Rev. Fitotec. Mex. Vol. 41 (1): 75 - 79, 2018

COMPARACIÓN DE SEIS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN TEJOCOTE (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé)

COMPARISON OF SIX DNA EXTRACTION METHODS IN MEXICAN HAWTHORN (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé)

Marcela Betancurt-Olvera[1], Ma. Dolores Perez-Lainez[2]*, Raúl Nieto-Angel[1], Alejandro F. Barrientos-Priego[1], María Del Rosario García-Mateos[1] y Tarsicio Corona-Torres[2]

[1]Departamento de Fitotecnia, Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Texcoco, Edo. de México. [2]Programa de Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

**Autor para correspondencia* (lainezd@gmail.com)

RESUMEN

El uso de técnicas de marcadores moleculares se inicia con un buen extracto de ADN; esto es, un ADN con buen rendimiento y pureza. Con la finalidad de obtener ADN puro e íntegro, en el presente estudio se evaluaron seis métodos de extracción de ADN: Dumolin, Doyle, Tsumura, Núñez, CTAB modificado y Kit Wizard Genomic DNA en brotes frescos y liofilizados, así como en hojas deshidratadas de tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). La mejor calidad de ADN se obtuvo con los métodos Doyle y CTAB, mientras que los mayores rendimientos fueron con el Kit y con el método Doyle. Así mismo, se encontró que el material vegetal liofilizado proporcionó mayor rendimiento en todos los protocolos en los brotes frescos y hojas deshidratadas. En la verificación mediante PCR se encontró que el gen ribosomal 16S podía ser fácilmente amplificado con los protocolos de Doyle, CTAB modificado y el kit comercial.

Palabras clave: *Crataegus mexicana*, calidad de ADN, PCR, purificación de ADN, tejocote.

SUMMARY

The use of molecular marker techniques starts with a good DNA extracts. Six DNA extraction methods were tested to identify the most adequate method that produces pure and integral DNA: Dumolin, Doyle, Tsumura, Núñez, modified CTAB and the commercial kit Wizard Genomic DNA on fresh and lyophilized shoots and in dried leaves of Mexican hawthorn (*Crataegus Mexicana* Moc.& Sessé). The highest DNA quality was obtained with the Doyle and CTAB methods, while the highest yields were obtained with the Kit and the Doyle methods. Likewise, it was found that lyophilized plant material produced higher yield in all the protocols in both fresh shoots and dry leaves. In the verification by PCR, it was found that the ribosomal 16S gene could be easily amplified with the Doyle and modified CTAB protocols as well as with the commercial kit.

Index words: *Crataegus mexicana*, DNA quality, DNA purification, PCR, Mexican hawthorn.

INTRODUCCIÓN

El género *Crataegus* agrupa alrededor de 150 especies en el mundo; se encuentra en regiones templadas de Asia, Europa y Norteamérica, 95 de ellas se encuentran en el continente americano, de las cuales 13 se consideran originarias de México (Phipps, 1997). El tejocote se encuentra ampliamente distribuido a lo largo y ancho de la República Mexicana, en altitudes que oscilan desde los 400 hasta los 3000 msnm (Nieto y Borys, 1991).

La importancia de este fruto radica en su amplia variabilidad en México y en su uso potencial como fruta fresca, portainjerto de otros frutales, forraje, fuente de pectina, ornamental, medicinal, y se usa en la preparación de licores tradicionales y conservas (Nieto y Borys, 1993).

Las investigaciones realizadas en este frutal se han enfocado a estudios principalmente morfológicos y fitoquímicos; sin embargo, las investigaciones moleculares dirigidas al conocimiento de la diversidad existente son limitadas. Uno de los requisitos indispensables para la realización de estudios moleculares es la extracción de ADN de buena calidad. La calidad del ADN está determinada principalmente por la condición fisiológica o morfológica del material vegetal, así como su etapa de desarrollo (Moreira y Oliveira, 2011). Debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios como taninos, fenoles y polisacáridos, principalmente en hojas maduras que pueden interferir en el proceso de extracción (Moreira y Oliveira, 2011; Souza *et al.*, 2012). En tejocote se ha reportado la presencia de fenoles, taninos, flavonoides y antocianinas, así como polisacáridos (pectinas) (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016; Edwards *et al.*, 2012; García-Mateos *et al.*, 2012).

Con la finalidad de obtener ADN puro e íntegro, en el presente estudio se evaluaron seis métodos de extracción de ADN de tejidos de tejocote para determinar los más apropiados para la realización de estudios de naturaleza molecular en esta especie.

Recibido: 4 de Abril de 2017
Aceptado: 26 de Noviembre de 2017

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Se evaluaron seis métodos de extracción de ADN y tres tipos de tejido vegetal del tejocote.

Material vegetal

Se utilizó tejido de árbol de tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé), accesión ATEX 02 originaria de Puebla, México, en tres modalidades: brotes frescos, hojas jóvenes deshidratadas en sílica gel y brotes frescos liofilizados. El material vegetal que se usó en fresco y las hojas deshidratadas en sílica gel se colectaron directamente del árbol, los brotes liofilizados fueron obtenidos de varetas brotadas bajo condiciones de invernadero; en su totalidad el material vegetal fue obtenido del Banco de Germoplasma en huerto vivo de la Universidad Autónoma Chapingo, localizado en las coordenadas 19º 29' N y 98º 53' O, a 2249 msnm. Los brotes liofilizados fueron previamente molidos en un molino TissueLyser II (QUIAGEN®, Hilden, Alemania). Las muestras se extrajeron por triplicado para cada uno de los métodos.

Extracción de ADN

Método de Dumolin *et al.* (1995)

Para el caso de tejido fresco y deshidratado se molieron 100 mg de la muestra con nitrógeno líquido. El tejido se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Con respecto al tejido liofilizado, se colocaron 15 mg, se añadieron 850 µL de amortiguador de extracción [EDTA 20 Mm, Tris-HCl pH 8.0 0.1 M, NaCl 1.4 M, CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 2 %, β-mercaptoetanol 1 % y PVP (polivinilpirrolidona) 1 %], mismas que se incubaron a 55 ºC por 60 min: posteriormente se continuó con el protocolo como lo señalan los autores. El extracto final se resuspendió en 100 mL de agua y se almacenó a -20 ºC.

Método de Doyle y Doyle (1990)

Este método se escaló para 50 mg de brotes frescos o 50 mg de hojas deshidratadas que se molieron con nitrógeno líquido. Para tejido liofilizado se utilizaron 15 mg. Se agregaron 400 mL de amortiguador de extracción (EDTA 20 mM, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, NaCl 1.4 M, CTAB 2 % y β-mercaptoetanol 1 %), se agitó en vórtex y se incubó a 60 ºC por 30 min. Se continúo con el protocolo de acuerdo con los autores.

Método de Tsumura *et al.* (1995)

Se utilizaron 15 mg de brotes liofilizados y para tejido fresco o deshidratado se molieron 50 mg de material con nitrógeno líquido. Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 500 mL de amortiguador de extracción I pre-enfríado en hielo (Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM; EDTA 5 mM; sorbitol 350 mM; BSA 1 %, 2-mercaptoetanol 0.1 %, polietilenglicol 10 %). Esta metodología se adaptó a una mini preparación 100 veces menor que el protocolo original para 5 g de tejido y 50 mL de amortiguador. El extracto final se resuspendió en 100 mL de TE y se almacenó a -20 ºC.

Método de Weising *et al.* (2005) modificado por Núñez-Colín *et al.* (2011)

Muestras de 15 mg de tejido liofilizado o 100 mg de tejido fresco o deshidratado (previamente molido con nitrógeno líquido) se colocaron en tubos de 5 mL que contenía 3 mL de amortiguador de extracción [CTAB 2 %, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM] precalentado a 60 ºC. Las muestras se incubaron por 15 min a 55 ºC en baño María. Se continuó con el protocolo según los autores y el extracto final se resuspendió en un volumen de 100 µL de TE y se almacenó en el refrigerador a una temperatura de 4 ºC.

Método CTAB modificado

Se pesaron 100 mg de hojas deshidratadas o brotes frescos, así como 15 mg de tejido liofilizado (previamente molidos). El material se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 600 µL de amortiguador salino (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0, NaCl 2 M, albumina sérica 0.05 %), se mezcló con un vórtex y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 5000 × *g* por 5 min y el sobrenadante se decantó y se agregaron 600 µL de amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, CTAB 2.0 %) y 3 µL de β-mercaptoetanol; la muestra se mezcló con vórtex e incubó a 55 ºC por 60 min. Posteriormente se agregaron 400 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 12,000 × *g* por 10 min.

La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se agregaron 600 µL de isopropanol (-20 ºC), se homogenizó por inversión y se dejó reposar 30 min a -20 ºC. Se centrifugó a 5000 × *g* por 5 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 600 µL de etanol al 75 % (-20 ºC), se agitó en vórtex y se centrifugó a 5000 × *g* por 4 min. El sobrenadante se decantó y se evaporó el etanol. La pastilla de ADN se resuspendió en 100 µL de agua. Se homogenizó en un vórtex e incubó a 4 ºC durante 12 h. Se agregaron

5 µL de ARNasa 10 mM, se incubó a 35 ºC por 30 min y a 65 ºC por 5 min para inactivar la ARNasa. Se agregaron 70 µL de acetato de sodio 3 M y 700 µL de isopropanol frío, se agitó hasta obtener el precipitado de ADN y se colocó a -20 ºC durante 30 min. Se centrifugó a 8000 × *g* durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de etanol al 70 %, se agitó y se centrifugó nuevamente a 8000 × *g* durante 10 min, se decantó, se dejó secar y se disolvió en 100 µL de TE. El ADN se almacenó a 4 ºC.

Método Kit de Purificación Wizard Genomic ADN (Promega Corporation, 2014)

Para este protocolo se utilizaron 40 mg de tejido fresco o seco (previamente molido con nitrógeno líquido) o 15 mg de tejido liofilizado. En este caso se siguieron las indicaciones del fabricante.

Determinación de la concentración y calidad del ADN

Para determinar la concentración y pureza del ADN se tomaron lecturas en un espectrofotómetro NanoDrop8000® (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) que registró la concentración del extracto en ng mL^{-1}, así como las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}. La verificación de la integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Por cada pozo se depositaron 8 µL de ADN a una concentración de 10 ng μL^{-1} y 2 µL de amortiguador de carga (azul de bromofenol). La electroforesis se llevó a cabo durante 1.5 h a 100 V, el gel fue teñido con bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}) y fotodocumentado en un transiluminador (High Performance UV Transiluminator, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Para comprobar la utilidad del ADN obtenido en técnicas moleculares PCR, se amplificó el gen ribosomal 16S, presente en todos los tipos de células de la muestra, que genera un producto de 315 pb. Los iniciadores empleados fueron el 16S1: 5'-TGAGAATGGATAAGAGGCTC-3' y el 16S2: 5'-TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG-3', que se amplificaron por 35 ciclos bajo el programa principal (94 ºC, 40 s; 55 ºC, 40 s; 72 ºC, 1 min), de acuerdo con Trejo-Saavedra *et al.* (2015).

El rendimiento de ADN se estimó a partir de la cantidad de material utilizado en cada protocolo y concentración total de ADN obtenida en ng mg^{-1} a partir de las lecturas de absorbancia.

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño de tratamientos factorial, donde el primer factor fueron los protocolos de estudio y el segundo factor los tipos de muestra. El diseño experimental fue completamente al azar. Se realizó análisis de varianza para cada una de las variables con procedimiento ANOVA mediante el sistema de análisis estadístico SAS (Statistical Analysis System), con una prueba de comparación de medias de Tukey 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de ácidos nucleicos en frutales puede ser técnicamente complicada debido a la gran cantidad de polisacáridos y compuestos polifenólicos que se acumulan durante la maduración o en respuesta a estímulos ambientales. En el presente estudio el material vegetal liofilizado proporcionó mayor rendimiento de ADN, independientemente de los protocolos evaluados con respecto a brotes frescos y hojas deshidratadas (Cuadro 1). El sistema de secado por vacío, llamado liofilización, resultó más eficiente para preservar las características del material vegetal inicial (Brennan *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 1994). En contraparte, en las hojas frescas, las enzimas se encuentran activas promoviendo la degradación de los compuestos fenólicos. En el caso de la deshidratación (secado con sílica gel), la temperatura y actividad acuosa tienen marcada influencia en la degradación o volatilización de algunos compuestos termosensibles (Dorta *et al.*, 2012).

En cuanto a pureza, un ADN puro y de calidad debe estar en un rango de 1.8 a 2.0 para la relación de absorbancias 260/280 y de 2.0 a 2.2 para la relación 260/230. Se observó que a pesar del mayor rendimiento de ADN obtenido con el kit comercial y para tejido liofilizado (Cuadro 1), éste no presenta los coeficientes mencionados para la relación 260/230, lo que indicó presencia de carbohidratos y fenoles.

Los protocolos de Tsumura *et al.* (1995) y Núñez-Colín *et al.* (2011) presentaron muy bajos rendimientos; esto último se relaciona con el uso de fenol equilibrado que requiere un mayor número de lavados, lo que incurre en pérdida de ADN en los diferentes pasos. Estos mismos exhibieron muy baja pureza de acuerdo con las relaciones de absorbancia registradas (Cuadro 1), lo cual se pudo apreciar durante el proceso de extracción debido a la rápida oxidación del tejido fresco y a la presencia de un compuesto de consistencia gelatinosa en algunas muestras de ADN altamente contaminadas; esto es posible, ya que el tejocote se caracteriza por su alto contenido de pectinas (polisacaridos) (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016) y fenoles (García-Mateos *et al.*, 2013) en fruto; y aun cuando en México no se ha estudiado la presencia de pectinas y fenoles en hoja, de manera general, sí han sido indicados (Kirakosyan *et al.*, 2003; Salazar y Gamboa, 2013; Willats *et al.*, 2006); esto último coincide con lo encontrado por Meisel *et al.* (2005), quienes mencionan que polisacáridos y compuestos polifenólicos frecuentemente precipitan y contaminan los ácidos nucleicos durante la extracción, lo que afecta tanto la calidad como la

Cuadro 1. Comparación de seis protocolos de extracción para los tres tipos de material vegetal utilizado en la extracción de ADN de tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé).

Protocolo	Muestra	Concentración (ng μL^{-1})	Absorbancia A260/280	Absorbancia 260/230	Rendimiento de ADN (ng mg^{-1})
	F	63.56 efg	1.68 abcd	2.04 ab	0.63 d
Dumolin	D	101.08 efg	1.63 abcde	1.02 bcd	1.01 d
	L	913.67 abc	2.15 a	2.15 a	60.91 ab
	F	220.57 efg	1.80 abcd	0.69 cd	4.41 d
Doyle	D	443.03 de	1.70 abcd	0.92 cd	8.86 cd
	L	1095.33 ab	2.05 ab	1.67 abc	73.02 a
	F	69.72 efg	1.11 e	0.44 d	1.39 d
Tsamura	D	41.25 fg	1.37 de	1.14 abcd	0.82 d
	L	418.93 def	1.48 cde	0.77 cd	27.92 c
	F	23.80 g	1.52 bcde	0.40 d	0.24 d
Núñez	D	40.05 fg	1.51 bcde	0.49 d	0.40 d
	L	85.20 efg	1.82 abcd	1.20 abcd	5.67 d
	F	136.39 efg	1.48 cde	0.43 d	2.72 d
CTAB	D	113.50 efg	1.36 de	0.49 d	2.27 d
	L	749.37 bcd	1.79 abc	2.02 ab	49.95 b
	F	189.87 efg	1.67 abcd	0.86 cd	4.74 d
Kit	D	695.20 cd	1.70 abcd	0.86 cd	17.38 cd
	L	1183.77 a	1.91 abc	0.96 bcd	78.92 a
DMSH		380.58	0.536	1.09	18.35
CV (%)		25.15	9.08	16.92	23.12

Medias con letras iguales en las columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$), DMSH: diferencia mínima significativa honesta; CV: coeficiente de variación. F: tejido fresco, D: tejido deshidratado, L: tejido liofilizado.

cantidad de ácidos nucleicos aislados. Los protocolos de Doyle y Doyle (1990) y CTAB modificado presentaron mejor calidad y mayores rendimientos.

Mediante la PCR realizada con el ADN obtenido de las diferentes metodologías se obtuvieron bandas de alrededor de 315 pb, indicando la amplificación correcta del gen de referencia (16S) para los protocolos de CTAB, Doyle y Doyle (1990) y kit, lo que indica que éstos pueden ser utilizados en la obtención de ADN de hojas de tejocote para estudios que involucren técnicas moleculares.

El material vegetal liofilizado proporcionó mayor rendimiento y calidad en todos los protocolos con respecto a brotes frescos y hojas deshidratadas. Los protocolos de Doyle y Doyle (1990) y CTAB modificado representan una alternativa para obtener ADN de buena calidad y rendimiento sin procedimientos tan largos y laboriosos evitando el uso de compuestos tóxicos y contaminantes como fenol, lo cual se verificó en cuanto a calidad y ausencia de inhibidores mediante la amplificación exitosa del gen ribosomal 16S por PCR.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México, por la beca doctoral otorgada al primer autor y segundo autor. Al Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández, por el soporte técnico en marcadores moleculares de ADN.

BIBLIOGRAFÍA

Brennan J. G. (2011) Evaporation and dehydration. *In*: Food Processing Handbook. Vol. 1. 2nd edition. J. G. Brennan and A. S. Grandison (eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. pp:77-130.

Cuevas-Bernardino J. C., C. Lobato-Calleros, A. Román-Guerrero, J. Alvarez-Ramirez, E. J. Vernon-Carter (2016) Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers* 103:63-71. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.03.024.

Dorta E., M. G. Lobo and M. González (2012) Using drying treatments to stabilise mango peel and seed: effect on antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 45:261-268. doi:10.1016/j.lwt.2011.08.016.

Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.

Dumolin S., B. Demesure and R. J. Petit (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1253-1256. https://doi.org/10.1007/BF00220937.

Edwards J. E., P. N. Brown, N. Talent, T. A. Dickinson and P. R. Shipley (2012) A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* 79:5-26. doi:10.1016/j.phytochem.2012.04.006.

García-Mateos R., E. Ibarra-Estrada and R. Nieto-Angel (2013) Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:1298-1304. http://dx.doi.org/10.7550/rmb.35675.

García-Mateos R., L. Aguilar-Santelises, M. Soto-Hernández, R. Nieto-Angel and G. Kite (2012) Total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the flowers of *Crataegus* spp. from México. *Agrociencia* 46:651-662.

Kirakosyan A., E. Seymour, P. B. Kaufman, S. Warber, S. Bolling and S. C. Chang (2003) Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3973-3976. doi:10.1021/jf030096r.

Meisel L., B. Fonseca, S. González, R. Baeza-Yates, V. Cambiazo, R. Campos, M. González, A. Orellana, J. Retamales and H. Silva (2005) A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biological Research* 38:83-88. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602005000100010.

Moreira P. A. and D. A. Oliveira (2011) Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genetics and Molecular Research* 10: 353-358. doi:10.4238/vol10-1gmr1030.

Moreira T., A. Gutiérrez y H. Delgado (1994) Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. *Biotecnología Aplicada* 11:113-119.

Nieto Á. R. y M. W. Borys (1991) El tejocote (*Crataegus* spp.) en México. *In*: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos en México. R. Ortega P., G. Palomino H., F. Castillo G., V. A. González H. y M. Livera M. (eds.). Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. (SOMEFI). Chapingo, México. pp:309-329.

Nieto Á. R. y M. W. Borys (1993) El tejocote (*Crataegus* spp.); un potencial frutícola para la producción de zonas templadas y frías. *Fruticultura Profesional* 54:64-71.

Núñez-Colín C. A., E. Valadez-Moctezuma, A. F. Barrientos-Priego, F. González-Andrés y R. Nieto-Ángel (2011) Variación de la región ribosómica nuclear en *Crataegus* L. del centro y sur de México. *Agronomía Mesoamericana* 22:1-10. http://dx.doi.org/10.15517/am.v22i1.8660.

Phipps J. B. (1997) Monograph of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, Subfam. Maloideae). Sida, Botanical Miscellany No. 15. Botanical Research Institute of Texas. Fort Worth, Texas. 94 p.

Promega Corporation (2014) Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Technical Manual. TM050. Revised 12/14. Promega Corporation. Madison, WI, USA. 18 p. https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/.

Salazar I. A. y A. Gamboa B. (2013) Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *Revista de Educación Bioquímica* 32:67-75.

Souza H. A. V., L. A. C. Muller, R. L. Brandão and M. B. Lovato (2012) Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Research* 11:756-764. http://dx.doi.org/10.4238/2012.March.22.6.

Trejo-Saavedra D. L., E. A. Rodríguez-Negrete y R. F. Rivera-Bustamante (2015) Detección de transgenes en organismos genéticamente modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria* 25:24-39. doi:10.15174/au.2015.906.

Tsumura Y., K. Yoshimura, N. Tomaru and K. Ohba (1995) Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1222-1236.

Weising K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl (2005) DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications. 2nd edition. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 444 p.

Willats W. G. T., J. P. Knox and J. D. Mikkelsen (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17:97-104. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008.