

PROTOCOLO PARA LA COLECTA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE TEJIDO DE ROBLES PARA LA OBTENCIÓN DE ADN

Juan Diego Palacio-Mejía
Última modificación: Nov, 2013

GENERALIDADES

El roble es una especie que presenta elevados niveles de taninos en sus hojas (Mauseth, 1988), razón por la cual presenta algunos desafíos cuando se trata de obtener ADN de buena calidad y en buena cantidad, por eso es de vital importancia seguir estas recomendaciones a la hora de colectar el tejido para evitar posteriores inconvenientes.

El ADN se puede ver afectado por diversos factores durante la colecta, transporte y almacenamiento de los tejidos. Una de las principales amenazas de éste es la acción de las ADNasas, que son una familia de enzimas que cortan el ADN hasta destruirlo totalmente, limitando su análisis. Estas enzimas inician su acción inmediatamente después de la muerte del tejido y cumplen su cometido en pocas horas, sin embargo pueden inhibirse por acción de sustancias que bloqueen su actividad enzimática, por ejemplo, la desecación inmediata del tejido o por congelación a temperaturas muy bajas (menores a -20 grados centígrados) a las cuales la actividad enzimática se disminuye permitiendo la conservación del ADN.

El mejor método para la deshidratación de tejido vegetal es el uso de sílica gel, un silicato que tiene la propiedad de absorber humedad y que suele incluir un indicador de azul de cobalto que permite conocer su capacidad de absorción (Azul indica que está en su plena capacidad de absorción y en la mitad que absorber agua va cambiando su coloración pasando por tonos morados hasta llegar a rosado indicando que está completamente hidratada). La sílica gel puede ser reutilizada, deshidratando en un horno usando temperaturas entre 50-70 °C unas 12 horas, o hasta ver que la sílica está completamente azul. Para reutilizar la sílica debe tenerse en cuenta que no esté contaminada con tejido vegetal.

El frío siempre será la mejor opción para la conservación de tejidos. El mejor método es el nitrógeno líquido, que proporciona temperatura de -196°C, pero su costo, limitaciones para conseguirlo y manejarlo lo hacen una opción poco práctica. Le sigue el hielo seco, que con sus -70°C proporciona un ambiente de alrededor -20°C. Sin embargo, la logística es también un poco complicada, por eso la sílica gel surge como la mejor opción. Es necesario aclarar que estos métodos solo inactivan las enzimas de manera temporal o hacen más lento el proceso, pero no las eliminan, por eso si el tejido recupera la humedad o retorna a temperatura ambiente, la degradación del ADN puede continuar. Por esta razón es necesario monitorear las condiciones de la sílica gel durante el transporte y almacenamiento procurando que siempre esté en capacidad de absorber humedad (azul, en caso de que posea indicador de cobalto) o que la cadena de frío no se rompa a fin de asegurar bajas temperaturas.

Este protocolo solo considera el uso de sílica gel, por su fácil manejo y por que ha sido empleada desde 1998 en diferentes proyectos de investigación con resultados favorables.

Técnica de colección y transporte y conservación de tejido foliar de robles para la obtención de ADN

Para la obtención de óptimos resultados en la colecta a realizar, se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

Seleccionar un o varias hojas que permitan completar unos 5 gr. de tejido foliar (una extracción típicamente requiere de 100 mg de tejido fresco, así que con 5 gr. podemos en teoría hacer unas 50 extracciones!). Las hojas deben ser jóvenes, pero maduras (Figura 1) es decir que el tejido este verde. Las hojas jóvenes suelen tener coloraciones que indican altas concentraciones de pigmentos que puede complicar la extracción del ADN. Mientras menos metabolitos tengamos que separar en el momento de la extracción, mejor. Por otro lado si las hojas están muy viejas, pueden presentar muchas epifitas, que pueden contaminar con su ADN la extracción.

Una vez seleccionada y colectada las hojas, estas deben ser rasgadas de inmediato, retirando la nervadura central, que no posee mucho ADN y puede dificultar el proceso de maceración del tejido. Los fragmentos deben ser de alrededor de 1 cm². El corte del tejido facilita su deshidratación. Hojas enteras tardan mucho mas tiempo en deshidratarse que pequeños fragmentos.

Almacenar la muestra en una bolsa plástica (con cierre hermético de 8 x 8 cm) con 50 gr de Sílica gel, esta cantidad permite mantener en condiciones favorables hasta 5 gr de tejido. Para garantizar un buen secado, la proporción de sílica gel: tejido deber ser de 10:1 (Adams y Do, 1991; Chase y Hills, 1991; Adams *et al.*, 1999). Esta relación también asegura que la muestra sea deshidratada durante las 12 horas siguientes a la muerte del tejido, que es la etapa crítica de degradación del ADN. El tamaño de la bolsa es clave, si es muy grande, la sílica gel tendrá que tomar toda la humedad almacenada en el aire contenido en la bolsa, y como los sitios de muestro generalmente son húmedos, esta humedad puede limitar la capacidad de deshidratación de la sílica, por eso entre mas pequeña, mejor.

Rotular muy bien la bolsa marcando sobre el plástico e introduciendo un papel en el interior con el número de la colecta que corresponda a la libreta de campo o la formato anexo.

Es muy importante la correcta identificación taxonómica del espécimen y que tenga un ejemplar de respaldo (*voucher*) en una colección biológica de referencia, por esta razón es necesario tomar dos ejemplares de herbario (que tengan estructuras reproductivas), por cada población muestreada.

La información taxonómica, geográfica y ecológica asociada a los individuos colectados es de suma importancia para la colección de tejidos en cualquier estudio que se vaya a realizar, por lo tanto es necesario el registro de ésta.



Figura 1. Hoja joven pero madura de roble.



Figura 2. Muestra de tejido foliar de roble conservado en silica gel

Bibliografía

- Adams, R.P., and Do, N. (1991). Preservation of DNA in plant specimens from tropical species by desiccation. In Conservation of plant genes: DNA banking and in vitro biotechnology, R.P. Adams, and J.E. Adams, eds. (San Diego: Academic Press, INC.), pp. 135-152.
- Adams, R.P., Zhong, M., and Fei, Y. (1999). Preservation of DNA in plant specimens: inactivation and re-activation of DNases in field specimens. *Molecular Ecology* 8, 681-684.
- Chase, M.W., and Hills, H.H. (1991). Silica gel an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40, 215-220.
- Mauseth, J.D. (1988). Plant anatomy, 1 edn (New Jersey: The Blackburn Press).