

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

Informe de Conclusión de Servicio Social

**Evaluación de cinco métodos de extracción de DNA para tejido vegetal en el Laboratorio  
de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria**

**Prestador de Servicio Social:**

Barragán González Elena

Matrícula: 2173064261

**Asesor Interno:**

M.C. Montiel Salero David

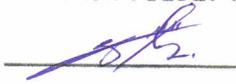
Número económico: 10847

Firma 

**Asesor Externo:**

M.C. Moya Hernández Sandra Lourdes

Cédula Profesional: 7819274

Firma 

**Lugar de realización:**

Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la  
Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). Carretera Federal México-Pachuca km  
37.5, Tecámac, 55740 México.

**Fecha de inicio y terminación:**

Del 02 de mayo del 2022 al 03 de noviembre del 2022.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>5</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
3.1 Objetivo general	6
3.2 Objetivos específicos	6
<b>IV. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
4.1 Generalidades del DNA	6
4.2 Extracción del DNA	6
4.3 Parámetros de la calidad del DNA	7
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
5.1 Sitio de estudio	9
5.2 Material vegetal	9
5.3 Protocolos para la extracción de DNA total	9
5.3.1 Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB 2%)	9
5.3.2 DNeasy Plant Mini Kit	10
5.3.3 GF-1 de Vivantis	10
5.3.4 Plant DNazol	11
5.3.5 Wizard® HMW DNA Extraction Kit	11
5.4 Variables a evaluar	12
5.4.1 PCR y qPCR	12
5.4.1.1 PCR punto final	12
5.4.1.2 PCR en tiempo real	13
5.5. Análisis estadísticos de datos	14
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>15</b>
6.1 Verificación de la calidad del DNA	15
6.1.1 Verificación de la cantidad y calidad del DNA mediante espectrofotometría	15
6.1.2 Verificación de la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa	20
6.1.3 Verificación de la integridad del DNA por amplificación por PCR	23
6.2 PCR tiempo real	24
6.2.1 PCR tiempo real para la detección de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	24
6.2.2 PCR tiempo real para la detección de <i>Acidovorax citrulli</i>	25
<b>VII. CONCLUSIÓN</b>	<b>26</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>27</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de la integridad del DNA	8
<b>Figura 2.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de tejido foliar de limón con método CTAB 2 %.	20
<b>Figura 3.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de tejido foliar de limón con el Kit comercial DNeasy plant mini kit.	20
<b>Figura 4.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de tejido foliar de limón con el kit comercial Vivantis GF-1.	20
<b>Figura 5.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de tejido foliar de limón con el kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit.	20
<b>Figura 6.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón con método CTAB 2 %.	21
<b>Figura 7.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón con el Kit comercial DNeasy plant mini kit.	21
<b>Figura 8.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón con el kit comercial Vivantis GF-1.	21
<b>Figura 9.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón con el kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit.	21
<b>Figura 10.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de frijol con método CTAB 2 %.	21
<b>Figura 11.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de frijol con el Kit comercial DNeasy plant mini kit.	21
<b>Figura 12.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de frijol con el kit comercial Vivantis GF-1.	21
<b>Figura 13.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de frijol con el kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit.	21
<b>Figura 14.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de pseudotallo y tallo de plátano con método CTAB 2 %.	22
<b>Figura 15.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de pseudotallo y tallo de plátano con el Kit comercial DNeasy plant mini kit.	22
<b>Figura 16.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de pseudotallo y tallo de plátano con el kit comercial Vivantis GF-1.	22
<b>Figura 17.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de pseudotallo y tallo de plátano con el kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit.	22
<b>Figura 18.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa con método CTAB 2 %.	23

<b>Figura 19.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa con el Kit comercial DNeasy plant mini kit.	<b>23</b>
<b>Figura 20.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa con el kit comercial Vivantis GF-1.	<b>23</b>
<b>Figura 21.</b> Integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa con el kit comercial Plant DNAzol®.	<b>23</b>
<b>Figura 22.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de frijol obtenidas con método CTAB 2 %.	<b>23</b>
<b>Figura 23.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de frijol obtenidas con el Kit comercial DNeasy plant mini kit.	<b>23</b>
<b>Figura 24.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de frijol obtenidas con el Kit comercial Vivantis GF-1.	<b>23</b>
<b>Figura 25.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de frijol obtenidas con el Kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit.	<b>23</b>
<b>Figura 26.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de plátano obtenidas con método CTAB 2 %.	<b>24</b>
<b>Figura 27.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de plátano obtenidas con el Kit comercial DNeasy plant mini kit.	<b>24</b>
<b>Figura 28.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de plátano obtenidas con el Kit comercial Vivantis GF-1.	<b>24</b>
<b>Figura 29.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de plátano obtenidas con el Kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit.	<b>24</b>
<b>Figura 30.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de papa obtenidas con método CTAB 2 %.	<b>24</b>
<b>Figura 31.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de papa obtenidas con el Kit comercial DNeasy plant mini kit.	<b>24</b>
<b>Figura 32.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de papa obtenidas con el Kit comercial Vivantis GF-1.	<b>24</b>
<b>Figura 33.</b> Amplificación de la región 16S de muestras de papa obtenidas con el Kit comercial Plant DNAzol®.	<b>24</b>
<b>Figura 34.</b> Curva de cuantificación para la detección de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .	<b>25</b>
<b>Figura 35.</b> Curva de cuantificación para la detección de <i>Acidovorax citrulli</i> .	<b>25</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Preparación de la mezcla de reacción para gen 16S.	<b>12</b>
<b>Cuadro 2.</b> Programa del termociclador para los iniciadores 16s1 y 16s2.	<b>12</b>
<b>Cuadro 3.</b> Preparación de la mezcla de reacción para la <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> .	<b>13</b>
<b>Cuadro 4.</b> Programa del termociclador para los iniciadores J-pth3 y Iniciador J-pth4.	<b>13</b>
<b>Cuadro 5.</b> Preparación de la mezcla de reacción para <i>Acidovorax citrulli</i> .	<b>14</b>
<b>Cuadro 6.</b> Programa del termociclador para los iniciadores 2549 y 2550	<b>14</b>
<b>Cuadro 7.</b> Valores promedio para la concentración y pureza obtenidos con los protocolos de extracción de DNA.	<b>15</b>
<b>Cuadro 8.</b> Prueba Tukey para la concentración y pureza obtenidos con los protocolos de extracción de DNA.	<b>18</b>

## I. INTRODUCCIÓN

La identificación de signos y síntomas permite un acercamiento al diagnóstico oportuno de enfermedades asociadas a microorganismos en plantas. En los últimos años las técnicas moleculares han favorecido la detección de fitopatógenos en plantas se identifique en menor tiempo. Para ello se requiere que los protocolos de extracción de DNA sean los adecuados (Pérez, 2011).

El objetivo del presente proyecto fue comparar cinco métodos de extracción de DNA: CTAB 2%, DNeasy Plant Mini Kit, GF-1 de Vivantis, Plant DNazol y Wizard® HMW DNA Extraction Kit, en matrices de tejido vegetal; estolones de papa (*Solanum tuberosum*), pseudotallo y corno de plátano enano gigante (*Musa paradisiaca* var. cavendish), semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), semillas de melón (*Cucumis melo*) y limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con ocho repeticiones para cada protocolo. Se evaluó la cantidad, calidad, e integridad de cada método de extracción. Con el fin de determinar el protocolo de extracción idóneo que permita obtener DNA de alta cantidad, calidad e integridad de acuerdo con el tejido vegetal que se desee procesar.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

A lo largo de los años se han registrado innumerables pérdidas en la agricultura a causa de microorganismos asociados a enfermedades, algunos cultivos presentan sintomatología en un periodo tardío, otros más son asintomáticos. Por lo cual, es de vital importancia un diagnóstico certero y oportuno. La extracción de DNA permite, a través de las técnicas moleculares, estudiar el genoma, su heredabilidad y la identificación de enfermedades en las plantas, entre otros aspectos. Al finalizar el proceso de extracción de DNA a partir de tejidos vegetales se espera contar con suficiente cantidad y pureza ya que de ello depende el éxito en las técnicas moleculares posteriores; PCR, qPCR, secuenciación, genotipaje, Southern blot, etc. En la actualidad, para extraer DNA de cualquier matriz existen métodos tradicionales y más recientemente kits comerciales que pueden ser utilizados, no obstante, no se cuenta con registros estandarizados conforme al tipo de material vegetal a utilizar.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Determinar el protocolo de extracción que permita obtener DNA de alta calidad, cantidad e integridad de acuerdo con el tejido vegetal que se desee procesar.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analizar la cantidad y pureza del DNA mediante espectrofotometría.
- Evaluar la integridad del DNA a través de electroforesis en gel de agarosa.
- Evaluar la calidad del DNA extraído por medio de su amplificación con el gen endógeno 16S y control interno.

### IV. ANTECEDENTES

#### 4.1 Generalidades del DNA

Los organismos vivos se encuentran constituidos y diferenciados por el DNA o Ácido Desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés deoxyribonucleic acid), esta molécula se encuentra formada por nucleótidos dispuestos en dos hebras o cadenas antiparalelas una en sentido 5'-3' y la otra 3'-5' unidas entre sí en forma de doble hélice, cada nucleótido está compuesto por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). Los nucleótidos se unen entre el grupo fosfato y el azúcar a través de enlaces fosfodiéster, mientras que la unión de las dos hebras se debe a puentes de hidrógeno (Beas *et al.*, 2009; Iwasa y Marshall, 2014).

#### 4.2 Extracción del DNA

El proceso de extracción de ácidos nucleicos consiste en aislar y purificar moléculas de DNA o RNA, existen diversos protocolos para su ejecución que se basan en tres principales principios: lisis celular, purificación y precipitación del DNA. La primera etapa tiene como objetivo liberar los ácidos nucleicos, para romper la pared y membrana celular se utilizan métodos físicos a través de la disrupción mecánica de los tejidos a bajas temperaturas utilizando nitrógeno líquido mortero y pistilo. También, se usan agentes químicos como: detergentes iónicos; Dodecil-sulfato de sodio (SDS) y/o, Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB), quelantes iones; Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y enzimas, por ejemplo, proteinasa

K. Estos favorecen el rompimiento de la bicapa de fosfolípidos de la membrana y la envoltura nuclear. Además, durante esta etapa se someten las muestras a periodos de incubación a altas temperaturas con el propósito de facilitar el proceso de lisis (Howe, 2007; Salazar *et al.*, 2013).

En la etapa de purificación lo que se espera es eliminar proteínas, utilizando solventes orgánicos (fenol, cloroformo), al momento de someter las matrices a centrifugación se forman dos fases: acuosa donde se localizan los ácidos nucleicos y la fase orgánica donde están restos de los solventes utilizados, entre estas dos se forma una interfase en la que se quedan proteínas. Respecto a la precipitación del DNA, consiste en lavados de las matrices empleando alcoholes (etanol al 75 %) a fin de remover sales, igualmente se centrifugan las veces que indique el protocolo, finalmente el DNA se concentra formando un pellet el cual se deja secar para posteriormente resuspender en agua libre de nucleasas (Camarena, 2008).

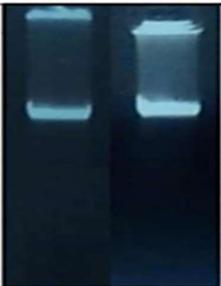
#### **4.3 Parámetros de la calidad del DNA**

Se considera que el DNA extraído es apropiado para su uso cuando este cumple con tres características: 1) Concentración, 2) Pureza y 3) Integridad. Primeramente, se puede determinar la concentración de forma cuantitativa a través de un espectrofotómetro, teniendo como principio que los ácidos nucleicos absorben las radiaciones electromagnéticas a una longitud de onda de 260 nm, de manera que la cantidad de luz que es absorbida por la muestra será proporcional a su concentración (O'Neill *et al.*, 2011).

Simultáneamente este aparato también permite evaluar la pureza del DNA para ello se utilizan las relaciones de absorbancia  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ . La primera es indicadora de que la muestra podría estar contaminada por proteínas; los valores óptimos son aquellos que estén entre 1.8-2.1, un valor  $<1.6$  señala una probable contaminación por compuestos aromáticos (fenoles y proteínas) y valores  $>2.1$  indican posible presencia de RNA. Mientras que la relación  $A_{260/230}$  es el indicador para la contaminación por sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, lo ideal es que los valores se encuentren entre 2.0-2.2, por lo tanto, cifras  $<1.8$  significa contaminantes en la extracción (Banco Nacional de ADN, 2020).

La integridad se logra evaluar por electroforesis en gel de agarosa, consiste en una matriz porosa (gel) a la cual se le aplica un campo eléctrico, generando la separación de biomoléculas en relación con su tamaño y carga eléctrica, el DNA posee carga negativa por ello migra del polo negativo al positivo, posteriormente los fragmentos de ácidos nucleicos presentes en gel se observan en un fotodocumentador (Iwasa y Marshall, 2014).

La electroforesis se considera una técnica cualitativa debido a que se basa en la presencia o ausencia de bandas, así como a las características visuales de las bandas. Seeker *et al.* (2016) propusieron una clasificación de la integridad del DNA, constituida por cinco clases, la 1 pertenece a la integridad ideal, banda bien definida en la parte superior del gel y sin estela. Clase 2 será aquella que presente una banda limpia, pero presentan estelas. Clase 3 las bandas se distinguen muy poco de las estelas. Clase 4 las bandas no se logran percibir y en la clase 5 se caracteriza porque el DNA migra a lo largo del gel (**Figura 1**).

Gel image:					
Gel score:	1	2	3	4	5
Description:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Clear DNA band</li> <li>2. All DNA bands on the same level</li> <li>3. no smear</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Clear DNA band</li> <li>2. All DNA bands on the same level</li> <li>3. Smear visible but clearly distinct from DNA band</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. DNA band is not clearly distinct from smear</li> <li>2. Majority of DNA on same level as DNA bands of samples with gel scores 1-2</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No DNA band visible</li> <li>2. All DNA further down the gel than DNA bands of samples with gel scores 1-2</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. DNA migrated very far along the gel</li> <li>2. No DNA band visible</li> </ol>

**Figura 1.** Clasificación de la integridad del DNA. Tomado de Seeker *et al.*, 2016.

Otra forma de verificar que el DNA extraído sea apto para su posterior uso es la prueba de PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), técnica de biología molecular en la cual se realiza una síntesis *in vitro* del DNA, tiene tres pasos que constituyen un ciclo: desnaturalización, alineamiento de primers y elongación de la cadena. Generalmente esto se repite durante 30 ciclos, al final del proceso se obtienen miles de copias de un fragmento de interés de DNA (Lozano *et al.*, 2005). Al realizar la PCR con un control interno o gen endógeno se consigue comprobar la calidad del DNA; el gen ribosomal 16S permite conocer si existen inhibidores para la PCR, además es ampliamente empleado para generar relaciones filogenéticas entre organismos procariontes. Mientras que, la PCR cuantitativa (Real-time Polymerase Chain Reaction, qPCR) amplifica y cuantifica a la vez, en tiempo real, esto a través de la cuantificación de la fluorescencia de una molécula reportera conocida como sonda (Rodicio y Mendoza, 2004; Gutiérrez-Ibáñez *et al.*, 2009).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Sitio de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, en el Área de Diagnóstico Fitosanitario dentro del Laboratorio de Bacteriología. Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, Tecámac, 55740 México.

### 5.2 Material vegetal

La extracción de DNA total se ejecutó a partir de cinco cultivos: hojas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con sintomatología asociada a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. También, se usaron 60 gramos de semillas de melón (*Cucumis melo*) inoculadas con *Acidovorax citrulli*. 16 gramos correspondiente a semillas de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas con *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. 25 gramos de pseudotallo y cormo de plátano enano gigante (*Musa paradisiaca* var. *cavendish*) y 70 gramos de estolones de papa (*Solanum tuberosum*). Asimismo, se trabajó con ocho repeticiones para cada tejido por protocolo. Previamente a iniciar los protocolos se pesó 0.2 gramos por muestra, esta fue macerada en un mortero estéril congelado -80 °C, hasta obtener consistencia de polvo, mismo que fue depositado en un tubo estéril de 2 mL.

### 5.3 Protocolos para la extracción de DNA total

#### 5.3.1 Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB 2%)

- 1) Transferir el tejido vegetal en un tubo estéril de 2 mL y agregar 1.5 mL de buffer CTAB 2% y 100 µL de Dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 10% homogenizar las muestras.
- 2) Incubar los tubos en baño maría a 80 °C durante 15 minutos.
- 3) Transcurrido el tiempo dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente de 3 a 5 y centrifugar a 13 000 g por 15 minutos.
- 4) Transferir el sobrenadante a otro tubo de 2 mL y agregar 500 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar por inversión para homogeneizar la muestra
- 5) Centrifugar a 13 000 g durante 15 minutos y transferir de 500 a 700 µL del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL.
- 6) Agregar ½ volumen de etanol: metanol: ácido acético glacial (9:3:1), mezclar por inversión y centrifugar a 13 000 g por 10 minutos.
- 7) Decantar el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla y lavarla con 500 µl de etanol: agua: metanol: acetato de sodio 3M (30:9:5:1). Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos.
- 8) Decantar el sobrenadante, sin perder la pastilla y

lavarla con 500  $\mu$ l de etanol al 70 %. Centrifugar a 13 000 g por 5 minutos. 9) Dejar secar la pastilla y resuspender en 70  $\mu$ L de agua grado biología molecular y almacenar el DNA a 4°C.

### **5.3.2 DNeasy Plant Mini Kit**

1) Transferir el tejido vegetal a un tubo de 2.0 mL y agregar 800  $\mu$ l de buffer AP1 y 4  $\mu$ l de RNase. Dar vortex hasta homogeneizar las muestras. 2) Incubar los tubos a 65°C por 10 minutos, mezclar por inversión dos o tres veces durante la incubación.

3) Agregar 260  $\mu$ l de buffer P3 e incubar los tubos 5 minutos a -20°C. 4) centrifugar el lisado a 14 000 rpm por 5 minutos. 5) recuperar 500  $\mu$ L del lisado, transferirlo a una columna QIAshredder y centrifugar a 14 000 por 3 minutos. 6) Retirar con cuidado la columna y transferir 400  $\mu$ l del lisado a un nuevo tubo de 2.0 mL (con precaución de no mezclar el pellet formado al fondo del tubo), agregar 1000  $\mu$ L de buffer AW1 y mezclar por pipeteo para homogeneizar la muestra. 7) Transferir 650  $\mu$ l de la mezcla a una columna DNeasy Mini spin, centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos, decantar el sobrenadante. Repetir este paso con la mezcla restante. 8) Colocar la columna en un nuevo tubo recolector de 2.0 mL, agregar 500  $\mu$ l de buffer AW2 y centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos. Desechar el líquido. 8) Agregar nuevamente 500  $\mu$ L de buffer AW2 y centrifugar a 14 000 rpm por 2 minutos. 9) Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL y agregar 70  $\mu$ L de buffer AE para elución del DNA. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. 10) Centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos y almacenar el DNA a 4°C.

### **5.3.3 GF-1 de Vivantis**

1) Transferir el tejido vegetal a un tubo de 2.0 mL, agregar 600  $\mu$ L de buffer PB y 20  $\mu$ L de proteinasa K, dar vortex hasta homogeneizar la muestra. 2) Incubar los tubos a 65°C durante una hora. 3) Centrifugar los tubos a 16 000 g por 5 minutos, transferir el sobrenadante a otro tubo de 2.0 mL. 4) Agregar 2 volúmenes de buffer PB y mezclar por inversión para homogeneizar las muestras. 5) Incubar los tubos a 65 °C por 10 minutos. 6) Agregar 200  $\mu$ L de etanol al 100% y mezclar por inversión. 7) Transferir 650  $\mu$ L de la mezcla a una columna ensamblada a un tubo colector. Centrifugar a 10 000 g por un minuto y desechar el sobrante. Repetir este paso con la mezcla restante. 8) Lavar la columna con 650  $\mu$ L de Wash buffer, centrifugar a 10 000 g por un minuto y desechar el sobrante. 9) Centrifugar la columna a 10 000 por un minuto a fin de remover todo el etanol. 10) Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL, agregar 70  $\mu$ L de elution buffer, incubar los tubos 2 minutos a temperatura ambiente. 11) Centrifugar a 10 000 g por 2 minutos y almacenar el DNA a 4°C.

### **5.3.4 Plant DNazol**

1) A partir del tejido macerado incorporar a un tubo de 2.0 mL y agregar 600 µL de Plant DNazol, dar vortex hasta homogeneizar la muestra e incubar las muestras con agitación a temperatura ambiente por 5 minutos. 2) Posteriormente agregar 300 µL de cloroformo, mezclar e incubar con agitación a temperatura ambiente por 5 minutos. 3) Centrifugar los tubos a 12 000 g por 10 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL. 4) Añadir 300 µL de etanol al 100%, mezclar por inversión de 6 a 8 veces e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. 5) Centrifugar los tubos a 12 000 g por 5 minutos y desechar el sobrenadante. 6) lavar la pastilla con 300 µL de etanol al 70%, centrifugar a 12 000 g por 5 min y desechar el sobrenadante. 7) Resuspender el DNA en 70 µL de agua grado biología molecular y almacenar el DNA a 4°C.

### **5.3.5 Wizard® HMW DNA Extraction Kit**

1) Transferir el tejido a un tubo de 2.0 mL y agregar 500 µL de HMW Lysis Buffer. Dar vortex hasta homogeneizar la muestra. 2) Incubar los tubos a 65 °C durante 15 minutos. 3) Transcurrido el tiempo dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Agregar 3 µL de ARNasa, mezclar por inversión. Incubar los tubos a 37 °C durante 15 minutos. 4) Agregar 20 µL de proteinasa K, mezclar por inversión hasta homogeneizar la muestra. Incubar a 56 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos. 5) Centrifugar los tubos a 16 000 g por 3 minutos. 6) Transferir el lisado a un tubo de 2.0 mL. 7) Agregar 200 µL de Protein Precipitation Solution. Mezclar por pipeteo e incubar 5 minutos a -20 °C. 8) Centrifugar los tubos a 16 000 g durante 10 minutos. 9) Transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL. Añadir 600 µL de isopropanol. Mezclar por inversión, incubar 1 minuto a temperatura ambiente y repetir la inversión. 10) Centrifugar los tubos a 16 000 g por 2 minutos. 11) Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con 600 µL de etanol al 70%. Repetir paso 10. 12) Desechar el sobrenadante y repetir paso 11. 13) Dejar secar la pastilla y resuspender en 70 µL de DNA Rehydration Solution de y almacenar el DNA a 4°C.

### **5.4 Variables a evaluar**

Se evaluó la cantidad, calidad e integridad del DNA extraído, para ello se llevó a cabo la cuantificación de la concentración del DNA de doble cadena (dsDNA, por sus siglas en inglés) misma que se realizó mediante el espectrofotómetro; NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ siguiendo las instrucciones del fabricante para determinar su absorbancia a 260 nm. La calidad

óptima del DNA se considerará adecuada con los valores de absorbancia  $A_{260/280} = 1.8-2.1$  y  $A_{260/230} = 2.0-2.2$ . Igualmente se verificó la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % considerando 7  $\mu\text{L}$  de DNA mezclado con 3  $\mu\text{L}$  de buffer de corrida (naranja G 6X) teñido con el colorante GelRed a 95 Voltios durante 1 hora 5 minutos y los resultados se visualizaron en el fotodocumentador.

#### 5.4.1 PCR y qPCR

Por otra parte, al DNA extraído de cada una de las muestras se realizaron diluciones hasta obtener concentraciones de 20 a 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$  a fin de realizar las pruebas de PCR y qPCR.

##### 5.4.1.1 PCR punto final

Para las muestras de frijol, plátano y papa se efectuó un ensayo de gen endógeno, amplificando el gen ribosomal 16S, con los iniciadores 16S1 (TGAGAATGGATAAGAGGCTC) y 16S2 (TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG) esperando una amplificación a 315 pb. Con la finalidad de corroborar que el DNA fuera idóneo para amplificar. En la mezcla de reacción se utilizaron los reactivos señalados en el **Cuadro 1** y las condiciones del termociclador se señalan en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 1.** Preparación de la mezcla de reacción para gen 16S.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer PCR	10X	1X	2.5
$\text{MgCl}_2$	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP	10 mM	0.16 mM	0.4
Iniciador S161	10 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{M}$	1
Iniciador S162	10 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{M}$	1
Taq DNA Pol	5 U/ $\mu\text{L}$	0.06 U/ $\mu\text{L}$	0.3
DNA	20 - 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$	4 - 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$	5
Agua grado biología molecular	-	-	14.05
		<b>Volumen final</b>	<b>25</b>

**Cuadro 2.** Programa del termociclador para los iniciadores 16s1 y 16s2.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	90 s	1
Desnaturalización	94 °C	40 s	35
Hibridación	55 °C	40 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	3 min	1

### 5.4.1.2 PCR en tiempo real

Se realizó PCR tiempo real para la detección de *X. citri* subsp. *citri*, los iniciadores y sonda recomendados son J-pth3 (ACCGTCCCCTACTTCAACTCAA) y J-pth4 (CGCACCTCGAACGATTGC) sonda J-Taqpht2 (FAM-ATGCGCCCAGCCCAACQC). Estos están diseñados a partir de secuencias del gen pth para detectar específicamente cepas de *X. citri* subsp. *citri* (IPPC, 2016). Para la mezcla de reacción se utilizaron los reactivos señalados en el **Cuadro 3**.

**Cuadro 3.** Preparación de la mezcla de reacción para la *X. citri* subsp. *citri*.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR	10X	1X	2.2
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	4 mM	1.76
dNTP	10 mM	0.3 mM	0.6
Iniciador J-pth3	10 μM	0.3 μM	0.6
Iniciador J-pth4	10 μM	0.3 μM	0.6
Sonda J-Taqpht2	10 μM	0.04 μM	0.1
Taq DNA Pol	5 U/μL	0.09 U/μL	0.4
DNA	20 - 50 ng/μL	3.64 - 9 ng/μL	4
Agua grado biología molecular	-	-	11.74
		<b>Volumen final</b>	<b>22</b>

Las condiciones del termociclador para los iniciadores J-pth1 y J-pth2 fueron las siguientes.

**Cuadro 4.** Programa del termociclador para los iniciadores J-pth3 y Iniciador J-pth4.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	15 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 s	40
Hibridación	60 °C	1 min	

Mientras que para la detección de *Acidovorax citrulli* a partir del DNA extraído de melón se verificó su amplificación con los iniciadores 2549 (GAGTCTACGAGGTTGTT) y 2550 (GACCCTACGAAAGCTAG) sonda 2551-P (FAM-TGCAQCCT/ZEN/TCA TTC ACG), bajo la mezcla de reacción mostrada en el **Cuadro 5** y las condiciones de amplificación fueron las que se señalan en el **Cuadro 6**.

**Cuadro 5.** Preparación de la mezcla de reacción para *Acidovorax citrulli*.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10X	1X	2.2
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	4 mM	1.76
dNTP	10 mM	0.3 mM	0.6
Iniciador 2549	10 µM	0.3 µM	0.6
Iniciador 2550	10 µM	0.3 µM	0.6
Sonda 2551	10 µM	0.04 µM	0.1
Taq DNA Pol	5 U/µL	0.09 U/µL	0.4
DNA	20 - 50 ng/µL	3.64 - 9 ng/µL	4
Agua grado biología molecular	-	-	11.74
		<b>Volumen final</b>	<b>22</b>

**Cuadro 6.** Programa del termociclador para los iniciadores 2549 y 2550.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 s	40
Hibridación	60 °C	45 S	

### 5.5. Análisis estadísticos de datos

Se hizo un análisis ANOVA de un solo factor con  $P < 0.05$ , independiente para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de extracción respecto a los criterios de: concentración de DNA, relaciones  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ . De la misma forma se ejecutó una comparación múltiple de medias con Tukey  $p < 0.05$  mediante el paquete estadístico OriginPro.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Verificación de la calidad del DNA

#### 6.1.1 Verificación de la cantidad y calidad del DNA mediante espectrofotometría

A continuación, se muestra la media y desviación estándar para las matrices trabajadas, así como los protocolos evaluados.

**Cuadro 7.** Valores promedio para la concentración y pureza obtenidos con los protocolos de extracción de DNA.

Cultivo	Protocolo de extracción	Concentración (ng/ $\mu$ L)		Pureza			
				A <sub>260/280</sub>		A <sub>260/230</sub>	
		$\mu$	<i>s</i>	$\mu$	<i>s</i>	$\mu$	<i>s</i>
Limón	CTAB 2 %	1038.26	504.31	1.71	0.17	1.48	0.24
	DNeasy Plant mini kit	33.53	4.94	1.77	0.09	1.18	0.17
	Vivantis GF-1	77.54	30.80	1.79	0.13	0.12	0.08
	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	303.68	76.29	1.44	0.02	0.69	0.04
Melón	CTAB 2 %	540.23	953.11	1.87	0.20	1.90	0.25
	DNeasy plant mini kit	9.70	15.96	1.34	4.95	-0.08	0.95
	Vivantis GF-1	96.09	30.63	2.18	0.19	0.17	0.07
	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	69.01	10.63	1.25	0.04	0.51	0.04

Cultivo	Protocolo de extracción	Concentración (ng/ $\mu$ L)		Pureza			
				A <sub>260/280</sub>		A <sub>260/230</sub>	
		$\mu$	s	$\mu$	s	$\mu$	s
Frijol	CTAB 2 %	40.21	20.27	1.42	0.03	1.44	0.18
	DNeasy plant mini kit	40.21	20.27	1.25	0.12	4.12	8.92
	Vivantis GF-1	49.63	17.87	7.59	2.66	1.07	0.89
	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	560.15	86.23	1.11	0.07	0.40	0.20
Plátano	CTAB 2 %	27.06	4.53	2.10	0.07	1.90	0.18
	DNeasy plant mini kit	18.80	28.44	1.63	0.11	1.71	0.82
	Vivantis GF-1	7.23	3.08	25.05	21.34	1.03	2.87
	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	51.21	26.57	3.64	4.87	0.56	0.27
Papa	CTAB 2 %	463.25	128.10	1.97	0.02	2.18	0.19
	DNeasy plant mini kit	17.56	18.89	2.01	0.12	2.12	0.33
	Vivantis GF-1	71.95	11.61	2.23	0.18	0.26	0.25
	Plant DNAzol®	449.90	104.73	1.64	0.11	0.34	0.22

Nota:  $\mu$ =media, s= desviación estándar.

Se pudo observar con base en los resultados del análisis de la varianza (ANOVA). Primeramente, los protocolos empleados en las muestras de limón se obtuvieron que la concentración CTAB 2 % es estadísticamente diferente, en la relación  $A_{260/280}$  Wizard® HMW DNA Extraction Kit, aunque la media es inferior a 1.6, lo cual indica que no se encuentra dentro de los valores aceptables. En la relación  $A_{260/230}$  todos son distintos, sin embargo, para efectos de pureza los kits Vivantis GF-1 y Wizard® HMW DNA Extraction Kit mantienen valores de absorbancia menores a 1.0 (**Cuadro 8**).

Por otra parte, para la concentración de DNA en semillas de melón ningún protocolo resultó distinto, en la relación  $A_{260/280}$  no mostró diferencias significativas, sin embargo, se puede distinguir que los valores de interés (1.80-2.0) se encuentran con el kit Vivantis GF-1 y, en cambio con DNeasy plant mini kit se obtuvieron valores menores a 1. En contraste CTAB 2% fue estadísticamente significativo para la relación  $A_{260/280}$  con niveles entre 1.5 y 2.0.

Con relación a las muestras de frijol, se obtuvo que hay significancia para las tres variables; Wizard® HMW DNA Extraction Kit registró mayor rendimiento en la concentración con valores mayores 450 ng/  $\mu$ L, para el resto de los métodos se obtuvieron datos menores a los 100 ng/  $\mu$ L. Vivantis GF-1 es significativo para la relación  $A_{260/280}$  y DNeasy plant mini kit en la relación  $A_{260/230}$ .

Asimismo, en el caso de plátano se tiene que CTAB 2 % y Wizard® HMW tienen similitudes de la misma manera DNeasy plant mini kit y Vivantis GF-1 muestran afinidad, pero con diferencia significativa a los otros dos protocolos. En tanto la relación  $A_{260/280}$  el kit Vivantis GF-1 es estadísticamente distinto respecto a los otros métodos.

En cuanto a la extracción del DNA a partir de tubérculos de papa se registró mayor recuperación de DNA en dos grupos; el primero CTAB 2 % y Plant DNAzol®, el segundo DNeasy plant mini kit y Vivantis GF-1, de manera que los primeros indican tener medias similares entre sí, pero distintas a los otros dos métodos. En la variable de  $A_{260/280}$  Vivantis GF-1 y Plant DNAzol® son significativamente diferentes al resto y entre sí, para la relación  $A_{260/280}$  estos dos últimos kits muestran similitudes entre sí, del mismo modo CTAB 2 % y DNeasy plant mini kit son similares entre sí, pero diferentes entre los otros dos métodos.

**Cuadro 8.** Prueba Tukey para la concentración y pureza obtenidos con los protocolos de extracción de DNA.

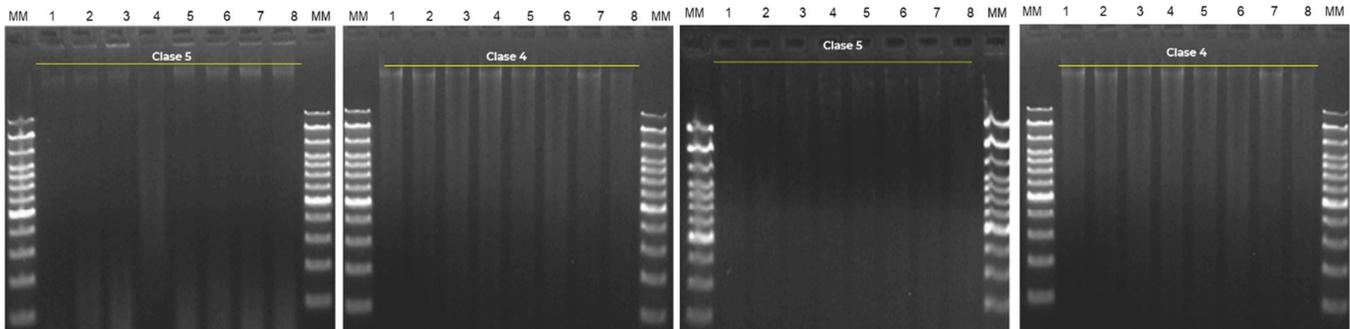
Cultivo	Protocolo de extracción	Concentración del DNA		Relación A <sub>260/280</sub>		Relación A <sub>260/230</sub>	
		Media	Grupos	Media	Grupos	Media	Grupos
Limón	CTAB 2 %	1038.26	A	1.71	A	1.48	A
	DNeasy plant mini kit	33.53	B	1.77	A	1.18	B
	Vivantis GF-1	77.54	B	1.79	A	0.12	D
	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	303.68	B	1.44	B	0.69	C
Melón	CTAB 2 %	540.23	A	1.87	A	1.90	A
	DNeasy plant mini kit	9.70	A	1.34	A	-0.08	B
	Vivantis GF-1	96.09	A	2.18	A	0.17	B
	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	69.01	A	1.25	A	0.51	B
Frijol	CTAB 2 %	40.21	B	1.42	B	1.44	A
	DNeasy plant mini kit	40.21	B	1.25	B	4.12	A
	Vivantis GF-1	49.63	B	7.59	A	1.07	A
	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	560.15	A	1.11	B	0.40	A

Cultivo	Protocolo de extracción	Concentración del DNA		Relación A <sub>260/280</sub>		Relación A <sub>260/230</sub>	
		Media	Grupos	Media	Grupos	Media	Grupos
Plátano	CTAB 2 %	27.06	A	2.10	B	1.90	A
	DNeasy plant mini kit	18.80	B	1.63	B	1.71	A
	Vivantis GF-1	7.23	B	25.05	A	1.03	A
	Wizard® HMW DNA Extraction Kit	51.21	A	3.64	B	0.56	A
Papa	CTAB 2 %	463.25	A	1.97	B	2.18	A
	DNeasy plant mini kit	17.56	B	2.01	B	2.12	A
	Vivantis GF-1	71.95	B	2.23	A	0.26	B
	Plant DNAzol®	449.90	A	1.64	C	0.34	B

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba Tukey= 0.05).

### 6.1.2 Verificación de la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa

En la verificación de la integridad del DNA con el gel de agarosa al 1.8% se obtuvo lo siguiente; en las muestras con tejido foliar de limón existieron similitudes cualitativas entre los métodos; CTAB 2% (**Figura 2**) y Vivantis GF-1 (**Figura 4**) siendo clase 5, en cuanto a DNeasy plant mini kit obtuvo la clase 4 (**Figura 3**) y Wizard® HMW DNA Extraction Kit (**Figura 5**) se observan bandas que migran al final del gel por lo tanto obtuvieron una clase 4.



**Figura 2.** Integridad del DNA obtenido a partir de tejido foliar de limón con método CTAB 2 %. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

**Figura 3:** Integridad del DNA obtenido a partir de tejido foliar de limón con el Kit comercial DNeasy plant mini kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

**Figura 4.** Integridad del DNA obtenido a partir de tejido foliar de limón con el kit comercial Vivantis GF-1. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

**Figura 5.** Integridad del DNA obtenido a partir de tejido foliar de limón con el kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

Existen factores que influyen directamente en la cantidad, calidad e integridad del DNA extraído, una de ellas es la matriz que se está trabajando; en tejidos foliares jóvenes se concentra mayor cantidad de DNA y el uso de métodos convencionales como CTAB 2 % resulta factible. No obstante, las relaciones  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  se ven afectadas, de acuerdo con el Banco Nacional de ADN (2020) para la primera relación valores entre 1.6 - 1.7 aún son aceptables, comprometiéndose su integridad cuando los valores son menores a 1.6. Con DNeasy plant mini kit se emplean columnas que disminuyen el riesgo de contaminantes y por consecuencia la integridad del DNA es homogéneo.

En cuanto a la integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón, con CTAB 2 % (**Figura 6**) tuvo bandas que migraron al final del gel, por ello adquiere una clase 4 al igual que DNeasy plant mini kit (**Figura 7**), con el kit Vivantis GF-1 no se logran observar bandas lo que corresponde a la clase 5 (**Figura 8**). Siendo Wizard® HMW DNA Extraction Kit el que obtuvo bandas limpias y visibles (**Figura 9**).

Los protocolos de extracción en semillas deben asegurar que la cantidad de almidones y polifenoles sea baja ya que durante el proceso suelen precipitarse y contaminar. El almidón es

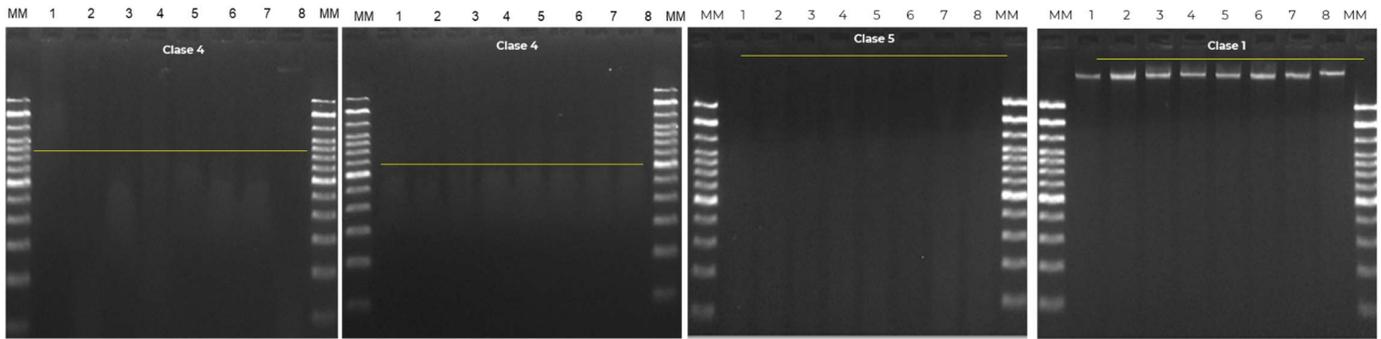


Figura 6. Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón con método CTAB 2 %. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

Figura 7. Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón con el Kit comercial DNeasy plant mini kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

Figura 8. Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón con el kit comercial Vivantis GF-1. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

Figura 9. Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de melón con el kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

considerado como la sustancia de mayor importancia debido a su función de reserva energética, en semillas de melón se concentra gran cantidad de este tipo de glúcidos (Meisel *et al.* 2005; Pérez, 2003). Wizard® HMW DNA Extraction Kit proporciona en promedio 69.01 ng/μL e integridad de clase 1 lo cual supone menos inhibidores para su posterior uso.

Por lo que refiere a las muestras de semillas de frijol la integridad tuvo mayor homogeneidad; tres métodos obtuvieron la clase 1; DNeasy plant mini kit (Figura 11), Vivantis GF-1 (Figura 12) y Wizard® HMW DNA Extraction Kit (Figura 13). No así con el método CTAB 2 % que fue de clase 4 (Figura 10).

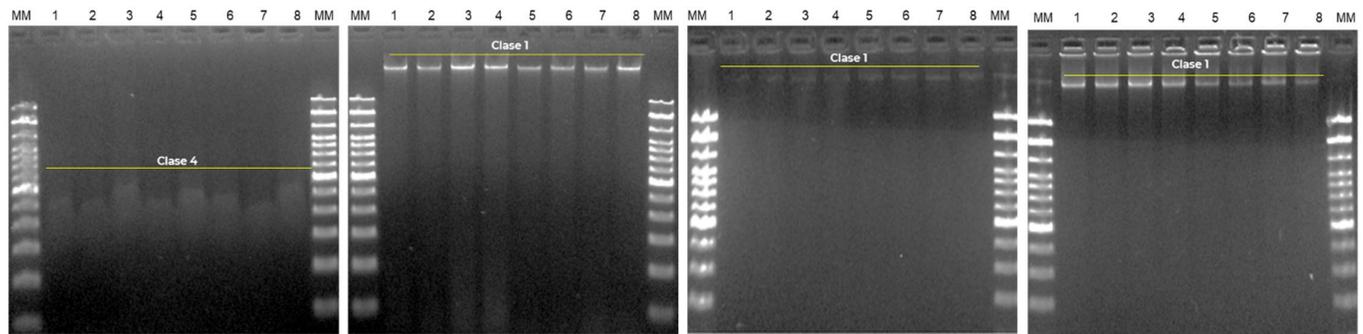


Figura 10. Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de frijol con método CTAB 2 %. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

Figura 11. Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de frijol con el Kit comercial DNeasy plant mini kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

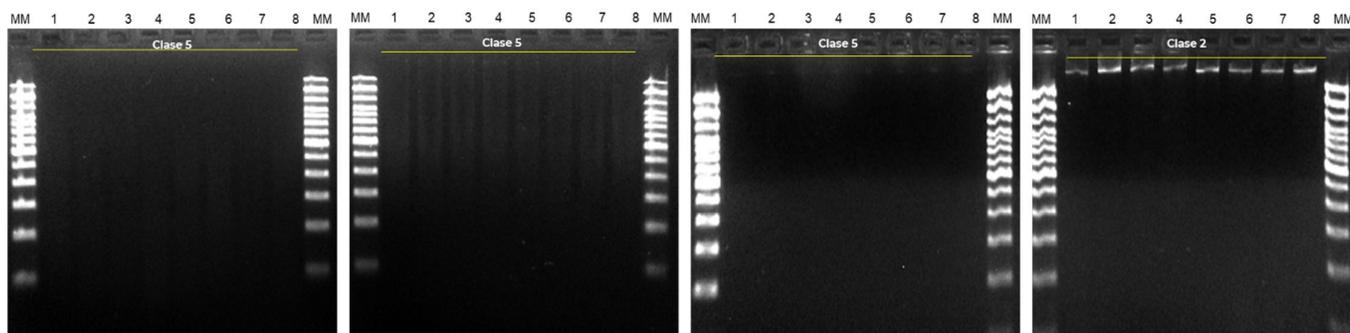
Figura 12. Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de frijol con el kit comercial Vivantis GF-1. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

Figura 13. Integridad del DNA obtenido a partir de semillas de frijol con el kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

Las semillas de frijol son consideradas altas en polisacáridos en su pared celular; su testa está compuesta por metabolitos secundarios, presenta hasta un 65% de polisacáridos celulósicos estructurales y llegan a concentrar un 1.9 % de lignina (Mex-Álvarez *et al.*, 2021; Serrano, 2004) lo cual influye directamente en la permeabilidad de la testa, comprometiendo la efectividad de los buffer de lisis, lo anterior puede contrarrestarse con aquellos protocolos que

proporcionen cantidades mayores a los 400  $\mu$ L de buffer y con al menos un periodo de incubación no menor a 10 minutos.

Los métodos para la extracción de DNA a partir de pseudotallo y corno de plátano muestran baja integridad, para CTAB 2 % (**Figura 14**), DNeasy plant mini kit (**Figura 15**) y Vivantis GF-1 (**Figura 16**). Nuevamente el kit Wizard® HMW DNA Extraction Kit mostró mejores bandas, aunque estas no se encuentran a la misma altura de manera que es una clase 2 (**Figura 17**).



**Figura 14.** Integridad del DNA obtenido a partir de pseudotallo y corno de plátano con método CTAB 2 %. 1) M1 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

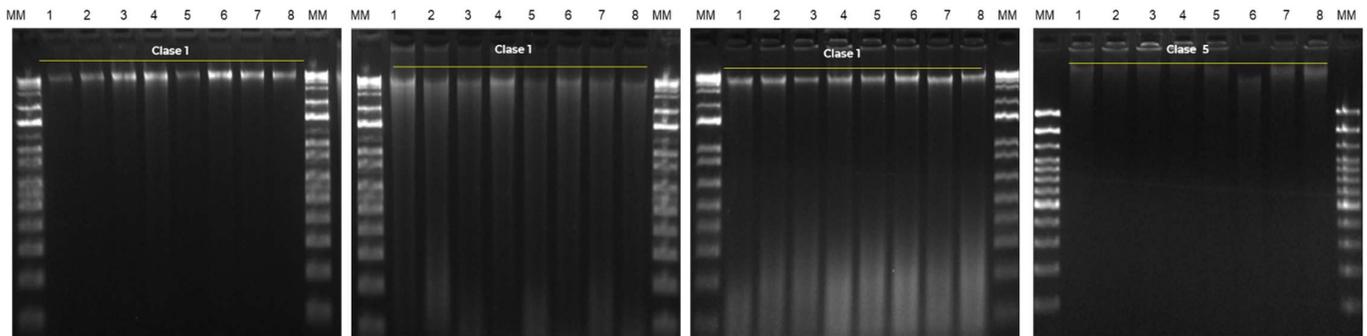
**Figura 15:** Integridad del DNA obtenido a partir de pseudotallo y corno de plátano con el Kit comercial DNeasy plant mini kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

**Figura 16.** Integridad del DNA obtenido a partir de pseudotallo y corno de plátano con el kit comercial Vivantis GF-1. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

**Figura 17.** Integridad del DNA obtenido a partir de pseudotallo y corno de plátano con el kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit. 1) M. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

Se ha reportado que el pseudotallo del plátano es considerado como un tejido alto en celulosa, hemicelulosa y almidón, lo cual dificulta el funcionamiento de agentes químicos (Carchi, 2014) y las probabilidades de que las muestras se contaminen con ARN son mayores, por ello lo ideal es la utilización de ARNasa; Wizard® HMW DNA Extraction Kit incluye este tipo de enzimas favoreciendo la integridad del DNA.

En la integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa se aprecian similitudes entre CTAB 2 % (**Figura 18**), DNeasy plant mini kit (**Figura 19**) y Vivantis GF-1 (**Figura 20**); bandas claramente visibles y sin estar borrosas o con estela, siendo características de la clase 1. Sólo con el kit Plant DNazol® no se observaron bandas (**Figura 21**).



**Figura 18.** Integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa con método CTAB 2 %. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

**Figura 19:** Integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa con el Kit comercial DNeasy plant mini kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

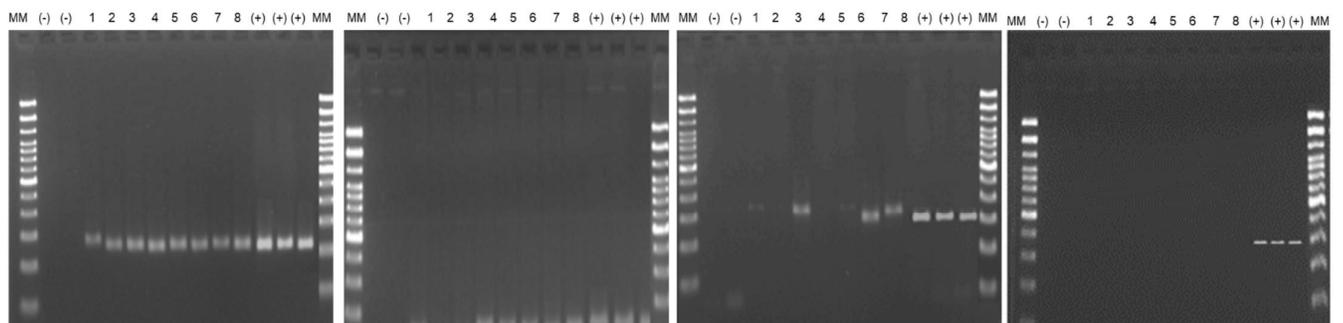
**Figura 20.** Integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa con el kit comercial Vivantis GF-1. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

**Figura 21.** Integridad del DNA obtenido a partir de tubérculos de papa con el kit comercial Plant DNAzol®. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular.

### 6.1.3 Verificación de la integridad del DNA por amplificación por PCR

A fin de corroborar la calidad e integridad del DNA extraído de las muestras de frijol, plátano y tubérculo de papa se procedió a realizar la prueba de PCR con un control o gen endógeno; amplificando el gen ribosomal 16S, con los iniciadores 16S1 (TGAGAATGGATAAGAGGCTC) y 16S2 (TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG).

Obteniéndose que para las muestras de frijol el método CTAB 2 % mostró mejores resultados (**Figura 22**) y Vivantis GF-1 se obtuvo tres muestras (**Figura 24**). No así para DNeasy plant mini kit (**Figura 23**) y Wizard® HMW DNA Extraction Kit (**Figura 25**) no se observó amplificación de gen endógeno.



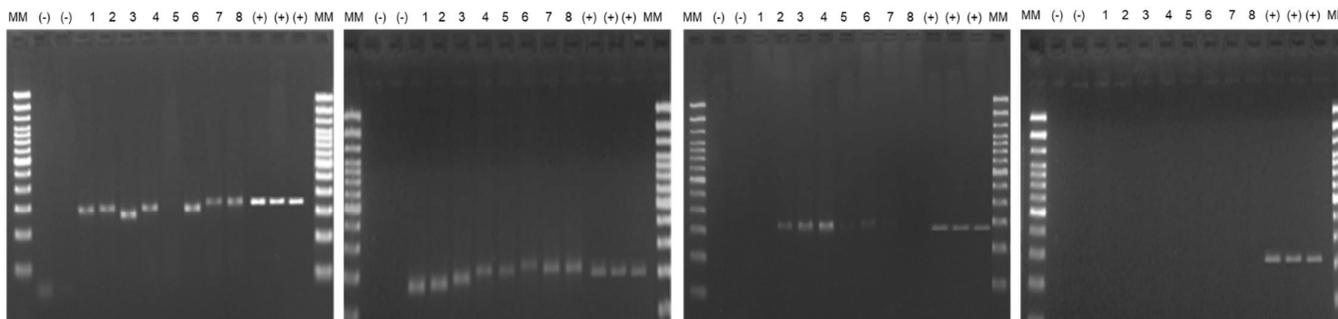
**Figura 22.** Amplificación de la región 16S de muestras de frijol obtenidas con método CTAB 2 %. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 23.** Amplificación de la región 16S de muestras de frijol obtenidas con el Kit comercial DNeasy plant mini kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 24.** Amplificación de la región 16S de muestras de frijol obtenidas con el Kit comercial Vivantis GF-1. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 25.** Amplificación de la región 16S de muestras de frijol obtenidas con el Kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

En cuanto a la amplificación de la región 16S del DNA extraído de muestras de plátano con CTAB 2 % ocho muestras fueron positivas (**Figura 26**), con el kit Vivantis tres muestras resultaron positivas (**Figura 28**).



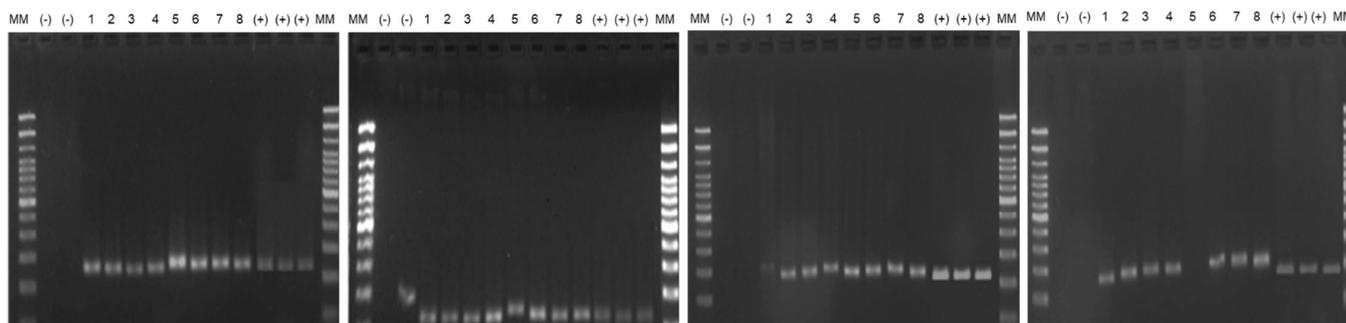
**Figura 26.** Amplificación de la región 16S de muestras de plátano obtenidas con método CTAB 2 %. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 27.** Amplificación de la región 16S de muestras de plátano obtenidas con el Kit comercial DNeasy plant mini kit: 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 28.** Amplificación de la región 16S de muestras de plátano obtenidas con el Kit comercial Vivantis GF-1.1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 29.** Amplificación de la región 16S de muestras de plátano obtenidas con el Kit comercial Wizard® HMW DNA Extraction Kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

Respecto a las muestras de DNA obtenido a partir de papa este tuvo mayor homogeneidad con CTAB 2 %, con el que las ocho muestras amplificaron (**Figura 30**), el kit DNeasy plant mini kit también permitió la amplificación de ocho muestras (**Figura 31**), Vivantis GF-1 y Wizard® HMW DNA Extraction Kit siete muestras mostraron amplificación (**Figura 32 y 33**).



**Figura 30.** Amplificación de la región 16S de muestras de papa obtenidas con método CTAB 2 %. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 31.** Amplificación de la región 16S de muestras de papa obtenidas con el Kit comercial DNeasy plant mini kit. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 32.** Amplificación de la región 16S de muestras de papa obtenidas con el Kit comercial Vivantis GF-1.1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

**Figura 33.** Amplificación de la región 16S de muestras de papa obtenidas con el Kit comercial Plant DNAzo®. 1) M1. 2) M2. 3) M3. 4) M4. 5) M5. 6) M6. 7) M7. 8) M8. MM. Marcador Molecular. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

## 6.2 PCR tiempo real

### 6.2.1 PCR tiempo real para la detección de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Considerando que las muestras de tejido foliar de limón mostraron sintomatología asociada a *X. citri* subsp. *Citri*, se procedió a realizar la técnica qPCR para analizar la amplificación y la detección de la bacteria.

Se pudo observar que las muestras en que se consideraron positivas alcanzaron los valores 15 ≤ 35 (Figura 34).

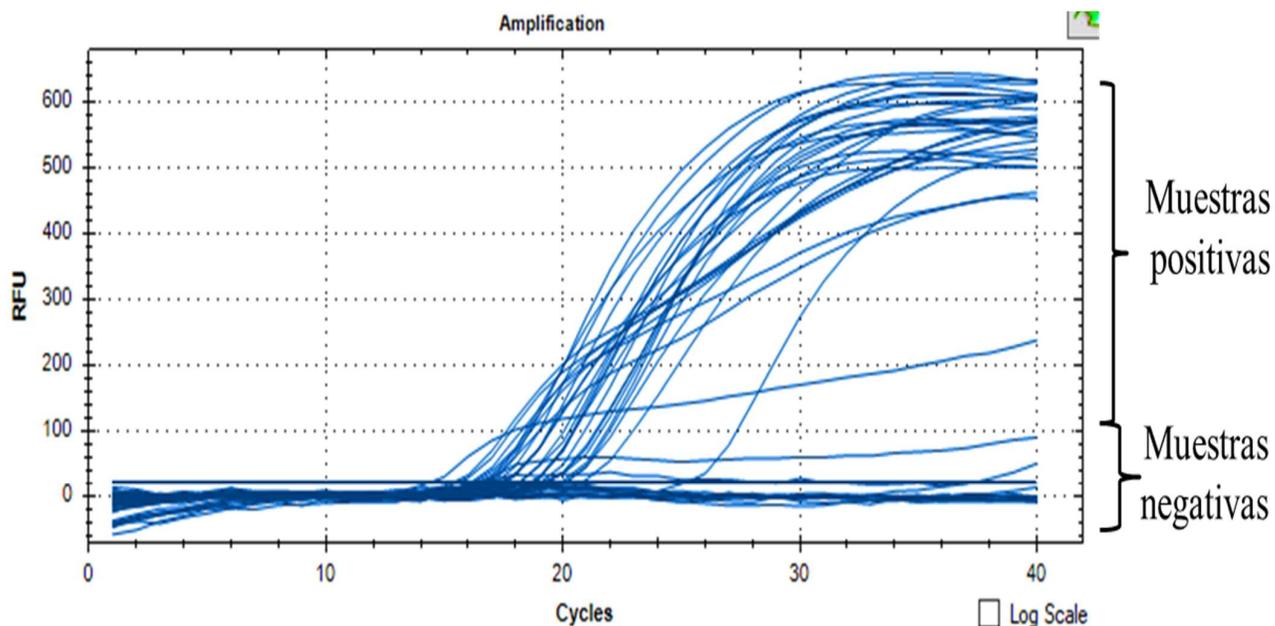


Figura 34. Curva de cuantificación para la detección de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

### 6.2.2 PCR tiempo real para la detección de *Acidovorax citrulli*

Por otra parte, las semillas de melón utilizadas se encontraban inoculadas con *A. citrulli* y en las por consiguiente se realizó qPCR para la detección de muestras positivas, de igual manera en la misma reacción el DNA de interés.

Como resultado de la qPCR para *A. citrulli* se consideró como un resultado positivo aquellos valores  $15 \leq 35$  (Figura 35).

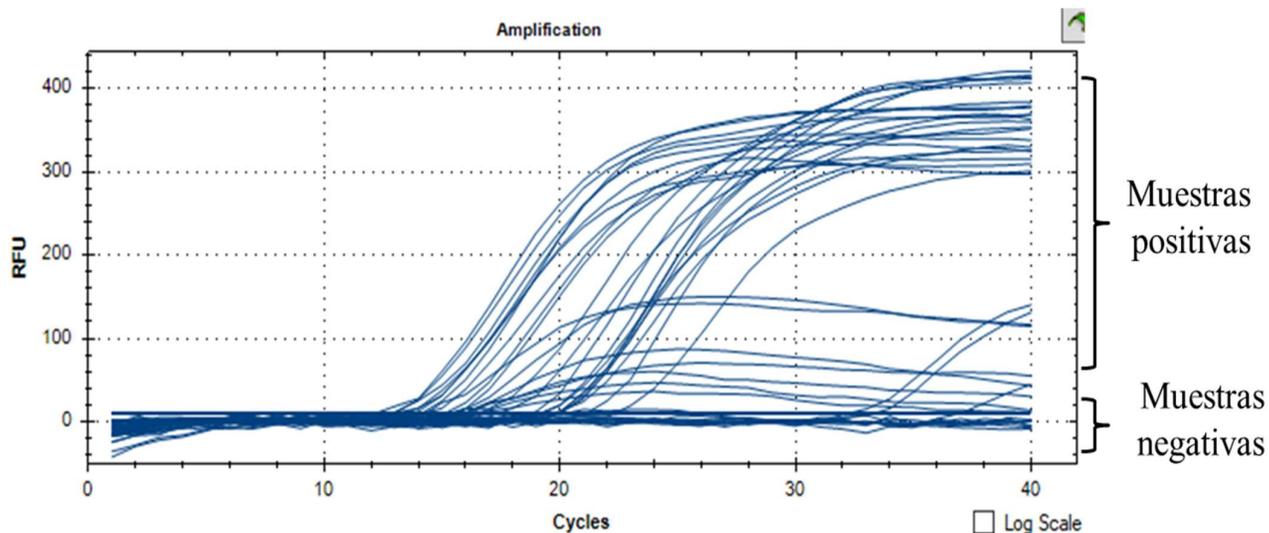


Figura 35. Curva de cuantificación para la detección de *Acidovorax citrulli*.

## VII. CONCLUSIÓN

La cantidad y calidad de los ácidos nucleicos determinan su efectividad para ser usadas en las distintas metodologías moleculares.

Se concluye que, para tejidos foliares de limón, se recomienda utilizar DNeasy Plant Mini Kit, en semillas de melón y frijol Wizard® HMW DNA Extraction Kit al igual que para plátano. Por el contrario, para papa el protocolo idóneo es CTAB al 2 %. Lo anterior basado en la calidad, cantidad e integridad del DNA obtenido.

Se recomienda considerar que el método a utilizar está en función a la muestra que se desee trabajar; no solo la cantidad recuperada de DNA, sino también los valores de absorbancia  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  a fin de que sea apto para su utilización en pruebas moleculares.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Disponible en: <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Beas C., Ortuño D. y Armendáriz J.S. (2009). Biología molecular. fundamentos y aplicaciones. Editorial McGraw-Hill.
- Camarena F. (2008). Biología celular y molecular. Manual de prácticas. Universidad Autónoma de Baja California. <https://ciencias.ens.uabc.mx/documentos/manuales/manual%20Biol%20Cel%20Y%20Mol.pdf>
- Carchi M., D. E. (2014). Aprovechamiento de los residuos agrícolas provenientes del cultivo de banano para obtener nanocelulosa. Tesis de Licenciatura Especialista en Ingeniería Química. Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Gutiérrez-Ibáñez A.T., Laguna-Cerda A., Rojas-Martínez R.I., González-Garza R., Salgado-Siclán M.L., Aguilar-Ortigoza C., y González-Esquivel C. (2009). Asociación molecular de *Xylella fastidiosa* en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con síntomas de punta morada, en México. Chapingo Serie Horticultura. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912186008>
- Howe C. (2007). Gene Cloning and Manipulation. (2ª ed). Editorial Cambridge University Press.
- IPPC. International Plant Protection Convention. (2016). NIMF 27 Protocolos de Diagnóstico para plagas reglamentadas PD: 6 *Xanthomonas citri* subsp. Autor. Disponible en: [https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2016/08/DP\\_06\\_2014\\_Es\\_2016-08-10\\_LRGreviewed.pdf](https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2016/08/DP_06_2014_Es_2016-08-10_LRGreviewed.pdf)
- Iwasa J. y Marshall W. (2014). Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. (8ª ed). Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Lozano J.A., Galindo J.D., García- Borrón J.C., Martínez-Liarte J.H., Peñafiel R. y Solano F. (2005). Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud. (3ª ed). Editorial McGraw-Hill.
- Meisel L., Fonseca B., González S., Baeza-Yates R., Cambiazo V., Campos R., González M., Orellana A., Retamales J. y Silva H. (2005). A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional

- genomics analyses. *Biological Research* 38, 83-88. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15977413/>
- Mex-Álvarez R.M., Garma-Quen, P.M, Yanez-Nava D., Guillen-Morales M.M., y Novelo-Pérez, M.I. (2021). Caracterización morfológica de *Phaseolus vulgaris* en Campeche, México. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 52(1), 32-38. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2221-24502021000100032&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24502021000100032&lng=es&tlng=es)
  - O'Neill M., McPartlin J., Arthur K., Riedel S. y McMillan Nd. (2011). Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *Journal of Physics: Conference Series*. 307. 012047.
  - Pérez F. (2003). Germinación y dormición de semillas. En Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía (Ed.) *Material vegetal de reproducción: manejo, conservación y tratamiento*. Junta de Andalucía 177-200. Disponible en: [https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales/80402\\_MATERIAL\\_VEGETAL\\_DE\\_REPRODUCCION\\_MANEJO\\_CONSERVACION\\_Y\\_TRATAMIENTO/80-402.htm](https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales/80402_MATERIAL_VEGETAL_DE_REPRODUCCION_MANEJO_CONSERVACION_Y_TRATAMIENTO/80-402.htm)
  - Pérez I., Angulo L., Osorio G., Ramis C., Bedoya A. M., Figueroa, R., Molina, S., y Infante, D. (2011). Método modificado de obtención de adn genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.): Para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*, 23(1), 27-34. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612011000100004&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612011000100004&lng=es&tlng=es).
  - Rodicio M. R. y Mendoza M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Vol. 22, (4), 238-245. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>
  - Salazar A.M., Sandoval A.S. y Armendáriz J. S. (2013). *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. (3ª ed). Editorial McGraw-Hill.
  - Seeker L.A., Holland, R., Underwood S., Fairlie J., Psifidi A., Ilska J.J., Bagnall A., Whitelaw B., Coffey M., Banos G. y Nussey D.H. (2016). Method Specific Calibration Corrects for DNA Extraction Method Effects on Relative Telomere Length

- Measurements by Quantitative PCR. PLoS ONE 11(10). Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0164046>
- Serrano, José, & Goñi, Isabel. (2004). Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 36-44. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000100006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100006&lng=es&tlng=es)