

Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum**

Optimizing a protocol for DNA isolation of leaf *Saccharum officinarum*

Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán^{1§}, Salvador Guzmán-González², Mario Orozco-Santos¹, José Joaquín Velázquez-Monreal¹, Marco Tulio Buenrostro-Nava² y Claudia Yared Michel-López³

¹INIFAP-Campo Experimental Tecomán. Carretera Colima-Manzanillo km 35, Tecomán, Colima, México. (orozco.mario@inifap.gob.mx; velazquez.joaquin@inifap.gob.mx). ²Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad de Colima. (sguzman@uacol.mx; marcobn@me.com). ³Instituto de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma de Baja California. (michelc@uabc.edu.mx). [§]Autor para correspondencia: bermudez.manuel@inifap.gob.mx.

Resumen

La extracción de DNA libre de polisacáridos, polifenoles, proteínas y RNA de plantas constituye el paso inicial para diversos estudios en Biología molecular. Existen diversos métodos de extracción de DNA específicos para caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), sin embargo, consumen mucho tiempo y utilizan reactivos y equipos costosos. El objetivo del presente estudio fue optimizar un protocolo rápido, eficiente y de bajo costo para extraer DNA de hojas de *S. officinarum*. Las variables evaluadas fueron rendimiento, pureza, integridad y funcionalidad del DNA purificado de hojas de caña de azúcar de 6 meses de edad. Se utilizaron técnicas de espectrofotometría, electroforesis en geles de agarosa y marcadores moleculares para evaluar las variables anteriores. Las variables rendimiento (mg/g) y pureza ($A_{260:280}$ y $A_{260:230}$) del DNA extraído mostraron diferencias altamente significativas ($p > 0.05$) con el protocolo I. Los mejores resultados se obtuvieron con la interacción del protocolo I + N₂, con un rendimiento de DNA de 1.17 mg/g y puridades de 1.95 y 1.91 ($A_{260:280}$ y $A_{260:230}$). La funcionalidad del DNA por amplificación por PCR con los marcadores RAPD y TRAP generaron perfiles de bandas nítidas de buena calidad y de fácil interpretación. Se recomienda el uso del protocolo I + N₂ para la extracción de DNA de *S. officinarum* para obtener elevados rendimientos de DNA con calidad y pureza óptima para aplicaciones de marcadores moleculares.

Abstract

The DNA extraction free polysaccharides, polyphenols, plant protein and RNA is the initial step to several studies in molecular biology. There are various methods of extracting specific DNA of sugar cane (*Saccharum officinarum*), however, are time consuming and expensive equipment and reagents used. The aim of this study was to optimize a fast, efficient and inexpensive protocol for extracting DNA from leaves of *S. officinarum*. The variables evaluated were yield, purity, integrity and functionality of DNA purified from leaves of sugarcane 6 months old. Techniques spectrophotometry, agarose gel electrophoresis and molecular markers to evaluate the above variables were used. The performance variables (mg/g) and purity ($A_{260:280}$ and $A_{260:230}$) the extracted DNA showed highly significant differences ($p > 0.05$) protocol I. The best results were obtained with the protocol interaction I + N₂, DNA yield 1.17 mg/g and 1.95 and 1.91 purities ($A_{260:280}$ and $A_{260:230}$). Functionality DNA by PCR amplification with the RAPD markers and TRAP bands sharp profiles generated good quality and easy to interpret. The use of the protocol I + N₂ for extracting DNA from *S. officinarum* to obtain high yields of DNA with optimal quality and purity for applications of molecular markers is recommended.

* Recibido: marzo de 2016
Aceptado: junio de 2016

Palabras clave: *Saccharum officinarum*, nitrógeno líquido, CTAB, marcadores moleculares.

Keywords: *Saccharum officinarum*, CTAB, liquid nitrogen, molecular markers.

Introducción

Los protocolos de extracción y purificación de ácidos nucleicos son esenciales para la mayoría de las aplicaciones en biología molecular. Técnicas como PCR tiempo real, microarreglos y marcadores moleculares utilizan DNA como punto de partida (Menossi *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012; Devarumath *et al.*, 2013; Garces *et al.*, 2014). En plantas, el éxito en las diversas aplicaciones biotecnológicas que involucran el uso de DNA depende en gran medida del rendimiento y pureza que se obtiene. La mayoría de los protocolos existentes, para aislar y purificar DNA de buena calidad, están basados en el método del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), por ser económico (Murray y Thompson, 1980; Doyle y Doyle, 1990; Porebski *et al.*, 1997; Hossain *et al.*, 2006; Sahu *et al.*, 2012).

La cantidad y tipos de metabolitos secundarios que secretan las plantas (flavonoides, terpenos, polifenoles, quinonas y alcaloides), son muy variados entre especies, por lo tanto, no es posible aplicar un método de extracción universal (Khanuja *et al.*, 1999). Es frecuente que los investigadores modifiquen un protocolo de purificación de DNA para una especie determinada. *Saccharum officinarum* contiene altos niveles de polisacáridos, polifenoles, RNA y proteínas, que constituyen una fuente de contaminación para obtener DNA puro que pueda ser usado en subsecuentes reacciones enzimáticas (Honeycutt *et al.*, 1992; Aljanabi *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2006). Honeycutt *et al.* (1992), desarrollaron un método de extracción de DNA para especies del género *Saccharum*, reportando rendimientos entre 0.07-0.28 mg de DNA por gramo de tejido fresco y pureza de 1.7 ($A_{260:280}$).

El DNA pudo emplearse en metodologías basadas en PCR, enzimas de restricción, hibridación Southern y secuenciación. Por otra parte, Aljanabi *et al.* (1999), optimizaron un protocolo para aislar grandes cantidades de DNA (0.5-0.8 mg/g) y de pureza entre 1.76-1.96 ($A_{260:280}$) a partir de meristemos de caña de azúcar y sin hacer uso de N_2 para moler el tejido. El DNA obtenido fue viable para ser utilizado con enzimas de restricción, PCR y RFLP. En tanto que Hossain *et al.* (2006), compararon tres métodos de extracción de DNA haciendo algunas modificaciones a la metodología descrita por Aljanabi *et al.* (1999).

Introduction

The extraction protocols and nucleic acid purification are essential for most applications in molecular biology. Techniques such as real-time PCR, microarrays and molecular markers using DNA as a starting point (Menossi *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012; Devarumath *et al.*, 2013; Garces *et al.*, 2014). In plants, the success in various biotechnological applications involving the use of DNA depends largely on the yield and purity obtained. Most of existing protocols, to isolate and purify DNA of good quality, are based on the method of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), being economical (Murray and Thompson, 1980; Doyle and Doyle, 1990; Porebski *et al.*, 1997; Hossain *et al.*, 2006; Sahu *et al.*, 2012).

The amount and types of secondary metabolites that secrete plants (flavonoids, terpenes, polyphenols, quinones and alkaloids) are varied among species, therefore it is not possible to apply a method of universal extraction (Khanuja *et al.*, 1999). Often researchers modified a protocol for purification of DNA for a given species. *Saccharum officinarum* contains high levels of polysaccharides, polyphenols, RNA and proteins, which are a source of contamination to obtain pure DNA that can be used in subsequent enzymatic reactions (Honeycutt *et al.*, 1992; Aljanabi *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2006). Honeycutt *et al.* (1992) developed a method for extraction of DNA species of *Saccharum*, between 0.07 to 0.28 mg reporting yields of DNA per gram of fresh tissue and purity of 1.7 ($A_{260:280}$).

The DNA was used in PCR-based methodologies, restriction enzymes, Southern hybridization and sequencing. Moreover, Aljanabi *et al.* (1999), a protocol optimized to isolate large amounts of DNA (0.5-0.8 mg/g) and purity between 1.76-1.96 ($A_{260:280}$) from sugar cane meristems and without using N_2 to grind tissue. The DNA obtained was feasible for use with restriction enzymes, PCR and RFLP. While Hossain *et al.* (2006) compared three methods of extracting DNA making some modifications to the methodology described by Aljanabi *et al.* (1999).

Más recientemente, Vaze *et al.* (2010), desarrollaron un protocolo específico para aislar DNA genómico de tejido foliar seco de caña de azúcar sin el uso de N₂, el rendimiento que reportaron de DNA fue de 0.25-1.00 mg/g y pureza de 1.7-1.8 (A_{260:280}); este DNA se utilizó exitosamente en marcadores RAPD e ISSR para estudios de diversidad genética. Frecuentemente se utilizan kits comerciales para extraer DNA de plantas, incluyendo caña de azúcar, sin embargo, está ampliamente reportado que a pesar de que reducen significativamente los tiempos, resultan ser muy costosos en comparación con los métodos clásicos, además de que se obtienen rendimientos muy bajos de DNA (Castillo-Reyes *et al.*, 2004; Niu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Pérez-Almeida *et al.*, 2011; Sahu *et al.*, 2012; Huaqiang *et al.*, 2013a).

A pesar de que existen reportes sobre protocolos específicos de extracción de DNA para caña de azúcar, la mayoría consumen mucho tiempo y requieren reactivos y equipos costosos (Honeycutt *et al.*, 1992; Aljanabi *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2006; Vaze *et al.*, 2010). El objetivo del presente estudio fue establecer un protocolo optimizado para purificar DNA de hojas de *S. officinarum* a concentraciones altas y pureza óptima, de forma rápida y económica. Con los resultados obtenidos se dispondrá de un protocolo estandarizado para purificar DNA de *S. officinarum* que pueda ser utilizado en marcadores moleculares en programas de mejoramiento genético.

Materiales y métodos

Se establecieron dos protocolos de extracción y purificación de DNA basados en el método de CTAB. El protocolo I se fundamentó según lo descrito por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones que incluyeron el uso de proteínasa K y polivinilpirrolidona (PVP) en el buffer de homogeneización, una extracción con fenol-cloroformo y el uso de RNasa A en la resuspensión final del DNA en buffer TE. El protocolo II derivó del trabajo descrito por Aljanabi *et al.* (1999) sin modificaciones. Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Biotecnología de plantas del Campo Experimental Tecomán-INIFAP, Colima, México.

Material vegetal. Se recolectaron hojas sanas y jóvenes con 6 meses de edad de plantas de caña de azúcar establecidas en campo. Las muestras foliares se transportaron refrigeradas al laboratorio y se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su uso. Para todas las muestras el DNA se extrajo a partir de

More recently, Vaze *et al.* (2010) developed a specific protocol to isolate genomic DNA from leaf tissue dry sugar cane without the use of N₂, performance reporting DNA was 0.25-1.00 mg/g purity 1.7-1.8 (A_{260:280}); This DNA was successfully used in RAPD and ISSR markers for genetic diversity studies. Often commercial kits are used to extract DNA from plants, including sugar cane, however, it is widely reported that although significantly reduce time, prove to be very costly compared to the conventional methods, plus yields are obtained very low DNA (Castillo-Reyes *et al.*, 2004; Niu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Perez-Almeida *et al.*, 2011; Sahu *et al.*, 2012; Huaqiang *et al.*, 2013a).

Although there are reports about specific protocols DNA extraction for sugarcane, most time consuming and require reagents and expensive equipment (Honeycutt *et al.*, 1992; Aljanabi *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2006; Vaze *et al.*, 2010). The aim of this study was to establish an optimized protocol for purifying DNA from *S. officinarum* leaves at high concentrations and optimal purity, quickly and economically. With the results obtained have a standardized to purify DNA from *S. officinarum* that can be used in molecular markers in breeding programs protocol.

Materials and methods

Two extraction protocols and DNA purification based on the method of CTAB were established. The I protocol was based as described by Doyle and Doyle (1990) with some modifications included using proteinase K and polyvinylpyrrolidone (PVP) in homogenization buffer, an extraction with phenol-chloroform and the use of RNase A in the final resuspension of the DNA in TE buffer. Protocol II derived from the work described by Aljanabi *et al.* (1999) unchanged. The tests were conducted in the laboratory of Plant Biotechnology Experimental Field-INIFAP Tecoman, Colima, Mexico.

Vegetal material. The young healthy leaves and 6 months old plants sugar cane field were harvested established. Leaf samples were transported to the laboratory refrigerated and stored at -70 °C until use. For all samples DNA was extracted from 100 mg leaf tissue. Grinding tissue +N₂ was performed in mortar using a pestle; and the required amount of tissue recovered with a spoon; while for grinding -N₂ the homogenization buffer he was added to the tissue in the mortar and mixed with micropipette recovered.

100 mg de tejido foliar. La molienda de tejido +N₂ se realizó en mortero con ayuda de un pistilo; y se recuperó la cantidad requerida de tejido con una cucharilla; mientras que para la molienda -N₂ se adicionó el buffer de homogeneización al tejido en el mortero y se recuperó la mezcla con micropipeta.

Protocolo I. El tejido se maceró (+N₂ y -N₂) y homogeneizó con 800 µL de solución amortiguadora CTAB [100 mM de Tris-HCl pH 8, 50 mM de EDTA pH 8, 1.4 M de NaCl, 3% (p/v) de CTAB y 1% (p/v) de PVP]. Posteriormente se adicionó 10 µL de 2-β-mercaptoetanol concentrado y 5 µL de proteínasa K (20 mg/mL). Se incubó las muestras durante 60 min a 65 °C en baño María y se mezcló por inversión cada 5 minutos. Se adicionó 800 µL de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una relación de 25:24:1, se mezcló vigorosamente usando un vórtex y se centrifugó a 14 000 rpm a 4 °C durante 10 min.

El sobrenadante recuperado se colocó en tubos de 1.5 mL y el DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 durante 30 min a -20 °C. La mezcla se centrifugó a 14 000 rpm a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se decantó y se agregó 500 µL de etanol al 70%; se agitó manualmente hasta desprender la pastilla de DNA y se centrifugaron los tubos a 14 000 rpm a 4 °C durante 5 min, se decantó la fase acuosa y se invirtieron sobre papel absorbente para retirar el exceso de etanol. La pastilla de DNA se secó a temperatura ambiente y resuspendió en 40 µL de amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA pH 8). Finalmente se agregó 1 µL de RNasa A (10 mg/mL), se mezcló con micropipeta, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se almacenó a -20 °C.

Protocolo II. Se maceró el tejido (+N₂ y -N₂) y mezcló con 500 µL de amortiguador de homogeneización [200 mM de Tris-HCl pH 8, 50 mM de EDTA pH 8, 2.2 M de NaCl, 2% (p/v) de CTAB, 0.06% (p/v) de sulfito de sodio]. Se adicionó 100 µL de N-lauril-sarcosina al 5% (p/v), 100 µL de PVP al 10% (p/v) y 100 µL de CTAB al 20% (p/v). Se incubó a 65 °C durante 60 min en baño María y mezcló por inversión cada 5 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se agregó un volumen de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló por inversión y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y transfirió a tubos estériles. Se agregó un volumen de isopropanol frío seguido de 100 µL de NaCl 6 M y se incubó a -20 °C por 60 min. Posteriormente, se centrifugaron los tubos durante 10 min a 14 000 rpm. La pastilla de DNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se secó

Protocolo I. The tissue was macerated (+N₂ and -N₂) and homogenized with 800 µL of CTAB buffer [100 mM of Tris-HCl pH 8, 50 mM of EDTA pH 8, 1.4 M of NaCl, 3% (p/v) of CTAB and 1% (p/v) of PVP]. Subsequently was added concentrated 10 µL of 2-β-mercaptoethanol and 5 µL of proteinase K (20 mg/mL). Samples incubated for 60 min at 65 °C in a water bath and mixed by inversion every 5 minutes. The chloroform: phenol 800 µL of the solution was added isoamyl alcohol in a ratio of 25:24:1 was vigorously mixed using a vortex and centrifuged at 14 000 rpm at 4 °C for 10 min.

The recovered supernatant was placed in 1.5 mL tubes and the DNA was precipitated with 0.6 volumes of cold isopropanol and 0.1 volume of 3 M sodium acetate pH 5.2 for 30 min at -20 °C. The mixture was centrifuged at 14 000 rpm at 4 °C for 10 min. The supernatant was decanted and 500 µL was added to 70% ethanol; was manually stirred until detaching the DNA pellet and the tubes at 14 000 rpm at 4 °C for 5 min centrifuged, the aqueous phase was decanted and inverted onto absorbent paper to remove excess ethanol. The DNA pellet was dried at room temperature and resuspended in 40 µL of buffer (10 mM of Tris-HCl, 1 mM of EDTA pH 8) TE. Finally 1 µL of RNase A (10 mg/mL) was added, mixed with a micropipette, incubated at room temperature for 5 minutes and stored at -20 °C.

Protocolo II. The tissue (+N₂ and -N₂) macerated and mixed with 500 µL of homogenization buffer [200 mM of Tris-HCl pH 8, 50 mM of EDTA pH 8, 2.2 M of NaCl, 2% (p/v) of CTAB, 0.06% (p/v) of sodium sulfite]. The 100 µL of N-lauryl sarcosine 5% (p/v), 100 µL of 10% PVP (p/v) and 100 µL of CTAB 20% (p/v) was added. It was incubated at 65 °C for 60 min in a water bath and mixed by inversion every 5 minutes. The samples were cooled to room temperature and a volume of the phenol solution was added: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1). Was mixed by inversion and centrifuged at 14 000 rpm for 10 min at 4 °C. the aqueous phase was recovered and transferred to sterile tubes. A volume of cold isopropanol followed of 100 µL 6 M NaCl and incubated at -20 °C for 60 min was added. Subsequently, the tubes were centrifuged for 10 min at 14 000 rpm. The DNA pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol and dried at room temperature. DNA was resuspended in 40 µL of buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) TE and stored at -20 °C.

Quantitation, purity and integrity of the DNA. The DNA concentration (ng/µL) was quantitated with a spectrophotometer NanoDrop Thermo Scientific and

a temperatura ambiente. Se resuspendió el DNA en 40 μL de amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8) y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuantificación, pureza e integridad del DNA. La concentración de DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific y se convirtió a mg/g . Como criterio de pureza se consideraron las relaciones de $A_{260:280}$ y $A_{260:230}$. La integridad de los ácidos nucleicos se verificó mediante la separación por electroforesis en gel de agarosa al 1% de 1 μg de DNA genómico, se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador.

Funcionalidad del DNA purificado

Marcador RAPD. Se utilizó el oligonucleótido OPA-10-5'-GTGATCGCAG-3' (Pan *et al.*, 1996). El volumen de la reacción de PCR fue de 25 μL conteniendo amortiguador de reacción 1 X, 1.5 mM de MgCl_2 , 1 μM de cada oligonucleótido, 100 μM de dNTPs, 1.25 U de ADN polimerasa (BioTecMol) y 50 ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación para la reacción se llevaron se basaron de acuerdo a Chen *et al.*, 2011, con algunas modificaciones: desnaturalización inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -4 min, seguido de 45 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -1 min, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -1 min y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -2 min de desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente, y una extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -7 min. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% (p/v) con amortiguador TAE teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL).

Marcador TRAP. Se utilizó el juego de oligonucleótidos Arbi 3 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3' y SuSy 5'-GGAGGAGCTGAGTGTTTC-3' (Hu y Vick, 2003; Devarumath *et al.*, 2013). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 μL conteniendo amortiguador de reacción 1 X, 1.5 mM de MgCl_2 , 1 μM de cada oligonucleótido, 100 μM de dNTPs, 1.25 U de DNA polimerasa (BioTecMol) y 50 ng de DNA genómico. Las condiciones de amplificación para la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -2 min, seguido de 5 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -45 s, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -45 s y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -1 min de desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente; seguido por 35 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -45 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -45 s y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -1 min de desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente. La extensión final fue de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -7 min (Hu y Vick, 2003). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% (p/v) con amortiguador TAE y se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL).

converted to mg/g . As a criterion of purity $A_{260:280}$ and $A_{260:230}$ relations were considered. The integrity of nucleic acids was verified by separation by gel electrophoresis 1% agarose 1 μg genomic DNA, stained with ethidium bromide (10 mg/mL) and visualized with UV light in a photodocumentador.

Purified DNA functionality

RAPD marker. Oligonucleotide was used OPA-10-5'-GTGATCGCAG-3' (Pan *et al.*, 1996). The volume of the PCR reaction was 25 μL containing 1 X reaction buffer, 1 X, 1.5 mM de MgCl_2 , 1 μM of each oligonucleotide, 100 μM of dNTPs, 1.25 U of DNA polymerase (BioTecMol) and 50 ng of genomic DNA. Amplification conditions for the reaction were carried were based according to Chen *et al.*, 2011, with some modifications. Initial denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -4 min, followed by 45 cycles of $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -1 min, $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -1 min and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -2 min denaturation, alignment and extension, respectively, and a final extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -7 min. The PCR products were separated by horizontal electrophoresis in agarose gels 1.5% (p/v) with TAE buffer stained with ethidium bromide (10 mg/mL).

TRAP marker. The game was used oligonucleotide Arbi 3 5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3' and SuSy 5'-GGAGGAGCTGAGTGTTTC-3' (Hu and Vick, 2003; Devarumath *et al.*, 2013). The PCR reaction was performed in a volume of 25 μL containing reaction buffer 1 X, 1.5 mM de MgCl_2 , 1 μM of each oligonucleotide, 100 μM of dNTPs, 1.25 U of DNA polymerase (BioTecMol) and 50 ng of DNA genomic. Amplification conditions for the reaction were as follows: initial denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -2 min, followed by 5 cycles of $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -45 s, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -45 s and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -1 min denaturation, alignment and extension, respectively; followed by 35 cycles of $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -45 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -45 s and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -1 min denaturation, alignment and extension, respectively. Final extension was $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -7 min (Hu and Vick, 2003). The PCR products were separated by horizontal electrophoresis in agarose gels 1.5% (p/v) with TAE buffer and stained with ethidium bromide (10 mg/mL).

Statistical analysis. The yield (mg/g) and purity ($A_{260:280}$ and $A_{260:230}$) were analyzed for DNA analysis of variance using a completely randomized design factorial 2 (protocols) x 2 ((+N₂ and -N₂) with, giving a total of 4 treatments and 10 repetitions. Experimental unit was considered as a sample of DNA from sugar cane. Test Duncan's multiple range was used to compare mean values between variables than

Análisis estadístico. El rendimiento (mg/g) y pureza ($A_{260:280}$ y $A_{260:230}$) del DNA se analizaron para un análisis de varianza utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 (protocolos) x 2 (+N₂ y -N₂), dando un total de 4 tratamientos y 10 repeticiones. Se consideró como unidad experimental una muestra de DNA de caña de azúcar. Se utilizó la prueba de Duncan de rangos múltiples para comparar los valores medios entre las variables al 95% de probabilidad mediante el paquete estadístico SAS. La integridad y funcionalidad del DNA fueron evaluadas visualmente con geles de agarosa.

Resultados y discusión

Rendimiento del DNA

El efecto del uso del N₂ sobre el rendimiento del DNA obtenido a partir de hojas de caña de azúcar se muestra en el Cuadro 1. Los valores medios de rendimiento del DNA extraído +N₂ (0.68 mg/g), fueron significativamente superiores a los obtenidos sin el uso del mismo (0.50 mg/g) ($p > 0.05$). Estos resultados superan a los reportados por otros autores, quienes extrajeron DNA de caña de azúcar, sin el uso de N₂ y con rendimientos de DNA inferiores a los 0.30 mg/g de tejido foliar (Honeycutt *et al.*, 1992; Hossain *et al.*, 2006; Vaze *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Rendimiento del DNA extraído de hojas jóvenes de *S. officinarum* (+N₂= con nitrógeno líquido; -N₂= sin nitrógeno líquido).

Table 1. Performance DNA extracted from young leaves of *S. officinarum* (+N₂= with liquid nitrogen; -N₂= no liquid nitrogen).

Protocolos	Nitrógeno líquido		Rendimiento (mg/g)		
	+N ₂	-N ₂	Media	Rango	
I	1.17 ^a	0.81 ^b	0.99 ^A	0.71-1.75	0.41-1.4
II	0.19 ^c	0.20 ^c	0.20 ^B	0.09-0.27	0.1-0.35
Media	0.68 ^M	0.50 ^N			

^{a, b, c} Medias con diferente superíndice entre columnas y filas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). ^{A, B} Medias con diferente superíndice en la columna denotan diferencias significativas entre protocolos ($p < 0.05$). ^{M, N} Medias con diferente superíndice en la fila denotan diferencias significativas con el uso del N₂ ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el uso de N₂ eleva el rendimiento de DNA de *S. officinarum*. De forma general, el empleo de N₂ está ampliamente documentado en plantas (Ahmad *et al.*, 2004; Niu *et al.*, 2008; Arif *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Cingilli-Vural y Dageri, 2011; Doosty *et al.*, 2012; Huaqiang *et al.*, 2013a; Huaqiang *et al.*, 2013b); hongos (Niu *et al.*, 2008; Motkova y Vytrasová, 2011; Cáceres

95% probability using the SAS statistical package. The integrity and functionality of DNA were visually assessed with agarose gels.

Results and discussion

DNA yield

The effect of using N₂ performance on DNA obtained from leaves of sugarcane shown in Table 1. The average values of extracted DNA yield +N₂ (0.68 mg/g), were significantly higher than those obtained without the use of the same (0.50 mg/g) ($p > 0.05$). These results exceed those reported by other authors, who extracted DNA from sugar cane, without the use of N₂ and with yields of DNA below 0.30 mg/g of leaf tissue (Honeycutt *et al.*, 1992; Hossain *et al.*, 2006; Vaze *et al.*, 2010).

The results obtained in this study indicate that the use of N₂ increased performance *S. officinarum* DNA. Generally, the use of N₂ is widely documented in plants (Ahmad *et al.*, 2004; Niu *et al.*, 2008; Arif *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010; Cingilli-Vural y Dageri, 2011; Doosty *et al.*, 2012; Huaqiang *et al.*, 2013a; Huaqiang *et al.*, 2013b); fungi (Niu *et al.*, 2008; Motkova y Vytrasová, 2011; Cáceres *et al.*, 2012; Prabha *et al.*, 2013) and animals (Gross-Bellard *et al.*, 1973; Chen *et al.*, 2010; Eschbach, 2012). Using N₂

freezes -196 to -210 °C tissue samples, facilitating all ruptured cell walls and membranes, allowing exposure of nucleic acids with extraction buffer (Cáceres *et al.*, 2012).

This suggests that the use of N₂ probably releases a larger amount of nucleic acids of a larger number of cells, yielding improved performance. Also reported obtaining DNA of

et al., 2012; Prabha *et al.*, 2013) y animales (Gross-Bellard *et al.*, 1973; Chen *et al.*, 2010; Eschbach, 2012). El uso de N₂ congela de -196 a -210 °C las muestras de tejido, facilitando la ruptura de todas las paredes y membranas celulares, permitiendo así la exposición de los ácidos nucleicos con el amortiguador de extracción (Cáceres *et al.*, 2012).

Lo anterior sugiere que probablemente el uso de N₂ libera una mayor cantidad de ácidos nucleicos de un mayor número de células, obteniéndose mayor rendimiento. También se ha reportado la obtención de DNA de buena calidad y elevado rendimiento en plantas -N₂ (Ahmad *et al.*, 2004; Tung-Nguyen *et al.*, 2009; Arif *et al.*, 2010; Sahu *et al.*, 2012), aunque la pureza y concentración en algunos casos son más bajos (Sharma *et al.*, 2010; Cáceres *et al.*, 2012). En caña de azúcar la molienda de tejido -N₂ es complicada, debido a la elevada cantidad de fibra que contienen las hojas. A pesar de que el N₂ es caro y difícil de conseguir en algunas regiones (Aljanabi *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2010; Sahu *et al.*, 2012), los resultados del presente trabajo indican que es preferible utilizar N₂ en la extracción de DNA de hojas de *S. officinarum*.

Por otra parte, se detectaron diferencias altamente significativas con el uso de los dos protocolos evaluados ($p > 0.05$) (Cuadro 1). Las diferencias entre los protocolos son: el I incluyó proteínasa K y 2-β-mercaptoetanol en el buffer de homogeneización, además utilizó acetato de sodio-isopropanol para la precipitación del DNA, así como el uso de RNasa; mientras que el II incluyó sulfito de sodio y N-lauril-sarcosina en el buffer de homogeneización y NaCl-isopropanol para la precipitación del DNA. El efecto de la proteínasa K es responsable de la lisis celular y digerir proteínas e inactivar RNasas y DNasas (Shahriar *et al.*, 2011), mientras que el 2-β-mercaptoetanol desnaturaliza proteínas mediante el rompimiento de los puentes disulfuro. Por otra parte, el sulfito de sodio inhibe la oxidación de los polifenoles y el N-lauril-sarcosina desnaturaliza proteínas mediante el rompimiento de enlaces covalentes (Aljanabi *et al.*, 1999). La RNasa A contenida en el protocolo I, actúa rompiendo los enlaces fosfodiéster entre las ribosas y grupos fosfato del RNA (Sambrook *et al.*, 2001). Todos estos componentes probablemente contribuyeron a que se obtuviera un mayor rendimiento de DNA con el protocolo I. Además, el ANOVA detectó diferencias significativas en la interacción de protocolos*N₂ ($p > 0.05$), por lo que el mejor tratamiento para extraer los rendimientos más elevados de DNA de hojas de caña de azúcar fue el protocolo I+N₂.

good quality and high yield in plants -N₂ (Ahmad *et al.*, 2004; Tung-Nguyen *et al.*, 2009; Arif *et al.*, 2010; Sahu *et al.*, 2012), although the purity and concentration in some cases are lower (Sharma *et al.*, 2010; Cáceres *et al.*, 2012). Sugar cane grinding -N₂ tissue is complicated due to the high amount of fiber containing sheets. Although the N₂ is expensive and difficult to get in some regions (Aljanabi *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2010; Sahu *et al.*, 2012), the results of this study indicate that it is preferable to use N₂ DNA extraction sheet *S. officinarum*.

Moreover, highly significant differences were detected using the two protocols evaluated ($p > 0.05$) (Table 1). The differences between the protocols are: I included proteinase K and 2-β-mercaptoethanol in homogenisation buffer also used sodium acetate-isopropanol for DNA precipitation, and the use of RNase; while the II included sodium sulfite and N-lauryl sarcosine in the homogenization buffer and NaCl-isopropanol for DNA precipitation. The effect of Proteinase K is responsible for cell lysis and protein digestion and inactivate RNase and DNase (Shahriar *et al.*, 2011), while 2-β-mercaptoethanol denatured protein by breaking the disulphide bridges. Moreover, sodium sulfite inhibits oxidation of polyphenols and N-lauryl sarcosine denatured proteins by breaking covalent bonds (Aljanabi *et al.*, 1999). RNase A contained in the first protocol, acts by breaking the phosphodiester bonds between the ribose and phosphate groups RNA (Sambrook *et al.*, 2001). All these components probably contributed to a higher yield of DNA was obtained with the protocol I. In addition, the ANOVA showed significant differences in the interaction of protocols*N₂ ($p > 0.05$), so the best treatment to extract yields more DNA elevated sugarcane leaves was I+N₂ protocol.

The results obtained in this study DNA performance exceeding those reported by Honeycutt *et al.* (1992), who obtained a DNA yield of 0.28 mg/g in *S. officinarum* using a modified CTAB method, which included the use of spermidine, polyethylene glycol (PEG) and sucrose cushion homogenization. Spermidine due to its polycationic character joins the DNA molecules of negative charge, conformation and precipitating modifying (Wallace *et al.*, 2003). The PEG also precipitated nucleic acids, while adding sucrose cushion increases the yield of DNA extracted, although unclear their interaction in the process of extracting DNA (Paithankar and Prasad, 1991; Takakura and Nishio,

Los resultados obtenidos en este estudio sobre rendimiento de DNA superan a los reportados por Honeycutt *et al.* (1992), quienes obtuvieron un rendimiento de DNA de 0.28 mg/g en *S. officinarum* utilizando un método modificado de CTAB, que incluyó el uso de espermidina, polietilenglicol (PEG) y sacarosa en el amortiguador de homogeneización. La espermidina debido a su carácter policatiónico se une con las moléculas de DNA de carga negativa, modificando su conformación y precipitándolas (Wallace *et al.*, 2003). El PEG también precipita ácidos nucleicos, mientras que la adición de sacarosa al amortiguador aumenta el rendimiento del DNA extraído, aunque no está muy clara su interacción en el proceso de extracción de DNA (Paithankar y Prasad, 1991; Takakura y Nishio, 2012). Los resultados obtenidos sugieren que el uso de espermidina y PEG no es necesario para obtener DNA de calidad de *S. officinarum*, reduciendo el costo del proceso de extracción.

Por otra parte, Aljanabi *et al.* (1999), obtuvieron rendimientos elevados de DNA de 0.50-0.80 mg/g de tejido de meristemas de caña de azúcar utilizando el equipo "Ultra-Turax" para la homogeneización de las muestras y una modificación del método del CTAB de Doyle y Doyle (1990) que incluyó altas concentraciones de CTAB (20%) y NaCl (6 M) para remover polisacáridos. En el presente trabajo se reprodujo la metodología descrita por el autor antes mencionado (protocolo II), utilizando 100 mg de tejido foliar (no meristemas). Los rendimientos de DNA obtenidos fueron muy bajos y se mantuvieron en un rango de 0.10-0.30 mg/g. Estos resultados indican que el tipo de tejido utilizado y equipo para la extracción del DNA de *S. officinarum* podrían explicar las diferencias entre los rendimientos obtenidos con los dos protocolos. Por lo anterior, no se requiere utilizar altas concentraciones de CTAB y NaCl para obtener DNA con pureza elevada a partir de hojas jóvenes de *S. officinarum*.

Hossain *et al.* (2006), evaluaron tres protocolos de extracción de DNA para caña de azúcar a partir de hojas y meristemas, con una modificación en la metodología propuesta por Aljanabi *et al.* (1999). Los autores sustituyeron el N-lauril-sarcosina por dodecilsulfato sódico (SDS), ambos detergentes aniónicos que rompen los enlaces covalentes entre las proteínas, desnaturalizándolas en el proceso de purificación del DNA. Los autores obtuvieron un rendimiento de DNA de 0.04 mg/g, valores significativamente más bajos a los aquí reportados para hojas (0.20 mg/g) (Cuadro 1), utilizando el protocolo II. El uso de distintos detergentes aniónicos podría tener diferente efectividad sobre el rompimiento de los enlaces covalentes de las proteínas, por lo que

2012). These results suggest that the use of spermidine and PEG is not necessary for DNA quality *S. officinarum*, reducing the cost of the extraction process.

Moreover, Aljanabi *et al.* (1999), obtained high yields of DNA from 0.50 to 0.80 mg/g tissue meristem sugarcane using the "Ultra-Turax" equipment for homogenization of samples and a modification of the CTAB method of Doyle and Doyle (1990) which included high concentrations of CTAB (20%) and NaCl (6 M) to remove polysaccharides. In this paper the methodology described by the aforementioned author (Protocol II), using 100 mg of leaf tissue (not meristems) was reproduced. The DNA yields obtained were very low and remained in a range of 0.10 to 0.30 mg/g. These results indicate that the type of fabric used and equipment for the extraction of DNA from *S. officinarum* could explain the differences between the yields obtained with the two protocols. Therefore, it is not necessary to use high concentrations of CTAB and NaCl to obtain high purity DNA from young leaves of *S. officinarum*.

Hossain *et al.* (2006) evaluated three DNA extraction protocols for sugar cane from leaves and meristems, with a change in the methodology proposed by Aljanabi *et al.* (1999). The authors replaced the N-lauryl sarcosine sodium dodecylsulfate by (SDS), both anionic detergents which break the covalent bonds between proteins, denaturing the DNA purification process. The authors obtained a yield of DNA of 0.04 mg/g, significantly lower the here reported for leaves (0.20 mg/g) (Table 1) using the protocol II values. The use of different anionic detergents may have different effectiveness on the breaking of covalent bonds of proteins, so probably the use of N-lauryl sarcosine could increase yields DNA of *S. officinarum* protocol II. Moreover, Vaze *et al.* (2010) reported low yields DNA 0.02-0.10 mg/g dry leaf tissue of sugarcane.

These variations between yields can be explained by the type and condition of tissue used, as in the present study used young leaves, which are in constant cell division, so there are as many cells per gram of tissue; addition, the concentration of phenolic compounds, polysaccharides and secondary metabolites is lower (Jobes *et al.*, 1995). Honeycutt *et al.* (1992) used mature leaves, where the concentration of phenolic compounds, polysaccharides and secondary metabolites is increased and the number of cells per gram of tissue is less compared to young leaves. Moreover, Aljanabi *et al.* (1999) included sugar cane meristems, which have similar properties to the young leaves. Meanwhile, Hossain

probablemente el uso de N-lauril-sarcosina podría aumentar los rendimientos de DNA de *S. officinarum* con el protocolo II. Por otra parte, Vaze *et al.* (2010) reportaron rendimientos bajos de DNA de 0.02-0.10 mg/g en tejido foliar seco de caña de azúcar.

Estas variaciones entre rendimientos pueden ser explicadas por el tipo y condición de tejido utilizado, ya que en el presente estudio se emplearon hojas jóvenes, las cuales están en constante división celular, por lo que hay mayor cantidad de células por gramo de tejido; además, la concentración de compuestos fenólicos, polisacáridos y metabolitos secundarios es menor (Jobes *et al.*, 1995). Honeycutt *et al.* (1992) usaron hojas maduras, donde la concentración de compuestos fenólicos, polisacáridos y metabolitos secundarios es mayor y el número de células por gramo de tejido es menor a comparación de las hojas jóvenes. Por otra parte, Aljanabi *et al.* (1999), incluyeron meristemas de caña de azúcar, los cuales tienen propiedades similares a las hojas jóvenes. Por su parte, Hossain *et al.* (2006) hicieron uso de meristemas y hojas; mientras que Vaze *et al.* (2010) extrajeron el DNA de hojas secas de caña de azúcar, donde el rendimiento y calidad del DNA son bajos y puede estar degradado. Los resultados anteriores sugieren el uso de hojas jóvenes de *S. officinarum* para extraer y purificar DNA de elevado rendimiento y pureza aceptable.

Pureza e integridad del DNA

El efecto del uso del N₂ y los protocolos de extracción de DNA sobre la pureza (A_{260:A280} y A_{260:A230}) del DNA obtenido a partir de hojas de caña de azúcar se muestra en la Cuadro 2 y 3. Una muestra pura de DNA tiene una relación de A_{260:A280} entre 1.8-1.9, mientras que la relación A_{260:A230} debe ser de 1.8-2.2 (Gallagher and Desjardins, 2011). Las purezas (A_{260:A280}) +N₂ y -N₂ fueron de 2.01 y 2.00, respectivamente, por lo que no se detectaron diferencias significativas con esta variable ($p > 0.05$). Por otra parte, se detectaron diferencias altamente significativas con el uso de los protocolos ($p > 0.05$) (Cuadro 2), mientras que la interacción protocolos*N₂ fue significativa ($p > 0.05$). Estos resultados son consistentes con los reportados en caña de azúcar por Aljanabi *et al.* (1999) y Vaze *et al.* (2010), mientras que Honeycutt *et al.* (1992) y Hossain *et al.* (2006) reportaron purezas por debajo de 1.8, por lo que probablemente el DNA se encuentra ligeramente contaminado por proteínas y/o fenoles (Gallagher and Desjardins, 2011; Huaqiang *et al.*, 2013a).

et al. (2006) made use of meristems and leaves; while Vaze *et al.* (2010) extracted the DNA from dried leaves of cane sugar cane, where the yield and quality of DNA are low and can be degraded. The above results suggest the use of young leaves of *S. officinarum* extract and purify DNA for high throughput and acceptable purity.

Purity and integrity of DNA

The effect of the use of N₂ and DNA extraction protocols on purity (A_{260:A280} and A_{260:A230}) of the DNA obtained from sugar cane leaves shown in Table 2 and 3. A pure sample of DNA has a ratio A_{260:A280} between 1.8-1.9, while the A_{260:A230} should be 1.8-2.2 (Gallagher and Desjardins, 2011). The purities (A_{260:A280}) +N₂ and -N₂ were 2.01 and 2.00, respectively, so no significant difference with this variable ($p > 0.05$) were detected. Moreover, highly significant differences were detected using protocols ($p > 0.05$) (Table 2), while the protocols *N₂ interaction was significant ($p > 0.05$). These results are consistent with those reported in sugar cane Aljanabi *et al.* (1999) and Vaze *et al.* (2010), while Honeycutt *et al.* (1992) and Hossain *et al.* (2006) reported purities below 1.8, so that DNA is probably slightly contaminated by proteins and/or phenols (Gallagher and Desjardins, 2011; Huaqiang *et al.*, 2013a).

Aljanabi *et al.* (1999) obtained for all samples A_{260/280} of between 1.76-1.96 and reported that the RNA was degraded in the extraction process, however, in this study using the same methodology (Protocol II), was reported for all samples values of the ratio A_{260/280} above 2 (Table 2), indicating the presence of RNA, which was not degraded during the extraction process as described by Aljanabi *et al.* (1999), so DNA quantifications II protocol could be overestimated. This was confirmed by electrophoresis on an agarose gel (Figure 1, A). These results suggest the use of RNase A in the DNA extraction process. Using the protocol I RNase A was not eliminated, this suggests that it may be possible omission of incubation at 37 °C and subsequent deactivation and cleaning of this enzyme, saving time. It has not been observed that there is inhibition effect of RNase A in the PCR reactions, so the inclusion of RNase A (10 mg/mL) in the final resuspension of DNA is recommended.

The purities (A_{260:A230}) +N₂ and -N₂ being 1.78 and 1.93 were respectively detected with this variable significant differences ($p > 0.05$), while the effect of the protocols

Cuadro 2. Comparación de la pureza ($A_{260:A280}$ nm) del DNA extraído de *S. officinarum* (+N₂= con nitrógeno líquido; -N₂= sin nitrógeno líquido).**Table 2. Comparison of purity ($A_{260:A280}$ nm) of DNA extracted from *S. officinarum* (+N₂= with liquid nitrogen; -N₂= no liquid nitrogen).**

Protocolos	Nitrógeno líquido		Media	Rango	
	+N ₂	-N ₂		+N ₂	-N ₂
I	1.95 ^b	1.92 ^b	1.93 ^B	1.92–2.00	1.88–1.94
II	2.07 ^a	2.09 ^a	2.08 ^A	2.05–2.11	1.95–2.16
Media	2.01 ^M	2.00 ^M			

^{a, b, c} Medias con diferente superíndice entre columnas y filas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). ^{A, B} Medias con diferente superíndice en la columna denotan diferencias significativas entre protocolos ($p < 0.05$). ^M Medias con diferente superíndice en la fila denotan diferencias significativas con el uso del N₂ ($p < 0.05$).

Cuadro 3. Comparación de la pureza ($A_{260:A230}$ nm) del DNA extraído de *S. officinarum* (+N₂= con nitrógeno líquido; -N₂= sin nitrógeno líquido).**Table 3. Comparison of purity ($A_{260:A230}$ nm) of DNA extracted from *S. officinarum* (+N₂= with liquid nitrogen; -N₂= no liquid nitrogen).**

Protocolos	Nitrógeno líquido		Media	Rango	
	+N ₂	-N ₂		+N ₂	-N ₂
I	1.91 ^b	2.28 ^a	2.09 ^A	1.63–2.10	2.14–2.37
II	1.65 ^c	1.58 ^c	1.61 ^B	1.42–1.84	1.27–2.01
Media	1.78 ^N	1.93 ^M			

^{a, b} Medias con diferente superíndice entre columnas y filas denotan diferencias significativas ($p < 0.05$). ^{A, B, C} Medias con diferente superíndice en la columna denotan diferencias significativas entre protocolos ($p < 0.05$). ^{M, N} Medias con diferente superíndice en la fila denotan diferencias significativas con el uso del N₂ ($p < 0.05$).

Aljanabi *et al.* (1999) obtuvieron para todas sus muestras $A_{260/280}$ de entre 1.76-1.96 y reportaron que el RNA se degradó en el proceso de extracción, sin embargo, en este estudio con la misma metodología (protocolo II), se reportó para todas las muestras valores de la relación de $A_{260:A280}$ por encima de 2 (Cuadro 2), indicativo de presencia de RNA, el cual no se degradó durante el proceso de extracción según lo descrito por Aljanabi *et al.* (1999), por lo que las cuantificaciones de DNA con el protocolo II podrían estar sobrestimadas. Lo anterior fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 1, A). Estos resultados sugieren el uso de RNasa A en el proceso de extracción de DNA. Con el uso del protocolo I la RNasa A no fue eliminada, lo anterior sugiere que puede ser posible la omisión de la incubación a 37 °C y posterior desactivación y limpieza de esta enzima, ahorrando tiempo. No se ha observado que exista inhibición por efecto de la RNasa A en las reacciones de PCR, por lo que se recomienda la inclusión de RNasa A (10 mg/mL) en la resuspensión final del DNA.

Las purzas ($A_{260:A230}$) +N₂ y -N₂ fueron de 1.78 y 1.93, respectivamente, detectándose diferencias significativas con esta variable ($p > 0.05$), mientras que el efecto de los protocolos fue altamente significativo ($p > 0.05$) y la

was highly significant ($p > 0.05$) and interaction protocols *N₂ was significant (Table 3). Data reported to the protocol I indicated that the DNA is free polysaccharides. The DNA extraction methods specific for *S. officinarum* described by Honeycutt *et al.* (1992), Aljanabi *et al.* (1999), Hossain *et al.* (2006) and Vaze *et al.* (2010) do not report the ratio $A_{260:A230}$ as second criterion of purity of DNA, to which the polysaccharides are detected. In the protocol II showed lower values of $A_{260:A230}$ of the 1.8 (Table 3), so probably the DNA are slightly contaminated with polysaccharides or phenols. I use +N₂ protocol is recommended to extract DNA from leaves of *S. officinarum* as both criteria of purity ($A_{260:A280}$ and $A_{260:A230}$) they were optimal.

The integrity of genomic DNA influenced by the use of N₂ and the two extraction protocols in young leaves of sugarcane in Figure 1. Agarose gels with DNA extracted from leaves were ground with N₂ showed banding patterns genomic DNA of high molecular weight in all lanes with two protocols evaluated (Figure 1-A), so that no degradation of the genomic DNA was detected. The protocol II samples (Lanes 10-18) RNA showed contamination due to the omission of treatment with RNase A as described by Aljanabi *et al.* (1999). The protocol I turned out to be the best for full

interacción protocolos* N_2 fue significativa (Cuadro 3). Los datos reportados con el protocolo I indicaron que el DNA se encuentra libre de polisacáridos. Los métodos de extracción de DNA específicos para *S. officinarum* descritos por Honeycutt *et al.* (1992), Aljanabi *et al.* (1999), Hossain *et al.* (2006) y Vaze *et al.* (2010) no reportan la relación de $A_{260:A230}$ como segundo criterio de pureza del DNA, a la cual se detectan los polisacáridos. El protocolo II presentó valores inferiores de $A_{260:230}$ de 1.8 (Cuadro 3), por lo que probablemente los DNA se encuentran ligeramente contaminados por polisacáridos o fenoles. Se recomienda el uso del protocolo I + N_2 para extraer DNA de hojas de *S. officinarum* ya que ambos criterios de pureza ($A_{260:A280}$ y $A_{260:A230}$) resultaron óptimos.

La integridad del DNA genómico influenciada por el uso del N_2 y los dos protocolos de extracción en hojas jóvenes de caña de azúcar se observa en la Figura 1. Los geles de agarosa con DNA extraído de hojas que fueron molidas con N_2 mostraron patrones de bandas de DNA genómico de elevado peso molecular en todos los carriles con los dos protocolos evaluados (Figura 1-A), por lo que no se detectó degradación del DNA genómico. Las muestras del protocolo II (Carriles 10-18) mostraron contaminación por RNA debido a la omisión del tratamiento con RNasa A según lo descrito por Aljanabi *et al.* (1999). El protocolo I resultó ser el mejor para obtener DNA íntegro y sin residuos de RNA (Figura 1-A, carriles 1-9). El DNA genómico obtenido tiene una integridad similar a la reportada por Aljanabi *et al.* (1999) y Vaze *et al.* (2010) en caña de azúcar y a la de otros autores que utilizaron el método del CTAB en frijol caupí (Huaqiang *et al.*, 2013a; Huaqiang *et al.*, 2013b). Por otra parte, el DNA extraído - N_2 mostró patrones de DNA barrido con el uso de los dos protocolos (Figura 1-B), indicativo de degradación del mismo. Resultados similares fueron obtenidos por Honeycutt *et al.* (1992). Se recomienda el uso de N_2 para extraer DNA con integridad aceptable de hojas de *S. officinarum*.

Funcionalidad

La Figura 2 muestra los perfiles de dos marcadores moleculares utilizados para verificar la funcionalidad del DNA aislado con los protocolos establecidos en el presente trabajo. Para el marcador RAPD todas las muestras amplificaron perfectamente sin que se notara algún efecto por las variables N_2 y protocolos (Figura 2-A). Además, los residuos de RNA (Figura 1, A) del protocolo II no tuvieron efecto negativo en la reacción de PCR, amplificándose un buen perfil de bandas. Por otra parte, con el marcador TRAP se obtuvo un patrón de bandas de mejor calidad con las

DNA without RNA residues (Figure 1-A, lanes 1-9). The genomic DNA obtained is similar integrity to that reported by Aljanabi *et al.* (1999) and Vaze *et al.* (2010) in sugarcane and other authors who used the method of CTAB in cowpea (Huaqiang *et al.*, 2013a; Huaqiang *et al.*, 2013b). Moreover, the DNA extracted DNA patterns showed - N_2 scanning using the two protocols (Figure 1-B), indicating degradation. Similar results were obtained by Honeycutt *et al.* (1992). The use of N_2 is recommended to extract DNA with acceptable integrity *S. officinarum* leaves.

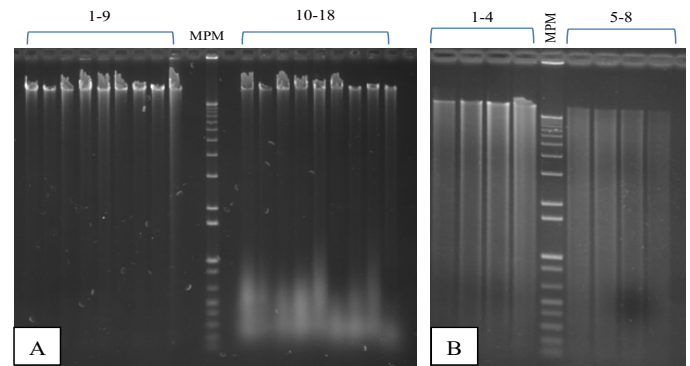


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico de *S. officinarum* extraído con dos protocolos basados en el método del CTAB a partir de tejido foliar. En cada carril se cargó 1 μ g de DNA. MPM= marcador de peso molecular, 1 Kb plus (Invitrogen) A) extracción + N_2 . Protocolo I= carriles 1-9; protocolo II= carriles 10-18. B) Extracción - N_2 . Protocolo I= carriles 1-4; protocolo II= carriles 5-8.

Figure 1. Gel electrophoresis in agarose genomic DNA of *S. officinarum* extracted with two protocols based on the CTAB method from leaf tissue. He was loaded in each lane 1 μ g of DNA. MPM= molecular weight marker, 1 Kb Plus (Invitrogen) A) + N_2 extraction. Protocol I= lanes 1-9; protocol II= lanes 10-18. B) Removal - N_2 . Protocol I= lanes 1-4; protocol II= lanes 5-8.

Functionality

In the Figure 2 shows the profiles of two molecular markers used to verify the performance of isolated DNA protocols set out in this work. The RAPD marker for all samples amplified perfectly without any effect by the variables N_2 and protocols (Figure 2-A) is noticed. Moreover, waste of RNA (Figure 1, A) protocol II had no negative effect on the PCR reaction, a good profile of amplified bands. Moreover, with the marker pattern TRAP bands with better quality samples they were treated + N_2 was obtained (Figure 2-B, lanes 1 and 2). The extracted samples - N_2 showed a pattern of diffuse

muestras que fueron tratadas +N₂ (Figura 2-B, carriles 1 y 2). Las muestras extraídas -N₂ presentaron un patrón de bandas difuso y de escasa calidad para su interpretación (Figura 2-B, carriles 4 y 5). Es probable mejorar el perfil de bandas con la modificación de la temperatura de alineamiento (T_m) del oligonucleótido. Por otra parte, teniendo en cuenta que en los marcadores RAPD es complicada su reproducibilidad en otros laboratorios, es importante que el DNA tenga valores óptimos de A_{260:280} y A_{260:230} para sobrellevar este problema; por lo que se recomienda el uso del protocolo I +N₂ para extraer DNA de hojas de *S. officinarum* para su uso con marcadores moleculares.

Además de los marcadores moleculares utilizados para explorar la diversidad genética de *S. officinarum*, el DNA obtenido con el protocolo I +N₂ ha sido usado exitosamente en metodologías basadas en PCR y secuenciación para detección de fitopatógenos en caña de azúcar: *Xanthomonas albilineans*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Puccinia melanocephala* y *P. kuehnii* causantes de enfermedades de importancia económica: escaldadura, raquitismo, roya café y roya naranja, respectivamente. También se ha utilizado en PCR tiempo real para la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal del Huanglongbing, en varias especies de cítricos (*Citrus aurantifolia*, *C. limon* y citrangeres) (datos no mostrados).

Conclusiones

Las modificaciones realizadas al método del CTAB para la extracción de DNA de *S. officinarum* permitieron optimizar un protocolo para obtener DNA de buena calidad y elevada cantidad. Los mayores rendimientos de DNA se obtuvieron con la interacción del protocolo I +N₂ para la molienda del tejido foliar. Además este mismo protocolo consumió el menor tiempo.

La pureza (A_{260:280} y A_{260:230}) del DNA aislado fue de mayor calidad con el uso del protocolo I +N₂. La integridad del DNA no presentó degradación +N₂, mientras que la degradación se presentó en muestras de DNA extraídas -N₂ con los dos protocolos evaluados.

En cuanto a la funcionalidad del DNA se obtuvieron perfiles de bandas nítidas y bien marcadas con el uso del marcador molecular RAPD +N₂ y -N₂. Mientras que para el marcador TRAP se logró un mejor patrón de bandas con la inclusión de

bands and poor quality for interpretation (Figure 2-B, lanes 4 and 5). It is likely to raise the profile of bands with changing the annealing temperature (T_m) of the oligonucleotide. Moreover, considering that in RAPD markers is complicated reproducibility in other labs, it is important that the DNA be optimal values of A_{260:280} and A_{260:230} to overcome this problem; so the use of the protocol I +N₂ is recommended to extract DNA from *S. officinarum* sheets for use with molecular markers.

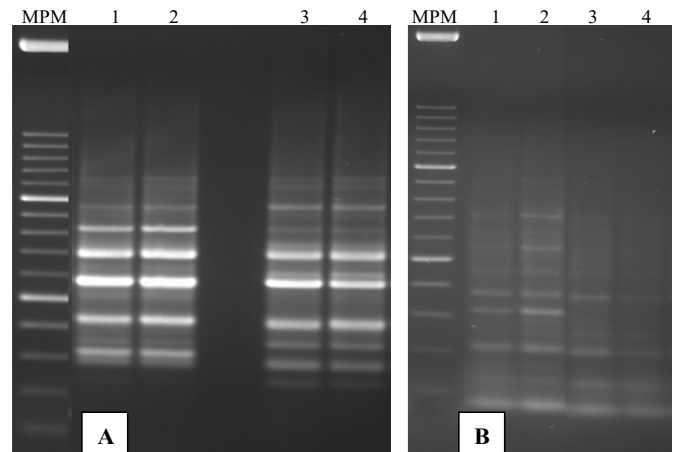


Figura 2. Marcadores moleculares con el DNA de hojas de *S. officinarum* extraído con dos protocolos basados en el método del CTAB. MPM= marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). A) RAPD con oligonucleótido OPA 10. B) TRAP con oligonucleótidos SuSy y Arbi 3. Carriles 1 y 2= muestras molidas +N₂ con los protocolos I y II, respectivamente. Carriles 4 y 5= muestras molidas -N₂ con los protocolos I y II, respectivamente.

Figure 2. Molecular markers with the DNA of *S. officinarum* leaves extracted with two protocols based on the CTAB method. MPM= molecular weight marker 100 bp (Invitrogen). A) RAPD with oligonucleotide OPA 10. B) TRAP with oligonucleotide SuSy and Arbi 3. Lanes 1 and 2= ground +N₂ protocols I and II, respectively samples. Lanes 4 and 5= ground samples -N₂ protocols I and II, respectively.

In addition to the molecular markers used to explore the genetic diversity of *S. officinarum*, the DNA obtained with I +N₂ protocol has been successfully used in PCR-based methodologies and sequencing for detection of pathogens in sugar cane: *Xanthomonas albilineans*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Puccinia melanocephala* and *P. kuehnii* cause diseases of economic importance: scald, rickets, rust brown and orange, respectively rust. It has also been used in real time PCR for detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causative agent of Huanglongbing in several species of citrus (*Citrus aurantifolia*, *C. limon* y citrangeres) (data not shown).

N₂ en cualquiera de los dos protocolos. Se recomienda emplear el protocolo I +N₂ para la extracción de DNA de hojas de caña de azúcar que podría ser utilizado con diversos marcadores moleculares en programas de mejoramiento genético.

Literatura citada

- Ahmad, S. M.; Ganaie, M. M.; Qazi, P. H.; Verma, V.; Basir, S. F. and Qazi, G. N. 2004. Rapid DNA isolation protocol for angiospermic plants. *Bulgarian J. Plant Physiol.* 30:25-33.
- Aljanabi, S. M.; Forget, L. and Dookun, A. 1999. An improved rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Mol. Biol. Reporter.* 17(3):1-8.
- Arif, I. A.; Bakir, M. A.; Khan, H. A.; Ahamed, A.; Al Farhan, A. H.; Al Homaidan, A. A.; Al Sadoon, M.; Bahkali, A. H. and Shobrak, M. 2010. A simple method for DNA extraction from mature date palm leaves: impact of sand grinding and composition of lysis buffer. *Int. J. Mol. Sci.* 11(9):3149-3157.
- Cáceres, P.; Cordero, C.; González, G.; Quiroz, K.; Bobadilla, J. C.; Bravo, C.; Caligari, P. D. S.; Carrasco, B. and García-González, R. 2012. Efficient protocols for the extraction of microbial DNA from the rhizosphere of hydrophilic forests in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria.* 39(3):585-592.
- Castillo-Reyes, F.; García-Villanueva, A. P.; Gómez-Martínez, M. y Reyes-Valdés, M. H. 2004. Comparación de tres métodos para el aislamiento de ADN en girasol. *Rev. Agraria.* 52(1):24-28.
- Chang, D.; Yang, F. Y.; Yan, J. J.; Wu, Y. Q.; Bai, S. Q.; Liang, X. Z.; Zhang, Y. W. and Gan, Y. M. 2012. SRAP analysis of genetic diversity of nine native populations of wild sugarcane, *Saccharum spontaneum*, from Sichuan, China. *Genetics Mol. Res.* 11(2):1245-1253.
- Chen, H.; Rangasamy, M.; Tan, S. Y.; Wang, H. and Siegfried, B. D. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE.* 5(8):1-6.
- Chen, P. H.; Salazar, E.; Fernández, H.; Castro, L.; Russo, A. y Vázquez, S. 2011. Detección de polimorfismos RAPD en materiales de *Musa* sp. con respuesta diferencial al ataque de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Agronomía Tropical.* 61(2):125-132.
- Cingilli-Vural, H. and Dageri, N. 2011. Evaluation of efficiency of different DNA extraction protocols and molecular identification of commercial soybean (*Glycine max.*, L.) growing in Turkey. *J. Appl. Biol. Sci.* 5(2):12-19.
- Devarumath, R. M.; Kalwade, S. B.; Bundock, P.; Elliott, F. G. and Henry, R. 2013. Independent target region amplification polymorphism and single-nucleotide polymorphism marker utility in genetic evaluation of sugarcane genotypes. *Plant Breed.* 132(6):736-747.
- Doosty, B.; Drikvand, R.; Salahvarzi, E.; Amiri, H. and Hadian, J. 2012. Comparative analysis and optimization of different DNA extraction protocols in *Satureja khuzistanica*. *Int. J. Biol.* 4(4):111-116.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12:13-15.
- Eschbach, E. 2012. Ascertainning optimal protocols for DNA extraction of different qualities of pike (*Esox lucius*) tissue samples a comparison of commonly used solid phase extraction methods. *Environ. Biotechnol.* 8:7-14.

Conclusions

Modifications to the CTAB for DNA extraction method of *S. officinarum* allowed optimizing a protocol for DNA quality and high quantity. Highest yields were obtained with DNA interaction protocol I +N₂ for grinding leaf tissue. Furthermore, this same protocol consumed the least amount of time.

The purity (A_{260:280} and A_{260:230}) isolated DNA was higher quality with the use of the protocol I +N₂. The DNA integrity presented no degradation +N₂, while degradation occurred in DNA samples extracted with the two protocols -N₂ evaluated.

As for the functionality of DNA profiles sharp and well marked bands were obtained with the use of RAPD molecular marker +N₂ and -N₂. While for a better marker TRAP banding pattern with the inclusion of N₂ in either protocol it was achieved. It is recommended to use I +N₂ protocol for extracting DNA from sugar cane leaves that could be used with various molecular markers in breeding programs.

End of the English version



- Gallagher, S. R. and Desjardins, P. 2011. Quantitation of nucleic acids and proteins. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques.* 5:1-36.
- Garces, F. F.; Gutierrez, A. and Hoy, J. W. 2014. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. *Plant Dis.* 98(1):121-126.
- Gross-Bellard, M.; Oudet, P. and Chambon, P. 1973. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 36(1):32-38.
- Gupta, V. K.; Misra, A. K.; Gupta, A.; Pandey, B. K. and Gaur, R. K. 2010. RAPD-PCR of *Trichoderma* isolates and *in vitro* antagonism against *Fusarium* wilt pathogens of *Psidium guajava* L. *J. Plant Protec. Res.* 50(3):256-262.
- Honeycutt, R. J.; Sobral, B. W. S.; Keim, P. and Irvine, J. E. 1992. A rapid DNA extraction method for sugarcane and its relatives. *Plant Mol. Biol. Reporter.* 10(1):66-72.
- Hossain, M. A.; Shaik, M. M.; Shahnawaz, R. M. S.; Islam, N. and Miah, M. A. S. 2006. Quality DNA isolation using different methods of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Bangladesh J. Sugarcane.* 28:65-69.
- Hu, J. and Vick, B. 2003. Target region amplification, polymorphism: a novel marker technique for plant genotypes. *Plant Mol. Biol. Reporter.* 20(3):289-294.
- Huaqiang, T.; Haitao, H.; Mamman, T.; Jianyao, M. and Huanxiu, L. 2013a. Comparative analysis of six DNA extraction methods in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J. Agric. Sci.* 5(7):82-90.
- Huaqiang, T.; Manman, T.; Li, Z.; Yanxia, Z. and Huanxiu, L. 2013b. The effects of three different grinding methods in DNA extraction of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Afr. J. Biotechnol.* 12(16):1946-1951.

- Jobes, D. V.; Hurley, D. L. and Thien, L. B. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon*. 44:349-386.
- Khan, I. A.; Bibi, S.; Yasmeen, S.; Seema, N.; Khatri, A.; Siddiqui, M. A.; Nizamani, G. S. and Afghan, S. 2011. Identification of elite sugarcane clones through TRAP. *Pak. J. Bot.* 43(1):261-269.
- Khanuja, S. P. S.; Shasany, A. K.; Darokar, M. P. and Kumar, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 17(1):1-7.
- Menossi, M.; Silva-Filho, M. C.; Vincentz, M.; Van-Sluys, M. A. and Souza, G. M. 2007. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. *Int. J. Plant Gen.* 2008:1-11.
- Motkova, P. and Vytrasová, J. 2011. Comparison of methods for isolating fungal DNA. *Czech J. Food Sci.* 29(S):76-85.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 8(19):4321-4325.
- Niu, C.; Kebede, H.; Auld, D. K.; Woodward, J. E.; Burow, G. and Wright, R. J. 2008. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *Afr. J. Biotechnol.* 7(16):2818-2822.
- Pan, Y. B.; Burner, D. M.; Ehrlich, K. C.; Grisham, M. P. and Wei, Q. 1996. Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. *BioTechniques*. 22(6):1071-1077.
- Paithankar, K. R. and Prasad, K. S. N. 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*. 19(6):1346.
- Pérez-Almeida, I.; Graterol, L. A.; Osorio, G.; Ramis, C.; Bedoya, A. M.; Figueroa-Ruiz, R.; Molina, S. and Infante, D. 2011. Métodos modificados de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*. 23(1):27-34.
- Porebski, S.; Bailey, L. G. and Baum, B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 15(1):8-15.
- Prabha, T. R.; Revathi, K.; Vinod, M. S.; Shanthakumar, S. P. and Bernard, P. 2013. A simple method for total genomic DNA extraction from water moulds. *Plant Breed. Gen. Res.* 104(30):585-592.
- Sahu, S. K.; Thangaraj, M. and Kathiresan, K. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *Int. Scholarly Res. Network Mol. Biol.* 1:1-6.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. and Sambrook, J. 2001. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory 3rd ed. NY, USA. 2100 p.
- Sharma, P.; Joshi, N. and Sharma, A. 2010. Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen. *Ind. J. Exp. Biol.* 48(6):610-614.
- Shahriar, M.; Haque, M. R.; Kabir, S.; Dewan, I. and Bhuyian, M. A. 2011. Effect of proteinase-K on genomic DNA extraction from Gram-positive strains. *Stamford J. Pharm. Sci.* 4(1):53-57.
- Takakura, K. and Nishio, T. 2012. Safer DNA extraction from plant tissues using sucrose buffer and glass fiber filter. *J. Plant Res.* 125(6):805-807.
- Tung-Nguyen, C. T.; Son, R.; Raha, A. R.; Lai, O. M. and Clemente-Michael, W. V. L. 2009. Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *Int. Food Res. J.* 16(1):21-30.
- Vaze, A.; Nerkar, G.; Pagariya, M.; Devarumath, R. M. and Prasad, D. T. 2010. Isolation and PCR amplification of genomic DNA from dry leaf samples of sugarcane. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 1(2):1-6.
- Wallace, H. M.; Fraser, A. V. and Hughes, A. 2003. A perspective of polyamine metabolism. *Bioch. J.* 376(1):1-14.