

División de Ciencias Biológicas y de las Salud

Licenciatura en Agronomía.

Estandarización de métodos de extracción de DNA para semillas de *Zea mays* y
RNA para muestras de *Solanum lycopersicum* L.

Prestador de Servicio Social en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria –
Brito García Andrés Jacobo – 2182030808

Asesor Interno:



Dra. Beatriz Sofia Schettino Bermúdez
No. Eco.17093
Adscripción Departamento de Producción Agrícola y Animal

Asesor Externo: Mtro. en C. Guillermo Santiago Martínez
Director de Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Revisado por:

Ing. Espinosa Mendoza Mario

Jefe de departamento de Biología Molecular en el CNRF

Ing. Morales Gonzáles Israel

Departamento de Biología Molecular en el CNRF

Ing. Soto Cárdenas Sandra Valeria

Departamento de Biología Molecular en el CNRF

Fecha de Inicio: 1 de Junio de 2022

Fecha de Terminación: 1 de Diciembre de 2022

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Zea mays.....	5
1.1.1. Taxonomía.....	5
1.1.2. Especies atendidas por el SNICS.....	5
1.1.3. ADN de Z mays.....	5
1.2. Solanum lycopersicum L.....	6
1.2.1. Especies reportadas.....	6
1.2.2. Especies atendidas por el SNICS.....	6
1.2.3. ADN de Jitomate.....	6
1.2.4. Técnicas de análisis del ADN de jitomate.....	7
1.3. Extracción de ácidos nucleicos.....	7
1.4. Kits comerciales para la extracción de ácidos nucleicos y método de laboratorio.....	8
1.4.1. Métodos de extracción para ADN de <i>Zea mays</i>	8
1.4.2. Métodos de extracción para RNA de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	9
2. JUSTIFICACIÓN.....	10
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. METODOLOGÍA.....	10
4.1. Extracciones de DNA para Zea mays.....	11
4.2. Extracciones de RNA Solanum lycopersicum L.....	11
4.3. Muestras biológicas.....	11
4.4. Cuantificación por espectrofotometría.....	13
4.5. Extracciones de DNA Zea mays.....	14
4.5.1. Metodología de extracción de DNA usando CTAB 2 % con PVP a pH=8 2%.....	14

4.5.2. Metodología de extracción de DNA usando muestra (~100 mg) DNeasy® Plant Mini kit (No. Cat: 69106) y 50 µL de volumen de elución	18
4.5.3. Procedimiento utilizando el kit ZYMO Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep. Cat. No. D6020	19
4.5.4. Metodología de extracción de DNA usando muestra (~20 mg) + Wizard SV Genomic DNA Purification System (No. Cat: A2361) y 100 µL de volumen de elución.	21
4.6. Metodologías para la extracción de RNA de <i>Solanum lycopersicum</i> L.	24
4.6.1. Método de extracción de RNA de <i>Solanum lycopersicum</i> L con el SV Total RNA Isolation System Cat. Z3105.	24
4.6.2. Método de extracción de RNA de <i>Solanum lycopersicum</i> L. con el kit RNeasy Plant Mini de Qiagen (No. Cat: 74104)	26
5. Resultados y conclusiones	29
5.1. Resultados de métodos de extracción en <i>Zea mays</i>	29
5.1.1. Cuantificación del DNA por espectrofotometría	30
5.2. Resultados análisis estadísticos de métodos de extracción en <i>Zea mays</i> .	31
5.2.1. Calidad de DNA A260/280 en Muestras en Mazorca	31
5.2.2. Concentración ng/µL Muestras en Mazorca	32
5.2.3. Calidad de DNA A260/280 en muestras en mazorca	33
5.2.4. Concentración ng/µL muestras en semilla	34
5.3. Resultados de método de extracción de RNA de <i>Solanum lycopersicum</i> L.	34
5.3.1. Cuantificación del RNA por espectrofotometría	34
5.3.2. Concentración ng/µL muestras sin germinar	35
5.3.3. Calidad de RNA A260/280 en muestras sin germinar	36
5.3.4. Concentración (ng/µL) muestras con 10 días de germinación	36
5.3.5. Calidad de RNA A260/280 en muestras con 10 días de germinación	37

1. INTRODUCCIÓN

Cada vez se busca más la innovación y modernización en la estandarización de métodos de extracción de ácidos nucleicos en semillas y plantas para realizar análisis genómicos, sin embargo, existen limitantes para su obtención.

Los ácidos nucleicos tienen como característica tener un alto peso molecular y su calidad se evalúa con la relación $A_{260/280}$. Este parámetro permite evaluar si la extracción contiene contaminantes como proteínas, polisacáridos, fenoles y/o inhibidores de DNA (Kasem S, et al, 2009) y con ello afectar a las aplicaciones posteriores, por ejemplo, la PCR.

El Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), tiene la misión de realizar actividades de ensayo para la identificación y el diagnóstico oportuno de plagas, así como la estandarización de protocolos en técnicas moleculares. Para ello cuenta con la infraestructura y tecnología que permite realizar diferentes pruebas mediante métodos y técnicas de última generación.

Los laboratorios que forman parte del CNRF cuentan con un área de Biología Molecular donde se busca la detección de fitopatógenos que no se pueden detectar mediante técnicas tradicionales, por lo que se recurre a las herramientas moleculares. Además del diagnóstico, también se realizan actividades como la estandarización de protocolos que abarcan métodos de extracción de ácidos nucleicos y PCR para la detección de fitopatógenos, lo que permite confirmar y respaldar su presencia mediante técnicas moleculares y tradicionales lo que genera un diagnóstico integral y eficiente (SENASICA, 2016).

Por otro lado, extraer ácidos nucleicos de buena calidad de diferentes matrices permite que este se use en técnicas avanzadas como mapeo genético, selección asistida por marcadores y evaluación de la autenticidad de las variables por medio de secuenciaciones y árboles filogenéticos (Kasem S, et al, 2009), además de evitar falsos negativos en las pruebas de diagnóstico.

En el presente trabajo se evaluaron y estandarizaron tres métodos de extracción para DNA y RNA con la finalidad de obtener ácidos nucleicos de alta calidad a partir de semilla de *Zea Mays* L. y semilla de *Solanum Lycopersicum*.

1.1. Zea mays

El maíz (***Zea mays***) es una especie de gramínea anual. México es reconocido como el país de origen, diversidad y domesticación del maíz (Matsuoka *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2009; Diario Oficial de la Federación, 2012; SAGARPA, 2016).

El ADN de *Zea mays* ha sido objeto de estudio para entender su evolución y diversidad genética, así como para mejorar su producción y resistencia a enfermedades y plagas.

1.1.1. Taxonomía

Su taxonomía del género *Zea* está compuesta por: *Zea diploperennis*, *Zea perennis* (teocintles perennes), *Zea mays* subsp. *Mexicana*, *Zea mays* subsp. *Parviglumis* (teocintles anuales) y *Zea mays* subsp. *Mays* (Diario Oficial de la Federación, 2012).

1.1.2. Especies atendidas por el SNICS

Z. mays (59 razas nativas de maíz).

1.1.3. ADN de *Z mays*

Debido a su larga historia de domesticación y selección artificial, *Zea mays* presenta una gran variabilidad genética. Esto se debe a la presencia de alelos diferentes en los genes, que pueden influir en características como la altura de la planta, el tamaño y sabor del grano, y la resistencia a enfermedades y plagas (Clark RM, 2004).

Los estudios del ADN de *Zea mays* han permitido identificar regiones específicas del genoma que están asociadas con estas características y desarrollar técnicas de mejoramiento genético para producir variedades más resistentes y productivas (Matsuoka Y, 2002).

El estudio del ADN de *Zea mays* ha permitido mejorar su producción a través de técnicas como la selección asistida por marcadores genéticos y la ingeniería genética. Estas técnicas permiten identificar y seleccionar plantas con características deseables y transferir genes de otras especies para mejorar su

resistencia a enfermedades y condiciones ambientales adversas (Messmer MM, 2019).

1.2. *Solanum lycopersicum* L.

México y Perú son considerados como los centros independientes de domesticación de ***Solanum lycopersicum* L.** de ahí el amplio acervo que poseen en recursos genéticos de la especie, algunos de ellos son altamente cotizados en los mercados locales y regionales. En México, se cultiva principalmente en los estados de Sinaloa, Jalisco, Michoacán y Baja California. (Lobato *et al.*, 2012).

El cultivo del tomate en México se realiza en diferentes sistemas de producción, desde el cultivo en campo abierto hasta el cultivo protegido en invernaderos.

México es uno de los principales exportadores de tomate del mundo, con destinos como Estados Unidos, Canadá y varios países europeos. Sin embargo, el cultivo de tomate también enfrenta desafíos como plagas y enfermedades, así como problemas sociales relacionados con las condiciones laborales de los trabajadores agrícolas (Lobato *et al.*, 2012).

1.2.1. **Especies reportadas**

En México se reporta una especie *Solanum lycopersicum* L (Lobato *et al.*, 2012).

1.2.2. **Especies atendidas por el SNICS**

El SNICS atiende una especie (Lobato *et al.*, 2012).

1.2.3. ADN de Jitomate

El estudio del ADN de jitomate es fundamental para entender su evolución y mejorar su cultivo. Gracias a las técnicas de secuenciación de nueva generación, hoy en día es posible analizar el genoma completo de esta especie, lo que permite identificar genes de interés para la producción de variedades más resistentes y nutritivas.

1.2.4. Técnicas de análisis del ADN de jitomate

Existen diversas técnicas para analizar el ADN de jitomate, como la electroforesis en gel, la PCR y el secuenciamiento de nueva generación (Müller L, 1999).

Estas técnicas permiten identificar diferencias genéticas entre variedades de jitomate, así como mutaciones y marcadores moleculares útiles para su mejora genética (Ríos Gálvez S, 2017).

El RNA extraído de *Solanum lycopersicum* La puede ser utilizado en una variedad de aplicaciones, incluyendo la secuenciación de RNA y el análisis de expresión génica. Estos estudios pueden proporcionar información valiosa sobre la regulación génica y la función celular en plantas (*Rubio-Cabetas MJ, 2020*).

Además, el RNA de *Solanum lycopersicum* La también puede ser utilizado en estudios de mejoramiento genético para desarrollar variedades de tomate con características deseables, como resistencia a enfermedades o mayor contenido de nutrientes (Simkin AJ, 2020)

1.3. Extracción de ácidos nucleicos

La técnica de extracción de ácidos nucleóticos consiste en aislar y purificar las moléculas de ADN y ARN, basado en las características fisicoquímicas de las moléculas. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre si formando una doble hélice que va de 5´ a 3´, mientras de la molécula de ARN está constituida por una sola cadena de nucleótidos. Los nucleótidos están constituidos por carbohidratos (desoxirribosa), un grupo fosfato (P) y una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el carbohidrato, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrogeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Laura P Alejos, et al, 2012)

Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na⁺ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el RNA y el DNA precipite (Sambrook *et al.* 1989). Sin embargo, la carga neta negativa del DNA le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Nason 1965, Travaglini 1973, Sambrook *et al.* 1989, Sinden 1994). En general, los protocolos tradicionales consisten en cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del DNA y RNA (Laura P Alejos, et al, 2012).

1.4. Kits comerciales para la extracción de ácidos nucleicos y método de laboratorio.

1.4.1. Métodos de extracción para ADN de *Zea mays*.

a) CTAB 2%

Es un detergente tensioactivo habitualmente utilizado en procedimientos de extracción ADN por su efectividad en la purificación de sales, minerales, así como de carbohidratos y lípidos presentes en las membranas celulares

b) *Kit DNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen (No. Cat: 69106)*

Es utilizado en las técnicas moleculares para la extracción de ADN total a partir de células, hongos, tejido vegetal y/o ADN genómico.

Algunas de las características principales de este kit comercial son.

Su alto rendimiento en el uso de PCR con técnicas que la marca Qiagen tiene patentadas como la tecnología de eliminación de inhibidores IRT. Alto rendimiento en la purificación de ADN y altas concentraciones para su extracción.

c) *Kit ZYMO Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep. Cat. No. D6020*

Método de fácil aplicación en el aislamiento de ADN libre de inhibidores, con calidad de PCR (hasta 25 µl/prep) esto con la extracción a partir de una variedad de muestras de plantas o semillas en aproximadamente 20 minutos.

d. Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega (No. Cat: A2361)

Método simple de purificación de ADN para células y tejidos Este sistema proporciona una técnica rápida y simple. El ADN genómico se puede purificar en aproximadamente 20 minutos.

1.4.2. Métodos de extracción para RNA de *Solanum lycopersicum* L.

a. RNeasy® Plant Mini Kit

El kit RNeasy® Plant Mini utiliza columnas de sílice para la purificación del RNA. Las muestras de tejido son homogeneizadas y luego tratadas con un tampón de lisis para liberar el RNA. El RNA se une a las columnas de sílice y se lava para eliminar impurezas. Finalmente, el RNA se eluye en agua libre de ribonucleasas (RNAsas).

Este método ha demostrado ser efectivo en la extracción de RNA de plantas, incluyendo *Solanum lycopersicum* La. Además, el kit RNeasy® Plant Mini es fácil de usar y proporciona resultados consistentes y reproducibles.

b. Metodo promega SV Total RNA Isolation System

El sistema Promega SV Total RNA Isolation utiliza cloruro de guanidinio para la lisis celular y la purificación del RNA. Las muestras de tejido se homogeneizan en presencia de cloruro de guanidinio y se añade β -mercaptoetanol para desnaturalizar las proteínas. El RNA se une a las partículas de vidrio y se lava para eliminar impurezas. Finalmente, el RNA se eluye en agua libre de RNAsas.

Este método también ha demostrado ser efectivo en la extracción de RNA de plantas, incluyendo *Solanum lycopersicum* La. Sin embargo, el sistema Promega SV Total RNA Isolation puede ser más costoso y requiere más tiempo de preparación en comparación con el kit RNeasy® Plant Mini.

2. JUSTIFICACIÓN

Estandarizar cuatro métodos de extracción para DNA genómico a partir semilla de *Zea mays* y de RNA a partir de semillas de *Solanum lycopersicum*. Los cuatro métodos a evaluar son kits comerciales de las marcas Qiagen, Zymo y Promega y un método tradicional conocido como CTAB, con el fin de extraer ADN de *Zea mays* y ARN de *Solanum lycopersicum* de buena calidad y alto rendimiento al cual se le va a evaluar su concentración en ng/ μ l, así como sus relaciones $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ con el objetivo de alcanzar las características idóneas para su posterior uso en PCR punto final y tiempo real.

En el Laboratorio de Biología Molecular del CNRF, se tiene la necesidad de diseñar y/o evaluar los mejores métodos de extracción con el fin de crear un protocolo estandarizado para la extracción de ADN de *Zea Mays* y ARN de *Solanum Lycopersicum*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

-) Elaborar un protocolo estandarizado de los métodos de extracción de ácidos nucleicos para *Zea Mays* y *Solanum Lycopersicum*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-) Obtener DNA y RNA de alta calidad con las características idóneas para poder realizar pruebas de PCR y sus variantes.
-) Proporcionar las metodologías de extracción de ácidos nucleico para las matrices analizadas.

4. METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevará a cabo con base en un diseño experimental de corte longitudinal, cuantitativo. Se compararon tres *kits* comerciales para *Zea mays* así como una metodología de extracción casera de nombre CTAB 2% para *Solanum lycopersicum L* en el caso de los kits se siguieron las instrucciones del fabricante, a los cuales se les realizaran modificaciones. Las metodologías para seguir fueron las siguientes:

4.1. Extracciones de DNA para *Zea mays*

- Estandarizar con metodología de extracción de DNA usando CTAB 2 % con PVP a pH=8
- Estandarizar método de extracción de DNA con el *Kit DNeasy® Plant Mini Kit* de Qiagen (No. Cat: 69106).
- Estandarizar método de extracción de DNA con el kit ZYMO Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep. Cat. No. D6020.
- Estandarizar método de extracción de DNA con el Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega (No. Cat: A2361).

4.2. Extracciones de RNA *Solanum lycopersicum L*

- Estandarización de ARN con el kit RNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen (No. Cat: 74104).
- Estandarización método de extracción de RNA de *Solanum lycopersicum L* con el Wizard SV Total RNA Isolation System de Promega (No. Cat: Z3100, Z3101 AND Z3105).

4.3. Muestras biológicas

Las muestras utilizadas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular, estas correspondieron a muestras del banco de semillas del CNRF **Cuadro 1 y Cuadro 2.**

Cuadro 1. Muestras usadas para la evaluación de métodos de DNA *Zea mays*

Método de extracción de DNA	Muestra	Código	Muestra	Código
Metodología de extracción de DNA usando CTAB 2 % con PVP a pH=8	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_1	Variedad 3	CTAB_Fre_1
	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_2	Variedad 3	CTAB_Fre_2
	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_3	Variedad 3	CTAB_Fre_3
	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_4	Variedad 3	CTAB_Fre_4
	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_5	Variedad 3	CTAB_Fre_5
Método de extracción de DNA con el <i>Kit DNeasy® Plant Mini Kit</i> de Qiagen (No. Cat: 69106).	Variedad 1 (roja)	Q-1	Variedad 3	Q-F-1
	Variedad 1 (roja)	Q-2	Variedad 3	Q-F-2
	Variedad 1 (roja)	Q-3	Variedad 3	Q-F-3
	Variedad 1 (roja)	Q-4	Variedad 3	Q-F-4
	Variedad 1 (roja)	Q-5	Variedad 3	Q-F-5
	Variedad 1 (roja)	Z-M-1	Variedad 3	Z-F-6

Método de extracción de DNA con el kit ZYMO Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep. Cat. No. D6020.	Variedad 1 (roja)	Z-M-2	Variedad 3	Z-F-7
	Variedad 1 (roja)	Z-M-3	Variedad 3	Z-F-8
	Variedad 1 (roja)	Z-M-4	Variedad 3	Z-F-9
	Variedad 1 (roja)	Z-M-5	Variedad 3	Z-F-10
Método de extracción de DNA con el Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega (No. Cat: A2361).	Variedad 1 (roja)	W-1	Variedad 3	W-F-6
	Variedad 1 (roja)	W-2	Variedad 3	W-F-7
	Variedad 1 (roja)	W-3	Variedad 3	W-F-8
	Variedad 1 (roja)	W-4	Variedad 3	W-F-9
	Variedad 1 (roja)	W-5	Variedad 3	W-F-10

En las muestras biológicas de *Zea mays* se utilizaron dos variantes, la variante 3 que es semilla extraída directamente de la mazorca (en fresco) misma que fue proporcionada por el laboratorio de biología molecular para la estandarización de metodología de extracción de DNA.

La segunda muestra fue una variante 1 del laboratorio de biología molecular de su banco de semillas en el CNRF de originaria de Perú proveniente de Francia.

Cuadro 2. Muestras usadas para la evaluación de métodos de RNA *Solanum lycopersicum L.*

Método de extracción de RNA <i>Solanum lycopersicum L.</i>	Muestra		Muestra	
	Técnica Sin Germinar	Código	Técnica 10 días germinado	Código
Método de extracción de RNA con kit RNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen (No. Cat: 74104).	TTC113ANGELLETY 1	SIL.S-P-1	TTC113ANGELLETY 1	SIL.P-P-1
	TTC113ANGELLETY 2	SIL.S-P-2	TTC113ANGELLETY 2	SIL.P-P-2
	TTC113ANGELLETY 3	SIL.S-P-3	TTC113ANGELLETY 3	SIL.P-P-3
	18P0011820. 1	SIL.S-P-4	18P0011820. 1	SIL.P-P-4
	18P0011820. 2	SIL.S-P-5	18P0011820. 2	SIL.P-P-5
	18P0011820. 3	SIL.S-P-6	18P0011820. 3	SIL.P-P-6
Método de extracción de RNA con el Wizard SV Total RNA Isolation System de Promega (No. Cat: Z3100, Z3101 AND Z3105).	TTC113ANGELLETY 1	SIL.S-RN-1	TTC113ANGELLETY 1	SIL.P-RN-1
	TTC113ANGELLETY 2	SIL.S-RN-2	TTC113ANGELLETY 2	SIL.P-RN-2
	TTC113ANGELLETY 3	SIL.S-RN-3	TTC113ANGELLETY 3	SIL.P-RN-3
	18P0011820. 1	SIL.S-RN-4	18P0011820. 1	SIL.P-RN-4
	18P0011820. 2	SIL.S-RN-5	18P0011820. 2	SIL.P-RN-5
	18P0011820. 3	SIL.S-RN-6	18P0011820. 3	SIL.P-RN-6

En las muestras biológicas de *Solanum lycopersicum L* se utilizaron dos variantes, la variante TTC113ANGELLETY y la variante 18P0011820 semillas originarias de Perú proveniente del Reino de los Países Bajos, muestras proporcionadas por el laboratorio de biología molecular de su banco de semillas en el CNRF.

Se elaborará un reporte de estandarización de extracción de ácidos nucleicos por cada *kit* comercial y metodología analizado en el presente experimento.

Las metodologías, así como el protocolo serán elaborados dentro del Laboratorio de Biología Molecular del CNRF, carretera federal México – Pachuca KM 37.5, Tecámac de Felipe Villanueva, Estado de México.

4.4. Cuantificación por espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica analítica que se utiliza para cuantificar la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra. La cualificación de ADN y ARN por espectrofotometría se basa en la medida de la absorbancia a una longitud de onda específica (260 nm para ADN y 260 nm y 280 nm para ARN) en una solución que contiene ADN o ARN.

Al DNA total obtenido de las muestras se le determinará su concentración (ng/μL) y pureza (calidad) mediante las absorbancias $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, se realizará con el uso del espectrofotómetro NanoDrop 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la cualificación de ADN y ARN por espectrofotometría, se deben realizar los siguientes pasos:

1. Preparar una solución de la muestra de ADN o ARN diluyéndolo en una solución salina como tampón fosfato (pH 7,4).
2. Medir la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 260 nm para ADN y 260 nm y 280 nm para ARN, utilizando un espectrofotómetro. La absorbancia a 280 nm se utiliza como medida de la presencia de proteínas en la muestra.
3. Calcular la concentración de la muestra de ADN o ARN utilizando la ley de Beer-Lambert, que establece una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la muestra.

La espectrofotometría es una técnica sensible y precisa para la cuantificación de ADN y ARN, y es ampliamente utilizada en laboratorios de investigación en biología molecular y genética.

4.5. Extracciones de DNA Zea mays

Se compararon 3 kits comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante y la metodología del CNRF de CTAB 2% CON PVP a pH=8.

4.5.1. Metodología de extracción de DNA usando CTAB 2 % con PVP a pH=8 2%

a) Equipos

-) Micropipetas con capacidad para diferentes volúmenes (2.5 µL, 10 µL, 100 µL, 200 µL y 1 000 µL)
-) Puntas estériles para micropipetas
-) Vórtex
-) Tubos estériles de microcentrífuga (1.5 mL y 2.0 mL)
-) Microcentrífuga con rotor para tubos de 1.5 mL y 2 mL
-) Termobloque (Eppendorf®) o baño maría con agitación o plataforma oscilante
-) Disruptor mecánico
-) Matrices de lisado "M" (MP Biomedicals®, No. 6923050)
-) Espectrofotómetro (Nanodrop 2000)

b) Reactivos

-) CTAB 2 % pH 8
-) Proteinasa K (20 mg/mL)
-) Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
-) Cloroformo
-) Isopropanol

) Etanol 70 % - no use alcohol desnaturalizado, porque contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona

) NaCl a 1.5 M

c) **Pretratamiento**

1. Lavar las semillas en un vaso de precipitado de 200 ml con solución de hipoclorito al 1 % y dejar secar a T_{amb} sobre un sanitario estéril.

d) Pesar entre 100 mg y 250 mg de semilla.

Nota: dependiendo de la variedad de la semilla, el peso puede corresponder a una semilla y previo al pesaje, la semilla se debe encontrar seca.

e) Colocar la semilla dentro de una matriz con balines y agregar 900 mL de agua libre de nucleasas

Nota: se recomienda usar el tubo de macerado "Metal Bead Lysing Matrix", ref: 6925500 de MP BIOMEDICALS.

f) Incubar la matriz dentro de un vaso de precipitado con agua destilada a 25 °C por 24 h (tipo baño maria).

g) **Tratamiento**

Previo a macerar usar una de las siguientes dos opciones:

1) Usar la matriz directamente en el disruptor.

2) Retirar la semilla de la matriz, realizar un corte longitudinal y regresar los cortes a la matriz.

d) **Procedimiento utilizando CTAB 2 % con PVP a pH=8 2%**

1. Macerar con un disruptor por 1 min a 6.5 m/s.

Nota: incubar las muestras en hielo por 1 min entre cada paso de macerado y mantener en hielo hasta que se centrifugue.

2. Repetir el paso "1" una vez más.

Nota: mantener en hielo hasta que se centrifugue.

3. Centrifugar por 5 min a 16 000 rcf, para separar la fase sólida de la líquida.
 4. Transferir 700 μ L de la fase líquida a un tubo estéril de 1.5 mL o 2 mL, agregar 600 μ L de **CTAB al 2 %** y 4 μ L de **proteínasa K (20 mg/mL)**, y homogenizar por inversión por 5 min.
 5. Colocar el tubo en un termobloque con función de agitación e incubar la muestra a 65 °C por 60 min a 700 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, dejar enfriar por 10 min a T_{amb} .
 6. Centrifugar por 10 min a 16 000 rcf.
 7. Transferir 700 μ L de la parte acuosa a un tubo estéril de 1.5 mL o 2 mL y agregar 500 μ L de **cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)**, homogenizar por inversión por 10 min y centrifugar por 10 min a 16 000 rcf.
 8. Transferir 500 μ L a un tubo estéril de 1.5 mL o 2 mL y 500 μ L de **cloroformo frío** y agregar 350 μ L de **NaCl a 1.5 M**, homogenizar por inversión 5 min y centrifugar por 10 min a 16 000 rcf.
 9. Transferir 400 μ L de la fase acuosa a un tubo estéril de 1.5 mL o 2 mL y agregar 200 μ L de **isopropanol frío**, homogenizar por inversión 10 veces.
 10. Incubar a – 20 °C por una hora y centrifugar por 30 min a 16 000 rcf.
 11. Desechar el isopropanol por decantación sin perder la pastilla.
 12. Lavar la pastilla con 500 μ L de **etanol al 70 % frío**, agitar en vórtex por 30 s y centrifugar por 5 min a 16 000 rcf. Desechar el sobrenadante por decantación sin perder la pastilla.
 13. Repetir el paso “12” dos veces más.
 14. Dejar secar la pastilla a T_{amb} o en un equipo de secado a 37 °C por 20 min y resuspender entre 50 μ L – 100 μ L de agua grado biología molecular.
- Nota:** el volumen de agua a usar en la última etapa dependerá del tamaño de la pastilla que se obtenga.
15. Cuantificar el DNA con un espectrofotómetro(nanodrop).
 16. Almacenar el DNA a -20 °C o a 4 °C.

4.5.2. Metodología de extracción de DNA usando muestra (~100 mg) DNeasy® Plant Mini kit (No. Cat: 69106) y 50 µL de volumen de elución

a) Equipos

-) Micropipetas con capacidad para diferentes volúmenes (2.5 µL, 10 µL, 100 µL, 200 µL y 1 000 µL)
-) Puntas estériles para micropipetas
-) Vórtex
-) Tubos estériles de microcentrífuga (1.5 mL y 2.0 mL)
-) Microcentrífuga con rotor para tubos de 1.5 mL y 2 mL
-) Termobloque (Eppendorf®) o baño maría con agitación o plataforma oscilante
-) Disruptor mecánico
-) Matrices de lisado "M" (MP Biomedicals®, No. 6923050)
-) Espectrofotómetro (Nanodrop 2000)
-) QIAshredder Mini spin column (color lila)
-) DNeasy Mini spin column (color blanco)

b) Reactivos

-) Buffer AP1
-) RNase A
-) Buffer P3
-) Buffer AW1
-) Buffer AW2
-) Buffer AE

c) Pretratamiento

1. Colocar en un tubo de macerado con matriz de balines y agregar 1.5 mL **buffer AP1**.

Nota: se recomienda usar el tubo de macerado "Lysing Matrix M", ref: 6923500 de MP BIOMEDICALS.

2. Macerar con un disruptor por 1 min. a 6.5 m/s.

Nota: incubar las muestras en hielo por 1 min entre cada paso de macerado y mantener en hielo hasta que se centrifugue.

3. Repetir el paso “2” una vez más.

Nota: mantener en hielo hasta que se centrifugue.

4. Centrifugar por 5 min a 16 000 rcf, para separar la fase sólida de la líquida.
5. Transferir 700 µL de sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 mL o 2 mL.

d) Procedimiento utilizando DNeasy® Plant Mini kit (No. Cat: 69106) y 50 µL de volumen de elución.

1. Agregar 400 µL de **buffer AP1** y 4 µL de **RNase A** al tubo con 700 µL de sobrenadante.
2. Incubar a 65 °C por 10 min.

Nota: invertir los tubos 2-3 veces durante la incubación.

3. Agregar 130 µL del **buffer P3**, mezclar con vórtex e incubar en hielo por 5 min.
4. Centrifugar por 5 min a 20 000 rcf.
5. Usar una columna **QIAshredder Mini spin column** (color lila), transferir 600 µL del lisado y centrifugar por 2 min a 20 000 rcf.
6. Transferir 450 µL del centrifugado a un tubo estéril de 1.5 mL o 2 mL.

Nota: evitar llevarse precipitados.

7. Agregar 675 µL del **buffer AW1** y mezclar por pipeteo.
8. Usar una columna **DNeasy Mini spin column** (color blanco), transferir 650 µL de la mezcla del paso “7”, centrifugar por 1 min a 6 000 rcf, desechar el líquido del tubo recolector y repetir el paso con el resto de la muestra, desechar el líquido y el tubo recolector.

9. Colocar la columna **DNeasy Mini spin column** en un tubo recolector de 2 mL, agregar 500 μ L de **buffer AW2** y centrifugar por 1 min a 6 000 rcf, desechar el líquido.
10. Agregar 500 μ L del **buffer AW2** a la columna **DNeasy Mini spin column** y centrifugar por 2 min a 20 000 rcf para secar la membrana.
11. Colocar la columna **DNeasy Mini spin column** en un tubo estéril de 1.5 mL o 2 mL y pipetear 50 μ L del **buffer AE** directamente sobre la membrana. Incubar por 5 min a T_{amb} y después centrifugar por 1 min a 6 000 rcf para eluir.
12. Cuantificar el DNA con un espectrofotómetro o nanodrop.
13. Almacenar el DNA a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.3. Procedimiento utilizando el kit ZYMO Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep. Cat. No. D6020

a) Equipos

-) Micropipetas con capacidad para diferentes volúmenes (2.5 μ L, 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 1 000 μ L)
-) Puntas estériles para micropipetas
-) Vórtex
-) Tubos estériles de microcentrífuga (1.5 mL y 2.0 mL)
-) Microcentrífuga con rotor para tubos de 1.5 mL y 2 mL
-) Termobloque (Eppendorf®) o baño maría con agitación o plataforma oscilante
-) Disruptor mecánico
-) Matrices de lisado "M" (MP Biomedicals®, No. 6923050)
-) Espectrofotómetro (Nanodrop 2000)
-) ZR BashingBead™ Lysis Tube
-) Zymo-Spin™ III-F Filters (rojas)
-) Genomic Lysis *Buffer* (con beta-mercaptoetanol)
-) Zymo-Spin™ IICR

) Zymo-Spin™ III-HRC Filter

b) Reactivos

) BashingBead™ Buffer

) DNA Pre-Wash Buffer

) g-DNA Wash Buffer

) DNA Elution *Buffer*

) Prep Solution

c) Procedimiento utilizando *kit* ZYMO Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep. Cat. No. D6020.

1. Colocar 1 larva (sin alcohol) en un tubo de lisado **ZR BashingBead™ Lysis Tube**, agregar 600 µL del **BashingBead™ Buffer** al tubo, cerrar herméticamente, macerar en un disruptor mecánico (MP Biomedicals) por 1 min a 5 m/s. Centrifugar por 1 min a 5 000 rcf.
2. Ensamblar una columna **Zymo-Spin™ III-F Filters (rojas)** en un tubo estéril de 2 mL, tomar 400 µL de la mezcla del paso anterior (incluido cualquier precipitado).
3. Centrifugar por 1 min a 8 000 rcf y desechar la matriz (roja) solamente.
4. Agregar 1 000 µL del **Genomic Lysis Buffer** (con beta-mercaptoetanol) a la solución anterior y mezclar en vórtex por 10 s.
5. Transferir 750 µL de la mezcla anterior a una columna **Zymo-Spin™ IICR**, centrifugar por 1 min a 8 000 rcf. Desechar el sobrenadante, reusar el tubo de recolección y repetir este paso con el resto de la mezcla.
6. Agregar 200 µL de **DNA Pre-Wash Buffer** a la columna, cambiar el tubo de recolección y centrifugar por 1 min a 8 000 rcf.
7. Agregar 500 µL de **g-DNA Wash Buffer** a la columna, cambiar el tubo de recolección y centrifugar por 1 min a 8 000 rcf.
8. Para eliminar los restos de alcohol, centrifugar por 2 min a 12 000 rcf.

9. Colocar la columna en un tubo estéril de 1.5 mL y agregar 50 μ L de **DNA Elution Buffer** al centro de la columna, incubar 1 minuto a T_{amb} . Centrifugar por 2 min a 8 000 rcf.
10. Tomar el volumen obtenido de la elución del paso 9 y colocarlo cuidadosamente en la misma columna, incubar 1 min a T_{amb} . Centrifugar por 2 min a 8 000 rcf.
11. Ensamblar la columna **Zymo-Spin™ III-HRC Filter** en un tubo nuevo de recolección, para prepararla, y agregar 600 μ L de **Prep Solution**. Centrifugar por 3 min a 8 000 rcf.
12. Colocar la columna **Zymo-Spin™ III-HRC Filter** en un tubo estéril de 1.5 mL, transferir el eluido del paso 10 y centrifugar por 3 min a 16 000 rcf.
13. Proceder a la verificación de calidad y cantidad DNA.
14. Almacenar el DNA a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.4. Metodología de extracción de DNA usando muestra (~20 mg) + Wizard SV Genomic DNA Purification System (No. Cat: A2361) y 100 μ L de volumen de elución.

a) Equipo

-) Micropipetas con capacidad para diferentes volúmenes (2.5 μ L, 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 1 000 μ L)
-) Puntas estériles para micropipetas
-) Vórtex
-) Tubos estériles de microcentrífuga (1.5 mL y 2.0 mL)
-) Microcentrífuga con rotor para tubos de 1.5 mL y 2 mL
-) Termobloque (Eppendorf®) o baño maría con agitación o plataforma oscilante
-) Disruptor mecánico
-) Matrices de lisado "M" (MP Biomedicals®, No. 6923050)
-) Espectrofotómetro (Nanodrop 2000)
-) Wizard® SV Minicolumn assembly

b) Reactivos

-) Nuclei Lysis Solution
-) 0.5 M EDTA (pH 8.0)
-) Proteinasa K (20 mg/mL)
-) RNase A Solution
-) Wizard® SV Lysis Buffer
-) Column Wash Solution(CWA)
-) Nuclease-Free Water

c) Pretratamiento

1. Pesar aproximadamente 20 mg de excreta.
2. Secar la muestra sobre papel encerado, para que se evapore el etanol, a T_{amb} por 30 min.

d) Procedimiento Extracción con el *kit* usando muestra (~20 mg) + Wizard SV Genomic DNA Purification System (No. Cat: A2361) y 100 µL de volumen de elución.

1. Colocar la muestra en un tubo estéril de 1.5 mL, agregar y cubrir la muestra con 275 µL de la solución de digestión (**Cuadro 1**).

Componentes de la solución de digestión	Volumen por muestra (µL)
Nuclei Lysis Solution	200
0.5 M EDTA (pH 8.0)	50
Proteinasa K (20 mg/mL)	20
RNase A Solution	5
Volumen total	275

Cuadro 1. Solución de digestión del *kit* Wizard SV Genomic DNA Purification System

Nota: si la solución no cubre la muestra, se recomienda que se corte en pequeños pedazos.

2. Incubar en un termobloque la muestra toda la noche (16-18 h) a 55 °C.

Nota: no es necesario que la muestra esté en agitación durante la incubación.

3. Centrifugar la muestra por 2 min a 13 000 rcf y transferir 150 µL del supernadante a un tubo estéril de 1.5 mL y colocar en el termobloque a 55 °C.

4. Agregar 250 µL de **Wizard® SV Lysis Buffer** y mezclar con vórtex por 15 s.

Nota: el lisado se debe mantener caliente cuando se agregue el *buffer* de lisis.

5. Transferir 400 µL del lisado a una columna **Wizard® SV Minicolumn assembly** y centrifugar por 3 min a 13 000 rcf.

Nota: si todavía hay remanentes del lisado, centrifugar por 1 min a 13 000 rcf.

6. Remover la columna **Wizard® SV Minicolumn assembly** del tubo recolector, desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en él.

Nota: evitar que la columna toque el líquido que se va a desechar.

7. Agregar 650 µL de la solución **Column Wash Solution(CWA)** en la columna **Wizard® SV Minicolumn assembly**.

8. Centrifugar por 1 min a 13 000 rcf.

9. Remover la columna **Wizard® SV Minicolumn assembly** del tubo recolector, desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en él.

Nota: evitar que la columna toque el líquido que se va a desechar.

10. Repetir los pasos 7-9 tres veces más, en total serían cuatro lavados.

11. Remover la columna **Wizard® SV Minicolumn assembly** del tubo recolector, desechar el líquido y colocar de nuevo la columna en él. Centrifugar por 2 min a 13 000 rcf para secar la matriz.

12. Remover la columna **Wizard® SV Minicolumn assembly** y colocarla en un tubo estéril de 1.5 mL y agregar 100 µL de **Nuclease-Free Water** a T_{amb} a la columna e incubar por 2 min a T_{amb}.

Nota: para una mejor calidad del DNA, se recomienda calentar el agua a 65 °C antes de agregarla a la columna.

13. Centrifugar por 1 min a 13 000 rcf.
14. Remover la columna **Wizard® SV Minicolumn assembly** y conservar el tubo de 1.5 mL.
15. Cuantificar el DNA con un espectrofotómetro o nanodrop.
16. Almacenar el DNA a -20 °C o a 4 °C.

4.6. Metodologías para la extracción de RNA de *Solanum lycopersicum* L.

4.6.1. Método de extracción de RNA de *Solanum lycopersicum* L con el SV Total RNA Isolation System Cat. Z3105.

a) Equipos

-) Micropipetas con capacidad para diferentes volúmenes (2.5 µL, 10 µL, 100 µL, 200 µL y 1 000 µL).
-) Puntas estériles para micropipetas
-) Vórtex
-) Tubos estériles de microcentrífuga (1.5 mL y 2.0 mL)
-) Microcentrífuga con rotor para tubos de 1.5 mL y 2 mL
-) Termobloque (Eppendorf®) o baño maría con agitación o plataforma oscilante
-) Matrices de lisado "M" (MP Biomedicals®, No. 6923050)
-) Espectrofotómetro (Nanodrop 2000)

b) Reactivos

-) **Buffer de lisis de RNA (RLA) (+BME)**
-) **Lysis Buffer**
-) RNA Dilution Buffer (RDA Blue)
-) Etanol al 95%
-) **RNA Wash Solution (AWN) (+ etanol)** (AWN) (+ etanol)
-) Mezcla de incubación de ADNase
-) **DNase Stop Solution (DSA) (+ ethanol)**

c) **Procedimiento utilizando el kit SV Total RNA Isolation System Cat. Z3105**

1. Colocar 175 μl **RNA Lysis Buffer (RLA) (+ BME)** en un tubo esterilizado en autoclave.
2. Preparar la muestra para lisis.
3. Inmediatamente coloque la muestra en **Lysis buffer**. Mezcle completamente por inversión. Nota: Asegúrese de que la relación entre el *buffer* de lisis y la muestra sea la adecuada. Consulte la Tabla 1 del protocolo estándar*.
4. Agregue 350 μl **RNA Dilution Buffer (RDA Blue)**. Mezcle invirtiendo 3-4 veces.

Nota: Consulte la sección de preparación de lisado adecuada en el Manual técnico n.º TM048 para determinar si la muestra debe calentarse a 70 °C durante 3 minutos.

5. Centrifugar durante 10 minutos. Transfiera el lisado aclarado a un tubo nuevo.
6. Agregue 200 μl de etanol al 95%, al lisado aclarado y mezcle bien (pipeteo).
7. Transfiera la mezcla al ensamblaje de la canasta giratoria y centrifugue durante 1 minuto. Deseche.
8. Agregue 600 μl de **RNA Wash Solution (AWN) (+ etanol)** (AWN) (+ etanol). Centrifugar durante 1 minuto y desechar.
9. Prepare la mezcla de incubación de ADNase utilizando la siguiente tabla:

Solución	Volumen	Numero de muestras	Total
Yellow Core Buffer	40 μl	5	200 μl
MnCl ₂ , 0.09M	5 μl	5	25 μl
Dnase I	5 μl	5	25 μl

Mezclar por pipeteo, no aplicar vortex

10. Aplique 50 µl de **mezcla de DNase** a la membrana. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
11. Añadir 200 µl de DNase **Stop Solution (DSA) (+ ethanol)** y centrifugar durante 1 minuto.
12. Agregue 600 µl de solución **RNA Wash Solution (AWN)**; centrifugue durante 1 minuto. Desechar.
13. Agregue 250 µl de solución **RNA Wash Solution (AWN)**; centrifugar durante 2 minutos. Transfiera la cesta de centrifugación al tubo de elución.
14. Agregue 100 µl de agua libre de nucleasas a la membrana. Centrifugar durante 1 minuto para eluir el ARN y almacenar a -70°C .

TA: temperatura ambiente

Centrifugación: 12 000–14 000 × g (a TA).

4.6.2. Método de extracción de RNA de *Solanum lycopersicum* L. con el kit RNeasy Plant Mini de Qiagen (No. Cat: 74104)

a) Equipos

-) Micropipetas con capacidad para diferentes volúmenes (2.5 µL, 10 µL, 100 µL, 200 µL y 1 000 µL).
-) Puntas estériles para micropipetas
-) Vórtex
-) Tubos estériles de microcentrífuga (1.5 mL y 2.0 mL)
-) Microcentrífuga con rotor para tubos de 1.5 mL y 2 mL
-) Termobloque (Eppendorf®) o baño maría con agitación o plataforma oscilante
-) Matrices de lisado “M” (MP Biomedicals®, No. 6923050)
-) Espectrofotómetro (Nanodrop 2000)
-) QIAshredder (lila)
-) RNeasy Mini (rosa)

b) Reactivos

-) Buffer RLC

-) -mercaptoethanol
-) Buffer RLT
-) Nitrógeno líquido
-) ARNasa
-) Buffer RLT
-) Etanol (96–100 %)
-) Buffer RW1
-) Buffer RPE

c) Procedimiento utilizando el kit RNeasy Plant Mini de Qiagen (No. Cat: 74104)

El kit RNeasy Plant Mini ofrece una selección de *buffers* de lisis. El *buffer* RLT es el más recomendable, pero el *buffer* puede provocar que se solidifiquen algunas muestras, dependiendo de la cantidad y tipo de metabolitos secundarios en el tejido, en ese caso se recomienda utilizar *buffer* RLC.

Añadir 10 µL -mercaptoethanol, o 20 µL a 2 M de ditioneitol a 1 mL de *buffer* RLT o RLC antes de usar.

1. Destruir un máximo de 100 g de material vegetal de acuerdo con el paso 1a o 1b.
 - 1a. Usar un disruptor con mortero y agregar inmediatamente el nitrógeno líquido. Moler a fondo. Decantar el polvo de tejido y el nitrógeno líquido en un tubo de microcentrífuga de 2 ml refrigerado por nitrógeno líquido y sin la muestra de ARNasa. Permita que el nitrógeno líquido se evapore, pero no permita que el tejido se descongele. Continúe inmediatamente con el paso 2.
 - 1b. Usar un disruptor para obtener información detallada sobre la interrupción de tejidos vegetales para la purificación de ARN, consulte el Manual de TissueLyser, el Manual de TissueLyser LT o el Manual de TissueRuptor.

2. Agregar 450 μL de *Buffer* RLT o *Buffer* RLC hasta un máximo de 100 mg de polvo de tejido. Dar Vórtex.
3. Transferir el lisado a una columna de centrifugación QIAshredder (lila) a un tubo de recogida de 2 ml. Centrifugue durante 2 min a máxima velocidad. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga sin perturbar el sedimento de restos celulares.
4. Agregar 0.5 volúmenes de etanol (96–100 %) al lisado aclarado y mezcle inmediatamente pipeteando. No centrifugar. Continúe inmediatamente con el paso 5.
5. Transferir la muestra (generalmente 650 μL), con cualquier precipitado, a una columna de centrifugación RNeasy Mini (rosa) en un tubo de recolección de 2 mL (suministrado). Cierre la tapa y centrifugue durante 15 s a 8000 x g (10 000 rpm). Deseche el flujo continuo. Pesar entre 100 mg y 250 mg de semilla.
6. Agregar 700 μL de buffer RW1 a la columna de centrifugación RNeasy. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 s a 8000 g. Deseche el flujo continuo.

Nota: dependiendo de la variedad de la semilla, el peso puede corresponder a una semilla y previo al pesaje, la semilla se debe encontrar seca.

7. Agregue 500 μL de tampón RPE a la columna de centrifugación RNeasy. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 s a 8000 x g. Deseche el flujo continuo. Colocar la semilla dentro de una matriz con balines y agregar 1.5 mL de agua libre de nucleasas
8. Agregue 500 μL de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy. Cierre la tapa y centrifugue durante 2 min a 8000 x g. Opcional: Coloque la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo de recogida de 2 mL (suministrado). Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min para secar la membrana.

Nota: se recomienda usar el tubo de macerado “Metal Bead Lysing Matrix”, ref: 6925500 de MP BIOMEDICALS.

9. Coloque la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo de recogida de 1.5 mL (suministrado). Agregue de 30 a 50 μ L de agua sin ARNasa directamente a la membrana de la columna de centrifugado. Cierre la tapa y centrifugue durante 1 min a 8000 x g para eluir el ARN. Incubar la matriz dentro de un vaso de precipitado con agua destilada a 25 °C por 24 h (tipo baño maría).
10. Si el rendimiento de ARN esperado es >30 μ g, repita el paso 9 con otros 30–50 μ L de agua libre de ARNasa. Alternativamente, use el fluido del paso 9 (si se requiere una alta concentración de ARN). Reutilice el tubo de recolección del paso 9.

5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

5.1. Resultados de métodos de extracción en *Zea mays*

Se realizan cambios en la metodología de CTAB 2% como primer cambio se retira el NaCl para obtener muestras más puras para la cuantificación por espectrofotometría, esto debido a que el uso de NaCl puede afectar la calidad y pureza del ADN obtenido, especialmente en muestras vegetales, debido a su capacidad de precipitar polisacáridos y proteínas, lo que puede resultar en una reducción en el rendimiento y en la recuperación de DNA funcionalmente activo (1). Como segundo cambio realizado a la metodología de CTAB 2% es cambiar la homogenización por inversión por vortex debido a que la técnica de Vortex tiene varias ventajas sobre la técnica de homogenización. El proceso de homogenización puede ser laborioso y requiere una gran cantidad de tiempo y esfuerzo. Por otro lado, la técnica de Vortex es rápida y fácil de realizar, lo que puede ayudar a reducir los tiempos de extracción de DNA.

En segundo lugar, la técnica de Vortex puede mejorar la calidad y pureza del DNA extraído. En una comparación entre la homogenización y la extracción de DNA con Vortex, un estudio encontró que la técnica de Vortex produjo una mayor calidad y cantidad de DNA extraído en comparación con la homogenización. Además, la extracción de DNA con Vortex fue más eficiente en la eliminación de impurezas y contaminantes.

Para la metodología de Zymo se modificaron las rcf en la centrifuga duplicando las mismas, una mayor velocidad de centrifugación puede mejorar la separación de las células y los tejidos vegetales. Esto podría aumentar el rendimiento y la calidad del DNA extraído. Según un estudio publicado en el Journal of Plant Research, la centrifugación a velocidades más altas puede mejorar la extracción de DNA en algunas especies de plantas debido a una mayor eficiencia en la liberación de las células de la pared celular (Sahoo et al., 2013).

Además, una centrifugación más rápida también puede acelerar el proceso de sedimentación de los sedimentos celulares y minimizar la presencia de contaminantes y otros artefactos en la muestra ADN. Según un estudio publicado en el Journal of Agricultural and Food Chemistry, una centrifugación más fuerte puede reducir la cantidad de polisacáridos y lípidos presentes en la muestra de ADN, disminuyendo así el riesgo de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Zhang et al., 2015).

5.1.1. Cuantificación del DNA por espectrofotometría

Se obtuvieron las calidades y concentraciones de los métodos utilizados en las extracciones de DNA *Zea mays* reportadas en el **Cuadro 5**.

Cuadro 5. Concentraciones y calidades obtenidas de los 3 métodos evaluados y el método CTAB 2% a Ph= 8 junto con sus códigos internos y la muestra evaluada.

Método de extracción de DNA	Muestra	Código	Concentración ng/μL	260/280	260/230	Muestra	Código	Concentración ng/μL	260/280	260/230
Metodología de extracción de DNA usando CTAB 2 % con PVP a pH=8	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_1	191.9	2.09	2.01	Variedad 3	CTAB_Fre_1	46.5	1.77	2.15
	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_2	6.8	1.89	1.07	Variedad 3	CTAB_Fre_2	190.9	1.86	1.55
	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_3	65.7	1.89	1.06	Variedad 3	CTAB_Fre_3	74	1.93	1.21
	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_4	16.7	1.85	1.41	Variedad 3	CTAB_Fre_4	130	1.71	2.39
	Variedad 1 (roja)	CTAB_T_5	92	2.06	1.72	Variedad 3	CTAB_Fre_5	93.1	1.86	2.08
Método de extracción de DNA con el Kit DNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen (No. Cat: 69106).	Variedad 1 (roja)	Q-1	10.2	1.66	1.22	Variedad 3	Q-F-1	4.5	1.64	0.24
	Variedad 1 (roja)	Q-2	8.7	1.62	1.73	Variedad 3	Q-F-2	2	1.27	0.1
	Variedad 1 (roja)	Q-3	9	1.66	1.42	Variedad 3	Q-F-3	4.1	1.78	0.22
	Variedad 1 (roja)	Q-4	9.3	1.78	1	Variedad 3	Q-F-4	4.1	1.43	0.23
	Variedad 1 (roja)	Q-5	10	1.63	1.02	Variedad 3	Q-F-5	3.2	0.94	1.07
Método de extracción de DNA con el kit ZYMO Quick-DNA™	Variedad 1 (roja)	Z-M-1	176.9	1.83	1.95	Variedad 3	Z-F-6	51.6	1.88	1.23
	Variedad 1 (roja)	Z-M-2	168.8	1.83	1.95	Variedad 3	Z-F-7	45.7	1.73	1.14

Plant/Seed Miniprep. Cat. No. D6020.	Variedad 1 (roja)	Z-M-3	169.7	1.83	1.9	Variedad 3	Z-F-8	34.4	1.85	0.62
	Variedad 1 (roja)	Z-M-4	173.2	1.84	1.92	Variedad 3	Z-F-9	42.4	1.85	0.62
	Variedad 1 (roja)	Z-M-5	183.9	1.83	1.96	Variedad 3	Z-F-10	42.4	1.81	0.87
Método de extracción de DNA con el Wizard SV Genomic DNA Purification System de Promega (No. Cat: A2361).	Variedad 1 (roja)	W-1	40.1	2.05	1.34	Variedad 3	W-F-6	6.5	1.61	0.69
	Variedad 1 (roja)	W-2	35	1.98	1.78	Variedad 3	W-F-7	5.2	1.56	1.05
	Variedad 1 (roja)	W-3	10.9	2.03	1.03	Variedad 3	W-F-8	8.2	1.52	0.69
	Variedad 1 (roja)	W-4	35.1	2.01	0.03	Variedad 3	W-F-9	10.9	1.53	0.9
	Variedad 1 (roja)	W-5	47.1	1.45	1.48	Variedad 3	W-F-10	5	1.53	0.56

5.2. Resultados análisis estadísticos de métodos de extracción en *Zea mays*.

En esta investigación se hizo una prueba ANOVA para comparar las medias de cuatro grupos: CTAB 2%, Qiagen, ZYMON y Promega.

La prueba ANOVA se utiliza para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de tres o más grupos. En este caso, el modelo tiene cuatro grupos, cada uno representado por un tipo de kit de extracción de DNA (CTAB 2%, Qiagen, ZYMON y Promega).

5.2.1. Calidad de DNA A260/280 en Muestras en Mazorca

En esta prueba ANOVA donde se avalúo la calidad de DNA $A_{260/280}$, se evaluó la hipótesis nula de que no hay diferencia significativa entre las medias de al menos tres grupos.

Los resultados de la prueba ANOVA muestran que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tres grupos (Valor $F = 7.11341$, $Prob > F = 0.00298$). La suma de cuadrados entre los grupos es de 0.6393, con un cuadrado medio de 0.2131, lo que indica que hay una variación significativa entre las medias de los tres grupos.

Para determinar dónde se encuentran las diferencias significativas entre las medias de los grupos, se utiliza el análisis con la prueba de Tukey (Figura 1).

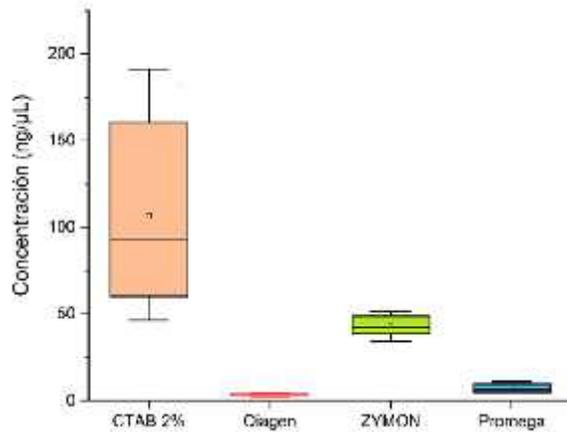


Figura 1. Los resultados de la prueba de Tukey muestran que hay una diferencia significativa entre la media del grupo Qiagen y la media de los grupos CTAB 2% y ZYMON. No hay diferencias significativas entre las medias de estos dos grupos.

5.2.2. Concentración ng/μL Muestras en Mazorca

Se realizó una prueba ANOVA para determinar si había diferencias significativas entre las medias de cuatro grupos diferentes. Los resultados muestran que hay una diferencia estadísticamente significativa entre al menos algunas de las medias, ya que el valor F es considerablemente alto (14.47631) y la probabilidad F es muy baja (<0.0001).

Para determinar cuáles de las medias son significativamente diferentes entre sí, se realizó una prueba post hoc de Tukey (Figura 2).

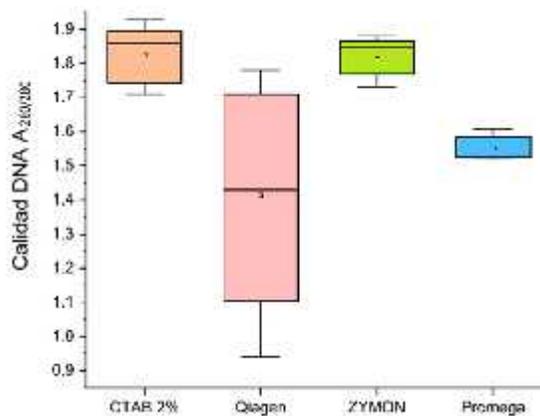


Figura 2. Los resultados indican que hay diferencias significativas entre las medias de todos los grupos, excepto entre los de Qiagen y Promega.

Podemos afirmar que hay una diferencia estadísticamente significativa entre al menos algunas de las medias de los cuatro grupos analizados. Las medias del grupo CTAB 2% son significativamente más altas que las de los otros tres grupos, mientras que las medias de ZYMON y Promega también difieren significativamente entre sí. Con una probabilidad F de 0.00298, se rechaza la hipótesis nula en favor de la variable habiendo una diferencia significativa entre las medias de al menos tres grupos.

5.2.3. Calidad de DNA $A_{260/280}$ en muestras en mazorca

Los datos recolectados se analizaron mediante un ANOVA de un solo factor para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro reactivos. El valor F obtenido fue 18.43779, con una probabilidad F de menos de 0.0001, lo que sugiere que hay una diferencia significativa entre los reactivos.

Posteriormente, se realizó un análisis de comparaciones de Tukey para determinar qué métodos eran significativamente diferentes entre sí (Figura 3).

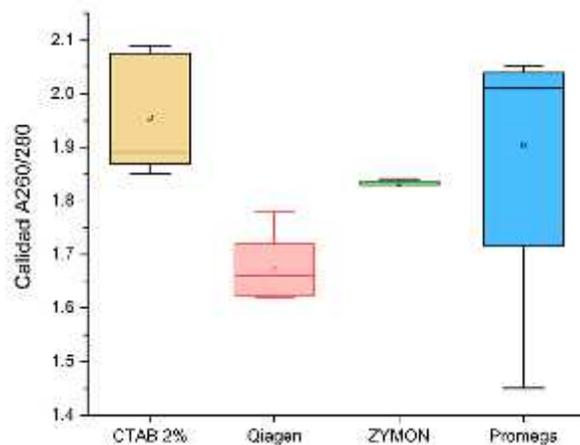


Figura 3. Los resultados mostraron que la media de CTAB 2% fue significativamente diferente de los demás métodos (Qiagen, ZYMON y Promega), mientras que no hubo diferencias significativas entre Qiagen, ZYMON y Promega.

5.2.4. Concentración ng/μL muestras en semilla

Los datos recolectados se analizaron mediante un ANOVA de un solo factor para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro reactivos. El valor F obtenido fue 18.43779, con una probabilidad F de menos de 0.0001, lo que sugiere que hay una diferencia significativa entre los reactivos. se realizó un análisis de comparaciones múltiples Tukey para determinar qué métodos eran significativamente diferentes entre sí. Los resultados mostraron que la media de CTAB 2% fue significativamente diferente de los demás reactivos (Qiagen, ZYMON y Promega), mientras que no hubo diferencias significativas entre Qiagen, ZYMON y Promega (Figura 4).

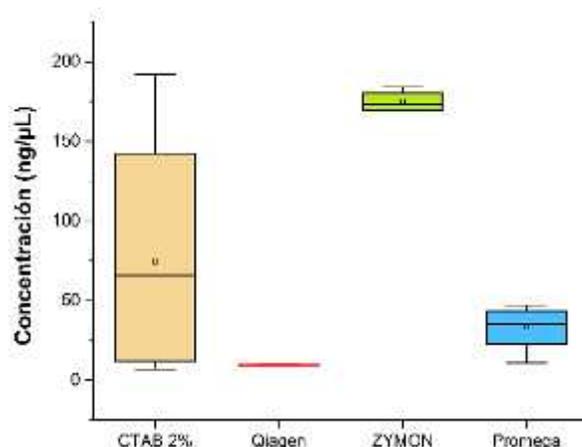


Figura 4. Los resultados sugieren que el uso de CTAB 2% en comparación con Qiagen, ZYMON y Promega puede tener un efecto significativo en el proceso estudiado, mientras que no hay diferencia significativa entre los otros tres reactivos.

5.3. Resultados de método de extracción de RNA de *Solanum lycopersicum* L.

5.3.1. Cuantificación del RNA por espectrofotometría

Se obtuvieron las calidades y concentraciones de los métodos utilizados en las extracciones de DNA *Zea mays* reportadas en el **Cuadro 6**.

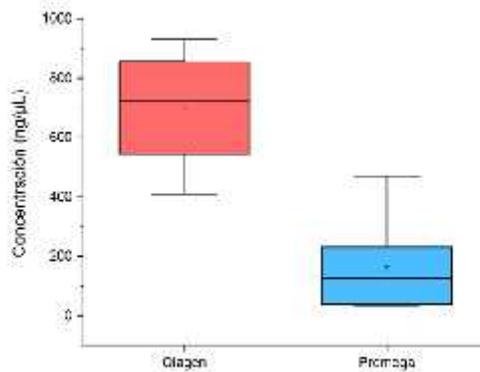
Cuadro 6. Concentraciones y calidades obtenidas de los 2 métodos evaluados y el método CTAB 2% a Ph= 8 junto con sus códigos internos y la muestra evaluada.

5.3.2. Concentración ng/μL muestras sin germinar

Método de extracción de RNA	Muestra Técnica Sin Germinar	Código	Concentración ng/μL	260/280	260/230	Muestra Técnica 10 días germinado	Código	Concentración ng/μL	260/280	260/230
Método de extracción de RNA con kit RNeasy® Plant Mini Kit de Qiagen (No. Cat: 74104).	TTC113ANGELLETY 1	SIL.S-P-1	730.6	2.13	2.02	TTC113ANGELLETY 1	SIL.P-P-1	11.6	1.95	0.66
	TTC113ANGELLETY 2	SIL.S-P-2	719.9	2.12	1.9	TTC113ANGELLETY 2	SIL.P-P-2	4.1	1.53	0.07
	TTC113ANGELLETY 3	SIL.S-P-3	931.3	2.15	2.09	TTC113ANGELLETY 3	SIL.P-P-3	15.2	1.91	0.42
	18P0011820. 1	SIL.S-P-4	829.1	1.99	1.3	18P0011820. 1	SIL.P-P-4	21	2.05	0.45
	18P0011820. 2	SIL.S-P-5	408.6	1.92	1.42	18P0011820. 2	SIL.P-P-5	28.8	2.09	1.46
	18P0011820. 3	SIL.S-P-6	588.5	2.05	0.98	18P0011820. 3	SIL.P-P-6	28.1	1.92	0.97
Método de extracción de RNA con el Wizard SV Total RNA Isolation System de Promega (No. Cat: Z3100, Z3101 AND Z3105).	TTC113ANGELLETY 1	SIL.S-RN-1	153.1	1.93	1.39	TTC113ANGELLETY 1	SIL.P-RN-1	182	2.13	1.72
	TTC113ANGELLETY 2	SIL.S-RN-2	34.7	1.87	0.06	TTC113ANGELLETY 2	SIL.P-RN-2	148.5	2.13	1.71
	TTC113ANGELLETY 3	SIL.S-RN-3	40.2	2	0.21	TTC113ANGELLETY 3	SIL.P-RN-3	246.1	2.14	1.94
	18P0011820. 1	SIL.S-RN-4	141.8	1.7	0.77	18P0011820. 1	SIL.P-RN-4	374	1.96	1.31
	18P0011820. 2	SIL.S-RN-5	111.3	1.86	0.92	18P0011820. 2	SIL.P-RN-5	115.4	2.14	1.81
	18P0011820. 3	SIL.S-RN-6	470.1	1.96	1.3	18P0011820. 3	SIL.P-RN-6	28.1	2.5	0.04

Los datos corresponden a un total de 12 muestras divididas en dos grupos, uno analizado con el kit de la marca Qiagen y el otro con el kit de la marca Promega. En este caso, el valor F de la prueba ANOVA es alto (29.68) y la probabilidad es muy baja (2.81594E-4), lo que nos indica que hay una diferencia significativa entre los grupos.

Para determinar cuáles de los grupos son significativamente diferentes entre sí se aplica la prueba de Tukey.

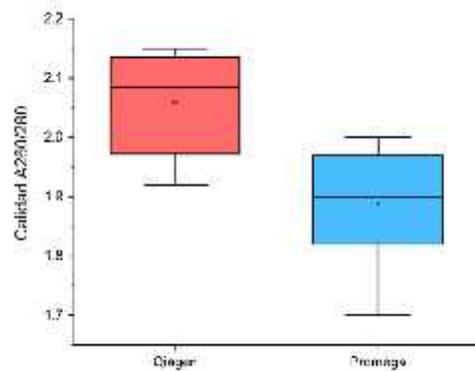


El resultado de la prueba nos indica que hay una diferencia significativa entre la media de Qiagen (701.33) y Promega (158.53), ya que la diferencia entre ellas es mayor que el valor de la SE de la media de ambos grupos.

5.3.3. Calidad de RNA $A_{260/280}$ en muestras sin germinar

Los resultados de la prueba ANOVA sugieren que existe una diferencia significativa entre las medias de ambos grupos (Valor F = 9.27934, Prob>F = 0.01233). Además, la suma total de cuadrados es de 0.18727, siendo la mayor parte de la variación (0.09013) atribuible a la diferencia entre los grupos y la menor parte (0.00971) al error de la medición.

Para determinar cuál grupo es significativamente diferente del otro, se realizó una prueba de Tukey.

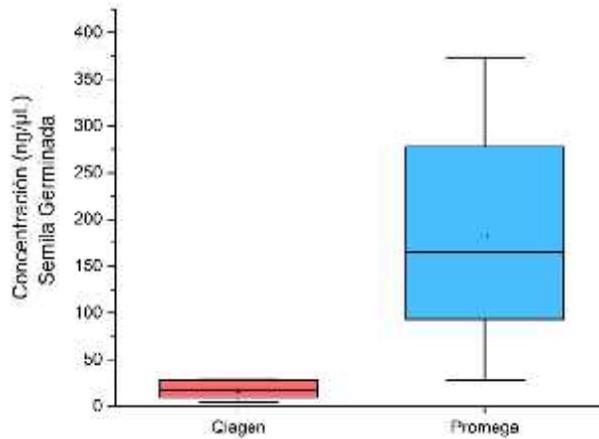


La diferencia significativa entre Qiagen y Promega se encuentra en el intervalo de confianza (IC) de 95% de la prueba Tukey, lo que indica que la media de Qiagen es significativamente mayor que la de Promega.

5.3.4. Concentración (ng/ μ L) muestras con 10 días de germinación

El resultado de la prueba ANOVA muestra que hay una diferencia significativa entre los dos análisis, ya que el valor F es mayor que 1 y la probabilidad F es menor que 0.05. Esto significa que hay una variación significativa entre los dos análisis.

Para identificar cuáles son los análisis que son significativamente diferentes, se realizó una prueba de Tukey.

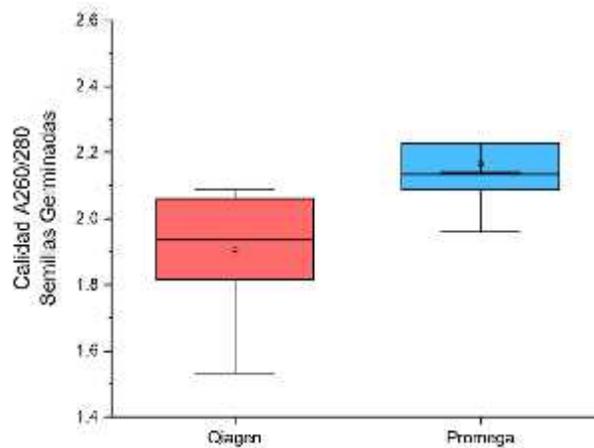


La prueba de Tukey muestra que hay una diferencia significativa entre Qiagen y Promega, ya que la media de Promega es significativamente mayor que la media de Qiagen.

En conclusión, la prueba ANOVA y la prueba de Tukey indican que hay una diferencia significativa entre los análisis de Qiagen y Promega, y que el análisis de Promega tiene una media significativamente mayor que el análisis de Qiagen.

5.3.5. Calidad de RNA $A_{260/280}$ en muestras con 10 días de germinación

La prueba ANOVA realizada indica que existe una significativa diferencia entre los niveles de Qiagen y Promega en el Análisis de N, ya que el valor de probabilidad es menor a 0.05, lo que indica que no se debe descartar la hipótesis nula de que los promedios son iguales.



La prueba de Tukey mostró que la media de Promega es significativamente mayor que la media de Qiagen, lo que indica que Promega es una mejor opción para el análisis de N.

5.4. Conclusiones

De acuerdo con los resultados estadísticos obtenidos en esta investigación sobre métodos de extracción de DNA en *Zea mays*, se puede concluir que el método ZYMON es superior en términos de calidad y cantidad de DNA obtenido en comparación con los métodos CTAB 2%, Qiagen y Promega. Los análisis estadísticos (ANOVA y Tukey) realizados en cada uno de los experimentos revelaron que existen diferencias significativas entre las medias de los diferentes grupos, siendo ZYMON el método que obtuvo las medias más altas y consistentes en todos los experimentos realizados. En consecuencia, se recomienda el uso de ZYMON para la extracción de DNA en futuros estudios y experimentos donde se requiera de alta calidad y concentración de DNA en *Zea mays*.

A partir de los resultados de los análisis estadísticos realizados en esta investigación sobre métodos de extracción de RNA en *Solanum lycopersicum* L., se concluye que Promega es una mejor opción que Qiagen en términos de concentración y calidad de RNA en muestras tanto sin germinar como con 10 días de germinación. En ambos casos, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambas opciones según los resultados de las pruebas ANOVA y de Tukey. En cuanto a la concentración, las medias obtenidas con el uso de Promega fueron significativamente más altas que las obtenidas con Qiagen en muestras sin germinar y con 10 días de germinación, mientras que en cuanto a la calidad de RNA, Promega nuevamente presentó una media significativamente mayor que Qiagen en ambas muestras. Estos resultados sugieren que Promega puede ser una opción más efectiva para la extracción de RNA en *Solanum lycopersicum* L. para estudios futuros.

1. Diario Oficial de la Federación, 2012. ACUERDO por el que se determinan Centros de Origen y Centros de Diversidad Genética del Maíz. <http://www.dof.gob.mx/>
2. Doebley J. Molecular Evidence and the Evolution of Maize. *Econ Bot.* 1998; 52(2):108-17. doi:10.1007/BF02861273
3. Kasem S, Rice N, Henry R. DNA extraction from plant tissue. In: Henry RJ, editor. *Plant genotyping II: SNP technology*. Wallingford: CAB International; 2008. p. 219–71.
4. Khan Academy. Resumen: clonación de ADN (s.f.). Recuperado el 20 de marzo de 2019 de <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/overview-dna-cloning>
5. Lobato, O., R., E. Rodríguez G., J. C. Carrillo R., J. L. Chávez S., P. Sánchez P. y A. Aguilar M. 2012. Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances en la Red de Jitomate. SINAREFI-SAGARPA. México. 59 pp.
6. Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, J. Sánchez G., E. Buckler and J. Doebley 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 6080-6084 p.
7. Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(9):6080-6084. doi:10.1073/pnas.052125199.
8. Messmer MM, Vargas M, Stamp P, et al. Genetic Basis of Heterosis for Growth-Related Traits in Maize. In: Jørgensen RB, Andersen SB, Hauser TP, eds. *Advances in Maize*. CRC Press; 2019:21-45. doi:10.1201/9780429422215-2.
9. Müller L, Hirschberg J, Sandmann G. Importance of light for the accumulation of β -carotene in tomatoes. *J Plant Physiol*. 1999;135(2):119-125. doi:10.1016/S0176-1617(99)80025-7
10. National Human Genome Research Institute. Clonación. (2015). Recuperado el 20 de marzo de 2019 de <https://www.genome.gov/27562613/clonacin/>
11. Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers –just a matter of fashion? *Nature Reviews* 5: 63-69.
12. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Laboratorio de Biología Molecular. (2016). Recuperado el 20 de marzo de 2019 de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/laboratorio-de-biologia-molecular>
13. Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:199-201.

14. Ríos Gálvez S, Parra N, Veillet F, et al. Use of RNA-seq data to identify differentially expressed genes related to fruit development and ripening in tomato. *Front Plant Sci.* 2017;8:13. doi:10.3389/fpls.2017.00013.
15. Rubio-Cabetas MJ, López-Marqués R, Cuezva JM, et al. Comparative proteomics and electron microscopy analysis of *Solanum lycopersicum* La and its nuclear-form mutants reveal new insights into the role of light in tomato fruit development and ripening. *Plant Sci.* 2020;294:110442. doi:10.1016/j.plantsci.2020.110442
16. Simkin AJ, Ruiz-Vera U, Valdes AE, et al. Photosynthesis in tomato plants carrying different gene constructs for enhancing fruit vitamin C content. *Plant Biotechnol J.* 2020;18(7):1629-1641. doi:10.1111/pbi.13359.
17. Joosen RV, et al. RNA-seq Analysis Identifies Candidate Genes for Key Traits Controlling the Development of Tomato Fruit Shape. *Front Plant Sci.* 2019;10:471. doi:10.3389/fpls.2019.00471. lark RM, Linton E, Messing J, et al. Single nucleotide polymorphism and haplotype diversity in maize genes: implications for the evolution of maize germplasm and the use of SNP genotyping in maize. *Mol Ecol.* 2004;13(11):2623-2638. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02181.x.
18. Hufford MB, Xu X, van Heerwaarden J, et al. Comparative population genomics of maize domestication and improvement. *Nat Genet.* 2012;44(7):808-811. doi:10.1038/ng.2309.
19. Li Y, Zheng Y, Liu X, et al. Genetic control of domestication traits in cultivated maize. *Nat Genet.* 2020;52(6):647-655. doi:10.1038/s41588-020-0632-1
20. Ross-Ibarra J, Tenaillon M, Gaut BS. Historical divergence and gene flow in the genus *Zea*. *Genetics.* 2009;181(4):1399-1413. doi:10.1534/genetics.108.099129.
21. Liao L, Liu P, Li X, et al. Comparative Proteomics Analysis of the Polyphenol and Flavonoid Accumulation in the Molecular System of Tomato Fruit Development. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):620. doi:10.3390/ijms20030620.
22. Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, et al. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(20):11479-11484. doi:10.1073/pnas.201394398.
23. Roncallo PF, Fagnani MA, Quiroga MP. Molecular Genetic Basis of Tomato Fruit Quality. In: Pérez-Miranda M, editor. *Molecular Analysis of Plant Adaptation to the Environment*. London, United Kingdom: IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.90893.
- 24.