

Artículo metodológico

Análisis comparativo de métodos de extracción de ADN en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*)

Comparative analysis for DNA extraction methods from cotton seeds (*Gossypium hirsutum*)

Florencia A. Paz¹; Eduardo A. Parellada²; Mónica V. Cornacchione³; Gustavo A. Palma^{1,2};
Maria S. Coria^{1,2*}

¹Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano (S) 1912 (G4200ABT), Santiago del Estero, Argentina.

²Laboratorio de Producción y Reproducción Animal. Instituto de Bionanotecnología del NOA (INBIONATEC), CONICET. Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE). RN9, km 1125 (G4206XCP), Santiago del Estero, Argentina.

³Estación Experimental Agropecuaria Santiago del Estero. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Jujuy 850 (CP 4200), Santiago del Estero, Argentina.

*Correo electrónico: sumicoria@gmail.com

Resumen

La extracción de ADN a partir de semillas presenta el desafío de evitar la coextracción de inhibidores de la reacción de PCR, naturalmente presentes en el tejido vegetal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de dos métodos de extracción de ADN en distintas fracciones de semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*) utilizando un kit comercial como control. Se trabajó con tres tipos de semillas, las cuales fueron procesadas y se obtuvieron dos fracciones, una rica en cáscara y fibra (FRF) y la otra fracción rica en endospermo (FRE). Se realizó la extracción de ADN por triplicado mediante los siguientes métodos: precipitación salina con dodecil sulfato de sodio (SDS), precipitación con acetato de potasio (AK) y con kit comercial (KC, control). Se evaluó la concentración, pureza e integridad del ADN utilizando un espectrofotómetro y electroforesis en gel de agarosa. Los resultados sugieren que los métodos SDS y AK generan extracciones con mayor pureza y concentración que el KC; sin embargo, en todos los métodos se observan contaminantes. No se observó degradación en ninguna de las muestras evaluadas. A su vez, se evaluó la actividad de la enzima *Taq* Polimerasa en la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR. El 100 % de las reacciones amplificaron en las muestras de ADN de la FRF obtenidas mediante SDS, y en ambas fracciones obtenidas por el método KC, sin diferencias en el tipo de semilla. La extracción de ADN con el método SDS sobre FRF de semillas de algodón constituye un método alternativo, más eficiente que el KC utilizado, ya que conduce a la obtención de ADN puro, en elevada concentración y de idéntica eficacia en la amplificación por PCR.

Palabras clave: Algodón; Extracción de ADN; PCR; Precipitación salina; Semillas.

Abstract

Plant tissue DNA extraction, in particular from seeds, requires revisions of techniques, in order to reduce co extraction of PCR inhibitors. The objective of the present work was to evaluate the efficacy of two economic methods of DNA extraction in different fractions of cotton seeds (*Gossypium hirsutum*) using a commercial kit as control. Three types of cotton seeds were ground separately to produce a fiber rich fraction (FRF), and an endosperm rich fraction (FRE). DNA extraction was carried out by triplicate following three methods: saline precipitation with sodium dodecyl sulfate (SDS), precipitation with potassium acetate (AK) and with a commercial kit (KC, control). DNA concentration, purity, and integrity were evaluated by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. The results suggest that SDS and AK methods yield higher purity, and higher concentration of DNA extracts than KC method, nevertheless contaminants were observed in all the samples. No degradation was observed in any of the evaluated samples. Activity of the enzyme *Taq* polymerase was evaluated by the polymerase chain reaction. All the PCR reactions amplified in the FRF DNA samples obtained by SDS, and in both fractions obtained by the KC method, without differences in seed type. The extraction of DNA with the SDS method on FRF from cotton seeds constitutes an alternative method, more efficient than the KC used, since it leads to obtaining pure DNA, in high concentration and with identical efficiency in PCR amplifications.

Keywords: Cotton; DNA extraction; PCR; Saline precipitation; Seeds.

Introducción

El éxito de numerosos estudios basados en técnicas de genética biomolecular depende fundamentalmente de un primer paso que consiste en la extracción de ADN. Los diferentes métodos de extracción combinan procesos de lisis celular, eliminación de proteínas, precipitación y purificación del ADN, los cuales dan como resultado variaciones en concentración y calidad del ADN extraído (Zidani *et al.*, 2005). Las técnicas utilizadas comúnmente requieren detergentes y una campana de extracción de gases para resguardar al operador del efecto tóxico de compuestos como el fenol-cloroformo utilizado para la eliminación de proteínas. Otros procedimientos de extracción utilizan columnas de centrifugación (“*spin-column*”), las cuales poseen una membrana de fibra de vidrio u otra matriz inorgánica a la que se une el ADN, un buffer para la lisis celular y un buffer de unión al ADN y posterior elución (Ferdous *et al.*, 2012). Existen algunos kits comerciales que utilizan estas columnas y son eficaces para la extracción de ADN de una amplia variedad de materiales, sin embargo, el costo de los mismos es elevado cuando se requiere realizar una gran cantidad de extracciones (Rios-Sánchez *et al.*, 2016).

Los protocolos, en general, no están estandarizados para la extracción en células vegetales y deben ser ajustados de acuerdo a las características especiales de cada caso. En particular, en la extracción de ADN de semillas es posible encontrar inhibidores potenciales para posteriores análisis, tales como los polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios como alcaloides y flavonoides, que dificultan el tratamiento posterior del ácido nucleico (Aydin *et al.*, 2018). La presencia de polisacáridos resulta particularmente problemática, ya que la misma inhibe la actividad de la *Taq* Polimerasa y de las enzimas de restricción (Sahu *et al.*, 2012). Por todo esto, es imprescindible obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de estos inhibidores. En este contexto, el objetivo del trabajo fue evaluar la eficacia de dos métodos de extracción de ADN alternativos frente al kit comercial en distintas fracciones de semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*).

Muestras Biológicas

Se trabajó con semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*) (Guazuncho, 2000) en diferentes presentaciones: semillas pre deslinte, recubiertas de fibra, semillas deslintadas por flameado y recubiertas de fibra y semillas deslintadas por método químico y recubiertas por una capa de fungicida.

Todas las muestras fueron procesadas utilizando un molinillo (Peabody, PE-MC9100, 220W) durante 15 seg. Las semillas recubiertas por fungicidas fueron previamente lavadas con agua destilada para quitar la capa fungicida. Posteriormente, se separaron dos fracciones: una rica en cáscara y fibra (FRF) y la otra rica en endospermo (FRE). Ambas fracciones se separaron manualmente con ayuda de pinzas y se analizaron por separado. La FRE fue procesada posteriormente en el molinillo durante 20 seg, para obtener un polvo fino, el cual fue utilizado inmediatamente después en la extracción. Las muestras se analizaron por triplicado biológico y técnico.

A continuación, se realizó la extracción de ADN de cada fracción, con tres protocolos diferentes.

Método de precipitación salina con dodecilsulfato de sodio (SDS)

Se realizó de acuerdo al protocolo de Chen *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Brevemente, en un tubo con 100 mg de muestra molida se agregó 1 ml del buffer de lisis I (Tris HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 5mM) y se homogeneizó suavemente. Posteriormente se centrifugó a 4.600 *xg* durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El *pellet* fue resuspendido con 450 μ l del buffer de lisis I. Se añadieron 20 μ l de SDS 10 % y se homogeneizaron 15 seg en vortex para lisar las células. Seguidamente se agregaron 200 μ l de NaCl 6 M y se homogeneizó en vortex durante 15 seg. Se realizó una centrifugación a 14.000 *xg* durante 5 min y se tomaron 500 μ l del sobrenadante, que fueron transferidos a otro tubo de microcentrífuga limpio y estéril de 1,5 ml. Se agregaron 500 μ l de isopropanol, y se homogeneizó suavemente. Posteriormente se centrifugó a 14.000 *xg* durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 700 μ l de etanol 70 %, seguidos de centrifugación a 14.000 *xg* durante 5 min. Finalmente, se resuspendió el ADN en 100 μ l de agua estéril.

Método del acetato de potasio (AK)

Se empleó el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983) con modificaciones. En un tubo con 100 mg de muestra molida se agregaron 1000 μ l de buffer lisis II (Tris HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100mM, SDS 1 %, β -mercaptoetanol 10 mM, pH 8), se sometió a agitación mecánica (vórtex) e incubó por 10 min a 65 °C. Seguidamente se agregaron 200 μ l de buffer SN3 (ácido acético glacial 11 % y acetato de potasio 5M), y se mezcló por inversión. La mezcla se colocó en hielo durante 20 min y luego se centrifugó durante 10 min a 11.600 xg a 4 °C. Luego, 300 μ l del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo y precipitados con el mismo volumen de isopropanol. Seguidamente se centrifugó 15 min a 11.600 xg a 4 °C y se realizaron dos lavados con 500 μ l de Etanol 70 % por medio del vortex o pipeta para disolver el *pellet*. Finalmente, se resuspendió el ADN en 100 μ l de agua estéril.

Método de extracción con kit comercial DNeasy Mini kit, (QIAGEN)

Se procedió a la extracción, siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Brevemente, en un tubo con 100 mg de muestra molida se agregaron 400 μ l buffer AP1 y 4 μ l de la solución RNAsa A (100 mg/ml) y se mezcló vigorosamente. Posteriormente se incubó la mezcla por 10 min a 65 °C, mezclando por inversión 2 o 3 veces durante la incubación. Se agregaron 130 μ l de buffer P3 al lisado, y se incubó por 5 min en hielo. Luego se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 xg y se transfirió el lisado a una columna de QIAshredder Mini Spin (lila), seguido de una centrifugación por 2 minutos a 14.000 xg . Aproximadamente 300 μ l del líquido obtenido en fondo del tubo colector fueron transferidos a un nuevo tubo, y se agregaron 450 μ l de buffer AW1. Posteriormente, el líquido fue transferido a una nueva columna Mini spin DNeasy (blanca) y se centrifugó por 1 minuto a 7.600 xg . Para realizar el lavado, se agregaron 500 μ l de buffer AW2 y se centrifugó por 1 min a 7.600 xg , y posteriormente se secó la membrana de la columna con una nueva centrifugación por 2 min a 14.000 xg . Finalmente, la columna se transfirió a un nuevo tubo y se agregaron 100 μ l de Buffer AE, y la elución se realizó luego de 5 min, en centrifuga a 7.600 xg durante 1 min.

Determinación de concentración y pureza del ADN extraído

La concentración del ADN obtenido se calculó mediante lecturas de absorbancia a $\lambda=260$ nm empleando el espectrofotómetro NanoDropp 2000 c (ThermoFisher). La pureza de la muestra de ADN se estimó teniendo en cuenta la relación de absorbancias a $\lambda=260$ nm, $\lambda=280$ nm y $\lambda=230$ nm (Osorio *et al.*, 2013). Los resultados de concentración de ADN obtenidos por los diferentes protocolos de extracción fueron evaluados mediante análisis de la varianza (ANOVA). Las medias se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD, Fischer) con un nivel de significancia del 5 % utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Determinación de integridad del ADN extraído

La calidad de las extracciones de ADN se corroboró mediante corrida electroforética horizontal en geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X, con el agente intercalante de ADN GelGreen (Biotium). Para tal fin, se sembraron 5 μ l de eluido de cada muestra, junto con el buffer de siembra (TAE 1X, glicerol y azul de bromofenol). La corrida se realizó por 30 min a un voltaje constante de 100 V en la cuba de electroforesis horizontal (Cleaver Scientific). Las bandas de ADN se observaron mediante luz azul en un transiluminador BluePad (Bio-Helix).

Reacción en cadena de la polimerasa

Se realizó la amplificación de la secuencia *acp1* (proteína transportadora de grupos acilo) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando pares de cebadores específicos para cada secuencia. Para la secuencia de 76 pb de *acp1*, los cebadores utilizados fueron: *acp1* F: 5' – ATT GTG ATG GGA CTT GAG GAA GA – 3' y *acp1* R 5' – CTT GAA CAG TTG TGA TGG ATT GTG – 3'. Los mismos se encuentran validados por el Laboratorio de Referencia de la Comunidad para alimentos y piensos genéticamente modificados (CRL-GMFF, 2008). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 10 μ l que contenía 100 ng de ADN molde, 0,5 μ M de cada cebador, 5 μ l de la Supermix iTaq (BioRad) y agua para completar el volumen. El programa utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos

de desnaturalización a 94 °C durante 30 seg, hibridación a 60 °C durante 30 seg y extensión a 72 °C durante 30 seg utilizando el termociclador Veritti (Applied Biosystems). Finalmente se realizó una extensión a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1 %, con el agente intercalante de ADN GelGreen (Biotium). Se estimó el porcentaje de amplificación teniendo en cuenta el número de muestras que dieron positivo en función del total de muestras evaluadas.

Como resultado, el análisis de los geles permite determinar cualitativamente la presencia de ADN y su integridad. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de una corrida electroforética en gel de agarosa al 1 %. En este sentido, los protocolos evaluados generaron ADN íntegro o con mínima degradación. Sin embargo, en las muestras de ADN obtenidas con el método AK, y en menor medida en las obtenidas por SDS, se identificaron productos de menor tamaño, que podrían ser polisacáridos o ARN contaminante.

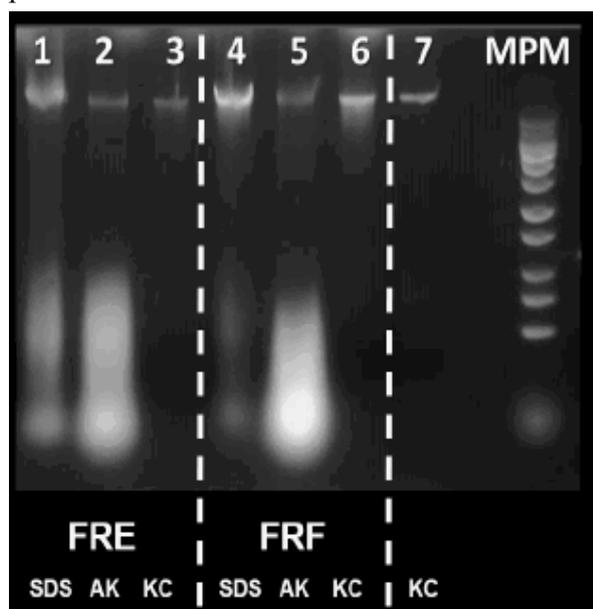


Figura 1. Gel de agarosa al 1 %. Muestras de ADN extraídas de la fracción rica en endosperma (1-3) y en fibra (4-7) por el método de precipitación salina con SDS (calle 1 y 4), el método de acetato de potasio (calle 2 y 5) y utilizando un kit comercial (calle 3, 6 y 7). MPM: Marcador de peso molecular de 1 kb.

Los valores de concentración promedio de ADN (ng/μl) obtenido de las muestras determinados mediante espectrofotómetro se encuentran en la Tabla 1. En general, las extracciones realizadas con la FRE generaron ADN con mayor concentración en los tres métodos evaluados, independientemente del tipo de semilla utilizada

(pre deslante, recubiertas de fibra, semillas deslintadas por flameado y recubiertas de fibra y semillas deslintadas por método químico y recubiertas por una capa de fungicida). La concentración de ADN obtenido mediante los diferentes métodos varió entre los 3,72 a 2083,05 ng/μl de ADN, obteniéndose mejores resultados con el método AK en la FRE, seguido por el método SDS en la FRE.

A su vez, en la Tabla 1 se indica la pureza de las muestras. La relación de absorbancia 260/280 permitió establecer que los métodos SDS y AK dieron lugar a extractos de elevada pureza. Por otro lado, la relación de absorbancias 260/230 obtenida mediante los tres métodos de extracción indica la presencia de contaminantes.

La Figura 2 muestra los resultados de amplificación de la PCR del gen proteína transportadora de grupos acilo en muestras de ADN de semilla de algodón obtenidas por los distintos métodos evaluados en la fracción rica en endospermo y la fracción rica en cáscara y fibra. Las muestras son eluidos obtenidos por los métodos AK, SDS y mediante el Kit comercial. El método SDS en la FRF obtuvo la misma eficiencia en las reacciones de PCR que el kit comercial. Por otro lado, el 66,66 % de las reacciones de PCR dio resultado positivo en las muestras amplificadas en la FRE. Sin embargo, el método AK generó eluidos de ADN con inhibidores de la PCR, y ninguna de las muestras de la FRE permitió la amplificación (0 %), mientras que el 44,44 % de las reacciones de PCR dió resultado positivo en las muestras amplificadas en la FRF (Tabla 1).

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuadas, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula (Zidani *et al.*, 2005, Sahu *et al.*, 2012, Aydin *et al.*, 2018). Una técnica ideal de extracción debe optimizar el rendimiento de ADN, minimizar su degradación y ser eficiente en términos de costo, tiempo, mano de obra y materiales. A su vez, debe ser adecuada para la extracción de múltiples muestras y generar mínimos residuos peligrosos (Zhang y Stewart, 2000).

En este sentido, las técnicas empleadas comúnmente en semillas de algodón realizan un paso previo de homogenización celular con nitrógeno líquido, lo cual puede generar contaminaciones cruzadas y conlleva el difícil

Tabla 1. Resultados de la concentración y pureza del ADN obtenido según la fracción de semilla de algodón y protocolo utilizado, junto a los datos de amplificación por PCR del gen proteína transportadora de grupos acilo.

	Precipitación Salina con SDS		Acetato de Potasio		Kit Comercial	
	FRF	FRE	FRF	FRE	FRF	FRE
Concentración (ng/μl)	53,15 ± 8,66 a	490,20 ± 36,27 b	185,48 ± 41,75 a	2083,05 ± 305,55 c	3,72 ± 0,56 a	18,80 ± 2,29 a
Pureza						
260/280	1,91	1,95	1,95	1,97	1,47	1,49
260/230	1,28	1,55	1,35	1,54	0,62	0,60
Amplificación (%)	100	66,66	44,44	0	100	100

FRF: Fracción rica en cáscara y/o fibra; FRE: Fracción rica en endospermo. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ($p < 0,05$). Amplificación (%): El porcentaje de amplificación se estima como: muestras positivas en función del total de muestras evaluadas.

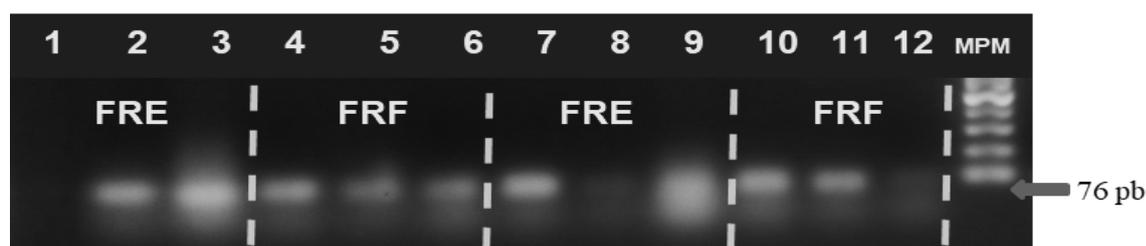


Figura 2. Gel de agarosa al 1%. Resultado de amplificación PCR del gen proteína transportadora de grupos acilo (76 pb) en 12 muestras de ADN de semilla de algodón obtenidas por los distintos métodos, en las fracciones rica en endospermo (FRE) y la fracción rica en cáscara y fibra (FRF). Las muestras son eluidos obtenidos por los métodos Acetato de Potasio (calles 1, 4, 8 y 12), precipitación salina con SDS (calles 2, 5, 9 y 10) y Kit Comercial (calles 3, 6, 7 y 11).

manejo de este elemento (Zhang y Stewart, 2000). Un método alternativo es la liofilización de las muestras, sin embargo, estos equipos no están disponibles en muchos laboratorios (Aydin *et al.*, 2018). En el presente trabajo, se realizó la homogenización con un molinillo y se obtuvieron dos fracciones. La separación de las fracciones permitió disociar la cáscara y fibra del endospermo, el cual es rico en metabolitos secundarios inhibidores de la PCR. Si bien la técnica empleada insume tiempo, la separación puede realizarse en unos minutos, con equipamiento poco sofisticado, que permite eliminar gran parte de las sustancias inhibitoras presentes en las semillas.

En cuanto a los reactivos utilizados para las etapas de lisis celular y separación de proteínas y lípidos, algunos autores sugieren el uso de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y fenol-cloroformo (Zhang y Stewart, 2000; Zidani *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; Ferdous *et al.*, 2012; Gul Ince y Karaka, 2018) o ultra-centrifugaciones con cloruro de cesio, seguido de extracciones con fenol-cloroformo (Ali *et al.*, 2019), lo que conlleva al uso de equipamientos como campanas de extracción de gases para resguardar al operador. Se debe mencionar que, durante la homogenización de los tejidos, los compuestos fenólicos pueden oxidarse y unirse irreversiblemente a proteínas y ácidos

nucleicos, produciendo un material gelatinoso, el cual es difícil de disgregar, generando extracciones de ADN de mala calidad (Zheng *et al.*, 2015). Los métodos utilizados en el presente trabajo emplean diferentes reactivos para evitar ese inconveniente. A diferencia del método acetato de potasio, el kit comercial contiene en el buffer usado para la lisis celular los reactivos polivinil pirrolidona (PVP), ditiotritol (DTT) y RNAsa que permiten la eliminación de polisacáridos y polifenoles. A su vez, estos reactivos producen la desnaturalización de proteínas y degradación de las moléculas de ARN. En su lugar, el método AK contiene β-mercaptoetanol, un agente reductor de enlaces disulfuro que facilita la desnaturalización de las proteínas. Se debe resaltar, que los métodos acetato de potasio y kit comercial utilizan incubaciones a 65 °C para la lisis celular y hielo para la separación de lípidos y proteínas (Herráez, 2012). En contraposición, el método de precipitación salina con SDS utilizado en el presente trabajo, genera la lisis celular con un buffer que contiene Tris, EDTA y cloruro de magnesio, reactivos utilizados habitualmente en los laboratorios. A su vez se emplea el detergente SDS para la desnaturalización de proteínas y posterior insolubilización mediante precipitación salina con cloruro de sodio, el cual en elevadas concentraciones permite la remoción

de polifenoles (Ali *et al.*, 2019). Los procesos de precipitación, lavado y elución del ADN son similares entre las metodologías empleadas, con excepción del kit comercial que utiliza la columna de purificación.

Por otro lado, se debe resaltar que existen tres factores que determinan el éxito de la PCR: la pureza del ADN extraído, la cantidad y la calidad (la cual se relaciona con el “daño” que puede haber sufrido el ADN durante la extracción). Con respecto a la pureza de las muestras, como se mencionó previamente, la misma se estima teniendo en cuenta la relación de absorbancias a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm. Una proporción entre 1,8-2,0 es aceptada como ADN puro mientras que proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción de absorbancias 260/230; los valores aceptados se encuentran en el rango de 2,0 a 2,2 (Sambrook y Green, 2001). Relaciones menores indican la presencia de contaminantes como carbohidratos, etanol o fenol. En este sentido, los métodos SDS y AK dieron lugar a extracciones de elevada pureza (ADN/proteínas). Sin embargo, todas las muestras presentaron contaminantes según la relación 230/260 y 260/280, que deben ser identificados posteriormente por otras metodologías. Se debe resaltar que el ADN extraído con el kit comercial presentó impurezas (asociadas con los compuestos fenólicos usados como reactivos) que dieron lugar a valores de relación 260/230 menores a 1.

En el presente trabajo, el método SDS generó extracciones de ADN con concentraciones inferiores a las del AK, pero mayores a las del kit comercial (Tabla 1). Asimismo, la FRF mediante el método SDS permitió generar ADN íntegro y con elevada pureza, el cual puede usarse con la misma eficiencia que el kit comercial en la amplificación de secuencias por PCR (Tabla 1, Figura 2).

Para concluir, se evaluaron dos protocolos de extracción de ADN en semillas de algodón, con el kit comercial como método de control. El kit comercial genera extracciones de ADN que permite la amplificación de las muestras mediante PCR. La molienda y preparación previa de las muestras realizada en este trabajo, genera dos fracciones, una de las cuales posibilita la extracción de ADN mediante el método de precipitación salina con SDS con igual eficiencia que el kit comercial. Los resultados obtenidos sugieren que esta metodología podría ser de gran utilidad

para estudios posteriores debido a su bajo costo y requerimiento de reactivos y equipamiento.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) que permitió la estancia de investigación de la Ing. Paz. El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas [PUE 2018 0035], la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación [PICT 2020 00062] el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y la Universidad Nacional de Santiago del Estero [UNSE 23/A262].

Referencias bibliográficas

- Ali Q., Salisua I.B., Razac A., Shahida A.A., Rao A.Q., Husnaina T. (2019). A modified protocol for rapid DNA isolation from cotton (*Gossypium* spp.). *MethodsX* 6: 259-264.
- Aydin A., Ince A.G., Uygur Gocer E., Karaca M. (2018). Single cotton seed DNA extraction without the use of enzymes and liquid nitrogen, *Fresenius Environmental Bulletin* 27: 6722-6726.
- Chen H., Rangasamy M., Tan S.Y., Wang H., Siegfried B.D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE* 5: e11963.
- Community Reference Laboratory for GM Food and Feed (CRL-GMFF).(2008). Event-specific Method for the Quantification of cotton Line MON 15985 using Real-Time PCR. Protocol 19 June 2008. Joint Research Centre. European Commission. 1-11.
- Dellaporta S., Wood J., Hicks J. (1983). A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-20.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión (2016). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. En: <http://www.infostat.com.ar>
- Ferdous J., Hanafi M.M., Rafii M.Y., Muhammad K. (2012). A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. *African Journal of Biotechnology*, 11 (27): 6956-6964.
- Gul Ince A., Karaca M. (2018). A Seed Genomic DNA Extraction Protocol Suitable for Important Dicotyledonous Crops. Conference Paper. ICAGAS. Alania, Turquía. 506-511.
- Herráez Á. (2012). Preparación de muestras, extracción y análisis de ácidos nucleicos. En: *Biología molecular e ingeniería genética*. 2da Edición. Elsevier. España. Pp 119-142.

- Osorio J., Pachajoa H., Hurtado P. (2013). Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. *Revista estomatol. salud*; 21(1):35-38.
- Rios-Sánchez E., Calleros E., González-Zamora A., Rubio J., Martínez O.C., Martínez A. Hernández S. Pérez-Morales R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria* 26 (4): 56-65.
- Sahu S.K., Thangaraj M., Kathiresan K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Sambrook J., Green M.R. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Vols 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EEUU.
- Zhang J., Stewart J.M. (2000). Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *Journal of Cotton Science* 4 (3): 193-201.
- Zheng X., Hoegenauer K.A., Maeda A.B., Wang F., Stelly D.M., Nichols R.L., Jones D.C. (2015). Non-destructive high-throughput DNA extraction and genotyping methods for cotton seeds and seedlings. *Biotechniques* 58 (5): 234-243.