

## Comparación de métodos de extracción de ADN para el género *Astylus* (Coleoptera: Melyridae)

Martín, Eduardo<sup>1,2</sup>; María Macarena Moreno Ruiz Holgado<sup>2</sup>; Gabriela María Silenzi Usandivaras<sup>1</sup>; Marcela Bonano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Genética, Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

E-mail: eduardomartin76@hotmail.com

► **Resumen** — Una extracción exitosa de ADN es fundamental para el progreso de estudios biológicos que incluyen identificación molecular, inferencia filogenética y genómica así como análisis de secuencias. Si bien los métodos de extracción de ácidos nucleicos son universales, ellos deben ser ajustados de acuerdo a las características de cada taxón estudiado. El objetivo del presente trabajo es comparar métodos de extracción de ADN y orientar en la elección del protocolo más conveniente según las capacidades de cada laboratorio. Se evaluaron cuatro métodos de extracción de ADN de ejemplares del género *Astylus atromaculatus* (Coleoptera: Melyridae), tomando como indicadores la concentración y pureza del ADN extraído, la cantidad de material de partida necesario y los costos económicos y de tiempo. Los métodos comparados fueron: 1) KIT comercial "HIGH Pure PCR Template Preparation Kit" ©Roche; 2) Precipitación salina con SDS; 3) Precipitación salina con CTAB y 4) Columnas de giro. Los cuatro métodos dieron resultados positivos en cuanto a cantidad y calidad de ADN; respecto al material de partida óptimo las muestras de medio abdomen y un segmento de pata fueron las de mayor rendimiento. El protocolo de CTAB brindó mejores resultados de concentración y pureza. Los protocolos de SDS y COLUMNAS DE GIRO produjeron valores intermedios de concentración y pureza, destacándose el último por su bajo costo económico. El KIT comercial fue el de menor rendimiento y mayor costo económico, pero a la vez fue el más rápido de ejecutar.

**Palabras clave:** Purificación de ADN, Precipitación salina, Kit comercial, Columnas de giro.

► **Abstract** — A successful extraction of DNA is fundamental for the progress of biological studies that include molecular identification, phylogenetic inference and genomics as well as sequences analyses. Although the methods of extraction of nucleic acids are universal, they must be adjusted according to the characteristics of each taxon studied. The aim of the present work is to compare DNA extraction methods and guide in the choice of the most convenient protocol according to the capacities of each laboratory. Four methods of DNA extraction were evaluated in the genus *Astylus atromaculatus* (Coleoptera: Melyridae) Taking as indicators DNA final concentration and quality, amount of starting material and, cost and time required. The evaluated methods were: 1) Commercial "HIGH Pure PCR Template Preparation Kit" ©Roche; 2) Saline precipitation method with SDS; 3) Saline precipitation method with CTAB and 4) Spin columns method. The four methods showed positive results regarding to the quantity and quality of DNA; with respect to starting material, the best result was provided by half abdomen and one segment of the leg. CTAB method was the best according to the concentration and quality of the DNA. SDS and SPIN COLUMNS methods showed intermediate values of concentration and purity, standing out the SPIN COLUMNS for its low cost. KIT extraction method showed the lower performance but the faster method.

**Keywords:** DNA purification, Salt precipitation, Commercial Kit, Spin-Columns.

## INTRODUCCIÓN

El éxito de numerosos estudios biológicos que incluyen la identificación molecular, la inferencia filogenética y genómica, así como los crecientes proyectos de secuenciación a gran escala, dependen fundamentalmente de un primer paso que consiste en la extracción de ADN a partir de los organismos en estudio (Falcón y Valera, 2007; Dittrich-Schröder *et al.*, 2012). Los diferentes métodos de extracción combinan procesos de lisis celular, eliminación de proteínas, precipitación y purificación del ADN, los cuales dan como resultado variaciones en concentración y calidad del ADN extraído (Waldschmidt *et al.*, 1997; Falcón y Valera, 2007; Chen *et al.*, 2008).

Una técnica ideal de extracción debe optimizar el rendimiento de ADN, minimizar su degradación y ser eficiente en términos de costo, tiempo, mano de obra y materiales. De igual manera debe ser adecuado para la extracción de múltiples muestras y generar mínimos residuos peligrosos (Aljanabi y Martínez, 1997; Chen *et al.*, 2010; Cadavid Sánchez *et al.*, 2013; Asghar *et al.*, 2015). Las técnicas utilizadas comúnmente requieren algún tipo de detergente como el Sodio Dodecil Sulfato (SDS) o Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) para la extracción de las moléculas de ADN a partir de diversos organismos. Además, demandan relativamente mucho tiempo y requieren una campana de extracción de gases para resguardar al operador del efecto tóxico de compuestos como el fenol-cloroformo utilizado para la eliminación de proteínas (Milligan, 1998; Falcón y Valera, 2007; Chen *et al.*, 2010). Estos métodos además requieren de la presencia de iones de sodio, etanol absoluto o isopropanol que se utilizan comúnmente para precipitar el ADN a partir de la solución acuosa. Otros procedimientos de extracción utilizan columnas de giro o de centrifugación (“spin-column”), las cuales poseen una membrana de fibra de vidrio u otra matriz inorgánica a la que se une el ADN, un buffer para la lisis celular y un buffer de unión al ADN y posterior elución (Ivanova *et al.*, 2006). Existen

algunos kits comerciales que utilizan estas columnas y son eficaces para extracción de ADN de una amplia variedad de materiales (ej.: sangre, cultivos celulares, tejido animal y levaduras).

Estos métodos diversos, en general no están preparados para extracción en tejidos de organismos específicos y deben ser ajustados de acuerdo a las características especiales de cada caso. Por ejemplo, los artrópodos tienen un exoesqueleto que dificulta la extracción del ADN. Entre los artrópodos, el orden Coleóptera es uno de los más numerosos dentro de Eucaria, con al menos 380.000 especies descritas que ocupan una amplia variedad de ambientes con una gran diversidad morfológica, representan alrededor del 25% de las especies conocidas y casi el 40% de los insectos (Słipiński *et al.*, 2011; Ribera y Beutel, 2012; McKenna *et al.*, 2015). La mayoría tiene una alimentación fitófaga y por esta razón muchas especies se convierten en plagas de cultivo, siendo principalmente las larvas las que causan los daños agrícolas y forestales. También hay especies saprófagas, que se alimentan de material vegetal en descomposición, otras coprófagas e incluso algunas depredadoras. La variedad de hábitos alimenticios dentro de este orden, lo convierte en un grupo con un rol fundamental en el mantenimiento de la salud del ecosistema y en el ciclo de los nutrientes.

El orden de los coleópteros se subdivide en cuatro subórdenes, Adephaga, Archostemata, Myxophaga y Polyphaga. En este último se incluyen la mayoría de los coleópteros actuales (al menos 300.000 especies), el cual está subdividido en cinco infraórdenes, Bostriichiformia, Elateriformia, Scarabaeiformia, Staphyliniformia y Cucujiformia (Ribera, 1999). En este último se encuentra la familia Melyridae que incluye, sólo para Norteamérica, 520 especies descritas. Por otro lado la representatividad de la fauna argentina de melíridos en colecciones es bastante baja, lo que coincide con la ausencia de taxónomos argentinos trabajando en el grupo. De acuerdo a la información recopilada de las 73 especies citadas para la Argentina, 62 se podrían considerar endémicas, no obstante,

es altamente probable que esta información cambie toda vez que se precisen los datos de recolección y/o se revisen los géneros involucrados (Padilla Macilla, 2008). Los individuos adultos se encuentran sobre las flores de diferentes especies por lo que son importantes polinizadores, aunque las larvas de muchas especies son plagas. Dentro de esta familia, son frecuentes los ejemplares del género *Astylus*, que alcanzan los 15 mm de longitud y élitros blandos, con pilosidad abundante y cabeza oculta en parte por el protórax. Por sus características, la familia presenta implicancias ecológicas y económicas que brindan un gran valor a las investigaciones sistemáticas, ecológicas, filogenéticas y de genética molecular, conducentes a la identificación y control de las diferentes especies de coleópteros (Asgar *et al.*, 2015).

En las últimas décadas se han reportado numerosos trabajos sobre protocolos de extracción de ADN para diversos organismos, asimismo se registran trabajos de análisis moleculares en coleópteros en los que se observa una amplia gama de variantes en los métodos de extracción, los cuales deben ser puestos a punto realizando algunas modificaciones para lograr su optimización de acuerdo al análisis requerido. Esta tarea de puesta a punto representa por lo general un ejercicio cotidiano en laboratorios con amplia trayectoria, pero puede ser complicado, costoso y hasta engorroso para laboratorios con menor experiencia en trabajos moleculares. Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo es orientar en la elección del método de extracción de ADN de coleópteros más conveniente a utilizar de acuerdo a las capacidades de cada laboratorio. Para ello se evaluó el rendimiento de cuatro métodos de extracción de ADN en coleópteros del género *Astylus atromaculatus*, perteneciente a la familia Melyridae. Para la comparación entre los protocolos, se tomaron cinco indicadores: 1) el rendimiento en cuanto a concentración de ADN obtenido; 2) la pureza del ADN extraído; 3) la cantidad de material de partida necesario para una extracción exitosa; 4) el costo económico y 5) el costo referido

al tiempo invertido para llevar a cabo cada método.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### COLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para este estudio se utilizaron individuos del género *Astylus* colectados en la localidad de Ticucho (departamento Trancas, 37,3 Km al N de la capital provincial, provincia de Tucumán, 26°48'85.89"S, 65°24'08.90"O). La captura se realizó de modo manual, en un campo de maíz. El material se conservó en alcohol al 95% y se mantuvo en freezer a -20°C hasta su análisis.

### PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción del ADN total se utilizaron cuatro métodos: 1) Protocolo de Kit comercial HIGH Pure PCR Template Preparation Kit ©Roche (KIT); 2) Protocolo de precipitación con SDS (SDS); 3) Protocolo de precipitación con CTAB (CTAB); 4) Protocolo con columnas de giro (COLUMNAS DE GIRO).

1) KIT. Contiene dos componentes principales: una solución de lisis y una solución para la precipitación de proteínas. El material se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se agregaron 200  $\mu$ l del buffer de lisis tisular más 40  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml) reconstituida, se mezcló inmediatamente y se incubó por una hora a 55°C o bien hasta que la muestra quedó totalmente degradada. Luego se añadieron 200  $\mu$ l de buffer de unión, se mezcló y se incubó por 10 minutos a 70°C. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de isopropanol frío y se mezcló nuevamente. Se extrajo la fase líquida con un tip descartable y se colocó dentro del tubo de filtro, el cual estaba ensamblado en el tubo colector. El tubo colector con el tubo de filtro se centrifugaron durante 1 minuto a 8000 g, para luego descartar el tubo colector y el líquido contenido en él. Se utilizó un nuevo tubo colector y se añadieron 500  $\mu$ l de buffer inhibidor en la parte superior del reservorio del tubo de filtro. Se centrifugó 1 minuto a

8000 g. Se colocó un nuevo tubo colector y se repitió el paso anterior. Se descartó el líquido del tubo colector y se volvió a centrifugar durante 10 segundos a velocidad máxima. El tubo de filtro se insertó en un tubo eppendorf, se agregaron 200  $\mu$ l de buffer de elución (precalentado a 70 °C), se centrifugó por un minuto a 8000 g y se obtuvo en el tubo eppendorf el ADN eluido final.

2) SDS. Se siguió el método según Chen *et al.* (2010) con modificaciones. El buffer de lisis se preparó con SDS al 0,5 % diluido en 200 mM de Tris, 25 mM de EDTA y 250 mM de NaCl. En un microtubo de 1,5 ml se adicionaron 150  $\mu$ l de buffer de lisis y se agregó la muestra a extraer, la cual se disgregó hasta homogenizar. Luego se agregaron 350  $\mu$ l más de buffer de lisis y 5  $\mu$ l de ARNasa 100 mg/ml. Se incubó a 37 °C durante una hora, se agregaron 5  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó nuevamente una hora a 50 °C. El homogenizado se extrajo por separación de fases con 240  $\mu$ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y centrifugando a 12.000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Para precipitar el ADN, se adicionaron 500  $\mu$ l de etanol absoluto, se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos. El pellet se lavó dos veces con 500  $\mu$ l de alcohol 70 % y finalmente se llevó a estufa a 37 °C durante 30 minutos hasta secar. Luego se agregaron 100  $\mu$ l de agua bidestilada para el eluido final.

3) CTAB. Se siguió el método según Chen *et al.* (2010) con modificaciones. El buffer de lisis se preparó con CTAB al 2 %, diluido en 100 mM de Tris HCL, 20 mM de EDTA, 1,4 M de NaCl y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0,2 %. Los pasos de extracción fueron iguales al protocolo con SDS antes descrito.

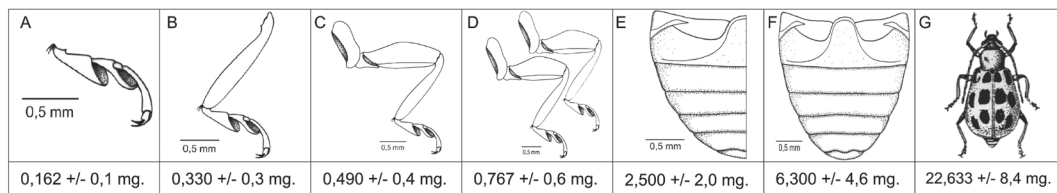
4) Columnas de giro. Se siguió el método según Ivanova *et al.* (2006) modificado, utilizando columnas de giro individuales en lugar de placas. El buffer de lisis contiene SDS al 0,5 % con 100 mM de NaCl, diluido en 50 mM de Tris-HCl a pH 8 y 10 mM de EDTA a pH 8. El buffer de unión contenía 6 M de Tiocianato de Guadinina (GuSCN), 20 mM de EDTA a pH 8; 10 mM de Tris-HCl a

pH 6.4 y Tritón X-100 al 4%. Este buffer fue precalentado a 56 °C, hasta su disolución. El buffer de mezcla estaba compuesto por 50 ml de etanol 96 %, y 50 ml de buffer de unión. El buffer de lavado de proteínas contenía 70 ml de etanol y 26 ml de buffer de unión. El Buffer de lavado se preparó con etanol 60 %, 50 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl a pH 7.4 y 0.5 mM de EDTA a pH 8.0. Previo a la extracción, se mezclaron 5 ml de buffer de lisis con 0,5 ml de proteinasa K (20 mg/ml). Luego se distribuyeron 50  $\mu$ l de la mezcla anterior en cada tubo eppendorf conteniendo la muestra, y se incubaron durante toda la noche a 56°C. Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 1000 g por 20 segundos. Luego se añadieron 100  $\mu$ l de buffer de mezcla y se centrifugó a 1000 g por 20 segundos. Se transfirieron 125  $\mu$ l del lisado obtenido a un tubo nuevo con las columnas de giro y se centrifugó a 5000 g por 5 minutos. El primer lavado se realizó con 180  $\mu$ l de buffer de lavado de proteínas y se centrifugó nuevamente a 5000 g por 2 minutos, el segundo lavado se realizó con 750  $\mu$ l de buffer de lavado y se centrifugó a 5000 g por 5 minutos. Luego se incubó a 56 °C por 30 minutos. Para obtener el ADN, se añadieron 50  $\mu$ l de agua bidestilada precalentada a 56 °C en cada tubo y se incubó a temperatura ambiente durante un minuto. El ADN se obtuvo por centrifugación a 5000 g por 5 minutos.

#### ESTIMACIÓN DE RENDIMIENTO Y PUREZA DE ADN

El éxito de las extracciones de ADN ( $n = 56$ ) se corroboró mediante corrida electroforética horizontal en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Figura 1). Para tal fin, se sembraron 5  $\mu$ l de eluido de cada muestra, junto al buffer de carga con glicerol y colorante intercalante de ADN GelRed. La corrida se realizó por 30 minutos a un voltaje constante de 100 V. Las bandas de ADN se observaron mediante luz ultravioleta en transiluminador.

La cuantificación de ADN extraído de cada muestra fue realizada mediante la uti-



**Figura 1.** Gel de agarosa al 1% donde se observa un ejemplo de 4 extracciones de ADN genómico en cada método en *Astylus*. Se sembraron 5  $\mu$ l del ADN eluido para cada muestra.

lización de un espectrofotómetro DENOVI DS11, con la lectura de la concentración de ADN doble cadena a una absorbancia de 260 nm (A260 nm), en referencia al agua desionizada como sustancia «blanco», que permite establecer el valor 0 en la curva de calibración.

La inferencia de la calidad del ADN fue estimada en base a la relación A260 nm/A280 nm. En general, el pico de absorción UV es a 260 nm para ADN y a 280 nm para proteínas, por lo tanto, cuando una solución contiene tanto ADN como proteínas, la absorbancia a 260 nm es debida principalmente al ADN presente, y la absorbancia a 280 nm se debe a proteínas. Una muestra pura de ADN relativamente libre de contaminación de proteínas, tiene la relación A260 nm/A280 nm de 1,8.

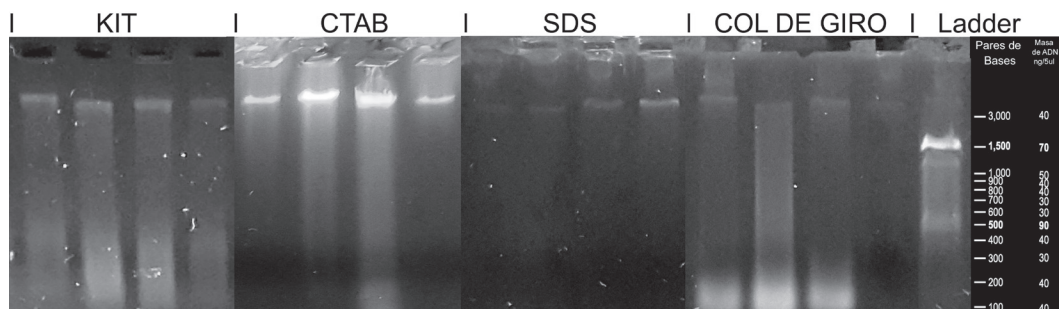
#### MATERIAL DE PARTIDA

El ADN genómico total fue extraído de *Astylus atromaculatus* (Melyridae) a partir de diferentes secciones del cuerpo que representan distintas cantidades de material de partida (Figura 2). Las muestras de trabajo

se enumeran en el listado a continuación: A) un segmento de pata (0,162 +/- 0,1 mg); B) dos segmentos de pata (0,330 +/- 0,3 mg); C) una pata completa (0,490 +/- 0,4 mg); D) dos patas completas (0,767 +/- 0,6 mg); E) medio abdomen (2,500 +/- 2,0 mg); F) un abdomen entero (6,300 +/- 0,6 mg); G) un individuo completo (22,633 +/- 8,4 mg). Todas las extracciones se realizaron por duplicado y para todos los casos fueron retirados los élitros. Las muestras fueron pesadas mediante una balanza analítica “Denver Instrument”, APX 200, 200 g/0.1 mg.

#### COSTO ECONÓMICO Y DE TIEMPO

Para evaluar el costo económico de cada protocolo, se calculó el valor de los reactivos y material descartable utilizados. El tiempo requerido para realizar la extracción a partir del material biológico con cada método fue estimado en base a los procedimientos detallados anteriormente para cada protocolo, sumando 30 minutos de manipulación de muestras por el operador. Debido a que el tiempo de digestión puede ser variable, en los resultados el tiempo final se expre-



**Figura 2.** Secciones del cuerpo de *Astylus* utilizados para la extracción de ADN con sus respectivos pesos: A) un segmento de pata; B) dos segmentos de pata; C) una pata completa; D) dos patas completas; E) medio abdomen; F) un abdomen entero; G) un individuo completo.

só como la suma del tiempo de digestión determinado por cada autor más el tiempo general del protocolo. Se excluyó el tiempo empleado para la preparación de soluciones en los métodos.

#### ANÁLISIS DE DATOS

Los datos de rendimiento y calidad de ADN fueron procesados con el programa RStudio (RStudio Team, 2015). Se realizó un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W). Como criterio de significancia se estableció un valor de alpha de 0.05.

#### RESULTADOS

Los valores de la concentración promedio de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) obtenido de las muestras y determinados mediante espectrofotómetro se encuentran en la Tabla 1. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de una corrida electroforética en gel de Agarosa para constatar la presencia de ADN en los extractos.

*Rendimiento y pureza de la extracción de ADN según el protocolo utilizado.*— De acuerdo a los resultados de K-W no se encontraron

diferencias estadísticamente significativas entre los protocolos en lo referido a la concentración de ADN obtenido. Al comparar los resultados de pureza, se encontraron diferencias entre los protocolos, agrupándose inicialmente los de COLUMNAS DEGIRO y CTAB, seguidos por SDS y KIT.

*Rendimiento de la extracción de ADN según el material de partida.*— Según los resultados obtenidos por comparación entre las muestras se diferencian dos secciones estadísticamente diferentes (A y B). La sección A está integrada por: medio abdomen ( $2,500 \pm 2,0\text{mg}$ ) y un segmento ( $0,162 \pm 0,1\text{mg}$ ). Mientras que la sección B está compuesta por: 2 patas ( $0,767 \pm 0,6\text{mg}$ ) y un individuo ( $22,633 \pm 8,4\text{mg}$ ). Además se pudo observar un bloque intermedio entre ellos (Bloque A-B) el cual está integrado por las muestras: una pata ( $0,490 \pm 0,4\text{mg}$ ), un abdomen completo ( $6,300 \pm 0,6\text{mg}$ ) y dos segmentos ( $0,330 \pm 0,3\text{mg}$ ).

*Costo económico y de tiempo.*— Los resultados del análisis del costo se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Resultados de concentración según material de partida y protocolo utilizado, y resultados de pureza obtenida con para cada protocolo.

Medida	Material de partida	Media	D.E.	Min	Max
Concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	Un segmento de pata	30,64	35,22	2,82	104,65
	Dos segmentos de pata	21,06	33,53	0,95	99,06
	Una pata completa	15,27	10,63	3,47	33,02
	Dos patas completas	19,1	8,78	9,26	31,04
	Medio abdomen	296,93	237,25	31,86	607,4
	Un abdomen entero	445,27	580,68	63,23	1786,07
	Un individuo completo	490,94	799,4	8,51	2114,87
	Protocolo	Media	D.E.	Min	Max
Concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	KIT	47,49	71,71	1,92	220,86
	COLUMNAS DE GIRO	70,11	100,59	6,03	363,9
	CTAB	526,27	732,49	0,95	2114,87
	SDS	109,96	111,1	24,43	440,97
Pureza 260/280	KIT	1,56	0,32	1,08	1,91
	COLUMNAS DE GIRO	2,00	0,15	1,82	2,20
	CTAB	1,88	0,81	0,31	2,88
	SDS	1,77	0,20	1,58	2,10

**Tabla 2.** Comparación entre costo económico y costo de tiempo por muestra para cada método de extracción de ADN. En el costo tiempo se expresa el tiempo total y entre paréntesis se desglosa el tiempo de digestión propuesto por cada autor sumado al procesado de las muestras. El costo económico se encuentra expresado en pesos argentinos.

Protocolo	Costo por muestra (\$AR)	Tiempo(horas, minutos)
KIT	34,70	1h, 45 min(1h + 45 min)
SDS	23,51	4 h,30 min(3 h + 1 h, 30min)
CTAB	17,00	4 h,30 min(3 h + 1 h, 30min)
COLUMNAS DE GIRO	12,64	9 h, 10 min(8 h + 1 h, 10 min)

## DISCUSIÓN

En este trabajo observamos que los cuatro protocolos analizados fueron útiles para extraer ADN de coleópteros aún cuando los protocolos no fueron diseñados específicamente para estos organismos. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto al rendimiento entre los cuatro protocolos analizados, esto se debería a la amplitud de cantidad del material de partida utilizado, desde un segmento a un individuo completo, y a que la variación dentro de cada muestra también fue elevada. Sin embargo, al observar los valores de medias de concentración de ADN para cada método (Tabla 1), nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Chen *et al.* (2010), quienes reportaron que los métodos de SDS y CTAB fueron los de mejor rendimiento en su investigación con el gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera*). Por otro lado, en nuestro trabajo, podemos observar que los protocolos del KIT y de COLUMNAS DE GIRO fueron los que reflejaron menores valores de concentración de ADN, esto se debería a que las columnas de giro con las que trabajamos estaban compuestas por fibra de vidrio, las cuales serían menos efectivas en las extracciones. Algunos autores detectaron que los métodos de extracción con columnas de giro de membrana de sílica resultaron más eficientes (Hajibabaei *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2006; Zetzsche *et al.*, 2008; Dittrich-Schröder *et al.*, 2012), encontrando también variaciones en las tasas de extracción de acuerdo a modificaciones en el diámetro de la membrana. Aquellas con gran

diámetro generalmente resultan en una gran cantidad de eluido de muy baja concentración, que no se puede utilizar directamente para PCR (Zetzsche *et al.*, 2008; Dittrich-Schröder *et al.*, 2012).

Los cuatro protocolos analizados mostraron valores de relación de absorbancia (A260 nm/A280 nm) que reflejan ADN de buena calidad. En general, las relaciones esperadas para las muestras de ADN extraídas deben aproximarse a 1,8, aceptando valores que oscilan entre 1,7 y 2,0 (Chen *et al.*, 2010). Los protocolos de SDS y CTAB fueron los que mostraron valores de relación de absorbancia más cercanos a 1,8, por lo tanto tuvieron mayor pureza, seguidos por el protocolo de COLUMNAS DE GIRO; mientras que el KIT de extracción fue el que presentó los valores de menor calidad. Estos resultados son importantes debido a que si bien un método de extracción contiene buena cantidad de ADN, las técnicas moleculares subsiguientes, como por ejemplo, una reacción de PCR, se verían afectadas por las presencia de proteínas que con frecuencia permanecen en la solución estrechamente unida al ADN, incluso la eliminación completa de la proteína no siempre es posible (Chen *et al.*, 2010). La calidad de ADN también se afectaría por la alta concentración de sales utilizadas para la precipitación del mismo (Rodríguez-Romero *et al.*, 2011). Para mejorar la separación de las proteínas del ADN se sugiere incluir en los protocolos un paso de purificación con fenol-cloroformo, pero este paso es poco deseable debido a la toxicidad del fenol, el cual debe utilizarse con la protección de campa-

nas de extracción de gases (Falcón y Valera, 2007; Chen *et al.*, 2010; Dittrich-Schröder *et al.*, 2012). Los protocolos de Chen *et al.* (2010) de SDS y CTAB, realizan un paso con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). En cambio, en el presente trabajo implementamos un paso de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), sin incluir fenol en la mezcla. Con dicha modificación nuestros resultados de pureza de ADN no difirieron de los obtenidos con el protocolo original, por lo cual recomendamos evitar el uso del fenol contaminante.

En cuanto al material de partida, medio abdomen y un segmento de pata resultaron ser los más eficientes en cuanto a la relación de peso de material de partida y ADN obtenido. Sin embargo, al observar las medias de la concentración de ADN se deduce que las muestras de mayor cantidad de material (medio abdomen, abdomen entero e individuo entero) tienen mayores concentraciones y que de hecho, serían de mayor utilidad para aquellas investigaciones donde se requieran importantes valores cuantitativos. Al momento de elegir el material de partida, se debe tener en cuenta que, cuando hay destrucción del individuo, no es posible conservar el mismo como ejemplar de referencia. Esto no resulta útil para estudios que requieran conservar el espécimen voucher; como por ejemplo en los trabajos de generación de la biblioteca de códigos de barras de la vida (Barcode of life). Si bien las muestras compuestas por patas mostraron menor concentración de ADN, la misma es suficiente para el desarrollo de la mayoría de los análisis moleculares y permite conservar el espécimen de referencia. En el trabajo de Rugman-Jones *et al.* (2006) utilizan el individuo completo, haciendo un orificio a un lado del abdomen, lo que resuelve el problema de la conservación de espécimen ya que recupera el exoesqueleto completo, pero para el desarrollo de este protocolo se necesita mayor tiempo (ver más abajo). Cabe destacar que el KIT utilizado recomienda hacer la extracción de 25 mg de tejido animal y en este trabajo se emplearon cantidades menores, lo cual es una ventaja para futuras investigaciones.

El costo económico de extracción también es un factor a tener en cuenta. En este trabajo el protocolo de menor costo fue el de COLUMNAS DE GIRO, seguido por los métodos de extracción por sales y siendo el de mayor costo el KIT comercial. Estos resultados son coincidentes con trabajos referidos a esta temática, la mayoría concluyen que los Kit comerciales resultan más costosos en términos económicos (Ball y Armstrong 2008; Chen *et al.*, 2010; Cadavid Sánchez *et al.*, 2013; Dittrich-Schröder *et al.*, 2012; Asghar *et al.*, 2015). Son recomendables para laboratorios con equipamiento básico, dado que los otros métodos imponen el uso de un laboratorio experimental con mayor infraestructura, como ser campanas de gases, balanzas y agitadores entre otros. Si bien la utilización de kit es costosa, la ventaja de su uso radica en el tiempo de procesado de muestras, ya que estos requieren menor tiempo que el resto de los protocolos (Ball y Armstrong 2008; Chen *et al.*, 2010; Cadavid Sánchez *et al.*, 2013; Dittrich-Schröder *et al.*, 2012; Asghar *et al.*, 2015). El protocolo de las COLUMNAS DE GIRO requiere de un tiempo mayor del que se emplea en los otros procedimientos, esto se debe a que se realiza una digestión toda la noche (“overnight”) equivalente a 8 horas, para efectivizar la extracción. Se debe tener en cuenta que los tiempos de digestión son ajustables de acuerdo al tipo de muestras con las que se trabaje. Por ejemplo, Rugman-Jones *et al.* (2006) realizaron una digestión de 18 horas en insectos del orden Thysanoptera. Ball y Armstrong (2008), en un ensayo con una gran variedad de insectos, obtuvieron mejores resultados de extracción cuando utilizaron tiempos intermedios entre 30 minutos y 1 hora de digestión. Por otra parte, en prácticas realizadas en nuestro laboratorio con extracción de ADN de sangre de aves, se obtuvieron excelentes resultados con 20 minutos de digestión (datos no publicados). Esto muestra que los tiempos de los protocolos de extracción varían de acuerdo al tiempo de digestión que se utilice y estos en definitiva dependen del tipo de material biológico utilizado, siendo recomendable realizar ajustes del mismo para cada caso



de estudio. Es debido a esto que en nuestros análisis se separaron los tiempos de digestión del resto del protocolo. Sin este tiempo, el método del KIT sigue siendo el más veloz, pero en este caso, el método de las COLUMNAS DE GIRO resulta más veloz en relación a los de CTAB y SDS.

En los protocolos de extracción, otro paso que incorpora variaciones en el tiempo de operación, es el de incubación para la precipitación del ADN. Chen *et al.* (2010) encontraron poca variación en la eficiencia de precipitación de ADN en relación al tiempo de incubación y recomiendan realizarla durante toda la noche para muestras pequeñas (15 mg). Por otro lado, un elemento que generalmente no es contemplado en los análisis de tiempo, es el necesario para la preparación de soluciones, el cual, en el caso de los kits no se requieren, o sólo incluye el agregado de etanol o agua bidestilada, mientras que para los otros métodos se requieren varios pasos para producir dichas soluciones los cuales aumentan el tiempo de extracción. Por ejemplo, en la preparación de fenol se requiere de dos pasos de separación de fases, los cuales se recomiendan dejar toda la noche.

### CONCLUSIÓN

Los cuatro métodos comparados son efectivos para la extracción de ADN en individuos del género *Astylus atromaculatus* (Coleoptera: Melyridae). Al evaluar los resultados generales, indicamos que el protocolo de CTAB fue el que brindó mayores beneficios, ya que produce mejores valores de concentración y pureza, además de no ser costoso en términos de tiempo y dinero. Los protocolos de SDS y COLUMNAS DE GIRO son de rendimiento medio, destacándose el último por su costo económico reducido. Finalmente el KIT, si bien mostró resultados positivos en cuanto a extracción, fue el protocolo de menor rendimiento y mayor costo, el cual es sólo recomendable en términos de velocidad y bajos requerimientos de laboratorio. Este estudio brinda un avance en el conocimiento de los protocolos de extracción de ADN para

coleópteros y otros insectos; y es útil para laboratorios que se estén iniciando en esta temática y que incluyan la identificación molecular, la inferencia filogenética y genómica de coleópteros, como de otros insectos relacionados. De igual forma, es útil también, para aquellos estudios que requieren de la preservación de los individuos para análisis morfológicos asociados.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Mg. Graciela Ruiz de Bigliardo y a la Lic. María Sara Caro por los valiosos aportes realizados a este trabajo.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aljanabi S. M., Martínez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.
- Asghar U., Malik M. F., Anwar F., Javed A., Raza A. 2015. DNA Extraction from insects by using different techniques: A Review. *Advances in Entomology*, 3: 132-138.
- Ball S. L., Armstrong K. F. 2008. Rapid, one-step DNA extraction for insect pest identification by using DNA barcodes. *Journal of Economic Entomology*, 101: 523-532.
- Cadavid Sánchez I. C., Rosero García D. C., Uribe Soto S. I. 2013. Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15 (2): 186-192.
- Chen H., Rangasamy M., Tan S. Y., Wang H., Siegfried B. D. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE* 5: e11963. (doi:10.1371/journal.pone.0011963).
- Chen M., Zhu Y., Tao J., Luo Y. 2008. Methodological comparison of DNA extraction from *Holoccarrushippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. *For Study China*, 10: 189-192.
- Dittrich-Schröder G., Wingfield M.J., Keein H. y Slippers B. 2012. DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Molecular Ecology Resources*, 12: 109-115.

- Falcón L.I., Valera A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. En Eguarte, V. Souza y X. Aguirre (compiladores), *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 499-515.
- Hajibabaei M., Ivanova N.V., Ratnasingham S., Dooh R. T., L Kirk S. L., Mackie P. M., Paul D. N., Hebert P. D. N. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 360: 1959-1967.
- Ivanova N. V., Dewaard J. R., Hebert P. N. V. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 6: 998-1002.
- McKenna D.D., Wild A.L., Kanda K., Belamy C.L., Beutel R.G., Caterino M.S., Farnum C.W., Hawks D.C., Ivie M.A., Jameson M.L., Leschen R.A.B., Marvaldi A.E., McHugh J.V., Newton A.F., Robertson J.A., Thayer M.K., Whiting M.F., Lawrence J.F., Slipinski A., Maddison D.R., Farrell B.D. 2015. The beetle tree of life reveals that coleoptera survived end-permian mass extinction to diversify during the cretaceous terrestrial revolution. *The Royal Entomological Society. Systematic Entomology*, 46 pp.
- Milligan B. G. 1998. Total DNA isolation. In: Hoelzel AR (ed.) *Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach*, 2nd Edition. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, pp. 29-64.
- Padilla Macilla, P. 2008. "Melyridae" en *Biodiversidad de Artrópodos Argentino*. Vol. 2. Lucía E. Claps, Guillermo Debandi, Sergio Roig-Juñent. 2008. *Sociedad Entomológica Argentina*, pp. 597-602.
- Ribera I. 1999. Evolución, filogenia y clasificación de Coleoptera (Artropoda: hexapoda) *Boletín SEA*, 26: 435-458.
- Ribera, I. & Beutel, R.G. 2012. Coleópteros. Capítulo 31. En: Vargas, P y Zardoya, R. (eds.) *El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos*. Madrid, pp. 312-321.
- Rodríguez Romero A., Posos Ponce P., Peteira B., Suris M. 2011. Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN en insectos del Orden Thysanoptera. *Revista de Protección Vegetal*, 26:187-190.
- RStudio Team. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>
- Rugman-Jones P. F., Hoddle M. S., Mound L. A., Stouthamer R. 2006. Molecular Identification key for pest species of Scirtothrips (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*, 99: 1813-1819.
- Ślipiński S. A., Leschen R. A. B., Lawrence J. F. 2011. Order Coleoptera Linnaeus, 1758. In *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*, Z. Q. Zhang (ed.). *Zootaxa* 3148: pp. 203-208.
- Waldschmidt A. M., Salomão T. M. F., Barros E. G. Oliveira Campos L. A. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20: 421-423.
- Zetsche H., Klenk H. P., Raupach M. J., Kneibelsberger T., Gemeinholzer B. 2008. Comparison of methods and protocols for routine DNA extraction in the DNA bank network. In: Gradstein R, Klatt S, Normann F, Weigelt P Willmann R, Wilson R (eds.) *Systematics Universitätsverlag Göttingen*, Göttingen, p. 354.