



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

---

---

EVALUACIÓN DE TRES METODOS DE EXTRACCIÓN DE  
ADN EN TÉPALOS DE *Tigridia pavonia* (L.f.) DC.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

**PRESENTA:**

MAGALI MAYA GARCÍA

(N° DE CUENTA: 1572698, 15ª GENERACIÓN)

**ASESOR:**

DR. JOSÉ LUIS PIÑA ESCUTIA

AGOSTO, 2024



CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, EL CERRILLO”  
PIEDRAS BLANCAS MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉXICO.

## ÍNDICE

	Página
<b>DEDICATORIAS.....</b>	2
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	3
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	6
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	7
<b>ABSTRAC.....</b>	8
<b>RESUMEN.....</b>	9
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	10
<b>II REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	12
2.1 Origen y distribución.....	12
2.2 Morfología.....	12
2.3 Importancia ornamental.....	12
2.4 Extracción y purificación.....	13
2.5 Cantidad de ADN y las relaciones de absorbancia 260/280 260/2230.....	13
2.6 Métodos para la extracción y purificación de ADN.....	14
2.7 Factores que afecta el proceso de extracción y purificación.....	15
2.8 Extracción de ADN utilizando pétalos en otras especies. ....	16
2.9 Electroforesis.....	17
2.9.1 Geles de agarosa.....	17
2.9.2 Geles de poliacrilamida.....	18
<b>III JUSTIFICACION.....</b>	19
<b>IV HIPOTESIS.....</b>	20
<b>V OBJETIVOS.....</b>	21

5.1	Objetivo general.....	21
5.2	Objetivos específicos.....	21
<b>VI</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
6.1	Ubicación de la investigación.....	22
6.2	Material biológico.....	23
6.3	Métodos utilizados.....	24
6.4	Evaluación de la cantidad y calidad de ADN.....	25
6.5	Evaluación de la integridad del ADN.....	25
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>27</b>
7.1	Rendimiento del ADN.....	31
7.2	Concentración e integridad del ADN obtenido.....	32
7.3	Determinación de Integridad de ADN en geles de agarosa.....	35
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>XX</b>	<b>CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1:</b> Métodos convencionales de extracción de ADN.....	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Resultados obtenidos para la concentración de ADN con el método de Zhou et al. (1999), a partir de tejido de tépalos de <i>T. pavonia</i> almacenado a -20 y -80°C .....	<b>28</b>
<b>Tabla 3.</b> Resultados obtenidos para la concentración de ADN con el método de Barba Gonzales (2005), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) a partir de tejido de tépalos de <i>T. pavonia</i> almacenado a -20 y -80 °C. ....	<b>29</b>
<b>Tabla 4.</b> Resultados obtenidos para la concentración de ADN con el método de Trizol SIGMA™, a partir de tejido de tépalos de <i>T. pavonia</i> almacenado a -20 y -80 °C. ....	<b>30</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Etapas de colecta de la flor en <i>Tigridia pavonia</i> var. Dulce. ....	<b>22</b>
<b>Figura 2:</b> División de material vegetativo. ....	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Comportamiento electroforético en gel agarosa al 1.0 % del ADN extraído en tépalos de <i>T. pavonia</i> con el método CTAB propuesto por Zhou et al. (1999). MM: marcador molecular (A) electroforesis a los ocho días posteriores de la extracción del ADN (B) electroforesis a los dos días posteriores de la extracción del ADN. ....	<b>36</b>
<b>Figura:4</b> Comportamiento electroforético en gel de agarosa al 1.0 % del ADN extraído en tépalos de <i>T. pavonia</i> con el método de Barba-González (2005), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)). MM: marcador molecular (A) electroforesis a los ocho días posteriores de la extracción del ADN (B) electroforesis a los dos días posteriores de la extracción del ADN. ....	<b>36</b>
<b>Figura 5.</b> Comportamiento electroforético en gel de agarosa al 1.0 % del ADN extraído en tépalos de <i>T. pavonia</i> . con el método Trizol SIGMA™ (A) Electroforesis a los dos días posteriores de la extracción del ADN. ....	<b>37</b>

## ASBTRACT

The extraction of DNA free of polysaccharides, polyphenols and proteins in plants is one of the essential steps for various studies in Molecular Biology, which require efficient methods that allow the isolation of DNA with good purity and integrity. The objective of this study was to compare three methods for the extraction and purification of DNA in *Tigridia Pavonia* tepals. The methods evaluated were: the method of Zhou et al. (1999), Barba-González (2005), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and Trizol (SIGMA<sup>MT</sup>). For this study, tepals of *T. Pavonia* previously differentiated as follows were used; (TIB) basal internal tepal, (TID) distal internal tepal, (TEB) basal external tepal and (TED) distal external tepal. The variables evaluated were the amount of DNA obtained, the ratio of absorbances A260/280 and A260/30, and DNA integrity in agarose gel electrophoresis. The results showed that at low temperatures the performance of DNA is favored, increasing the concentration and improving the absorbance ratio, while tissue stored for a long time causes degradation of the molecule. The best method for DNA extraction in *T. Pavonia* tepals was Trizol (SIGMA TM), with which DNA concentrations of up to 3355.4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  were obtained from tissue stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and 1196.6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , with tissue stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . It is believed that the collection time is related to the yield and quality of the DNA, so prolonged storage favors the degradation of the molecule.

## RESUMEN

La extracción de DNA libre de polisacáridos, polifenoles y proteínas en plantas es uno de los pasos esenciales para diversos estudios en Biología Molecular, que requieren de métodos eficientes que permitan el aislamiento de ADN con buena pureza e integridad. El objetivo de este estudio fue comparar tres métodos para la extracción y purificación de ADN en tépalos de *Tigridia pavonia*. Los métodos evaluados fueron: el método de Zhou *et al.* (1999), Barba-González (2005), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y Trizol (SIGMA<sup>MT</sup>). Para este estudio se utilizaron tépalos de *T. pavonia* previamente diferenciados de la siguiente forma; (TIB) tépalo interno basal, (TID) tépalo interno distal, (TEB) tépalo externo basal y (TED) tépalo externo distal. Las variables evaluadas fueron, cantidad de ADN obtenido, relación de absorbancias  $A_{260/280}$  y  $A_{260/30}$ , e integridad de ADN en electroforesis en gel de agarosa. Los resultados mostraron que con bajas temperaturas el rendimiento del ADN se ve favorecido, aumentando la concentración y mejorando la relación de absorbancias, mientras que el tejido almacenado por tiempo prolongado provoca una degradación de la molécula. El mejor método para la extracción de ADN en tépalos de *T. pavonia* fue el Trizol (SIGMA<sup>TM</sup>), con el cual se obtuvieron concentraciones de DNA de hasta  $3355.4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  a partir de tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y de  $1196.6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , con tejido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se cree que la hora de colecta está relacionado con el rendimiento y calidad del ADN, así como por el almacenamiento prolongado favorece la degradación de la molécula.

## I. INTRODUCCIÓN

La tribu Tigridieae está representada por 66 especies y 7 subespecies. De estas, 54 especies y 7 subespecies son endémicas. El género *Tigridia* es el más diverso con 43 especies y 6 subespecies (Guadalupe-Munguía *et al.*, 2015).

La riqueza de taxa se concentra en México en los estados de Oaxaca, México y Jalisco. Actualmente, sólo la especie *T. pavonia* se encuentra ampliamente distribuida en Europa, Asia y Australia, donde se comercializa como planta para jardinería. A pesar de esto, en México, ésta y las demás especies no son explotadas debido a la poca información sobre su abundancia y distribución. Por lo cual, los estudios sobre su variabilidad genética son necesarios para generar el conocimiento para su eficiente conservación, así como para su uso en programas de mejoramiento genético (Arroyo-Martínez 2014).

La agricultura moderna emplea con mayor frecuencia las nuevas técnicas moleculares, un ejemplo son los programas de mejoramiento mediante biotecnología. Para poder desarrollar y utilizar eficientemente las herramientas moleculares, es fundamental contar con protocolos de extracción de ADN, que produzcan aislamientos de buena calidad y con un alto rendimiento, lo cual ha sido un factor limitante en muchos análisis genéticos de las plantas (Healey *et. al.*, 2014; Pommer & Murakami, 2009).

Actualmente, hay disponibles numerosos métodos para el aislamiento de ADN genómico en plantas, entre los más utilizados están el aislamiento basado en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Abdel-Latif & Osman, 2017; Aboul-Maaty & Oraby, 2019; Arif *et al.*, 2010; Betancurt *et al.*, 2018). Métodos de aislamiento que utilizan



reactivos orgánicos que permiten eliminar los contaminantes (polisacáridos, proteínas y compuestos aromáticos) y precipitar el ADN (Xia *et al.*, 2019).

Las plantas tropicales, por ejemplo, suelen tener niveles elevados de polisacáridos, polifenoles, proteínas, lípidos, entre otros, que dificultan el aislamiento y la purificación del ADN (Barra *et al.*, 2012; Cavallari *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2014).

Además, la presencia de estos compuestos en el ADN aislado inhibe la actividad de varias enzimas utilizadas en experimentos de biología molecular, como el ADN, ligasas, polimerasas y endonucleasas, afectando su eficiencia, y en muchos casos, dando resultados negativos (Friar, 2005; Cavallari *et al.*, 2014; Swati *et al.*, 2016).

Para *Tigridia pavonia* no existe información sobre algún protocolo idóneo para la extracción de ADN en tépalos de la flor de esta especie. Considerando la senescencia acelerada de estos, así como la presencia de fenoles y/o antocianinas en los tejidos, la información generada puede ser útil para su uso en pruebas moleculares y estudios de análisis de expresión de genes, enfocados al mejoramiento de la especie.

Por lo que el objetivo de esta investigación es comparar tres métodos para la extracción de ADN en tépalos de *Tigridia pavonia*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Origen y distribución

*Tigridia pavonia*, es una especie nativa de México que se puede encontrar en forma silvestre, en bosque de encino, jardines de traspatio y al lado de terrenos de cultivo, y aún en proceso de domesticación, en toda la República Mexicana (Molseed, E 1970). México es considerado como el centro de mayor diversidad genética de esta especie, a nivel nacional se ubica en 18 estados, y en nuestra Entidad Federativa se localiza en 22 municipios (Vázquez-García *et al.*, 2010).

### 2.2 Morfología floral

Es una planta herbácea perenne, de 30 a 150 cm de alto, bulbo ovoide con escamas de color café oscuro; tallos robustos con numerosas hojas basales y de una a numerosas hojas caulinares más cortas que las de la base; brácteas florales de 6 a 12 cm; las flores pueden ser de color rosa, rojo, anaranjado, amarillo o blanco con manchas en el centro; tres tépalos externos más grandes que los tres internos; anteras lineares, erectas o curvadas; cápsulas maduras, cilíndricas y semillas piriformes (Vázquez *et al.*, 2011b).

### 2.3 Importancia ornamental

En México, el oceloxochitl o flor de tigre (*T. pavonia*) fue de gran importancia entre los guerreros aztecas debido a la belleza de sus flores, las cuales eran utilizadas en la elaboración de coronas y guirnalda honoríficas (Hernández 1995).

En los últimos años, el tamaño de su flor, su forma arquitectónica, así como la abundante variabilidad de colores, han hecho de las especies de *Tigridia* un atractivo recurso florícola con una importante demanda en el mercado como planta ornamental para jardines y macetería (Borys et al., 2000).

A pesar de lo efímero de su belleza, presenta características de gran valor florícola, como la belleza y el tamaño de su flor, la gran variabilidad de colores, la cantidad de flores y de racimos florales que puede generar por bulbo, así como su comportamiento colonizador (Arroyo Martínez *et al.*, 2020)

#### **2.4 Extracción y purificación de ADN**

La obtención de ADN purificado es un punto clave para el desarrollo de técnicas moleculares que permiten caracterizar una especie en estudio. De manera general, el aislamiento de ácidos nucleicos de alta calidad a partir del tejido de muchas plantas es notoriamente difícil (Hughes y Galau, 1988).

#### **2.5 Cantidad de ADN y las relaciones de absorbancia A260/280 y 260/230.**

Se ha reportado que el ADN tiene una absorbancia máxima en 260 nm, mientras que las proteínas, las cuales son las impurezas más comunes en preparaciones de ADN, tienen una absorbancia máxima de 280 nm; esta es la razón por la cual esas dos longitudes de onda son usadas para verificar la pureza del ADN. Si la relación está entre 1.7 y 2.0 entonces la preparación de ADN es considerada pura, una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas y una relación mayor indica presencia de ARN (Müller y Schweizer 1994; Weir *et al.*, 1996).

De manera similar, Sánchez- Barrantes *et al.* (2021) mencionan que en la relación A260/230 nm, el rango óptimo debe ubicarse entre los valores de 1.8-2.2.

## 2.6 Métodos para extracción y purificación de ADN

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 su bajo costo (Murray y Thompson, 1980; Doyle y Doyle, 1990; Porebski *et al.*, 1997; Hossain *et al.*, 2006; Sahu *et al.*, 2012). Aunque este método de extracción aún se utiliza rutinariamente en muchos laboratorios, el uso de solventes orgánicos como el cloroformo, puede generar un riesgo relativo para la salud humana y el ambiente, principalmente por las dificultades para su eliminación (Valter de Oliveira *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2010). Aún con esto, los métodos que utilizan este tipo de solventes orgánicos parecen tener una mejor eficacia ante cualquier muestra para la extracción de su ADN (Tabla 1) (Chomzynki, 1987).

**Tabla 1:** *Métodos convencionales de extracción de ADN*

<b>Método de extracción de ADN</b>	<b>Tiempo</b>
Método fenol-cloroformo	19 horas
Método de acetato de potasio	4 horas
Método acetato de potasio modificado	4 horas
Método CTAB	4 horas
Método de calentamiento	30 minutos

El método convencional de extracción de ADN con mayor tiempo de duración en su protocolo es el de fenol-cloroformo y el de menor tiempo de extracción es el método por calentamiento. Aunque el tiempo de extracción no está ligado a la eficiencia de los resultados en cuanto a cantidad de ADN extraído, el método fenol-cloroformo es el que más eficacia ha mostrado en estudios de origen vegetal y animal (Fraga *et al.*, 2014).

Dentro de los métodos de extracción de ADN antes mencionados, también se encuentran algunos kits comerciales, por ejemplo; Qiagen (2005), o Invitrogen (2005), con los cuales se puede disminuir el tiempo de extracción a unas cuantas horas porque reducen el número de pasos del procedimiento y, utilizados bajo las recomendaciones de cada proveedor, garantizan una extracción de alta pureza ya que tanto la recuperación del ADN como la eliminación de contaminantes son muy eficientes.

## **2.7 Factores que afectan el proceso de extracción de ADN.**

De acuerdo a Moreira y Oliveira (2011), la calidad del ADN está determinada principalmente por la condición fisiológica o morfológica del material vegetal, así como su etapa de desarrollo.

Aunado a lo anterior, se han reportado muchas dificultades para aislar ADN de buena calidad en plantas (Novaes *et al.*, 2009), las principales se atribuyen a los niveles variables en plantas de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios. Estos componentes suelen obstaculizar el proceso de purificación del ADN y su uso posterior en estudios moleculares (Aboul-Maaty & Oraby, 2019).

## 2.8 Extracciones de ADN usando pétalos de otras especies.

- Relación entre la abscisión de pétalos y muerte celular programada en *Prunus yedoensis* y *Delphinium belladonna*.

En pétalos de *P. yedoensis* no se observó degradación del ADN, ni condensación de cromatina, ni cambios en el volumen nuclear, antes de la abscisión. En cambio, en la abscisión de pétalos de *D. belladonna*, se encontró una degradación considerable del ADN, la cromatina se condensó y el volumen nuclear se redujo considerablemente (Yamada *et al.*, 2007)

- Evaluación y comparación de protocolos de extracción y amplificación del ADN en exsiccados de orquídeas conservadas en colecciones de herbario.

El protocolo con el que se obtuvo ADN de mejor calidad y mayor cantidad fue el propuesto por Quintanilla *et al.* (2010). Así mismo, se encontró una relación directamente proporcional entre la cantidad de tejido y la concentración ADN, logrando extraer, amplificar y secuenciar el ADN proveniente de exsiccados de orquídeas con más de 40 años de preservación.

- Análisis de expresión del gen *RhNUDX1* en pétalos de variedades de rosas de la finca “Royal Flower”.

Se logró extraer ADN de los pétalos de cinco variedades de rosa por el método CTAB, obteniendo un valor medio de pureza en el rango 260/280 de 1.87 y una concentración media de 501.6 µg/mL, ambos valores óptimos para poder trabajar con las muestras de ADN extraído (Guallasim y Alejandro 2020).

## **2.9 Electroforesis**

La electroforesis es un método que utiliza una corriente eléctrica controlada, con la finalidad de separar biomoléculas (proteínas, isoenzimas o ácidos nucleicos como ADN o ARN) de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica (Berkelman *et al.*, 1998).

De acuerdo con Robertis (2006), cuando una mezcla de moléculas ionizadas con carga neta, es colocada en un campo eléctrico, esta experimenta una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta.

Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de integridad.

### **2.9.1 Geles de agarosa**

Uno de los geles más utilizados son los geles de agarosa, los cuales están hechos a base de un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 °C y formar un gel semisólido al enfriarse (Robertis, 2006).

### **2.9.2 Geles de poliacrilamida**

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE. Para ello se prepara un gel en placa vertical (Cultek, 2006). Aunque este tipo de electroforesis también permite la separación de ácidos nucleicos, generalmente se utiliza para la separación de proteínas.



### III. JUSTIFICACIÓN

*Tigridia pavonia* (L.f) DC también conocida como "Oceloxochitl" o "Flor de tigre" es una planta ornamental nativa mexicana de gran variabilidad en el color y belleza de su flor (Piña-Escutia *et al.*, 2013; Arzate-Fernández *et al.*, 2015; Arroyo-Martínez *et al.*, 2017). Aunque la longevidad de su flor se limita a un día, la producción de flores continúa durante ocho semanas, siendo una excelente planta para exterior.

Este conocimiento es importante para la correcta utilización y conservación de la especie. Una de las estrategias son los estudios moleculares, con el ADN como material de partida. La viabilidad de estudios moleculares recae en gran medida en la habilidad del investigador para aislar el ADN en una buena calidad y cantidad con la mínima cantidad de tejido (Hua Yue & Orban, 2001), pues la fidelidad y reproducibilidad de la prueba dependen de la suficiente calidad y cantidad del ADN aislado de una mínima cantidad de tejido (Hales, 1996).

La evaluación de tres métodos de extracción de ADN utilizando la metodología CTAB de Zouh *et al.*, (1999), Barba-González (2005) y Trizol (SIGMA™) permitirá determinar el mejor protocolo para obtener ADN de calidad y pureza. Esta información puede servir de base para futuros estudios, como el análisis de expresión de genes candidatos o en el diseño de programas de mejoramiento genético de la especie.

#### **IV HIPOTESIS**

Al menos uno de los métodos evaluados producirá mayor cantidad de ADN de buena calidad.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Comparar tres métodos para la extracción de ADN en tépalos de *Tigridia pavonia*.

### 5.2 Objetivos específicos

- Comparar dos temperaturas de almacenamiento en la preservación de las muestras de *T. pavonia*.
- Evaluar el método denominado CTAB de (Zhou *et al*, 1999), Barba-González (2005), y Trizol SIGMA™ en el proceso de extracción de ADN a partir de tépalos de *Tigridia pavonia*.
- Determinar la concentración e integridad del ADN obtenido.

|

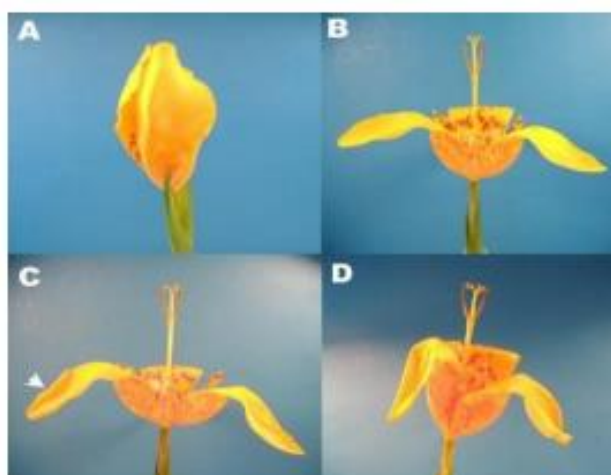
## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Ubicación de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, localizada en el Campus Universitario el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México

Se utilizaron tépalos de *Tigridia pavonia* var. *Dulce*, los cuales fueron colectados en los diferentes estadios del periodo de apertura y cierre de la flor (7 am, 12 pm, 3 pm y 7 pm) de plantas cultivadas en un invernadero tipo rustico, en la Facultad de Ciencias Agrícolas.

El material vegetativo fue cortado con tijeras previamente esterilizadas y se agregaron en bolsas de tetrapac para posteriormente ser llevadas al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, donde se almacenó en refrigeración para posteriormente realizar las extracciones.

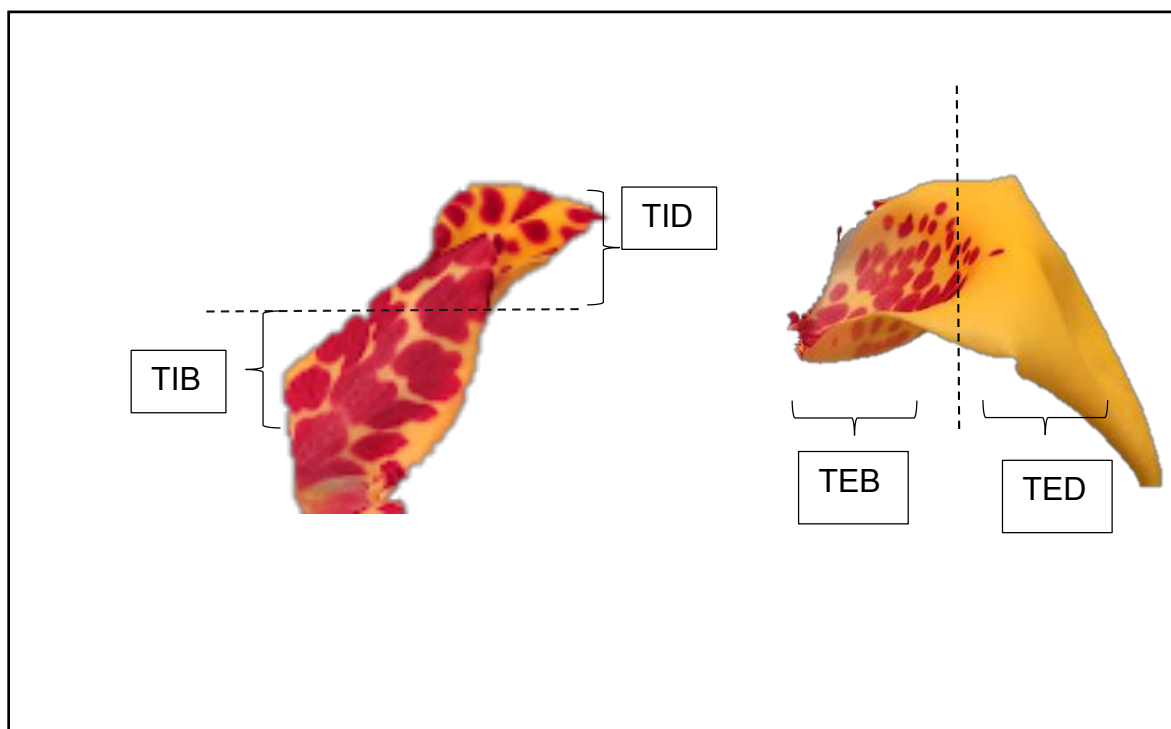


**Figura 1.** Etapas de desarrollo de la flor y senescencia en *Tigridia pavonia* var. *Dulce*. A. Inicio de apertura (etapa 1). B. Apertura completa (etapa II). C. Senescencia parcial (etapa III); la cabeza de la flecha indica el pliegue del tépalo externo como primera señal visible de senescencia. D. Flores completamente marchitas (etapa IV). Imagen tomada de Perea-López (2020).

## 6.2 Material biológico

Con la finalidad de conocer si existe alguna diferencia en los niveles de concentración de ADN, los tépalos fueron separados y diferenciados de la siguiente forma: (TIB) tépalo interno basal, (TID) tépalo interno distal, (TEB) tépalo externo basal y (TED) tépalo externo distal, como se muestra en la (Figura 2).

Una vez diferenciado el material, se procedió al macerado con nitrógeno líquido y se conservó a dos temperaturas (-20°C y -80 °C) para posteriormente realizar la extracción de ADN.



**Figura 2:** Diferenciación de los tépalos interno y externo para su análisis en la extracción de ADN. (TIB) tépalo interno basal, (TID) tépalo interno distal, (TEB) tépalo externo basal y (TED) tépalo externo distal.

### **6.3 Métodos utilizados**

El ADN genómico fue aislado a partir de 100 mg de tejido de los tépalos de la variedad ‘Dulce’, siguiendo dos protocolos previamente reportados, y uno comercial, con ligeras modificaciones:

- 1. CTAB reportado por Zhou *et al.*, (1999).**
- 2. CTAB reportado por Barba-González (2005).**
- 3. Trizol (SIGMA™)**

#### **Metodología Trizol (SIGMA™)**

1. Macerar 100 mg de tejido con nitrógeno líquido en un mortero pre-congelado.
2. Transferir el tejido macerado a un tubo eppendorf de 2.5 ml. Adicionar 1 ml de reactivo TRI Reagent® y se homogeneiza con un vortex, se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 0,2 ml de cloroformo por 1 ml de reactivo TRI utilizado. Agitar vigorosamente durante 1 min, dejar reposar durante 15 min a temperatura ambiente, y centrifugar a 15.000 rpm durante 17 min a 4 °C.
4. Retirar con cuidado la fase acuosa restante y desechar.
5. Para precipitar el ADN de la interface y la fase orgánica, agregar 0,3 ml de etanol al 97% por 1 ml de reactivo TRI Reagent®.
6. Mezclar por inversión y reposar durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente centrifugar a 5000 rpm durante 5 min a 4 °C.

7. Lavar el sedimento de ADN dos veces en citrato trisódico 0,1 ml. Durante cada lavado, dejar reposar el sedimento de ADN durante al menos 30 minutos. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min a 2-8 °C.
8. Resuspender el sedimento de ADN en etanol al 75% (1,5 por cada ml de reactivo TRI) y dejar reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 5000 rpm y desechar el sobrenadante.
9. Secar el sedimento de ADN durante 10 min al vacío y disolver en Hidróxido de sodio (NaOH) 500 ml con pipeteo lento repetido con una micropipeta. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min para eliminar cualquier material insoluble y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

#### **6.4 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN**

El ADN genómico producto de los protocolos fue cuantificado utilizando un Biofotómetro marca Eppendorf<sup>®</sup>; donde se mezclaron 4 µL de ADN en 196 µL de agua desionizada esterilizada (MilliQ) y se colocó la muestra en las celdas de lectura para biofotómetros. Se registró la concentración (ng/µL), la absorbancia a 260 y 280 y la relación 260/280 nm para cada una de las muestras.

#### **6.5 Evaluación de la integridad del ADN**

La separación de los fragmentos se realizó en cámaras de electroforesis horizontal (Easycast<sup>™</sup>), con geles de agarosa tipo II (Sigma<sup>®</sup>) al 1.0%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 a 2000 pb. A los geles se agregaron 3 µL de bromuro de

etidio (Sigma<sup>TM</sup>). Los pocillos fueron cargados con 3  $\mu$ l de ADN por tres 3  $\mu$ l de marcador de carga azul de bromofenol (BPB), como marcador de carga.

Las muestras se corrieron a 80 V y 120 mA durante 80 min, y la observación de los fragmentos se visualizó usando un transiluminador UV BioDoc-It System Imaging (UVP<sup>TM</sup>).



## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción del ADN de plantas que contienen grandes cantidades de polifenoles, taninos y polisacáridos ha sido siempre difícil de manejar en el pasado (Webb y Knapp, 1990; Varadarajan y Prakash *et al.*, 1991). Esta es una etapa fundamental en el proceso de amplificación del ADN mediante PCR, ya que la presencia de polifenoles, polisacáridos, proteínas, taninos, entre otros, son elementos que dañan del ADN, su precipitación y como consecuencia de ello comprometen posteriores análisis moleculares (Sánchez-Coello *et al.*, 2012; Puchooa *et al.*, 2004).

En el presente estudio, con la cuantificación por espectrofotometría se pudo evidenciar la cantidad de ADN de acuerdo a las relaciones de absorbancia obtenida. En las Tablas 2, 3 y 4 se muestran las temperaturas de almacenamiento, las concentraciones de ADN, las horas de recoleta de las muestras y las absorbancias obtenidas de la extracción de ADN obtenido a partir del tejido de tépalos de *T. pavonia*.

**Tabla 2.** Resultados obtenidos para la concentración de ADN con el método de Zhou et. al (1999), a partir de tejido de tépalos de *T. pavonia* almacenado a -20 y -80°C.

Temperatura de almacenamiento						
-20°C				-80°C		
Tejido	Concentración	Absorbancias		Concentración	Absorbancias	
	(ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	260/280	260/230	(ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	260/280	260/230
<b>7:00 a. m.</b>						
<b>TED</b>	113	1.73	0.011	-27.5	---	---
<b>TEB</b>	18	0.03	0.44	593.7	1.48	2.04
<b>TID</b>	---	---	---	232.	2.37	1.06
<b>TIB</b>	12.3	0.13	0.15	28.9	13.3	0.3
<b>12:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	42.4	1.96	1.23	14.5	1.06	0.1
<b>TEB</b>	48	0.072	0.23	25.4	0.3	0.03
<b>TID</b>	---	---	---	---	---	---
<b>TIB</b>	27.9	0.56	2.06	9.7	0.52	0.06
<b>3:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	20.1	12.9	0.04	9	7.1	0.83
<b>TEB</b>	72.4	2.28	0.07	340.7	1.49	2.38
<b>TID</b>	---	---	---	189.6	1.98	3.21
<b>TIB</b>	168.7	2.29	0.13	20	---	---
<b>7:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	108.7	4.85	0.8	126.1	1.48	2.8
<b>TEB</b>	35.4	1.28	1	180.6	2.56	1.01
<b>TID</b>	---	---	---	---	---	---
<b>TIB</b>	---	---	---	963.5	1.76	1.79.

(TIB) tépalo interno basal, (TID) tépalo interno distal, (TEB) tépalo externo basal y (TED) tépalo externo distal.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos para la concentración de ADN con el método de Barba-González (2005), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) a partir de tejido de tépalos de *T. pavonia* almacenado a -20 y -80°C.

Temperatura de almacenamiento						
-20°C				-80°C		
Tejido	Concentración	Absorbancias		Concentración	Absorbancias	
	(ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	260/280	260/230	(ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	260/280	260/230
<b>7:00 a. m.</b>						
<b>TED</b>	102.3	1.57	0.54	25.6	1.79	0.89
<b>TEB</b>	35.1	1.47	0.17	10	0	0.24
<b>TID</b>	---	---	---	---	---	---
<b>TIB</b>	15	0.86	0.13	19.9	3.97	0.55
<b>12:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	60.9	1.67	0.24	43.5	---	0.67
<b>TEB</b>	5.7	0.94	0.05	29.5	0	0.43
<b>TID</b>	---	---	---	---	---	---
<b>TIB</b>	9.7	0.52	0.06	27.9	3.14	0.25
<b>3:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	49.6	1.42	0.34	27	0	0.043
<b>TEB</b>	-4.4	0.55	0.04	---	---	---
<b>TID</b>	42.5	1.12	0.023	43.4	1.68	0.44
<b>TIB</b>	32.4	2.36	0.027	46.6	7.98	0.25
<b>7:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	52.6	1.18	0.26	43.9	3.28	0.71
<b>TEB</b>	22	1.93	0.022	29.1	7.98	0.25
<b>TID</b>	---	---	---	---	---	---
<b>TIB</b>	14.5	1.08	0.16	44.9	3.68	0.6

(TIB) tépalo interno basal, (TID) tépalo interno distal, (TEB) tépalo externo basal y (TED) tépalo externo distal.

**Tabla 4.** Resultados obtenidos para la concentración de ADN con el método de Trizol SIGMA™, a partir de tejido de tépalos de *T. pavonia* almacenado a -20 y -80°C.

Temperatura de almacenamiento						
-20°C				-80°C		
Tejido	Concentración	Absorbancias		Concentración	Absorbancias	
	(ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	260/280	260/230	(ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	260/280	260/230
<b>7:00 a. m.</b>						
<b>TED</b>	1425	1.61	2.04	2070	1.57	1.6
<b>TEB</b>	10.8	1.01	0.74	483	1.43	1.26
<b>TID</b>	3323	1.83	2.04	---	---	---
<b>TIB</b>	1467	1.71	1.88	204	1.66	1.13
<b>12:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	3355.4	1.76	2.28	1252.4	1.53	1.59
<b>TEB</b>	123.8	2.21	0.86	2399.2	1.73	1.66
<b>TID</b>	18.9	1.13	0.17	---	---	---
<b>TIB</b>	---	---	---	1196.6	1.56	1.46
<b>3:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	9.29	1.57	2.15	296.1	1.46	1.11
<b>TEB</b>	278.4	1.53	2.07	1045.7	1.47	1.36
<b>TID</b>	825	1.58	1.93	51.4	---	---
<b>TIB</b>	2417.2	1.71	2.21	189.5	1.62	1.11
<b>7:00 p. m.</b>						
<b>TED</b>	1693.7	1.56	1.93	3920.9	1.75	1.96
<b>TEB</b>	732.8	1.6	2.11	2166.8	1.59	2
<b>TID</b>	---	---	---	---	---	---
<b>TIB</b>	4.59	1.59	1.99	---	---	---

(TIB) tépalo interno basal, (TID) tépalo interno distal, (TEB) tépalo externo basal y (TED) tépalo externo distal.

## 7.1 Rendimiento de ADN

Los rendimientos del ADN extraído por los tres métodos utilizados se muestran en las tablas 2, 3 y 4 de manera general, los métodos descritos por Zhou *et al.* (1999), y Barba-González (2005), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) presentaron los rendimientos más bajos.

El primero método de Zhou *et al.* (1999), mostró un rendimiento promedio de ADN de  $60.7 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  a partir de tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mientras que cuando se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  el promedio fue de  $185.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Este mismo método utilizado por Martínez (2020) en agave, reportaron, que obtuvieron una concentración promedio de  $159.6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ADN por muestra.

Con el método de Barba-González (2005), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) utilizando tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  se tuvo un rendimiento de  $33.7 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , mientras, al utilizar tejido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , el rendimiento fue de  $32.61 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Arroyo Martínez (2020) utilizó esta misma metodología en tejido foliar de *T. pavona* donde logró obtener ADN genómico para la elaboración de preparaciones cromosómicas. ABYTEC (2017) menciona que al almacenar tejido a  $-20^{\circ}\text{C}$  se utiliza para almacenar muestras biológicas durante cortos periodos de tiempo, en aquellos casos donde no sea estable a temperaturas mayores la ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  es el método para almacenar muestras biológicas a largo plazo, ya que previene la degradación de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas.

En contraste, con el método Trizol (SIGMA <sup>TM</sup>) el ADN almacenado con ambas temperaturas se logró tener mayores concentraciones  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ , obteniendo rendimientos

de 1120.3 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  en tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y de 1273 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a partir del tejido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Marcos (2019) reportaron que utilizando este método de extracción con Tiocianato de Guanidina (TRIzol) provee mayores concentraciones medias de material genético ( $\mu=274,17\text{ng}/\mu\text{L}$ ).

Curiosamente con tejido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se logró obtener un dato con mayor cantidad de ADN en el cual se encontró en el TED el cual fue colectado a las 7:00 pm, con una concentración 3920.9 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y valores en la relación de absorbancias  $A_{260/280}$  (1.75) y  $A_{260/230}$  (1.96), los cuales se observó en tejido colectado en la etapa IV cuando la senescencia de la flor ya está muy avanzada. Garzon L. (2023) menciona que una temperatura baja, en torno a los  $-10^{\circ}\text{C}$ , proporciona una velocidad pequeña y en consecuencia una mayor duración del ADN y una mayor antigüedad para un mismo contenido actual de dicha sustancia. indica que la velocidad de descomposición del ADN es muy sensible a la temperatura disminuyendo conforme la temperatura decrece.

## **7.2 Concentración e integridad del ADN obtenido.**

El propósito de las técnicas de extracción de ADN es obtener altas concentraciones de la molécula, con el mínimo de degradación y con un grado de pureza tal que permita realizar pruebas de biología molecular (Rada y Taboada, 1998). La relación  $A_{260/280}$  es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación  $A_{260/280} > 1.6$ . Un valor  $A_{260/280} < 1.6$  indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio  $A_{260/280} > 2.1$  podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. A 230nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o

carbohidratos. En general, se considera que el ADN es puro cuando el ratio  $A_{260/230}$  se sitúa en torno 1.8-2.2. Un ratio menor de 1.8 se relaciona con presencia de contaminantes en la muestra (Universidad de Salamanca, 2020). Los resultados para las relaciones de  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  obtenidos en la presente investigación, se muestran en las tablas 2, 3 y 4.

Las relaciones  $A_{260/280}$  para el primer método (Tabla 2) utilizando tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mostraron sólo dos valores aparentemente normales de 1.73 y 1.93. Estos se presentaron en los tépalos externo distal (TED) colectado a las 7:00 am y 12 :00 pm, cuatro valores más presentaron un rango desde 2.28 a 12.9 y el resto descendió desde 0.52 y 1.67. Para este mismo método, pero con tejido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , también se obtuvieron dos valores dentro de los rangos óptimos, 1.76 para TIB colectado a las 7 pm y 1.98 para TID colectado a las 3 pm. Del mismo modo, cuatro valores más estuvieron en un rango de 2.37 a 13.3, mientras que el resto de estos descendieron 0.3 a 1.49. Resultados similares fueron reportados por Martínez (2020) quien, utilizando este mismo método en agave *A. salmiana* y *A. marmorata*, obtuvo relaciones de absorbancia entre 260 a 280 nm con variaciones de 1.4 a 2.0, y solo con dos muestras de valores arriba de 2.0.

En cuanto a la relación  $A_{260} / 230$ , para el caso de tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sólo se obtuvo un valor dentro del rango óptimo de 2.06, mientras que el resto descendió a 0.11 a 1.23. En contraste, para el tejido proveniente de  $-80^{\circ}\text{C}$  se logró obtener dos valores dentro del óptimo: 1.79 y 2.04, tres ascendieron desde 2.38 a 3.21, y el resto estuvo en un rango de 0.03 a 1.06.

Para el segundo método (Tabla 3), en las relaciones  $A_{260/280}$  con tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  se logró obtener valores de 1.93 para TEB colectado a las 7 pm, y de 2.36 para

TIB colectado a las 3 pm, mientras que el resto estuvo en el rango de 0.52 a 1.67. Con tejido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , el rango óptimo fue de 1.79 para TED colectado a las 7 pm, y el resto de las relaciones mostraron valores de 3.14 a 7.98. E. Martín *et al.* (2017) Al utilizar la metodología de CTAB al evaluar los resultados generales, indicaron que el protocolo de CTAB fue el que brindó mayores beneficios, ya que produce mejores valores de concentración y pureza.

Con el método tres se obtuvieron mejores absorbancias (Tabla 4). Así, con el tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  se obtuvieron cuatro datos óptimos desde 1.71 a 1.83 en la relación  $A_{260/280}$ , mientras que para el tejido de  $-80^{\circ}\text{C}$  solo se logró obtener dos datos dentro del rango óptimo (1.73 y 1.75) y el resto descendió desde 1.43G a 1.66.

Respecto al tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en la relación  $A_{260/230}$ , se encontraron 11 datos dentro de las absorbancias adecuadas (de 1.88 a 2.28), en contraste, para el caso de  $-80^{\circ}\text{C}$ , sólo dos datos se encontraron en lo óptimo: 1.96 en TED colectado a las 7:00 pm y 2.0 para TEB del mismo horario.

EL método Trizol SIGMA<sup>TM</sup> como se mencionó tubo modificaciones para su uso, Ye Yin Bo (200) utilizando este método y uno de su selección en tejido animal al comparar la pureza del ADN utilizando los dos métodos de aislamiento, se encontró que la densidad óptica de 260/280 y 260/230 nm para el ADN extraído utilizando el método de selección estaba dentro del rango ideal (1,878–1,903 y 1,860–3,400, respectivamente), Fa Yi Xue Za Zhi (2013) utilizaron este mismo método mencionan que el ADN extraído por este método modificado mostró un mejor resultado de calidad y cantidad que el del método tradicional TRIZOL.

Es importante señalar que los valores inferiores a 1.8 observados en la relación  $A_{260/280}$ , en los tres métodos evaluados (tablas 2, 3 y 4), pueden indicar contaminación



con proteínas, o fenoles. Estos datos concuerdan con lo descrito por Ranta R (1988) describio que, cuando se estudia la proporción A260/A280 para el ADN y esta se acerca a 1,8 nos indica que las muestras son puras.

Müller y Schweizer (1994) y Weir et al. (1996), reportaron que el ADN tiene una absorbancia máxima en 260 nm, mientras que las proteínas, las cuales son las impurezas más comunes en preparaciones de ADN, pueden también presentar una absorbancia máxima de 280 nm; esta es la razón por la cual esas dos longitudes de onda son usadas para verificar la pureza del ADN. Si la relación está entre 1.7 y 2.0 entonces la preparación de ADN es considerada pura, una relación menor indica contaminación de la muestra.

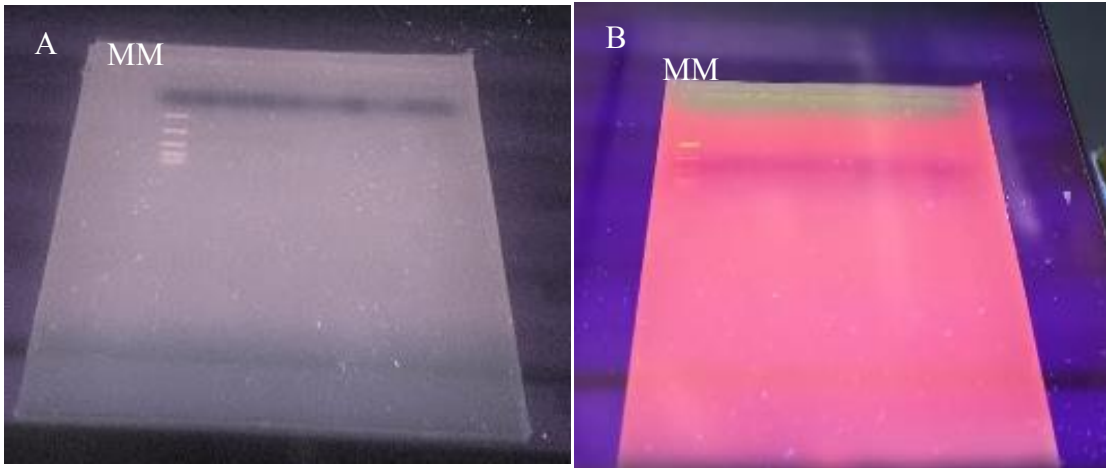
Además de esto, se debe resaltar que en los métodos uno y dos se utilizó RNasa mientras el método tres no lo contempla. Al respecto, Tamari *et al.* (2013) y Abdel-Latif y Osman (2017) indican que la inclusión del paso RNasaA en todos los métodos ayuda a disminuir la absorbancia de estos compuestos durante las lecturas espectrofotométricas, como pudo observarse en el presente estudio.

### **7.3 Determinación de Integridad de ADN en geles de agarosa.**

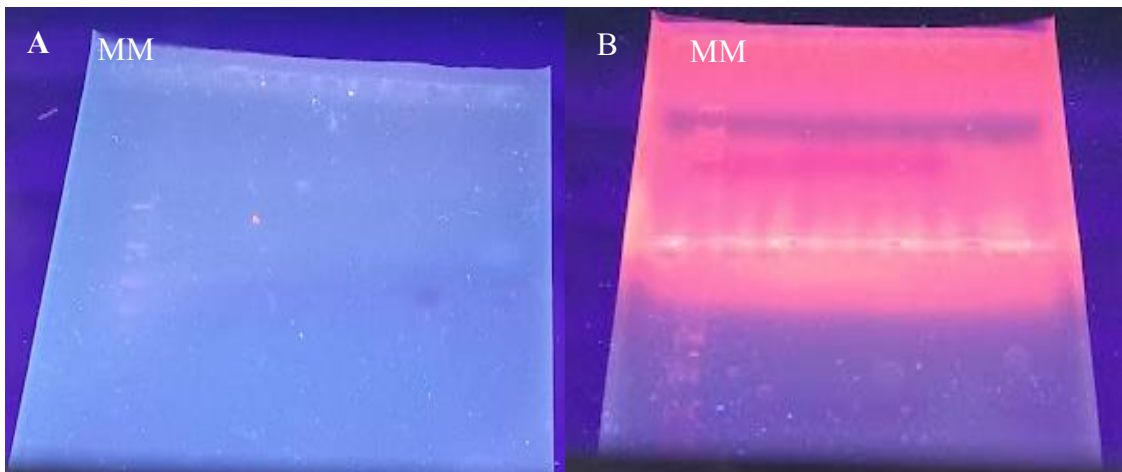
Para determinar la integridad del ADN obtenido por los métodos evaluados, se realizó la electroforesis en geles de agarosa tipo II (Sigma®) al 1.0 %.

En las figuras 3A, 4A y 5A se muestran los geles de electroforesis a partir de extracciones de ADN de tejido almacenado a -80°C. En ellas, no se logró distinguir alguna banda, observándose únicamente la banda del marcador de peso molecular (MM).

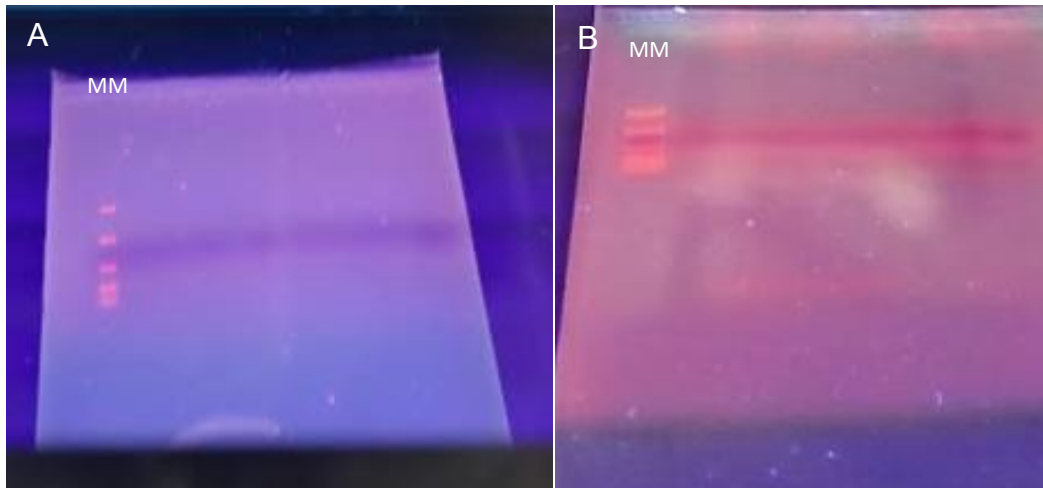
Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Westermeier (1997), quien menciona que, aunque los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida, su resolución es limitada por lo que las bandas formadas tienden a ser difusas y a expandirse, debido al tamaño de los poros.



**Figura 3. Comportamiento electroforético en gel agarosa al 1.0 % con el método CTAB propuesto por Zhou *et al.* (1999). MM: marcador molecular (A) electroforesis a los ocho días posteriores de la extracción del ADN (B) electroforesis a los dos días posteriores de la extracción del ADN.**



**Figura:4 Comportamiento electroforético en gel de agarosa al 1.0 % del ADN extraído en tépalos de *T. pavonia* utilizando el método Barba-González (2005), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), MM: marcador de peso molecular (A) electroforesis a los ocho días posteriores de la extracción del ADN (B) electroforesis a los dos días posteriores de la extracción del ADN.**



**Figura 5. Comportamiento electroforético en gel de agarosa al 1.0 % del ADN extraído en tépalos de *T. pavonia*. con el método Trizol (SIGMA™) (A) Electroforesis a los dos días posteriores de la extracción del ADN.**

En el presente estudio se logró aislar pequeñas cantidades de ADN con los tres métodos utilizados, no obstante, en cuanto a la cantidad, calidad e integridad del mismo, hubo variación dependiendo del método empleado. Se cree que uno de los factores que pudo afectar estos parámetros, fue la adición de RNAsa. En el método uno, la RNAsa se agregó en el proceso de precipitación y posteriormente fue desechada, mientras que, en el segundo protocolo, el ADN fue tratado con RNAsa en buffer TE para posteriormente ser almacenado a 4 °C, mientras tanto con el método de Trizol SIGMA™, en el cual se obtuvo gran cantidad de ADN, no se agregó RNAsa. Otro factor considerado en el contraste de los métodos de extracción fueron las relaciones de absorbancia de 260 /280 que se emplearon para evaluar la pureza de ADN con respecto a la contaminación con fenoles, proteínas, o aminoácidos, (Arif *et al.*, 2010). De esta forma, con los dos métodos CTAB se observaron absorbancias fuera de un rango óptimo, lo que denota baja pureza y, por consecuencia, baja calidad del ADN. Esto coincide con lo reportado por Sanchez- Barrantes et al. (2021) quienes

mencionan que en la relación  $A_{260/230}$ , el rango óptimo debe ubicarse entre los valores de 1.8-2.2. De acuerdo a esto, la extracción realizada en nuestra investigación con el método Trizol (SIGMA<sup>TM</sup>), fue la que más se acercó al rango óptimo (Tabla 4).

Dellaporta *et al.* (1983) mostraron que el uso de N<sub>2</sub> líquido puede mejorar los resultados de la extracción. En congruencia con esto, nuestros resultados mostraron que la maceración del tejido con N<sub>2</sub> líquido y el posterior almacenamiento a -20 y -80 °C, contribuyó a una mejor extracción y rendimiento de ADN obtenido.

De manera interesante se pudo notar que, al realizar una electroforesis en todas las muestras almacenadas a -4°C después de una semana, no fue posible observar el ADN. Esto sugiere que, para futuros estudios la extracción de ADN a partir de este tipo de tejido, deben llevarse a cabo con material recién colectado y realizar la extracción inmediatamente, evitando así la degradación del ADN y lograr resultados favorables. Resultados similares fueron reportados por Yamada *et al.* (2007) quienes reportaron una degradación sustancial de ADN en geles de agarosa, a partir de tejido colectado antes y durante la abscisión de pétalos de *D. belladonna* y *P. yedoensis*, respectivamente. Sin embargo, en el momento de la desecación total de los pétalos, la cantidad de ADN degradado en los geles fue menor que en el momento del marchitamiento visible de los pétalos.

Así, las variaciones entre el rendimiento, integridad y la electroforesis observada en el presente estudio, pueden ser explicadas por el tipo de tejido y las condiciones utilizadas, pues aun cuando se utilizó N<sub>2</sub>, la rápida senescencia de los tépalos pudo afectar el rendimiento del ADN obtenido.

## VII. CONCLUSIONES

El mejor método para la extracción de ADN en tépalos de *T. pavonia* fue el Trizol (SIGMA™), con el cual se obtuvieron concentraciones de DNA de hasta 3355.4 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  a partir de tejido almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y de 1196.6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , con tejido almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El tiempo de almacenamiento del ADN, por más de una semana a  $4^{\circ}\text{C}$  afecta su integridad al no observarse por medio de electroforesis, por lo que acelera la degradación de la molécula.

Las bajas temperaturas a  $-20^{\circ}\text{C}$  favorecen el rendimiento del ADN y su pureza, en función de la absorbancia obtenida.

La mayor cantidad de ADN se obtuvo a partir de tejido del tépalo exterior distal colectado a las 7:00 pm, y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , con una concentración de 3920.9 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y valores de 1.75 y 1.96 en las absorbancias  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ , respectivamente

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). *Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize*. Plant Methods, 13, Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>

Abyntek. (2017). *A qué temperatura almacenar muestras biológicas*. Abyntek an the service of research. <https://www.abynetek.com/almacenar-muestras-biologicas/>

Aboul-Maaty, N. A. F., & Oraby, H. A. S. (2019). *Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method*. Bulletin of the National Research Centre, 43, Article 25. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>.

Arif, I.A., Bakir,M.A., Khan,h.a.,Ahamed, A., FARHAN,A.H.A., HOMAIDAN,A.A.A.,Sadoon, M.a .,Bahkal u,A.H.,& Shobrak,M.A.(2010). *A simple methodfor DNA extraction from mature date palm leaves: impactof sand grinding and composition of lysis buffer*. International journal of molecular Sciences, 11(9),3149-3157. <http://doi.org/10.3390/ijms11093149>

Arroyo-Martínez H, Arzate-Fernández AM, Barba-González R and Piña-Escutia JL (2017) *Karyotype analysis and physical mapping of the 5S and 45S rDNA genes in Tigridia pavonia var. Dulce (Iridaceae)*. Caryologia 71 (1): 1-6.

Arroyo- Martínez. H. (2014). *Determinación Del Cariotipo En Tres Especies Silvestres De Tigridia Spp. Tesis de licenciatura*

Arroyo- Martínez. H. (2020). *Caracterización molecular de cromosomas B en Tigridia pavonia (L.f.). Tesis de doctorado pag.22.*

Barba-González, R., M. S. Ramanna, R. G. F. Visser, and J. M. Van Tuyl. 2005. *Intergenomic recombination in F1 lily hybrids (Lilium) and its significance for genetic variation in the BC1 progenies as revealed by GISH and FISH. Genome. 48: 884 – 894 pp. DOI: 10.1139/g05-057.*

Bo, Bo, YY, Liang, LD, Hua, YJ, Zhao, Z., Yao, MS, Shan, LB y Liang, CZ (2020). *Extracción de ADN de alta pureza de tejido animal mediante selección en el método basado en Trizo. BioTechniques , 70 (3), 186–190. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0142>*

Barra M, Salazar E, Beltrán M Sagredo B (2012). *Sencillo y robusto método de extracción para el análisis a gran escala de genotipos con alto contenido de polifenoles, como las razas locales de Solanum tuberosum yzea may. Ciencia e investigación agraria 39:593-601*

Berkelman, T., Willson, T. and S. T. (1998). *Electrophoresis using immobilized Ph Gradients. Principles & methods. Amersham Pharmacia Biotech.*

Borys, M. W.; Leszczyńska-Borys, H. y Galván, J. L. 2000. *Continuity of roots emergence and growth in Tigridia pavonia Ker. Gawl.* Revista Chapingo Serie Horticultura: 6(1): 57-61 pp.

Betancurt, M., Pérez, M. D., Nieto, R., Barrientos, A. F., García, M. D. R., & Corona, T. (2018). *Comparación de seis métodos de extracción de ADN en Tejocote (Crataegus mexicana Moc. & Sessé).* Revista Fitotecnia Mexicana, 41(1), 75-79. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.1.75-79>.

Cavallari MM, Siqueira MVBM, Val TM, Pavanelli JC, Monteiro M, Granado C, Pinheiro JB, Zucchi MI, Giménez MA (2014). *Un enfoque ácido modificado para la extracción de ADN de especies de plantas que contienen altos niveles de metabolitos secundarios.* Genética e Investigación Molecular 13:6497-6502.

Chomzynski, P (1987). *Single-Step Method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-Chloroform.* Extraction. Analytical Biochemistry, 162(1),156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>

Criollo Guallasim y Miguel Alejandro (2020). *Análisis de expresión del gen RhNUDX1 en pétalos de variedades de rosas de la finca “ royal Flower,* Tabacundo, Ecuador. ESPE., Universidad de las Fuerzas Armadas PG.49.

Cultek. (2006). *Electroforesis de proteínas: Protocolos y técnicas.* Obtenido de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-electroforesisprotocolos.pdf>.



De Robertis, E. M. (2006). Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(4), 296–302. <https://doi.org/10.1038/nrm1855>

De Robertis, J. (2006). *Biología Celular y Molecular*. In *Ciencias de la Salud, Naturales y Divulgación Científica* (15th ed., p. 486). El Ateneo.

E. Martín *et al.* (2017) *Comparación de métodos de extracción de ADN para el género Astylus*. *Acta zoológica lilloana* 61 (1): 55–64. <https://www.lillo.org.ar/revis/zoo/2017/v61n1/v61n1a06.pdf>

Fraga, N., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., & Fernández, A. (2014). *Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatómicos: su utilización es la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)*. *Scielo*. 53(3).

Friar EA (2005). Isolation of DNA from plants with large amounts of secondary metabolites in enzymology. *Methods in Enzymology*. 395:32-38.

GARZÓN L. (2023). *La degradación natural del ADN: el concepto de edad térmica*. <https://www.seaf.es/images/seaf/papers/vol23/final%20v%2023%2006%20065-076.pdf>.

Guadalupe Munguía-Lino, Aarón Rodríguez, Luis Miguel Vázquez-García, Georgina Vargas-Amado. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 2015, 86(1).

Hernández, F. (1995). *Historia Natural de la Nueva España*. Universidad Nacional Autónoma de México. Tomo II, Vol. I. 476pp.

Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., & Henry, R. J. (2014). *Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species*. *Plant Methods*, 10(1), 21-28. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>.

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.

Hua-Yue, G. & Orban, L. 2001. *Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction*. *Marine Biotechnology* 3: 199-204.

Huang QX, Wang XC, Kong H, Guo YL, Guo AP (2014). *Un eficiente Método de aislamiento de ADN para plantas tropicales*. *Revista africana de biotecnología* 12 (19): 2727-2732.

Huhs D.W. y Galau G. (1988). *Preparation of RNA from cotton leaves and pollen*. *Plant Molecular Biology Rep.* 6:253-257.

Marco Guevara Vega. (2019). *Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de garrapatas duras (Acari: Ixodidae)*. Obtenido de:

<https://repositorio.unisucre.edu.co/server/api/core/bitstreams/97de1319-79ab-4066-8f65-a7a3098e31a4/content>

Martínez I. (2020). *Respuesta Morfogénética y Variación Somaclonal En Dos Especies De Agave Regeneradas In Vitro*. Tesis.

Merck (2021). Protocolo TRI Reagent®.  
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-lysis-and-extraction/tri-reagent>.

Molseed E 1970. *The genus Tigridia (Iridaceae) of Mexico and Central America*. University of California. Publications in Botany. Berkeley. 54: 1-126.

Molseed E 1970. The genus *Tigridia* (Iridaceae) of Mexico and Central America. University of California. Publications in Botany. Berkeley. 54: 1-126.

Moreira P. A. and D. A. Oliveira (2011) *Leaf age affects the quality of DNA extracted from Dimorphandra mollis (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil*. *Genetics and Molecular Research* 10:353-358, doi:10.4238/vol10-1gmr1030.

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.L., Woodward, J.E., Burow, G., Wright,

R.J. (2010). *A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal ADN in an open laboratory environment. African Journal of Biotechnology.* 7(16) : 2818-2822.

Niu, C., Kebede, H., Auld, D.L., Woodward, J.E., Burow, G., Wright, R.J. 2010. *A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal ADN in an open laboratory environment. African Journal of Biotechnology.* 7(16) : 2818-2822 .

Novaes, R., Rodrigues, J., & Lovato, M. (2009). *An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. Genetics And Molecular Research,* 8(1), 86-96. <https://doi.org/10.4238/vol8-1gmr542>.

Puchooa, D. “A simple, (2004). *Rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (Litchi chinensis Sonn.)*”. *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, no. 4, pp. 253-255, ISSN 1684-5315, DOI 10.4314/ajb.v3i4.14954.

Pommer, C. V., & Murakami, K. R. (2009). Breeding guava (*Psidium guajava*). In S. M. Jain, & P. M. Priyadarshan (Eds.), *Breeding plantation tree crops* (pp. 83-120). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7\\_314](https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7_314)±19pp.

Sanchez- Barrantes *et. al.* (2021). *Aislamiento de ADN de alta calidad en Psidium guajava L. para estudios genómicos.* Pag. 644.

Sunnucks, P. & Hales, D. P. 1996. *Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus Sitobion (Hemiptera: aphididae)*. *Molecular Biology and Evolution* 13: 510-524.

Perea López, Emeli V. (2020). *Caracterización del Proceso de Senescencia de la Flor de Tigridia pavonia* (L.f.).DC.<http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110199>.

Piña-Escutia JL, Vázquez-García LM and Arzate-Fernández AM (2013) *Interspecific hybridization between Tigridia pavonia and T. augusta through ovary slice culture*. *Genetics and Molecular Research* 12 (1): 15-22.

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.

*Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca) (2020)..*  
extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>.

Ranta R. Treatment of unilateral posterior crossbite: comparison of the quad-helix and removable plate. *ASDC journal of dentistry for children*. 1988 MarApr;55(2):1024. PubMed PMID: 3280631.

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.

Sanchez-Coello, N.; Luna-Rodriguez, M.; Vazquez-Torres, M.;Rafael Sanchez-Velasquez, L.; Santana-Buzzy, N.;Octavio-Aguilar, P. y Georgina Iglesias-Andreu, L. “*Optimization of a protocol for dna isolation and issrpcramplification system for ceratozamia mexicanabrongn (Zamiaceae)*”. *Revista Chapingo Serie CienciasForestales y del Ambiente*, vol. 18, no. 1, 2012, pp. 127–137,ISSN 2007-3828.

Swati R, Geeta JD, Annapurna AN, Arunkumar N, Karaba N (2016). *Estandarización del método de extracción de ADN de hojas secas maduras y condiciones ISSR-PCR parameliá dubiaCav. Especie arbórea polivalente de rápido crecimiento*. *Revista estadounidense de ciencias de las plantas* 7 (3): 437-445.

Tamari F, Hinkley CS, Ramprashad N (2013). *Una comparación de ADN métodos de extracción utilizando tejidos híbridos de Petunia*. *Revista de Técnicas Biomoleculares* 24(3):113-118.

Tetsuya Yamada ,et al., 2007). *Relación entre la abscisión de pétalos y muerte celular programada en Prunus yedoensis y Delphinium belladonna*. *universidad de agricultura y tecnología de tokió, japon*. Pag 123.

Valter de Oliveira, L.F., Wallau, G.L., Silva Loreto, E.L. 2009. *Isolation of high quality ADN: a protocol combining “rennet” and glass milk*. Electronic Journal of Biotechnology. 12: 11–12.

Varadarajan, G.S. and Prakash, C.S. (1991). *A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species*. Plant Mol. Biol. Rept. 9(1):6-12. Pp.

Vázquez-García L.M., Przybyla A.A., De la Cruz T.E., Torres Navarro H., Rodriguez G. 2001b. *Morphological description of nine botanical varieties of Tigridia pavonia (L. F.) Ker. Gawl.* Journal of Applied Botany, 75:

Vázquez-García, L.M. 2011. *Tigridias ornamentales, su uso y distribución. México: Universidad Autónoma Chapingo*. 104pp.

Webb, D.M. and Knapp, S.J. (1990). *DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus*. Plant Mol. Biol. Rept. 8:180-185. Pp.

Westermeier, R. (1997). *Electroforesis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations* (2a. ed.), VCH Press Weinheim.

Xia, Y., Chen, F., Du, Y., Liu, C., Bu, G., Xin, Y., & Liu, B. (2019). *A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean*. Bioscience reports, 39(2), Article BSR20182271. <https://doi.org/10.1042/BSR20182271>.

Yang, Bh., Liu, Bs. y Chen, Zl. Extracción de ADN con reactivo TRIzol utilizando una columna de sílice. *ANAL. SCI.* **37**, 1033–1037 (2021).  
<https://doi.org/10.2116/analsci.20P361>

Zhou, Z., M. Miwa, and T. Hogetsu. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaemferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytol.* 144: 55–63

Zhou, Zhihua; MIWA, Makoto y HogetsuG, Taizo. Análisis de la estructura genética de una población de *Suillus grevillei* en un rodal de *Larix kaempferi* mediante el polimorfismo de repetición de secuencia intersimple (ISSR). *New Phytologist*, 1999.