

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA EL USO DE SSRs, ISSRs Y AFLPs EN CHAPULINES

¹J. Natividad Gurrola-Reyes, ²Rene Torres-Ricario, ¹Isaias Chairez-Hernández y ¹María Berenice González-Maldonado. ¹Academia de Entomología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango, México. ²Alumno del Doctorado en Ciencias en Biotecnología nodo CIIDIR Durango. IPN. BECARIOS DE COFAA. ngurrola@ipn.mx.

RESUMEN: Los saltamontes son objeto de estudio a lo largo del mundo, debido al gran daño que puedan causar. En el presente trabajo se realizó una comparación de dos métodos de extracción de ADN en base CTAB y SDS su aplicación con diferentes marcadores moleculares en *Boopedon nubilum* y *Melanoplus lakinus*, Obteniendo diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la pureza y la cantidad de ADN entre los distintos métodos, y aplicando estas muestras a marcadores moleculares codominantes (SSRs) y dominantes (ISSRs y AFLPs) para estudios preliminares de variabilidad genética, obteniendo valores de Índice de contenido Polimórfico PIC=68% para AFLPs. Este es el primer reporte que se presenta para obtención de ADN y uso de marcadores moleculares para estas especies

Palabras clave: SDS, CTAB, Saltamontes y ADN.

Evaluation of two methods for DNA extraction using SSRs, AFLPs ISSRs AND IN grasshoppers

ABSTRACT: Grasshoppers are studied throughout the world due to the great damage they may cause. In this paper a comparison of two methods of DNA extraction was performed according CTAB and SDS application with different molecular markers and *Melanoplus lakinus* and *Boopedon nubilum*, Obtaining significant differences ($p < 0.05$) with respect to the purity and amount of DNA between different methods and applying these samples codominant molecular markers (SSRs) and dominant (ISSRs and AFLP) for preliminary studies of genetic variability, obtaining values of PIC Polymorphic index content = 68% for AFLPs. This is the first report to be submitted for DNA extraction and use of molecular markers for these species.

Key words: SDS, CTAB, Grasshoppers and DNA.

Introducción

Saltamontes y langostas de la familia Acrididae son los grupos de fitófagos más grandes del mundo, catalogados muchos de ellos como plagas potenciales en pastizales y algunos cultivos (Latchininsky *et al.*, 2011) A diferencia del impacto que ocasionan las langostas (*Schistocerca gregaria*) debido a su gran movilidad (alrededor de 100 km en 9 a 10 horas), los saltamontes generan impactos más crónicos y locales debido a su comportamiento (Blanchet *et al.*, 2012; Lecoq, 2003). Esta naturaleza de las langostas, aunado a una gran fecundidad da como resultado en una baja estructura genética de sus poblaciones (Chapuis *et al.*, 2008). A pesar de la importancia que tiene el estudio de las estructuras poblacionales de las especies en cuestiones de manejo, como de los patrones de variabilidad genética y sus efectos debido a los factores intrínsecos dentro de las poblaciones, estos han sido poco estudiados en especies de saltamontes con comportamiento de migración baja (Simpson *et al.*, 2009; Sword *et al.*, 2005; Toro and Caballero, 2005). Debido a que la dinámica poblacional y estructura genética de los saltamontes difiere de las langostas es importante el estudio de estos para generar un mejor entendimiento de las especies presentes alrededor del planeta. Existen diversos estudios de esta naturaleza en el mundo dentro del orden ortóptera por lo que podemos identificar la importancia que tienen estas investigaciones y las implicaciones tanto económicas como de carácter ecológico que puede alcanzar (Brede *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Las especies *Boopedon nubilum* y *Melanoplus lakinus* comparten una distribución espacial similar, provenientes del sur de Canadá hasta

la zona centro de México, en el estado de Durango estas especies son las que se encuentran en mayor densidad junto con *Brachystola magna*. Por otro lado actualmente se cuenta con una gran variedad de herramientas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usadas para estudios taxonómicos, de genética poblacional y evolutivos (Lagisz *et al.*, 2010). Teniendo como paso inicial y en ocasiones como limitante la extracción de ADN. Una gran variedad de métodos se han desarrollado y se han evaluado en base a su eficiencia, costo y efectos relacionados comúnmente con la degradación del ADN. Los métodos basados en SDS (Dodecilsulfato sódico o Laurilsulfato sódico) y CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio o Bromuro de cetiltrimetilamonio) son de los más comúnmente usados en una gran variedad de organismos (Chen *et al.*, 2010). En el presente trabajo se realizó una comparación de dos métodos de extracción de ADN en base CTAB y SDS y su aplicación con diferentes marcadores moleculares (SSRs, ISSRs Y AFLPs) en *Boopedon nubilum* y *Melanoplus lakinus*.

Materiales y Método

Se analizaron 71 individuos de la especie *B. nubilum* y 78 individuos de la especie *M. lakinus*, colectados de diferentes partes a lo largo del estado de Durango. Se emplearon dos protocolos de extracción de ADN y se realizó una caracterización de marcadores moleculares SSRs (microsatelites), ISSRs y AFLPs con el ADN obtenido de ambos protocolos.

Extracción de ADN basado en CTAB. El protocolo establecido por Barragán-Valencia *et al.*, (2009) (Barragán-Valencia *et al.*, 2009) basado en CTAB en el que los insectos se lavaron cuatro veces con una solución 0.065% de NaCl para remover etanol e impurezas. Los tejidos se homogenizaron en solución buffer CTAB (2%CTAB, 1.4M NaCl, 0.2% 2-mercaptoetanol, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8) a 60°C durante una hora. Se agregó un volumen de solución de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), se mezcló vigorosamente, y centrifugó a 6000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa, se mezcló con dos volúmenes de isopropanol frío, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos para la precipitación de los ácidos nucleicos. Se centrifugó a 6000g durante 10 minutos; el sobrenadante se descartó y la pastilla resultante se lavó dos veces con etanol al 75%. Finalmente la pastilla de ácidos nucleicos se resuspendió en 50µL de buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.4).

Extracción de ADN basado en SDS El protocolo empleado por Aljanabi y Martínez (1997), Basado en SDS y que ha sido empleado con una amplia gama de grupos de organismos (Aljanabi and Martinez, 1997). Los tejidos fueron homogenizados en 400 µL de un regulador (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA), durante 5 minutos como mínimo por muestra, Se agregaron 40µL de solución de SDS al 20% (concentración final del 2%) y 8µL de solución 20mg/mL de proteinasa K (400µg/mL concentración final), se mezcló en vortex. Las muestras fueron incubadas de 55 a 65°C durante dos horas. Se les agregaron 300µL de solución 6M de NaCl, se mezclaron y se centrifugaron durante 30 minutos a 10000g. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y, estéril. Se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló vigorosamente y las muestras se incubaron a -20°C durante una hora, después se centrifugó durante 20 minutos a 10000 g (4°C). La pastilla de ácidos nucleicos se lavó dos veces con etanol al 70%, se dejó secar y se re suspendió en 500µL de agua bi-destilada.

Caracterización de marcadores moleculares

AFLPs. Se utilizó el protocolo establecido por Vos *et al.*, (1995) (Vos *et al.*, 1995), debido a que el genoma de los chapulines es peculiarmente grande a comparación de otros organismos en los cuales se ha empleado esta técnica, se emplearon modificaciones propuestas por Sword (2005) (Sword *et al.*, 2005) en se emplearon extensiones de pares de bases en los cebadores tanto de la pre amplificación (EcoRI +CA, +CG y Tru9I +CT,+C) como de la amplificación selectiva (EcoRI CTCC,

Tru9I +CAAT, +CGAC, +CCTG) para disminuir el número de fragmentos amplificados y poder tener un número manejable para el procesamiento de los datos. Los productos pre amplificados se diluyeron en relación 1:10 en buffer TE (pH 7.5) y se almacenaron a -20°C para su conservación. Se visualizaron los fragmentos amplificados en geles de poliacrilamida al 6%, tiñéndolos con Sybergold (INVITROGEN).

SSRs. Para le análisis de Microsatelites se utilizó el protocolo descrito por Teng (2007) (Teng and Kang, 2007) usando once pares de cebadores de la especie *Odealous decorus*, con modificaciones en las condiciones de PCR con las siguientes condiciones de amplificación, temperatura de desnaturalización de 94°C por 5 min, 35 ciclos dividido en 1 min 30s a 94°C, 1 min de la correspondiente temperatura de alineamiento de los cebadores de 55°C y 1 min a 72°C, con un paso final a 72°C durante 7 min.

ISSRs. Para el análisis de ISSRs se empleó el protocolo establecido por Manrique-Poyato (2013) (Manrique-Poyato et al., 2013) empleando nueve cebadores diferentes. Con modificaciones en las temperaturas de alineamiento con respecto al artículo de referencia para algunos iniciadores.

Resultados y discusión

Extracción de ADN. En ambos protocolos se obtuvo el 100% de extracción positiva, tanto para *Boopedon nubilum* como para *Melanoplus lakinus.*, con una cantidad media de 244.61 ng/μL para el método con CTAB y una pureza promedio de 1.51 (relación 260/280 nm) (Absorbancia ADN/absorbancia proteínas), mientras que en el método SDS, se obtuvo una cantidad promedio de 382.17 ng/μL con una pureza de 1.96, lo que muestra diferencias significativas con respecto a la pureza o relación 260/280nm entre protocolos (Cuadro 1), así como entre la cantidad de ADN obtenida por cada uno de los métodos. Mientras que en el cuadro 2 se observa que la cantidad y la pureza registrada para la especie *B. nubilum* muestra una diferencia (p < 0.05) entre la cantidad obtenida de machos con respecto a la obtenida de las hembras, pero no se observó diferencia entre la pureza. Aun y cuando las hembras son de tamaño mayor que los machos, en base a un análisis de correlación de Pearson no se encontró relación entre el tamaño del insecto con la cantidad de ADN(R =.105, p = 0.115).

Cuadro 1. Cantidad y pureza de ADN de saltamontes de las especies *Boopedon nubilum* y *Melanoplus lakinus*, obtenidos con dos métodos de extracción de ADN

Método	Pureza (260/280)	Cantidad (ng/μL)	Análisis de varianzas	
			F	Sig (p=0.05)
SDS	1.96±0.45	382.17	3.29	.007
CTAB	1.51±0.41	244.61	7.19	.008

Cuadro 2. Comparación de machos y hembras de la especie *Boopedon nubilum* mediante dos Protocolos de extracción de ADN

	Machos	Hembras	t	g.l	p
Pureza (260/280)	1.70±0.4	1.69±0.4	0.14	139	0.88
Cantidad (ng/μL)	263.40	444.98	-4.33	139	0.00

t= valor calculado de t, g.l= grados de libertad, p= significancia (0.05).

Caracterización de los marcadores moleculares

Con las extracciones de ADN obtenidas se aplicaron pruebas preliminares para los marcadores AFLPs, SSRs y ISSRs. Se utilizaron solo las muestras que presentaron los mayores valores de pureza y cantidad de ADN.

Para la amplificación de AFLPs se requirió una pureza e integridad mayor de ADN, y se obtuvieron resultados positivos en ambas especies, demostrando que ambos protocolos son ideales para la obtención de ADN de calidad. Se analizaron siete individuos de cada especie con tres combinaciones de cebadores para la pre amplificación y la amplificación selectiva, se manejó la combinación que amplificó en todas las muestras, de esta combinación se analizaron 30 individuos por especie para calcular el PIC y el tamaño mínimo requerido para estudios de variabilidad. En la figura 1. 3a se observa las amplificaciones positivas de las siete muestras de *M. lakinus* y en la figura 1. 3b se observa las amplificaciones positivas de la muestra *B. nubilum*.

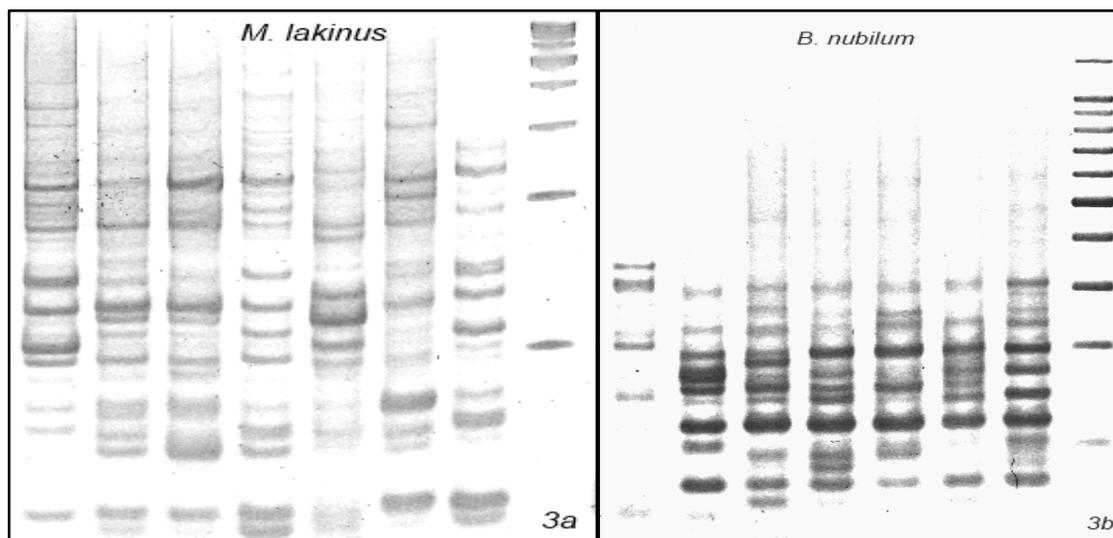


Figura 1. 3a. Amplificaciones positivas de *M. lakinus* por medio de AFLPs (marcador de peso molecular a la derecha 100pb). 3b. Amplificación de siete muestras de *B. nubilum* por medio de AFLPs (marcador derecha 100pb)

En la amplificación con SSR se obtuvieron buenos resultados con la especie *M. lakinus* ya que se amplificaron siete de los once cebadores, aunque en base al análisis de la probabilidad combinada de exclusión para identificar los marcadores ideales para estudios de variabilidad solo tres presentaron valores de (PCE = 0.999) por lo que son los ideales para realizar estudios de variabilidad genética de esta especie, y para la especie *B. nubilum* solo se amplificó un cebador de los once aplicados por lo que se recomienda el uso de microsatelites más relacionados a la especie figura 2.

Las muestras amplificadas para ISSRs mostraron resultados positivos de amplificación para la especie *B. nubilum* en seis de los nueve cebadores y solo tres para la especie de *M. lakinus* aunque esta última no presentó un porcentaje de loci polimórfico necesario para estudios de variabilidad (PIC = 5%) debido a que el número de alelos obtenidos fue escaso, pudiendo ocurrir problemas en la amplificación o un grado mayor de mutación en el marcador impidiendo así su amplificación (Fig. 3).

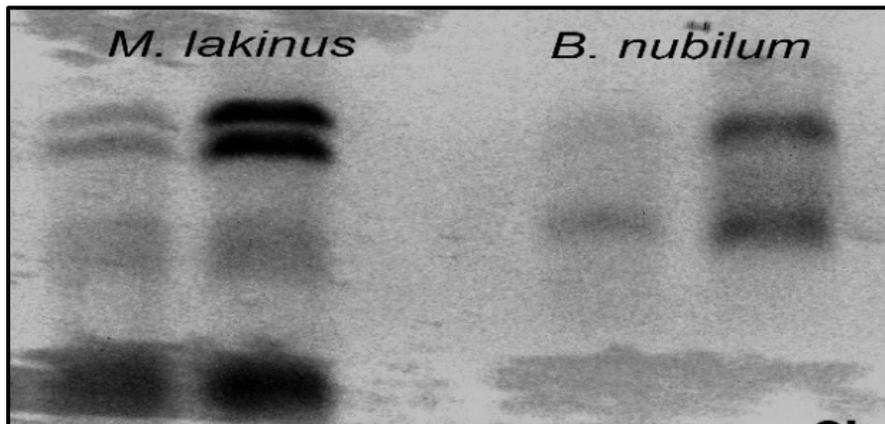


Figura 2. Amplificación de dos muestras de *M. lakinus* de un cebador de microsatelites y dos muestras de *B. nubilum*

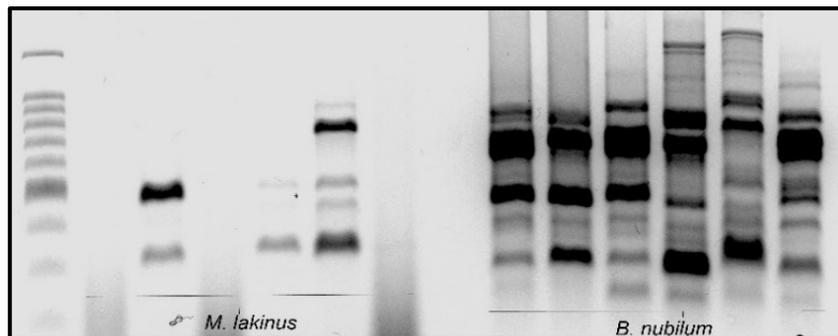


Figura 3. Amplificación de seis cebadores de ISSRs en muestras de *M. lakinus* y *B. nubilum*

El programa Infogen (Balzarini M.G., 2013) mostro un mínimo de 18 muestras para el estudio poblacional de las especies *B. nubilum* y *M. lakinus* y se obtuvieron valores de PIC de 68% para *B. nubilum* y 46% para *M. lakinus*. Obteniendo valores similares a los obtenidos por (Li et al., 2011) (36-64%). La obtención de ADN a partir de las dos métodos de CTAB y SDS mostraron diferencias entre ellos, Obteniendo ADN con un nivel de pureza mayor las muestras obtenidas por el método de SDS ($260/280=1.96$), resultados parecidos a los obtenidos por (Aljanabi and Martinez, 1997) (1.97) pero se obtuvo una cantidad menor a la reportada por el mismo autor ya que en el presente estudio se obtuvo una cantidad promedio de 380 ng/ μ L comparada con los 800 ng/ μ L. No se presentó correlación entre los métodos de extracción y la pureza y cantidad de ADN ($r = 0.105$, $p = 0.201$). Las muestras de la especie *B. nubilum* muestran diferencias solo en la cantidad de ADN obtenida sin relación con respecto al peso ni al tamaño de los insectos por lo que pudieran existir factores de otro tipo que influyan entre machos y hembras. El único marcador molecular que se amplificó en el 100% de las muestras analizadas en ambas muestras fue los AFLPs, siendo esta una técnica que tiene como restricción principal la calidad y cantidad de ADN empleada ya que al ser llevar una digestión con enzimas de restricción se requiere de una pureza mayor a la que normalmente se trabaja. Por lo que los problema de amplificación de los SSRs y los ISSRs podrían deberse principalmente a cuestiones de variación dentro de las secuencias de estos marcadores moleculares. Por lo que con ayuda de estos datos podemos realizar trabajos variabilidad genética de estas especies dentro del estado de Durango.

Literatura Citada

- Aljanabi, S. M., and I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25: 4692-4693.
- Balzarini M.G., D. R. J. A. I. F. 2013. InfoGen versión 2013. U.Nal. de Córdoba, Argentina. Barragán-Valencia, G., N. Almaraz-Abarca, R. Álvarez-Zagoya, A. E. Delgado-Alvarado, and J. F. Pérez-Domínguez. 2009. DNA Isolation from *Diabrotica Virgifera Zeae* Krysan and Smith and *Diabrotica Virgifera Virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) by a CTAB Simplified Procedure. *Southwestern Entomologist* 34: 289-294.
- Blanchet, E. et al. 2012. Population structures of three *Calliptamus* spp.(Orthoptera: Acrididae) across the Western Mediterranean Basin. *European Journal of Entomology* 109.
- Brede, E. G., J. Adis, and P. Schneider. 2008. Genetic diversity, population structure and gene flow in native populations of a proposed biocontrol agent (*Cornops aquaticum*). *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 666-676.
- Chapuis, M. P. et al. 2008. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular ecology* 17: 3640-3653.
- Chen, H., M. Rangasamy, S. Y. Tan, H. Wang, and B. D. Siegfried. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PloS one* 5: e11963.
- Lagisz, M., G. Port, and K. Wolff. 2010. A cost-effective, simple and high-throughput method for DNA extraction from insects. *Insect Science* 17: 465-470.
- Latchininsky, A., G. Sword, M. Sergeev, M. M. Cigliano, and M. Lecoq. 2011. Locusts and grasshoppers: behavior, ecology, and biogeography. *Psyche: A J. Entomol.* 2011.
- Lecoq, M. 2003. Desert locust threat to agricultural development and food security and FAO/international role in its control. *Arab Journal of Plant Protection* 21: 188-193.
- Li, T. et al. 2010. Host-associated genetic differentiation in rice grasshopper, *Oxya japonica*, on wild vs. cultivated rice. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 958-963.
- Li, T. et al. 2011. Population genetic structure and phylogeographical pattern of rice grasshopper, *Oxya hyla intricata*, across Southeast Asia. *Genetica* 139: 511-524.
- Manrique-Poyato, M. I., M. D. López-León, R. Gómez, F. Perfectti, and J. P. M. Camacho. 2013. Population genetic structure of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the south and east of the Iberian Peninsula. *PloS one* 8: e59041.
- Simpson, S. J., G. A. Sword, D. Whitman, and T. Ananthakrishnan. 2009. Phase polyphenism in locusts: mechanisms, population consequences, adaptive significance and evolution. *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences*: 147-189.
- Sword, G. A., A. Joern, and L. B. Senior. 2005. Host plant-associated genetic differentiation in the snakeweed grasshopper, *Hesperotettix viridis* (Orthoptera: Acrididae). *Molecular ecology* 14: 2197-2205.
- Teng, Z.-Q., and L. E. Kang. 2007. Microsatellites reveal the genetic structure of thelytokous strains of the migratory locust. *Insect Science* 14: 193-199.
- Toro, M. A., and A. Caballero. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360: 1367-1378.
- Vos, P. et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* 23: 4407-4414.