

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGÍA



Estandarización de la extracción del ácido desoxirribonucleico de maíz (*Zea mays* L.).

Por:

ALBERTO HERNÁNDEZ SOSA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

Torreón, Coahuila, México
Junio 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGÍA

Estandarización de la extracción del ácido desoxirribonucleico de maíz (*Zea mays* L.).

Por:

ALBERTO HERNÁNDEZ SOSA

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

Aprobada por:



Dr. Jesús Vásquez Arroyo
Presidente



M.C. Eduardo Blanco Contreras
Vocal



M.C. Gerardo Zapata Sifuentes
Vocal



M.Sc. Emilio Duarte Ayala
Vocal



M.C. Víctor Martínez Cueto
Coordinador de la División de Carreras Agronómicas



Torreón, Coahuila, México
Junio 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGÍA

Estandarización de la extracción del ácido desoxirribonucleico de maíz (*Zea mays* L.).

Por:

ALBERTO HERNÁNDEZ SOSA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Jesús Vásquez Arroyo
Asesor Principal

M.C. Eduardo Blanco Contreras
Coasesor

M.C. Gerardo Zapata Sifuentes
Coasesor

M.C. Víctor Martínez Cueto
Coordinador de la División de Carreras Agronómicas



Torreón, Coahuila, México
Junio 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a ti, mi ALMA TERRA MATER, en vida para la formación de grandes hombres y mujeres llenos de sabiduría, como privilegio de brindarme la oportunidad de estudiar y acogerme en tu seno, dándome esa esencia, mente y fuerza que me unen para un solo fin.

Le agradezco al Dr. JESUS VASQUEZ ARROYO, por permitirme trabajar con esta investigación y contar con su disponibilidad en todo momento de las necesidades; por su persona, su confianza, y porque fue imprescindible para poder culminar con esta etapa importante de mi vida académica y personal.

A mis PROFESORES, por su grandeza, su respetuosa formación académica en pos para enseñar y guiar, por la paciencia, el apoyo incondicional (moral y profesional); por hacerles reconocer mi entera satisfacción, por su labor y porque fueron un gran pilar para mantenerme siempre firme.

A mi FAMILIA, porque siempre han creído en todo lo que soy y en mi capacidad para seguir alcanzando mis metas, por el sacrificio y el esfuerzo, y por la dicha de ser parte de mí; porque de ellos prendí mi formación de ser un buen hombre con muchos valores.

A mis AMIGOS, por el esmero y la voluntad de ayudarme, por su empatía, por determinar en mí el ahínco, y por consagrarme algo único en la vida, su amistad.

DEDICATORIA

Dedico, enteramente, este esfuerzo a mi padre Facundo Hernández, a mi madre Isabel Sosa y a mis hermanos Jorge, Miguel, Angélica y Pedro, porque han caminado conmigo en la vida; que han sido la razón de mi alegría y el motivo que me impulsa en cada día las ganas de salir adelante para ser una mejor persona, por la lealtad y confianza inteligible que solo en la familia puede haber, para recompensar el inmenso amor y dedicación que me han brindado. Les dedico este logro en distintiva de lo mucho que los quiero, de todo lo que representan para mí y de mi infinita gratitud.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN	vii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.2 GENERAL	2
1.1.3 PARTICULARES	2
1.2 HIPÓTESIS	2
CAPÍTULO II.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 BREVE HISTORIA DE LA AGROECOLOGÍA.....	3
2.1.1 LA AGROECOLOGÍA EN MÉXICO	4
2.2 EL CULTIVO DE MAÍZ.....	5
2.2.1 RAZAS DE MAÍZ.....	7
2.2.2 VARIABILIDAD GENÉTICA.....	8
2.2.3 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	9
2.2.4 CENTRO DE ORIGEN Y DIVERSIFICACIÓN	9
2.3 ALTERACIONES EN EL DNA.....	10
2.3.1 MARCADORES MOLECULARES.....	11
2.3.2 REPRODUCIBILIDAD	12
2.3.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE EXTRACCIÓN DE DNA.....	12
2.4 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS	13
2.4.1 MECANISMOS RETROTRANSPOSONES	13
2.4.2 SECUENCIAS REPETIDAS ETIQUETADAS INVERSAS (ISTR, INVERSE SEQUENCE TAGGED REPEATS), MEDIANTE PCR.....	14

2.4.3 TAXONOMÍA NUMÉRICA	17
2.4.4 COEFICIENTE DE SIMILITUD	19
2.4.5 ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS DE LABORATORIO	19
2.5 VOCABULARIO	19
2.5.1 METROLOGÍA. CONCEPTOS FUNDAMENTALES Y GENERALES, Y TÉRMINOS ASOCIADOS (VIM)	19
2.5.2 MAGNITUDES Y MEDIDAS	20
2.5.3 MEDICIONES.....	22
CAPÍTULO III.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO	28
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
3.3. REACTIVOS	28
3.4 PARA EXTRACCIÓN DEL DNA.....	29
3.4.1 Primera Extracción.....	29
3.4.2 Segunda Extracción.....	30
3.5 Determinación de concentración (ng mL^{-1}), pureza (relación absorbancia a λ A230/A260) y rendimiento del DNA ($\text{ng mg de tejido}^{-1}$)	30
3.6. Diseño Experimental.....	30
3.7. Análisis de datos.....	31
CAPÍTULO IV.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 Primera extracción de DNA en hojas de maíces criollos.....	32
4.1.1. Concentración (ng mL^{-1}).....	32
4.1.2. Pureza y rendimiento (ng mg^{-1} de biomasa en peso seco).....	33
4.2 Segunda extracción de DNA en hojas de maíces en los genotipos.....	36
4.2.1 Concentración (ng mL^{-1}).....	36
4.2.2 Pureza del DNA extraído y rendimiento en hojas de las variedades de maíz Antílope y TL-2440	36
4.3 Comparación de la extracción del DNA y pureza en hojas de dos variedades de maíz Antílope y TL-2440.....	39
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Magnitudes.	20
Cuadro 2. De magnitudes básicas.	22
Cuadro 3. Unidades básicas.	22
Cuadro 4. Prefijos SI para múltiplos y submúltiplos.	23
Cuadro 5. Condiciones de extracción de DNA para ensayos experimentales con maíces criollos (2), con 100 mg de muestra (primera extracción) y las variedades Antilope y TL-2440, con 50 mg de muestra (segunda extracción).	29
Cuadro 6. Resultados promedios de la extracción de DNA (ng mL^{-1}), pureza (relación A230/A260) y rendimiento (ng mg^{-1} de tejido), utilizando Nanodrop (equipos, dos); en razas (Dos) de maíz (<i>Zea mays</i> L.); empleando diferentes concentraciones del buffer de lisis (mM). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.	32
Cuadro 7. Análisis de varianza para la cuantificación de extracción de DNA de dos razas de maíz, utilizando dos equipos de medición, con dos concentraciones del buffer de extracción, muestra de 100 mg y cinco repeticiones.	34
Cuadro 8. Análisis de varianza para la pureza del DNA extraído de dos genotipos de maíz, utilizando dos equipos de medición, con dos concentraciones del buffer de extracción, muestra de 100 mg y cinco repeticiones.	35
Cuadro 9. Análisis de varianza para la cuantificación del DNA en dos equipos de medición, realizando determinación por duplicado, con cuatro concentraciones del buffer de extracción.	37
Cuadro 10. Análisis de varianza en la determinación de pureza de extracción del DNA de hojas de maíz criollo en dos equipos de medición, realizando determinación por duplicado, con cuatro concentraciones del buffer de extracción.	38
Cuadro 11. Comparativo del rendimiento en DNA extraído utilizando dos equipos de medición, cuatro buffer de lisis y 15 repeticiones.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dendograma de los análisis de SSR para tres líneas de maíz. (Torres-Morán <i>et al.</i> , 2012)	17
Figura 2. Dendograma de los ISTR de tres líneas de maíz. (Torres-Morán <i>et al.</i> , 2012)...	18
Figura 3. Extracción de DNA (ng mL) en dos razas de maíz (<i>Zea mays</i> L.), utilizando Nanodrop (equipos, dos); empleando diferentes concentraciones del buffer de lisis (mM), con cinco repeticiones por tratamiento.	33
Figura 4. Resultados del efecto de la concentración del buffer de lisis sobre la cantidad (ng/g) extracción del DNA de maíz criollo, utilizando dos quipos para cuantificación; Nanodrop (Nano 1 y Nano 2), realizando la determinación por duplicado (a y b).	37
Figura 5. Resultados del efecto de la concentración del buffer de lisis sobre la pureza de la extracción del DNA de maíz criollo, utilizando dos quipos para cuantificación; Nanodrop (Nano 1 y Nano 2), realizando la determinación por duplicado (a y b).	38
Figura 6. Valores promedio de la extracción (ng mL ⁻¹) (Barra) y pureza de DNA (relación A ₂₃₀ /A ₂₆₀ entre 1.8-2.0) (Líneas) en un genotipo de maíz (<i>Zea mays</i> L.) utilizando cuatro concentraciones de buffer de lisis (mM) y dos equipos Nanodrop de la misma marca. Se utilizaron 15 repeticiones por tratamiento.	39

RESUMEN

Se desarrolló un protocolo simple y eficiente para aislar DNA genómico, evaluando un muestreo adecuado mediante métodos apropiados y validados de extracción. El DNA genómico se extrajo de tejidos foliares jóvenes de maíz. La concentración, calidad y rendimiento del DNA extraído se determinó con el espectrofotómetro de dos instituciones. La disponibilidad de métodos validados, materiales de referencia certificados, así como de todos los reactivos y kits de extracción es crucial para implementar metodologías adecuadas de rutina. Se realizó este estudio para determinar la concentración de extracción de DNA, pureza y rendimiento con el efecto de cuatro concentraciones de buffer de lisis (200, 250, 300 y 400 mM), utilizando dos equipos para la cuantificación y pureza (Nanodrop), con 100 y 50 mg de muestra de maíz, con cinco y 15 repeticiones respectivamente. Para las muestras de 100 mg, se utilizaron las variedades de maíz ANTILOPE y TL-2440 utilizando dos concentraciones de buffer de lisis (200, 400 mM). Los resultados de análisis de varianza mostraron diferencias altamente significativas en equipos de cuantificación ($P < 0.001$) y significativas con el genotipo ($P < 0.05$), en el cual, con el Nanodrop 1 se obtienen resultados para cuantificación de la extracción de DNA más altos; sin embargo en la determinación del promedio de pureza del DNA, el equipo 2 fue de mayor eficacia. Este estudio fue para evaluar el rendimiento, calidad y se requiere de análisis posterior, con el fin de formular recomendaciones racionales a los laboratorios para implementar las técnicas moleculares apropiadas para el procesamiento y análisis de la muestra de maíz en campo.

Palabras clave: Hojas de maíz (*Zea mays*), Genotipo, Extracción de DNA, Pureza de DNA.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La extracción de ADN de calidad para estudios moleculares, plantea un desafío en la mayoría de los países en desarrollo, ya que el nitrógeno líquido, un componente importante de la extracción, es caro y no está disponible (Adentumbi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013, Zahng *et al.*, 2013). Edwards *et al.* (1991), indica un método simple de realizar extracción ADN de plantas para análisis por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), sin utilizar fenol ni cloroformo, sin embargo, no se indican los datos de concentración ni calidad del ADN. Eso no lo hace un método validado, puesto que no se utiliza de manera universal. Por otra parte, Ramos *et al.* (2014), indican que empleando protocolos comúnmente para la extracción de ADN de origen vegetal, resultando poco exitosos. La extracción de ADN genómico de calidad de plantas se complica por la presencia de metabolitos secundarios, lo que reduce la cantidad y calidad del mismo (Chabi-Sika *et al.*, 2015).

El aislamiento de suficiente DNA genómico en cantidad y calidad es vital para experimentos de biología molecular. Diversos materiales intracelulares en plantas interfieren con el aislamiento y limpieza del DNA (Zahng *et al.*, 2013). Una diversidad de métodos de aislamiento se han publicado, entre ellos se incluyen: el de duodecil sulfato de sodio (SDS) (Marmur, 1961), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1990), pH bajo alto en sales (Guillemaut y Merechal-Drouard, 1992), extracción con sales (Aljanabi y Martínez, 1997) e hidróxido de sodio (Hill-Ambroz *et al.*, 2002).

El principio del uso del SDS a altas concentraciones es para lisar células, seguido de la adición de cloroformo-alcohol isoamílico para remover biomoléculas diferentes al DNA, tales como proteínas y lípidos, para finalmente precipitar el DNA con isopropanol (Natarajan *et al.*, 2016). Además de la extracción manual de DNA con SDS, diversos kits comerciales se han desarrollado. Sin embargo, se ha

señalado a menudo que están fuera de la eficacia de la lisis celular (Zhou *et al.*, 1996).

En México, se emplearon cinco protocolos comerciales diferentes para extraer y purificar ADN genómico de diversos tejidos de maíz, analizando los resultados por espectrofotometría, por electroforesis en gel y como sustrato para una PCR de punto final y Tiempo Real (Acatzi *et al.*, 2014). Los resultados indicaron la necesidad de DNA altamente amplificable, en lugar de altos rendimientos de extracción, para un análisis consistente (San Juan Badillo *et al.*, 2014).

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 GENERAL

Validar metodologías de biología molecular que contribuyan a la conservación y biodiversidad del germoplasma agrícola nacional.

1.1.3 PARTICULARES

Promover las mejores prácticas de laboratorio de biología molecular en lo general y de extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) de plantas de maíz en lo particular.

Contribuir con la comunidad científica regional en la reducción de esfuerzo y la mejora de la eficiencia y efectividad del desarrollo, adaptación, diseminación e implementación de metodología de extracción de ADN, con base en evidencias.

1.2 HIPÓTESIS

La extracción de DNA de hojas de plantas de maíz será eficiente y reproducible al validarse inter e intralaboratorios regionales.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 BREVE HISTORIA DE LA AGROECOLOGÍA

Los conocimientos y las prácticas utilizadas por los indígenas y campesinos de Mesoamérica, los Andes y el trópico húmedo constituyen las raíces de la Agroecología en América Latina. En la década de los 70s y 80s, Steve Gliessman y su grupo en el entonces Colegio Superior de Agricultura Tropical (CSAT) en Tabasco, México, inspirados por el trabajo de Efraín Hernández-Xolocotzi reconocieron que esta información empírica basada en la observación y en la práctica y con fuerte arraigo cultural, constituía una fuente de conocimiento para conceptualizar y aplicar la Agroecología (Altieri, 2015).

La agroecología fue adoptada fuertemente por las organizaciones no gubernamentales en la década (1980-1990) impulsadas por Movimiento Agroecológico Latino Americano (MAELA) y por el Consorcio Latino Americano de Agroecología y Desarrollo (CLADES) que constituyó un programa regional de investigación, capacitación y extensión diseñado a fortalecer a los técnicos y campesinos en los principios y prácticas de la Agroecología (Altieri, 2015).

La corriente más académica de la agroecología se consolida a nivel regional a través de la creación de la Sociedad Científica Latino Americana de Agroecología (SOCLA) formada en 2007 (Altieri, 2015).

Es la década 1990, Eduardo Sevilla-Guzmán y su grupo del Instituto de Sociología y Estudio Campesino (ISEC) desarrollan el cuerpo teórico de la sociología agroecológica que reformula los antiguos supuestos y enfoques sociológicos para un nuevo estilo de desarrollo agrícola y rural. Esta perspectiva más sociocultural es también reforzada por las contribuciones etnoecológicas de Víctor Manuel Toledo, de la UNAM en México (Altieri, 2015).

La agroecología constituye una alternativa a la agricultura industrial y lo hace sin el uso de agroquímicos y transgénicos usando principios que permiten rediseñar agroecosistemas diversificados, productivos y resilientes. Posición que se expresó en las conferencias regionales que FAO organizó en América Latina, Asia y África (Altieri, 2015).

2.1.1 LA AGROECOLOGÍA EN MÉXICO

La introducción, estabilización y adopción del modelo agroindustrial en México fue un proceso complejo en el que participaron agentes e instituciones diversas. A decir de Cotter (2003) dicho proceso de modernización inició tras el fin de la Revolución Mexicana, cuando mediante distintas estrategias se buscó transformar el paisaje agrícola a través nuevas técnicas e instrumentos. Este esfuerzo modernizador registró una importante inflexión en 1943, con la fundación de la Oficina de Estudios Especiales (OEE) por acuerdo de la Fundación Rockefeller (FR) y el Gobierno Mexicano (Astier *et al.*, 2015).

Si bien es hasta 1977 cuando Efraín Hernández propuso la noción de agroecosistema, lo cierto es que desde los años 40 podemos observar en sus publicaciones un esfuerzo por comprender las interacciones ecológicas y las estrategias humanas de adaptación y manejo de recursos (Astier *et al.*, 2015).

Desde 1977, diversos autores documentaron los sistemas de manejo y domesticación de las especies presentes en los agroecosistemas campesinos e indígenas a lo largo del país. Se presentaban trabajos en los seminarios sobre análisis de agroecosistemas organizados por Efraín Hernández X., y colaboradores del Colegio de Postgraduados (CP) de Chapingo. En el libro que coordinó Teresa Rojas (1994) "Agricultura indígena pasado y presente" se recogen los estudios de los sistemas agrícolas arqueológicos y contemporáneos en las regiones maya, purépecha, náhuatl y mixteca (Casas *et al.*, 1997). En el trabajo de

Altieri y Trujillo (1987) se ponen en evidencia los mecanismos de regulación de plagas y transferencia de nutrientes que existían en los sistemas tradicionales de maíz en policultivo y agroforestales en Tlaxcala (Astier *et al.*, 2015).

La carrera de Ingeniero en Agroecología surge y se consolida en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en la década de los 90's, se propone como alternativa a la formación agropecuaria convencional e inicia operaciones en 1996. Su primera generación egresa en el año dos mil. Por lo que en 2015, se cuentan con 15 generaciones de egresados los cuales suman un total de 182. El manejo de agroecosistemas se perfila como una necesidad social, por lo que se espera que lleguen finalmente a ocupar los puestos que les corresponden, como agroécólogos al comprender la dinámica social de la producción sana y sostenible (Blanco Contreras y Saenz López, 2015).

El concepto de agroecosistema se construyó con base en García *et al.* (1988), quienes señalaron la pobreza en la abundancia productiva a nivel local; mientras que el currículo se sustentó en Altieri y Francis, (1992), ante la necesidad de un cambio en la currícula de formación de agrónomos. Así, se integró un concepto de agroecosistema que emerge de las esferas física (suelo, agua, clima) y biológica (plantas, animales y desintegradores) del ecosistema, hacia la esfera socioeconómica humana (visión, conocimiento, transformaciones); generando una interface donde confluyen las visiones, conocimientos y transformaciones con los recursos naturales, lo cual tiene su origen en los albores de la civilización, pero que han conducido a un desequilibrio que es preciso restaurar (Blanco Contreras y Saenz López, 2015).

2.2 EL CULTIVO DE MAÍZ

Es de suma importancia tener presente que el maíz en México se considera más que una semilla (alimentos) para la población en general, pero aún más para los pueblos indígenas, por ser centro de origen y diversidad genética (por decreto), es

decir, aquella área geográfica del territorio nacional donde se llevó a cabo el proceso de domesticación de una especie determinada (González Ángeles, 2018). México es considerado el centro de origen y uno de los centros de diversificación de las razas de maíz (Sánchez *et al.* 2000, Matsuoka *et al.* 2002, Bellon *et al.* 2003, Álvarez-Buylla 2004, Kato *et al.* 2009). El maíz tiene una función primordial en la agricultura de todas las culturas indígenas de México, debido a su amplia adaptación a distintos ambientes; a su tolerancia y resistencia a enfermedades, plagas y cambios en las condiciones climáticas y edáficas; a sus múltiples usos como alimento o forraje y gran variedad de productos que se obtienen de esta especie (Herrera-Cabrera *et al.* 2004, Kato *et al.* 2009; citados por (Aragón Martínez, 2011).

El maíz (*Zea mays* subespecie *mays*), probablemente se domesticó hace alrededor de 9,000 años en la región central de la cuenca del Balsas, en Michoacán y Guerrero, a partir del Teocintle anual *Zea mays* spp. *parviglumis*. La dispersión de este cultivo y las técnicas regionales de agricultura tradicional, posiblemente han promovido la diversificación en razas y la adaptación local. La selección divergente, una forma de selección positiva que genera la adaptación local, posiblemente ha incrementado la diferencia genética de loci específicos en el genoma del maíz. Dicho genoma tiene un tamaño de alrededor de 2.3 gigapares de bases, distribuidas en 10 cromosomas (Breña Ochoa, 2013).

Debido a que el maíz es uno de los tres cultivos más importantes del mundo y originario de México, representa un aporte importante a la seguridad alimentaria (Valdés Blanquet, 2006), pero con un déficit en la balanza agroalimentaria, además se observa una brecha recurrente entre la producción y el consumo nacional, del total de semilla cosechada, se pierde del 10-25% (Ramírez Mandujano, 2006). Diversas instituciones realizan estudios con el propósito de incrementar rendimientos y la producción de nuevos y mejorados híbridos altamente productivos. Las semillas sintéticas representan un área importante de desarrollo en el cultivo (Valdés Blanquet, 2006).

Semillas sintéticas se han desarrollado mediante embriogénesis somática (descrito por Reinert *et al.*, en 1958), los embriones somáticos se obtienen a partir de explantes que fueron segmentados de tallo con hojas, induciendo la formación de callos en medio Murashige y Skoog, adicionados con 2,4-D y dicamba, así como la extracción de embriones cigóticos de semillas de maíz PROMESA. Estos últimos generaron semillas sintéticas y las condiciones óptimas de las hormonas fueron 4×10^{-4} mg mL⁻¹ de BA y GA₃ (Valdés Blanquet, 2006).

Se ha realizado envejecimiento artificial de la semilla de maíz para determinar la repercusión del deterioro en su capacidad germinativa. Así mismo, de los embriones se extrajo su DNA, para realizar estudios moleculares RAPD, para estudiar la variación de la huella genético-molecular de las semillas nuevas y envejecidas, los estudios preliminares no permitieron encontrar diferencias entre los testigos y los tratamientos (Ramírez Mandujano, 2006).

La humanidad es capaz de entender muchos hechos acerca de los genomas en los tiempos actuales. Existe información de diversos puntos de vista y todos tenemos el derecho a estar informados, acerca de los diferentes aspectos relacionados con la manipulación genética. El bienestar de la humanidad depende como los países manejen sus recursos, específicamente los de origen alimentario. El mejoramiento genético tiene una función importante en la seguridad alimentaria y métodos sostenibles para producir y transformar especies silvestres en plantas cultivables (Torres-Morán *et al.*, 2012).

2.2.1 RAZAS DE MAÍZ

El concepto de raza representa un grupo de individuos relacionados con suficientes características en común como para permitir su reconocimiento como grupo, teniendo un alto número de genes comunes (Anderson y Cutler, 1942).

Wellhausen, Roberts y Hernández-X realizaron una descripción de las razas agronómicas de maíces criollos en México basándose en el rango de altitudes al

que se adaptan, características vegetativas de la planta, de la espiga, de la mazorca y del grano, así como caracteres fisiológicos, genéticos y citológicos. Reportando 25 razas más 7 como no definidas (Wellhausen *et al.*, 1951). Ortega *et al.* (1991) reconocen 41 razas y Sánchez *et al.* (2000), integran los trabajos anteriores y reconocen 59 razas que se agruparon tomando en cuenta su adaptación agroecológica, las características de la mazorca, del grano y sus usos. En el occidente de México y sur de Mesoamérica (Oaxaca, Chiapas y Guatemala) es donde actualmente se presenta la mayor variación racial (27 razas de México más las guatemaltecas) (Kato *et al.* 2009) (Aragón Martínez, 2011).

Algunas razas muestran una amplia adaptabilidad y han proporcionado material genético que se encuentra en casi todos los ambientes tropicales. Una de ellas es el Tuxpeño, que se encuentra en varios maíces mejorados que se originan directamente de esta raza o en combinación con otros materiales (Paliwal 2001, Kato *et al.* 2009).

2.2.2 VARIABILIDAD GENÉTICA

La variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse. Los individuos de una misma especie no son idénticos. Si bien, son reconocibles como pertenecientes a la misma especie, existen muchas diferencias en su forma, función y comportamiento. En cada una de las características que podamos nombrar de un organismo existirán variaciones dentro de la especie. Por ejemplo, los jaguares del pantanal en Brasil son casi del doble del tamaño (100 kilos) que los jaguares mexicanos (entre 30 y 50 kilos) y sin embargo son la misma especie (*Panthera onca*) (CONABIO, 2018d).

Los casos más evidentes de variabilidad genética de las especies son las especies domesticadas, en donde los seres humanos utilizamos la variabilidad para crear razas y variedades de maíces, frijoles, manzanas, calabazas, caballos, vacas, borregos, perros y gatos, entre otros (CONABIO, 2018).

Gran parte de la variación en los individuos proviene de los genes, es decir, es variabilidad genética. La variabilidad genética se origina por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas). Los procesos que dirigen o eliminan variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética (CONABIO, 2018).

La variabilidad genética permite la evolución de las especies, ya que en cada generación solamente una fracción de la población sobrevive y se reproduce transmitiendo características particulares a su progenie (CONABIO, 2018).

2.2.3 DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética, es el número total de características genéticas dentro de cada especie. Esta diversidad se reduce, cuando una población disminuye substancialmente y quedan pocos individuos. A mayor diversidad genética, las especies tienen mayores probabilidades de sobrevivir a cambios en el ambiente. Las especies con poca diversidad genética tienen mayor riesgo frente a esos cambios. En general, cuando el tamaño de las poblaciones se reduce, aumenta la reproducción entre organismos emparentados (consanguinidad) y hay una reducción de la diversidad genética, se puede medir utilizando la diversidad de genes, la heterocigocidad, o el número de alelos por locus (CONABIO, 2018b).

2.2.4 CENTRO DE ORIGEN Y DIVERSIFICACIÓN

Las especies que conocemos actualmente han tenido su origen en diferentes momentos de la historia de nuestro planeta. El origen de la mayor parte de esta diversidad se remonta a tiempos geológicos, así como a eventos y causas de diversa índole, como son la deriva continental, la dispersión y aislamiento de floras y faunas, la genética de las especies y su adaptación a diversos ambientes. Estos fenómenos dieron origen a las floras y faunas particulares de los continentes

actuales. A los espacios donde ocurrió el origen o la diferenciación de una especie o población particular se les ha denominado de manera general "CENTROS DE ORIGEN" (CONABIO, 2018a).

Estas especies o poblaciones al dispersarse o diferenciarse por diferentes fenómenos, como migraciones, aislamiento geográfico o reproductivo, mutaciones, dieron origen nuevamente a otras especies o formas y así sucesivamente. Una especie o un grupo relacionado de especies pueden diversificarse más en regiones diferentes a las de su origen. Así pues, los "centros de diversificación" actuales pueden no ser precisamente el centro de origen de una especie o un grupo biológico particular. Un ejemplo clásico es el de los pinos con su centro de origen en el noroeste de China y su centro de diversificación en el territorio comprendido entre México, Guatemala y Honduras. De un total de 111 especies en el mundo, en México viven 49 especies de pinos (44 %) (CONABIO, 2018a).

2.3 ALTERACIONES EN EL DNA

El proceso de envejecimiento o deterioro de las semillas, es un conjunto de eventos degenerativos no regulados, que se suscitan a diversos niveles; los cuales menoscaban progresivamente la calidad seminal y culminan con la pérdida de viabilidad. La semilla es el producto final de los programa de fitomejoramiento. La huella genética generada por marcadores de DNA, permiten la identificación inequívoca de las variedades mejoradas. Con respecto a los dendogramas generados en el estudio, mediante técnicas de RAPD y RAMP, permiten evidenciar las diferencias que a nivel de DNA (polimorfismo) existen entre los híbridos de maíz H28 y H30 (Fragoso Pérez, 2006).

Las alteraciones en el DNA, pueden ser la causa primaria de la reducción en la capacidad para germinar y la elevada proporción de plántulas anormales, producidas por el envejecimiento natural en la semilla (McDonald, 1998).

Es sabido que, la calidad (integridad) del DNA varía según el estado fisiológico de la semilla, de ahí que en semillas envejecidas haya mayor proporción de plántulas anormales formadas (Gutiérrez *et al.*, 2003).

2.3.1 MARCADORES MOLECULARES

En el genoma existen regiones que son extremadamente conservadas en la evolución de la especie, por lo que no son útiles para diferenciar individuos; sin embargo, existen otras a las que se les ha dado el nombre de DNA polimórfico, que tiene una variación moderada, lo que permite la diferenciación entre individuos (Valadez y Kähl, 2000).

Los marcadores moleculares, corresponden a diferencias tangibles en la secuencia de DNA, que se presentan en proporciones homólogas del genoma de individuos diferentes, pertenecientes a la misma especie (Alanís, 2003). En los marcadores, las secuencias genómicas, se localizan en un mismo locus de diferentes individuos, pero que difieren en su secuencia de bases nitrogenadas (Valadez y Kähl, 2000).

Existen diferencias en la secuencia del DNA o polimorfismos, normalmente no se asocian a caracteres fenotípicos (Zhang *et al.*, 1996). Resultan de cambios o arreglos entre los pares de bases nitrogenadas, como son las translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas (Valadez y Kähl, 2000). Dichos cambio se pueden evidencia al analizar directamente la macromolécula o sus productos (Alanís, 2003).

Se han desarrollado una diversidad de marcadores moleculares, entre los que podemos destacar a los basados en el polimorfismo encontrado en el DNA, como son: Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLPs), DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) y polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), los que nos permiten el análisis del genoma

completo, evitando las impresiones causadas por efectos ambientales y por supuesto, reducir los costos de experimentos. Éstos, son influenciados por interacciones genéticas y pueden detectar cambios pequeños (Fragoso Pérez, 2006).

2.3.2 REPRODUCIBILIDAD

Una diversidad de factores influyen en la reproducibilidad de los RAPDs: las concentraciones de: Mg, DNA, iniciador y la temperatura de la PCR, el número de ciclos, la fuente de la TaqDNA polimerasa; además, es importante la calidad del DNA, en virtud de que la integridad del templado influirá en los resultados (Fernández y Bejarano, 2003).

Se ha reportado la degradación del DNA durante el almacenamiento y que eventualmente se repara durante la imbibición. La degradación puede conducir a la formación de polimorfismos diferentes a causa de que se tengan hebras cortas de DNA y se cambie la disponibilidad del templado (Fragoso Pérez, 2006).

2.3.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE EXTRACCIÓN DE DNA

La obtención de ADN íntegro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular. Una de las ventajas de utilizar métodos tradicionales es su bajo costo, así como un alto rendimiento. Sin embargo, en ocasiones el material obtenido está fragmentado. Estos métodos son susceptibles de contaminación, variación y errores por los múltiples pasos de manipulación. El rendimiento de los kits depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, así como de la capacidad de unión de la membrana (Velázquez *et al.*, 2014).

2.4 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS

2.4.1 MECANISMOS RETROTRANSPOSIONES

Retrotransposon es una clase de elemento traspasable que tiene una función primordial en el genoma y evolución genética en plantas. Los elementos traspasable, son segmentos de DNA con la capacidad de moverse entre diferentes sitios en los cromosomas y ellos se mueven directamente como DNA, comportándose como forma de “copiar y pegar” o “cortar y pegar”, mientras que los retrotransposones se expanden vía reversa transcripcional de un mRNA de transcritos intermedios de un elemento móvil (San Miguel *et al.*, 1996).

Los retrotransposones han sido encontrados en todo tipo de organismos, son ubicuos, dinámicos y abundantes en genomas de eucariotas (Malik y Eickbush, 2001; Sarilar *et al.*, 2010). Se agrupan en dos grandes categorías: repetición terminal larga (long-terminal-repeat)(LTR) y no-LTR; también conocidos como elementos LINE, en base a su estructura global (Torres-Morán *et al.*, 2012). Los retrotransposones LTR, son subdivididos en dos grupos importantes que son: Ty1 o copia, y Ty3 o *gypsy (gitano)*. La diferencia principal entre uno y otro es en el orden de la transcriptasa reversa (RT) y dominios integrasa y sus genes pol. Los elementos del grupo “gitano” son similares a los retrovirus. Los genes de la RT tienen dominios de aminoácidos conservados, algunos de los cuales son característicos de cada grupo de retroelemento (Friesen *et al.*, 2001; San Miguel *et al.*, 1996). Los LTRs, son las secuencias repetidas que flanquean la región de codificación interna, las cuales incluyen genes que codifican tanto para proteínas estructurales como enzimáticas. Los RNA genómicos que permiten el movimiento específico de los retrotransposones sean transportados al citoplasma, trasladados y empaquetados juntos con sus productos genéticos en una estructura denominada partícula como virus (VLP).

El movimiento del DNA de fragmentos específicos tiene lugar cuando el gen gag (gen del antígeno grupal, grop antigen gene) que codifican las proteínas que forman la VLP dentro de la transcripción reversa. El gen pol codifica funciones

enzimáticas, incluyendo la proteasa que copia los RNA de retrotransposones en cDNA y una integrasa que integra el cDNA en el genoma (Havecker *et al.*, 2004).

La mayoría de los retrotransposones se consideran que están transcripcionalmente inactivos (Kumar y Bennetzen, 1999). O silenciosos en los tejidos osmóticos, pero activos durante ciertas etapas del desarrollo de las plantas y bajo los efectos de condiciones estresantes (Grandbastien, 1998). La actividad de retrotransposones puede ser inducida por estrés y como consecuencia un incremento en su movilidad, con lo que se genera nueva variabilidad genética, la cual puede resultar útil en condiciones de estrés (Capy *et al.*, 2000). Esta parece ser la consideración más importante por la cual los marcadores basados en retrotransposones sea una herramienta útil para detectar cambios en genes específicos durante el mejoramiento o la manipulación genética de plantas (Torres-Morán *et al.*, 2012).

2.4.2 SECUENCIAS REPETIDAS ETIQUETADAS INVERSAS (ISTR, INVERSE SEQUENCE TAGGED REPEATS), MEDIANTE PCR.

Se han realizado estudios de ISTR por PCR para la caracterización de poblaciones naturales de *Agave duranguensis*, con la finalidad de obtener perfiles de ISTR como herramienta taxonómica; estimar la variabilidad genética. Los resultados indican que, los marcadores ISTR son reproducibles y sensibles para detectar variabilidad intra e interpoblacional, se generaron patrones de perfiles de amplificación específicos que permiten discriminar entre especies de *Agave* y entre especies de *Agavaceae*; por tanto, los ISTR se podrán usar como método de rutina, para determinar el origen botánico de las plantas de *Agave*, como proceso de control de calidad (Torres-Morán, 2009).

El genoma de maíz (*Zea mays* L.), está repleto de retrotransposones. Se han reportado cerca de 150,000 a 250,000 LTR retrotransposones, cerca de 50-80% de sus genomas. Su amplia distribución en el genoma de maíz, podría representar

un marcador conveniente en algunos estudios, debido a su ocasional contribución al estado físico, el cual se ha denominado “domesticación molecular” de los elementos por el genoma (San Miguel y Vitte, 2009). El constante movimiento de los retrotransposones, pueden proveer de nuevas propiedades regulatorias a un gen (Bernet y Asins, 2003), y el primer paso para detectar el cambio, es caracterizar las posiciones de las secuencias basadas en retrotransposones a través de Secuencias repetitivas marcadas inversas (ISTR, Inverse, Sequence-Tagged Repeats) (San Miguel y Vitte, 2009). Los ISTR son como copias derivadas de secuencias de primer oligodeoxinucleótido utilizadas como marcadores ubicuamente dispersos entre el genoma eucariota (Rohde, 1996, citado por (Torres-Morán *et al.*, 2012))

Una comparación entre la información proporcionada por las metodologías de microsatélites o simples secuencias repetidas (SSRs, simple sequence repeats) y ISTR en maíz se realizaron en Guanajuato. Se pretendía medir la homogeneidad genética en dos líneas de maíz (LUG03 y CML282). La CML282 tiene dos versiones, el original y LUG282 generado por autopolinización en 10 años de conservación en un banco de germoplasma de la Universidad de Guanajuato (Rodríguez-Ponce *et al.*, 2012). Treinta individuos fueron analizados por ambos marcadores. Diez iniciadores de SSRs, uno de cada cromosoma de maíz y dos combinaciones de ISTR se utilizaron. La PCR se llevó a cabo de acuerdo con lo especificado por Matsuoka *et al.* (Matsuoka *et al.*, 2002), para SSRs y para ISTRs (Torres-Morán *et al.*, 2012)

Ambos marcadores fueron capaces de separar las líneas en dos grupos principales y juntando las dos versiones de CML282 (CLM282 y LUG282). Los resultados demostraron alta fidelidad entre los individuos de cada línea observada con SSR (Figura 1). El polimorfismo revelado con SSRs fue 0.7%. La similitud entre individuos detectados por ISTR fue baja, lo que indica que, muchas regiones de los genomas individuales son polimórficas (figura 2).

La capacidad de los ISTR para detectar diferencias entre los individuos de la misma línea, podrá permitir a los mejoradores, detectar genes específicos empelando el procedimiento para eludir bandas específicas y secuenciarlas.

Se han desarrollado tecnologías novedosas en el área de microarreglos denominada Sensores Universales de Huella Genómica (UFC), con la intención de identificación universal de todos los organismos, utilizando un conjunto de sondas de DNA diseñadas de forma aleatorias sin conocimiento previo de las secuencias genómicas. La validación se realiza mediante comparación de la distribución de los organismos de un árbol taxonómico construido con las distancias entre las huellas genómicas, respecto a la taxonomía que hoy conocemos. Se observa la sensibilidad en la discriminación y coincidencia de forma razonables de ambas taxonomías, con lo cual se puede hablar que la UFC pueden ser aplicadas con éxito para estudios experimentales (Larios Serrato, 2009).

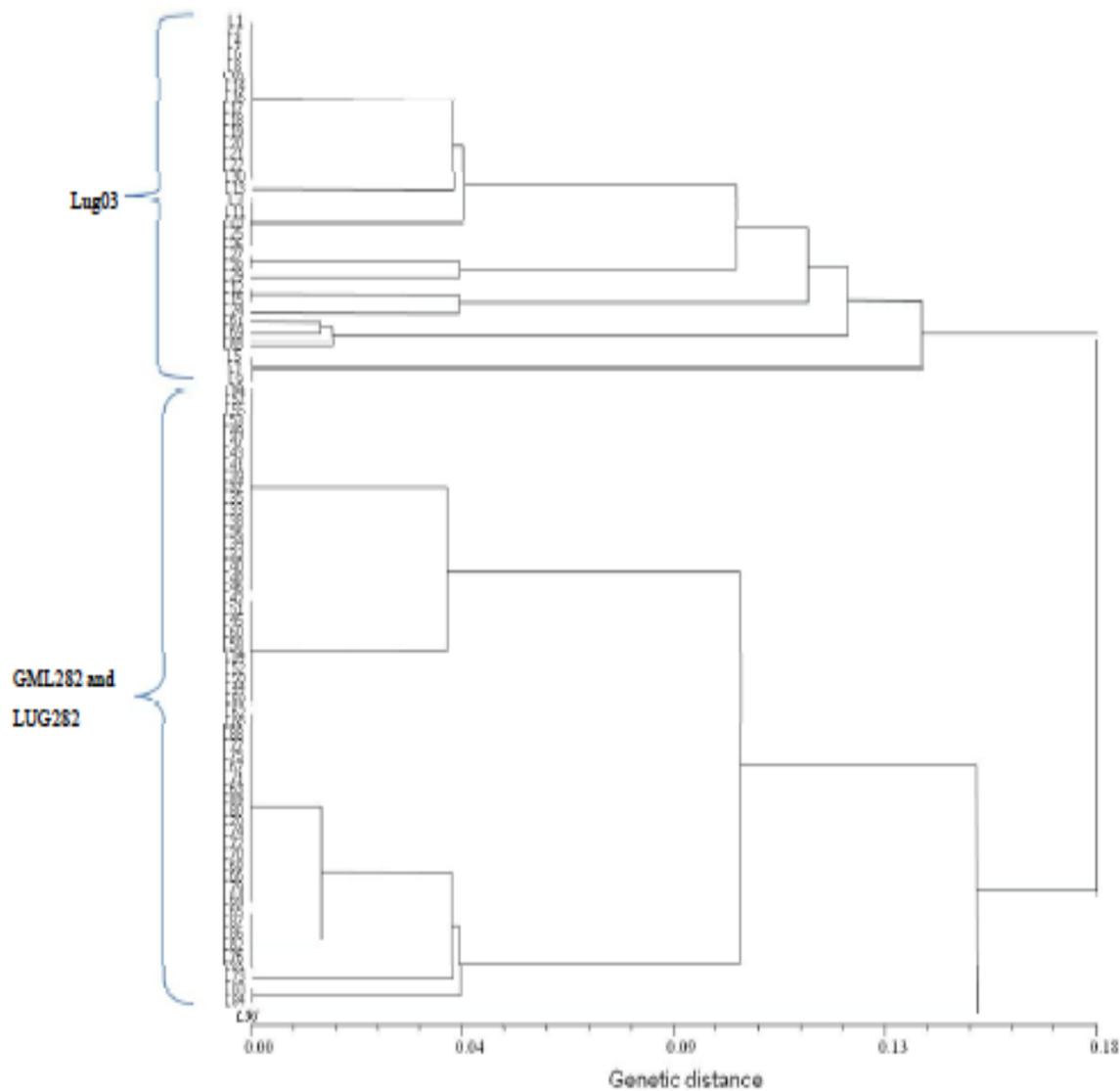


Figura 1. Dendrograma de los análisis de SSR para tres líneas de maíz. (Torres-Morán *et al.*, 2012)

2.4.3 TAXONOMÍA NUMÉRICA

La taxonomía numérica es el agrupamiento por métodos numéricos de unidades taxonómicas (OTU's) dentro de taxas. El término incluye un boceto de las inferencias fenéticas o filogenéticas de los datos por métodos estadísticos o matemáticos. Integrar datos derivados de diversas fuentes, es decir, datos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos, afinidad entre cadenas de DNA,

secuencias de aminoácidos, entre otras; aspectos muy difíciles para la taxonomía convencional. Los datos codificados en forma numérica pueden integrarse en sistemas de procesamiento electrónico (Anderberg, 1973).

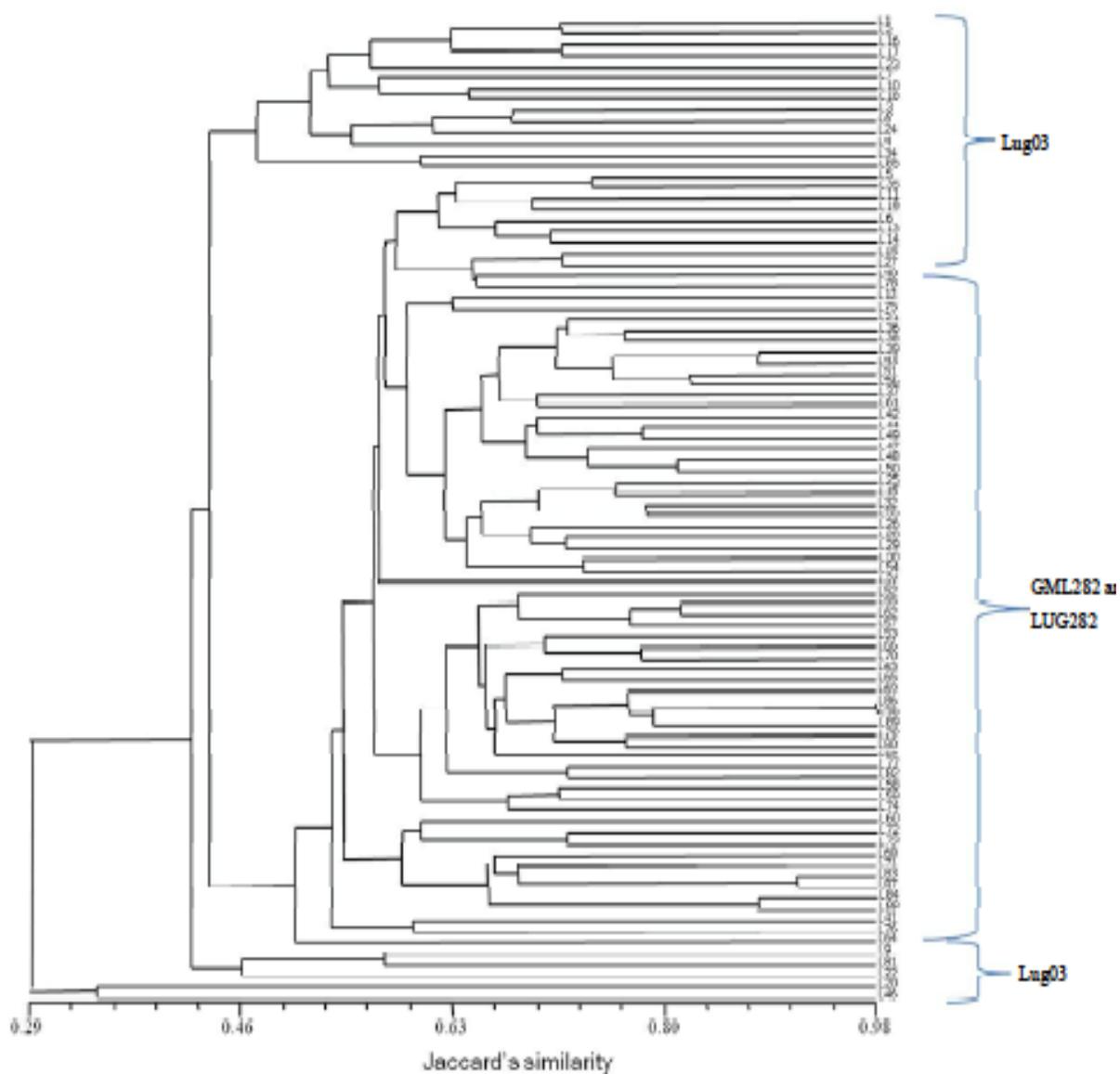


Figura 2. Dendrograma de los ISTR de tres líneas de maíz. (Torres-Morán *et al.*, 2012)

Los datos de variables moleculares que se obtiene como patrones de bandas en geles, son analizados por métodos numéricos haciendo uso de la taxonomía numérica (Koller *et al.*, 1993).

El análisis involucra el cálculo de una unidad de semejanza (coeficiente de similitud) y la organización de los patrones de similitud, las relaciones resultantes se presentan en un dendograma derivado del agrupamiento algorítmico. En un análisis multivariado, el dendograma puede ser retomado para obtener una representación multidimensional de las relaciones (Bishop *et al.*, 1967).

2.4.4 COEFICIENTE DE SIMILITUD

La similitud entre dos unidades taxonómicas se estima por medio de coeficientes de similitud, las cuales cuantifican las semejanzas entre los elementos de las filas (Kaufman y Rousseeuw, 1990). Con los valores de similitud se forma una matriz y a partir de esta, se realizan análisis de conglomerados con diferentes métodos (Anderberg, 1973).

2.4.5 ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS DE LABORATORIO

El Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (IMNC) es una asociación civil, que cuenta con el Registro No. 002/B como Organismo Nacional de Normalización (ONN) para elaborar, actualizar, expedir y cancelar Normas Mexicanas, con fundamento en los Artículos 39 fracción IV, 65 y 66 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización (IMNC, 2009).

2.5 VOCABULARIO

2.5.1 METROLOGÍA. CONCEPTOS FUNDAMENTALES Y GENERALES, Y TÉRMINOS ASOCIADOS (VIM)

Este vocabulario de acuerdo con IMNC (2009), proporciona un conjunto de definiciones y de términos asociados, en idioma español, para un sistema de

conceptos fundamentales y generales utilizados en metrología. Pretende ser una referencia común para científicos, ingenieros, físicos, químicos, médicos, biólogos, así como para profesores, estudiantes y todo aquel, implicado en la planificación o realización de mediciones, cualquiera que sea el campo de aplicación y el nivel de incertidumbre de la medida.

2.5.2 MAGNITUDES Y MEDIDAS

IMNC (2009) da referencia a lo siguiente.

Magnitud, f. Propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia.

Nota 1. El concepto genérico de magnitud puede dividirse en varios niveles de conceptos específicos, como se muestra en el cuadro siguiente. La mitad izquierda del Cuadro 1 presenta conceptos específicos de “magnitud”, mientras que la mitad derecha presenta conceptos genéricos para magnitudes individuales.

Cuadro 1. Magnitudes.

Concepto específico		Concepto genérico
Longitud, l	radio, r	radio del círculo A, r_A o $r(A)$
	longitud de onda, λ	longitud de onda de la radiación D del sodio, λ_D o $\lambda(D; Na)$

Naturaleza de una magnitud, f

Nota 1. La clasificación de las magnitudes según su naturaleza es en cierta medida arbitraria.

Ejemplo 1. Las magnitudes diámetro, circunferencia y longitud de onda se consideran generalmente magnitudes de una misma naturaleza denominada longitud.

Ejemplo 2. Las magnitudes calor, energía cinética y energía potencial se consideran generalmente magnitudes de una misma naturaleza denominadas energía.

Nota 2. Las magnitudes de la misma naturaleza en un sistema de magnitudes dado tiene la misma dimensión. Sin embargo las magnitudes de la misma dimensión no son necesariamente de la misma naturaleza.

Ejemplo. Por convenio, las magnitudes de momento de una fuerza y energía no se consideran de la misma naturaleza, aunque tengan las mismas dimensiones. Análogamente sucede con la capacidad térmica y la entropía, y con la permeabilidad relativa y la fracción molar.

Sistema de magnitudes, m ; conjunto de magnitudes relacionadas entre sí mediante ecuaciones no contradictorias.

Sistema internacional de magnitudes, m

ISQ

Sistema de magnitudes basado en las siete magnitudes básicas: longitud, masa, tiempo, corriente eléctrica, temperatura termodinámica, cantidad de sustancia e intensidad luminosa.

Nota 1. En un sistema de magnitudes determinado,

- Las magnitudes de la misma naturaleza tienen la misma dimensión
- Las magnitudes de dimensiones diferentes son siempre de naturaleza diferente, y
- Las magnitudes que tiene las mismas dimensiones no tiene por qué ser de la misma naturaleza

Nota 2. En el Sistema Internacional de Magnitudes (ISQ), los símbolos correspondientes a las dimensiones de las magnitudes básicas. Cuadro 2. (IMNC 2009).

Cuadro 2. De magnitudes básicas.

Magnitud básica	Dimensión
Longitud	L
Masa	M
Tiempo	T
corriente eléctrica	I
temperatura termodinámica	O
cantidad de sustancia	N
intensidad luminosa	J

Sistema Internacional de Unidades, m

Sistema SI, m

Sistema de unidades basado en el sistema internacional de magnitudes, con nombres y símbolos de las unidades, y con una serie de prefijos con sus nombres y símbolos, así como reglas para su utilización, adoptados por la Conferencia General de Pesas y Medidas (CGPM)

Nota 1. El SI está basado en las siete magnitudes básicas del ISQ. Los nombres y símbolos de las unidades básicas se presentan en el Cuadro 3 (IMNC 2009).

Nota 2. Los prefijos SI para los múltiplos y submúltiplos de las unidades. Ver cuadro 4 (IMNC 2009).

2.5.3 MEDICIONES

Medición, f

Cuadro 3. Unidades básicas.

Magnitud básica	Unida Básica	
Nombre	Nombre	Símbolo
Longitud	Metro	M

Masa	kilogramo	kg
Tiempo	Segundo	s
corriente eléctrica	Ampére	A
temperatura termodinámica	Kelvin	K
cantidad de sustancia	Mol	mol
intensidad luminosa	Candela	cd

Cuadro 4. Prefijos SI para múltiplos y submúltiplos.

Factor	Prefijo	
	Nombre	Símbolo
10^{24}	yotta	Y
10^{21}	zetta	Z
10^{18}	exa	E
10^{15}	peta	P
10^{12}	tera	T
10^9	giga	G
10^6	mega	M
10^3	kilo	K
10^2	hecto	H
10^1	deca	Da
10^{-1}	deci	D
10^{-2}	centi	C
10^{-3}	mili	M
10^{-6}	micro	μ
10^{-9}	nano	N
10^{-12}	pico	P
10^{-15}	femto	F
10^{-18}	atto	A
10^{-21}	zepto	Z
10^{-24}	yocto	Y

Proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que pueden atribuirse razonablemente a una magnitud.

Nota 1. Las propiedades no son de aplicación a las propiedades cualitativas.

Nota 2. Las mediciones suponen una comparación de magnitudes, e incluyen el contenido de entidades.

Nota 3. Una medición supone una descripción de magnitud compatible con el uso previsto de un resultado de medida, un procedimiento de medida y un sistema de medida calibrado conforme a un procedimiento de medida especificado, incluyendo las condiciones de medida.

Metrología, f

Ciencia de las mediciones y sus aplicaciones.

Nota. La metrología incluye todos los aspectos teóricos y prácticos de las mediciones, cualquiera que sea su incertidumbre de medida y su campo de aplicación.

Mensurando, m

Magnitud que se desea medir.

Nota 1. La especificaciones de un mensurando requiere el conocimiento de la naturaleza de la magnitud y la descripción del fenómeno, cuerpo o sustancia cuya magnitud es una propiedad, incluyendo las componentes pertinentes y las entidades químicas involucradas.

Nota 2. En la 2ª edición del VIM y en IEC 60060-300:2001, el mensurando es definido como “magnitudes sujetas a medición”.

Nota 3. La medición, incluyendo el sistema de medida y las condiciones bajo las cuales se realiza ésta, podrían alterar el fenómeno, cuerpo o sustancia, de tal forma que la magnitud bajo medición difiera del mensurando. En este caso sería necesario efectuar corrección apropiada.

Ejemplo: La longitud de una varilla cilíndrica de acero a una temperatura de 23 °C será diferente de su longitud a la temperatura de 20 °C, para la cual se define el mensurando. En este caso, es necesaria una corrección.

Nota 4. En química, la “sustancia a analizar”, el analito, o el nombre de la sustancia o compuesto, se emplea algunas veces en lugar de “mensurando”. Esta práctica es errónea debido a que estos términos no se refieren a magnitudes.

Principio de medida, m

Fenómeno que sirve como base de una medición.

Ejemplo 1. El efecto termoeléctrico aplicado a la medición de temperatura.

Ejemplo 2. La absorción de energía aplicada a la medición de la concentración de cantidad de sustancia.

Nota. El fenómeno puede ser de naturaleza física, química o biológica.

Método de medida, m

Descripción genérica de la secuencia lógica de operaciones utilizadas en una medición.

Nota. Los métodos de medida pueden clasificarse de varias maneras como:

- Método de sustitución
- Método diferencial, y
- Método de cero;

O

- Método directo, y
- Método indirecto.

Procedimiento de medida, m

Descripción detallada de una medición conforme a uno o más principios de medida y a un método de medida dado, basado en un modelo de medida y que incluye los cálculos necesarios para obtener un resultado de medida.

Nota 1. Un procedimiento de medida se documenta habitualmente con suficiente detalle para que un operador pueda realizar la medición.

Nota 2. Un procedimiento de medida puede incluir una incertidumbre de medida objetivo.

Nota 3. El procedimiento de medida a veces se denomina *standar operating procedure* (SOP) en inglés. Esta terminología no se utiliza en español.

Procedimiento de medida de referencia, m

Procedimiento de medida aceptado para producir resultados de medida apropiados para su uso previsto, para evaluar la veracidad de los valores medidos obtenidos a partir de otros procedimientos de medida para magnitudes de la misma naturaleza, para una calibración o para la caracterización de materiales de referencia.

Procedimiento de medida primario, m

Procedimiento primario. Procedimiento de medida de referencia utilizado para obtener un resultado de medida independientemente de cualesquier patrón de medida de una magnitud de la misma naturaleza.

Ejemplo. El volumen de agua suministrado por una pipeta de 5 mL a 20 °C se mide pesando el agua vertida por la pipeta en un vaso, considerando la diferencia existente entre la masa del vaso con agua y la masa del vaso vacío, y corrigiendo la diferencia de masa a la temperatura real del agua, utilizando la densidad de la masa.

Nota 1. El Comité Consultivo para la Cantidad de Sustancia – Metrología Química (CCQM) utiliza el término “método primario de medida” para este concepto.

Resultado de medida, m

Resultado de una medición, m .

Conjunto de valores de una magnitud atribuidos a un mensurando, acompañados de cualquier otra información relevante disponible.

Nota 1. Un resultado de medida contiene generalmente información relevante sobre el conjunto de valores de una magnitud. Algunos de ellos representan el mensurando mejor que otros. Esto puede representarse como una función de densidad de probabilidad (FDP).

Nota 2. El resultado de una medición se expresa generalmente con un valor medido único y una incertidumbre de medida. Si la incertidumbre de medida se considera despreciable para un determinado fin, el resultado de medida puede expresarse con un único valor medido de la magnitud. En muchos campos ésta es la forma habitual de expresar el resultado de medida.

Nota 3. En la bibliografía tradicional y en la edición precedente del VIM, el término resultado de medida estaba definido como valor atribuido al mensurando y podía entenderse como indicación, resultado no corregido o resultado corregido, según el contexto.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento se realizó en el laboratorio de Agroecología ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, con las coordenadas (24° 22' de Latitud Norte y 102° 22' de Longitud Oeste con elevación a 1120 msnm). El clima es semiárido, con una precipitación anual promedio de 224.6 mm y temperatura media anual de 21.11 °C.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se tomaron muestras de tejidos foliares jóvenes de maíz Criollo (dos), y de las variedades Antílope y TL-2440, del campo experimental en UAAAN UL. Estas fueron lavadas con agua destilada seguida de desinfección con etanol al 70 %. Después las hojas frescas se cortaron y sometieron a secado en estufa a 60°C hasta obtener peso constante. Posteriormente se molieron y colectaron en cajas de petri y etiquetaron. Se mantuvieron en estufa a temperatura de 37°C y fueron posteriormente procesadas para la extracción de ADN.

3.3. REACTIVOS

- Buffer de extracción de DNA: 200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM de Cloruro de Sodio, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5 SDS (P/V).
- Acetato de potasio 5M pH 5.2
- Isopropanol
- Etanol al 70 %
- Buffer TE 0.1X: 1mM Tris-HCL, pH 8.0. 0.1 mM de EDTA, pH 8.0.

3.4 PARA EXTRACCIÓN DEL DNA

Se prepararon los reactivos en fresco para llevar a cabo pruebas preliminares con 100 mg de tejido de hojas de maíz criollos (dos). Se utilizaron soluciones concentradas del buffer de lisis y posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes para preparar soluciones a las concentraciones deseadas.

Las concentraciones de trabajo inicial fueron para modificar la concentración del Tris-HCl y se mantuvieron constantes las demás concentraciones. Posteriormente se hicieron cuatro modificaciones de las concentraciones del Tris-HCl sin modificar los restantes constituyentes (Cuadro 5).

Cuadro 5. Condiciones de extracción de DNA para ensayos experimentales con maíces criollos (2), con 100 mg de muestra (primera extracción) y las variedades Antilope y TL-2440, con 50 mg de muestra (segunda extracción).

Buffer Primera extracción	Buffer Segunda extracción
200 y 400 mL del Tris-HCl, pH 7.5	200, 250, 300 y 400 mM Tris-HCl
250 mM de NaCl	250 mM de NaCl
25 mM de EDTA	25 mM de EDTA
0.5 % de SDS.	0.5 % de SDS.

3.4.1 Primera Extracción

Se pesaron 100 mg de tejido de maíces criollos y colocaron en tubos eppendorf (cinco por tratamiento), se adicionaron 750 mL de buffer de lisis (Se utilizaron solo dos concentraciones del buffer de lisis 200 y 400 mM), se dejaron reposar por cuatro horas y posteriormente se sometieron a agitación vigorosa en vortex por dos minutos. Se centrifugaron las muestras a 13,000 x g por dos minutos y se tomaron 300 mL de sobrenadante y colocaron en un nuevo tubo eppendorf. Se adicionaron 300 mL de isopropanol y se mantiene a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugaron las muestras a 13,000 x g por cinco minutos. Se elimina

el sobrenadante y se deja secar al ambiente. Finalmente se disuelven en 100 mL del buffer TE pH 7.5. y se conservan en refrigeración para su análisis posterior (4°C).

3.4.2 Segunda Extracción

Se tomaron 50 mg de las variedades Antílope y TL-2440 y se sometieron al mismo proceso de extracción, solo que en este caso se emplearon cuatro concentraciones del buffer de lisis 200, 250, 300 y 400 mM. Así mismo, se utilizaron 15 repeticiones.

3.5 Determinación de concentración (ng mL^{-1}), pureza (relación absorbancia a λ A230/A260) y rendimiento del DNA ($\text{ng mg de tejido}^{-1}$)

La concentración del DNA se calculará con la absorbancia de 260 nm. La absorbancia de gDNA a 230 y 260 nm se llevará a cabo en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 de acuerdo con las especificaciones del fabricante, relaciones de 1.8-2.0 son indicadoras de pureza del DNA genómico. El rendimiento ($\text{ng mg de tejido}^{-1}$), se determinará a partir de la concentración, multiplicada por la cantidad de TE en que se disolvió y dividido entre la cantidad de muestra utilizada. En la primera extracción, el rendimiento corresponderá al valor especificado de extracción, dado que se utilizaron 100 mL de TE y en la segunda extracción, la concentración se multiplicará por 100 y dividirá entre 50, que fueron los miligramos de tejido empleados.

3.6. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental factorial de $A \times B \times C$, donde el factor A, fueron los maíces (criollos) y variedades; el factor B (las concentraciones del buffer de lisis) y C, los equipos de medición (Nanodrops, 1 y 2). Con cinco y quince repeticiones respectivamente.

3.7. Análisis de datos.

Las variables de estudio, fueron sometidas a análisis de varianza (ANOVA) y en caso de diferencias estadísticas significativas, se realizaron análisis de medias de Tukey ($\alpha=0.05$).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Primera extracción de DNA en hojas de maíces criollos.

En esta primera extracción, se trabajó con hojas de dos maíces criollos y se utilizaron 100 mg de muestra, de igual manera, se utilizaron solamente dos concentraciones del buffer de lisis (200 y 400 mM) y solamente cinco repeticiones.

4.1.1. Concentración (ng mL⁻¹).

De acuerdo con los resultados encontrados (Cuadro 6, Figura 3), se pudo observar que la mejor extracción de DNA se logró con la raza 1 y una concentración de 400mM del buffer de lisis. Concentración superior a la raza 2 en las concentraciones probadas. Por tanto, se encontraron diferencias entre las razas para la extracción de DNA, así como en el uso del equipo de cuantificación Nanodrop, donde el Equipo 1, generó resultados más altos para la raza 1, no así para la raza 2.

Cuadro 6. Resultados promedios de la extracción de DNA (ng mL⁻¹), pureza (relación A230/A260) y rendimiento (ng mg⁻¹ de tejido), utilizando Nanodrop (equipos, dos); en razas (Dos) de maíz (*Zea mays* L.); empleando diferentes concentraciones del buffer de lisis (mM). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Genotipo	Nanodrop	Buffer Lisis (mM)	Conc. DNA (ng mL ⁻¹)	Pureza A230/A260	Rendimiento (ng de DNA por mg Tejido)
1	1	200	243.35	2.09	243.4
	1	400	374.40	1.97	374.4
2	2	200	199.64	1.98	199.6
	2	400	197.94	2.10	197.9
2	1	200	91.67	2.08	91.7
	1	400	108.46	1.88	108.5
2	2	200	111.43	2.09	111.4
	2	400	124.30	2.07	124.3

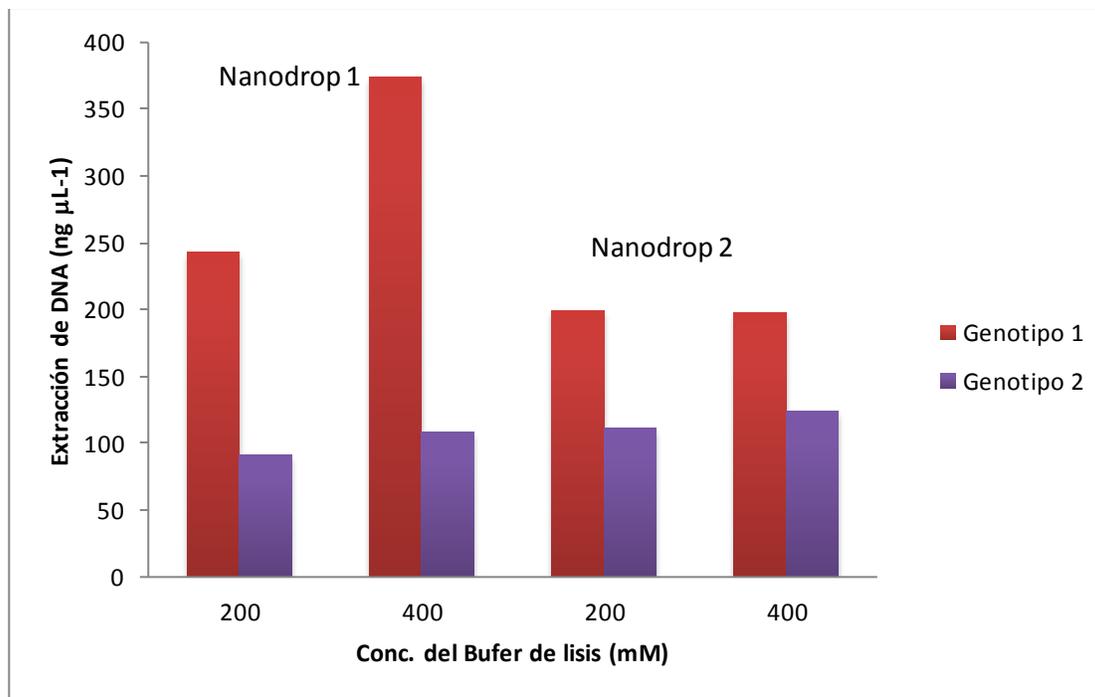


Figura 3. Extracción de DNA (ng mL^{-1}) en dos razas de maíz (*Zea mays* L.), utilizando Nanodrop (equipos, dos); empleando diferentes concentraciones del buffer de lisis (mM), con cinco repeticiones por tratamiento.

4.1.2. Pureza y rendimiento (ng mg^{-1} de biomasa en peso seco).

En cuanto a la pureza del DNA y su rendimiento (Cuadro 6), en la raza de maíz 1, no se observaron diferencias significativas, en cuanto a la pureza, donde los valores más bajos los encontramos con la concentración de 400 mM (1.97), utilizando el Nanodrop 1 y los más altos a la misma concentración (2.10), con el Nanodrop 2. Cabe recordar que la pureza óptima de acuerdo con la literatura se ubica en el rango de 1.8-2.0, lo que nos indica que el DNA obtenido en las condiciones experimentales llevada a cabo es satisfactorio. Esta generalización se aplica de la misma manera para la raza de maíz 2, donde a una concentración del buffer de lisis de 400 mM, se obtuvieron los valores más bajos (1.88), con el equipo Nanodrop 1, mientras que los más altos fueron con 200 mM (2.09), con el Nanodrop 2.

En cuanto al rendimiento de DNA en base a la cantidad de tejido utilizada en la raza de maíz 1, el menor rendimiento lo encontramos utilizando la concentración del buffer de lisis de 400 mM (197.9 ng mg^{-1}), utilizado en Nanodrop 2, mientras que la mayor concentración la encontramos a la misma concentración con el Nanodrop 1 (374.4 ng mg^{-1}). En la raza de maíz 2, la menor concentración se encontró a 200 mM (91.7 ng mg^{-1}), mientras que la más alta fue para 400 nM (124.3 ng mg^{-1}), utilizando el Nanodrop 2.

Cuadro 7. Análisis de varianza para la cuantificación de extracción de DNA de dos razas de maíz, utilizando dos equipos de medición, con dos concentraciones del buffer de extracción, muestra de 100 mg y cinco repeticiones.

Fuente	Cuadrado Medio	gl	Cuadrado Medio	F	sig.
Intersección	196.279	1	196.279	6619.848	0.000
Equipos	1.546	1	1.546	52.148	0.000
Razas de maíz	0.155	1	0.155	5.212	0.029
Buffer	0.056	1	0.056	1.883	0.180
Equipo * Genotipo	0.134	1	0.134	4.508	0.042
Equipo * Buffer	0.010	1	0.010	0.325	0.573
Genotipo * Buffer	0.016	1	0.052	1.754	0.195
Equipo * Genotipo* Buffer	0.052	1	0.052	1.754	0.195
Error	.949	32			
Total	199.196	40			

De acuerdo con el ANOVA (Cuadro 7), se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.000$), para los equipos utilizados y significativas ($P < 0.05$), para la razas de maíz utilizados, por lo tanto las diferencias son debidas a los tratamientos y no son aleatorias, lo que nos deja entrever que es necesario tomar en cuenta que las razas de maíz que se utilicen para la extracción del DNA, se obtendrán resultados diferentes y que es muy importante verificar que el equipo

de medición de la extracción, verdaderamente realice la cuantificación correcta, para ello se recomendará buscaran estándares certificados de DNA para determinar la concentración y pureza del DNA.

La determinación de la concentración de extracción de DNA en dos genotipos de maíz, generó diferencias en los Nanodrops utilizados y en los genotipos de maíz (Cuadro 6 y 7), siendo estas diferencias altamente significativas ($P < 0.000$) y significativas ($P < 0.029$) respectivamente. Se encontró interacción significativa estadísticamente entre el Nanodrop empleado y genotipo ($P < 0.042$). La mejor concentración se encontró con el Nanodrop 1 con el genotipo 1 y buffer de lisis a una concentración de 400 mM (476.92 ng g^{-1}).

Cuadro 8. Análisis de varianza para la pureza del DNA extraído de dos genotipos de maíz, utilizando dos equipos de medición, con dos concentraciones del buffer de extracción, muestra de 100 mg y cinco repeticiones.

Fuente	Cuadrado Medio	gl	Cuadrado Medio	F	sig.
Intersección	9.191	1	9.191	15289.708	0.000
Equipos	0.001	1	0.001	1.012	0.000
Variedades	0.001	1	0.001	2.408	0.131
Buffer	0.003	1	0.003	4.365	0.045
Equipo * Variedad	6.03E-05	1	6.03E-05	0.1	0.754
Equipo * Buffer	0.000	1	0.000	0.706	0.407
Genotipo * Buffer	0.004	1	0.004	7.319	0.011
Equipo * Variedad* Buffer	0.000	1	0.000	0.365	0.550
Error	0.019	32			
Total	9.22	40			

Para el caso de la calidad de la extracción del DNA en maíces criollos, el ANOVA (Cuadro 8), se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.000$) entre los equipos de medición (Nanodrops) y diferencias significativas ($P < 0.05$), para el

buffer de lisis, así como una interacción buffer contra el tipo de maíz criollo ($P < 0.011$).

4.2 Segunda extracción de DNA en hojas de maíces en los genotipos.

En esta segunda extracción, se trabajó con hojas de dos variedades de maíz; Antílope y TL-2440, se utilizaron 50 mg de muestra, ahora se utilizaron cuatro concentraciones del buffer de lisis (200, 240, 300 y 400 mM), con 15 repeticiones. Esto con la finalidad de buscar una mayor precisión en los resultados y validar la concentración óptima para llevar a cabo la extracción de DNA en hojas de variedades de maíz.

4.2.1 Concentración (ng mL^{-1}).

De acuerdo con los resultados encontrado, utilizando 50 mg de muestra de maíz, se logró la menor extracción con el buffer de lisis a 300 mM, con el Nanodrop 2, mientras que, la mayor extracción se logró a 200 mM, con el Nanodrop 1 y se observa una tendencia que a mayor concentración del buffer de lisis, menor la concentración de DNA extraído (Figura 4).

De acuerdo con el ANOVA (Cuadro 9), se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre los equipos ($P > 0.000$), no se encontraron diferencias entre duplicados y se encontraron diferencias en las diferentes concentraciones del buffer de lisis. Así como una interacción entre los equipos Nanodrop y el buffer de lisis ($P < 0.011$).

4.2.2 Pureza del DNA extraído y rendimiento en hojas de las variedades de maíz Antílope y TL-2440

La pureza del DNA extraído (Figura 5), contrario a los resultados de la cuantificación de DNA, a mayor concentración molar del buffer de lisis, mayor es la pureza del DNA. El ANOVA indicó diferencias estadísticas altamente significativas ($P > 0.000$) en equipo (nanodrop) y la concentración del buffer de lisis (Cuadro 10).

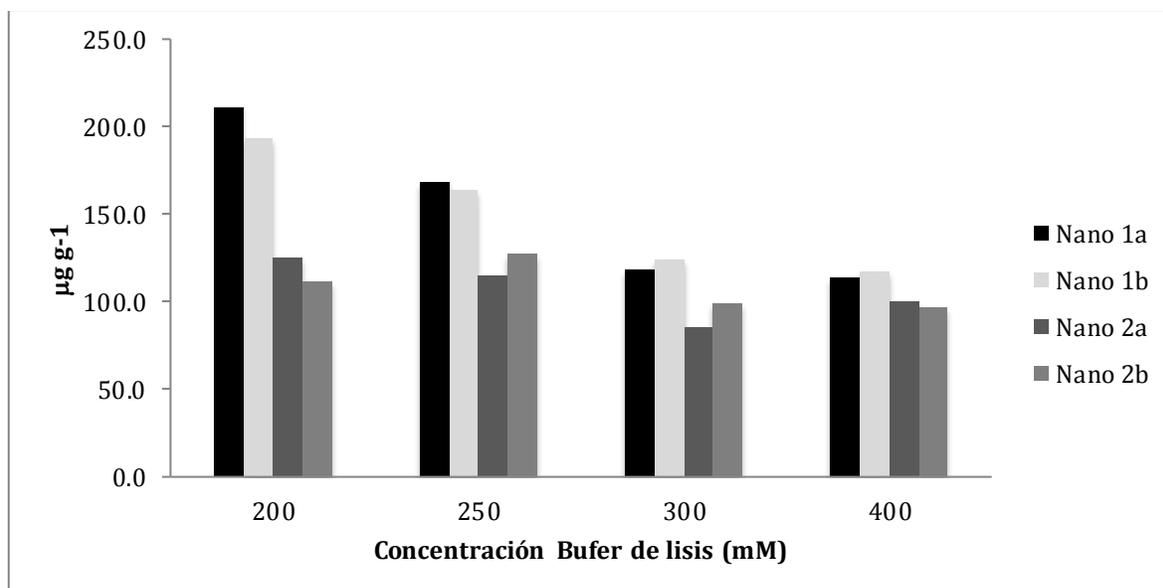


Figura 4. Resultados del efecto de la concentración del buffer de lisis sobre la cantidad (ng/g) extracción del DNA de maíz criollo, utilizando dos quipos para cuantificación; Nanodrop (Nano 1 y Nano 2), realizando la determinación por duplicado (a y b).

Cuadro 9. Análisis de varianza para la cuantificación del DNA en dos equipos de medición, realizando determinación por duplicado, con cuatro concentraciones del buffer de extracción.

Origen	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Sig.
Equipos	1.152	1	1.152	58.626	0.000
Duplicados	0.001	1	0.001	0.051	0.821
Buffer de Lisis	1.291	3	0.43	21.906	0.000
Equipo*Duplicado	0.005	1	0.005	0.237	0.627
Equipo*Buffer	0.222	3	0.074	3.773	0.011
Duplicado*Buffer	0.033	3	0.011	0.567	0.638
Eq.*Duplicado*Buffer	0.022	3	0.007	0.38	0.768
Error	4.4	224	0.02		
Total	1044.533	240			

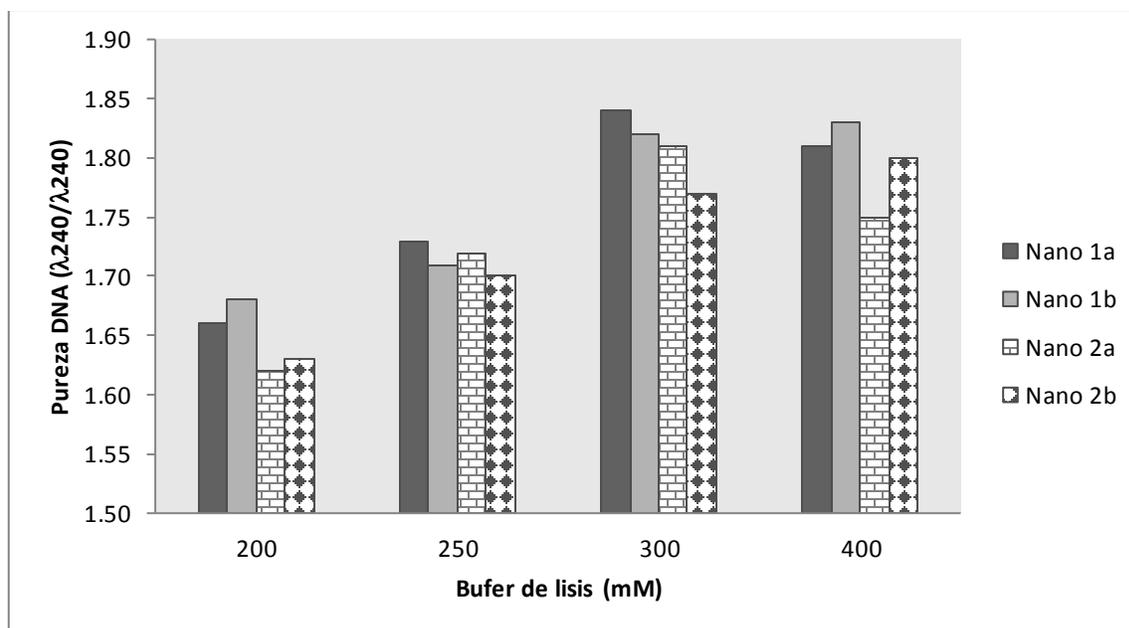


Figura 5. Resultados del efecto de la concentración del buffer de lisis sobre la pureza de la extracción del DNA de maíz criollo, utilizando dos equipos para cuantificación; Nanodrop (Nano 1 y Nano 2), realizando la determinación por duplicado (a y b).

Cuadro 10. Análisis de varianza en la determinación de pureza de extracción del DNA de hojas de maíz criollo en dos equipos de medición, realizando determinación por duplicado, con cuatro concentraciones del buffer de extracción.

Origen	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Sig.
Equipos	0.003	1	0.003	16.27	0.000
Duplicados	2.64E-07	1	2.64E-07	0.001	0.970
Buffer de Lisis	0.028	3	0.009	50.01	0.000
Equipo*Duplicado	1.23E-07	1	1.22E-07	0.001	0.979
Equipo*Buffer	0.000	3	4.80 E-5	0.259	0.855
Duplicado*Buffer	0.000	3	0.000	0.701	0.552
Equipo*Duplicado*Buffer	0.001	3	0.000	1.102	0.349
Error	0.041	224	0.000		
Total	46.259	240			

La pureza fue muy parecida a las concentraciones del buffer de lisis a 300 y 400 mM.

4.3 Comparación de la extracción del DNA y pureza en hojas de dos variedades de maíz Antílope y TL-2440.

Como se puede observar en la Figura 6, mientras que la cantidad de DNA extraído disminuye a concentraciones de 250 y 300 nM, aumentó ligeramente con el equipo de nanodrop 1, mientras que con el Nanodrop 2, se mantuvo la tendencia a disminuir.

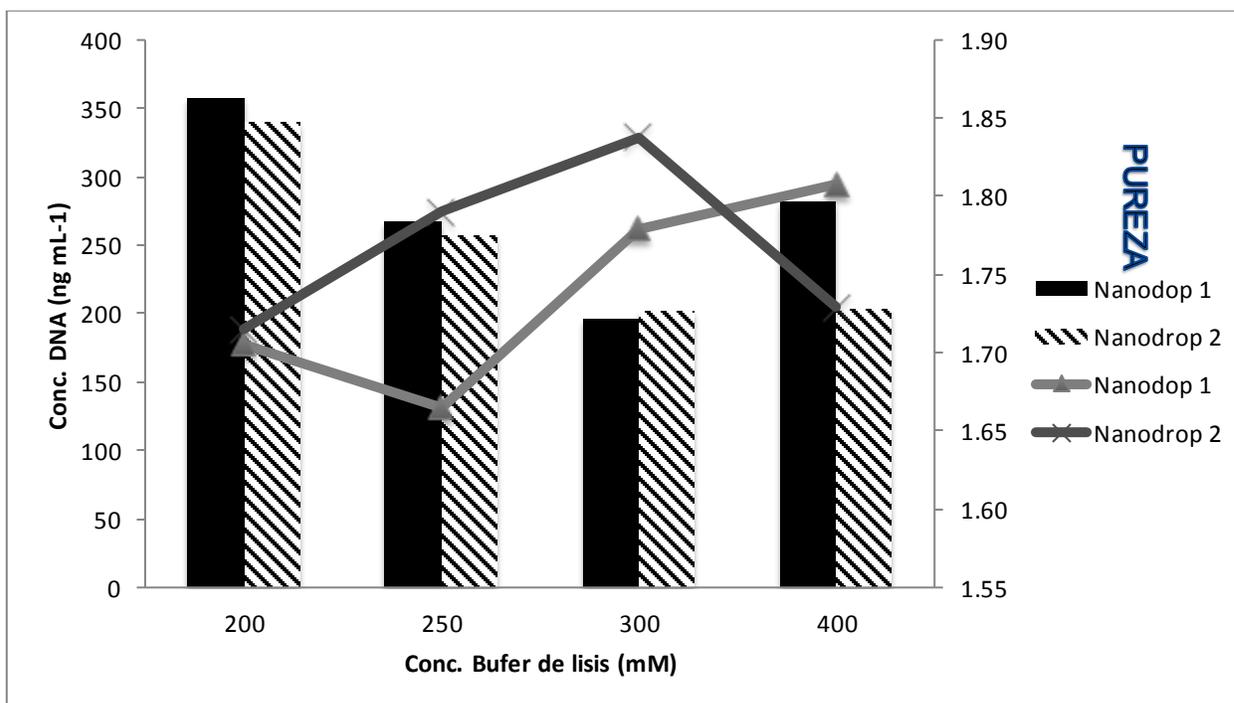


Figura 6. Valores promedio de la extracción (ng mL^{-1}) (Barra) y pureza de DNA (relación A_{230}/A_{260} entre 1.8-2.0) (Líneas) en un genotipo de maíz (*Zea mays* L.) utilizando cuatro concentraciones de buffer de lisis (mM) y dos equipos Nanodrop de la misma marca. Se utilizaron 15 repeticiones por tratamiento.

La pureza fue mejor con el buffer de lisis de 400 nM utilizando el Nanodrop 1 y fue menor a 250 nM. Por otra parte, el Nanodrop 2, la mejor pureza se obtiene a 300 nM y la menor a 200 nM, lo que quiere decir que los resultados no son

consistentes, obviamente la diferencia en los Nanodrops resultaron altamente significativos y por tanto, existe influencia de los Nanodrops sobre la pureza del DNA extraído.

Como se puede observar en el cuadro 11, dos de los mejores rendimientos de DNA se obtuvieron con el Nanodrop 1, en las concentraciones de buffer de lisis de 200 y 250 nM con 422.30 y 337.32 ng mg de tejido⁻¹ utilizado para la extracción. Se observaron nuevamente diferencias en los equipos para el rendimiento de DNA extraído. Como se observó en el Cuadro 9, el ANOVA las diferencias estadísticas son altamente significativas para los equipos y buffer de lisis ($P < 0.000$). Se ratifica la importancia de calibrar los equipos de medición con un buen control de estándar de DNA.

Cuadro 11. Comparativo del rendimiento en DNA extraído utilizando dos equipos de medición, cuatro buffer de lisis y 15 repeticiones.

Equipo	Buffer de lisis	Rendimiento ng DNA mg de tejido ⁻¹
1	200	422.30
	250	337.32
	300	236.82
	400	228.80
2	200	250.08
	250	230.44
	300	171.76
	400	200.00

Por los resultados anteriores, claramente se demuestra que existe un efecto de la concentración del buffer de lisis en el proceso de extracción, así mismo, es importante contar con estándares certificados de concentraciones de DNA conocidos, a fin de poder establecer si existe error en los equipos de medición o es debido a la falta de pericia por parte los analistas y la cantidad de muestra que se deberá de utilizar al momento de la determinación.

Aunque la espectrofotometría UV (A_{260}) se usa ampliamente para la cuantificación de ácidos nucleicos, tiene limitaciones: mide el ADN de cadena doble, pero si la muestra contiene RNA, DNA de una sola hebra u otros compuestos, como fenoles y la absorbancia aumenta en consecuencia. Tanto la degradación del ADN como su desnaturalización contribuyen a ese efecto hipercrómico. El ADN degradado puede producir fragmentos monocatenarios y desnaturalización, y se produce la separación de cadenas (Demeke y Jenkins, 2010; Gryson, 2010). Lograr una cuantificación absoluta y confiable de ADN por espectrofotometría UV es difícil, a menos que se disuelva una muestra pura de ADN de cadena doble y la molécula se distribuya uniformemente en solución. Otros métodos para cuantificar el ADN se basan en agentes intercalantes, como SYBR Green y PicoGreen. Estos colorantes fluorescentes se unen preferentemente al ADN de cadena doble, lo que es un método muy sensible. Sin embargo, los métodos SYBR Green pueden sobreestimar las concentraciones de ADN entre 15 a 50 % (Nielsen *et al.*, 2008).

El ADN extraído se podría usar en otros análisis moleculares que requieren pureza alta para obtener resultados confiables y reproducibles. Para el análisis por PCR, la idoneidad del ADN por lo general se evalúa midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. La relación A_{230}/A_{260} indica la pureza de preparación del ADN con respecto a la presencia de proteínas contaminantes, y aunque los valores obtenidos en la mayoría de las preparaciones de ADN parecían adecuadas - valores entre 1.8 y 2.0- (Sambrook y Russell, 2001; Gryson, 2010), no es un criterio absoluto. Otro indicador de calidad para los extractos de ADN puede obtenerse a partir de la relación de A_{230}/A_{260} , se recomienda que sea de ≥ 1.7 , lo que significa que la A_{260} daría lugar a una cuantificación precisa de ADN. Un valor menor que 1.7 se asocia con la presencia de compuestos fenólicos e hidratos de carbono que pueden interferir con la PCR (Corbisier *et al.*, 2007; Demeke *et al.*, 2009; Gryson, 2010). Para la mayoría de las preparaciones de ADN, el valor A_{230}/A_{260} fue mayor que 2.0, por lo cual la relación correspondiente no pudo calcularse. Los resultados mostraron que sólo algunas de las muestras obtenidas cumplen con el valor estándar mencionado, y que la pureza evaluada por

absorbancia no estuvo necesariamente relacionada con la capacidad de amplificación de un ADN determinado, como se muestra a continuación (San Juan Badillo *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

El aislamiento de DNA genómico de hojas de maíz y con ello el método de estudio demostrado para la extracción y cuantificación es una alternativa para hacerse valer a nivel regional en los laboratorios, permitirá medir la expresión genética y con los que se podrán diseñar experimentos más valiosos para lograr avanzar una parte importante del conocimiento. Queda demostrado que existe una diferencia altamente significativa en la cuantificación de extracción de DNA y en el análisis de pureza extraído con respecto al equipo de cuantificación, al buffer de lisis aplicado y significativamente en el genotipo del maíz, siendo con este estudio resultado de ser eficiente y reproducible. A esto, cabe decir la importancia que se debe tener en consideración al material y equipo utilizado, y a la estricta disciplina y enfoque que se tiene al realizar estudios similares. Sin embargo, a partir de este estudio de la extracción de DNA puede ser muy útil en estudios moleculares preliminares, proporcionando información útil en donde puede implementar junto con otros protocolos de muestreo en campo. De esta forma, da suma importancia a un aporte a los bancos de germoplasma a consideración, pues de aquí se tiende un estudio para la conservación de la diversidad genética de cultivos y especies silvestres, autóctonas o en peligro de extinción. Si bien, en agroecología, el patrimonio genético de la especie del maíz (*Zea mays*) en donde su almacenamiento y reproducibilidad representa un individuo en potencia da como énfasis la oportunidad y el valor para previas investigaciones dentro de los agroecosistemas; en síntesis esto nos permitirá conservar especies y darnos una garantía de biodiversidad.

REFERENCIAS

- Acatzi, A., Gálvez, A., Plasencia, J. y Quirasco, M., 2014. Assesment of DNA extraction methods from various maize (*Zea mays L.*) tissue for enviornmental GMO monitoring in México. Part II . Quantification by real-time PCR. *Agrociencia* 48, 35-52.
- Adetumbi, J.A., Daniel, I.O., Oyelakin, O.O., Akande, S.R. y Moronkola, D., 2013. Comparative assessment of quality of genomic DNA extracted from Maize (*Zea mays*) seed and leaf. *Agr. Sci. REs. J.* 32, 67-71.
- Alanís, E.I., 2003. Variabilidad genética de cuatro formas de especies de *Fusarium oxisporum*: Schlechtend, Emed, Snyd, & hars, mediante las técnicas moleculares: RAPD, MP-PCR y RAMP nr. Tesis de licenciatura. Departamento de Parasitología Agrícola de UACH. Texcoco, México.
- Aljanabi, S.M. y Martínez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25, 4692-4693.
- Altieri, M.A., 2015. Breve reseña sobre los orígenes y evolución de la agroecología en América Latina. *Agroecología* 10, 7-8.
- Álvarez-Buylla E., 2004. Aspectos ecológicos, biológicos y de agrobiodiversidad de los impactos del maíz transgénico. En: *Maíz y biodiversidad: efectos del maíz transgénico en México. Conclusiones y recomendaciones*. Informe del Secretariado de la Comisión para la Cooperación Ambiental. 24 p.
- Anderberg, M.R., 1993. *Cluster analysis for applications*. New York. USA.
- Anderson, E. y Cutler, H., 1942. Races of *Zea Mays*: I. Their recognition and classification. *Ann. Botanical GArden* 29, 69-89.
- Aragón Martínez, M.C., 2011. Variación genética en maíces criollos de la región Loxicha, Oaxaca. Fecha e consulta. 28 de marzo del 2018. Disponibel en: https://http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Fomento-investigacion/Tesis/Tesis_julio_2011_97-2003.pdf.
- Astier, C.M., Argueta, Q., Orozco-Ramírez, Q., González, S.M.V., Morales, H.J., Peter Gerritson, P.E.W., Escalona, M., Rosado, M., Sánchez-Escudero, J., Martínez, T.S.S., Sánchez-Sánchez, C.D., Arzuffi, B.R., Castrejón, A.F., Morales, H., Soto, P.L., Mariaca, M.R., Ferguson, B., Rosset, P., Ramírez, T.H.M., Jarquin, G.R., Moya, G.F., González-Esquivel, C. y Ambrosio, M., 2015. Historia de la agroecología en México. *Agroecología* 10, 9-18.
- Bellon, Mauricio R. y Julien, B., 2003. "Transgenic Maize and the Evolution of Landrace Diversity in Mexico. The Importance of Farmers' Behavior", *Plant Physiology, Agricultural Ethics, USA*, vol. 134, march.
- Bernet, G.P. y Asins, M.J., 2003. Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in Citrus and Poncirus. *Theor Appl Genet* 108, 121-130.

- Bishop, D.G., Rutberc, L. y Samuelsson, B., 1967. The Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of *Bacillus subtilis* by Sodium Dodecyl Sulphate. Department of Chemistry and Department of Bacteriology, Harolinska Institute, Stockholm.) pag. 454-459.
- Blanco Contreras, E. y Sáenz López, M. 2015. Ingeniero en Agroecología; Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, México. In: V Congreso Latinoamericano de Agroecología, La Plata, Argentina, 5.
- Breña Ochoa, A., 2013. Estructura genética espacial asociada a la selección en razas de maíz de México. Instituto de Ecología. UNAM, México.
- Capy, P., Gasperi, G., Biemont, C. y Bazin, C., 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* (Edinb) 85 (Pt 2), 101-106.
- Casas A., Caballero J., Mapes C., Zárate S., 1997. Manejo de la vegetación, domesticación de plantas y origen de la agricultura en Mesoamérica. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 61: 31-47.
- Chabi Sika, K., Kefela, T., Adoukonou-Sagbadja, H., Ahoton, L., Saidou, A., Baba-Moussa, L., Baptiste, L.J., Kotconi, S.O. y Gachomo, E.W., 2015. A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems.
- CONABIO, 2018a. Centros de origen. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Fecha de consulta. 28 de Marzo del 2018. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/centrosOrig.html>.
- CONABIO, 2018b. Diversidad genética. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Fecha de consulta. 28 de Marzo del 2018. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/divgenetica.html>.
- CONABIO, 2018c. Especies domesticadas en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Fecha de consulta. 28 de Marzo del 2018. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/otrosCentros.html>.
- CONABIO, 2018d. Variabilidad genética. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Fecha de consulta. 28 de Marzo del 2018. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/vargenetica.html>.
- Corbisier, P., Broothaerts, W., Gioria, S., Schimmel, H., Burns, M., Baoutina, A., Emslie, K.R., Furui, S., Kurosawa, Y., Holden, M.J., Kim, H.H., Lee, Y.M., Kawaharasaki, M., Sin, D., y WangJ., 2007. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt176 corn by real-time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3249-3257.

- Cotter J., 2003. *Troubled Harvest. Agronomy and Revolution in Mexico, 1880-2002*. Westport. Praeger.
- Demeke, T., Ratnayaka I., y Phan, A., 2009. Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready soybean. *J. AOAC Int.* 92: 1136-1144.
- Demeke, T., y Jenkins, G.R., 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 1977-1990.
- Doyle, J.J. y Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*,12:13-15.
- Edwards, K., Johnstone, C. y Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349.
- Fragoso Pérez, E.M., 2006. *Envejecimiento natural y perfiles genómicos de semillas de maíz*. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, I.P.N., México.
- Friesen, N., Brandes, A. y Heslop-Harrison, J.S., 2001. Diversity, origin, and distribution of retrotransposons (gypsy and copia) in conifers. *Mol Biol Evol* 18:1176-1188.
- González Ángeles, M.A., 2018. *Efectos jurídicos del maíz genéticamente modificado en los pueblos indígenas*. Facultad de Derecho. UNAM, México.
- Grandbastien, M.A., 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci.* 3:181-187.
- Gryson, N., 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 2003-2022.
- Guillemaut, P. y Mardchal-Drouard, L., 1992. Isolation of Plant DNA: A Fast, Inexpensive, and Reliable Method. (PG) Laboratoire de Biologie Végétale Appliquée, Institut Universitaire de Technologie Louis Pasteur, 3 rue de l'Argonne, F-67000 Strasbourg, France; (LMD) Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, 12 rue du Général Zimmer, F-67084 Strasbourg Cedex, France. *Plant Molecular Biology Reporter* pages 60-65 Volume 10(1).
- Havecker, E.R., Gao, X. y Voytas, D.F., 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol.* 5:225.
- Herrera-Cabrera B.E., Castillo-González F., Sánchez-González J.J., Hernández-Casillas J.M., Ortega-Paczka R.A. y Major-Goodman M., 2004. Diversidad del maíz Chalqueño. *Agrociencia.* 38: 191-206.
- Hill-Ambroz, K.L., Brown-Guedira, G.L. y Fellers, J.P., 2002. Modified rapid DNA extraction protocol for high throughput microsatellite analysis in wheat. *Crop Sci.* 42:2088-2091.

- IMNC 2009. Vocabulario internacional de metrología - Conceptos fundamentales y generales, términos asociados (VIM). In ISO/IEC Guide 99:2007. NMX-Z-055-IMNC-2009, Certificación, I.M.d.N.y., ed. (México, IMNC), 84.
- Kato, T.A., Mapes, C., Mera, L.M., Serratos, J. A. y Bye, R.A., 2009. Origen y diversificación del maíz: una visión analítica, México, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Kaufman, L. y Rousseeuw, P.J., 1990. Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J.M. y Gessler, C., 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 85:901-904.
- Kumar, A. y Bennetzen, J.L., 1999. Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet* 33, 479-532.
- Li, H., Li, J., Cong, X.H., Duan, Y.B., Li, L., Wei, P.C., Lu, X.Z. y Yang, J.B., 2013. A high-throughput, high-quality plant genomic DNA extraction protocol. *Genet Mol Res* 12:4526-4539.
- Larios Serrato, V., 2009. Diseño de un chip de DNA para la identificar la huella genómica de un organismo genético. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N., México.
- Malik, H.S. y Eickbush, T.H., 2001. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res* 11:1187-1197.
- Marmur, J., 1961. A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
- Matsuoka, Y., Mitchell, S.E., Kresovich, S., Goodman, M. y Doebley, J., 2002. Microsatellites in *Zea* - variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor Appl Genet* 104:436-450.
- Natarajan, V.P., Zhang, X., Morono, Y., Inagaki, F. y Wang, F., 2016. A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments. *Front Microbiol* 7:986.
- Nielsen, K., Smidt Mogensen, H., Hedman, J., Niederstätter, H., Parson, W. y MorlingN., 2008. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2: 226-230.
- Ortega, P. R., J.J. Sánchez G., Castillo González, F. y Hernández Casillas, J.M., 1991. Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México, En: Ortega P., R., G. Palomino H., F. Castillo G., V.A. González H. y M. Livera M. (eds.), avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México. México: Sociedad Mexicana de Fitogenética. pp. 161-185.
- Paliwal, R.L., 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO–. 376 p.

- Ramírez Mandujano, M., 2006. Deterioro inducido y huella genómica de maíz. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, I.P.N., México.
- Ramos, C.G., Grilo, A.M., da Costa, P.J.P., Feliciano, J.R. y Leitão J.H., 2014. MtvR Is a global small noncoding regulatory RNA in *Burkholderia cenocepacia*. *J Bacteriol.* 195:3514–3523.
- Rodríguez-Ponce, A.K., Ron-Parra, J. y Torres-Morán, M.I., 2012. “Determinación molecular de la fidelidad genética en dos líneas de maíz después de ciclos de autofecundación. *Rev. Int. Cont. Amb.* 28, 146.
- Sambrook, J., y Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3rd edition. Cold Spring Harbor Press, USA.
- San Juan Badillo, A., Gálvez, A., Plasencia, A. y Quirasco, M., 2014. Assesment of DNA extraction methods from various maize (*Zea Mays L.*) tissue for enviornmental GMO monitoring in México. Part I . Detected by end-point PCR. *Agrociencia* 48:17-33.
- San Miguel, P. y Vitte, C. 2009. The LTR-retrotransposons of maize, In: Bennetzen, J.L., Hake, S. (Eds.) *Handbook of maize.* Springer, New York, 307-331.
- San Miguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z. y Bennetzen, J.L., 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274:765-768.
- Sánchez, G.J.J., Goodman M.M. y Stuber C.M., 2000. Isozymatic and Morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany*, 54:143-159.
- Sarilar, V., Ridet, C., Rousselet, A., Falque, M., Letanneur, J.-C., Eber, F., Chèvre, A.-M., Brandt, P. y Alix, K., 2010. What is the impact of allopolyploidy on transposable elements? A structural approach on newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Acta Hort.* 867:113-117.
- Torres Morán, M.I., 2009. Caracterización molecular del complejo *Agave durangensis* por medio de marcadores ISTR. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, I.P.N., México.
- Torres-Morán, M.I., Almaraz Abarca, N. y Escoto-Delgadillo, M., 2012. ISTR, a retrotransposons-based marker to assess plant genome variability with special emphasis in the genera *Zea* and *Agave*. *Amer. J. Plant Sciences* 3: 1820-1826.
- Valadez, M.E. y Kahl, G., 2000. Huellas de DNA en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundiprensa. D. F., México.
- Valdés Blanquet, A.Y.N., 2006. Semillas sintéticas de maíz. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, I.P.N., México.

- Wellhausen, E.J., L.M., R. y Hernández X., E. 1951. Razas de maíz en México, su origen, características y distribución (México, Secretaria de Agricultura y Ganadería de México y Fundación Rockefeller), 239.
- Zhang, L., Wang, B., Pan, L. y Peng, J., 2013. Recycling isolation of plant DNA, a novel method. *J Genet Genomics* 40:45-54.
- Zhou, J., Bruns, M.A. y Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62:316-322.