentración y pureza del ADN

La integridad del ADN obtenido se determinó por su observación en geles de agarosa al 0,8% (p/v) con 1 µL DNA GelRed® Nucleic Acid Biotium. Se mezcló 1 µL de ADN con 1 µL de tampón de carga 6X (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% azul de bromofenol; 0,03% xylene cyanol; 60% glicerol y 60 mM EDTA). Las electroforesis se realizaron a 80 V constantes y 25 mA durante 30 min, en tampón TBA 1X (Tris acetate EDTA, de la casa comercial IBI®). Los geles se analizaron mediante foto documentador digital (DNr Bio-Imaging Systems MiniBis Pro, UK). La concentración y pureza del ADN extraído (ng.µL⁻¹) fueron estimadas en espectrofotómetro Nano Drop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), mediante su absorbancia a A₂₆₀ nm y con la relación A₂₆₀/A₂₈₀ nm, respectivamente.

Validación y funcionalidad del ADN purificado

El ADN genómico fue diluido a 10 ng.µL⁻¹ en agua destilada estéril libre de nucleasas, para su amplificación PCR-SSR.

Mezcla de reacción PCR-SSR

La mezcla de 20 µL de reacción PCR consistió en Tampón 0,5X; 2,5 mM MgCl₂; 0,4 mM de cada dNTP's; 0,05 mg.mL⁻¹ BSA; 0,5 µM de cada iniciador directo y reverso; 0,13 U.µL⁻¹ Taq polimerasa y 10 ng.µL⁻¹ de ADN. Se seleccionaron tres microsatélites del mapa de ligamiento desarrollado por Pugh et al. (2004) y verificados por De Faria (2022) (Tabla 1).

Tabla 1.

Cebadores utilizados, ubicación en el genoma, tamaño esperado en pares de bases (pb) y secuencias (5'→3')

Cebador	C	Tpb	Mrep	T°C	Secuencia directo (5'→3')	Secuencia inversa (5'→3')
mTcCIR 84	1	136	(GA) ₁₁	47,1	CATGGGACGCTGCCT	CTCTTATTAATTGAATTCTCT
mTcCIR 7	7	160	(GA) ₁₁	51	ATGCGAATGACAACTGGT	GCTTTCAGTCCTTTGCTT
mTcCIR 160	9	288	(GA) ₈	48,4	GATTGTTGTTTGGTATGC	GTGAAGGTGAAGGTGTG

Nota. Ubicación en el genoma, cromosoma (C); tamaño en pares de bases (Tpb); motivo repetido (MRep); temperatura de alineación (T°C)

La amplificación se realizó en un termociclador (Eppendorf modelo 6331, Alemania) en las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; seguida por 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 s; hibridación (47 - 51 °C) dependiendo de la temperatura de

alineación de los cebadores, por 1 min y extensión 72 °C por 1 min; seguida por un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 min. Los amplicones PCR-SSR fueron separados en geles de agarosa de alta resolución al 2% (p/v) con agente intercalante (1µL DNA GelRed® Nucleic Acid Biotium) añadido a la mezcla del gel de agarosa. La electroforesis fue durante 1 h a 90 V constantes y los geles fueron visualizados bajo luz UV y fotografiados como ya se indicó anteriormente.

Diseño y análisis estadístico

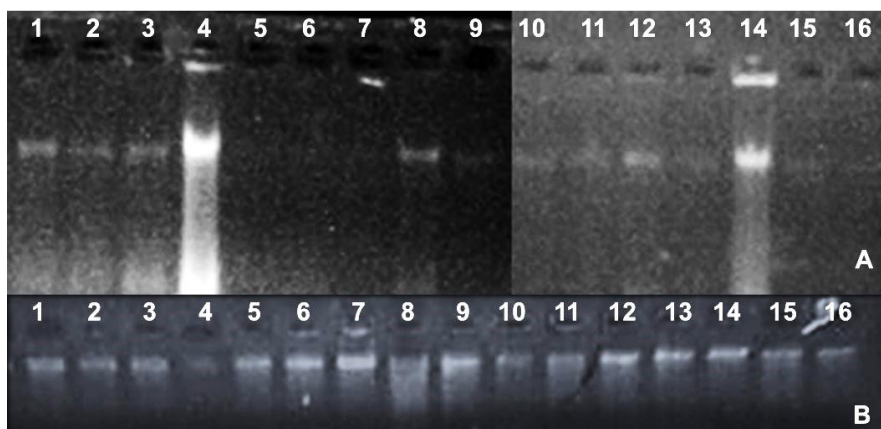
Los valores de las concentraciones del ADN (A_{260} nm) y pureza (relación A_{260}/A_{280} nm) fueron utilizados para determinar sus medias y las desviaciones estándares. Los resultados fueron analizados estadísticamente, de acuerdo a un diseño completamente al azar y con arreglo de tratamiento factorial 2x4. El primer factor (método de extracción) a dos niveles y el segundo factor (clones de cacao) a cuatro niveles, mediante el programa estadístico Statistix 9.0 (2009). En aquellos casos, donde el análisis de la varianza detectó diferencias significativas a valores de $p \leq 0,05$, se efectuó la prueba de comparación entre medias de Tukey. La funcionabilidad del ADN fue verificada y validada mediante su amplificación PCR-SSR y sus resultados se presentan como imágenes en gel de agarosa, para observar la calidad de los amplicones.

RESULTADOS

En ambos métodos de extracción se observó ADN en todas las repeticiones. En los geles de agarosa se visualizó: Integridad de la banda y degradación (barrido de la banda del gel) (Figura 1).

Figura 1.

*Visualización de la integridad del ADN extraído de tejido foliar de cacao (*Theobroma cacao* L.) en electroforesis de gel de agarosa: (A) método BME (Doyle y Doyle, 1987) y (B) método Risterucci et al. (2000) modificado (CTAB-Mod). Clones: 23 Tenancingo (1-4); CPS-5 N°22 Tenancingo (5-8), 35 Ciudad Delgado (9-12) y 2A UES Polideportivo (13-16)*



En ambos procedimientos de extracción se visualizaron bandas nítidas y luminosas en la mayoría de los casos (integridad), bandas estrechas cercanas al pozo donde fue colocada la muestra. En otros casos, hubo fragmentación del ADN (barrido), visualizándose como una banda menor a un centímetro de ancho y un sendero luminoso en el carril de la muestra, en tres ADN del protocolo BME y cuatro del CTAB-Mod, es decir 18,75 % y 25 %, respectivamente (Figura 1).

El promedio de la concentración del ADN obtenido fue mayor por el método CTAB-Mod (786,93 ng.µL⁻¹) que para BME (513,17 ng.µL⁻¹). El valor promedio de la relación A₂₆₀/A₂₈₀ nm (pureza del ADN) fue 1,86 y 1,71; para BME y CTAB-Mod, respectivamente, indicativo de baja contaminación de ARN y proteínas (Tabla 2)

Tabla 2.

Comparación entre los valores promedios y desviación estándar de la concentración y pureza de los métodos BME y CTAB-Mod en tejido foliar de cacao (Theobroma cacao L.) ($\bar{X} \pm SD$); n=4

Método de extracción	Clon	Concentración ADN (ng.µL ⁻¹)	Relación A ₂₆₀ /A ₂₈₀
BME	23 Tenancingo	586,15±267,75	1,55±0,17
	CPS-5 N°22 Tenancingo	399,60±179,53	1,89±0,20
	35 Ciudad Delgado	617,68±119,04	1,88±0,38
	2A UES Polideportivo	449,25±49,65	2,12±0,11
	Promedio	513,17	1,86
CTAB-Mod	23 Tenancingo	619,13±266,42	1,85±0,10
	CPS-5 N°22 Tenancingo	936,55±172,99	1,62±0,04
	35 Ciudad Delgado	831,90±281,34	1,69±0,10
	2A UES Polideportivo	760,15±137,08	1,69±0,11
	Promedio	786,93	1,71

El valor promedio de la relación de absorbancias A₂₆₀/A₂₈₀ del método BME fue 1,86; resultado similar reportado por Acosta (2017) al obtener un rango entre 1,8-2,0 y 1,87 en promedio, evidenciándose poca cantidad de proteínas contaminantes en los productos de la extracción.

En el análisis de la varianza se detectaron diferencias ($p \leq 0,01$) para la concentración (A_{260} nm) y los valores de la pureza (relación A_{260}/A_{280}) entre los dos métodos de obtención de ADN evaluados (Tabla 3).

Tabla 3.

*Cuadrados medios del análisis de la varianza de la concentración y pureza del ADN obtenido de tejido foliar de clones de cacao (*T. cacao* L.) mediante dos protocolos*

Fuente de variación	g.l.	Cuadrados Medios	
		Concentración del ADN (ng.µL ⁻¹)	Relación A_{260}/A_{280}
Repetición	3	2.431 ^{ns}	0,12 ^{**}
Clon	3	9.683 ^{ns}	0,06 [*]
Método	1	904.008 ^{**}	0,18 ^{**}
Método x clon	3	90.856 ^{**}	0,20 ^{**}
Método x repetición	3	3.718 ^{ns}	0,07 [*]
Error	27	7.315	0,02
Total	31		
%CV		12,68	6,37

Nota. Grados de libertad (g.l.), porcentaje coeficiente de variación (%CV), diferencias significativas ($*p \leq 0,05$) ($**p \leq 0,01$), no significativo (ns).

En la interacción método de extracción y clon de cacao se detectaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) para la concentración (A_{260} nm) y los valores de la pureza (relación A_{260}/A_{280}), lo cual podría inferirse del posible efecto de las características genéticas de cada clon de cacao. Al aplicar la prueba de comparación entre medias de Tukey, el método CTAB-Mod fue el que obtuvo mayores concentraciones de ADN y el método BME fue el de mejor pureza (Tabla 4).

Tabla 4.

Prueba de comparación entre medias para la concentración del ADN y pureza obtenidos en dos procedimientos de extracción de ADN, en tejido foliar de clones de cacao (T. cacao L.)

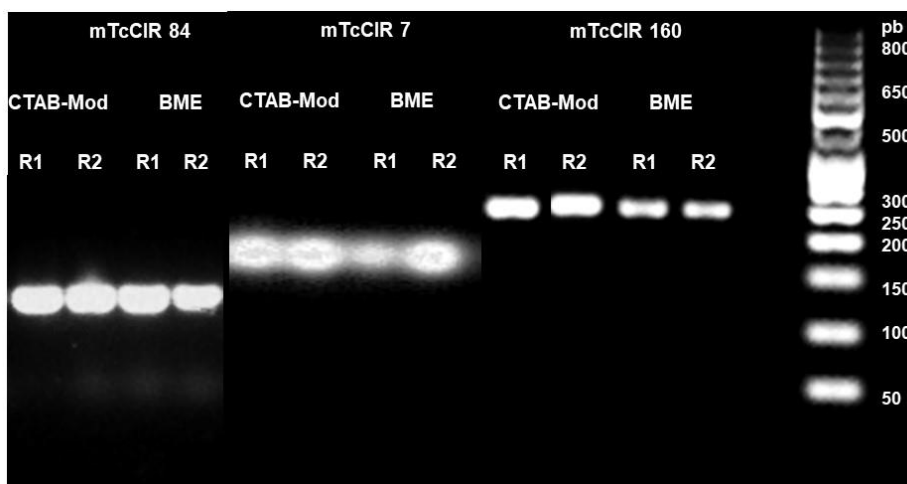
Método de extracción	Concentración del ADN (ng.µL ⁻¹)	Relación Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀
ADN genómico		
CTAB-Mod	842,43 ^a	1, 71 ^b
BME	506,28 ^b	1, 86 ^a

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

En la validación y funcionalidad del ADN purificado se utilizó como ADN molde el Clon 2A UES Polideportivo, extraído en cada protocolo y repetido dos veces, para verificar su amplificación PCR-SSR (Figura 2).

Figura 2.

Productos de amplificación PCR-SSR en gel de agarosa de alta resolución al 2% (p/v) del ADN Clon de cacao 2A UES Polideportivo, obtenidos con dos métodos de extracción y validados mediante tres microsatélites. Repeticiones (R1 y R2), último carril del gel, marcador de tamaño de 50 pb



Todos los ADN en ambos procedimientos de extracción amplificaron para los tres SSR, se visualizaron amplicones en todos los cebadores utilizados y sus repeticiones con buena reproducibilidad de las bandas. Esto permitió validar y verificar la funcionalidad del ADN aislado.

Se observaron pocas diferencias en la intensidad de los amplicones o en la resolución de los productos amplificados. En ambas metodologías fue posible minimizar algún efecto inhibitor de la PCR, como ha sido señalado por Pérez et al. (2013).

DISCUSIÓN

En el procedimiento CTAB-Mod se observaron más bandas con mayor intensidad del ADN, posiblemente, porque en el paso final de las modificaciones incluidas en la extracción del ADN, los tubos fueron colocados en incubación a 55 °C durante 1 h, con agitación suave, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se almacenaron a -20 °C. Este paso, posiblemente evitaría la fragmentación del ADN, como ha sido señalado por Alejos et al. (2014). Se utilizó tampón TE (pH 8,0) como solución amortiguadora, para rehidratar el pellet y almacenarlo. A diferencia, en el método BME se utilizó agua grado molecular, estéril y libre de nucleasas. Algunos autores confirman para la resuspensión del ADN, se puede realizar con agua grado molecular o una solución tampón que prevenga su degradación (Pérez et al., 2013).

El método Doyle & Doyle (1987) con algunas modificaciones permite remover el exceso de mucílago pegajoso del sobrenadante y obtener una buena calidad del ADN, libre de ARN y de proteínas contaminantes (Chandrakant et al., 2019). En el método CTAB modificado en este estudio, los valores de la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} variaron entre 1,62 y 1,85 con 1,71 en promedio, similar a los obtenidos por Santos et al. (2014) entre 1,7 y 2,0 de pureza.

Una proporción en la relación de absorbancia entre 1,8 y 2,0 es aceptada como ADN puro y es considerada entre buena y excelente, mientras que proporciones menores o mayores a ese rango probablemente, el ADN se encuentra ligeramente contaminado por proteínas y/o fenoles (Bermúdez-Guzmán et al., 2016; Acosta, 2017). Ramos y Gómez (2019) ajustaron y modificaron el método CTAB adicionando 2-β-Mercaptoethanol, eso les permitió mejorar el rendimiento, la calidad, separar bien los residuos celulares del ADN y obtener una concentración promedio de 309,04 ng.μL⁻¹ de ADN y 1,54 de pureza.

En contraste a los resultados obtenidos con los reportados por Suazo et al. (2020) en materiales de cacao acirollados de Nicaragua, utilizando el protocolo Doyle & Doyle (1987), obtuvieron una pureza promedio de 1,30; posiblemente por la contaminación en la extracción de polisacáridos y polifenoles, los cuales actuaron como inhibidores durante la extracción y oxidaron el ADN durante el proceso de lisis. Un protocolo de extracción de ADN debe presentar

niveles muy bajos de agentes contaminantes y permitir obtener alrededor de 80 mg de ADN por cada gramo de tejido foliar utilizado, garantizando sus características fisicoquímicas y biológicas aún después de varios meses de almacenamiento (Rocha, 2002).

Es importante destacar que en ambos métodos no se utilizó ARNasa (10 mg.mL^{-1}), ni la purificación con kits comerciales, como es sugerido en la literatura. Esto minimiza los costos y los pasos adicionales en la extracción del ADN donde se aplica tratamiento con ARNasa y/o se procesan muchas muestras (Batista et al., 2016; Osayande et al., 2016).

La principal diferencia entre ambos procedimientos utilizados en este estudio fue la composición del tampón de lisis para disolver las proteínas celulares. En el método BME se incorporó 2- β -mercaptoetanol como agente antioxidante biológico y reductor. Su principal ventaja en el tampón de lisis es la desnaturalización de la estructura terciaria y cuaternaria de algunas proteínas, las inactiva por reducción de los puentes de disulfuro y remueve los polifenoles (Knight, 2004). En el método CTAB-Mod se adicionó polietileno-glicol (PEG) y sulfito de sodio. Estos componentes tal vez favorecieron el aislamiento de un ADN de mayor peso molecular, por la disminución de los polifenoles, al ser oxidados durante la extracción de los ácidos nucleicos. El sulfito de sodio (Na_2SO_3) pudo inhibir la oxidación de los polifenoles, al oxidarse en sulfato de sodio (Na_2SO_4) y evitar la oxidación de la muestra. Los resultados obtenidos sugieren que el uso de PEG permitió obtener una concentración promedio del ADN en los clones de cacao de $786,93 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, como ha sido reportado por Bermúdez-Guzmán et al. (2016) y Henao et al. (2018).

Posiblemente, la diferencia del rendimiento de ADN obtenido en cada método podría ser debida a la capacidad de liberarse en la fase acuosa, la mayor cantidad de ADN presente en el tejido foliar y separar el ADN de los restos celulares, lo cual pudo influir en las diferencias estadísticas ($p \leq 0,01$) entre las concentraciones del ADN y su pureza.

Los dos protocolos utilizaron CTAB como detergente catiónico que pudo facilitar la inhibición de las ADNasas y formar complejos con las proteínas e inactivarlas. Adicionalmente, en el método CTAB-Mod se incorporó 1% polietileno-glicol y 0,5% de sulfito de sodio, que posiblemente favoreció la precipitación de los compuestos fenólicos durante la lisis. En este método, los tubos fueron incubados a una temperatura mayor ($74 \text{ }^\circ\text{C}$) para la lisis celular. Estas condiciones al parecer permitieron extraer mayor cantidad de ADN que en el protocolo BME.

En el protocolo propuesto por Bermúdez-Guzmán *et al.* (2016) se incorporó proteínasa K y 2- β -Mercaptoetanol en el tampón de lisis. Además, acetato de sodio-isopropanol para la precipitación del ADN y ARNasa después de la rehidratación del pélet. Con esas modificaciones, detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para la pureza de los ADN obtenidos.

Las modificaciones realizadas en este estudio al protocolo original de Risterucci *et al.* (2000) permitieron la obtención de un ADN de mayor peso molecular y un rendimiento promedio del ADN de $3,93 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ por mg de tejido utilizado, si se compara con los resultados del método BME ($2,56 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}/\text{mg}$). Además, de disminuir los volúmenes en la utilización de reactivos, gastos en tubos resistentes a cloroformo de 30 mL, centrífuga con rotor para esas dimensiones y minimizar el tiempo en la manipulación, pesado y equilibrado de los tubos.

El protocolo de extracción de ADN modificado en este estudio puede ser una metodología estándar para obtener alto rendimiento y funcionabilidad en la PCR, permitiendo visualizar amplicones con buena resolución en el gel de agarosa, criterios que han sido señalados en la literatura (Cadavid *et al.*, 2013; Chávez *et al.*, 2014; Viet *et al.*, 2015). La extracción del ADN debe permitir ser suficiente para el número de reacciones PCR (Santos *et al.*, 2014). Mediante el procedimiento CTAB-Mod, en una sola extracción por material de cacao, se tendría la cantidad suficiente para todas las reacciones de PCR, una consideración que ha sido reportada por Henao *et al.* (2018). Entre las ventajas del método modificado, si se compara con el protocolo original están: La disminución de los volúmenes del tampón de extracción, cloroformo: alcohol isoamílico, alcoholes etanol e isopropanol (en todos se requieren 5 mL) y TE 1X (1 mL).

CONCLUSIÓN

Se logró optimizar un protocolo simple, eficiente y económico a partir del método de maxi extracción de ADN propuesto en la literatura. El método CTAB-Mod logró aislar ADN de alto peso molecular y pureza, sin inhibidores de la PCR-SSR, observándose amplicones de alta resolución y reproducibilidad, lo que permitiría ser utilizado en diferentes estudios, como: Caracterización molecular, diversidad genética y mejoramiento asistido por marcadores moleculares. La aplicación del protocolo modificado facilitó una extracción con niveles bajos de agentes contaminantes, lo cual permitiría su almacenamiento durante varios meses a bajas temperaturas (-20 y -80 °C).

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue realizada con financiamiento otorgado por el Proyecto de la Agencia de Cooperación Internacional de Corea (KOICA) y del Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología (MECT) de El Salvador, para la adquisición de equipos, materiales y suministros del Laboratorio de Biotecnología Agrícola, de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. Los autores extienden un agradecimiento al Ing. Agr. M. Sc. Mario Antonio Orellana Núñez por su desempeño en las actividades generadoras de proyectos de investigación y del fortalecimiento del laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J. (2017). *Clonación, Secuenciación y Caracterización Molecular de Genes Codificantes de Polifenol Oxidasa (PPO) en Theobroma cacao L. (cacao) en el Cantón Quevedo – Provincia De Los Ríos*. (Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. 84p.
- Alejos, L. P., Aragón, M. C., y Romero, A. (2014). Extracción y Purificación de ADN. En A. C. Romero. (Ed.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1-26). Ciudad de México, México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático y Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Batista, A., Ramos, P., Magalhães, A., Amato, F. & Correa, R. (2016). Molecular genetic diversity in a core of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones with potential for selection of disease resistance, plant height and fruit production. *African Journal of Biotechnology*, 15(44), 2517-2523.
- Bermúdez-Guzmán, M., Guzmán-González, S., Orozco-Santos, M., Velázquez-Monreal, J., Buenrostro-Nava, M., y Michel-López, C. (2016). Optimización de un protocolo para asilamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4), 897-910.
- Bhattacharjee, R., Kolesnikova-Allen, M., Aikpokpodion, P., Taiwo, S., & Ingelbrecht, I. (2004). An improved semiautomated rapid method of extracting genomic DNA for molecular marker analysis in cocoa, *Theobroma cacao* L. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(4), 435–436. doi.org/10.1007/BF02772686

- Cadavid, I., Rosero, D., y Uribe, S. (2013). Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*. *Revista Colombiana Biotecnológica*, 15(2), 186-192.
- Chandrakant, E., Tulshiram, W., Mathew, D., Minimol, J., Sherin, J., Kurian, S., & Shylaja, M. (2019). Microsatellite and inter-microsatellite markers linked with resistance to vascular streak dieback in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, (94), 1-9. doi: 10.1080/14620316.2019.1677509
- Chávez, E., Arteaga, D., y Giraldo, M. (2014). Protocolo de purificación de ADN de hojas de *Theobroma cacao* L. para estudios de genética poblacional con microsatélites (STR). *Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial*. Diciembre(2), 70-72.
- Cornejo, O., Muh-Ching, Y., Dominguez, V., Andrews, M., Sockell, A., Strandberg, E.,... Motamayor, J. (2018). Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. *Communications Biology*. doi: 10.1038/s42003-018-0168-6.
- De Faria, Y. (2022). *Identificación del grupo genético "Cacao Costa Aragüeña", mediante el uso de marcadores moleculares*. (Trabajo de Grado para optar al Título de *Magister Scientiarum* en Agronomía, mención Mejoramiento Genético y Biotecnología. Postgrado en Agronomía). Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 63p.
- Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin*, (19), 11-15.
- Guevara, M., & Salazar, J. (2015). *Caracterización morfológica del fruto y la semilla de 9 clones de cacao (Theobroma cacao L), del Centro de Desarrollo Tecnológico del INTA, El Recreo, Rama RAAS, en el año 2014-2015*. (Tesis para obtener el Título de Doctor). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. 114p.
- Guiraud, B., Tahí, M., Fouet, O., Trebissou, C., Pokou, D., Rivallan, R....Lanaud, C. (2018). Assessment of genetic diversity and structure in cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in Côte d'Ivoire with reference to their susceptibility to Cocoa swollen shoot virus disease (CSSVD). *Tree Genetics & Genomes*, 14(52). doi.org/10.1007/s11295-018-1264-y
- Henao, A., Salazar, H., & Urrea, A. (2018). Quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) DNA from foliar tissue at different stages of development. *Acta Agronómica*, 67(2), 311-318.
-

- International Cocoa Organization (ICCO). 2023. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Cocoa supply and demand situation*. Recuperado de <https://www.icco.org/may-2023-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics/>
- Knight, J. (2004). 2-Mercaptoethanol. En W. Paquette & Sons. (Ed.), *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*: New York. doi: 10.1002/047084289
- Michiels, A., Van Den, E., Tucker, M., Van Riet, L., & Van Laere, A. (2003). Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*, 315(1), 85-89. doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00665-6
- Olivares, M. (2020). *Estudio de metodologías de extracción y purificación de ADN de alimentos para amplificación por PCR*. (Tesis para optar por el grado académico de Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos). Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 109p.
- Osayande, L., Horn, R., Obinna, G., Ralph, C., Afolabi, A., & Asemota, O. (2016). Development of a method for DNA extraction from oil palm leaves and the effects of pH and ionic strength on nucleic acid quantification. *Journal of Biological Methods*, 3(2): 1-6. doi: 10.14440/jbm.2016.80
- Osorio-Guarín, J., Berdugo, J., Coronado, R., Zapata, Y., Quintero, C., Gallego-Sánchez, G., & Yockteng, R. (2017). Colombia a Source of Cacao Genetic Diversity as Revealed by the Population Structure Analysis of Germplasms Bank of *Theobroma cacao* L. *Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2017.011994
- Pérez, M., Rivera, J., y Malus, E. (2013). *Manual de Protocolos de Medición de Organismos Genéticamente Modificados*. Elaborado con fondos del Proyecto Sectorial de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 2011-09-172352. ISBN: 978-607-96162-4-3. 79p.
- Pugh, T., Fouet, O., Risterucci, M., Brottier, P., Abouladze, M., Deletrez, C.,...Lanaud, C. (2004). A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theoretical Applied Genetics*, (108),1151-1161.
- Ramirez, M., Salazar, H., y Urrea, A. (2018). Calidad del ADN de cacao (*Theobroma cacao* L.) a partir del tejido foliar en diferentes etapas de desarrollo. *Acta Agronómica*, 67(2), 311-318. doi: <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.63046>
-

- Ramos, A., y Gómez, M. (2019). *Caracterización Fenotípica y Genotípica de Aislados de Cacao (Theobroma cacao L.) de Dibulla, Guajira*. (Tesis para optar al Título de *Magister Scientiarum* en Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales). Universidad Libre Seccional Barraquilla, Colombia. 95p.
- Richardson, J., Whitlock, B., Meerow, A., & Madriñán, S. (2015). The age of chocolate: a diversification history of *Theobroma* and Malvaceae. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(120), 1-14.
- Risterucci, A., Grivet, L., N´Goran, J., Pieretti, I., Flament, M., & Lanaud, C. (2000). A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, (101), 948-955.
- Rocha, P. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas*, 23(3), 9-17.
- Santos, E., Cerqueira-Silva, C., Mori, G., Ahnert, D., Mello, D., Pires, J.,...De Souza, A. (2015). Genetic Structure and Molecular Diversity of Cacao Plants Established as Local Varieties for More than Two Centuries: The Genetic History of Cacao Plantations in Bahia, Brazil. *PLoS ONE*, 10(12), 1-18. doi.org/10.1371/journal.pone.0145276
- Santos, R., Vanderlei, U., Clément, D., Pires, J., Matos, E., Batista, T., & Peres, K. (2014). A protocol for large scale genomic DNA isolation for cacao genetics analysis. *African Journal of Biotechnology*, 13(7), 814-820. doi.org/10.5897/AJB2013.13181.
- Scharf, A., Lang, C., & Fischer, M. (2020). Genetic authentication: Differentiation of fine and bulk cocoa (*Theobroma cacao* L.) by a new CRISPR/Cas9-based in vitro method. *Food Control the International Journal of HACCP and Food Safety*, (114), 1-9. doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107219.
- Statistix. 2009. Statistix 9: Analytical Software.copyright ©. Version 9.0. Tallahassee, Florida 32312. Recuperado de <https://www.statistix.com/>
- Suazo, T., Miranda, S., Rivers, E., Lacayo, M., y Tenorio, D. (2020). Evaluación de metodologías de extracción de ADN de plantas recalcitrantes. *Revista Torreón Universitario*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua, 9(24), 45-57. doi.org/10.5377/torreon.v9i24.9723
- Tiwari, J., Chandel, P., Gupta, S., Gopal, J., Singh, B., & Bhardwaj, V. (2013). Analysis of genetic stability of in vitro propagated potato microtubers using DNA markers. *Physiology Molecular Biology Plants*, 19(4), 587-595. doi.org/10.1007/s12298-013-0190-6
-

Viet, L., Vanlerberghe, L., Thanh, H., Dewettinck, K., & Messens, K. (2015). Comparative Evaluation of Six Extraction Methods for DNA Quantification and PCR Detection in Cocoa and Cocoa-Derived Products. *Food Biotechnology*, (29), 1-19. doi: 1.1080/08905436.2014.996761

Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I.,...Valdez, F. (2018). The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology & Evolution*. doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x