

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA**



**Extracción y purificación de DNA en hojas de maíz sin el uso de  
nitrógeno líquido**

Por:

**MARÍA DEL CARMEN PÉREZ VALENCIA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

Torreón, Coahuila, México.

Diciembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

**Extracción y purificación de DNA en hojas de maíz sin el uso de  
nitrógeno líquido**

Por:

**MARÍA DEL CARMEN PÉREZ VALENCIA**

TESIS

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

**INGENIERO AGRÓNOMO**

Aprobada por:



Dr. Jesús Vásquez Arroyo  
Presidente



Dra. Oralia Antuna Grijalva  
Vocal

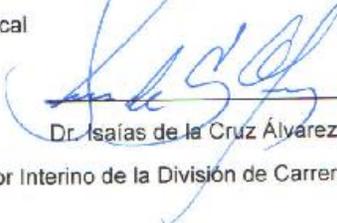


M.C. Sergio Hernández Rodríguez  
Vocal



M.C. Gerardo Zapata Sifuentes  
Universidad Autónoma Agraria  
ANTONIO NARRO

M.C. Gerardo Zapata Sifuentes  
Universidad Autónoma Agraria  
ANTONIO NARRO



Dr. Isaias de la Cruz Álvarez  
Coordinador Interino de la División de Carreras Agronómicas



COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN  
DE CARRERAS AGRONÓMICAS

Torreón, Coahuila, México.

Noviembre 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

**Extracción y purificación de DNA en hojas de maíz sin el uso de  
nitrógeno líquido**

Por:

**MARÍA DEL CARMEN PÉREZ VALENCIA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Jesús Vásquez Arroyo

Asesor Principal



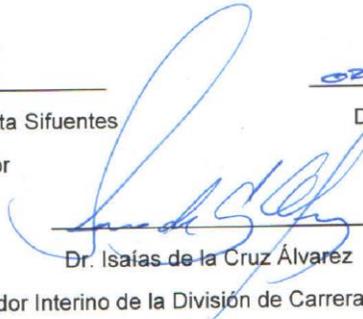
M.C. Gerardo Zapata Sifuentes

Coasesor



Dra. Oralia Antuna Grijalva

Coasesor



Dr. Isaías de la Cruz Álvarez

Coordinador Interino de la División de Carreras Agronómicas

Universidad Autónoma Agraria  
ANTONIO NARRO



COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN  
DE CARRERAS AGRONÓMICAS

Torreón, Coahuila, México.

Noviembre 2021

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a DIOS primeramente por la vida.

Agradezco a la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO la oportunidad y el privilegio de estudiar, fue mi segunda casa donde me brindo lo necesario para poder formarme profesionalmente y hacer realidad uno de tantos sueños.

AI DR JESÚS VÁSQUEZ ARROYO por la oportunidad de trabajar en el proyecto, el apoyo incondicional, la confianza puesta en mí, y esos sabios consejos que nunca voy a olvidar.

A MIS PROFESORES por la paciencia, dedicación y el apoyo incondicional siempre.

A MI FAMILIA, por estar siempre ahí apoyándome, en los buenos y malos momentos.

A mi novio Maufret Roblero que continua motivándome a salir adelante.

A todos esas personas maravillosas que encontré en el camino, y me dieron la mano cuando más necesite a mis amigos, amigas y maestros los llevo en el corazón a cada uno de ustedes.

## **DEDICATORIA**

Este logro es dedicado a MIS PADRES Abenamar Pérez Hernández y Mayte Valencia Helería, a mi hermano Abenamar Pérez Valencia fueron mi razón para estudiar, por ser el motor en todo momento para poder terminar la carrera y mi motivación para ser mejor persona cada día.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Rancho el Retiro el cual se encuentra ubicado en San Pedro de la Colonias Coahuila, propiedad de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Se evaluaron genotipos del CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO (CIMMYT), se seleccionó la línea 3 para el estudio, dos surcos por línea de 10 m de largo. Se colectaron 25 hojas de las plantas de la línea 3 y se llevaron al laboratorio para su análisis. Las hojas de las plantas se secaron y molieron. Para la extracción del DNA se llevó a cabo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (T1-T4) y un control comercial (Plant DNAzol®). Se realizaron 25 repeticiones y la lectura por triplicado para las determinaciones de concentración y pureza. Se realizó un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Los resultados de análisis de varianza mostraron diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ) entre tratamiento y efecto del equipo de cuantificación. El rendimiento de extracción del DNA (ng de DNA mg de tejido de planta<sup>-1</sup>), fueron de 587 y 369 con los tratamientos T4 y T1 respectivamente, sin embargo, la pureza oscilo entre 1.0-2.8, para el primero y 1.0-1.4 para el segundo. La cantidad y la calidad del producto de extracción son relevantes y a considerar, así como la validación del método de extracción y la calibración del equipo de medición, mediante estándares certificados o internos de calidad comprobada.

**Palabras claves:** Nanodrop, Rendimiento de extracción del DNA, Maíz (*Zea mays*), Rancho el Retiro, Ácido desoxirribonucleico

## INDICE DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>i</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>INDICE DE CONTENIDO</b> .....	<b>iv</b>
<b>CAPÍTULO I.</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS.....	2
<b>1.1.2 General</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.3 Particulares</b> .....	<b>2</b>
1.2 HIPÓTESIS.....	2
<b>CAPÍTULO II.</b> .....	<b>3</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 El cultivo de maíz.....	3
2.2 Centros de origen y diversificación.....	5
2.3 Razas de maíz .....	6
2.4 Diversidad genética .....	7
2.5 Variabilidad genética.....	8
2.6 Estructura del ADN .....	9
2.7 Tipos de Ácido Desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés). .....	10
Bases nitrogenadas del DNA .....	10
2.8 Que son las alteraciones genéticas .....	10
2.9 Alteraciones en el ADN.....	11
2.10 Extracción de ADN.....	11

2.11 Marcadores moleculares.....	12
2.11.1 Marcadores detectados por hibridación. ....	12
2.12 Ventajas y desventajas de la extracción de ADN .....	13
<b>CAPÍTULO III. ....</b>	<b>14</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Ubicación.....	14
3.2 Material biológico .....	16
3.3 Reactivos del Buffer de extracción .....	16
3.4 Para la extracción de DNA.....	16
3.5 Determinación de concentración (ngmL <sup>-1</sup> ), pureza (relación absorbancia aλA230/A260) y rendimiento del DNA (ngmg de tejido <sup>-1</sup> ) .....	17
3.6 Diseño experimental .....	17
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>17</b>
4.1 Extracción de ADN.....	17
4.1.1 Extracción de DNA (ng μL <sup>-1</sup> ) de hojas de maíz. ....	17
4.1.2. Pureza (relación λ 260/280) del DNA extraído de las hojas de maíz, cuantificado con equipo Nanodrop 2000. ....	20
Análisis de varianza (ANOVA) de Pureza del DNA extraído de las hojas de maíz. ....	23
4.1.3. Rendimiento de extracción del DNA tejido de hoja de maíz (ng mg <sup>-1</sup> ) .....	24
<b>Discusión .....</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>33</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> La genética es una disciplina de la biología que estudia los genes (Rico, 2019). .....	5
<b>Figura 2.</b> Cuello de botella (Rico, 2019) .....	8
<b>Figura 3.</b> Estructura química de las bases nitrogenadas (Valle de biología., 2013). 10	
<b>Figura 4.</b> Distribución de la extracción de DNA (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz de 25 repeticiones y triplicado por repetición para el tratamiento 1. ....	18
<b>Figura 5.</b> Distribución de la extracción de DNA (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz de 25 repeticiones y triplicado por repetición para el tratamiento 2. ....	18
<b>Figura 6.</b> Distribución de la extracción de DNA (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz de 25 repeticiones y triplicado por repetición para el tratamiento 3. ....	19
<b>Figura.8</b> Distribución de pureza (relación $\square\square$ 260/280) de DNA extraído (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 1. 21	
<b>Figura .9</b> Distribución de pureza (relación $\square\square$ 260/280) de DNA extraído (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 2 21	
<b>Figura 10.</b> Distribución de pureza (relación $\square\square$ 260/280) de DNA extraído (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 3 .....	22
<b>Figura 11.</b> Distribución de pureza (relación $\square\square$ 260/280) de DNA extraído (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 4. ....	22
<b>Figura.13.</b> Resultados del rendimiento de DNA extraído (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 2. ....	25
<b>Figura 14.</b> Resultados del rendimiento de DNA extraído (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 3 .....	26
<b>Figura 15.</b> Resultados del rendimiento de DNA extraído (ng $\mu$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 4. ....	26
<b>Figura 16.</b> Resultados de la extracción del DNA de plantas de maíz empleando un reactivo comercial para plantas Plant DNAzol® de invitrogen, empleado 10 repeticiones y lecturas por triplicado de cada repetición. Donde A, es para extracción del DNA del tejido, B; pureza y C, rendimiento. ....	28

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Tipo de tejido, cantidad de muestra y rendimiento esperado de ADN, usando combo de extracción comercial. ....	14
Cuadro 2 Estadísticos descriptivos de las concentraciones de ADN en tratamientos de maíz. ....	20
Cuadro 3 Diferencia entre tratamientos en la extracción de DNA de hojas secas de maíz (ng $\mu$ L-1), de acuerdo a la Prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).....	19
Cuadro 4 Análisis de varianza de la pureza en la extracción del DNA de hojas de maíz. ....	23
Cuadro 5 Análisis de media de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) de la pureza en la extracción del DNA de hojas de maíz. ....	24

## CAPÍTULO I.

### INTRODUCCIÓN

El maíz es considerado uno de los tres cereales más consumidos a nivel mundial junto con el trigo y el arroz. Este cereal fue domesticado y venerado por las culturas prehispánicas, y sigue siendo la base de la alimentación mexicana (Coll y Godínez, 2003, FAO, 2006).

México es reconocido como el centro de origen del maíz (*Zea mays* L.). La arqueología ha demostrado que los restos más antiguos provienen de los estados de Oaxaca y Puebla, donde existe una gran variedad de especies criollas y parientes silvestres (Benz, 2001; Piperno y Flannery, 2001). La diversidad genética del maíz es patrimonio nacional y mundial, y una fuente importante para los programas de mejoramiento genético en este cultivo (FAO, 1995).

El cultivo de maíz son plantas domesticada completamente, el hombre y el maíz han sobrevivido y han evolucionado ambos desde tiempos antiguos. El maíz no crece en forma salvaje y no puede sobrevivir en la naturaleza, siendo dependiente directamente de los cuidados del hombre (Wilkes, 1985; Galinat, 1988; Dowsell, Paliwal y Cantrell, 1996).

Con el descubrimiento del ADN (ácido desoxirribonucleico) en 1953, fue un avance científico extraordinario en la biología y la genética molecular. El ADN es una estructura química de doble hélice conformada por nucleótidos. A lo largo de la doble cadena de ADN se localizan los genes, los cuales codifican información (proteína).

El descubrimiento de la técnica de la (PCR) reacción en cadena de la polimerasa, originó una gran revolución en la biología en cuanto a la investigación, generando así una mejor interpretación de procesos biológicos como en las áreas de estudios genéticos, diagnóstico y mejora (Mullis y Faloona, 1987).

La aplicación de esas técnicas es de especial interés para la exitosa ejecución de programas de mejoramiento genético, la obtención de ADN es el punto clave para los análisis genéticos posteriores.

La limitante para los estudios moleculares en plantas es la obtención del ADN. En la actualidad existen muchas técnicas o métodos para manipular el ADN de plantas, cabe mencionar que todos los métodos tienen como objetivo obtener ADN de calidad y pureza. Un aspecto indispensable es que el protocolo debe ser fácil, simple, barato y en lo posible no debe emplear sustancias químicas peligrosas (Mogg y Bond, 2003; Nieto *et al.*, 2005; Scoot y Playford, 1996).

El nitrógeno líquido es un componente muy importante para la extracción, esta caro y no está disponible al alcance de todos (Adentumbi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013) es por eso que se busca establecer un nuevo método sin el empleo de nitrógeno líquido.

## **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.

## **1.2 HIPÓTESIS**

Existen diferencias de medias en la concentración del buffer de lisis, la extracción y la pureza del DNA obtenido.

## CAPÍTULO II.

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 El cultivo de maíz

El maíz (*Zea mays L.*) Es una de las especies más cultivadas y productivas. Tiene el potencial más alto para la producción de carbohidratos por unidad de superficie por día. Es el primer cereal sometido a rápidas e importantes transformaciones tecnológicas en su forma de cultivo, es una planta C4 con una alta tasa de actividad fotosintética. Fue el primer cereal sometido a rápidas e importantes transformaciones tecnológicas en su forma de cultivo, tal como ha sucedido con la aparición de los híbridos. Con el éxito obtenido a través de los avances tecnológicos el cultivo de maíz estimuló una revolución agrícola en diferentes partes del mundo (Golik *et al.*, 2018)

Es el cereal más cultivado en una amplia diversidad de ambientes, siendo mucho mayor que cualquier otro cultivo. Se cultiva hasta los 58° de latitud norte en Canadá y en Rusia y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile. Con respecto a la altitud, el maíz es cultivado a altitudes medias, si bien también se cultiva por debajo del nivel del mar. De acuerdo a la altitud donde se lo cultiva y el ambiente, el maíz se clasifica en dos tipos. Maíz cultivados en ambiente cálidos (entre la línea ecuatorial y los 30° de latitud sur y los 30° de latitud norte es el maíz conocido como “maíz tropical” y el que se cultiva en climas más fríos (a más de los 34° de latitud sur y norte) es llamado maíz de zona templada. Los maíces que se cultivan entre los 30° y 34° de las latitudes norte y sur se conocen como maíces subtropicales (Paliwal, 2001).

En cuanto a su origen filogenético, existen diferentes teorías: Una de las teorías reconoce el hecho de que el teosinte es el antecesor silvestre y/o allegado al maíz y que ha participado directamente en el origen del maíz cultivado (Iltis, 1983;

Mangelsdorf, 1986; Galinat, 1988, 1995; Goodman, 1988; Doebley, 1990). Galinat (1988) conjuntamente con Harlan & de Wet (1971), tuvieron en cuenta estudios arqueológicos, morfológicos, hibridológicos, genéticos y citogenéticos del maíz (*Zea*), los teosintos (*Euchlaena*) y el género *Tripsacum*.

Para México la importancia del maíz, especialmente como parte de la alimentación de su población ha sido documentada ampliamente (Randolph, 1952; 1981; Figueroa y Aguilar, 1997).

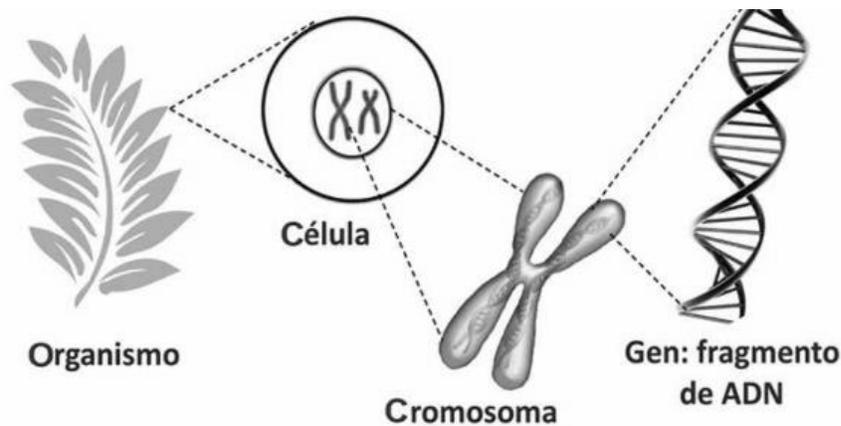
Este cereal fue domesticado y venerado por las culturas prehispánicas, y sigue siendo la base de la alimentación mexicana (Coll y Godínez, 2003, FAO, 2006).

México se considera como el centro de origen y domesticación del maíz, es uno de los centros más importantes de diversidad de este cultivo (Benz, 2001; Matsuoka *et al.*, 2002; Tenailon *et al.*, 2004; Doebley, 2004; Turrent y Serratos, 2004; Buckler y Stevens, 2005; Buckler *et al.*, 2006; Pohl *et al.*, 2007). No hay un acuerdo sobre cuándo se empezó a domesticar el maíz, pero los indígenas mexicanos dicen que esta planta representa, para ellos, diez mil años de cultura (Riveiro, 2004).

La domesticación fue a partir de los “teocintles”, gramíneas muy similares al maíz, que crecen de manera natural principalmente en México y en parte de Centroamérica. Se estima que las poblaciones de teocintle del centro de México o los que crecen en el trópico seco de la Cuenca del Balsas, pudieron ser los ancestros del maíz que se domesticó como planta cultivada (Matsuoka *et al.*, 2002).

Actualmente (*Zea mays* L.) es uno de los tres cereales más importantes del mundo. En México es de gran importancia por su historia, tradición e impacto social y económico.

La evaluación de dicha diversidad es importante para los programas de mejoramiento genético, por su gran potencial como fuente de características nuevas, exóticas y favorables (Vigouroux *et al.*, 2008).



**Figura 1.** La genética es una disciplina de la biología que estudia los genes (Rico, 2019).

La variabilidad genética de maíz constituye una riqueza para la población mundial, y puede ser la base fundamental para lograr la soberanía alimentaria de México, en especial ante los cambios climáticos (Preciado y Montes, 2011).

## 2.2 Centros de origen y diversificación

Las especies que hoy conocemos han tenido su origen en diferentes momentos de la historia de nuestro planeta. La mayor parte de esta diversidad se originó en tiempos geológicos diferentes, así como 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. (CONABIO, 2019a)

Una especie o un grupo relacionado de especies pueden diversificarse más en regiones diferentes a las de su origen, a las que llegan a dispersarse por los fenómenos o procesos citados. Los “centros de diversificación” actuales pueden no ser exactamente 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 %).

El hombre ha mantenido activo el proceso de diversificación, mediante el cual ha seleccionado y modificado características genotípicas de la planta, que le han permitido la formación de nuevas poblaciones adaptadas a diversos climas y tipos de suelos. De acuerdo con Sánchez *et al.* (2000), Goodman y Brown (1988), Ortega-Paczka (2003), y Pressoir y Berthaud (2004) la interacción ambiente-genotipo y el aislamiento geográfico favorecieron la distribución geográfica de nuevas variantes de maíz obteniendo así una diversificación.

### **2.3 Razas de maíz**

Raza, es uno de los términos se ha utilizado en el maíz y en las plantas cultivadas para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, de orden morfológico, ecológico, genético y de historia de cultivo, que permiten diferenciarlas como grupo (Anderson y Cutler 1942; Harlan y de Wet 1971; Hernández y Alanís 1970).

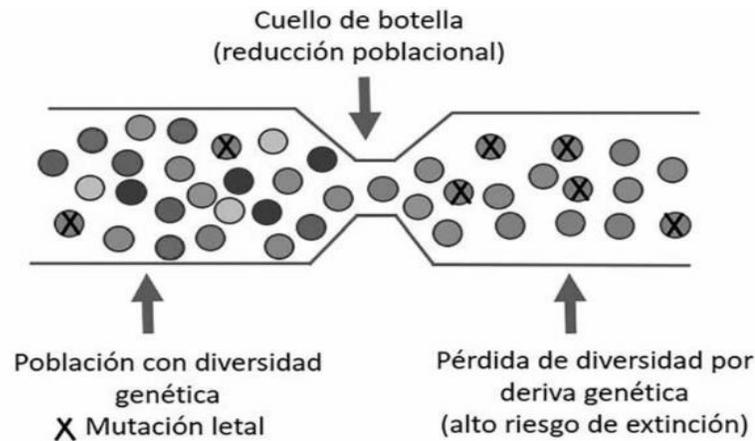
El concepto y la categoría de raza es de gran utilidad como sistema de referencia rápido para comprender la variación de maíz, para organizar el material en las colecciones de bancos de germoplasma y para su uso en el mejoramiento (Wellhausen, 1990), así como para describir la diversidad a nivel de paisaje (Perales y Golicher 2011).

Las razas se nombran a partir de distintas características fenotípicas (Cónico, por la forma de la mazorca), tipo de grano (Reventador, por la capacidad del grano para explotar y producir palomitas), por el lugar o región donde inicialmente fueron colectadas o son relevantes (Tuxpeño de Tuxpam, Veracruz; Chalqueño, típico del Valle de Chalco) o por el nombre con que son conocidas por los grupos indígenas o mestizos que las cultivan (Zapalote Chico en el Istmo de Oaxaca o Apachito en la Sierra Tarahumara) (McClintock, 1981; Wellhausen *et al.*, 1951).

En América Latina se han descrito cerca de 220 razas de maíz (Goodman y McK. Bird. 1977), de las cuales 64 (29%) se han identificado, y descrito en su mayoría, para México (Anderson, 1946; Wellhausen *et al.*, 1951; Hernández y Alanís, 1970; Sánchez, 1989; Sánchez *et al.*, 2000).

#### **2.4 Diversidad genética**

La diversidad genética es el número total de características genéticas dentro de cada especie. Esta diversidad se reduce cuando hay “cuellos de botella”, es decir, cuando una población disminuye substancialmente y quedan pocos individuos. Por ejemplo, la población de alrededor de 100 leones (*Panthera leo*) del Cráter Ngorongoro en Tanzania desciende de alrededor de 15 leones sobrevivientes de una plaga de moscas mordelonas (*Stomoxys calcitrans*) producida por el aumento de lluvias en 1962. La pérdida de diversidad genética de los leones del Cráter ha resultado en problemas reproductivos y de sobrevivencia (Rico, 2019)



**Figura 2.** Cuello de botella (Rico, 2019)

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. La diversidad genética se puede medir utilizando la diversidad de genes, la heterocigocidad, o el número de alelos por locus.

## 2.5 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, 2019b).

La variabilidad genética de las especies es más evidente en 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. 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*). Mayormente la variación en los individuos proviene de los genes, es decir, es variabilidad genética. Ésta, hace posible 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. En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (Schlötterer, 2004).

## **2.6 Estructura del ADN**

Las características más importantes de la estructura del adn son las siguientes:

1) La estructura básica es helicoidal –consta de dos hélices que se entrecruzan–, el corazón de la hélice está ocupado por las bases purínicas y pirimidínicas –los grupos fosfato están en el exterior.

2) Las hélices no son idénticas, sino complementarias de manera que si una hélice contiene una base purínica la otra contiene una pirimidínica –esta característica es producto de nuestro intento de que los residuos sean equivalentes y, al mismo tiempo, de situar las bases purínicas y pirimidínicas en el centro. (Watson y Crick, 1953).

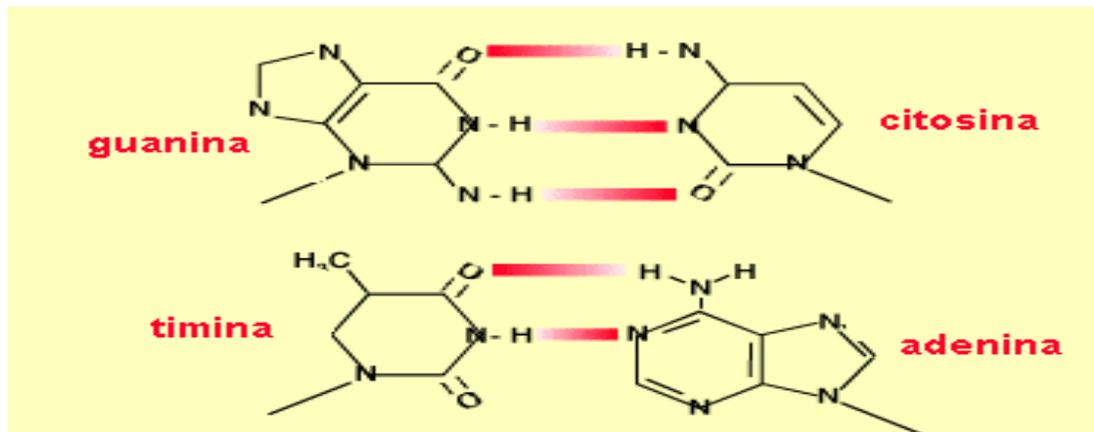
El apareamiento de las purinas con las pirimidinas es muy exacto y obedece a su deseo de formar enlaces de hidrógeno– la adenina formará pareja con la timina mientras que la guanina siempre lo hará con la citidina. (Watson y Crick, 1953).

## 2.7 Tipos de Ácido Desoxirribonucléico (DNA, por sus siglas en inglés).

### Bases nitrogenadas del DNA

Las bases nitrogenadas de los nucleótidos son moléculas orgánicas (basadas en carbono), compuestas por estructuras anulares que contienen nitrógeno química (Illana, 2013).

Cada nucleótido del ADN contiene una de cuatro posibles bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G) citosina (C) y timina (T). La adenina y la guanina son **purinas**, significa que sus estructuras contienen dos anillos fusionados de carbono y nitrógeno. En cambio, la citosina y la timina son **pirimidinas** y tienen solo un anillo de carbono y nitrógeno (Figura 1) (Kahn Academy, s/f).



**Figura 3.** Estructura química de las bases nitrogenadas (Valle de biología., 2013).

## 2.8 Que son las alteraciones genéticas

Se puede decir de manera general, que las alteraciones genéticas tienen dos orígenes: se puede presentar una alteración por factores externos de tipo ambiental y factores internos de tipo genético. (Veritas Intercontinental, 2020).

Cualquier cambio en la secuencia del ADN, puede alterar el código genético y, por tanto, puede que altere la síntesis de la proteína para la que codifica.

Como hemos visto anteriormente las alteraciones genéticas se trata de una sustitución, ya que se produce el cambio de un nucleótido por otro, pero hay más tipos de alteraciones genéticas, de manera general:

**Sustitución:** cambio de una base por otra.

**Delección:** eliminación de una serie de bases.

**Duplicación:** duplicación de un fragmento de bases.

**Inversión:** inversión del orden de una secuencia de bases (Veritas Intercontinental ,2020).

## 2.9 Alteraciones en el ADN

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

## 2.10 Extracción de ADN

Se le llama extracción al método por el cual se obtiene el ADN a partir de material biológico (ej.: cepillado bucal, saliva, sangre o cualquier tejido) utilizando técnicas físicas y químicas. La extracción consiste en la separación y purificación del ADN con el fin de poder estudiarlo, analizarlo o manipularlo (Checa, 2016).

El primer paso para desarrollar experimentos con marcadores moleculares es la extracción del ADN (Rocha, 2002). Un buen método de extracción debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración (Sambrok *et al.*, 2001)

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos

cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Velázquez *et al.*, 2014)

### **2.11 Marcadores moleculares.**

Los marcadores moleculares que se relacionan a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar individuos que contengan esa característica y diferenciarlos de los que no la posean, brinda información sobre la diversidad genética. Esto es un aspecto importante en el campo de la biología tanto aplicada como fundamental: Ecología, Biología de la Evolución, Taxonomía, Agronomía, Biotecnología, Microbiología, Genética, etc (Cornide, 2000).

#### **2.11.1 Marcadores detectados por hibridación.**

Dentro de estos se agrupan las técnicas que emplean sondas para la detección de los marcadores. Las sondas son fragmentos de ADN o ARN que contienen el código complementario para una secuencia específica del genoma. Las técnicas más usuales son: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Número variable de repeticiones en tandem (VNTR) y ADNShips (Oligonucleotide arrays) (Cornide, 2000).

Marcadores basados en la PCR. Los marcadores identificados por amplificación del ADN están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La introducción de esta tecnología permitió nuevas posibilidades para la detección del polimorfismo genético (Mullis, 1994).

Polimorfismo significa “muchas formas”. Así pues, el polimorfismo genético, cromosómico o de secuencia del ADN es el responsable de la gran variabilidad existente entre los individuos de una misma especie (Torrades, 2002)

Para los estudios de polimorfismos genético vegetal a nivel de ácidos nucleicos deben de contar siempre con un protocolo de extracción y purificación de ADN eficiente, lo que viabilizara su empleo en diversos estudios y a la vez la obtención de resultados con un alto grado de confiabilidad (Boiteux *et al.*, 1999).

### **2.12 Ventajas y desventajas de la extracción de ADN**

La obtención de ADN íntegro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular Tang *et al.* (2005) y Wang *et al.* (2005). Es importante mencionar que 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 (Störmer *et al.*, 2007).

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. En los últimos años ha aumentado el uso de los métodos de extracción comerciales debido a que la matriz permite capturar selectivamente al ADN haciendo posible obtener un extracto de alta pureza con moléculas íntegras; al tiempo que se reduce el número de pasos en la extracción y se disminuye la posibilidad de contaminación con ADN o ARN exógeno. Los extractos con estas características aumentan la sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas moleculares, lo que garantiza la obtención de resultados confiables. Aunque se sacrifique el rendimiento en algunas ocasiones, las técnicas actuales de biología molecular no requieren de grandes cantidades de material genético (Velázquez *et al.*, 2020)

### **Cuadro 1 Tipo de tejido, cantidad de muestra y rendimiento esperado de ADN, usando combo de extracción comercial.**

Se puede emplear el método de extracción que se desee, lo importante es realizar cada paso cuidadosamente para obtener ADN íntegro y puro que permita llevar a cabo las técnicas posteriores.

### **2.13 Ventajas y desventajas de los protocolos de extracciones tradicionales y comerciales**

**En el Cuadro 1, se muestra la cantidad de tejido recomendada y el rendimiento esperado cuando la extracción se lleva a cabo utilizando combos de extracción comercial (Velázquez *et al.*, 2014)**

En el **Cuadro 2** Se tiene las cantidades de muestras y el rendimiento esperado utilizando combo de extracción comercial. (Velázquez *et al.*, 2014)

### **Cuadro 2 Tipo de tejido, cantidad de muestra y rendimiento esperado de ADN, usando combo de extracción comercial.**

## **CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Ubicación**

El experimento se realizó en el campo experimental, rancho El Retiro ubicado en San Pedro de la Colonias, Coahuila, Propiedad de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. La extracción del DNA, se realizó en las instalaciones de la UAAAN-

UL, Ubicada en Periférico Raúl López Sánchez S/N, Colonia Valle Verde, en Torreón, Coahuila, México, en el laboratorio del Departamento de Agroecología.

Condición	Métodos tradicionales	Métodos comerciales
Material inicial	Miligramos o gramos	De 50 a 250 mg como máximo
<b>Material</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Rendimiento de ADN (ug)</b>
Uso de células tóxicas	Células de <i>Escherichia coli</i> (E. coli) En la mayoría de los protocolos	Se evita utilizarlas 10-30
Tiempo de proceso	Células HeLa 5 x 10 <sup>6</sup>	20-40
	Células 293F Hasta varios días debido a los numerosos pasos a desarrollar	Menor a 15-30
	Sangre de humano	200 ul 3-10
Integridad	Cola de ratón	1 a 1.2 cm 5-25
(considerando tejido en buen estado de conservación)	Cerebro de ratón Se requiere experiencia para evitar que el ADN se fragmente	25 mg 25 mg Generalmente se obtiene moléculas de ADN de alto peso molecular 10-30 10-30
	Hígado de ratón	25 mg 10-40
Rendimiento	Vaso de ratón	25 mg 10-40
	<i>Spinacia oleracea</i> Varios microgramos, aunque puede incluir moléculas de ADN fragmentadas	100 mg 100 mg Varios nanogramos pero en su mayoría con moléculas de ADN integras 2.0-2.5 1.8-3.1
	<i>Arabidopsis italiana</i>	100 mg
Inhibición enzimática	<i>Medicago sativa</i>	100 mg 2.1-3.0
	<i>Helianthus annuus</i>	100 mg 1.6-4.0
	<i>Fungi</i> Los reactivos utilizados para la extracción fácilmente acarrear con las muestras e interfieren con aplicaciones posteriores	100 mg 100 mg Poco frecuente si se siguen los pasos y cantidades recomendadas por el fabricante 0.3-2.0
	<i>Glycine max</i>	100 mg
	<i>Triticum</i>	100 mg 9.2-14.6
Automatización	<i>Zea mays</i> Poco factible por los múltiples pasos y el uso de solventes tóxicos	100 mg 4.4-6.6
	<i>Solanum lycopersicum</i> Jitomate	100 mg Altamente recomendable 1.0-2.3
Costo	Bajo	Alto

### **3.2 Material biológico**

Se evaluaron genotipos del CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO (CIMMYT), se seleccionó la línea 3 para el estudio, dos surcos por línea de 10 m de largo. Se colectaron 25 hojas de las plantas de la línea 3 y se llevaron al laboratorio para su análisis. Las muestras fueron lavadas con detergente, agua destilada y para su desinfección se utilizó etanol al 70%.

Se continuó con el secado de las hojas en la estufa a 60°C por 24 horas, posteriormente se molieron las muestras y se colocaron en pequeñas bolsas de plástico etiquetadas. Guardadas a temperatura ambiente para continuar con la extracción de DNA.

### **3.3 Reactivos del Buffer de extracción**

- 200 mM de Tris de HCL pH 7.5
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 0.5% Duodecil Sulfato de Sodio (SDS)
- Los tratamientos: Se modificaron sólo en la concentración del NaCl (mM): T1, 200; T2, 250; T3, 300 y T4, 400 mM.

### **3.4 Para la extracción de DNA.**

Se pesaron 100 mg del tejido de las muestras colectadas y se colocaron en tubos eppendorf (25 por tratamiento) se adicionaron 750 µl de buffer de lisis (se utilizaron dos concentraciones de buffer 200 y 400 mM) se dejaron reposar por 4 horas y luego se sometieron a agitación vigorosa en el vortex por 2 minutos. Se tomaron 300 µl de sobrenadante y se colocaron en un nuevo tubo eppendorf, se adicionó 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente por cinco minutos. Se centrifugó las muestras a 13,000 rpm (revoluciones por minuto). Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se disolvió en 100 µl del buffer de Tris-EDTA (TE) pH 7.5, y se conservó en refrigeración (4 °C) para su análisis posterior.

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

Para la determinación de concentración del DNA se calculó la absorbancia de 260 nm. La absorbancia del DNA a 230 y 260 nm se lleva 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 ( $\text{ng de DNA mg}^{-1}$  de tejido), 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.

### **3.6 Diseño experimental**

Para la extracción del DNA se llevó a cabo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos, los tratamientos se modificaron sólo en la concentración del NaCl, T1 200 mM NaCl; T2 250mM NaCl ; T3, 300 mM NaCl y T4, 400 mM NaCl

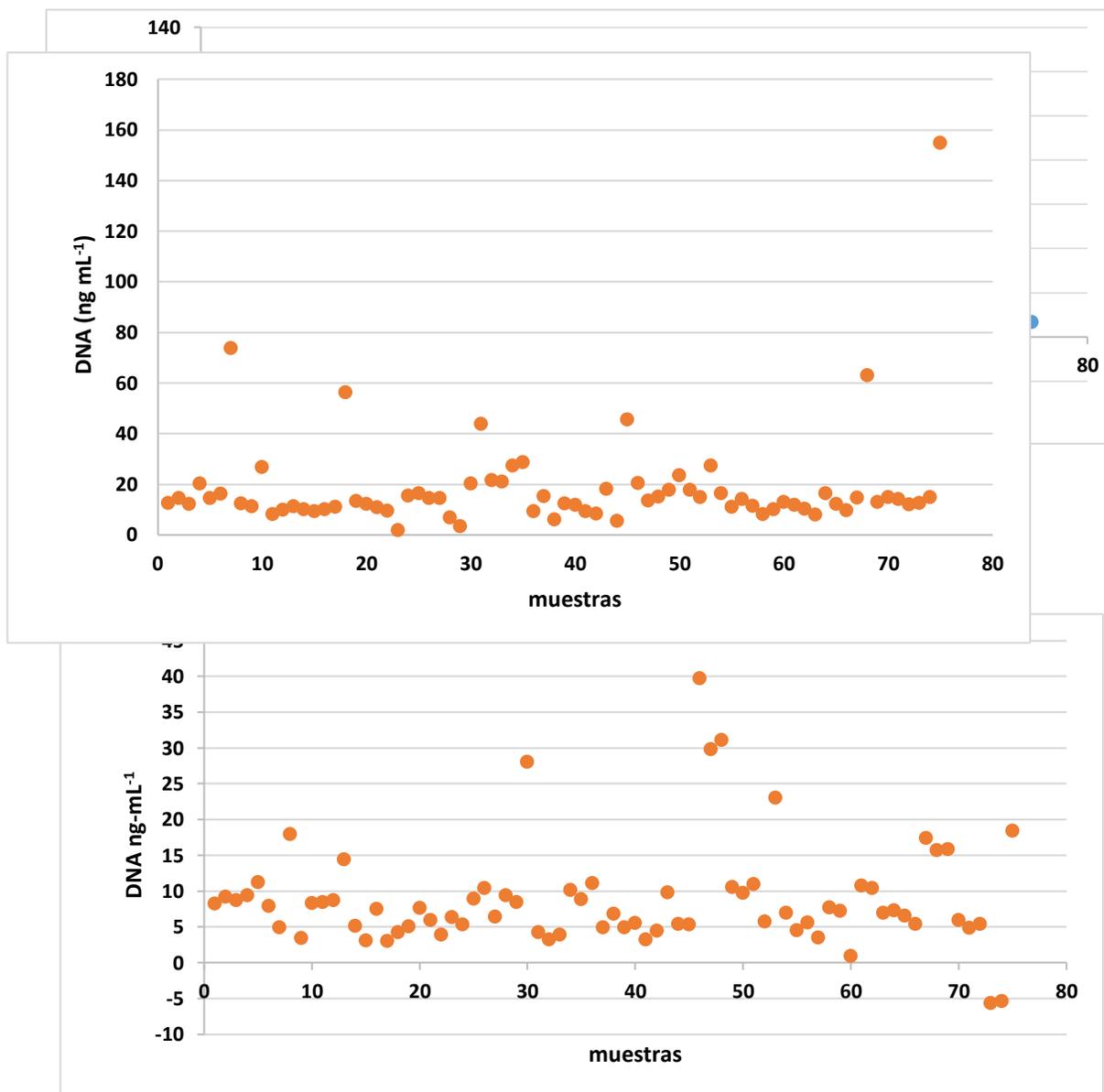
Se realizaron 25 repeticiones por tratamiento y triplicado de cada una de las lecturas para la concentración y pureza del mismo con un  $\mu\text{L}$  de muestra. Se realizó un análisis de varianza y prueba de medias entre tratamientos de un total de 75 datos por tratamiento y de 30 para el testigo Comercial.

## **CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Extracción de ADN.**

#### **4.1.1 Extracción de DNA ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) de hojas de maíz.**

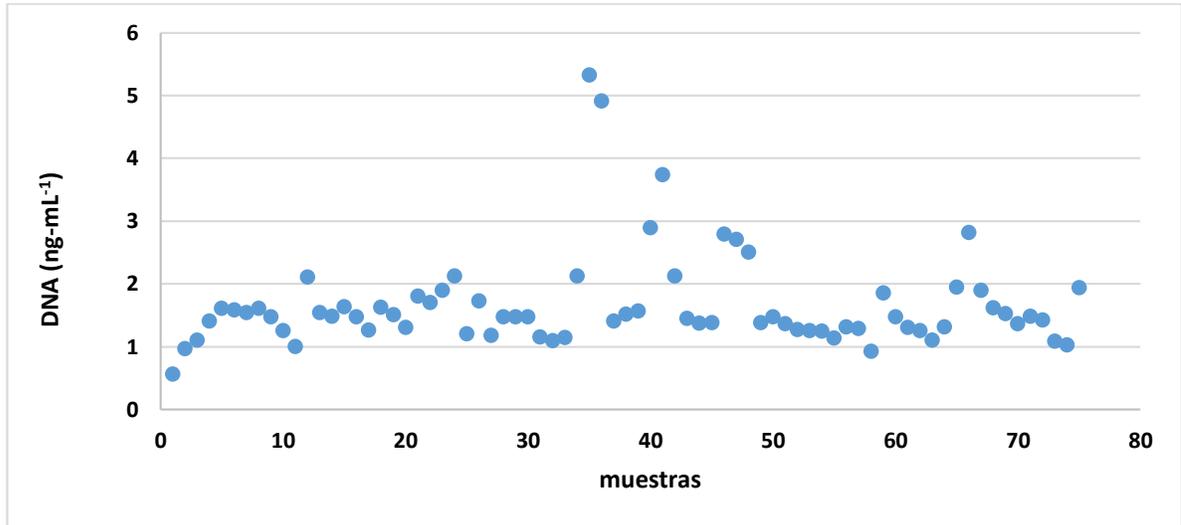
Como se puede observar en las Figuras 4 y 7, los valores de extracción de DNA que se comportaron de manera más homogéneos fueron para los tratamientos 4 y 7 (Figura 4 y 7 respectivamente); sus valores oscilaron de 10-20  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ . El mejor tratamiento de extracción resultó T3 (figura 6), aunque sus valores fueron menos homogéneo, oscilando los valores de 10-200  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ .



**Figura 4.** Distribución de la extracción de DNA (ng mL<sup>-1</sup>) de hojas de maíz de 25 repeticiones y triplicado por repetición para el tratamiento 1.

**Figura 5.** Distribución de la extracción de DNA (ng mL<sup>-1</sup>) de hojas de maíz de 25 repeticiones y triplicado por repetición para el tratamiento 2.

**Figura 6.** Distribución de la extracción de DNA (ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>) de hojas de maíz de 25 repeticiones y triplicado por repetición para el tratamiento 3.



**Figura 7.** Distribución de la extracción de DNA (ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>) de hojas de maíz de 25 repeticiones y triplicado por repetición para el tratamiento 4.

**4.2 ANOVA para Extracción de DNA.**

De acuerdo con el análisis de varianza (Cuadro 3), se confirman las diferencias entre tratamientos, destacando las diferencias estadísticas de medias (CUADRO 4) entre los tratamientos 4 y 1 y sin diferencia entre los tratamientos 2 y 3.

**Cuadro 3. Estadísticos descriptivos de las concentraciones de ADN en tratamientos de maíz.**

**Cuadro 3 Diferencia entre tratamientos en la extracción de DNA de hojas secas de maíz (ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>), de acuerdo a la Prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ )**

Tratamientos	N	Media ng $\mu$ L <sup>-1</sup>	Agrupación
T4	75	29.39	A

**Cuadro 2 Estadísticos descriptivos de las concentraciones de ADN en tratamientos de maíz.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Tratamientos	3	20912	6970.5	23.49	0.000
Triplicados	2	853	426.6	1.44	0.239
Error	294	87259	296.8		
Falta de ajuste	6	1498	249.6	0.84	0.541
Total	299	109024			

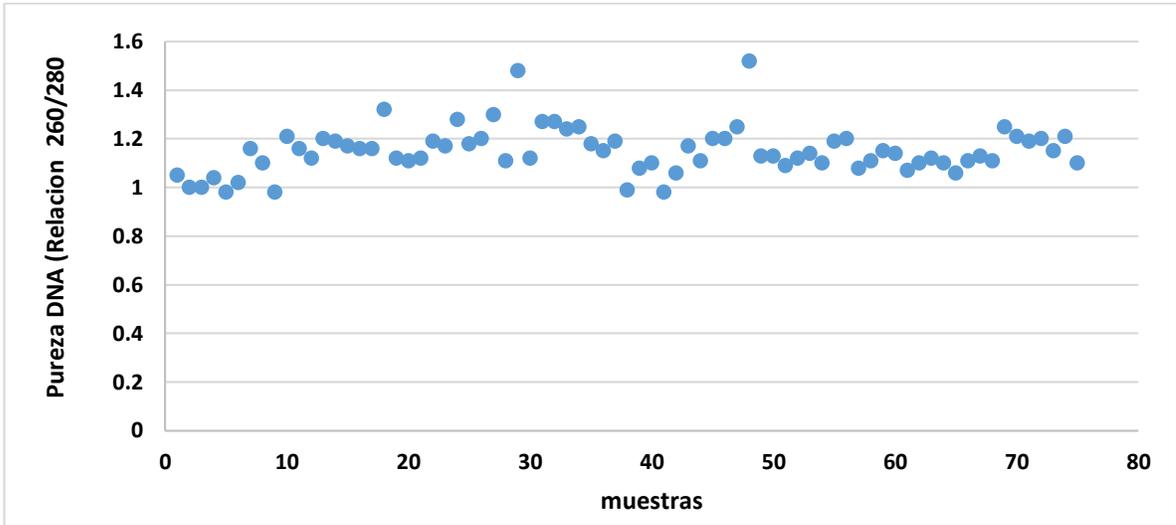
  

T1	75	18.47	B
T3	75	9.52	C
T2	75	8.75	C

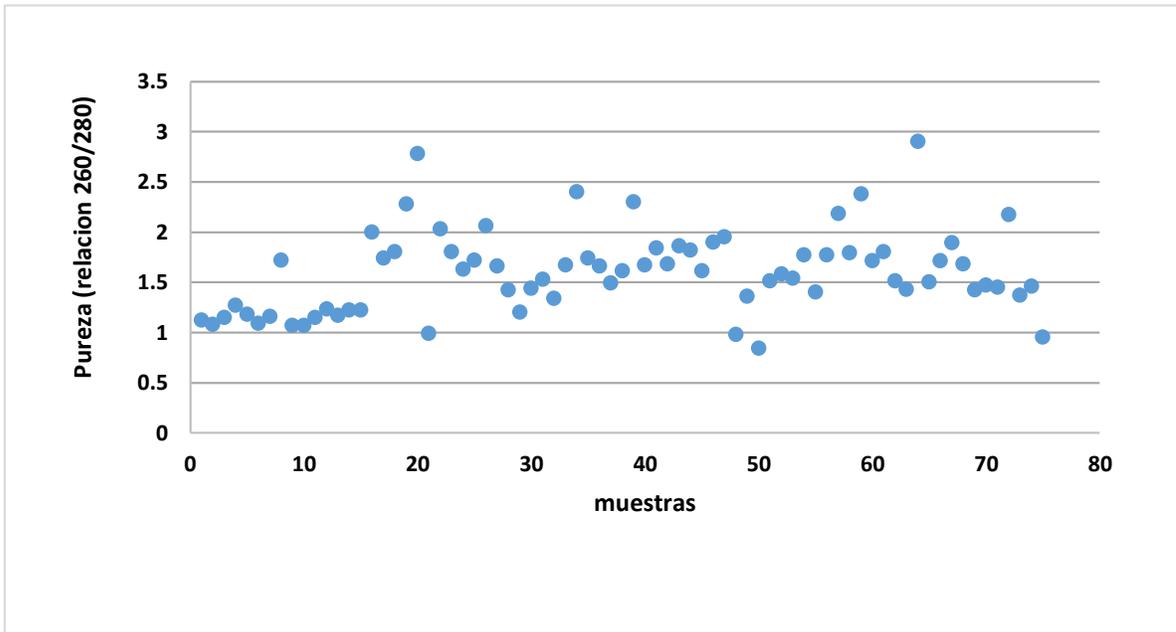
*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

#### **4.1.2. Pureza (relación $\lambda$ 260/280) del DNA extraído de las hojas de maíz, cuantificado con equipo Nanodrop 2000.**

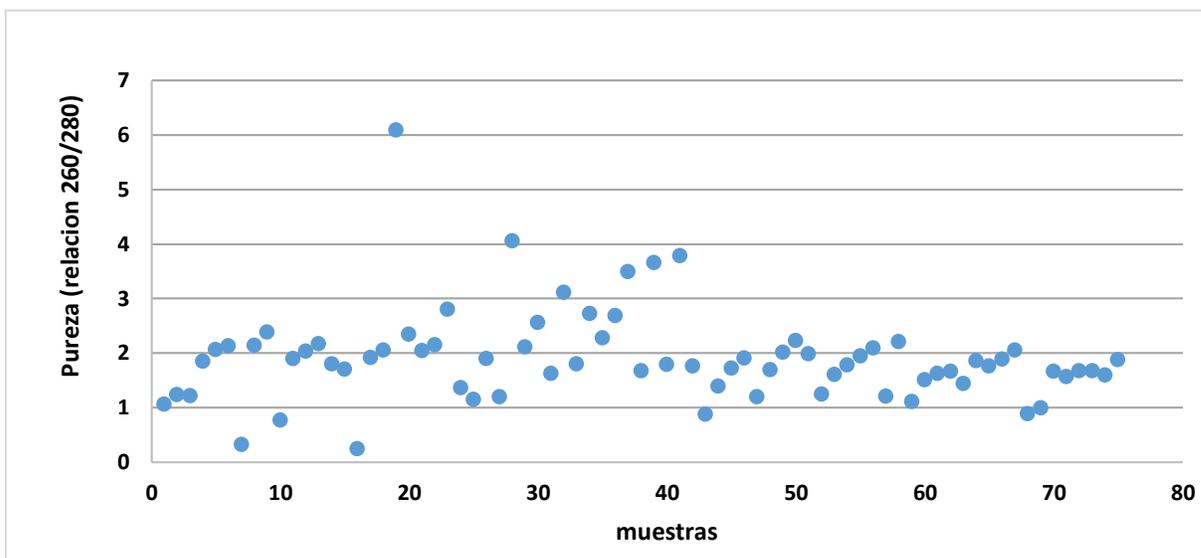
Como se puede observar en las Figuras 8 y 11, los valores de pureza son variables y heterogéneo, lo cual es un indicativo de la necesidad de ser cuidadosos y eficientes en el proceso de extracción, dado que los valores esperados de buena pureza deben oscilar entre 1.8 y 2.0, como se observará, los tratamientos no logran cumplir con este criterio, se recomienda estandarizar la extracción primero, así como el proceso de purificación a fin de obtener un producto de calidad.



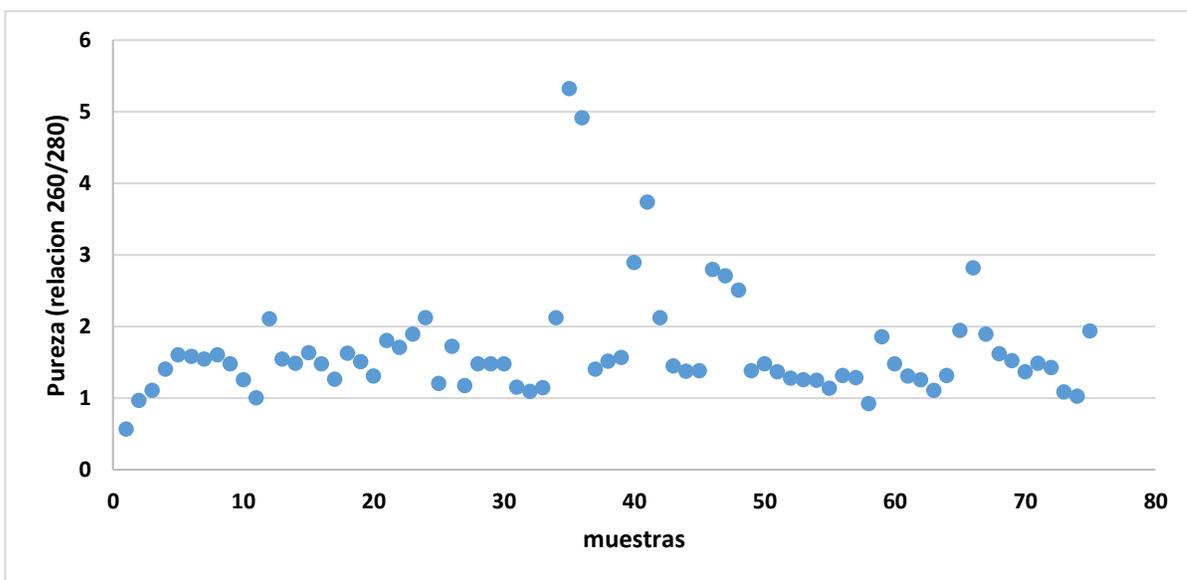
**Figura.8** Distribución de pureza (relación 260/280) de DNA extraído (ng L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 1.



**Figura .9** Distribución de pureza (relación 260/280) de DNA extraído (ng L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 2



**Figura 10.** Distribución de pureza (relación  $\frac{260}{280}$ ) de DNA extraído (ng  $\square$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 3



**Figura 11.** Distribución de pureza (relación  $\frac{260}{280}$ ) de DNA extraído (ng  $\square$ L-1) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 4.

### **Análisis de varianza (ANOVA) de Pureza del DNA extraído de las hojas de maíz.**

El análisis de varianza (ANOVA) de Pureza (relación  $\lambda_{260/280}$ ), el DNA extraído de las hojas de maíz, se cuantificó con equipo Nanodrop 2000.

De acuerdo con el ANOVA se encuentran diferencias altamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.001$ ) (Cuadro 5), y el análisis de medias (Cuadro 6), indicó que los mejores tratamientos para determinar la pureza T3 y T2, con 1.90 y 1.84.

La relación  $A_{260}/A_{280}$  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 DNA parecían adecuadas (valores entre 1.8 y 2.0), (Sambrook y Russell, 2001; Gryson, 2010), esto no es un criterio absoluto.

Otro indicador de calidad para los extractos de ADN puede obtenerse a partir de la relación de  $A_{260}/A_{230}$ , se recomienda que sea de  $\geq 1.7$ , 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).

#### **Cuadro 4 Análisis de varianza de la pureza en la extracción del DNA de hojas de maíz.**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Tratamientos	3	26.182	8.7273	5.81	0.001
Duplicados	2	1.633	0.8164	0.54	0.581
Error	294	441.887	1.5030		
Falta de ajuste	6	10.854	1.8091	1.21	0.302
Total	299	469.702			

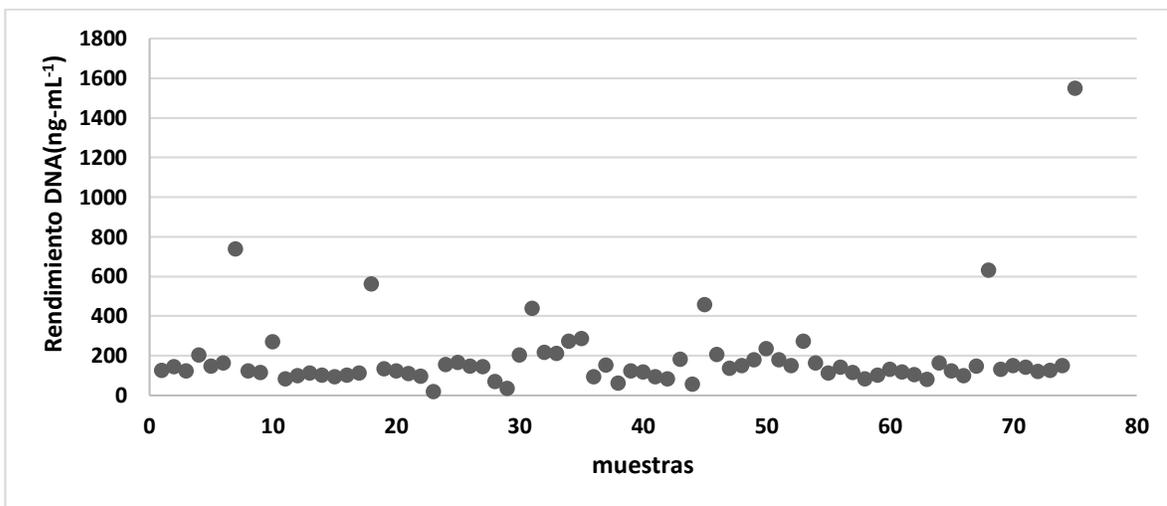
**Cuadro 5 Análisis de media de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) de la pureza en la extracción del DNA de hojas de maíz.**

Trat.	N	Media	Agrupación	
T3	75	1.90320	A	
T2	75	1.84053	A	
T4	75	1.65387	A	B
T1	75	1.15067	B	

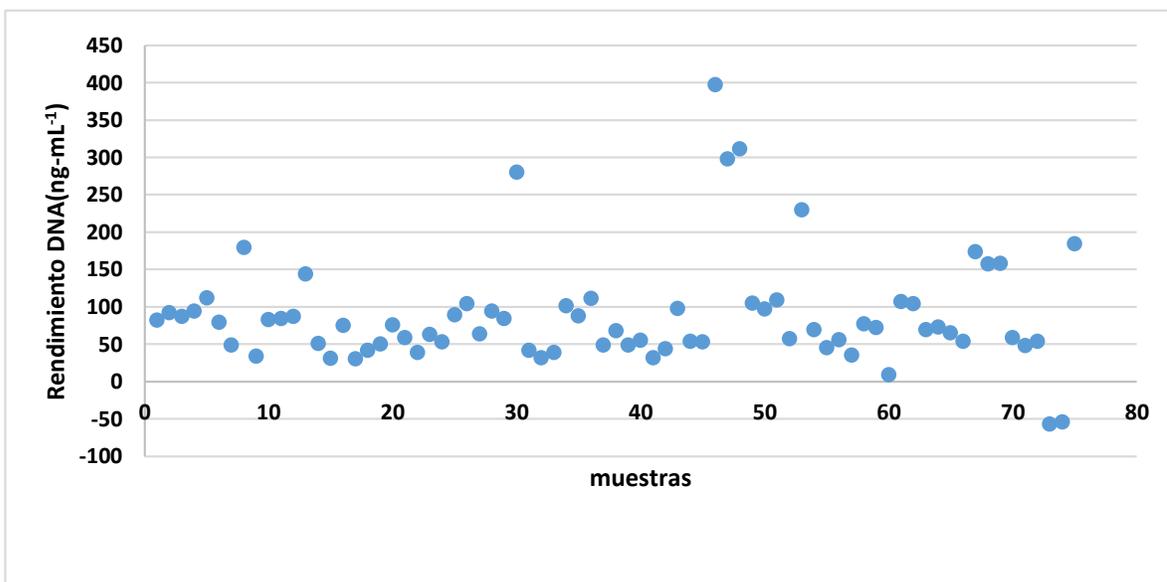
Medias con la misma letra en la columna no difieren estadísticamente ( $\alpha=0.05$ )

#### **4.1.3. Rendimiento de extracción del DNA tejido de hoja de maíz (ng mg<sup>-1</sup>)**

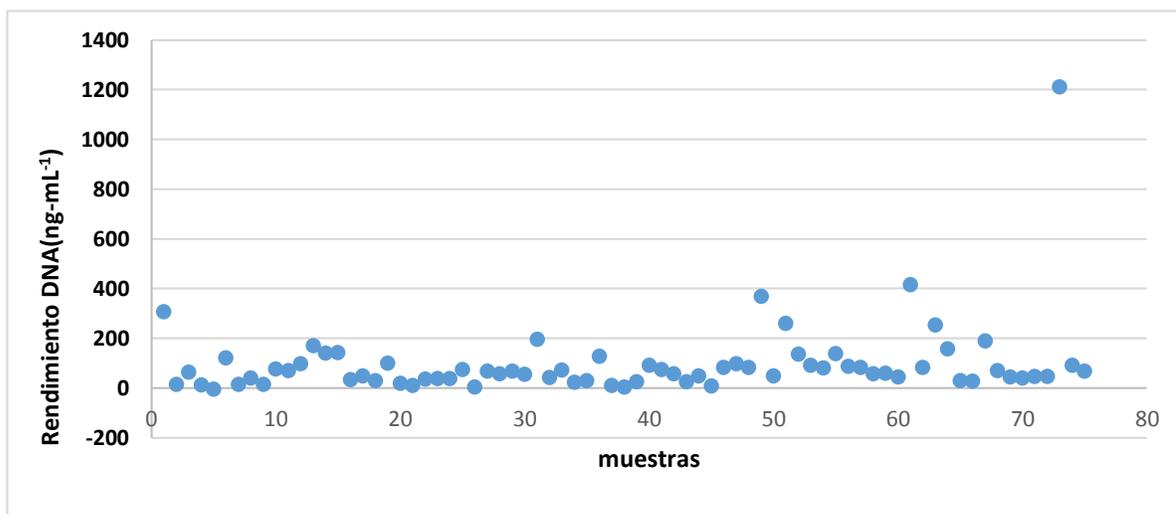
El mejor rendimiento de extracción del DNA tejido de hoja de maíz fue en los tratamientos 1-4. Como se puede observar en las figuras, el rendimiento obtenido de DNA por g de tejido vegetal, aunque fue muy homogéneo los mejores tratamientos fueron los tratamientos 1 y 4 (Figura 12 y 15). Sus valores oscilaron entre 587 y 369 ng mg<sup>-1</sup>.



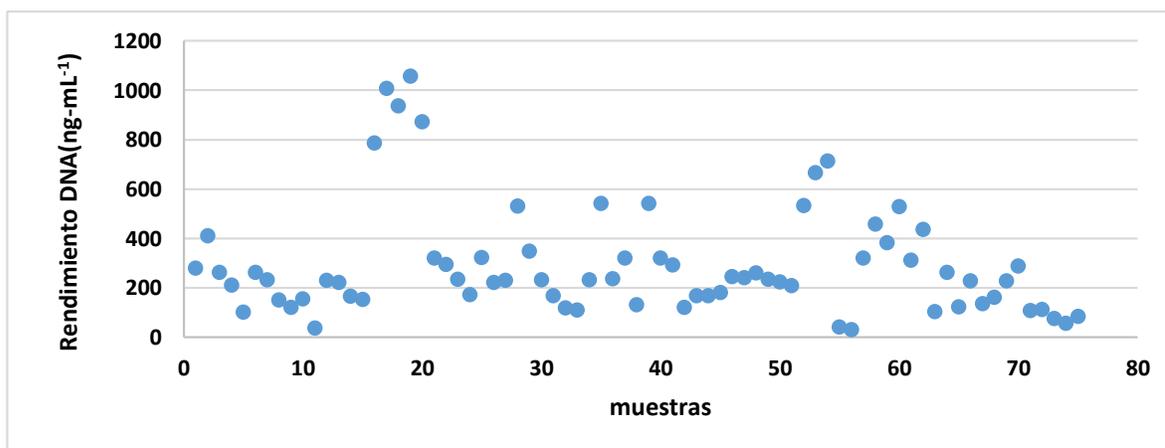
**Figura.12.** Resultados del rendimiento de DNA extraído (ng mL<sup>-1</sup>) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 1.



**Figura.13.** Resultados del rendimiento de DNA extraído (ng mL<sup>-1</sup>) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 2.



**Figura 14.** Resultados del rendimiento de DNA extraído ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 3.



**Figura 15.** Resultados del rendimiento de DNA extraído ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) de hojas de maíz, de 25 repeticiones y triplicado por repetición, para el tratamiento 4.

### Rendimiento obtenido de DNA ( $\text{ng mg}^{-1}$ )

Los máximos rendimientos de ADN se obtuvo en el tratamiento 4 y 1, con 587 y 369  $\text{ng mg}^{-1}$ , considerándose el tratamiento 4 como el mejor y teniendo mínimos en el tratamiento 3 y 2 con 190 y 175  $\text{ng mg}^{-1}$  (**Tabla 5**).

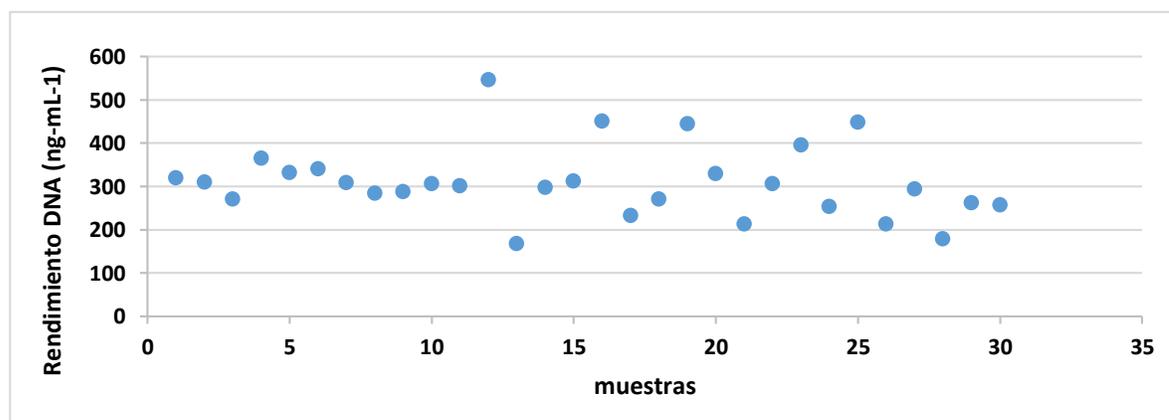
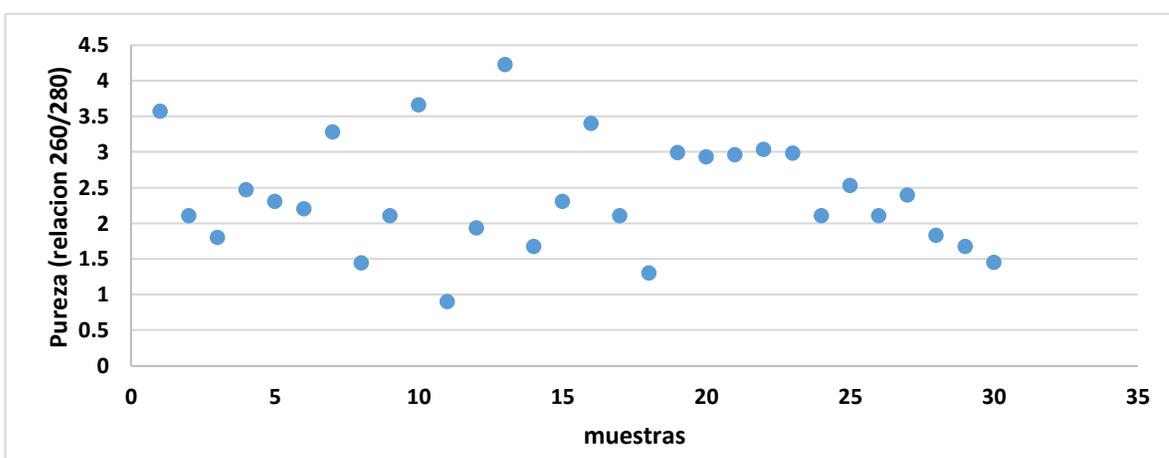
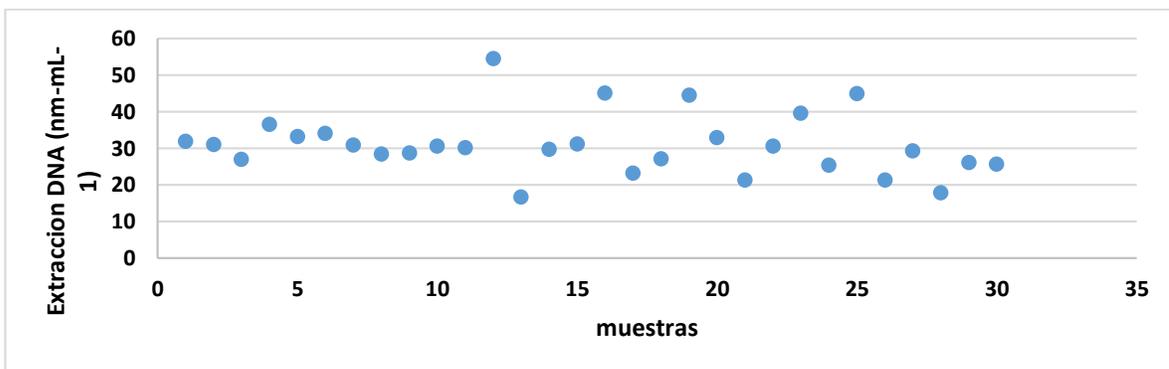
TRATAMIENTOS	$\text{ng mg}^{-1}$ tejido
<i>T4</i>	<i>587<sup>a</sup></i>
<i>T1</i>	<i>369<sup>b</sup></i>
<i>T3</i>	<i>190<sup>c</sup></i>
<i>T2</i>	<i>175<sup>c</sup></i>

Medias con la misma letra en la columna no difieren estadísticamente ( $\alpha=0.05$ )

### 4.2 Análisis de los resultados empleando un reactivo de extracción comercial de DNA de plantas (PlantDNAzol®) de Invitrogen.

Como se puede observar en la figura 16, se obtuvo los siguientes resultados.

En la extracción del DNA se obtuvo de 20- 40 ng, en cuanto a pureza hubo una alta homogeneidad obteniendo datos de 1.5-3 ng y se obtuvo un rendimiento de 200-400  $\text{ng uL}$ .



**Figura 16.** Resultados de la extracción del DNA de plantas de maíz empleando un reactivo comercial para plantas Plant DNAzol® de invitrogen, empleado 10 repeticiones y lecturas por triplicado de cada repetición. Donde A, es para extracción del DNA del tejido, B; pureza y C, rendimiento.

## Discusión

Para nuestros resultados fue necesario seleccionar 25 plantas diferentes de la misma parcela y el análisis de cada resultado se realizó por triplicado a fin de fortalecer la precisión y exactitud de los mismos.

Como lo señala (Riu *et al.*, 2020) todos los que somos responsables de resultados de ensayo, sentimos una especial preocupación y compromiso por conseguir en primer lugar, que los valores que proporcionamos sean exactos y preciso.

De acuerdo con Abdel-Latif y Osman (2017), reportan tres métodos de extracción con una extracción de 11.2-386.9 ng de DNA mg muestra<sup>-1</sup>, donde su mejor método de extracción, resulta similar al nuestro, los costos actuales por muestra, solo del kit es promedio de 110-120 pesos, costos superiores a los encontrados en nuestro estudio. Los resultados son similares a los nuestros en cuanto a la pureza obtenida (1.61-2.0), en nuestro estudio, los valores fueron de 1.0-3.0.

Bermúdez-Guzman *et al.*, (2016), reportaron promedios de 990 pg de DNA mg de tejido<sup>-1</sup> en plantas de caña de azúcar, empleando Nitrógeno líquido, con alto nivel de pureza, rangos de 1.92-2.0. Sin embargo, el Nitrógeno líquido, es un factor que afecta a los costos de extracción (Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016).

Es claro que, si deseamos mayor pureza, se requerirá en este caso, purificar las muestra, lo que implica que habrá una pérdida de DNA por el procesamiento.

Situación que no fue posible en todas las variables, ello puede deberse a dos aspectos, como se ha reportado por resultados previos (Hernández-Sosa, 2019), donde los resultados se afectan por el analista y equipo utilizado.

Los resultados encontrados concuerdan con lo señalado por San Juan-Badillo *et al.* (2014), existe un alta heterogeneidad entre los métodos de extracción evaluados y los rendimientos de DNA obtenidos por gramos de tejido vegetal de maíz.

## CONCLUSIONES

Mediante el proceso de extracción de ADN el protocolo de estudio ha evidenciado ser una alternativa para la extracción y cuantificación, haciéndose posible validar a nivel regional en los laboratorios.

Nos ayudara a medir las expresiones genéticas y nos será de gran ayuda para diseñar experimentos más valiosos para lograr avanzar una parte importante del conocimiento.

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.

La importancia que se debe tener en consideración al material, equipo utilizado y la estricta disciplina y enfoque que se tiene al realizar estudios similares ya que los resultados se ven afectados por el analista directamente como antes ya se ha reportado por resultados previos (Hernández-Sosa, 2019).

Queda demostrado que existe una diferencia altamente significativa en la cuantificación de extracción de ADN y en el análisis de pureza extraído con respecto al equipo de cuantificación siendo con este estudio resultado de ser eficiente y reproducible.

El objetivo se cumplió, sin embargo se requiere repetir y homogenizar la extracción a fin de garantizar que el método pueda ser validado, dado que los equipos de cuantificación presentaron diferencias significativas.

Se sugiere mejorar los procesos de pureza y definir el número de lavados de muestra con etanol y definir las posibles pérdidas que con ello conlleve por cada lavado.

Cabe mencionar la importancia que debe tenerse con el material y el equipo utilizado tanto la estricta disciplina al realizar estudios preliminares moleculares y durante todo el proceso de extracción y cuantificación, ya que como se pudo ver los resultados se afectan por el analista y equipo utilizado

Se ha demostrado que existe una diferencia altamente significativa en la cuantificación de la extracción de DNA y el análisis de pureza extraído con respecto a los tratamientos. De acuerdo con el análisis de medias, el tratamiento T4 generó la mejor extracción (29.39 ng  $\mu$ L), rendimiento de 587 ng  $\text{mg}^{-1}$  de tejido de hoja de maíz y la pureza con contaminación (1.65), estadísticamente no diferente de los tratamientos T2 (1.9) y T3 (1.84), pero sí de T1 (1.15).

En cuanto a la obtención de pureza, los resultados fueron muy homogéneos tanto en tratamiento como en el testigo, por lo cual se recomienda estandarizar la extracción, así como el proceso de purificación a fin de obtener productos de calidad.

Para mejorar el proceso de extracción se sugiere seguir estrictamente los pasos del protocolo, y la manipulación correcta de los equipos.

## REFERENCIAS

- Abdel-Latif**, A., Osman, G., 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods* 13, 1
- 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
- Anderson**, E. y H. C. Cutler. 1942. Races of *Zea mays* L. Their recognition and classification. *Annals of Missouri Botanical Garden* 29:69-88.
- Benz**, B. F. 2001. Archaeological evidence of teosinte domestication from Guilá Naquitz, Oaxaca. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(4):2104-2106.
- Bermúdez-Guzmán**, M. de J., Guzmán-González, S., Orozco-Santos, M., Velázquez-Monreal, J. J., Buenrostro-Nava, M. T., Michel-López, C. Y., Bermúdez-Guzmán, M. de J., Guzmán-González, S., Orozco-Santos, M., Velázquez-Monreal, J. J., Buenrostro-Nava, M. T., & Michel-López, C. Y. 2016. Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(4), 897-910.
- Buckler** E. S.; Goodman; M. M.; Holtsford; T. P.; Doebley, J. F. and Sánchez, G. J. 2006. Phylogeography of the wild subspecies of *Zea mays*. *Maydica* 51: 123-134
- Buckler**, E. S. and Stevens, N. M. 2005. Maize origins, domestication, and selection. In: Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution and conservation of crops. Motley, T. J. Zerega, H. and Cross, N. (Eds.). Darwin's harvest: new

approaches to the origins, evolution and conservation of crops. Columbia University Press. New York.

**Boiteux**, L.S.; Fonseca, M.E. & Simon, P.W. 1999. Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot. Amer. Soc. Hort. pp 32-34

**CONABIO**, 2019a. Centros de origen. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Fecha de consulta. 02 de junio del 2019. Disponible en:<http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/centrosOrig.html>.

**CONABIO**, 2019b. Variabilidad genética. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Fecha de consulta. 08 de junio 2019. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/genes/vargenetica>

**Coll**, H. A. y Godínez, L. 2003. La agricultura en México: un atlas en blanco y negro. México, D. F. Instituto de Geografía UNAM. I. 5.4 (No. S451 C64). Disponible [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-46112004000100013](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-46112004000100013).

**Cornide M.T.**, 2000. DIVERSIDAD GENETICA Y MARCADORES MOLECULARES. CNIC, La Habana.

**Checa Rojas**, A. (2016, 22 de Junio) Extracción de ADN. Conogasi, Conocimiento para la vida. Fecha de consulta: Octubre 21, 2021. Alberto Checa Rojas. (2016). Extracción de ADN. 2021, Octubre 21, Conogasi.org Sitio web: <http://conogasi.org/articulos/extraccion-de-adn/>

**Doebley**, J. 2004. The genetics of maize evolution. Ann. Rev. Genetics. 38:37-59.

- Doebley**, J. 1990. Molecular evidence and the evolution of maize. *Economic Botany* 44: 6-27.
- Dowswell**, C.D., Paliwal, R.L. & Cantrell, R.P. 1996. *Maize in the third world*. Boulder, CO, USA, Westview Press.
- FAO**, 1995. Conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos. Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos en América Central y México. Informe síntesis regional. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. San José, Costa Rica.
- FAO**. 2006. El maíz en la nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s00.htm>. [ [Links](#) ]
- Figueroa** C. J. D. y Aguilar, R. 1997. El origen del maíz. *Avance y Perspectiva* 16:91-98.
- Galinat**, W.C. 1988. The origin of corn. In G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3rd ed., p. 1-31. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.
- Galinat** W.C. 1995. El origen del maíz: el grano de la humanidad - The origin of maize: grain of humanity. *Economic Botany* 49: 3-12. Goodman M.M. (1988). The history and evolution of maize.
- Goodman** M.M. and R.Mck. Bird. 1977. The races of maize IV: tentative groupings of 219 Latin American races. *Econ. Bot.* 31: 204-221

- Goodman**, M.M. and W.L. Brown. 1988. Races of corn. In: Sprague, G.F and Dudley, J.W. (Eds.) Corn and corn improvement. Agro.
- Golik S.**, Larran, S. Gerard, G. Constanza Fleitas, M. 2018. Cereales de verano, Buenos aires Argentina. EDITORIAL Universidad de la plata Capítulo 1 Maíz: Importancia, origen, sistemática, morfología y composición química, LIBROS DE CATEDRA. FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES UNIVERSIDAD NACIONAL DE PLATA. Pág. 11
- Harlan**, J. R. y J. M. J. de Wet. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20(4):509- 517
- Hernández X.**, E. y G. Alanís F. 1970. Estudio morfológico de cinco razas de maíz de la Sierra Madre Occidental de México: Implicaciones filogenéticos y fitogeográficas. *Agrociencia* 5 (1): 3–30.
- Hernández Sosa** Alberto. 2019. Estandarización de la extracción del ácido desoxirribonucleico de maíz (*Zea mays* L.). (Tesis de licenciatura.) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila México
- Illis** H.H. 1983. From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. *Science* 222: 886-894
- Khan Academy (s/f). Acidos nucleicos. Fecha de consulta 24 de septiembre 2020. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/dna-and-rna-structure/a/nucleic-acids>
- 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.

- Mangelsdorf P.C.** 1986. The origin of corn. *American Scientist* 255: 72-78. Maizar. (2015). Estadísticas maíz/sorgo. Disponible en:<http://www.maizar.org.ar/estadisticas.php>. Último acceso: Junio 2015
- Matsuoka Y**, Vigouroux, Y., M M Goodman, J Sánchez, E Buckler, J Doebley. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:6080-6084.
- Mullis**, K & Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 335-340 pp.
- Mullis K.B.**, .1994. THE POLYMERASE CHAIN REACTION, Birkhauser, Boston.
- Mogg** RJ and Bond JM. 2003. A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. *Mol Ecol Notes* 3, 666-668.
- McDonald M B.**1998. Seed deterioration: physiology, repair, and techno. 8:265-275
- Nieto JE**, Ramos L y Motte E. 2005. Extracción y purificación de ADN de *Tectona grandis* L. para su empleo en la técnica RAPD. *Foresta Veracruzana* 7(2), 1-6.
- Ortega** Paczka, R. 2003. La diversidad del maíz en México. In Esteva, G., y C. Marielle (Coordinadores). Sin Maíz no hay País. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas, México, D. F. pp. 123-154.
- Paliwal R.L.** 2001. Tipos de maíz. *El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción*

- Perales R.**, H. y D. Golicher. 2011. Modelos de distribución para las razas de maíz en México y propuesta de centros de diversidad. Informe técnico preparado para la CONABIO. ECOSUR. Chiapas. México. 108 p. Manuscrito.
- Piperno**, D. R. and Flannery, K. V. 2001. The earliest archeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:2101–2103.
- Pohl**, M. E. D.; Piperno, D. R.; Pope K. O. and Jones, J. G. 2007. Microfossil evidence for pre-Columbian maize dispersals in the neotropics from San Andrés, Tabasco, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104(16):6870-6875.
- Preciado O R E**, S Montes. 2011. Reseña del libro “Amplitud, Mejoramiento, Usos y Riesgos de la Diversidad Genética de Maíz en México”. *Rev. Fitotec. Mex.* 34, Núm. 4. 2 p
- Pressoir G.**, y J. Berthaud. 2004. Population structure and strong divergent selection shape phenotypic diversification in maize landraces. *Heredity* 92: 95-101.
- Randolph L S** (1952) New evidence of the origin of maize. *Amer. Nature* 86:193-202.
- Rico**, Y. 2019. Herramientas genéticas para proteger a la naturaleza. *Rev. Ecofronteras.* Vol. 23, Num 66 pp. 30-33, ISSN 2007-4549 (revista impresa), E-ISSN 2448-8577 (revista digital).
- Riu J**, Ricardo Boque, Alicia maroto ,F. Xavier Rius. 2020. Exactitud y trazabilidad. Departamento de química analítica y química orgánica. Instituto de Estudios Avanzados. Universitat Rovira i Virgili. Pl. Imperial Tàrraco, 1. 43005-Tarragona. España

**RIVEIRO**, S. 2004. El día en que muera el sol: contaminación y resistencia en México.  
GRAIN

**Rochas**, P. J. 2002. “Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite”. Revista. Palmas. No . vol. no 23 no 23. pág. 9 – 17.

**Rogers**, S.O.; Bendich, A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual. A6: 1- 10. Kluwer Academic Publishers, Belgium

**Sambrook**, J.; Russell, D.W.; Sambrook, J. 2001. Molecular Cloning. 3Rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

**Sánchez**, J. J. 1989. Relationships among the Meican races of maize. Unpublished Ph. D. dissertation. North Carolina State University, Raleigh. 187 p.

**Sánchez G.**, J., M.M. Goodman, and C.W. Stuber. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. Econ. Bot. 54(1):43-59.

**SanJuan-Badillo**, Andrea; Gálvez, Amanda; Plasencia, Javier; Quirasco, Maricarmen .2014.ASSESSMENT OF DNA EXTRACTION METHODS FROM VARIOUS MAIZE (*Zea mays* L.) TISSUES FOR ENVIRONMENTAL GMO MONITORING IN MEXICO. PART I: DETECTION BY END-POINT PCR *Agrociencia*, vol. 48, núm. 1, enero-febrero, pp. 17-33 Colegio de Postgraduados Texcoco, México

**Scott KD** and Playford J. 1996. DNA extraction technique for PCR in rain forest plant species. *Biotechniques* 20, 974-979.

- Schlötterer, C.** 2004. The evolution of molecular markers –just a matter of fashion? Nature Reviews 5: 63-69.
- Störmer M., K. Kleesiek y J. Dreier.** 2007. High-Volume Extraction of Nucleic Acids by Magnetic Bead Technology for Ultrasensitive Detection of Bacteria in Blood Components. Clinical Chemistry 53: 104–110.
- Tang Y. W., S.E. Sefers, H. Li, D. J. Kohn y G.W. Procop.** 2005. Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. Journal of Clinical Microbiology 43: 4830-4833.
- Tenailon, M. I.; U'ren, O. J.; Tenailon, J. and Gaut, B. S.** 2004. Selection versus demography: a multilocus investigation of the domestication process in maize. Mol. Biol. Evol. 21(7):1214-1225.
- Torrades, S.** 2002. Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. Rev. OFFARM. VOL 21 NÚM 5. páginas 122-125.
- Turrent, A. and Serratos, J. A.** 2004. Context and background on maize and its wild relatives in Mexico. In: maize and biodiversity: the effects of transgenic maize in Mexico. Key findings and recommendations. commission for environmental cooperation. Secretarial Report. Getineauu, Quebec, Canada. 1-55 pp.
- Valle de biología.** Estructura del ADN. Fecha de consulta: 24 de septiembre 2020. Disponible en: <http://valledebiologia.blogspot.com/2013/02/estructura-del-adn.html>
- Velázquez Alejos P.L, Martínez Aragón M C; Romero Cornejo A.** 2014. Extracción y purificación de ADN. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>

- Veritas Intercontinental.** 2020. The genome Company. Alteraciones genéticas: causas y tipos. Fecha de consulta 04 de agosto 2020. Disponible en: <https://www.veritasint.com/blog/alteraciones-geneticas-causas-tipos/>
- Vigouroux Y,** J C Glaubitz, Y Matsuoka, M M Goodman, J Sánchez, J Doebley .2008. Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *Amer. J. Bot.* 95:1240-1253. [ [Links](#) ]  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802013000500009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000500009)
- Wang F.,** Y. Zhu, Y. Huang, S. McAvoy, W. B. Johnson, T. H. Cheung, T.K.H. Chung, K.W. K. Lo, S.F. Yim, M.M.Y. Yu, H. Y. S. Ngan, Y.F. Wong y D.I. Smith. 2005. Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 24: 3875–3885.
- Watson JD,** Crick FH. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953; 421: 397-378
- Wellhausen,** E. J. 1990. Algunas reflexiones sobre el Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA). *Agronomía Mesoamericana* 1:97-106
- Wellhausen,** E., L. M. Roberts, E. Hernández X., en colaboración con P. C. Mangelsdorf. 1951. Razas de maíz en México, su origen, características y distribución. Folleto Técnico no.5, Oficina de Estudios Especiales, Secretaría de Agricultura y Ganadería, México, D. F.
- Wilkes,** H.G. 1985. Teosinte: the closest relative of maize revisited. *Maydica*, 30: 209-223.

**Wang F.**, Y. Zhu, Y. Huang, S. McAvoy, W. B. Johnson, T. H. Cheung, T.K.H. Chung, K.W. K. Lo, S.F. Yim, M.M.Y. Yu, H. Y. S. Ngan, Y.F. Wong y D.I. Smith. 2005. Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 24: 3875–3885.

**Zhang, L.**, Wang B., Pan, L. y Peng, j., 2013. Recycling isolation of plant DNA, a novel method. *J Genet Genomics* 40:45-54.