

EXTRACCION DEL ADN DE *Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi*

Sixta T. Martínez*, Carlos Y. Soto

*Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Apartado Aéreo 14140. Santafé de Bogotá.

Keywords: *Fusarium* DNA, Filamentous fungi DNA.

RESUMEN

Se estudia la utilización de dos métodos para la extracción del ADN del *Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi*. En los dos métodos la pared del hongo se rompió con nitrógeno líquido, uno de ellos empleó como solución extractora bromuro de cetil trimetil amonio (BCTA) y el otro una solución de sacarosa con altas concentraciones de proteasa y EDTA. Para la desproteínización ambos métodos utilizaron soluciones de fenol-cloroformo y enzimas proteolíticas.

El ADN obtenido se digirió con enzimas de restricción EcoRI y HindIII.

Se corroboró que el ADN estaba libre de los contaminantes más frecuentes en hongos, como proteínas y carbohidratos por medio de ultracentrifugación en cloruro de cesio (CsCl). La extracción con BCTA presentó los mejores rendimientos.

ABSTRACT

Two methodologies are presented for the extraction of *Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi* DNA. The cell wall of the fungus was disrupted using liquid nitrogen. Extraction of DNA with either cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) or high concentrations of protease and EDTA was carried out. A final extraction with phenol/chloroform was done to eliminate residual protein. The DNA obtained can be digested with EcoRI or HindIII. Ultracentrifugation in CsCl gradients showed that the DNA was free of most contaminants (protein, polysaccharides). The CTAB extraction method shows a better yield of DNA.

INTRODUCCION

El *Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi* es un patógeno que ataca el clavel, y causa marchitamiento vascular ocasionando pérdidas económicas en los cultivos de esta

planta. Se han ensayado varios métodos para eliminar la infección como tratamiento con vapor, fungicidas, tratamiento con iones etc., sin encontrarse resultados efectivos (1).

Una posibilidad para disminuir los efectos del patógeno, surge si se conoce el genoma del parásito, para lo cual es necesario aislar el ADN intacto, libre de contaminantes que inhiban las enzimas de restricción.

Existen varios problemas por resolver en la extracción del ADN del hongo, como son el rompimiento de la pared celular sin llegar a dañar la integridad del ADN, la eliminación de contaminantes especialmente los polisacáridos e incrementar el rendimiento.

Se han reportado varios métodos para obtener ADN de hongos, los cuales van encaminados a separar un material en cantidad y calidad suficiente, que permita su utilización en la tecnología de ADN recombinante. Specht y colaboradores (2) desarrollaron un método para la extracción del ADN a partir de hongos filamentosos denominado GEM (Gentle extraction method) que utiliza un período de extracción entre 24 y 78 horas para la eliminación de polisacáridos.

Manicom y colaboradores (3) realizan la extracción de carbohidratos y proteínas con una solución de bromuro de cetil trimetil amonio (BCTA), con este método el ADN se obtiene aproximadamente en seis horas.

Garber y Yoder (4) emplean una solución extractora con sacarosa, EDTA, y proteinasa K, obteniendo buenos rendimientos con un tiempo cercano de 10 horas. Además realizan separación del ADN nuclear, mitocondrial y ribosomal utilizando gradiente en cloruro de cesio y bisbenzimidida como colorante para visualizarlo. Reader y Broda (5) desarrollaron un método rápido, el cual tiene una duración aproximada de dos horas, para la extracción del ADN a partir de hongos filamentosos.

Debido a la necesidad de conocer el genoma del parásito, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar las condiciones favorables para el cultivo del *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi* y obtener el ADN del hongo libre de los contaminantes más frecuentes como son las proteínas y los carbohidratos con base en los procedimientos anteriores.

MATERIALES Y METODOS

El hongo fue suministrado por la compañía Floramerica¹, en donde lo aislaron de claveles infectados.

¹ Empresa de cultivo de flores para exportación

El cultivo del hongo se realizó en caldo de papa (400 gr de papa/lit de agua) enriquecido con glucosa. Se ensayaron varias concentraciones de glucosa 0.2%, 5%, 10% y diferentes tiempos de crecimiento entre 10-20 días, para observar a qué tiempo y con qué concentración de glucosa se obtenía un buen rendimiento. A diferencia del método de Manicom (3) que cultivó el hongo en medio PDA sin glucosa, y del método de Garber y Yoder que realizó el cultivo en medio completo (CM) sin glucosa.

Extracción del ADN utilizando el método de Manicom B. Q.

Para desarrollar este método se utilizó micelio liofilizado y micelio fresco.

El micelio se maceró en un mortero con proporción (1/30) de solución extractora (1% BCTA, 50 mM tris-HCl pH 8.0, 0.7 M NaCl y 10 mM EDTA), la extracción se realizó a 65°C durante 10 minutos. Cuando se utiliza la solución extractora con BCTA es importante tener en cuenta la concentración del NaCl, ya que a concentraciones menores de 0.5 M los ácidos nucleicos pueden precipitar (6).

La suspensión se extrajo con un volumen igual de cloroformo, alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa superior y se añadió el buffer de extracción anterior pero con 10% de CATB. La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó con un volumen igual de buffer de extracción, al cual se le eliminó el NaCl 0.7 M. Los ácidos nucleicos precipitados se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 3000g y se lavó el precipitado con una solución de etanol al 70%.

El ADN se disolvió en 700 µl de buffer TE (10mM tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA).

Para eliminar el ARN y las proteínas el ADN se digirió con 100µg de RNasa libre de DNasa durante 1 hr a 37°C y luego con 10 µg de proteinasa K por 1 hora a 37°C.

Se realizó extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y luego con cloroformo alcohol isoamílico (24:1).

El ADN se precipitó con 0.1 del volumen de acetato de sodio 3M y 0.6 del volumen de isopropanol, se disolvió en TE (1mM de EDTA, 10mM de tris) y se tomó espectro de absorción.

Extracción del ADN utilizando el método de Garber C. R. y Yoder O. C.

Se partió de cultivo fresco o liofilizado, el cual se suspendió en buffer de extracción frío compuesto de 0.35M de sacarosa, 50mM de EDTA, 10mM de tris-HCl pH 7.4 y 20 µg/ml de proteinasa K. La proporción buffer micelio fue de (2:5).

El homogenizado se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante de aspecto turbio se centrifugó a 25000g en un rotor Sorvall ss-34 durante 1 hora. El "pellet" se disolvió y se homogenizó lentamente en 2.5 ml de buffer fresco de lisis (150mM NaCl, 50mM EDTA, 10mM Tris pH 7.4, 20 µg de proteinasa K/ml).

La lisis de los organelos se llevó a cabo por adición de dodecil sulfato de sodio a una concentración final del 2%. Si la solución no clarificaba con este tratamiento se continuaba la lisis a 65°C durante 45 minutos. El tubo se colocó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3800g en un rotor Sorvall ss-34 durante 10 minutos a 4°C, con el fin de precipitar el material no lisado.

El sobrenadante se desproteinizó utilizando fenol saturado con tris pH 8.0. Se añadió un volumen igual de fenol, se mezcló y se centrifugó a 3000 r.p.m. en una microcentrifuga durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se repitió la extracción de proteínas hasta que no aparecieran en la interfase. Finalmente la fase acuosa se extrajo con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24/24/1) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24/1). El ADN se precipitó con 0.1 del volumen de acetato de sodio 0.3M y con 0.6 del volumen de isopropanol. El ADN precipitado se disolvió en buffer TE y se tomó el espectro de absorción.

Ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

Con el fin de separar el ADN nuclear del mitocondrial se realizó una ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio utilizando bisbenzimidida para visualizar el ADN. Los diferentes ensayos realizados se detallan en la tabla 1.

Digestión con enzimas de restricción (7)

El ADN se sometió a digestión con las enzimas EcoRI y HindIII. Se utilizó 1 µg de ADN el cual se puso en digestión con 1 unidad de enzima a 37 °C durante 1 hora.

Tabla 1. Separación de las clases de ADN por ultracentrifugación en gradiente de CsCl a 50000 rpm y 17 °C.

ROTOR	DENSIDAD gr/ml	TIEMPO horas	VOLUMEN TUBO ml
Sorvall T-875	1.68	24	10.5
Sorvall T-875	1.68	48	10.5
Beckman VTi 65	1.68	24	5.2
Beckman VTi 65	1.40	24	5.2

Determinación del T_m (Temperatura de fusión) (8, 9)

A tres muestras de ADN disueltas en buffer TE, se les realizaron medidas de absorbancia a temperaturas comprendidas entre 17 y 90°C con las cuales se elaboró la gráfica correspondiente. Para determinar un resultado más exacto se calculó la primera y segunda derivada de la figura 1. Basado en este resultado se calculó el % de G+C según:

$$T_m = 69.3 + 0.41 (\%G + \%C) \quad (7)$$

RESULTADOS Y DISCUSION

El hongo se cultivó inicialmente en caldo de papa, sin agitación y sin glucosa siguiendo algunas de las recomendaciones de Manicom; los rendimientos que se obtuvieron en estas condiciones fueron bajos, ya que su crecimiento era lento y se detenía a tiempos prolongados de cultivo (10 a 15 días). Se realizaron varios ensayos de cultivo, utilizando diferentes concentraciones de glucosa en el medio. Se encontró que con concentraciones de glucosa que comprendían entre 5 y 10% durante 15 días se lograba un cultivo del hongo con buen rendimiento (4.8 gr de micelio /100ml), tiempos mayores a 15 días conducen a un envejecimiento acelerado y menores de 13 días no dan un buen rendimiento del cultivo (1.0gr de micelio/100 ml de medio líquido).

En el método reportado por Manicom se utiliza para romper la pared del hongo, maceración del micelio liofilizado con arena. En nuestro caso además del recomendado se utilizó maceración con arena y nitrógeno líquido no habiendo encontrado diferencias en cuanto a rendimiento. Tampoco se observaron diferencias en la extracción utilizando micelio fresco y micelio liofilizado.

Los rendimientos alcanzados con este método estuvieron entre 0.3 mg y 1 mg por gramo de micelio liofilizado, este último valor comparable al reportado por Manicom, de 1mg de ADN por gramo de micelio liofilizado. Garber y Yoder recomiendan para romper la pared el empleo de un homogenizador y aire líquido; en este trabajo se realizó también el rompimiento de ésta con mortero y aire líquido. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó el homogenizador.

Utilizando este método se obtuvieron rendimientos variables, en algunos casos muy bajos (a partir de 60 gr de micelio húmedo se obtuvieron 70 µg de ADN), y en otros rendimientos aceptables (a partir de 60 gr de micelio húmedo se obtuvieron 561 µg de ADN), este último comparable al del artículo en mención en el cual obtenían 270-790 µg de ADN total a partir de 30-60 g. de micelio fresco.

Comparando los dos métodos en cuanto rendimiento, el mejor lo presentó el método de Manicom. Sin embargo la relación $Ab\ 260/280$ para los dos métodos da valores bajos entre 1.11 y 1.44, los cuales están alejados del reportado para el ADN libre de contaminantes (1.8). Este valor bajo podría ser indicio de un alto contenido de proteínas y carbohidratos como contaminantes, lo cual se descartó posteriormente.

El ADN obtenido por ambos métodos se corrió en electroforesis en agarosa (foto 1) y se sometió a digestión con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII, las enzimas actuaron bien en la digestión del ADN (foto 1), se obtuvo un barrido para la digestión del ADN total como se esperaba, lo que está de acuerdo con los resultados de Garber y Yoder, quienes presentan barridos semejantes mostrando que las enzimas no fueron inhibidas por la presencia de contaminantes como las proteínas o los polisacáridos. El ARN tampoco aparece en la electroforesis como contaminante, lo cual se observa en la misma fotografía.

Se intentó separar el ADN obtenido en nuclear y mitocondrial por medio de ultracentrifugación en $CsCl\ d = 1.6$. Se obtuvieron 2 bandas ligeramente separadas, por lo cual resultó muy difícil sacarlas del tubo sin mezclarlas. Con el fin de mejorar

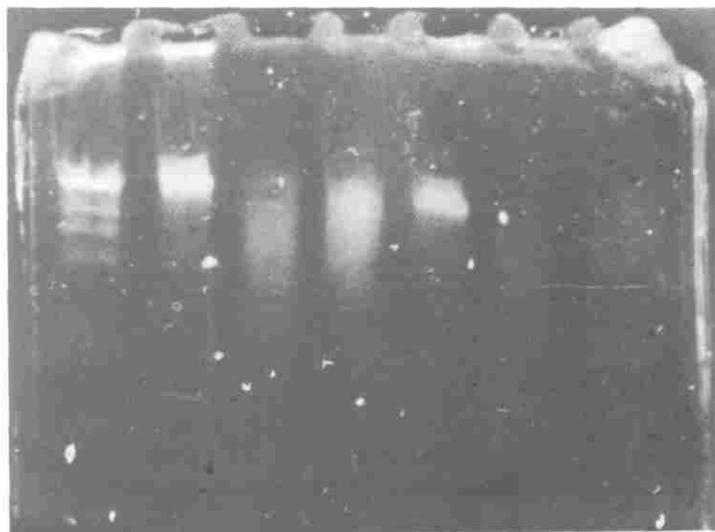


FOTO 1. Electroforesis en gel de agarosa 0.7% del ADN extraído de *Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi*. Digestión del ADN con enzimas de restricción.

Primer carril: patrón de pesos moleculares, lambda cortado con HindIII. Segundo carril: ADN total extraído con el método de Garber y Yoder. Tercer carril: ADN total extraído con el método de Garber y Yoder y digerido con HindIII. Cuarto carril: ADN extraído con el método anterior y digerido con EcoRI. Quinto carril: ADN total obtenido con el método de Manicom. Sexto carril (difuso): ADN extraído con el método anterior y digerido con HindIII.

la separación de las bandas se cambió la densidad del CsCl a 1.4, sin lograr mejorar los resultados anteriores.

Lo que sí se logró corroborar con la ultracentrifugación fue la no contaminación con proteínas, carbohidratos y ARN de la muestra de ADN como se observa en la foto 2. Utilizando también la misma técnica de ultracentrifugación, Reader y Broda demuestran que con la metodología propuesta por ellos el ADN obtenido está libre de los contaminantes mencionados.

Con los métodos de Manicom y de Garber y Yoder se logró extraer a partir de *Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi* un ADN libre de los contaminantes más comunes presentados en hongos filamentosos como son proteínas y carbohidratos. En este trabajo también se cultivó el hongo en un medio económico, y con buen rendimiento, como es el caldo de papa enriquecido con glucosa, medio diferente a los utilizados en los artículos reportados.

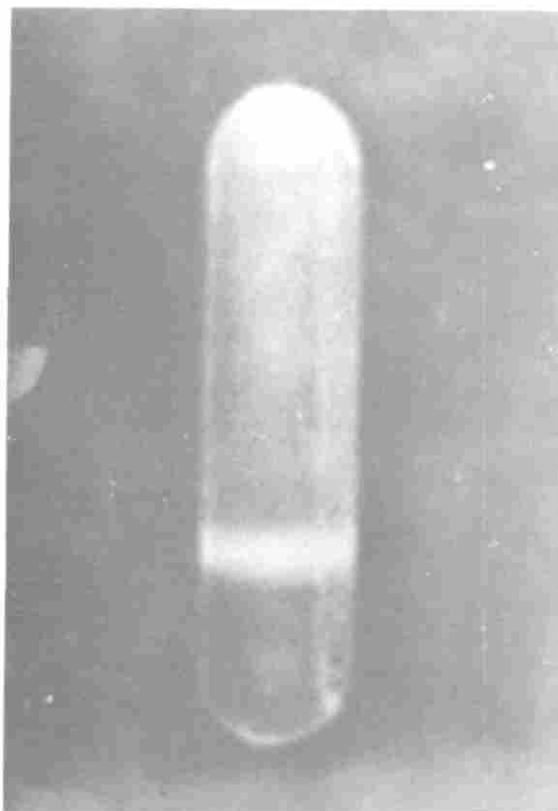


FOTO 2. Ultracentrifugación de DNA total utilizando como colorante bisbenzimidá. Densidad 1.68. Rotor Beckman VTi 65. 50000 rpm.

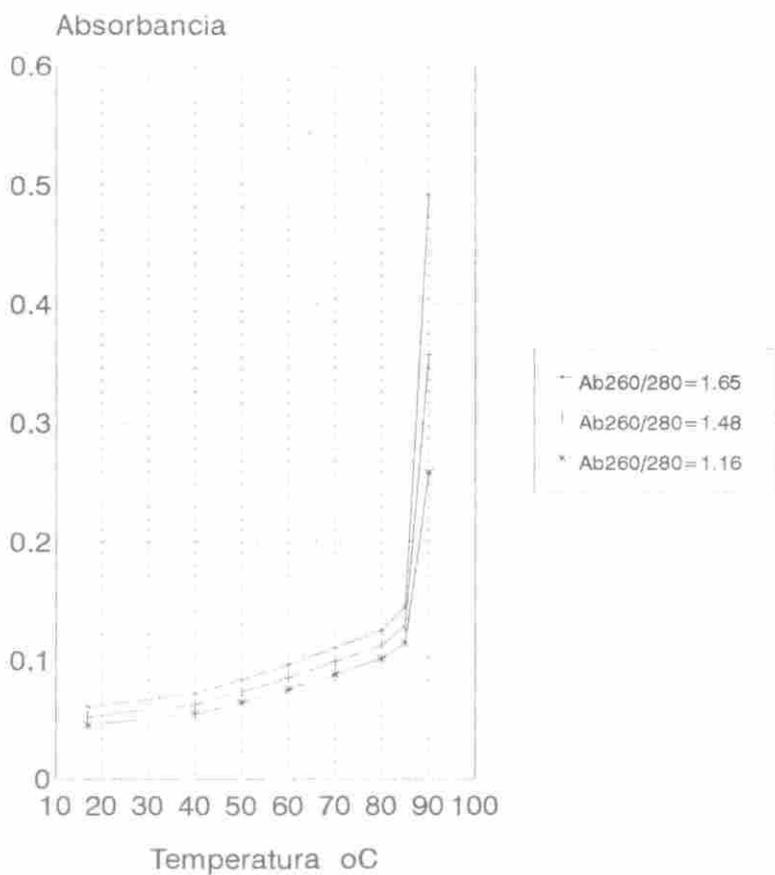


Figura 1
Punto de fusión (T_m) de ADN *Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi*
(Gráfica lograda a partir de 3 muestras de ADN de diferente relación de Absorbancia, 260/280)

Los valores bajos para la relación A_{260}/A_{280} se deben seguramente a contaminación con solventes según la comparación con los espectros de absorción. El isopropanol presenta absorbancia entre 190 y 310 nm, y el cloroformo entre 230 y 290 nm, el fenol absorbe a 260nm, éste último es uno de los contaminantes frecuentes para ADN, el cual influye en la baja relación de A_{260}/A_{280} (10). Se calculó el peso molecular, en forma aproximada, ya que el gel utilizado fue de 0.7% de agarosa, el peso molecular obtenido fue mayor de 36000 pb (237600000 daltons), el cual corresponde a un ADN de gran tamaño como se esperaba para los eucariotes. (foto 1) Se calculó el T_m para tres muestras de ADN provenientes de diferentes extracciones el valor obtenido fue de 85°C el cual corresponde a un contenido de $\%G + \%C = 38.29$ (figura 1).

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo agradecen al CINDEC el soporte financiero, a la compañía FLORAMERICA el suministro del hongo y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia su apoyo logístico.

BIBLIOGRAFIA

1. Guzman, S.; León, J. E., "Control de la marchitez causada por *Fusarium oxysporum f.sp. Dianthi* y *Phialophora cinerescens* en el cultivo de Clavel" Tesis de grado, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, 1985.
2. Specht, A.C.; Dirusso, C.; Novotny, Ch.; Ullrich, C. R., *Analytical Biochemistry*, 1982, 119, 158-163.
3. Manicom, B. Q.; Bar-Joseph, M.; Rosner, A.; Vigodsky-Hass, H.; Kotze, J. M., *Phytopathology*, 1987, 77, 5, 669-672.
4. Garber, C. R.; Yoder, O. C., *Analytical Biochemistry*, 1983, 135, 416-422.
5. Raeder, V.; Broda, P., *Letters Applied Microbiology*, 1985, 1, 1720.
6. Ausbell, F. M., "Current Protocols in Molecular Biology" Green Publishing Associates. Ed. Officers. Massachussets, Supplement 4, number 2, 1988.
7. Maniatis, S. et al. "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Second edition. Cold spring harbor laboratory. USA, 1989.

8. Kurtzman, C. P., "*Molecular Taxonomy of the Fungi*" En gene manipulations in fungi. Edited by J.W. Bennett-Linda. Lasure. Academic Press New York, London, 1985.
9. Davidson, J.N.; Cohn. W.E. "*Progress in Nucleic Acid Research*", vol I. Academic Press New York, London, 1985.
10. Brown, T. A., *Gene Cloning. An Introduction*. Second edition. Chapman Hall. London. New York, 1990.