

Nota científica

Preservación y almacenamiento de ADN de mariposas utilizando papel filtro

Preservation and storage of butterfly DNA using filter paper

LUZ MIRYAM GÓMEZ-P.¹ y SANDRA I. URIBE²

Resumen: Dos técnicas de almacenamiento de ADN de mariposas se compararon por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante la amplificación de un fragmento del gen ND4. El ADN extraído se depositó en tubos de microcentrifuga y se almacenó a -20°C, alternatively se depositó en papel de filtro y se almacenó a temperatura ambiente. Las amplificaciones de fragmentos de ADN mediante PCR provenientes de papel filtro exhibieron buena calidad. Nuestros resultados sugieren el almacenamiento en papel filtro como una alternativa sencilla, efectiva y económica para preservar el ADN extraído.

Palabras clave: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). ND4. Lepidoptera.

Abstract: Two techniques for butterfly DNA storage were compared using Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification of a fragment from the ND4 gene. Extracted DNA was put into microcentrifuge tubes and stored at -20°C; alternatively, they were put on filter paper and stored at ambient temperatures. Fragments of DNA amplified through PCR that came from filter paper exhibited high quality. Our results suggest storage on filter paper to be a simple, effective and inexpensive alternative to preserve extracted DNA.

Key words: Polymerase Chain Reaction (PCR). ND4. Lepidoptera.

Los estudios moleculares en mariposas han proporcionado un renacimiento en la sistemática de este grupo que constituye uno de los más grandes y diversos del mundo animal. Al interior de Insecta, el orden Lepidoptera (mariposas y polillas) constituye el segundo orden más rico en número de especies, con cerca de 170.000 especies reconocidas y unas 300.000 especies todavía sin describir (Wahlberg 2006). Con base en dichos estudios, se han abordado aspectos taxonómicos, biogeográficos y evolutivos proporcionando avances significativos en el conocimiento sobre estos organismos (Sperling 2003; Sperling y Harrison 1994; Mallarino *et al.* 2005; Whinnett *et al.* 2005).

En la actualidad técnicas como la obtención de secuencias nucleotídicas y otras basadas en la PCR (por su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction), son de uso común en los estudios de sistemática molecular de mariposas y constituyen una de las principales herramientas para complementar y contrastar la información obtenida con base en caracteres morfológicos (Campbell y Pierce 2003; Keyghobadi *et al.* 2003). Para los entomólogos y en este caso particular para aquellos interesados en estudios moleculares de mariposas, el intercambio de muestras (especímenes o ADN) así como la calidad y cantidad de ADN obtenido son de gran importancia; por lo tanto, aspectos como el almacenamiento, transporte y posible degradación de las muestras por los ciclos repetidos de congelación y descongelación deben recibir especial consideración. Todos ellos, determinan en gran parte la calidad de la información obtenida (Hoy 1994; Avise 2004; Dessauer *et al.* 1996).

Por lo general, las extracciones de ADN realizadas a partir de insectos son almacenadas de forma individual en tubos de

microcentrifuga y congeladas a -20°C o -80°C hasta su utilización en las diferentes técnicas moleculares; también pueden peletizarse mediante precipitación en alcohol o secarse al vacío cuando se almacenan por largos periodos. En este último caso, se requiere la resuspensión del ADN en el momento de realizar la técnica de amplificación (PCR) (Yang *et al.* 1997).

El papel filtro es usado de rutina en procedimientos de laboratorio y se ha implementado con éxito en extracciones de ADN. Así, la técnica conocida como Flinders Technology Associates (FTA®) permite la extracción del ADN a partir de sangre y su preservación a temperatura ambiente. En ella, se utiliza el papel filtro como una matriz de almacenamiento del ADN siendo una solución adecuada para aislarlo y preservarlo. Aunque esta técnica se ha realizado con algún éxito en plantas y pequeños insectos, es demasiado costosa en relación con la lisis celular tradicional en la que se basa la mayoría de los métodos de extracción de ADN en insectos (1 dólar vs 0.05 dólares por muestra). (Devost y Choy 2000; Natarajan *et al.* 2000; Snowden *et al.* 2002). En la presente nota se presenta una forma sencilla, económica y efectiva para almacenar, preservar e intercambiar ADN de mariposas utilizando papel filtro. Vía PCR se comparó la utilización del papel filtro comercial con la congelación y almacenamiento en tubos de microcentrifuga a -20°C de las muestras.

Materiales y Métodos

Las mariposas utilizadas fueron *Oleria fumata* (Haensch, 1905) y *Oleria makrena* (Hewitson, 1854) colectadas en el municipio de Jardín, Antioquia. Las extracciones de ADN individuales

¹ Autor para correspondencia: Bacterióloga, Entomóloga M. Sc., Grupo de Investigación en Sistemática Molecular –GSM–, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. lmgoomezp@unalmed.edu.co

² Ingeniera Agrónoma, M. Sc., Ph. D. Coordinador Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. suribe@unal.edu.co

se realizaron a partir de dos patas de las mariposas congeladas a -20°C entre dos a cinco meses de su recolección. La extracción se realizó mediante el método sugerido en el kit comercial Dneasy kit (QIAGEN).

El ADN extraído de 50 muestras fue resuspendido en 80 μl de TE. La calidad de las muestras se verificó mediante observación en geles de agarosa al 0,8%. Las muestras con PCR positivo para el gen ND4 (subunidad 4 de la NADH-deshidrogenasa-mitocondrial-) se seleccionaron para la comparación. Posteriormente, se dispuso de dos trozos circulares de 3 cm de diámetro de papel filtro No.1 de advantec MFS, inc. marcados con lápiz para cada muestra. Con una micropipeta Gilson se depositaron sobre cada círculo 25 μl de ADN y se dejaron secar durante 10 horas. Para ello, los círculos se colocaron sobre cajas de petri estériles con doble papel servilleta encima y debajo. Una vez secos, se retiraron de las cajas petri y se depositaron en sobres blancos de papel respectivamente marcados que se almacenaron a temperatura ambiente (25°C) en un cajón de madera de 20 x 20 cms. Otros 25 μl de cada muestra se almacenó a -20°C en tubos de microcentrífuga.

Cada mes durante cuatro meses tanto las muestras congeladas como las almacenadas en papel filtro, se probaron para PCR utilizando los cebadores ND4ar 5'-AA(A/G)GCTCATGTTGAAGC-3' y ND4c 5'-ATTTAAAGG(T/C)AATCAATGTAA-3', diseñados por Uribe *et al.* (2001) en el CDC de Atlanta, que amplifican un fragmento del gen ND4 de aproximadamente 600pb. La PCR se desarrolló con el siguiente perfil térmico: 94°C durante tres minutos, 35 ciclos a 93°C , durante 30 segundos, 48°C durante un minuto, 70°C durante un minuto y un paso final de extensión de 72°C durante 10 minutos. Los geles se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador con luz ultravioleta (Biodoc analyzer, Biometra).

Para ambos tratamientos el volumen de la reacción fue de 50 μl empleando 2 μl de ADN molde en el caso del ADN congelado y un círculo de papel de 4mm, retirado con un

sacabocado de las muestras almacenadas a temperatura ambiente (aprox. 25°C) y depositado en la mezcla de reacción. Los reactivos de mezcla de reacción, (Fermentas) se utilizaron en las siguientes cantidades y concentraciones: 5 μl de buffer 10x, 4 μl de MgCl_2 (25 mM), 0,1 μl de dNTPs (1mM), 0,3 μl de taq polimerasa (500U) y 0,3 μl de cada primer (50 μM) y agua ultrapura estéril ajustada al volumen final de la reacción. Las muestras se clasificaron como positivas o negativas para PCR.

Resultados

De las 50 extracciones, 48 fueron positivas para PCR con los cebadores para amplificar el fragmento del gen ND4 las cuales se seleccionaron para la comparación. Al realizar de nuevo los PCR después de preservar las muestras congeladas y en papel filtro, se obtuvieron resultados positivos en cada uno de los cuatro meses para la totalidad de las muestras. En la figura 1 se observan algunos de los amplificados para algunas de las mariposas.

Los resultados verifican que el ADN almacenado a temperatura ambiente en papel filtro durante cuatro meses funcionó de forma efectiva para el almacenamiento y preservación del ADN genómico verificado por la técnica de PCR. Esta técnica representa una excelente fuente de almacenamiento de ADN sin los costos de congelación y con gran economía de espacio, ya que un gran número de muestras podrían almacenarse en sobres de papel en gabinetes de madera a temperatura ambiente. Otra ventaja es el fácil intercambio de las muestras entre investigadores al poder enviar los discos de papel en vez del ADN en solución lo cual significa no solo bajar los costos, sino también los riesgos de pérdida de la muestra por derrames o fracturas en los tubos. Esta forma de envío también es útil para remitir las muestras a laboratorios nacionales o internacionales para análisis o secuenciación. Adicionalmente, se evitan los ciclos de congelación y descongelación que afectan la calidad del ADN y se optimiza

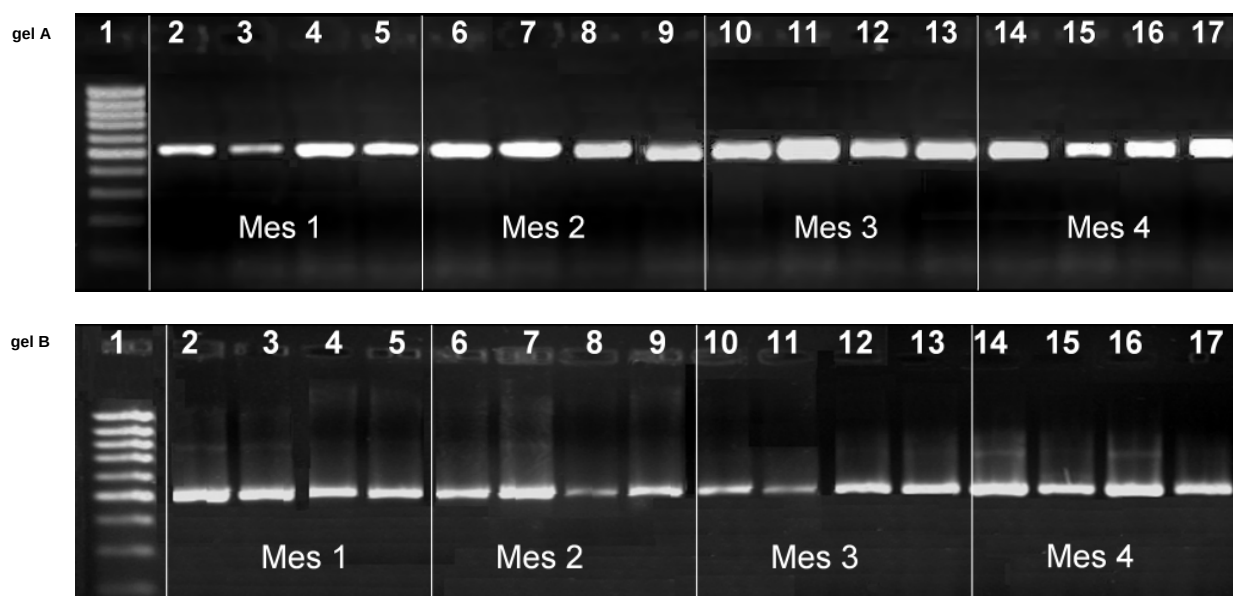


Figura 1. Amplificados del gen ND4 para ejemplares de *O. fumata* y *O. makrena*. Las muestras del **gel A** fueron congeladas a -20°C . Las muestras del **gel B** fueron conservadas en papel filtro. En los carriles número 2-3, 6-7, 10-11, 14-15 se sembraron muestras de *O. fumata*. En los carriles 4-5, 8-9, 12-13, 16-17 se sembraron muestras de *O. makrena*. El carril número 1 corresponde al marcador de peso molecular (100 pb).

la cantidad de reacciones de la PCR que pueden realizarse con base en una muestra, la cual corresponde al número de círculos que pueden usarse para cada reacción.

Es importante validar este estudio con un número mayor de muestras y por diferentes tiempos de almacenamiento del ADN ya que existe cierto grado de degradación del ácido nucleico, el cual puede ser más evidente con el paso del tiempo. Esta forma de conservar y preservar el ADN puede ser de gran utilidad en especial para técnicas como la PCR en la cual se logran resultados exitosos con pequeñas cantidades de ADN y aun con cierta degradación. Esto es especialmente válido para ADN mitocondrial uno de los más utilizados en la actualidad para estudios evolutivos y biogeográficos (Quicke 1993; Avise 2004; Hoy 1994).

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó como parte de un trabajo de tesis de maestría en Entomología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y gracias a la financiación de la dirección de investigaciones de la sede proyecto QUIPU: 20101004614. Las autoras agradecen al especialista Keith R. Willmott (McGuire Center for Lepidoptera Research) por la confirmación taxonómica de los ejemplares utilizados en el estudio y a los miembros del semillero de investigación del grupo Sistemática Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín que apoyaron la realización del macro-proyecto.

Literatura Citada

- AVISE, J. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer associates, Inc. Miami. United States of America. 684 p.
- CAMPBELL, D.; PIERCE, N. 2003. Phylogenetic relationships of the Riodinidae: implications for the evolution of ant association, pp. 395-408. En: Boggs, C.; Watt, W.; Ehrlich, P. (eds.). Butterflies. Ecology and evolution taking flight. The University of Chicago Press. Chicago. United States of America. 739 p.
- DESSAUER, H.; COLE, C.; HAFNER, M. 1996. Collection and storage of tissues, pp. 29-47. En: Hillis, D.; Moritz, C.; Mable, B. (eds.). Molecular systematics. Sinauer associates. Miami. United States of America. 656 p.
- DEVOST, N.; CHOY, F. 2000. Mutation analysis of Gaucher disease using dot-blood samples on FTA filter paper. American Journal of Medical Genetics 94: 417-420.
- HOY, M. 1994. Insect molecular genetics. Academic press, Inc. California. United States of America 546 p.
- KEYGHOBADI, N.; ROLAND, J.; FOWNES, S.; STROBECK, C. 2003. Ink marks and molecular markers: examining the effects of landscape on dispersal using both mark-recapture and molecular methods, pp. 169-183. En: Boggs, C.; Watt, W.; Ehrlich, P. (eds.). Butterflies. Ecology and evolution taking flight. The University of Chicago Press. Chicago. United States of America. 739 p.
- MALLARINO, R.; BERMINGHAM, E.; WILLMOTT, K.; WHINNETT, A.; JIGGINS, C. 2005. Molecular systematics of the butterfly genus *Ithomia* (Lepidoptera: Ithomiinae): a composite phylogenetic hypothesis based on seven genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 34 (3): 625-44.
- NATARAJAN, P.; TRINH, T.; MERTZ, L.; GOLDSBOROUGH M.; FOX, D. 2000. Paper-based archiving of mammalian and plant samples for RNA analysis. Biotechniques 29: 1328-1333.
- QUICKE, D. L. 1993. Principles and techniques of contemporary taxonomy. Blackie academic & professional. Great Britain. 311 p.
- SNOWDEN, K. F.; LOGAN, K.; VINSON, S. 2002. Simple, filter-based PCR detection of *Thelophania solenopsae* (Microspora) in fire ants (*Solenopsis invicta*). Journal of Eukaryotic Microbiology 49: 447-448.
- SPERLING, F. 2003. Butterfly molecular systematics: from species definitions to higher-level phylogenies, pp. 431-458. En: Boggs, C.; Watt, W.; Ehrlich, P. (eds.). Butterflies. Ecology and evolution taking flight. The University of Chicago Press. Chicago. United States of America. 739 p.
- SPERLING, F.; HARRISON, R. 1994. Mitochondrial DNA variation within and between species of the *Papilio machaon* group of swallowtail butterflies. Evolution 48: 409-422.
- URIBE, S.; LEHMANN, T.; ROWTON, E.; VÉLEZ, I.; PORTER, C. H. 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. Molecular Phylogenetics and Evolution 18 (1): 84-93.
- WAHLBERG, N. 2006. Lepidoptera Evolution, Taxonomy and Systematics- Scientific Report European Science Foundation. Stockholm, Sweden, 12 p.
- WHINNETT, A.; BROWER, A.; LEE, M.; WILLMOTT, K.; MALLETT, J. 2005. The phylogenetic utility of Tektin, a novel region for inferring systematic relationships amongst Lepidoptera. Annals of the Entomological Society of America 98 (6): 873-886.
- YANG, H.; GOLENBERG, E.; SHOSHANI, J. 1997. Proboscidean DNA from museum and fossil specimens: An assessment of ancient DNA extraction and amplification techniques. Biochemical Genetics 35 (5/6): 165-179.

Recibido: 26-abr-2006 • Aceptado: 7-ago-2007