

Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2015, 32: 231-251

## Protocolo de extracción de ADN para *Aloe barbadensis* Mill.

DNA extraction protocol for *Aloe barbadensis* Mill.

A. Nava<sup>1</sup>, N. Albany<sup>2</sup> y J. Vilchez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomía, <sup>2</sup>Departamento de Química y <sup>3</sup>Departamento de Botánica. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

### Resumen

El cultivo de *Aloe barbadensis* Mill. presenta múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmetológica y alimenticia. A pesar de su adaptabilidad a zonas desérticas el incremento de la superficie sembrada en Venezuela se ve limitado por las bajas tasas de propagación de hijuelos de forma convencional. La propagación masiva de plantas sanas de zábila se puede lograr a través de métodos de micropropagación, pero requiere de la verificación de la fidelidad genética de las plantas, para lo cual es necesario contar con un método de extracción de ADN que sea rápido, económico y que genere un ADN de alta calidad y cantidad. En tal sentido, se compararon tres protocolos de extracción de ADN (20% SDS, 2% CTAB/3,5M NaCl y 2% CTAB/1,4M NaCl) en tejido foliar de vitroplantas e hijuelos de zábila. Basados en los análisis espectrofotométricos de pureza (1,45) e integridad del ADN se seleccionó el protocolo de 2% CTAB/1,4M NaCl para evaluar diferentes zonas del tejido foliar (apical, media y basal), además se realizaron modificaciones en los antioxidantes del tampón de extracción, el tiempo de homogenización e incubación, y se eliminó el uso de acetato de sodio y se adicionó un tratamiento con ARNasa para la estandarización del método de extracción de ADN de zábila. Las zonas media y basal del tejido foliar, así como las modificaciones realizadas al protocolo 2% CTAB/1,4M NaCl permitieron obtener un ADN de zábila con concentración (185,45 y 204,67 ng.µL<sup>-1</sup>) y calidad (1,89 y 1,93) adecuada para los análisis moleculares.

**Palabras clave:** Zábila, ácidos nucleicos, métodos de extracción.

---

Recibido el 5-3-2015 ● Aceptado el 1-06-2015

Autor de correspondencia e-mail: nalbany@fa.luz.edu.ve

## Abstract

*Aloe barbadensis* Mill. is a crop with multiple applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industry. Even though, Aloe has high adaptability to deserted areas, the increment of commercial sown surface of aloe in Venezuela is limited due to the low propagation rates of offshoots by conventional propagation methods. Massive propagation of healthy plant could be achieved by micropropagation techniques. However, the genetic stability of these plants must be verified, therefore a DNA extraction protocol is necessary, which be cheap, will consume less time and able to achieve high quality and quantity of DNA. Three DNA extraction protocols (20%SDS, 2%CTAB/3.5MNaCl and 2%CTAB/1.4MNaCl) on aloe foliar tissue of vitroplants and offshoots were compared. Based on spectrophotometric analysis of the quality (1.45) and integrity (electrophoretic analysis) of DNA, the extraction protocol 2%CTAB/1.4MNaCl was selected to evaluate different position of foliar tissue (apical, intermediate, base); in addition, several modification were carried out, antioxidants in the buffer extraction, incubation and homogenization time, and RNAase treatment, sodium acetate was excluded for standardization of DNA extraction method for aloe. The intermediate and base zone of foliar tissue as well as all modifications carried out to 2% CTAB/1.4M NaCl protocol allowed to obtain satisfactory quantity (185.45 and 204.67 ng.μL<sup>-1</sup>) and quality (1.89 and 1.93) of DNA of aloe for molecular analysis.

**Key words:** Aloe, nucleic acid, extraction protocols.

## Introducción

La especie *Aloe barbadensis* Mill., ubicada en la familia Asphodelaceae es muy utilizada en la industria farmacéutica, de alimentos y cosmética por las propiedades biológicas de la aloína y otros metabolitos primarios y secundarios que se extraen de esta especie (Campestrini *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2002).

Los avances en el cultivo de tejidos vegetales han generado en los últimos diez años varios métodos de micropropagación para zábila; altamente eficientes en cuanto a la cantidad de plantas reproducidas y la calidad fitosanitaria (Matos, 2007; Albany *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2004). Sin embargo, estas plantas deben ser eva-

## Introduction

The species of *Aloe barbadensis* Mill., belonging to the Asphodelaceae family is very used in the pharmaceutical, food and cosmetics industry by the biological properties of the aloin and other primary and secondary metabolites that are extracted from this species (Campestrini *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2002).

The advances in plant tissue culture have generated in the last ten years several micropropagation methods for aloe; highly efficient regarding the quantity of propagated plants and the phytosanitary quality (Matos, 2007; Albany *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2004). However, these plants

luadas antes de ser establecidas comercialmente para reducir las posibilidades de obtener variantes somaclonales (Samantaray y Maiti, 2008), para lo cual se usan marcadores morfológicos o moleculares (Sánchez y Jiménez, 2009; Roca y Ramirez, 2000). Los primeros se basan en el estudio de cambios visibles en el fenotipo y requieren de un registro cuidadoso de las características morfológicas de las plantas hasta su madurez (Deore *et al.*, 2014). Los segundos están basados en el ADN, no son afectados por factores ambientales y generan resultados confiables y reproducibles (Rathore *et al.*, 2011); que además pueden ser empleados en la etapa de aclimatación de cultivo de tejido.

El proceso de extracción de ADN implica romper y digerir las paredes celulares para exponer los constituyentes celulares (Sánchez *et al.*, 2012), seguido de la lisis celular para liberar al ADN del interior de la célula (Falcón y Valera, 2007). Para ello, se procede a la destrucción de las estructuras formadas por lípidos y proteínas de la célula, permitiendo la liberación del ADN del núcleo celular; mediante una solución tampón salina que suele contener detergentes (Red Nacional de Biobancos, 2012), con adiciones de una molécula quelante y el Tris-HCl para mantener el pH de la solución estable (Falcón y Valera, 2007); además de otras sustancias como antioxidantes (2 mercaptoetanol, ácido ascórbico) y enzimas hidrolíticas (proteínasa K).

Entre los detergentes más utilizados en las soluciones de extracción se encuentra el dodecilsulfato sódico, conocido como SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), con propiedades tensoactivas

should be evaluated before being established commercially to reduce the chances of obtaining somaclonal variants (Samantaray and Maiti, 2008), for which morphological or molecular markers are used (Sanchez and Jimenez, 2009; Roca and Ramirez, 2000). The firsts are based on the study of visible changes in the phenotype and require a thorough record of the morphological characteristics of the plants until their ripening (Deore *et al.*, 2014). The seconds are based on the DNA, are not affected by environmental factors and generate reliable and reproducible results (Rathore *et al.*, 2011); which can also be used in the acclimation stage of the tissue culture.

The process of DNA extraction involves breaking and digesting the cell walls to expose the cellular constituents (Sánchez *et al.*, 2012), followed by cell lysis to release the DNA inside the cell (Falcón and Valera, 2007). For this, the structures formed by lipids and proteins of the cell are destroyed, allowing the release of the DNA in the cell nucleus using a buffered salt solution that usually contains detergents (National Network of biobanks, 2012), and adding a chelating molecule and the Tris-HCl to maintain stable the pH of the solution (Falcón and Valera, 2007); besides other substances such as antioxidants (2 mercaptoethanol, ascorbic acid) and hydrolytic enzymes (proteinase K).

Among the most used detergents in the extraction solutions are: sodium dodecyl sulphate, known as SDS with active anionic properties (Falcón and Valera, 2007); the cetyl trimethyl

aniónicas (Falcón y Valera, 2007); el bromuro de cetiltrimetilamonio (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*: CTAB) con propiedades tensoactivas catiónicas y el Tween (Castillo *et al.*, 2004). La función de estos detergentes en el proceso de extracción de ADN es principalmente solubilizar los lípidos; de tal manera que captura los lípidos junto con las proteínas de la membrana celular y nuclear exponiendo el ADN. Algunos de los detergentes empleados pueden coadyuvar en la desnaturalización de las proteínas ligadas al ADN (histonas) y/o proteasas (ADNasas) que se encuentran en la célula (Red Nacional de Biobancos, 2012).

Una vez que se precipitan las proteínas, el ADN que permanece en la solución acuosa puede precipitar cuando se adiciona un alcohol y una sal en alta concentración (acetato de sodio, cloruro de sodio, acetato de amonio o cloruro de litio) (Falcón y Valera, 2007; Sambrook y Russell, 2001); ya que los ácidos nucleicos en forma de sales, presentan baja solubilidad en los alcoholes (Abu Almakarem *et al.*, 2012). El isopropanol o el etanol actúan sobre los ácidos nucleicos exponiendo las cargas negativas de sus grupos fosfatos, los cuales se unen a las contracargas del  $\text{Na}^+$  reduciendo las fuerzas de repulsión entre los polinucleotidos, favoreciendo la precipitación del ADN por centrifugación (Sambrook y Russell, 2001); siendo el isopropanol selectivo para la precipitación del ADN en presencia de ARN (Velasco, 2005).

La concentración y la calidad del ADN extraído puede cuantificarse utilizando electroforesis de muestras y

ammonium bromide: CTAB with cationic properties and the Tween (Castillo *et al.*, 2004). The function of these detergents in the process of DNA extraction is mainly to solubilize lipids in such a way that these capture the lipids along with the proteins in the cell membrane, exposing the nuclear DNA. Some of the detergents employed can assist in the denaturalization of the proteins bounded to the DNA (histones) and/or proteases (DNAases) that are found in the cell (National Network of Biobanks, 2012).

Once the proteins are precipitated, the DNA that remains in the aqueous solution can precipitate when alcohol and a salt are added in high concentrations (sodium acetate, sodium chloride, ammonium acetate or lithium chloride) (Falcón and Valera, 2007) Sambrook and Russell, 2001) since the nucleic acids as salts have low solubility in alcohols (Abu Almakarem *et al.*, 2012). The isopropanol or ethanol act on nucleic acids by exposing the negative charges of the phosphate groups, which join to the counter-charge of Na reducing the repulsion forces between the polynucleotides, favoring the precipitation the ADN by centrifugation (Sambrook and Russell, 2001); being the isopropanol selective for the DNA precipitation in the presence of RNA (Velasco, 2005).

The concentration and quality of the extracted DNA can be quantified using sample electrophoresis and known concentration patterns of DNA or by using a spectrophotometer, which detects the radiation emitted by the nitrogenous bases found in the DNA after being moved with a

patrones de concentraciones conocidas de ADN o empleando un espectrofotómetro, el cual detecta la radiación emitida por las bases nitrogenadas presentes en el ADN luego de ser excitadas con una longitud de onda de 260 nm (Rocha, 2002). La relación A260nm/A280nm ha sido señalada por varios autores como indicativo de pureza del ADN, considerándose que un ADN es de buena calidad si esta en los siguientes rangos: entre 1,8 y 2 (San Juan *et al.*, 2014; Cerda y Díaz, 2013; Sánchez *et al.*, 2012; Sambrook y Russel, 2001), entre 1,7 y 2,0 (López *et al.*, 2011), entre 1,6 y 1,8 (Gryson, 2010) o entre 1,5 y 2,0 (Castillo *et al.*, 2004).

La mayoría de las extracciones de ADN de plantas se han realizado por medio de dos protocolos básicos que han sido modificados según las propiedades de los tejidos vegetales estudiados, uno propuesto por Dellaporta *et al.* (1983) y otro por Doyle y Doyle (1990), con compuestos que eliminan subsecuentemente proteínas, polisacáridos y polifenoles. En el primero son utilizados reactivos como SDS en presencia de acetato de potasio para la precipitación simultánea de proteínas y polisacáridos, mientras que en el segundo se utiliza CTAB (Romano y Miranda, 1999).

Los métodos de extracción de ADN buscan rapidez, simplicidad, eficiencia y economía; además, de obtener un producto aislado que sea de calidad y con altos rendimientos para ser utilizado en diferentes objetivos (Deore *et al.*, 2014, Castillo *et al.*, 2004). Sin embargo, la extracción del ADN no siempre es simple y los protocolos publicados no son necesariamente repro-

wavelength of 260 nm (Rocha, 2002). The A260nm/A280nm relationship has been mentioned by different authors as an indication of the DNA purity, considering that a DNA with good quality is the one that merges in the ranges: from 1.8 and 2 (San Juan *et al.*, 2014; Cerda and Diaz, 2013; Sánchez *et al.*, 2012; Sambrook and Russell, 2001), from 1.7 to 2.0 (López *et al.*, 2011), from 1.6 to 1.8 (Gryson, 2010) or from 1.5 to 2.0 (Castillo *et al.*, 2004).

Most of the DNA extractions of plants have been carried out by means of two basic protocols that have been modified according to the properties of the vegetable tissue studied, one proposed by Dellaporta *et al.* (1983) and other by Doyle and Doyle (1990), with compounds that subsequently eliminate proteins, polysaccharides and polyphenols. In the first, agents such as SDS are used along to potassium acetate for the simultaneous precipitation of proteins and polysaccharides, while in the second CTAB is used (Romano and Miranda, 1999).

The DNA extraction methods look for speed, simplicity, efficiency and economy, also to obtain a high quality isolated product with high yields to be used in different objectives (Deore *et al.*, 2014, Castillo *et al.*, 2004). However, the DNA extraction is not always simple and the published protocols are not necessarily reproducible for any species, due to the fact that a large number of plants produce secondary metabolites (Castillo *et al.*, 2004) that interfere and hinders the removal process; thus, each researcher describes a different

ducibles para cualquier especie, debido a que un gran número de plantas producen metabolitos secundarios (Castillo *et al.*, 2004); que interfieren y dificultan el proceso de extracción, por lo que cada investigador describe un método diferente (López *et al.*, 2011) estandarizado a sus propias condiciones; especialmente cuando los tejidos de la planta dificultan el proceso de extracción como las células del parénquima que forman el gel de la zábila. Por tanto se plantea como objetivo de esta investigación obtener un protocolo de extracción de ADN para *A. barbadensis* que proporcione la concentración y calidad necesaria para el desarrollo de estudios moleculares.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

De una planta de zábila (*A. barbadensis*) crecida en condiciones de campo en el Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola y Apícola de CORPOZULIA, ubicado en el Municipio Mara, estado Zulia, Venezuela (latitud Norte 10°49'40" y longitud Oeste 79°46'31"), se seleccionaron brotes para generar: vitroplantas (Albany *et al.*, 2006) e hijuelos por propagación convencional.

### Comparación de tres protocolos de extracción de ADN para zábila

La extracción de ADN se llevó a cabo a través de tres protocolos, uno basado en el uso de dodecilsulfato sódico (SDS); y dos basados en el uso de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Los tres protocolos fueron adaptados a las condiciones de suministros, equipos e instalaciones del la-

method (Lopez *et al.*, 2011) standardized to their own conditions; especially when the plant tissue hinders the removal process such as the parenchyma cells that form the aloe gel. Therefore, the aim of this research is to obtain an extraction protocol of DNA for *A. barbadensis* that would *provide* the necessary concentration and quality for the development of molecular studies.

## Materials and methods

### Vegetal material

Sprouts were selected to generate vitroplants (Albany *et al.*, 2006) and tillers by conventional propagation from an aloe plant (*A. barbadensis*) grown under field conditions in the Socialist Center of Fruit and Beekeeping Research and Development of CORPOZULIA, located in Mara county, Zulia state, Venezuela (North latitude 10°49'40" and West longitude 79°46'31").

### Comparison of three DNA extracting protocols for aloe

DNA extraction was carried out through three protocols, one based on the use of sodium dodecyl sulphate (SDS); and two based on the use of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). The three protocols were adapted to the conditions of supplies, equipment and facilities of the Biotechnology laboratory "Professor Silvia León de Sierralta" of the Agronomy Faculty of Universidad del Zulia.

### Selection and processing of the foliar tissue for the DNA extraction

Young leaves of equal appearance in terms of length and thickness of



boratorio de Biotecnología “Profesora Silvia León de Sierralta” de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia.

### **Selección y procesamiento del tejido foliar para la extracción de ADN**

Hojas jóvenes de igual apariencia en cuanto a longitud y grosor de vitroplantas e hijuelos de edad, altura (~ 15 cm) y número de hojas similares se cortaron en condiciones de asepsia, utilizando guantes de latex e instrumentos esterilizados (capsulas de petri, pinzas y bisturí). Sólo las hojas provenientes de hijuelos se desinfectaron con una solución de NaClO al 3% v/v durante 3 min; luego se enjuagaron con suficiente agua destilada estéril y se colocaron sobre la capsula de petri con una pinza. Para obtener una lámina delgada constituida por la cutícula, la epidermis y las células parenquimatosas (tejido foliar) se utilizó un bisturí y un Flosbrush® (mango de auto dispensación de hilo dental) con un alambre fino y estéril (figura 1a, 1b, 1c y 1d). Para eliminar la mayor cantidad posible de gel se realizó un barrido con la hoja de un bisturí en forma de bisel sobre el tejido foliar.

Un círculo de 0,5 cm de diámetro de la zona media-basal del tejido foliar con un peso comprendido entre 50 y 55 mg se colocó en un tubo nuevo y estéril de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidad, previamente identificado según la procedencia del tejido foliar y el protocolo de extracción a evaluar, todos los protocolos se hicieron por triplicado.

**El protocolo 20% SDS:** fue realizado siguiendo los procedimientos de Gilbertson *et al.* (1991) con modifica-

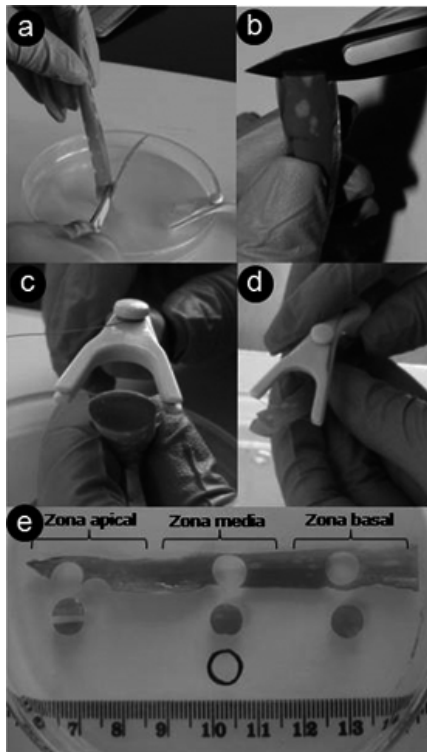
vitroplants and tillers with similar age, height (~ 15 cm) and number of similar leaves were cut on asepsis conditions, using latex gloves and sterilized instruments (petri plates, tweezers and scalpel). Only the leaves from shoots were disinfected with a NaClO 3% v/v solution for 3 min; then flushed with enough sterile distilled water and placed on a petri plate with a clamp. A scalpel and a Flosbrush® (self dispensing flossing) with a thin and sterile wire (figure 1a, 1b, 1c and 1d) were used to obtain a thin sheet formed by the cuticle, the epidermis and the parenchymal cells (leaf tissue). To eliminate the greatest amount of gel, a sweep on the foliar tissue was done using a scalpel.

A 0.5 cm diameter circle in the media-basal area of the foliar tissue weighing between 50 and 55 mg was placed in a new and sterile microcentrifuge tube for 1.5 mL capacity, previously identified according to the origin of the foliar tissue and the extraction protocol to be evaluated; all the protocols were made by triplicate.

**The 20% SDS protocol:** was carried out following the Gilbertson *et al.* (1991) procedures with modification in the times of centrifugation (increased from 10 to 15 min) and the ethanol percentage (increased from 70 to 100%).

**The 2% CTAB/3.5 M NaCl protocol:** was used following the procedure described by Rathore *et al.* (2011), whose modifications consisted of the exclusion of the nitrogen in liquid and the ARNase.

**The 2% CTAB/1.4 M NaCl protocol:** employed the methodology of Doyle and Doyle (1990) with some



**Figura 1.** Proceso de extracción del tejido foliar de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.): (a) Corte del margen dentado y espinoso de la hoja con bisturí. (b) Incisión transversal debajo de la epidermis de la cara adaxial de la hoja. (c) Inserción con alambre fino y estéril usando un Flosbrush®. (d) Obtención del tejido foliar para extracción de ADN haciendo un recorrido del alambre a lo largo de la hoja. (e) Círculos de tejido foliar de zábila de aproximadamente 0,5 cm de diámetro de las zonas basal, media y apical utilizados para la estandarización del protocolo 2% CTAB/1,4 M NaCl de extracción de ADN.

**Figure 1.** Extraction process of the leaf tissue of Aloe (*Aloe barbadensis* Mill.): (a) toothed and thorny cut of the sheet with a scalpel. (b) Transverse incision below the epidermis of the adaxial face of the leaf (c) insertion with fine and sterile wire using a Flosbrush®. (d) Obtaining of the foliar tissue for the DNA extraction doing a tour of the wire throughout the leaf. (e) Circles of foliar tissue of Aloe of approximately 0.5 cm of diameter of the basal, middle and apical areas used for the standardization of the protocol 2% CTAB/1.4 M NaCl of the DNA extraction.



ción en los tiempos de centrifugación (incrementado de 10 a 15 min) y el porcentaje del etanol (incrementado de 70 a 100%).

**El protocolo 2% CTAB/3,5 M NaCl:** se utilizó siguiendo el procedimiento descrito por Rathore *et al.* (2011), cuya modificación consistió en la exclusión del nitrógeno líquido y la ARNasa.

**El protocolo 2% CTAB/1,4 M NaCl:** empleó la metodología de Doyle y Doyle (1990) con algunas adaptaciones realizadas por Pardo *et al.* (2008), que incluyen el uso de centrifugación en frío.

#### **Evaluación de diferentes zonas del tejido foliar de zábila en la estandarización del protocolo de extracción de ADN.**

Se evaluó la zona apical, media y basal del tejido foliar de zábila (figura 1e) en la estandarización del protocolo seleccionado de la comparación en el primer ensayo, realizando algunos cambios como la eliminación de raspado del gel en el procesamiento del tejido para evitar procesos de oxidación del tejido y degradación del ADN, la solución tampón de extracción estuvo constituida por 2% CTAB; 100 mM Tris HCl (pH 8); 20 mM EDTA; 1,4 M NaCl; 1% PVP 40000 y 2 mercaptoetanol (0,2%) al momento de su uso, la homogeneización fue más rápida aproximadamente 5 seg, el tiempo de incubación se redujó a 30 min, se excluyó el uso del acetato de sodio y finalmente se adicionó tratamiento con ARNasa según lo descrito por Romano y Miranda (1999).

#### **Evaluación de la concentración, pureza, rendimiento e integridad del ADN**

Una vez resuspendidos los precipitados de ADN en 40 mL de solución

adjustments made by Pardo *et al.* (2008), who include the use of centrifugation in cold.

#### **Evaluation of different leaf tissue areas of aloe in the standardization of the DNA extraction protocol.**

The apical, middle and basal areas of the aloe leaf tissue were evaluated (figure 1e) in the standardization of the selected protocol of the comparison in the first essay, making some changes such as the scraping elimination of the gel in the tissue processing to prevent oxidation processes of the tissue and degradation of DNA, the solution extraction buffer was composed of 2% CTAB; 100 mm Tris HCl (pH 8); 20 mm EDTA, 1.4 M NaCl, 1% PVP 40000 and 2 mercaptoethanol (0.2%) at the time of its use, the homogenization was fast, approximately 5 sec, the incubation time reduced to 30 min, the use of sodium acetate was excluded and finally the treatment with ARNase was added as described by Romano and Miranda (1999).

#### **Evaluation of the DNA concentration, purity, performance and integrity**

Once suspended the DNA precipitates in 40 mL of buffer sterile solution of TE-8 (10 mM Tris HCl and 1 mm EDTA, adjusted to pH 8), it was proceeded to measure the concentration and purity (A260nm/A280nm) of the DNA in an UV visible spectrophotometer (Bioware DNA, WPA, Cambridge, UK). Three readings of the same sample were done to verify the performance of the equipment. The DNA yield (ng.mg<sup>-1</sup>) was calculated taking the DNA

tampón esterilizada de TE 8 (10 mM Tris HCl y 1 mM EDTA, ajustada a pH 8), se procedió a medir la concentración y la pureza (A260nm/A280nm) del ADN en un espectrofotómetro UV visible (Bioware DNA, WPA, Cambridge, RU). Se realizaron tres lecturas de la misma muestra para verificar la operatividad del equipo. El rendimiento del ADN ( $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) se calculó tomando el valor de la concentración de ADN ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) obtenida en el espectrofotómetro, multiplicado por el volumen total de resuspensión (40 mL) y dividido entre el peso (mg) del tejido foliar seccionado de cada muestra.

La integridad del ADN se verificó visualmente a través de la intensidad y definición de la banda, así como el barrido o arrastre de la misma en geles de agarosa (0,8%) mediante electroforesis horizontal, tinción con  $0,0015 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio (Méndez *et al.*, 2010) y posterior visualización en un transiluminador de luz UV (UV/White Ligth transmilluminator, UVP, Cambridge, RU).

Se realizó un análisis de varianza para evaluar la concentración, pureza y rendimiento del ADN extraído por los tres protocolos de extracción estudiados, así como para la evaluación de las diferentes zonas de tejido foliar de zábila para la estandarización de la extracción de ADN. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones (muestras). La prueba de mínima diferencia significativa de Tukey se utilizó para comparar las variables concentración de ADN, pureza y rendimiento de cada método estudiado, las variables mencionadas fueron transformadas con  $\sqrt{x+0,5}$ .

concentration value ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) obtained in the spectrophotometer, multiplied by the total volume of resuspension (40 mL) and divided by the weight (mg) of the sectioned leaf tissue of each sample.

The DNA integrity was verified visually through the intensity and definition of the band, as well as the sweep or drag of the same in agarose gels (0.8%) by using horizontal electrophoresis, staining with  $0.0015 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of ethidium bromide (Méndez *et al.*, 2010) and subsequent visualization in a light box of UV light (UV/White Ligth transmilluminator, UVP, Cambridge, UK).

A variance analysis was done to evaluate the concentration, purity and yield of the DNA extracted by three studied extracting protocols, as well as for the evaluation of different areas of leaf tissue of aloe for the standardization of the DNA extraction. A completely randomized design with three replications (samples) was used. Tukey test was performed to compare the variables: DNA concentration, purity and yield of each studied method, the mentioned variables were transformed with  $\sqrt{x+0.5}$ .

## Results and discussion

### Comparison of the DNA extracting protocols

The three protocols for the DNA extraction in aloe were statistically different ( $P \leq 0.01$ ) for the concentration and performance variables of the extracted DNA, while the purity showed no statistical differences among the three protocols. The concentration and the DNA yield obtained with the protocol 2% CTAB/3.5 M NaCl were

## Resultados y discusión

### Comparación de los protocolos de extracción de ADN

Los tres protocolos de extracción de ADN evaluados en zábila resultaron diferentes estadísticamente ( $P \leq 0,01$ ) para las variables concentración y rendimiento del ADN extraído; mientras que la pureza no mostró diferencias estadísticas entre los tres protocolos. La concentración y el rendimiento de ADN obtenidos con el protocolo 2% CTAB/3,5 M NaCl fueron notablemente superiores en comparación con los valores obtenidos con los protocolos SDS y 2% CTAB/1,4 M NaCl; donde se observaron valores estadísticamente similares; según la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey (cuadro 1).

Sin embargo, la alta concentración de ADN y por ende el rendimiento obtenido con el protocolo 2% CTAB/3,5 M NaCl pudiera estar sobreestimado por el efecto de hipercromicidad del ADN desnaturizado o degradado, a consecuencia de una mayor exposición de la muestra en el baño de María (90 min) en comparación con el protocolo SDS (10 min) y el protocolo 2% CTAB/1,4 M NaCl (20 min). Una muestra de ADN de doble cadena al ser desnaturizada o degradada incrementa notablemente su capacidad de absorber luz UV a 260nm (San Juan *et al.*, 2014). Así también, residuos de CTAB en las muestras, especialmente en medios hipersalinos (Castillo *et al.*, 2004), aumentan erróneamente el valor de la concentración del ADN. Contrariamente, otros investigadores utilizan 4% CTAB y 5 M NaCl y obtienen valores de

significativamente higher in comparison with the values obtained with the protocols and SDS and 2% CTAB/1.4 M NaCl; where values were statistically similar; according to the evidence of least significant difference of Tukey (table 1).

However, the high DNA concentration and therefore, the performance obtained with the protocol 2% CTAB/3.5 M NaCl might be overestimated by the hyperchromicity effect of the denatured or degraded DNA as a result of a greater exposure of the sample in a water bath (90 min) in comparison with the SDS protocol (10 min) and the protocol 2% CTAB/1.4 M NaCl (20 min). A sample of double-stranded DNA when denature or degraded, significantly increases the ability to absorb UV light at 260nm (San Juan *et al.*, 2014). Also, waste of CTAB in the samples, especially in hypersaline mediums (Castillo *et al.*, 2004), erroneously increase the value of the DNA concentration. Conversely, other researchers used 4% CTAB and 5 M NaCl and obtain values of  $A_{260nm}/A_{280nm}$  from 1.6 to 1.7 and note that the DNA extracted from aloe presented high purity and good quality (Deore *et al.*, 2014).

Among other components associated with the DNA extraction that are capable of absorbing wavelengths of 260 nm, EDTA and phenol are emphasized, which mean that their waste in the removal of the DNA can increase the concentration value of nucleic acids, when the measurement in the spectrophotometer is done (Sambrook and Russell, 2001). This might explain the high values obtained with the SDS protocol with respect to those obtained

**Cuadro 1. Concentración, pureza (A260nm/A280nm) y rendimiento de ADN de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) obtenidos con los protocolos de extracción SDS, 2% CTAB/3,5 M NaCl y 2% CTAB/1,4 M NaCl.**

**Table 1. Concentration, pureness (A260nm/A280nm) and DNA yield of Aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) obtained with the extraction protocols SDS, 2% CTAB/3.5 M NaCl and 2% CTAB/1.4 M NaCl.**

Protocolo	Variables		
	Concentración de ADN (ng.mL <sup>-1</sup> )	A260nm/A280nm	Rendimiento (ng.mg <sup>-1</sup> )
SDS	406,40 <sup>b</sup>	1,23 <sup>a</sup>	309,64 <sup>b</sup>
2% CTAB/3,5 M NaCl	1697,30 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	1293,20 <sup>a</sup>
2% CTAB/1,4 M NaCl	257,56 <sup>b</sup>	1,45 <sup>a</sup>	196,23 <sup>b</sup>

Valores seguidos de letras distintas en la misma columna, difieren estadísticamente ( $P \leq 0,05$ ) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

A260nm/280nm entre 1,6 y 1,7 y señalan que el ADN extraído de zábila presentó alta pureza y buena calidad (Deore *et al.*, 2014).

Entre otros componentes asociados con las extracciones de ADN que son capaces de absorber longitudes de 260 nm se destaca el EDTA y el fenol, por lo que sus residuos en la extracción del ADN pueden incrementar el valor de la concentración de los ácidos nucleicos, cuando se hace la medición en el espectrofotómetro (Sambrook y Russell, 2001). Esto pudiera explicar los altos valores obtenidos con el protocolo SDS con respecto a los obtenidos con el protocolo 2% CTAB/1,4 M NaCl, dado que en el primero la concentración de EDTA en el buffer de extracción fue un 40% más que en el último.

En la prueba de integridad del ADN para los tres protocolos de extrac-

with the 2% protocol CTAB/1.4 M NaCl, given that in the first EDTA concentration in the extraction buffer was a 40% more than in the past.

In the DNA integrity test for the three extraction protocols evaluated, diffuse DNA bands were observed, scarcely defined with a broad sweep along the gel, which shows a high degradation of the DNA. Romano and Miranda (1999) mention that when a DNA is not clearly visualized in the gel; it is possible that the sample is contaminated with RNA and the ARNases are recommended to be used in the extraction protocols to decrease the pollution of the DNA extracted with RNA.

Although the variance analysis showed no significant differences among the DNA extracting protocols for purity; the mean values were considered (table 1) as quality

ción evaluados, se observaron bandas de ADN muy difusas, escasamente definidas con un amplio barrido a lo largo del gel, lo que evidencia una alta degradación del ADN. Romano y Miranda (1999) señalan que cuando un ADN no es visualizado de forma nítida en el gel; es posible que la muestra este contaminada con ARN y recomiendan incorporar en los protocolos de extracción el uso de ARNasas para disminuir la contaminación del ADN extraído con ARN.

Aunque el análisis de la varianza no mostró diferencias significativas entre los protocolos de extracción de ADN evaluados para la pureza; se consideraron los valores promedios (cuadro 1) como indicadores de calidad del ADN para cada protocolo de extracción estudiado. Entre los valores promedios de la pureza; se destaca el protocolo 2% CTAB/1,4 M NaCl con el valor (1,45) más cercano al señalado por Gryson (2010); aunque San Juan *et al.* (2014) afirman que para calificar un ADN de óptima calidad el rango de la relación A260nm/A280nm debe estar entre 1,8 y 2.

Además de los resultados obtenidos, fue necesario considerar algunas ventajas y diferencias entre los tres protocolos de extracción evaluados, en cuanto a la practicidad del proceso, tiempo de ejecución y uso de algunos compuestos o sustancias que mostraron inconvenientes durante el proceso de extracción. Esta comparación permitió descartar el protocolo 2% CTAB/3,5 M NaCl; ya que los valores de estimación de pureza resultaron ser los más bajos (1,06); con una dudosa cuantificación de ADN y barrido en la prueba de electroforesis; siendo el pro-

indicators of DNA for each extracting protocol studied. Among the average values of purity, the protocol 2% CTAB/1.4 M NaCl stands out with the value (1.45) closest to the one outlined by Gryson (2010); although San Juan *et al.* (2014) claim that in order to qualify a DNA with optimum quality the range of the relationship A260nm/A280nm should be between 1.8 and 2.

In addition to the results obtained, it was necessary to consider some of the advantages and differences between the three extraction protocols evaluated in terms of the practicality of the process, runtime and use of some compounds or substances that showed disadvantages during the extraction process. This comparison allowed to dismiss the protocol 2% CTAB/3.5 M NaCl; since the estimate values of purity proved to be the lowest (1.06), with a questionable DNA quantification and sweep in the electrophoresis test; being the more laborious protocol among the evaluated, with the highest concentration of salts in the buffer solution (3.5 M NaCl), longer incubation time in water bath (90 min) and where some whitish precipitates of DNA were observed as possible presence of unsettled salts by the centrifugation in the presence of sodium acetate.

This protocol, 2% CTAB/3.5 M NaCl, was selected in the consulted literature (Rathore *et al.*, 2011) by referring to the DNA extraction from aloe. However, in the execution of this research liquid nitrogen, phenol, and ARNase were not used; thus the changes done to the original protocol described by Rathore *et al.* (2011)

toloco más laborioso entre los evaluados, con la más alta concentración de sales en la solución tampón (3,5 M NaCl), mayor tiempo de incubación en baño de María (90 min) y en el que se observaron algunos precipitados de ADN blanquecinos; como probable presencia de sales decantadas por la centrifugación ante la presencia del acetato de sodio.

Este protocolo, 2% CTAB/3,5 M NaCl, fue seleccionado de la literatura consultada (Rathore *et al.*, 2011) por estar referido a la extracción de ADN de zábila. No obstante, en la ejecución del mismo en esta investigación no se utilizaron nitrógeno líquido, fenol, ni ARNasa; por lo que los cambios realizados al protocolo original descrito por Rathore *et al.* (2011) probablemente marcaron las diferencias en los resultados obtenidos en esta investigación.

Entre los protocolos SDS y 2% CTAB/1,4 M NaCl no se observaron diferencias estadísticas para la concentración y rendimiento de ADN; y en ambos casos se visualizó un amplio barrido en el gel de agarosa. Sin embargo, al comparar los valores promedio de la relación de A260nm/A280nm (cuadro 1) se procedió a descartar el protocolo SDS por obtener el valor más distante de los referidos por Gryson (2010), quien estimó el parámetro de pureza del ADN entre 1,5 y 2,0 de A260nm/A280nm.

Considerando que en la mayoría de las referencias consultadas sobre los protocolos de extracción específicos para el género *Aloe*, se destacan aquellos basados en el uso de CTAB/NaCl (Deore *et al.*, 2014; Rathore *et al.*, 2011; Toothman, 1999); y tomando en cuenta los resultados obtenidos en la com-

probablemente marked the differences in the results obtained in this research.

Among the protocols SDS and 2% CTAB/1.4 M NaCl none statistically significant differences were observed for the concentration and performance of DNA, and in both cases a wide sweep in the agarose gel was observed. However, when comparing the mean values of the relationship of A260nm/A280nm (table 1) it was proceeded to dismiss the SDS protocol to obtain the most distant value from those referred by Gryson (2010), who considered the purity parameter of the DNA from 1.5 and 2.0 to A260nm/A280nm.

Considering that in most of the literature consulted on the extraction protocols specific for *Aloe*, highlighted those based on the use of CTAB/NaCl (Deore *et al.*, 2014; Rathore *et al.*, 2011; Toothman, 1999); and taking into account the results obtained in the comparison of the three DNA extracting methods from this study, the protocol 2% CTAB/NaCl 1.4 was selected to determine the leaf tissue area of aloe for its standardization.

#### **Evaluation of different leaf tissue areas of aloe in the standardization of the DNA extracting protocol**

The evaluation of the leaf tissue areas of aloe showed no statistical differences for the variables: concentration, purity and performance of the extracted DNA. However, from a practical point of view it is simpler to use the middle and basal areas by the width of sheet lamina that allows removing the leaf tissue in a single surface (Figure 1e), facilitating the homogenization process and avoiding the DNA degradation. Both areas showed



paración de los tres métodos de extracción de ADN de este estudio se seleccionó el protocolo 2% CTAB/1,4 NaCl para determinar la zona del tejido foliar de zábila para la estandarización.

### **Evaluación de diferentes zonas del tejido foliar de zábila en la estandarización del protocolo de extracción de ADN**

La evaluación de la zonas del tejido foliar de zábila no mostraron diferencias estadísticas para las variables concentración, pureza y rendimiento del ADN extraído. Sin embargo, desde el punto de vista práctico es más sencillo emplear las zonas media y basal por el ancho de la lámina de la hoja que permite extraer el tejido foliar en una sola superficie (figura 1e), facilitando el proceso de homogeneización y evitando la degradación de ADN. Ambas zonas mostraron valores de pureza altos (1,93 y 1,89) (cuadro 2) cercanos a los señalados por varios autores para calificar el ADN de óptima calidad (San Juan *et al.*, 2014; Cerda y Díaz, 2013; Sánchez *et al.*, 2012). Los valores de concentración y rendimiento de ADN resultaron más altos (cuadro 2) que los obtenidos con el protocolo 2% CTAB/1,4% NaCl del primer ensayo de comparación de tres protocolos (cuadro 1).

Con los resultados obtenidos, es indudable que las modificaciones realizadas al protocolo seleccionado (2% CTAB/1,4% NaCl) para disminuir la degradación del ADN fueron acertadas, evidenciándose un incremento en los valores de todas las variables estudiadas independientemente de las zonas del tejido foliar evaluadas.

Entre las modificaciones realizadas en el proceso de extracción de ADN

high purity values (1.93 and 1.89) (table 2) close to those reported by several authors to qualify the DNA of optimal quality (San Juan *et al.*, 2014; Cerda and Diaz, 2013; Sanchez *et al.*, 2012). The concentration values and performance of DNA were higher (table 2) than those obtained with the protocol 2% CTAB/1.4% NaCl of the first comparison test of three protocols (table 1).

With the results obtained, there is no doubt that the modifications made to the selected protocol (2% CTAB/1.4% NaCl) to reduce the degradation of the DNA were right, this shows an increment in the values of all the studied variables independently of the leaf tissue areas evaluated.

Among the changes in the DNA extracting process of aloe, highlights the reduction in the homogenization time of the sample to a few seconds (approx. 5 Sec), which possibly allowed minimizing the factors which lead to the degradation of DNA. Abu Almakarem *et al.* (2012) mention that the nucleic acids generally begin to degrade shortly after the tissue lysis by the release of nucleases, proteases and other degrade molecules; therefore, to minimize the risk factors for the DNA degradation guarantees the quality of the DNA obtained.

Likewise, the replacement of the antioxidants NaSO<sub>3</sub> and PEG by the use of 2-mercaptoethanol and polyvinyl pyrrolidone (PVP 40000) in the extraction buffer solution may have influenced in the control of substances or oxidative molecules that affect the integrity of the DNA. The 2 mercaptoethanol is widely used in the DNA extraction processes as an

**Cuadro 2. Concentración, pureza (A260nm/A280nm) y rendimiento de ADN de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) de la zona apical, media y basal del tejido foliar utilizando el protocolo de extracción de ADN 2% CTAB/1,4 M NaCl.**

**Table 2. Concentration, pureness (A260nm/A280nm) and DNA yield of aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) of the apical, medium and basal area of the foliar tissue using the DNA extraction protocol 2% CTAB/1.4 M NaCl.**

Zona	Variables		
	Concentración de ADN (ng.mL <sup>-1</sup> )	A260nm/A280nm	Rendimiento (ng.mg <sup>-1</sup> )
Apical	198,89 <sup>a</sup>	1,62 <sup>a</sup>	151,94 <sup>a</sup>
Media	185,45 <sup>a</sup>	1,89 <sup>a</sup>	141,29 <sup>a</sup>
Basal	204,67 <sup>a</sup>	1,93 <sup>a</sup>	155,94 <sup>a</sup>

Valores seguidos de letras iguales en la misma columna, no difieren estadísticamente ( $P \leq 0,05$ ) para la prueba de mínima diferencia significativa de Tukey.

para zábila, se destaca la disminución del tiempo de homogeneización de la muestra a unos pocos segundos (aprox. 5 seg), que posiblemente permitieron minimizar los factores que inducen a la degradación del ADN. Abu Almakarem *et al.* (2012) señalan que los ácidos nucleicos por lo general comienzan a degradarse poco después de la lisis del tejido, por la liberación de nucleasas, proteasas y otras moléculas degradativas; por lo tanto, reducir al mínimo los factores de riesgo para la degradación del ADN, garantizan la calidad del ADN obtenido.

Igualmente la sustitución de los antioxidantes NaSO<sub>3</sub> y PEG por el uso de 2 mercaptoetanol y polivinil pirrolidona (PVP 40000) en la solución tampón de extracción, puede haber influenciado en el control de las sustancias o moléculas oxidativas que afectan la integridad del ADN. El 2

efficient antioxidant that inactivates proteins by reducing the disulfides (Velasco, 2005); while the PVP is a detergent that reduces the phenolic compounds (Rocha, 2002). These compounds according to Deore *et al.* (2014) are vacuoles releases during the homogenization process of the sample, and react quickly with cytoplasmic enzymes; therefore, the addition of PVP in the presence of the CTAB can help to eliminate the presence of phenolic compounds by their union through hydrogen links forming a complex; and to some extent these can help eliminate other impurities (Velasco, 2005).

The reduction of the incubation temperature from 74 to 65 minimizes the fragmentation and denaturalization of the DNA; avoiding a hyperchromic effect for not overestimating the reading of

mercaptoetanol es ampliamente utilizado en los procesos de extracción de ADN como un antioxidante eficiente; que inactiva proteínas por reducción de los puentes disulfuros (Velasco, 2005); mientras que el PVP es un detergente que reduce los compuestos fenólicos (Rocha, 2002). Estos compuestos según Deore *et al.* (2014) son liberados de vacuolas durante el proceso de homogeneización de la muestra, y reaccionan rápidamente con enzimas citoplasmáticas; por lo que la adición de PVP en presencia del CTAB pueden contribuir a eliminar la presencia de los compuestos fenólicos por unión a éstos a través de enlaces de los hidrógeno formando un complejo; y hasta cierto punto pueden ayudar a eliminar otras impurezas (Velasco, 2005).

La disminución de la temperatura de incubación de 74°C a 65°C, minimiza la fragmentación y desnaturalización del ADN; evitando un efecto hipercrómico, para no sobreestimar la lectura de absorbancia a 260 nm que se traduce en lecturas erróneas de concentración del ADN extraído (San Juan *et al.*, 2014).

La adición de ARNasa en el protocolo de extracción 2% CTAB/1,4% NaCl para las tres zonas del tejido foliar de zábila evaluado fue apropiado; observándose una banda de ADN de alto peso molecular, nítida y definida en el gel de agarosa; especialmente cuando se utilizó tejido foliar de zábila de las zonas media y basal (figura 2). Igualmente otros autores (Deore *et al.*, 2014; Nayanakantha *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010; Toothman, 1999) han incluido ARNasa en sus protocolos de extracción de ADN específicos para *Aloe* con resultados

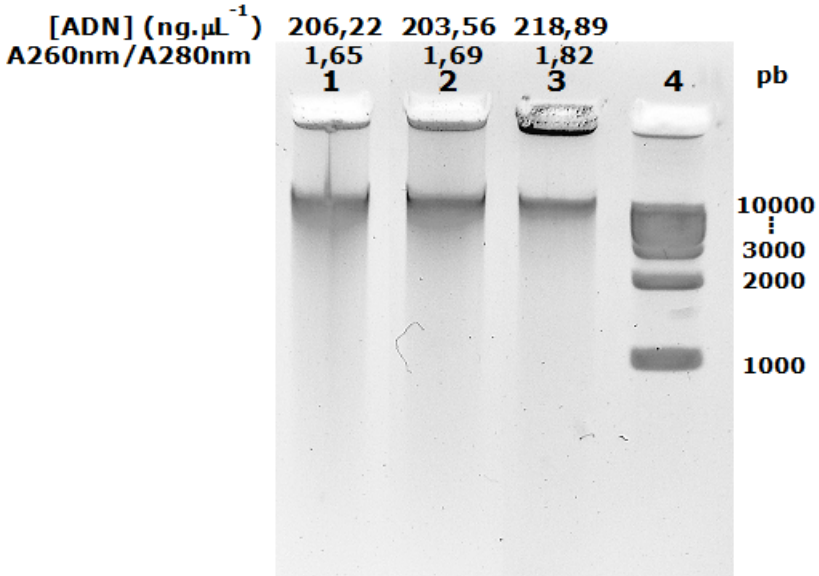
absorbance at 260 nm resulting in erroneous readings of DNA extracted concentration (San Juan *et al.*, 2014).

The addition of ARNase in the extraction protocol 2% CTAB/1.4% NaCl to the three leaf tissue areas evaluated of aloe was appropriate, observing a DNA band with high molecular weight, clear and defined in the agarose gel; especially when using leaf tissue of aloe of the middle and basal areas (figure 2). Likewise, other authors (Deore *et al.*, 2014; Nayanakantha *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010; Toothman, 1999) have included ARNase on their DNA extraction protocols specific for *Aloe* with similar results in terms of increase in concentration, purity and integrity of the extracted DNA.

## Conclusions

The protocol 2% CTAB/1.4% NaCl of DNA extraction standardized for aloe markedly improved the DNA integrity displayed in the agarose gels, the concentration values and the DNA performance, as well as the purity of the DNA by placing the values in optimal ranges; especially for the middle and basal areas of the leaf tissue of aloe.

The reduction in the homogenization time of the samples approximately at 5 sec, the use of antioxidants 2 mercaptoethanol and polyvinyl pyrrolidone 40000 in the extraction buffer solution, the reduction of the time and incubation temperature at 30 min and 65°C, respectively, as well as the use of ARNase allowed the standardization of



**Figura 2.** Electroforesis de ADN genómico de las zonas apical, media y basal del tejido foliar de vitroplantas de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.) extraído por el protocolo 2% CTAB/1,4 mM NaCl estandarizado. Carril 1: zona apical, carril 2: zona media y carril 3: zona basal. El carril 4 contiene el marcador de peso molecular de 1 kb de ADN (Promega). Los valores de concentración y pureza de ADN fueron calculados en base al promedio de 3 muestras.

**Figure 2.** Electrophoresis of genomic DNA from apical, middle and basal areas of the leaf tissue in vitroplants of aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) extracted by the protocol 2% CTAB/1.4 mM NaCl standardized. Lane 1: apical area, lane 2: Middle and lane 3: basal area. Track 4 contains the molecular weight marker of 1 kb of DNA (Promega). The concentration and purity of DNA values were calculated based on the average of 3 samples.

similares en cuanto a incremento de concentración, pureza e integridad del ADN extraído.

### Conclusiones

El protocolo 2% CTAB/1,4% NaCl de extracción de ADN estandarizado para

the protocol 2% CTAB/1.4% NaCl to the DNA extraction of aloe.

### Acknowledgment

The authors thank the Scientific, Humanistic and Technological Board of Universidad del Zuloia (CONDES-

zábila; mejoró notablemente la integridad del ADN visualizado en los geles de agarosa, los valores de concentración y rendimiento de ADN, así como la pureza del ADN ubicando los valores en rangos óptimos; especialmente para las zonas media y basal del tejido foliar de zábila.

La disminución del tiempo de homogeneización de las muestras aproximadamente a 5 seg, el uso de los antioxidantes 2 mercaptoetanol y polivinil pirrolidona 40000 en la solución tampón de extracción, la disminución del tiempo y la temperatura de incubación a 30 min y 65°C, respectivamente, así como el uso de ARNasa permitieron la estandarización del protocolo 2% CTAB/1,4% NaCl para la extracción de ADN de zábila.

## Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el financiamiento otorgado a esta investigación a través del Proyecto VAC-CONDES-0439-14.

## Literatura citada

Abu Almakarem A., K. Heilman, Y. Conger, H. Shtarkman, S. Rogers. 2012. Extraction of DNA from plant and fungus tissues *in situ*. BioMed Central Research Notes 5:266-277.

Albany N., J. Vilchez, S. León, M. Molina, P. Chacín. 2006. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 23:213-222.

Araujo P., J. Duarte, C. Neckel, C. Ianssen, A. Oltramari, R. Dos Pasos, E. Tiepo, D. Bach, M. Maraschin. 2002. Micropropagación de babosa (*Aloe*

LUZ) by the finance provided for this research with the Project VAC-CONDES-0439-14.

## *End of english version*

---

*vera* Liliaceae). Biotecnologia Ciência y Desenvolvimento 25:54-57.

Campestrini L., S. Kuhnen, P. Lemos, D. Bach, P. Dias, M. Maraschin. 2006. Cloning protocol of *Aloe vera* as a study-case for "Tailor-Made" biotechnology to small farmers. Journal of Technology Management Innovation 1:76-79.

Castillo F., A. García, M. Martínez, M. Reyes. 2004. Comparación de tres métodos de aislamiento de ADN en girasol. Revista Agraria Nueva Época 52:24-28.

Cerda D., V. Díaz. 2013. Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinustecumanii*. Encuentro 94:82-92.

Dellaporta S., Wood J., Hicks J. 1983. A plant DNA miniprep: version 2. Original: Plant Molecular Biology Report 1:19-22.

Deore P., S. Samantaray, S. Maiti. 2014. Genomic DNA isolation protocol for *Aloe barbadensis* Miller: Using leaf gel for genetic characterization. International Journal of Scientific and Research Publications 4:1-5.

Doyle J., J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Falcón L., A. Valera. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. Capítulo 16. Quinta Parte: Las herramientas moleculares. p. 499-516. En: Eguiarte L., Souza V. y Aguirre X (Eds.). Ecología molecular. Primera edición. México D.F., México. Editado por el Instituto Nacional de Ecología. ISBN:978-968-817-839-3.

Gilbertson R., M. Rojas, D. Russell, D. Maxwell. 1991. Use of the

- asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. *Journal of General Virology* 72:2843-2848.
- Gryson N. 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396:2003-2022.
- Liao Z., M. Chen, F. Tan, X. Sun, K. Tang. 2004. Micropropagation of endangered Chinese aloe. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76:83-86.
- López P., A. López, M. Marulanda. 2011. Estandarización de la extracción de ADN genómico en *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Okén. *Temas Agrarios* 16:28-41.
- Matos A. 2007. Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. (Zábila). *Ciencia* 15:319-330.
- Méndez C., A. Fariá, F. Osorio, A. Nava. 2010. Evaluation of DNA extraction methods from dried and frozen tomato leaves for detecting begomoviruses by PCR. *Interciencia* 35:823-827.
- Nayanakantha N., B. Singth, A. Gupta. 2010. Assessment of genetic diversity in *Aloe* germoplasm accessions from India using RAPD and morphological markers. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)* 39:1-9.
- Pardo A., C. Michelangeli, C. Ramis, N. Mogollón, C. Silva. 2008. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD, en brotes de *Billbergia rosea* Hortus. Ex Beer, conservados *in vitro*. *Bioagro* 20:97-104.
- Rathore S., J. Chikara, C. Mastan, H. Rahman, K. Anand, N. Shekhawat. 2011. Assessment of genetic stability and instability of tissue culture-propagated plantlets of *Aloe Vera* L. by RAPD and ISSR Markers. *Applied Biochemistry Biotechnology* 165:1356-1365.
- Red Nacional de Biobancos. 2012. Guía de protocolos utilizados para la obtención de ácidos nucleicos en biobancos. En: Orfao A. y R. Pinto (Eds.). Documentos de la Red Nacional de Biobancos. Instituto de salud Carlos III, España. Disponible en: [www.redbiobancos.es/pages/docs/Protocolos\\_extracción\\_ADN.pdf](http://www.redbiobancos.es/pages/docs/Protocolos_extracción_ADN.pdf).
- Roca W., H. Ramírez. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Editado por el Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF), Santo Domingo, República Dominicana. 174 p.
- Rocha P. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas* 23:9-17.
- Romano E., A. Miranda. 1999. Extração de DNA de plantas. *Biotechnology Ciência y Desenvolvimento* 9:40-43.
- Samantaray S., S. Maiti. 2008. Rapid plant generation and assessment of genetic fidelity of *in vitro* raised plants in *Aloe barbadensis* Mill. using RAPD markers. *Acta Botanica Gallica* 155:427-434.
- Sambrook J., D. Russel. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Volumen 1. Tercera edición. Editado por: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA. Apéndice 1.1 7.88.
- San Juan A., A. Galvez, J. Plasencia, M. Quirasco. 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* 48:17-33.
- Sánchez N., M. Luna, M. Vázquez, L. Sánchez, N. Santana, P. Octavio, L. Iglesias. 2012. Optimización de un protocolo del aislamiento del ADN y de un sistema de amplificación ISSR-PCR para *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18:123-133.
- Sánchez N., V. Jiménez. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20:135-151.
- Singh B., R. Yadav, H. Singh, G. Singh, A. Punia. 2010. Studies of effect PCR-



RAPD conditions for molecular analysis in *Asparagus* (Satawari) and *Aloe vera* medicinal plants. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 4:6570-6574.

Toothman P. 1999. Method of identifying *Aloe* using PCR. United States Patent N° 6,001,572. Univera Pharmaceuticals,

Inc., Broomfield, Colorado, USA. Registro US006001572A.

Velasco R. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias 3:14 -8.