



## Aislamiento de ADN de alta calidad en *Psidium guajava* L. para estudios genómicos<sup>1</sup>

### High quality DNA isolation in *Psidium guajava* L. for genomic studies

Elodia Sánchez-Barrantes<sup>2</sup>, Eric Mora-Newcomer<sup>3</sup>, Walter Barrantes-Santamaría<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Recepción: 18 de mayo, 2020. Aceptación: 13 de octubre, 2020. Este trabajo formó parte del proyecto "Desarrollo de herramientas genómicas modernas para el mejoramiento de caracteres de calidad en guayaba" inscrito en la vicerrectoría de investigación de la Universidad de Costa Rica.
- <sup>2</sup> Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Laboratorio de Biología Molecular, Alajuela, Costa Rica. elodia.sanchez@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0001-9014-5884>). walter.barrantes@ucr.ac.cr (autor para la correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-5288-451X>).
- <sup>3</sup> Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Programa de mejoramiento genético de la guayaba. Alajuela, Costa Rica. eric.mora@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0003-4713-0622>).

## Resumen

**Introducción.** La guayaba es uno de los principales frutales de la familia Myrtaceae por su alto valor nutricional. Es originario de América tropical y los principales países productores son: México, India, Brasil y Tailandia. El interés generado en los últimos años por el mejoramiento genético de este cultivo, ha propiciado el empleo de herramientas moleculares que permitan determinar la variabilidad genética y seleccionar genes de interés agronómico de una forma rápida y confiable. Sin embargo, el aislamiento de ADN de alta pureza es un requisito previo para poder emplear las técnicas moleculares de última generación. **Objetivo.** Aislar ADN genómico (ADNg) de alta calidad de guayaba, en cantidad e integridad adecuadas. **Materiales y métodos.** El experimento se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, entre enero y diciembre del 2019. Se compararon tres métodos diferentes para aislar ADN: Promega (ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep Kit), Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit) y CTAB (Doyle y Doyle, 1990) con modificaciones. Para la extracción de ADNg se utilizó material fresco y liofilizado de hojas jóvenes de guayaba (*Psidium guajava* L.;  $2n = 22$ ). Para determinar el mejor método se midieron la calidad, cantidad e integridad del ADNg de cada uno. **Resultados.** Se logró obtener ADNg con los tres métodos evaluados, los mejores resultados en cantidad de ADNg ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) se obtuvieron con el material liofilizado y con el método CTAB. Los métodos CTAB y Qiagen mostraron mayor grado de pureza (relaciones A260/280 con valores óptimos) en comparación con el método Promega. **Conclusión.** Se logró obtener ADNg en cantidad, calidad e integridad adecuada. Esto se logró con base en extracciones en tejido liofilizado de hojas jóvenes y con el método de extracción del kit de Qiagen.

**Palabras clave:** guayaba, métodos de extracción de ADN, integridad ADN, cuantificación de ADN, liofilización, secuenciación.



## Abstract

**Introduction.** Guava is one of the main fruit trees of the Myrtaceae family for its high nutritional value. It is originally from tropical America and the main producing countries are: Mexico, India, Brazil, and Thailand. The interest generated in recent years by the genetic improvement of this crop, has led to the use of molecular tools that allow determining genetic variability and selecting genes of agronomic interest in a fast and reliable way. However, the isolation of high-purity DNA is a prerequisite for the use of state-of-the-art molecular techniques for genetic analysis.

**Objective.** Isolate high-quality genomic DNA (gDNA) from guava, in adequate quantity and integrity. **Materials and methods.** The experiment was carried out in the Molecular Biology Laboratory of the Estacion Experimental Agricola Fabio Baudrit Moreno, between January and December 2019. Three different methods for isolating DNA were compared: Promega (ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep Kit), Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit), and CTAB (Doyle and Doyle, 1990) with modifications. For the gDNA extraction, fresh and lyophilized of young leaves of guava (*Psidium guajava* L.; 2n = 22) were used. To determine the best method, the quality, quantity, and integrity of the gDNA were measured for each method. **Results.** The gDNA was obtained with the three evaluated methods. The best results in terms of gDNA quantity (ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) were obtained with the lyophilized material and with the CTAB method (Doyle and Doyle). The CTAB (Doyle and Doyle) and Qiagen methods showed a higher degree of purity (A260 / 280 ratios with optimal values) compared to the Promega method. **Conclusion.** The gDNA was obtained in adequate quantity, quality, and integrity. This was achieved based on extractions in lyophilized young leaf tissue and with the extraction method of the Qiagen kit.

**Keywords:** guava, DNA extraction methods, DNA integrity, DNA quantification, lyophilization, sequencing.

## Introducción

La guayaba (*Psidium guajava* L.; 2n = 22) es un frutal tropical perteneciente a la familia Myrtaceae. Conocida como fruto del pobre o manzana del trópico, es nativa de América y, actualmente, está ampliamente distribuida en las regiones tropicales del mundo (Prakash et al., 2002).

Entre los principales países productores se encuentran India, México, Brasil y Tailandia, aunque esta especie se considera un cultivo secundario en términos de comercio mundial, su importancia económica está relacionada con el uso de la fruta y sus múltiples productos derivados como jugo, pasta y mermelada, que contienen altas cantidades de vitaminas A y C, fibra y calcio (Risterucci et al., 2005). Además, se ha informado que diferentes partes de las plantas como hojas, raíces y corteza, son útiles en el tratamiento de gastroenteritis, diarrea, disentería e infecciones fúngicas (Kanupriya et al., 2011), por lo que también posee gran importancia por sus usos farmacéuticos.

En cuanto a recursos fitogenéticos, existe germoplasma para producir variedades que producen tanto frutos climatéricos como no climatéricos (Chen et al., 2017), estos últimos de larga vida pos-cosecha, lo cual permite su transporte a largas distancias. También se ha observado variabilidad genética en cuanto a sabores (Moon et al., 2018). La guayaba es una de las pocas especies frutales que no requiere inducción ambiental para florecer, por lo que se puede producir durante todo el año. Esta serie de características que presenta este frutal, lo convierten en un cultivo con potencial para adquirir una gran relevancia y a su vez, despierta gran interés en cuanto a su mejoramiento genético. Sin embargo, actualmente existe muy poca información genética disponible y, además, esta especie no es candidata idónea para el análisis genético clásico, por ser árboles leñosos perennes con un ciclo reproductivo largo, que hace que este tipo de análisis sean demasiado lentos y laboriosos (Hendre & Aggarwal, 2007).

El uso de la caracterización morfológica es poco práctico para discriminar genotipos estrechamente relacionados, debido a que los afectan el ambiente, las interacciones epistáticas, los efectos pleiotrópicos, entre otros. Esta situación incentiva el desarrollo de protocolos moleculares específicos que aceleren y brinden fiabilidad

en la caracterización del acervo genético, que conlleven a una utilización más eficiente del germoplasma disponible en los programas de mejoramiento genético (Hendre & Aggarwal, 2014).

La agricultura moderna emplea cada vez con mayor frecuencia las nuevas técnicas moleculares, un ejemplo son los programas de mejoramiento mediante biotecnología. Para poder desarrollar y utilizar eficientemente las herramientas moleculares, es fundamental contar con protocolos de extracción de ADN, que produzcan aislamientos de buena calidad y con un alto rendimiento, lo cual ha sido un factor limitante en muchos análisis genéticos de las plantas (Healey et al., 2014; Pommer & Murakami, 2009). En el caso de aplicaciones nuevas, como los ensayos de secuenciación de una sola molécula, el genotipado SNP de alto rendimiento y la secuenciación Illumina de lectura corta, requieren un ADN sin fallas, que sea de alta calidad y pureza (libre de contaminación por proteínas, ARN o polisacáridos) (Inglis et al., 2018).

Actualmente, hay disponibles numerosos métodos para el aislamiento de ADN genómico en plantas, entre los más utilizados están el aislamiento basado en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Abdel-Latif & Osman, 2017; Aboul-Maaty & Oraby, 2019; Arif et al., 2010; Betancurt et al., 2018) y el aislamiento basado en dodecil sulfato de sodio (SDS) (Amani et al., 2011; Sabriu-Haxhijaha et al., 2020; Xia et al., 2019), los cuales se usan en conjunto con otros compuestos como NaCl, Tris-HCl y EDTA, para formar un buffer de lisis que permite modificar o destruir las moléculas que conforman las paredes y membranas celulares y nucleares, permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen y que las enzimas que degradan el ADN se inhiban (Xu, 2016). Posteriormente, estos métodos de aislamiento utilizan reactivos orgánicos que permiten eliminar los contaminantes (polisacáridos, proteínas y compuestos aromáticos) y precipitar el ADN (Xia et al., 2019).

En la práctica estos procedimientos no se pueden generalizar, debido a la variabilidad en la composición del tejido vegetal y a las particularidades de cada especie vegetal, que pueden provocar problemas en el aislamiento, como degradación del ADN por las endonucleasas, coaislamiento de polisacáridos viscosos y compuestos inhibidores como metabolitos secundarios (Amani et al., 2011). Con el fin de contrarrestar estos problemas durante el aislamiento del ADN genómico de especies vegetales, se han diseñado kits de extracción de ácidos nucleicos especializados en este tipo de tejidos como el “DNeasy Plant Mini Kit” de la empresa Qiagen, el cual se ha utilizado en extracciones de ADN de plantas como *Zea mays* (Abdel-Latif & Osman, 2017), *Stevia rebaudiana* Bert (Lata et al., 2012), *Cupressus sempervirens* L. (Doullis et al., 1999) y *Arabidopsis thaliana* y *Brassica rapa* (Strehle et al., 2018), con buenos resultados. Otro kit similar es el “ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep Kit”, el cual no fue diseñado especialmente para plantas, pero autores como Leonel et al. (2020) y Salgado et al. (2018), han reportado su uso en el aislamiento de ADN de tejidos de insectos, los cuales se caracterizan por su alto contenido del polisacárido quitina. Estos kits comerciales poseen columnas con membranas de sílica que permiten una alta purificación del material genómico aislado en tejidos que poseen contaminantes como los mencionados anteriormente.

El aislamiento de ADN en guayaba (*Psidium guajava*) para procedimientos de rutina como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), no es del todo desconocido. Se han realizado extracciones de ADN para el uso de marcadores como RAPD (Ahmed et al., 2011; Bajpai et al., 2008; Dahiya et al., 2002; Prakash et al., 2002) AFLP (Rodríguez et al. 2004; Valdés-Infante et al., 2003), SSR (Chaithanya et al., 2017; Sánchez-Teyer et al., 2010), entre otros. Sin embargo, para tecnologías como la secuenciación se necesitan grandes cantidades de ADN genómico de alta calidad, lo que hace que sea particularmente problemático en esta especie, debido a la alta cantidad de fenoles y polisacáridos (Ramírez et al., 2004). Esta particularidad hace que la adopción de nuevas tecnologías de mejora biotecnológica en guayaba se haya relegado en demasía.

El objetivo de la presente investigación fue aislar ADN genómico (ADNg) de alta calidad de guayaba, en cantidad e integridad adecuados.

## Materiales y métodos

### Material vegetal y tratamiento previo

La investigación se desarrolló durante los meses de enero a diciembre del año 2019, en el Laboratorio de Biología Molecular de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica (EEAFBM); la cual se localiza a una Latitud de: 10° 16' 54" N y una Longitud de: 84° 57' 52" O, a una altitud de 859 msnm, en la zona de la Garita de Alajuela, Costa Rica.

Se recolectaron hojas jóvenes de árboles de guayaba (*Psidium guajava* L.) de entre dos y tres años de edad, pertenecientes a una selección fenotípica promisorio llamada P411 que fue seleccionado para realizar la secuenciación de su genoma completo. Las principales características de la fruta de este genotipo son: peso aproximando 300 g, forma redondeada, no climatérica, de pulpa blanca, los grados brix oscilan entre 9 y 12, son árboles de alta precocidad (entra en producción a los nueve meses después del trasplante). Este material se desarrolló por el programa de mejoramiento genético de guayaba de la EEAFBM. El tejido joven se colectó en tubos plásticos de 1,5 ml y se mantuvieron con nitrógeno líquido hasta su llegada al Laboratorio de Biología Molecular de la EEAFBM, donde se realizaron las extracciones.

Se evaluaron en total dieciocho muestras de follaje joven. Las muestras se dividieron en dos grupos, un primer grupo se utilizaron para realizar las extracciones con material fresco (1-9), el segundo grupo (10-18), se colocó en un liofilizador (BK-FD10S Biobase Biodustry, Shandong), durante 24 h, después de ese tiempo se inició con las extracciones.

Para las extracciones con tejido fresco se tomaron 100 mg de tejido foliar y se maceraron en nitrógeno líquido. En el caso de las muestras liofilizadas se utilizaron 25 mg cada una. Las muestras de tejido fresco y las muestras de tejido liofilizado se colocaron en tubos de 1,5 ml y se les agregaron dos balines de acero inoxidable de 0,2 mm de diámetro, estériles. Luego se procedió a su trituration usando el macerador Geno/Grinder 2010 (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ, USA), el macerado duró 5 min y se utilizaron 1500 rpm, cada tubo contenía la cantidad de buffer de extracción respectiva según el protocolo indicado. Una vez realizado el macerado se procedió con los tratamientos siguiendo las instrucciones de cada protocolo.

### Métodos de extracción de ADN genómico

Se evaluaron tres métodos de extracción de ADN genómico en dos sustratos de hojas jóvenes. Los métodos de extracción y el tipo de sustrato en cada método fueron los siguientes:

#### 1. Método de Promega (*ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep Kit*)

La extracción de ADN se realizó con el kit comercial *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System*, Promega, Wisconsin, USA, para ello se utilizó el tejido previamente macerado con el buffer de extracción de este kit (100 mg de tejido joven/fresco maceradas en nitrógeno líquido y 25 mg de tejido liofilizado joven/fresco), cada tipo de muestra se hizo por triplicado. El proceso de extracción se realizó con base en las instrucciones del fabricante (Promega, 2013).

## 2. Método de Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit)

La extracción de ADN se realizó con el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA, para lo cual se utilizó el tejido previamente macerado con el buffer de extracción de ese kit (100 mg de tejido joven/fresco maceradas en nitrógeno líquido y 25 mg de tejido joven/fresco y liofilizado), cada tipo de muestra se hizo por triplicado. El proceso de extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, 2016).

## 3. Método CTAB (Doyle y Doyle, 1990) incluyendo las modificaciones

Para la extracción de ADN con el método CTAB, se procedió de la siguiente forma: a cada tipo de muestra, que se hizo por triplicado (100 mg de tejido joven/fresco maceradas en nitrógeno líquido y 25 mg de tejido joven/fresco y liofilizado), se le agregaron 600  $\mu$ l de buffer de extracción (20 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM Tris (pH 8,0), 2 % PVP, 2 % CTAB, 1,4 M NaCl y 0,2 % v/v  $\beta$ -mercaptoetanol), se maceraron como se indicó en el tratamiento previo y se incubaron a 65 °C por 20 min. Posteriormente, se agregaron 600  $\mu$ l de una solución de cloroformo-fenol (24:1) a cada tubo y se homogenizaron por inversión.

Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se transfirieron 400  $\mu$ l del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml, a cada uno de estos tubos se le agregó 400  $\mu$ l de isopropanol frío (-20 °C), se homogenizaron por inversión y se dejó reposar durante 10 min a -20 °C. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a -4 °C y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con 600  $\mu$ l de etanol 70 % frío, y se centrifugó por 2 min a 13 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado. Finalmente, se puso a secar el pellet a 42 °C por 20 min y se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua libre de nucleasas junto con 1  $\mu$ l de ARNasa (concentración solución stock 10 mg ml<sup>-1</sup>) y se incubó a 37 °C durante 30 min.

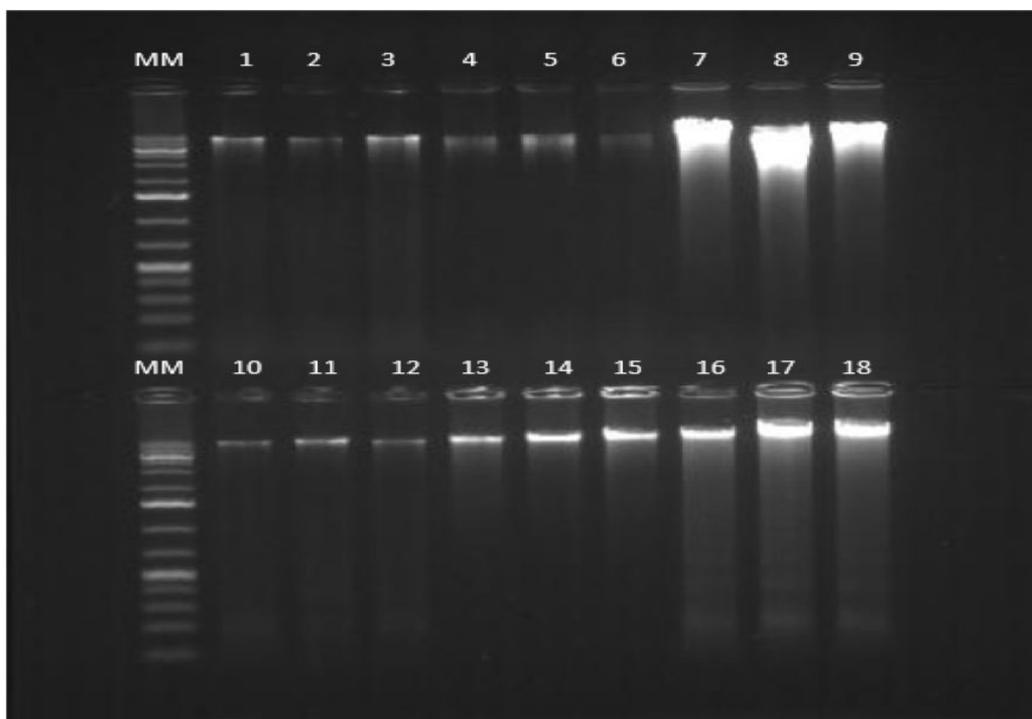
## Evaluación de la cantidad, calidad e integridad del ADN

Una vez aislado el ADN, se determinó la cantidad obtenida del mismo (ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) por cada método, a través de espectrofotometría con el equipo Qubit (Invitrogen, USA). La medición de la calidad y pureza se determinó mediante las relaciones A260/280 nm y A260/230 nm (Desjardins & Conklin, 2010), obtenidas en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) y, finalmente, la integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 0,8 % corrido en TBE 1X (45 min / 100 V).

Los datos de cantidad de ADN genómico medido por medio de espectrometría se sometieron a un análisis de varianza y posterior prueba de comparación de medias (Tukey), para determinar el tratamiento que obtuvo mayor rendimiento.

## Resultados

Se logró aislar ADN genómico de guayaba (*Psidium guajava* L.; 2n = 22) con los tres métodos evaluados. No obstante, la cantidad, calidad e integridad del mismo varió dependiendo del método utilizado y del tipo de sustrato empleado. Dentro de las características evaluadas interesaba sobre manera la integridad del ADN, las extracciones realizadas con tejido liofilizado (muestras de la 10-18), mostraron mayor integridad respecto al material fresco que mostró un mayor grado de degradación del ADN (Figura 1), esta característica fue mucho más evidente en el método de extracción CTAB. Se observó que durante el proceso de aislamiento con muestras frescas (maceradas con nitrógeno líquido), la solución de extracción comenzó a oxidarse (oscurecerse) durante la incubación y



**Figura 1.** ADN aislado de muestras de *Psidium guajava* L. ( $2n=22$ ) por tres métodos de extracción y dos tipos de tejido distintos en gel de agarosa al 1 % (m/v). MM: Marcador molecular. 1, 2, 3: HF-MP, 4, 5, 6: HF-MQ, 7, 8, 9: HF-MC, 10, 11, 12: HL-MP, 13, 14, 15: HL-MQ, 16, 17, 18: HL-MC. Laboratorio de biología molecular, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica. 2020.

HF: hoja fresca, HL: hoja liofilizada, MP: método Promega, MQ: método Qiagen, MC: método CTAB.

**Figure 1.** DNA isolated from *Psidium guajava* ( $2n=22$ ) samples by three extraction methods and two different types of tissue on 1 % agarose gel (m/v). MM: Molecular marker. 1, 2, 3: HF-MP, 4, 5, 6: HF-MQ, 7, 8, 9: HF-MC, 10, 11, 12: HL-MP, 13, 14, 15: HL-MQ, 16, 17, 18: HL-MC. Molecular Biology Laboratory, Estacion Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica. 2020.

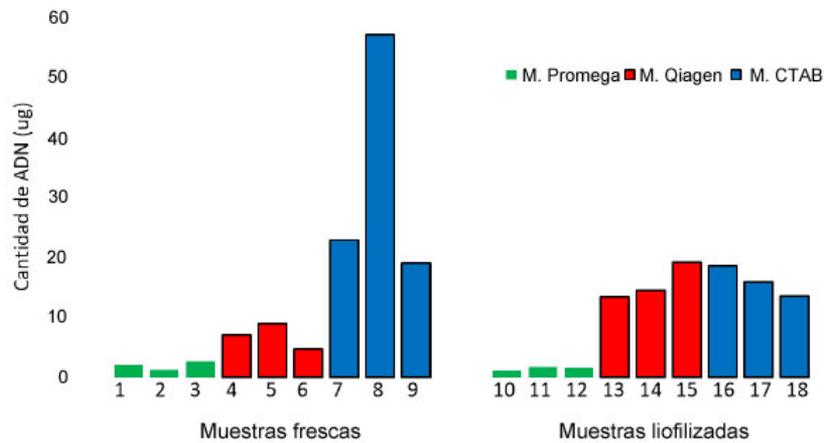
HF: fresh leaf, HL: lyophilized leaf, MP: Promega method, MQ: Qiagen method, MC: CTAB method.

centrifugación, hasta que finalmente se volvió marrón, este fenómeno se observó en los tres métodos evaluados. Por su parte, en el caso de las extracciones con hojas liofilizadas, la oxidación con el método Promega fue baja y en los otros métodos la oxidación estuvo ausente.

Con respecto al rendimiento ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ), parámetro importante debido a que se requiere una gran cantidad de ADN para realizar la secuenciación de genoma completo y genotipados masivos, se notó que el procedimiento de liofilización de las muestras, aunque no mejoró en todos los métodos de extracción la cantidad de ADN extraído, sí aumentó la homogeneidad en este parámetro (Figura 2).

Con el método de extracción CTAB y el empleo de tejido fresco, se logró aislar en números absolutos la mayor cantidad de ADN genómico (Figura 2, muestras 7, 8 y 9), aunque no difirió estadísticamente del tratamiento CTAB y Qiagen que usaron tejido liofilizados. Donde sí se presentaron diferencias significativas fue con respecto a los métodos de extracción Qiagen con tejido fresco y Promega con ambos tipos de tejido (Cuadro 1). A su vez cuando el tejido fue liofilizado no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p \geq 0,007$ ).

El análisis de absorbancia con el espectrofotómetro, mostró que las relaciones A260/280 presentaron valores de pureza de ADN óptimos ( $\sim 1,8 - 2,0$ ) para los métodos Qiagen y CTAB, tanto en extracciones de tejido



**Figura 2.** Rendimiento de ADN aislado de guayaba (*Psidium guajava* L.; 2n = 22) mediante tres métodos de extracción utilizando tejido fresco y liofilizado. Laboratorio de Biología Molecular, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

**Figure 2.** Yield of DNA isolated from guava (*Psidium guajava* L.; 2n = 22) by three extraction methods using fresh and lyophilized tissue. Molecular Biology Laboratory, Estacion Experimental Agricola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica, 2020.

**Cuadro 1.** Rendimiento del ADN y relaciones A260/230 y A260/230 para las muestra frescas y liofilizadas de guayaba (*Psidium guajava* L.; 2n = 22), con los métodos de extracción Promega, Qiagen y CTAB. Laboratorio de Biología Molecular, Estación Agrícola Experimental Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica. 2020.

**Table 1.** DNA yield and A260 / 230, and A260 / 230 ratios for fresh and lyophilized guava samples (*Psidium guajava* L.; 2n = 22), with the Promega, Qiagen, and CTAB extraction methods. Molecular Biology Laboratory, Estacion Experimental Agricola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica. 2020.

Protocolo de extracción	Estado del tejido	Concentración (ng $\mu$ l <sup>-1</sup> )	Relación A260/280	Relación A260/230	Volumen ( $\mu$ l)	Cantidad total de ADN (ug $\mu$ l <sup>-1</sup> )
Promega	Fresco	41,27	1,54	0,89	50,00	2,06b
	Liofilizado	30,80	1,67	1,08	50,00	1,54b
Qiagen	Fresco	34,87	1,83	2,52	200,00	6,97b
	Liofilizado	78,53	1,88	2,84	200,00	15,71ab
CTAB	Fresco	329,67	1,94	1,66	100,00	32,97a
	Liofilizado	160,33	1,91	1,50	100,00	16,03ab

Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas / Means followed by the same letter do not show statistically significant difference.

macerado con nitrógeno líquido como con tejido liofilizado (Cuadro 1). Con el método Promega, estas relaciones de absorbancia se observaron fuera del rango óptimo, lo que denota baja pureza y, consecuentemente, baja calidad del ADN extraído.

En cuanto las relaciones de absorbancia A260/230, el rango óptimo debe ubicarse entre los valores 1,8-2,2. En este caso las extracciones realizadas por el método CTAB y Qiagen, con ambos sustratos, fueron las que se acercaron más al rango óptimo.

## Discusión

El mayor problema que se presentó en los métodos de extracción fue la oxidación de los tejidos, traducido en coloraciones marrón oscuro del tejido en las soluciones durante los procesos intermedios de extracción. El oscurecimiento de la solución es atribuido a la oxidación de los metabolitos secundarios fenólicos que se encuentran en las hojas de muchas plantas (Sahu et al., 2012). Este problema de oxidación es muy conocido en plantas como café (Diniz et al., 2005), aguacate y guayaba (Ramírez et al., 2004). En sus formas oxidadas, los polifenoles se unen al ADN covalentemente, lo cual lo hace no deseado para la mayoría de las aplicaciones moleculares (Pommer & Murakami, 2009).

En el procedimiento de extracción, las condiciones del buffer de los kits de extracción del mercado, están diseñadas para permitir la adsorción de ADN específico de la membrana de gel de sílice y ofrecer una eliminación óptima de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos de las plantas (Abdel-Latif & Osman, 2017), lo que permite obtener un ADN más puro. Sin embargo, ocasiona que el rendimiento sea menor, ya que en plantas que presentan grandes cantidades de compuestos aromáticos o sustancias mucilaginosas, las columnas o filtros de purificación que traen los Kits, pueden obstruirse lo que conlleva a la pérdida de ADN en la columna (Roy & Sherpa, 2017). Dichos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el mayor rendimiento se obtuvo con el protocolo CTAB, respecto a los kits utilizados, los cuales mostraron menor cantidad de ADN aislado. Una forma de solucionar este inconveniente que presentan los kits de extracción, es realizar repetidas extracciones y combinarlas para lograr alcanzar la cantidad de ADN requerida para la preparación de una librería NGS para su posterior secuenciación y genotipado; sin embargo, esto conlleva más trabajo y mayores costos.

En métodos convencionales de extracción de ADN vegetal, como CTAB, una manera de disminuir los problemas de oxidación es utilizar un buffer de extracción con  $\beta$ -mercaptoetanol al 2 % que la previene (Dempster et al., 1999) y PVP al 2 % que mejora la calidad del ADN al eliminar las impurezas fenólicas. Este polímero forma un complejo con los polifenoles a través de los enlaces de hidrógeno, que permite que se eliminen de las muestras con facilidad antes de que oxide irreversiblemente la molécula de ADN (Nunes et al., 2011). En este experimento, el único método que llevó  $\beta$ -mercaptoetanol fue el CTAB y fue el que logró el mayor rendimiento y las relaciones 260/280 estuvieron dentro del rango óptimo. Sin embargo, la integridad del ADN se vio comprometida al presentar mayor degradación si se compara con los otros métodos estudiados.

De acuerdo con lo que se observó durante cada procedimiento de extracción, la disminución en la oxidación de los tejidos y soluciones intermedias, fue más dependiente de la condición del sustrato, ya que con el tejido liofilizado se logró disminuir considerablemente los problemas de oxidación en los tres tratamientos. Además, hay una mejora en el rendimiento y calidad de las extracciones de ADN al utilizar muestras liofilizadas (Nunes et al., 2011; Betancurt et al., 2018), ya que al disminuir la cantidad de agua dentro del tejido se disminuye el proceso catabólico dentro de la célula, la fluidez del ambiente y se disminuye la actividad catalítica de las nucleasas y proteasas, lo que evita que se degraden los ácidos nucleicos (Santos et al., 2014).

Otro factor considerado en el contraste de los métodos de extracción fueron las relaciones de absorbancia a 260/280 nm que se emplearon para evaluar la pureza del ADN con respecto a la contaminación con fenoles, proteínas, aminoácidos aromáticos, entre otros (Arif et al., 2010). En general, tanto en el protocolo de CTAB como Qiagen los valores fueron óptimos (1,8 -2,0); sin embargo, esto está en contraposición con otras investigaciones que mencionaron que los métodos que emplean kits DNeasy (Qiagen) y / o métodos basados en CTAB pueden no ser óptimos para todas las plantas, porque los inhibidores pueden coprecipitarse con el ADN (Siegel et al., 2017), lo cual no sucedió con el género *Psidium*.

El método Promega presentó valores más bajos a los considerados como óptimos, lo cual indica que hubo contaminación con compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Una medida alternativa para medir la pureza del ácido nucleico se basa en la relación de absorbancia a 260/230 nm (Arif et al., 2010). Tanto el protocolo de

CTAB como Qiagen mostraron valores cercanos a los óptimos (1,5 a 2,2), es posible que la modificación de usar NaCl (1.4 M) en el método CTAB facilitó la eliminación de los polisacáridos al aumentar su solubilidad en etanol y evitó la coprecipitación con el ADN (Fang et al., 1992), lo que ayudó a obtener valores cercanos a los óptimos. En esta variable el método Promega presentó valores más bajos que los óptimos, lo que indica la presencia de contaminantes que se absorben a 230 nm como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), carbohidratos y fenoles (Arif et al., 2010); mientras que en el método Qiagen los valores superiores a 2,2 no necesariamente denotaron baja calidad del ADN, sino que son característicos del buffer usado en el kit de extracción. La relación A260/230 es mucho más variable que la relación A260/280 y depende de la composición del buffer del kit de extracción, así como de la dilución de la muestra de ADN.

## Conclusiones

Los métodos de extracción del kit de Qiagen y el CTAB, fueron los que presentaron índices adecuados en cuanto a calidad y cantidad del ADN de guayaba, recomendados para los procedimientos de secuenciación de genoma completo y genotipado de poblaciones de plantas. En cuanto a la integridad del ADN, medida por medio de la electroforesis, fueron los dos kits comerciales (Qiagen y Promega) quienes mostraron bandas con menor degradación.

El Kit de Qiagen fue superior en los tres parámetros evaluados y que definen un ADN genómico ideal para procesos de secuenciación y genotipado masivo del genoma completo de la guayaba.

En las extracciones de ADN de la guayaba, el proceso liofilización del tejido fresco mejoró la homogeneidad de las muestras antes de realizar el proceso de extracción, lo que se reflejó en mejor integridad y, en algunos casos como con el método de Qiagen, hubo más cantidad del ADN.

## Referencias

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13, Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Aboul-Maaty, N. A. F., & Oraby, H. A. S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, Article 25. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Ahmed, B., Mannan, M. A., & Hossain, S. A. (2011). Molecular characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm by RAPD analysis. *International Journal of Natural Sciences*, 1(3), 62–67. <https://doi.org/10.3329/ijns.v1i3.8823>
- Amani, J., Kazemi, R., Abbasi, A. R., & Salmanian, A. H. (2011). A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(1), 69–71.
- Arif, I. A., Bakir, M. A., Khan, H. A., Ahamed, A., Farhan, A. H. A., Homaidan, A. A. A., Sadoon, M. A., Bahkali, A. H., & Shobrak, M. A. (2010). A simple method for DNA extraction from mature date palm leaves: Impact of sand grinding and composition of lysis Buffer. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(9), 3149–3157. <https://doi.org/10.3390/ijms11093149>
- Bajpai, A., Chandra, R., Rajan, S., & Srivastava, N. (2008). RAPD and minisatellite markers for genetic diversity and relationship in guava varieties. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 68(4), 441.

- Betancurt, M., Pérez, M. D., Nieto, R., Barrientos, A. F., García, M. D. R., & Corona, T. (2018). Comparación de seis métodos de extracción de ADN en Tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(1), 75–79. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.1.75-79>
- Chaithanya, M. N., Sailaja, D., Dinesh, M. R., Vasugi, C., Reddy, D. L., & Aswath, C. (2017). Microsatellite-based DNA fingerprinting of guava (*Psidium guajava*) genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences*, 87(3), 859–867. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0660-4>
- Chen, K. E., Liu, T. C., Liu, Y. C., & Wu, C. T. (2017). Jen-Ju Bar” guava exhibited a non-climacteric ripening behavior resulting from a defect in the expression of System-2 ACC synthase PgACS1. *Acta Horticulturae*, 1166(9), 63–70. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2017.1166.9>
- Dahiya, K. K., Archak, S., & Karihaloo, J. L. (2002). DNA fingerprinting of guava (*Psidium guajava* L.) cultivars using RAPD markers. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 15(2), 112–115.
- Dempster, E. L., Pryor, K. V., Francis, D., Young, J. E., & Rogers, H. J. (1999). Rapid DNA extraction from ferns for PCR-Based analyses. *BioTechniques*, 27(1), 66–68. <https://doi.org/10.2144/99271bm13>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45, Article e2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Diniz, L. E., Sakiyama, N. S., Lashermes, P., Caixeta, E. T., Oliveira, A. C., Zambolim, E. M., Loureiro, M., Pereira, A. A., & Zambolim, L. (2005). Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5(4), 387–393. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v05n04a03>
- Doulis, A. G., Harfouche, A. L., & Aravanopoulos, F. A. (1999). Rapid, high quality DNA isolation from cypress (*Cupressus sempervirens* L.) needles and optimization of the RAPD marker technique. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(4), 411–412. <https://doi.org/10.1023/A:1007679220683>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13–15.
- Fang, G., Hammar, S., & Grumet, R. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 13(1), 52–56. <https://www.researchgate.net/publication/21651496>
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., & Henry, R. J. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10(1), 21–28. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>
- Hendre, P. S., & Aggarwal, R. K. (2007). DNA markers: Development and application for genetic improvement of coffee. In R. A. Varshney, & R. Tuberosa (Eds.), *Genomics-Assisted Crop Improvement* (pp. 399–434). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6297-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6297-1_15)
- Hendre, P. S., & Aggarwal, R. K. (2014). Development of genic and genomic SSR markers of Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre Ex A. Froehner). *PLoS ONE*, 9(12), e113661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113661>
- Inglis, P. W., Pappas, M. de C. R., Resende, L. V., & Grattapaglia, D. (2018). Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high-quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLOS ONE*, 13(10), Article e0206085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206085>

- Kanupriya, P., Latha, P. M., Aswath, C., Reddy, L., Padmakar, B., Vasugi, C., & Dinesh, M. R. (2011). Cultivar identification and genetic fingerprinting of guava (*Psidium guajava*) using microsatellite markers. *International Journal of Fruit Science*, 11(2), 184–196. <https://doi.org/10.1080/15538362.2011.578521>
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., ElSohly, M. A., & Khan, I. A. (2012). Determination of genetic stability of micropropagated plants of *Stevia rebaudiana* Bert. using inter-simple sequence repeat (ISSR) Markers. *Planta Medica*, 78(05), Abstract 1. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1307509>
- Leonel, J. A. F., Vioti, G., Alves, M. L., da Silva, D. T., Meneghesso, P. A., Benassi, J. C., Spada J. C. P., Ovallos, F. G., Soares R. M. & de Sousa Oliveira, T. M. F. (2020). DNA extraction from individual *Phlebotomine* sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) specimens: Which is the method with better results? *Experimental Parasitology*, 218, Article 107981. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107981>
- Moon, P., Fu, Y., Bai, J., Plotto, A., Crane, J., & Chambers, A. (2018). Assessment of fruit aroma for twenty-seven guava (*Psidium guajava*) accessions through three fruit developmental stages. *Scientia Horticulturae*, 238, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.067>
- Nunes, C. F., Ferreira, J. L., Fernandes, M. C. N., Breves, S. de S., Generoso, A. L., Soares, B. D. F., Dias, M. S. C., Pasqual, M., Borem, A., & Cançado, G. M. de A. (2011). An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural*, 41(8), 1383–1389. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782011000800014>
- Pommer, C. V., & Murakami, K. R. (2009). Breeding guava (*Psidium guajava*). In S. M. Jain, & P. M. Priyadarshan (Eds.), *Breeding plantation tree crops* (pp. 83–120). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7_3)
- Prakash, D. P., Narayanaswamy, P., & Sondur, S. N. (2002). Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(3), 287–293. <https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511494>
- Promega. (2013). *Technical manual: ReliaPrep™ gDNA tissue miniprep system*. <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/reliaprep-gdna-tissue-miniprep-system-protocol.pdf?la=en>
- Qiagen. (2016). *Quick-Start protocol. DNeasy® plant mini kit*. <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=6b9bcd96-d7d4-48a1-9838-58dbfb0e57d0&lang=en>
- Ramírez, I. M., Rodríguez, N. N., Valdés-Infante, J., Capote, M., Becker, D., & Rohde, W. (2004). Isolation of genomic DNAs from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for PCR-based DNA marker application. *Cultivos tropicales*, 25(1), 33–38. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193230179006.pdf>
- Risterucci, A. M., Duval, M. F., Rohde, W., & Billotte, N. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 745–748. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01050.x>
- Rodríguez, N. N., Valdés-Infante, J., Becker, D., Velásques, B., Coto, O., Rohde, W., & Ritter, E. (2004). Morphological, agronomic and molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Genetics and Breeding*, 58, 79-90
- Roy, B., & Sherpa, A. R. (2017). Extraction of high quality DNA from mucilaginous plants with a new improved method, suitable for detection of geminiviruses and downstream applications. *International Journal of Science and Research*, 6(5), 121–124. <https://ijsr.net/archive/v6i5/ART20173077.pdf>

- Sabriu-Haxhijaha, A., Ilievska, G., Stojkovski, V., & Blagoevska, K. (2020). A modified SDS-based method applied for extraction of high-quality DNA from raw corn and roasted soybean. *Macedonian Veterinary Review*, 43(1), 61–67. <https://doi.org/10.2478/macvetrev-2020-0017>
- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012, Article 205049. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>
- Salgado, G., Sanz, P. A., & Vaz, M. A. B. (2018). First record of *Ophiocordyceps dipterigena* (Ascomycota: Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) infecting adults of *Melanagromyza sojæ* (Diptera: Agromyzidae) in Brazil. *Ciência Rural*, 48(7), Article e20170637. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170637>
- Sánchez-Teyer, L. F., Barraza-Morales, A., Keb, L., Barredo, F., Quiroz-Moreno, A., O'Connor-Sánchez, A., & Padilla-Ramírez, J. S. (2010). Assessment of genetic diversity of Mexican guava germplasm using DNA molecular markers. *Acta Horticulturae*, 849, 133–138. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.849.14>
- Santos, R. M. F., Lopes U. V., Clement D., Pires, J. L., Lima, E. M., Messias, T. B., & Gramacho, K. P. (2014). A protocol for large scale genomic DNA isolation for cacao genetics analysis. *African Journal of Biotechnology*, 13(7), 814–820. <https://doi.org/10.5897/ajb2013.13181>
- Siegel, C. S., Stevenson, F. O., & Zimmer, E. A. (2017). Evaluation and comparison of FTA card and CTAB DNA extraction methods for non-agricultural Taxa. *Applications in Plant Sciences*, 5(2), 1600109. <https://doi.org/10.3732/apps.1600109>
- Strehle, M. M., Purfeerst, E., & Christensen, A. C. (2018). A rapid and efficient method for enriching mitochondrial DNA from plants. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(1), 239–242. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1438856>
- Valdés-Infante, J., Sourd, D., Rodríguez, J., Becker, D., Rohde, W., & Ritter, E. (2003). Molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.), establishment of a first molecular linkage map and mapping of QTLs for vegetative characters. *Journal of Genetics and Breeding*, 57, 349–358.
- Xia, Y., Chen, F., Du, Y., Liu, C., Bu, G., Xin, Y., & Liu, B. (2019). A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. *Bioscience reports*, 39(2), Article BSR20182271. <https://doi.org/10.1042/BSR20182271>
- Xu, W. (2016). Adaptable methods to extract nucleic acid targets and evaluate quality. In W. Xu (Ed.), *Functional Nucleic Acids Detection in Food Safety* (pp. 17–36). Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-1618-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-1618-9_2)