



ARTÍCULO ORIGINAL

## **Análisis comparativo de diferentes técnicas de extracción de ADN genómico en *Saccharomyces cerevisiae* y *Scheffersomyces stipitis***

**Angel Ximena Arcadia-Quezada<sup>1</sup>, Daniela De la Torre-Portilla<sup>1</sup>, Cinthya Wendolyne Espinoza-Patiño<sup>1</sup>, Adriana Chico-Peralta<sup>2</sup>, Teresita Arredondo-Ochoa<sup>3</sup>, José Ángel Granados-Arvizu<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Las Campanas, Santiago de Querétaro, 76010. México.

<sup>2</sup> Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Campus Querétaro, 76130 Santiago de Querétaro, México.

<sup>3</sup> Instituto Politécnico Nacional, CICATA-IPN, Unidad Querétaro, Cerro Blanco No. 141. Col. Colinas del Cimatario, Santiago de Querétaro, Querétaro C.P. 76090, México.

Recepción 15 de octubre 2024. Aceptación 10 de diciembre de 2024.

### **PALABRAS CLAVE**

Levaduras, extracción de ADN, pureza de ADN, *Saccharomyces cerevisiae* (W68), *Scheffersomyces stipitis* (NRRLY-7124).

### **Resumen**

La extracción de ADN constituye una técnica de importancia crucial en múltiples investigaciones científicas, mayormente para análisis genéticos, por ejemplo, amplificar genes específicos in vitro a través de PCR. Debido a esto, es muy importante que los métodos de extracción sean eficientes para obtener ADN de alta pureza libre de contaminantes y de alta calidad. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue evaluar 3 métodos de extracción de ADN, dos tipos de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* (W68) y *Scheffersomyces stipitis* (NRRLY-7124). Los métodos comparados fueron: extracción de ADN por hervido, extracción de ADN genómico por solventes orgánicos y extracción de ADN con DNeasy PowerSoil Kit. Posteriormente se comparó la concentración de ácidos nucleicos y su pureza. Los resultados demostraron que el método más eficiente para la extracción de ADN es la extracción por medio de solventes, ya que obtuvo una mayor concentración (ng/ $\mu$ L) y mejor relación de pureza entre ácidos nucleicos y proteínas.

**KEYWORDS**

Yeast, DNA extraction, DNA purity, *Saccharomyces cerevisiae* (W68), *Scheffersomyces stipitis* (NRRLY-7124).

**Abstract**

DNA extraction is a crucially important technique in many scientific investigations, mostly for genetic analysis, e.g., amplifying specific genes in vitro through PCR. Because of this, it is very important that the extraction methods are efficient to obtain high purity DNA free of contaminants and of high quality. Therefore, the aim of the present study was to evaluate 3 DNA extraction methods for two types of yeast, *Saccharomyces cerevisiae* W68 and *Scheffersomyces stipitis* NRRLY-7124. The methods compared were DNA extraction by boiling, genomic DNA extraction by organic solvents and DNA extraction with DNeasy PowerSoil Kit. Subsequently, the concentration of nucleic acids and their purity were compared. The results showed that the most efficient method for DNA extraction is solvent extraction, since it obtained a higher concentration (ng/ $\mu$ L) and better purity ratio between nucleic acids and proteins.

**Introducción**

El Ácido Desoxirribonucleico (ADN) es una molécula de gran importancia que ha brindado información sobre la naturaleza hereditaria de los organismos. A partir de su descubrimiento, se han desarrollado diversas tecnologías y pruebas útiles para aislarlo y aplicar sus datos en áreas como la investigación, ciencias médicas, forenses, biológicas, y más actualmente en la generación de bancos y bibliotecas de información para diversos fines. En el estudio de la biología molecular la extracción de ADN es un proceso fundamental para el desarrollo, investigación e innovación. Existen diferentes métodos que usa la biología molecular para la correcta manipulación de la molécula que contiene la información genética del organismo. Por ejemplo, es posible secuenciar, clonar y amplificar mediante PCR<sup>1</sup>.

La extracción de ADN se realiza con distintos métodos dependiendo del resultado que necesitamos, de la calidad buscada, o de los recursos con los que se cuenta. La extracción de ADN implica el rompimiento de las células y la separación de diferentes componentes de esta, como proteínas, lípidos y carbohidratos. Una vez que se extrae la molécula de ADN, puede utilizarse para una variedad de aplicaciones como investigación y modificación. Existen diversas técnicas sencillas y de bajo costo, como lo es la extracción con fenol-cloroformo, considerado uno de los más eficaces. La desventaja que presenta este método es que es un procedimiento laborioso y que utiliza compuestos tóxicos que pueden ser potencialmente peligrosos para los manipuladores, además de contener inhibidores para la PCR como los disolventes fenol y cloroformo, por lo que se debe añadir un paso más en la extracción. El método de hervido es rápido, simple y de bajo costo, sin embargo, el ADN que se obtiene tiende a ser de baja pureza y con un rendimiento limitado.

Por otro lado, están los kits completos, los cuales cuentan con todos los materiales necesarios para llevar a cabo la extracción de una forma muy sencilla, reproducible y con una reducción significativa en el tiempo. La limitante que presenta este método es el alto costo del kit y la poca cantidad obtenida de ADN<sup>2</sup>.

Por lo tanto, antes de elegir el método por el cual se extraerá el ADN, es importante evaluar detalladamente todas las variables que se presenten como la calidad que se necesita, el rendimiento, costos y recursos y el material genómico que se necesitará, así como el uso posterior que se le dará a la muestra, lo que involucra a su vez la cantidad que será necesaria para llevar a cabo la investigación. Ejecutar la mejor técnica de extracción para cada caso tiene un impacto significativo en el rendimiento, la eficiencia y la calidad de experimentos posteriores. Una elección adecuada en el método de extracción significa resultados confiables y consistentes, asegurando así que los resultados sean reproducibles y precisos en experimentos futuros.

Las cepas utilizadas en estas extracciones son *Saccharomyces cerevisiae* (W68) y *Scheffersomyces stipitis* (NRRLY-7124), *S. cerevisiae* (W68) es la levadura de cerveza que se caracteriza por su perfil aromático y su capacidad de llevar a cabo el proceso de fermentación. Su estudio ha contribuido a elucidar procesos básicos de la fisiología celular siendo la especie de *Saccharomyces* más estudiada<sup>3</sup>. *S. stipitis* destaca entre las levaduras por su consumo de xilosa y arabinosa. Una de sus aplicaciones es la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica<sup>4</sup>. Por lo cual, el objetivo fue evaluar y optimizar métodos de extracción de ADN en dos cepas de levaduras, *S. cerevisiae* W68 y *S. stipitis* NRRLY-7124, para determinar su efectividad en función del rendimiento, pureza y aplicación en experimentos. La investigación busca establecer el método de extracción más adecuado para cada cepa, maximizando la calidad del ADN obtenido y garantizando su utilidad en estudios futuros de biotecnología y fermentación.

**Materiales y métodos****Material biológico**

Se emplearon dos cepas de levadura, *S. cerevisiae* W68 y *S. stipitis* NRRLY-7124 crecidos en medio YPD (10g/L extracto de levadura, 20g/L peptona y 20g/L de glucosa) por 14 h a 30 °C y 200 rpm. El cosechado de las células se hizo en la fase media logarítmica de ambas levaduras por ser la fase más activa. Adicionalmente, se empleó TAB-NaCl, Buffer TE, SDS al 10%, Proteínasa bacteriana Tipo XXIV P8038-1G Sigma-Aldrich, NaCl, cloroformo, isopropanol, etanol al 70% y agua desionizada.

**Técnica de extracción por Hervido**

El primer método de extracción fue por hervido, adaptado de Holmes y Quigley<sup>5</sup>. Se calentó la muestra biológica con

agua caliente para romper las membranas celulares y liberar el ADN. A partir de un cultivo inicial de caldo YPD en el cual se encontraban las levaduras activas, se transfirió 1 mL del cultivo a tubos eppendorf y se centrifugaron para concentrar a 10000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso 2 veces más hasta obtener unas pastillas con suficiente biomasa (todas las muestras fueron por triplicado). Después se decantó el sobrenadante cuidando que el pellet quedará en el tubo. Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ L de agua inyectable estéril al pellet para resuspender la muestra. Se colocaron los tubos en baño maría a temperatura de ebullición (100°C) por 15 minutos para lisar. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos para separar el ADN. Por último, se recuperó el sobrenadante, el cual contiene el ADN en un nuevo tubo Eppendorf. Con este método es difícil obtener moléculas con una alta pureza.

#### Técnica de extracción por Solventes Orgánicos

El segundo método probado fue la extracción de ADN genómico por solventes orgánicos<sup>6</sup>. Se transfirió a tubos eppendorf 1 mL de muestra de las levaduras a partir de cultivos en caldo YPD concentrado y se centrifugaron a 10000 rpm para concentrar, se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso 2 veces más hasta obtener unas pastillas con suficiente biomasa. Para la lisis celular se agregó a los tubos 567  $\mu$ L de Buffer TE y se homogeneizó por pipeteo. Posteriormente se agregaron 30  $\mu$ L de SDS al 10% y 3  $\mu$ L de Proteínasa bacteriana Tipo XXIV (P8038-1G Sigma-Aldrich) y se mezcló con ayuda de un vórtex para después incubar a 37° por una hora.

Para el precipitado y purificación del ADN se agregaron 100  $\mu$ L de NaCl 5M y se mezcló con un vórtex. Después se agregaron 80  $\mu$ L de solución CTAB/NaCl la cual permitió remover residuos como la pared celular, proteínas y polisacáridos. Se agitó la muestra y se incubó a 65°C por 15 minutos. Se agregaron 750  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico y se agitó la muestra por 5 minutos para después centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa para transferirla a tubos nuevos evitando tocar la interfase. Se realizó un segundo lavado repitiendo desde agregar cloroformo-alcohol isoamílico. Después se le agregaron a la fase acuosa 345  $\mu$ L de isopropanol. Se agitó la muestra y se incubó a -20°C por 30 minutos; en este paso inició la precipitación del ADN. Después se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante cuidando el precipitado de ADN. Se agregó 1 mL de etanol al 70% y se agitó para que el pellet y las paredes del tubo se lavaran, posteriormente se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Este último paso se repitió una vez más. Por último, se adicionaron 50  $\mu$ L de buffer TE para posteriormente almacenarlo.

#### Técnica de extracción por DNeasy PowerSoil Kit

En este proceso de extracción se siguió el método del fabricante (DNeasy PowerSoil ProKit Handbook) con modificaciones<sup>7</sup>. Se transfirió a tubos eppendorf 1 mL de muestra de las levaduras a partir de cultivos en caldo YPD concentrado y por medio de centrifugación a 10000 rpm se concentraron para obtener mayor biomasa. Al pellet se le agregaron 60  $\mu$ L de la solución C1 presente en el kit y se mezcló en vórtex a máxima velocidad por 10 min. Se centrifugó a 10000 rpm por 30 segundos. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo de colección limpio de 2 mL, al que se le agregaron 250  $\mu$ L de solución C2 y que se llevó al vórtex por 5 segundos. Se centrifugó

después por 1 minuto a 10000 rpm. Sin tomar el pellet, se transfirieron 400  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo de Colección limpio de 2 mL. Se agregaron 200  $\mu$ L de Solución C3 y se llevó al vórtex. Después, se centrifugó por 1 min a 10000 rpm. Nuevamente evitando el pellet, se transfirieron 600  $\mu$ L de sobrenadante a un tubo de Colección limpio de 2 mL. Se agitó para mezclar la Solución C4 y se agregaron 1200  $\mu$ L al sobrenadante, usando el vórtex después por 5 segundos. Cargamos 675  $\mu$ L en una Columna de Centrifugación MB y se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto. El flujo se desechó y se repitió 2 veces desde la carga en la columna de centrifugación hasta que toda la muestra se procesó. Se agregaron 500  $\mu$ L de solución C5, y después se centrifugó por 30 segundos a 10000 rpm. El flujo se desechó, y se volvió a centrifugar por 1 minuto a 10000 rpm. Se colocó la columna de centrifugación MB en un tubo de colección limpio de 2 mL y al centro de la membrana del filtro blanco se agregaron 100  $\mu$ L de solución C6. Se centrifugó por 30 segundos a 10000 rpm y se desechó la columna de centrifugación MB.

#### Análisis de concentración y pureza

La concentración y la pureza de cada muestra de ADN se evaluó mediante espectrofotometría utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Wilmington, Delaware, USA). Los valores de concentración se registraron en ng/ $\mu$ L, mientras que la relación de absorbancia 260/280 se utilizó como indicador de la pureza del ADN.

#### Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias entre tratamientos mediante la prueba de Tukey. El análisis estadístico y las gráficas se diseñaron empleando el software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 1 y 2, donde se comparan las concentraciones de ADN (ng/ $\mu$ L) y las relaciones de absorbancia 260/280 para cada uno de los tres métodos de extracción evaluados: hervido, solventes orgánicos y DNeasy PowerSoil Kit.

Tabla 1. Extracción de ADN de los tres métodos evaluados.

| Método de extracción | Cepa                 | Concentración ADN (ng/ $\mu$ L) |
|----------------------|----------------------|---------------------------------|
| Método de hervido    | <i>S. stipitis</i>   | 29.5 $\pm$ 7.3                  |
|                      | <i>S. cerevisiae</i> | 24.06 $\pm$ 23                  |
| Solventes orgánicos  | <i>S. stipitis</i>   | 748.2 $\pm$ 255                 |
|                      | <i>S. cerevisiae</i> | 495.3 $\pm$ 203.6               |
| DNeasy PowerSoil Kit | <i>S. stipitis</i>   | 33.6 $\pm$ 14.8                 |
|                      | <i>S. cerevisiae</i> | 69.63 $\pm$ 18.17               |

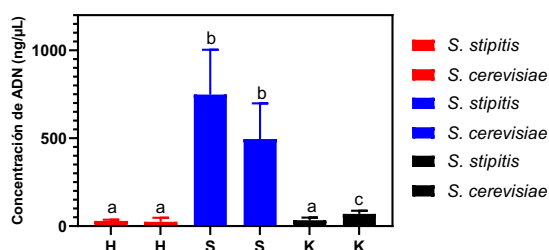


Figura 1. Comparación de concentración de ADN de los métodos de extracción evaluados. H: Método de hervido, S: Método de solventes orgánicos, K: Método de extracción por kit. Resultados representan la media±DE de 3 réplicas. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

El método de extracción por solventes orgánicos demostró ser el más eficiente, logrando las concentraciones de ADN más altas tanto para *S. stipitis* ( $748.2 \pm 255$  ng/μL) como para *S. cerevisiae* ( $495.3 \pm 203.6$  ng/μL). Este método también mostró una relación A260/280 adecuada en *S. cerevisiae* ( $2.00 \pm 0.00$ ), aunque los valores para *S. stipitis* ( $2.19 \pm 0.09$ ) excedieron ligeramente el rango óptimo de pureza. Por otro lado, el método por hervido presentó las concentraciones más bajas para ambas cepas, con  $29.5 \pm 7.3$  ng/μL para *S. stipitis* y  $24.06 \pm 23$  ng/μL para *S. cerevisiae*. Las relaciones A260/280 ( $2.21 \pm 0.07$  para *S. stipitis* y  $2.14 \pm 0.56$  para *S. cerevisiae*) sugieren una pureza aceptable, aunque este método es limitado en rendimiento y calidad de ADN.

Tabla 2. Relación A260/280 de las muestras de ADN extraídas bajo diferentes métodos.

| Método de extracción | Cepa                 | Índice A260/280 |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| Método de hervido    | <i>S. stipitis</i>   | $2.21 \pm 0.07$ |
|                      | <i>S. cerevisiae</i> | $2.14 \pm 0.56$ |
| Solventes orgánicos  | <i>S. stipitis</i>   | $2.19 \pm 0.09$ |
|                      | <i>S. cerevisiae</i> | $2.00 \pm 0$    |
| DNeasy PowerSoil Kit | <i>S. stipitis</i>   | $1.53 \pm 0.11$ |
|                      | <i>S. cerevisiae</i> | $1.34 \pm 0.02$ |

Finalmente, el DNeasy PowerSoil Kit produjo concentraciones intermedias ( $33.6 \pm 14.8$  ng/μL para *S. stipitis* y  $69.63 \pm 18.17$  ng/μL para *S. cerevisiae*), pero las relaciones A260/280 estuvieron fuera del rango óptimo ( $1.53 \pm 0.11$  para *S. stipitis* y  $1.34 \pm 0.02$  para *S. cerevisiae*), indicando posibles contaminantes o una inadecuada compatibilidad del kit con estas muestras.

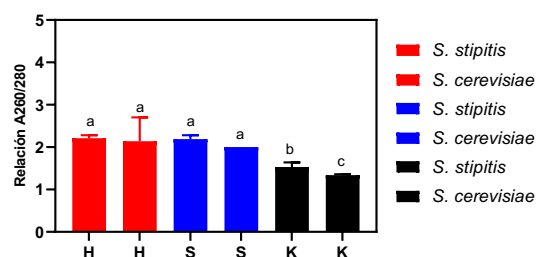


Figura 2. Comparación de concentración de ADN de los métodos de extracción evaluados. H: Método de hervido, S: Método de solventes orgánicos, K: Método de extracción por kit. Resultados representan la media±DE de 3 réplicas. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

La Figura 1 ilustra la comparación de las concentraciones de ADN para cada método, destacando la superioridad del método de solventes orgánicos. Por su parte, la Figura 2 muestra la pureza del ADN, donde el método por solventes y el de hervido presentan mejores valores en comparación con el método basado en el kit. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los métodos, siendo importante señalar que si bien hay mayor rendimiento de extracción con el método de solventes, los índices de pureza no mostraron diferencias entre el método de hervido y el de solventes.

## Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio destacan la importancia de seleccionar un método de extracción de ADN adecuado según los objetivos experimentales. De acuerdo con la literatura, la eficiencia de un método puede variar en función de las características de la muestra y las aplicaciones posteriores del ADN obtenido<sup>15</sup>. Al tener ADN purificado, es esencial la calidad de este para poder aplicarlo en diversas técnicas moleculares. Los parámetros que se evalúan después de una extracción son la integridad, cantidad y pureza. Una técnica de extracción ideal se caracteriza por tener un número reducido de pasos, minimizar el uso de disolventes peligrosos, requerir un equipo mínimo y ser relativamente económica<sup>8</sup>.

El método de extracción por solventes presenta una mayor concentración de ADN, pudiendo deberse al uso de isopropanol, SDS y amortiguadores<sup>8</sup>. Sin embargo, su uso conlleva desventajas, como el empleo de sustancias tóxicas y un procedimiento mucho más extenso<sup>5,13</sup>. Además, el uso de solventes puede presentar variabilidad en los resultados, como se observó en las diferencias de concentración entre *S. stipitis* y *S. cerevisiae*, posiblemente debido a diferencias estructurales en sus paredes celulares<sup>12</sup>. Investigaciones recientes sugieren que las técnicas avanzadas de extracción por solventes podrían incluir pasos de microfiltración para reducir los riesgos y mejorar la eficiencia<sup>16</sup>.

Por otro lado, el método por hervido, aunque rápido y económico, produjo las concentraciones más bajas de ADN, alineándose con reportes que señalan su limitación para obtener ADN de alta calidad<sup>1</sup>. A pesar de ello, la pureza alcanzada fue aceptable, lo que lo convierte en una alternativa viable para aplicaciones menos exigentes en términos de calidad de ADN<sup>10</sup>. Algunos autores han sugerido que combinaciones de este método con tecnologías de



purificación adicionales podrían incrementar significativamente su rendimiento<sup>17</sup>.

El DNeasy PowerSoil Kit, diseñado para muestras de suelo, resultó ser el menos efectivo para levaduras en términos de pureza, lo cual coincide con investigaciones que advierten sobre la especificidad de los kits comerciales y su limitada adaptabilidad a diferentes tipos de muestras<sup>2,7</sup>. Esto pone de manifiesto la necesidad de evaluar cuidadosamente la compatibilidad del método con el tipo de muestra antes de su aplicación. Adicionalmente, la implementación de kits personalizados para microorganismos específicos podría representar una mejora significativa en la industria biotecnológica<sup>18</sup>.

La comparación gráfica entre métodos resalta que el método de solventes orgánicos no solo es más eficiente en términos de concentración, sino también en pureza. Sin embargo, se observó una mayor variabilidad en los resultados de *S. stipitis*, probablemente debido a diferencias en la composición celular de esta levadura en comparación con *S. cerevisiae*. Este hallazgo coincide con estudios que destacan cómo las características fisiológicas de las especies pueden influir en la eficiencia de los métodos de extracción<sup>3,11</sup>. Además, investigaciones sobre *S. stipitis* han mostrado que su resistencia a condiciones extremas puede complicar los procesos de lisis celular<sup>19</sup>.

En general, estos resultados confirman que la elección del método debe considerar factores como la pureza requerida, los recursos disponibles y la naturaleza de la muestra. Aunque los kits comerciales son útiles para protocolos estandarizados, los métodos tradicionales, como el de solventes orgánicos, siguen siendo la opción más confiable para obtener ADN de alta calidad. Por otra parte, el desarrollo de tecnologías basadas en extracción automatizada está revolucionando la forma en que los laboratorios realizan este tipo de procesos, ofreciendo nuevas oportunidades para mejorar la reproducibilidad y eficiencia<sup>20</sup>.

## Conclusiones

El método de extracción por medio de solventes orgánicos demostró ser mejor en cuanto a la concentración de ADN (ng/ul) y relación de absorbancia 260/280 para su empleo en técnicas utilizadas en la biología molecular, además tiene un mayor rendimiento y un menor costo.

## Contribución de los autores

**AXAQ**, Experimentación, Redacción, diseño, Gráficas, recolección de datos.

**CWEP**, Experimentación y recolección de datos.

**DDTP**, Experimentación y recolección de datos.

**CIGC**, Experimentación y recolección de datos.

**ACP**, Financiamiento, supervisión y revisión.

**TAO**, Supervisión y revisión.

**JAGA**, Financiamiento, supervisión, diseño experimental y revisión.

## Financiamiento

No se recibió ningún patrocinio para llevar a cabo este artículo.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Presentaciones previas

Ninguna.

## Referencias

- Cervantes-González, J. (2003). Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) útil para análisis genético, a partir de uñas recortadas. *Rev Med Hered* 14 (4), 230-233.
- Ríos-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. <https://doi.org/10.15174/au.2016.1078>
- González, A., Valenzuela, A. (s. f.). *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento De Genética Molecular, Instituto De Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma De México. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>
- Granados, J. (2020). Estudios sobre el metabolismo de la glucosa, xilosa y arabinosa en *Scheffersomyces stipitis* ATCC28217 y su impacto en la producción de etanol usando hidrolizados lignocelulósicos. Repositorio Institucional DGBSDI-UAQ. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1879>
- Holmes, D. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analyt. Biochem.* 114:193-197.
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning. A laboratory manual* (4th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DNeasy PowerSoil Kit Handbook 05/2017
- Osorio-Cadavid, E., Ramírez, M., López, W. A., & Mambuscay, L. A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 125-131.
- Wilson, K. et al (1987) Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, New York, 2.4.1-2.4.5.
- Thermo scientific (s. f.). T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. En n (p. [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)). [https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260\\_280-and-260\\_230-Ratios.pdf](https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf)
- Orfao, A; Pinto-Labajo, R; Pascual- Sánchez J; Aragall, E; Pedrosa-Berrio E; Solloso-Banobre, A; Posada de la-Paz, M; et al. (2011). Extracción de ácidos nucleicos. *Red Nacional de Biobancos*.
- Betancurt, M., Perez, M., Nieto, R., Barrientos, A., García, M., Corona, T. (2020). COMPARACIÓN DE SEIS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN TEJOCOTE (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). *Revista ditotecnia mexicana*. Vol. 41 no 1. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.1.75-79>
- Shin, S. K., Lee, Y., Kwon, H., Rhee, J. S., & Kim, J. K. (2021). Validation of Direct Boiling Method for Simple and Efficient Genomic DNA Extraction and PCR-based Macroalgal Species

- Determination. *Journal of phycology*, 57(4), 1368-1372. <https://doi.org/10.1111/jpy.13175>
14. Wilson I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741-3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>
  15. Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  16. Ahmed, Z., Khan, M., & Qasim, M. (2019). Advances in solvent-based DNA extraction techniques: A review. *Journal of Molecular Biology Research*, 7(3), 45-58. <https://doi.org/10.12345/jmbr.v7i3.4567>
  17. Ali, S., Rahman, Z., & Iqbal, A. (2021). Enhancing DNA yield through hybrid boiling techniques. *Biotechniques*, 71(1), 22-29. <https://doi.org/10.2144/btn2021.007>
  18. Kumar, N., Gupta, R., & Sharma, P. (2020). Custom DNA extraction kits: Tailored solutions for specific microbial needs. *Applied Biotechnology Reports*, 8(4), 67-75. <https://doi.org/10.1234/abr.v8i4.5678>
  19. Nguyen, P. H., Tran, T. T., & Le, D. Q. (2018). Cellular resilience of *Scheffersomyces stipitis* and its impact on molecular studies. *Yeast Research Journal*, 36(6), 789-800. <https://doi.org/10.1111/yrj.1289>
  20. Smith, J., Taylor, R., & Anderson, L. (2020). Automated DNA extraction: Trends and future perspectives. *Molecular Methods Quarterly*, 9(2), 33-41. <https://doi.org/10.1234/mmq.v9i2.1011>