

DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO Y SENCILLO PARA EL AISLAMIENTO DE ADN DE ESPECIES FÚNGICAS QUE AFECTAN AL ARROZ Y EL TABACO

E. Miranda e Ileana Sandoval

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

Los patógenos fúngicos son causantes de graves y severos daños en la mayoría de los cultivos de nuestro país. Tal es el caso de la pata prieta del tabaco, causada por el hongo de suelo *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, que puede ocasionar graves pérdidas en fase de semilleros en el país, así como la pudrición de la vaina del arroz por *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams & Hawsks., patógeno recientemente registrado para las condiciones de Cuba, capaz de necrosar intensamente las vainas de las panículas y provocar manchado y vaneado de los granos con pérdidas en los rendimientos [Sandoval *et al.*, 1999].

La caracterización de los hongos mediante marcadores moleculares puede propiciar un mayor entendimiento de la epidemiología de las enfermedades, lo que se revertiría en un mejor control [Crowhurst *et al.*, 1995].

Los marcadores RAPD se basan en el PCR, para lo cual se utilizan cebadores de 10 nucleótidos con una secuencia arbitraria, según Williams *et al.* (1990). Los patrones de bandas obtenidos con cada iniciador sirven para estudiar la variabilidad genética intra e inter-poblacional de los patógenos, así como sus relaciones taxonómicas.

Estos estudios se hacen generalmente con un número elevado de cepas, por lo que se necesita un método rápido y simple de obtención de ADN que permita procesar una gran cantidad de muestras al mismo tiempo.

En este estudio se presenta un protocolo para la extracción de ADN desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, el cual muestra resultados adecuados para los fines antes expuestos en relación con las especies fúngicas *S. oryzae* y *P. nicotianae*.

Para la obtención del ADN se tomó de 0,5-0,75 g de micelio de los cultivos de los hongos crecidos en sustra-

to líquido papa dextrosa, y se trituró en un microtubo de 1,5 mL con 500 µL de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH = 7,5; 50mM EDTA, 2% de SDS y 1% de Na₂SO₃).

La mezcla fue macerada en el microtubo, se agitó en el vortex durante un minuto y posteriormente se centrifugó a 6 000 rpm durante diez minutos. El sobrenadante fue calentado durante quince minutos a 80°C, seguido de una extracción con un volumen de fenol-cloroformo (1:1) y centrifugación a 10 000 rpm por diez minutos. Se colectó la fase acuosa y se le agregó igual volumen de isopropanol. La mezcla fue colocada en frío durante veinte minutos y centrifugada a 10 000 rpm por espacio de diez minutos. Se desechó el sobrenadante, y el precipitado fue secado a 37°C durante treinta minutos y resuspendido en 50 µL de buffer TE1X pH = 8.

Las concentraciones de ADN obtenidas fueron de 1 a 2 µg/µL, cantidad suficiente para realizar más de 50 reacciones RAPD. El tiempo total de todo el proceso de extracción fue aproximadamente de tres horas. Siguiendo esta técnica, y según las posibilidades prácticas de nuestro laboratorio, se pueden llegar a procesar al mismo tiempo hasta 15 muestras diferentes por un solo especialista, por lo que se reduce considerablemente el tiempo de procesamiento en relación con otros métodos. Por ejemplo, con el método de Dellaporta *et al.* (1983) puede tomar hasta un día todo el proceso de obtención de ADN y, por los volúmenes que se emplean en los momentos iniciales, es muy difícil el procesamiento de seis muestras paralelamente.

Una de las novedades del método es el empleo del calentamiento a 80°C durante quince minutos para inactivar nucleasas. Muchos métodos de extracción emplean en este paso la incubación con proteinasa K a

37 °C durante al menos una hora [Boehm, 1999], o la incubación a 65°C por una hora [Du Teau y Leslie, 1999], por lo que es obvio el ahorro de tiempo que se obtiene con esta innovación.

La técnica propuesta resultó satisfactoria para la extracción de ADN de dos representantes de los hongos de diferentes grupos taxonómicos, Oomycetes y Deuteromycetes, con resultados excelentes para su inclusión en los estudios de la caracterización molecular de diferentes aislamientos del patógeno de la pudrición de la vaina del arroz *S. oryzae* en diferentes variedades y localidades arroceras del país.

La técnica ha resultado adecuada además para la obtención de ADN de tabaco y frijol, por lo que es posible su aplicación para plantas.

REFERENCIAS

- Boehm, E. W.: «Fungal Genomic DNA Extraction (on Line)», <http://www.protocolonline.net/molbio/DNA/fungal-genomic-dna-extraction.htm> (consulta: diciembre 1999).
- Crowhurst, R. U. et al.: «RAPD Characterization of *Fusarium oxysporum* Associated with Wilt of Angsana (*Pterocarpus indicus*) in Singapore», *Mycol. Res.* 99: 14-18, 1995.
- Dellaporta, S. L.; J. Wood; J. B. Hichs: «A Plant Molecular DNA Mini-preparation, Version II», *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21, 1983.
- Du Teau, N. M.; J. F. Leslie: «A Simple, Rapid Procedure for Isolation of DNA for PCR from *Gibberella fujikuroi* (on Line)», <http://www.protocolonline.net/molbio/DNA/simple-rapid-dna-extraction.htm> (consulta: diciembre 1999).
- Sandoval, Ileana et al.: «Primer reporte en Cuba de la enfermedad de la pudrición de la vaina del arroz por *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams & Hawk», *Fitosanidad* (La Habana) 3(4): 7-11, 1999.
- Williams, J. G. K. et al.: «DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful As Genetic Markers», *Nucl. Acids Res.* 18:22: 6531-6535, 1990.