

# PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRAS DE HOJAS DE EJEMPLARES DE PHOENIX PARA EXTRACCIÓN DE ADN PARA ANÁLISIS GENÉTICO



## **Autores**

**Pedro Sosa Henríquez**

**Mara Arbelo Ramírez**

**Leticia Curbelo Muñoz**

Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (iUNAT).  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

## Preámbulo

El presente documento muestra la forma de realizar una extracción óptima de ADN de cualquier especie del género *Phoenix* (Arecaceae). Se basa en el método descrito por Dellaporta et al. (1983) modificado por Corniquel y Mercier (1994).

Este protocolo se ha elaborado en el marco del proyecto europeo LIFE-PHOENIX [<https://lifephoenix.gesplan.es/es>] denominado **Restauración y mejora del hábitat prioritario 9370\* "Palmerales de Phoenix"**

## Preparación de la salida

Para realizar el estudio genético de muestras de Phoenix, lo primero, es conocer y saber qué ejemplares y palmerales van a ser estudiados. Para ello se debe realizar primeramente una elección sobre el mapa y posteriormente realizar una visita de prospección. En ocasiones el palmeral es completamente inaccesible ya sea por el tamaño de sus ejemplares, por la presencia de cañas u otros elementos geográficos que impiden el acceso al mismo.

Además, y para proceder a cortar las hojas es necesario disponer de las herramientas adecuadas. Será necesario al menos: Una pértiga que tenga un serrucho, cuchillo o tijeras en el extremo. Tijeras de podar, cuchillo o navaja, paño o servilleta para limpiar las hojas de las suciedades y contaminantes que pueda tener, alcohol para desinfectar las herramientas entre muestra y muestra, sobres de papel, rotuladores permanentes, lápices, gel de sílice, metro, recipientes de plástico para almacenar las muestras durante la recogida. Un GPS lo más preciso posible.

## Elección del ejemplar. Elaboración de la ficha identificativa

Una vez elegidas las poblaciones en el mapa (regiones, áreas...) se debe realizar una ficha para cada población y para cada ejemplar que se vaya a estudiar en dicha población.

Se asigna en primer lugar el nombre de la localidad, es preferible utilizar el topónimo oficial de los mapas y asignarle un código específico a cada población y ejemplar que se vaya a recoger. Se adjunta una ficha de ejemplo.

Population / UTM:	Population / UTM:
Sample / UTM:	Sample / UTM:
Height:            nº Photo:            ♀□    ♂□    ?□	Height:            nº Photo:            ♀□    ♂□    ?□
Observations:	Observations:

Figura 1. Ejemplo de ficha de campo con datos de cada ejemplar

## Datos que se deben apuntar en las fichas para cada ejemplar

---

- ✓ Localización de la población mediante GPS (UTM). Incluir superficie o área de trabajo si es necesario.
- ✓ Localización del ejemplar mediante GPS (UTM). Nos situamos debajo del individuo para recoger sus coordenadas.
- ✓ Asignar un código al individuo. Nosotros solemos poner un código según el nombre de la población y enumeramos secuencialmente. Ej. Gomera-Tazo (GTZ001).
- ✓ Indicar el sexo del ejemplar (macho, hembra, indeterminado).
- ✓ Indicar y apuntar la altura aproximada del individuo. A veces y si no es posible determinar con exactitud, indicamos un rango de forma aproximada. *Depende del ejemplar.*
- ✓ Incluir observaciones del ejemplar. Describir alguna característica. Presencia de frutos, estado de los frutos, estado del ejemplar, presencia de hojas muy secas, presencia de plagas...a veces ayuda mucho para el reconocimiento posterior si fuese necesario, incluir algún accidente o característica geográfica o punto singular que permita identificarlo. Ej. Está situado al lado de la casa roja. Se encuentra en el fondo del barranco junto a una roca grande...
- ✓ Sacar fotografías del ejemplar. Nosotros solemos sacar 4-5 fotos con algunos detalles de algunas partes (hojas, tronco, etc) y 2-3 fotografías generales donde se aprecie el ejemplar entero. En el caso de *Phoenix canariensis* es importante para poder tener evidencia de las diferencias morfológicas entre *P. canariensis*, *P. dactylifera* y sus híbridos. Además, hacemos varias fotografías de la zona y alrededores.
- ✓ Apuntar los números (códigos) de la cámara de fotos de cada ejemplar en las fichas. Nosotros hacemos una foto al aire o ponemos la mano delante o hacemos cualquier foto rara que sirva para separar el conjunto de fotos que corresponden con un ejemplar del conjunto de fotos de otro ejemplar diferente.



Foto 1. Recogiendo posición del ejemplar con GPS

### Corte de las hojas

---

Se necesitan solamente 4-5 folíolos para analizar y almacenar las muestras.

Con la ayuda de la pértiga y el serrucho, se corta parte de la hoja del ejemplar. Generalmente la cortamos hacia el extremo apical para no desperdiciar material vegetal. No importa la zona de la cual se recojan las muestras, pero es **muy importante** recoger las partes de las hojas que estén verdes y dispongan de folíolos verdes.

Las hojas más jóvenes (las más verdes) son más difíciles de obtener y recoger porque se encuentran en el ápice y cogollo del ejemplar y suelen estar más alejadas. Se puede recoger cualquier hoja, siempre que se vea que están **verdes y sanas**.



**Foto 2. Corte de un trozo de hoja verde. De este trozo se cortan posteriormente los 4-5 foliolos que se van a almacenar**



**Foto 3. Corte de un trozo de hoja verde. De este trozo se cortan posteriormente los 4-5 foliolos que se van a almacenar. No es necesario que la hoja cortada sea tan grande. Esta hoja se cortó para otros propósitos.**

En muchas ocasiones es necesario utilizar una pértiga con tijeras o serrucho para alcanzar las hojas de ejemplares que sean muy altos. Se recomienda comprar alguna herramienta similar (Foto 4-5).



**Foto 4. Recogiendo hojas. Encima del hombro de un compañero o a través de una pértiga**

Una vez tengamos la hoja, cortamos entre 4-5 folíolos de entre 10-12 cm. Los limpiamos bien con un trozo de papel o con un trapo humedecido en agua. Dejar secar. Así eliminamos la suciedad y presencia de fitófagos, insectos e incluso algún hongo u otros organismos de las hojas. Y las guardamos en el sobre con su correspondiente código (Fotos 5, 6, 7).





**Foto 5. Herramientas para cortar las hojas y foliolos. De izquierda a derecha. Pértiga con tijeras. Pértiga con serrucho. Tijeras de poda. Tamaño de los foliolos para introducir en un sobre de papel con el código correspondiente**



**Foto 6. Cortando los foliolos para guardar en el sobre**



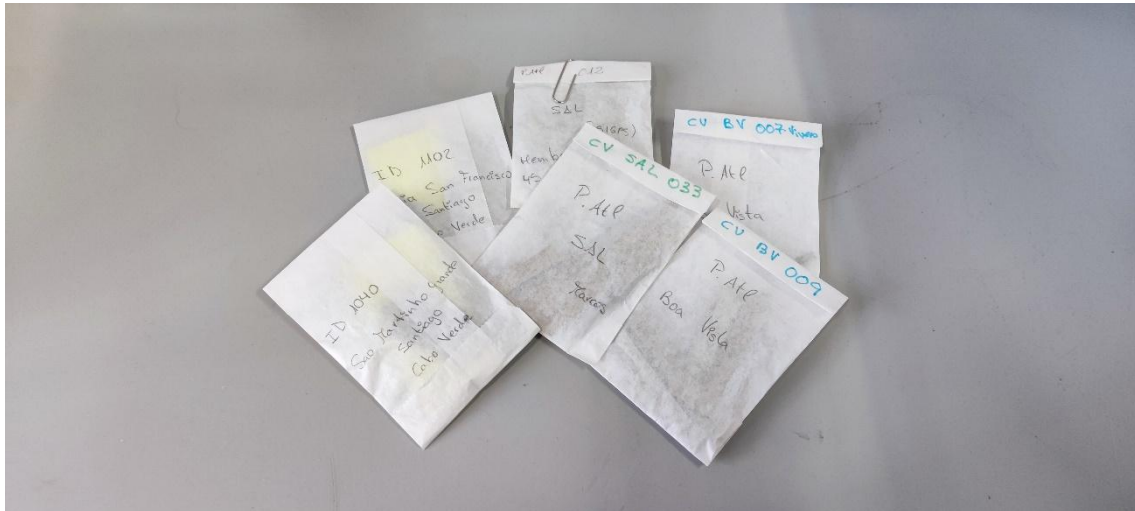
**Foto 7. Foliolos con restos orgánicos o insectos que hay que limpiar y eliminar antes de almacenar los foliolos**

Cortamos los foliolos en un tamaño tal que se puedan introducir en un sobre de papel (10-12 cm). Se introducen los foliolos en el sobre marcado, escribimos el código del ejemplar en el sobre y opcionalmente los códigos de las fotografías y se cierran(Foto 8).



**Foto 8. Sobre de papel con los foliolos y código del ejemplar**

No hace falta cerrar el sobre de forma hermética (sellándolo) porque se va a utilizar posteriormente. Solo se dobla bien, varias veces, el extremo del sobre para que la muestra no se salga de este. Se puede poner un clip o un poco de cinta adhesiva para mayor seguridad (Foto9).



**Foto 9. Sobre de papel con los foliolos y código del ejemplar. Ver posición del clip que ayuda a que no se salga y que se pueda así abrir y cerrar las veces que sea necesario. O cinta invisible que se despega fácilmente.**

Durante la campaña de recogida se incluyen los sobres en un recipiente bien tapado, que contenga abundante gel de sílice (Fotos 10-11).

### **Secado y almacenamiento de las hojas**

El proceso de secado es muy importante para un adecuado almacenaje. Las muestras (hojas) deben estar siempre bien secas. Las hojas de *Phoenix* son hojas coriáceas y secas, pero durante la primera fase del proceso es importante que se introduzcan bien los sobres en gel de sílice desde el momento de recogerse.

Los sobres con las muestras se introducen en una bolsa con cierre o en alguna caja con tapa y abundante gel de sílice. Generalmente al día siguiente el gel de sílice ha absorbido la humedad y cambia de color, tornándose a verde oscuro. Es en ese momento cuando hay que cambiarlo y renovarlo con gel nuevo.

Este proceso de renovación del gel de sílice lo hacemos en cajas de plástico y durará 3 o 4 semanas aproximadamente hasta que el gel ya no cambie de color. En el interior de

las cajas se pueden almacenar varias decenas de sobres con los ejemplares. En esos momentos las muestras están listas para proceder a la extracción de ADN y se pueden almacenar por meses (Fotos 10-11).



Foto 10. Sobres de muestras cerradas en cajas de plástico con gel de sílice (bolitas naranjas en el interior de la caja).



Foto 11. Detalle de los sobres de muestras en las cajas de almacenamiento

Las cajas se almacenan en un lugar seco. Deben estar herméticamente cerradas. Pueden durar mucho tiempo (años)(Foto 12).



**Foto 12. Almacenamiento de las muestras en cajas. Es importante renovar el gel de sílice cada seis meses o desde que se observe que ha virado el gel.**

**IMPORTANTE:** Durante el almacenamiento de las muestras hay que revisar las condiciones del gel de sílice y renovarlo cada cierto tiempo. El gel no se desecha, se puede reutilizar varias veces. Para ello se sitúa en bandejas y se introduce en una estufa a 135°C durante 5 horas (Foto 13). Nosotros lo ponemos en bandejas de aluminio dentro de la estufa y una vez que se reactiva el gel (cambia de color), apagamos la estufa y lo dejamos que se enfríe en el interior de la estufa. Cuando se haya enfriado lo guardamos en un recipiente cerrado herméticamente lejos de la luz.



**Foto 13. Gel en la estufa para la reactivación**

## Extracción de ADN de Phoenix

La extracción del ADN de las muestras de *Phoenix* se establece a partir de, aproximadamente 50 mg de hojas anteriormente deshidratadas. Las hojas (la muestra) se limpian bien, se cortan en pequeños trocitos para facilitar su pulverización y se colocan en tubos para proceder a pesar (Foto 14).



**Foto 14. Muestras de hojas de Phoenix en tubos de plástico para establecer su peso**

Se introduce a continuación la muestra en un tubo de plástico de 2 ml junto con dos bolitas de acero que está preparadas para machacar las mismas.

Se colocan los tubos en los receptáculos del homogeneizador automático (Mixer Mill MM 300 Retsch). Sellar bien y colocar en el aparato de forma opuesta, siempre balanceados, asegurándose que encajan bien y se aprietan las ruedas sin llegar a forzarlas (Foto 15).

Homogeneizar los tubos utilizando los adaptadores homologados para placas (TissueLyserAdapter set), durante 3 min – 30 Hz), dos veces, cambiando la orientación de la placa).

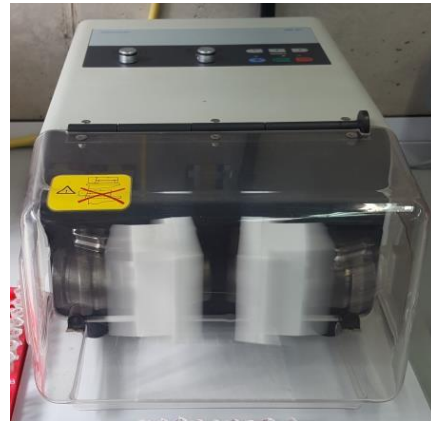


Foto 15. Muestras de los tubos con las hojas secas en el homogeneizador automático

Una vez se encuentren machacadas (aparece un polvillo de color verdoso) se añaden 700  $\mu$ l del **Tampón-1 de extracción** (0.1M Tris-HCL pH 8; 50 mM EDTA; 0.5 M NaCl; 1% SDS; 2% PVP), y se agita fuertemente con ayuda de un agitador de tubo, vórtex (Foto 16).



Foto 16. Agitador de tubo Vortex

Se añade a continuación 300 ul de **SDS** al 10%.

Se enciende el bloque térmico para que alcance la temperatura deseada de 65°C y se dejan los tubos en el dicho bloque durante 20 minutos (Fotos 17 y 18).



Foto 17. Muestras en bloque térmico a 65°C

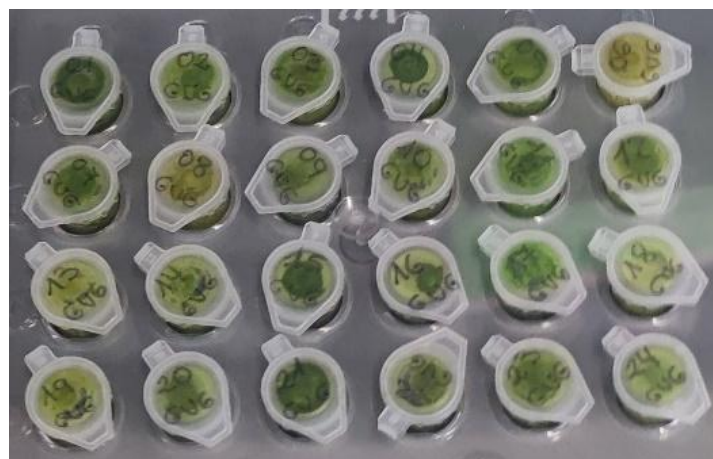


Foto 18. Detalle de las muestras una vez machacadas e incluidas en tampón y SDS con los códigos correspondientes

A continuación, se añaden 300 ul de Acetato potásico 5 M y se agita brevemente.

Se introducen los tubos con las muestras en una cama de hielo durante 20 minutos y luego se centrifugan a 13.000 rpm durante 30 minutos (Foto 19).



**Foto 19. Centrifuga eppendorf con las muestras (13.000 r.p.m.)**

Posteriormente se recoge con una pipeta la fase superior que es la que contiene el ADN y se pasa a un tubo limpio que contiene 500 ul de isopropanol frío almacenado a -20°C.

Se mezcla por inversión y se almacena toda la noche en un congelador a -20°C.

Al día siguiente se centrifuga de nuevo a 13.000 rpm durante 15 minutos.

Se descarta cuidadosamente el sobrenadante volcando el líquido y se deja secar el sedimento invirtiendo el tubo sobre papel secante durante aprox. 10 minutos (Foto 20).



Foto 20. Secado del sedimento de las muestras en papel de filtro

El sedimento se resuspende con Tampón-2 (50mM Tris-HCL pH 8,0; 10mM EDTA) y se vuelve a centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.

Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se añaden 75 ul de Acetato Sódico 3M y 500 ul de Isopropanol frío (-20°C). Se mezcla por inversión.

Se vuelve a centrifugar 13.000 rpm durante 30 minutos.

Se vuelve a descartar cuidadosamente el sobrenadante y se lava el sedimento con una o dos gotas de etanolal 80% (5 minutos).

Se elimina el etanol por inversión sobre papel secante y se deja secar el sedimento incubando en estufa a 36°C.

Finalmente, se resuspende el ADN en 100 ul de tampónTE (100mM Tris; 1mm EDTA) y se almacena a -20°C.

### **Análisis con marcadores SSR y genotipado**

Para el genotipado de las muestras se seleccionó una batería de 18 SSR de tipo microsatélite localizados en el genoma nuclear (Tabla 1) y 1 SSR de tipo minisatélite localizado en el genoma del cloroplasto, que usados de manera combinada poseen un

alto poder de resolución para abordar cuestiones sobre la hibridación entre especímenes de *Phoenix*.

Las muestras fueron amplificadas en la empresa ADNid (Montpellier, Francia), donde tienen estandarizada la amplificación de este conjunto de marcadores moleculares para el género *Phoenix*, de manera que se pudiera abordar el análisis dentro de los plazos de ejecución del presente estudio.

Además, nos permitirá desarrollar una base de datos conjunta y homologada entre ambos laboratorios. Del total, el 4% de las muestras fueron sometidas a un segundo análisis para confirmar irregularidades observadas durante la lectura de los picos, y evitar así errores de genotipado.

Una vez amplificado el ADN con los 19 SSR (18 nucleares y 1 cloroplástico), se procede a la lectura de tamaños de los fragmentos amplificados (en adelante tratados como 'alelos') para constituir el genotipado de cada muestra, mediante el uso del programa GeneMapper v3.7 (*AppliedBiosystem*).

Tabla 1. Descripción de los 18 microsatélites nucleares polimórficos (en adelante nSSR) utilizados en el presente estudio para el análisis genético de muestras de *P. canariensis* y *P. dactylifera*. Cebadores 5'→3': secuencia de los cebadores complementarios a la región flanqueante a los SSR estudiados. F: Cebador "Forward" o delantero. R: Cebador "Reverse" o trasero. Motivo: secuencia que se repite en tándem un número variable de veces; Rango: rango de tamaños en número de pares de bases (pb) que muestran los fragmentos amplificados a partir de cada nSSR.

Nombre	Código	Referencia	Cebadores 5'→3'	Motivo	Rango (pb)
mPdCIR10	Pd10	B	F: ACCCGGACGTGAGGTG R:CGTCGATCTCCTCCTTTGTCTC	(GA) <sub>22</sub>	118–161
mPdCIR15	Pd15	B	F: AGCTGGCTCCTCCCTTCTTA R: GCTCGGTTGGACTTGTCT	(GA) <sub>15</sub>	120–156
mPdCIR16	Pd16	B	F: AGCGGGAATGAAAAGGTAT R: ATGAAAACGTGCCAAATGTC	(GA) <sub>14</sub>	130–138
mPdCIR25	Pd25	B	F: GCACGAGAAGGCTTATAGT R: CCCCTCATTAGGATTCTAC	(GA) <sub>22</sub>	199–231
mPdCIR32	Pd32	B	F: CAAATCTTTGCCGTGAG R:GGTGTGGAGTAATCATGTAGTAG	(GA) <sub>19</sub>	284–305
mPdCIR35	Pd35	B	F: ACAAACGGCGATGGGATTAC R: CCGCAGCTCACCTCTTCTAT	(GA) <sub>15</sub>	175–221
mPdCIR57	Pd57	B	F: AAGCAGCAGCCCTTCCGTAG R:GTTCTCACTCGCCAAAAAATAC	(GA) <sub>20</sub>	251–278
mPdCIR63	Pd63	B	F: CTTTTATGTGGTCTGAGAGA R: TCTCTGATCTTGGTTCTGT	(GA) <sub>17</sub>	121–156
mPdCIR78	Pd78	B	F: TGGATTTCCATTGTGAG R: CCCGAAGAGACGCTATT	(GA) <sub>13</sub>	117–152

mPdCIR85	Pd85	B	F: GAGAGAGGGTGGTGTATT R: TTCATCCAGAACCACAGTA	(GA) <sub>29</sub>	152–183
mPdIRD13	P13	A	F: GCGGAGACAGGAGATGGTAA R: CTTGACTGCTTCTGCTGCTG	(CAC) <sub>6</sub>	198–227
mPdIRD31	P31	A	F: GCAGGTGGACTGCAAAATCT R: CTATTGGGGTGCTGATCCAT	(CCA) <sub>7</sub>	343–372
mPdIRD33	P33	A	F: GGAGCATACAGTGGGTTTGC R: CAGCCTGGGAATGAGGATAG	(CAG) <sub>7</sub>	189–213
mPdIRD40	P40	A	F: GAGAGATGCGTCAGGGAATC R: CCAGAATCTTCCAAGCAAGC	(CCAGTG) <sub>4</sub>	175–211
PdAG1ssr	AG1	L	F: TCTGATTTTCGTTTACTTCTTAGGA R: TTCATATTCAGTTGTCGGGTGTA	(GA)	260
PdAP3ssrF4	AP3	Z	F: GAGAAATAGAGAGCTGTGCAAG R: CTGCAGTACTCGGAGAACTTG	(GA) <sub>25</sub>	331
PdCUC3ssr1	CUC3-1	Z	F: CGTGGACTCATGACTCGCATGTCC R: GGTCTTGCCGGTGGCCTTC	(GT) <sub>14</sub>	330
PdCUC3ssr2	CUC3-2	Z	F: ACATTGCTCTTTTGCATGGGCT R: CGAGCAGGTGGGGTTCGGGT	(GA) <sub>22</sub>	350

**A:** Aberlenc-Bertossi y col. (2014). **B:** Billotte y col. (2004). **L:** Ludenña y col. (2011). **Z:** Zehdi-Azouzi y col. (2015).

## Referencias

- Aberlenc-Bertossi, F., Castillo, K., Tranchant-Dubreuil, C., Chérif, E., Ballardini, M., Abdoukader, S., Gros-Balthazard, M., Chabrillange, N., Santoni, S., Mercuri, A., & others. (2014). In silico mining of microsatellites in coding sequences of the date palm (*Arecaceae*) genome, characterization, and transferability. *Appl. Plant Sci.*, 2(1), 1300058. <https://doi.org/doi:10.3732/apps.1300058>
- Billotte, N., Marseillac, N., Brottier, P., Noyer, J. L., Jacquemoud-Collet, J. P., Moreau, C., Couvreur, T., Chevallier, M. H., Pintaud, J. C., & Risterucci, A. M. (2004). Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. *Molecular Ecology Notes*, 4(2), 256–258. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00634.x>
- Corniquel, B., & Mercier, L. (1994). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant Science*, 101(2), 163–172.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19–21.
- Ludena, B., Chabrillange, N., Aberlenc-Bertossi, F., Adam, H., Tregear, J. W., & Pintaud, J.-C. (2011). Phylogenetic utility of the nuclear genes AGAMOUS 1 and

PHYTOCHROME B in palms (*Arecaceae*): an example within *Bactridinae*. *Annals of Botany*, 108(8), 1433–1444.

Zehdi-Azouzi, S., Cherif, E., Moussouni, S., Gros-Balthazard, M., Naqvi, S. A., Ludeña, B., Castillo, K., Chabrillange, N., Bouguedoura, N., Bennaceur, M., Si-Dehbi, F., Abdoukader, S., Daher, A., Terral, J. F., Santoni, S., Ballardini, M., Mercuri, A., Salah, M. Ben, Kadri, K., ... Aberlenc-Bertossi, F. (2015). Genetic structure of the date palm (*Phoenix dactylifera*) in the Old World reveals a strong differentiation between eastern and western populations. *Annals of Botany*, 116(1), 101–112. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv068>

**Cofinanciado por la Unión Europea. No obstante, las opiniones y puntos de vista expresados son exclusivamente los del autor(es) y no reflejan necesariamente los de la Unión Europea o CINEA. Ni la Unión Europea ni CINEA pueden ser considerados responsables de los mismos.**

© Los autores



Co-funded by  
the European Union

