

Optimización de protocolos de extracción de ADN en *Eucalyptus urograndis*: Evaluación de pureza, rendimiento y costo

**Optimization of DNA extraction protocols in *Eucalyptus urograndis*:
Evaluation of purity, yield and cost.**

**Otimização de protocolos de extração de ADN em *Eucalyptus urograndis*:
Avaliação da pureza, rendimento e custo**

Carranza-Patiño, Mercedes
Universidad Técnica Estatal de Quevedo
mcarranza@uteq.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-0917-0415>



Coello-Cevallos, Wilson José
Universidad Técnica Estatal de Quevedo
wcoelloc@uteq.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0002-3064-239X>



Herrera-Feijoo, Robinson J.
Universidad Técnica Estatal de Quevedo
rherreraf2@uteq.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-3205-2350>



Rivera-Gamarra, Anais Elizabeth
Universidad Técnica Estatal de Quevedo
ariverag@uteq.edu.ec
<https://orcid.org/0009-0002-1224-4638>



Cedeño-Moreira, Ángel Virgilio
Universidad Técnica Estatal de Quevedo
acedenom@uteq.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-6564-5569>



 DOI / URL: <https://doi.org/10.55813/gaea/ccri/v5/n2/599>

Como citar:

Carranza-Patiño, M., Coello-Cevallos, W. J., Herrera-Feijoo, R. J., Rivera-Gamarra, A. E., & Cedeño-Moreira, Ángel V. (2024). Optimización de protocolos de extracción de ADN en *Eucalyptus urograndis*: Evaluación de pureza, rendimiento y costo. *Código Científico Revista De Investigación*, 5(2), 1571–1586. <https://doi.org/10.55813/gaea/ccri/v5/n2/599>.

Recibido: 20/10/2024

Aceptado: 16/11/2024

Publicado: 31/12/2024

Resumen

La extracción de ADN de alta calidad es fundamental para estudios genéticos y biotecnológicos en *Eucalyptus urograndis*, una especie clave en la silvicultura. Este estudio evaluó la eficacia de cuatro protocolos de extracción de ADN: Doyle y Doyle (1990), Dellaporta et al. (1983), CTAB modificado, y PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, con el objetivo de identificar el método más eficiente en términos de rendimiento, pureza y costo. Se recolectaron hojas de *E. urograndis* y se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría y electroforesis en gel. Los resultados indicaron que el protocolo CTAB proporcionó la mayor pureza y cantidad de ADN, demostrando su efectividad en la eliminación de inhibidores. Aunque más costoso y laborioso, se considera la opción más adecuada para aplicaciones avanzadas como la secuenciación genética. Estos hallazgos destacan la importancia de seleccionar el protocolo de extracción de acuerdo con los requerimientos específicos de pureza, cantidad de ADN y costo en investigaciones forestales.

Palabras clave: Inhibidores, Genotipos, Calidad del ADN, Biotecnología, Forestal.

Abstract

High-quality DNA extraction is essential for genetic and biotechnological studies in *Eucalyptus urograndis*, a key species in forestry. This study evaluated the efficacy of four DNA extraction protocols: Doyle and Doyle (1990), Dellaporta et al. (1983), modified CTAB, and PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, with the objective of identifying the most efficient method in terms of yield, purity, and cost. *E. urograndis* leaves were collected and DNA was quantified by spectrophotometry and gel electrophoresis. Results indicated that the CTAB protocol provided the highest purity and quantity of DNA, demonstrating its effectiveness in inhibitor removal. Although more costly and laborious, it is considered the most suitable option for advanced applications such as genetic sequencing. These findings highlight the importance of selecting the extraction protocol according to the specific requirements of purity, DNA quantity and cost in forestry research.

Keywords: Inhibitors, Genotypes, DNA quality, Biotechnology, Forestry.

Resumo

A extração de DNA de alta qualidade é essencial para estudos genéticos e biotecnológicos em *Eucalyptus urograndis*, uma espécie-chave na silvicultura. Este estudo avaliou a eficácia de quatro protocolos de extração de DNA: Doyle e Doyle (1990), Dellaporta et al. (1983), CTAB modificado e PureLink® Plant Total DNA Purification Kit, com o objetivo de identificar o método mais eficiente em termos de rendimento, pureza e custo. As folhas de *E. urograndis* foram recolhidas e o ADN foi quantificado por espectrofotometria e eletroforese em gel. Os resultados indicaram que o protocolo com CTAB proporcionou a maior pureza e quantidade de ADN, demonstrando a sua eficácia na remoção de inibidores. Embora mais dispendioso e trabalhoso, é considerado a opção mais adequada para aplicações avançadas, como a sequenciação de genes. Estes resultados realçam a importância de selecionar o protocolo de extração de acordo com os requisitos específicos de pureza, quantidade de ADN e custo na investigação florestal.

Palavras-chave: Inibidores, Genótipos, Qualidade do ADN, Biotecnologia, Silvicultura.

Introducción

El híbrido *Eucalyptus urograndis*, derivado del cruce entre *Eucalyptus urophylla* y *Eucalyptus grandis*, es ampliamente utilizado en la industria forestal debido a su rápido crecimiento y adaptabilidad a climas tropicales (Marco de Lima et al., 2019). Países como Brasil y China han adoptado *E. urograndis* en plantaciones comerciales por su eficiencia en la producción de pulpa y papel (Fonseca et al., 2018). Además, esta especie se utiliza para la generación de biomasa y productos bioenergéticos, contribuyendo significativamente a la sostenibilidad ambiental (Fernández et al., 2018). La expansión de su cultivo ha permitido un suministro renovable de recursos, lo que ha reducido la presión sobre los bosques nativos y ha fomentado el uso de fuentes renovables (Sharma et al., 2015).

El avance en la biotecnología forestal y el mejoramiento genético de *E. urograndis* dependen de la obtención de ADN de alta calidad, necesario para la implementación de técnicas moleculares avanzadas (Resquin et al., 2020). La presencia de compuestos secundarios, como polifenoles y polisacáridos, complica la purificación del ADN en esta especie (O. A. P. da Silva et al., 2023). Estos compuestos interfieren con la extracción de ADN, afectando su integridad y reduciendo la eficacia de las aplicaciones genéticas avanzadas (Araújo et al., 2018). La extracción de ADN puro es esencial para caracterizar genotipos superiores, lo que mejora la productividad forestal y fomenta el manejo sostenible de la especie (Lear et al., 2018).

Durante las últimas décadas, los investigadores han desarrollado técnicas de extracción de ADN que van desde métodos clásicos, como el uso de fenol-cloroformo (un solvente orgánico utilizado para separar el ADN de los contaminantes), hasta tecnologías avanzadas como las matrices de sílice, que capturan el ADN a través de interacciones químicas específicas (Wang et al., 2021). Sin embargo, la aplicación de estos métodos en *E. urograndis* aún requiere adaptaciones para superar la presencia de compuestos fenólicos, que dificultan la obtención de ADN puro y de alta integridad (Salazar et al., 2013). La optimización de los protocolos de

extracción no solo mejora la calidad del ADN, sino que también facilita el uso de técnicas avanzadas, como la secuenciación de última generación y la edición genética (Healey et al., 2014). Esto resulta crucial para explorar la diversidad genética de *E. urograndis* y mejorar sus aplicaciones biotecnológicas (Agbagwa et al., 2012).

El presente estudio evalúa comparativamente cuatro protocolos de extracción de ADN en *E. urograndis*, incluyendo el protocolo CTAB, conocido por su efectividad en la eliminación de inhibidores (Miguel et al., 2017). Los investigadores buscan identificar el método más eficiente en términos de pureza, cantidad y costo, optimizando el protocolo de extracción para beneficiar tanto la investigación genética de *E. urograndis* como su manejo sostenible (Ludvichak et al., 2022). El objetivo de este estudio es identificar el protocolo de extracción de ADN más eficiente para *E. urograndis*, maximizando la pureza y cantidad de ADN obtenido mientras se optimizan los costos.

Metodología

Localización de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicado en el Campus Universitario “La María”, en el Km 7,5 de la vía Quevedo – El Empalme, Ecuador (latitud 01° 05' 15" S, longitud 79° 29' 56.7" O, 67 m s.n.m.). Las instalaciones del laboratorio están equipadas con tecnología avanzada y condiciones controladas, adecuadas para realizar análisis genéticos de *Eucalyptus urograndis*, permitiendo la ejecución precisa de protocolos de extracción y análisis de ADN.

Tratamientos

Para la extracción y purificación del ADN de *Eucalyptus urograndis*, se evaluaron cuatro protocolos distintos. El protocolo de Doyle and Doyle (1990) es un método clásico que utiliza un buffer CTAB para la lisis de células vegetales, aplicando un volumen de 600 µL y

una incubación a 65 °C durante 30 minutos. El protocolo de Dellaporta et al. (1983) se basa en el uso de SDS (1% final) y proteasas, con una incubación a 60 °C durante 45 minutos para lograr la lisis celular. El protocolo modificado de CTAB incrementó la concentración de CTAB al 3% y añadió 2-mercaptoetanol al 0.2%, con una incubación a 65 °C durante 45 minutos, mejorando la eliminación de inhibidores secundarios presentes en las hojas. Por último, se utilizó el kit PureLink® Plant Total DNA Purification como control, sin modificaciones adicionales, empleando sílice para la captura de ADN.

Manejo del experimento El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado (DCA), con cuatro repeticiones por protocolo, lo cual permitió una comparación estadística precisa de los resultados obtenidos (Ma et al., 2023).

Manejo del experimento

El material vegetal se recolectó de una población de 1000 árboles de *E. urograndis* ubicados en la empresa NOVOPAN. Se seleccionaron aleatoriamente 12 clones de árboles de cuatro años de edad, garantizando representatividad en términos de tamaño y vigor. Las hojas, en estado intermedio de madurez, se recolectaron de las ramas basales, se almacenaron en fundas de papel y se transportaron en condiciones frías (aproximadamente -4 °C) hasta el laboratorio en un plazo máximo de 4 horas. Posteriormente, las hojas se lavaron con agua destilada para eliminar residuos superficiales y se almacenaron a -40 °C en un ultracongelador, preservando la integridad del ADN hasta su procesamiento (Nikitina et al., 2022).

Las muestras de hojas se prepararon de acuerdo con los procedimientos específicos de cada protocolo, ajustando las condiciones de incubación, volúmenes de reactivos y tiempos de tratamiento para minimizar la degradación del ADN durante la extracción y purificación. Este manejo permitió obtener resultados confiables y replicables, alineándose con estudios similares que destacan la importancia de la optimización en la obtención de ADN de calidad (Carey et al., 2023).

Variables evaluadas

La cantidad de ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando un estándar de concentración de 100 pb para comparar la intensidad de las bandas. Se utilizó el software GelAnalyzer 19.2 para estimar la concentración de ADN en cada muestra, calculando la cantidad de ADN extraído a partir de la comparación con el estándar (Kumar et al., 2023).

La calidad del ADN se evaluó visualmente en gel de agarosa al 1%, utilizando una escala de tres niveles: malo, regular y bueno. Las bandas difusas con fragmentación significativa se clasificaron como "malo", mientras que las bandas parcialmente definidas con ligera degradación se consideraron "regular". Las bandas nítidas y completas se calificaron como "bueno". Esta escala se estableció para facilitar una evaluación objetiva de la pureza e integridad del ADN obtenido (Lutz et al., 2023).

Costos por tratamiento

Los costos asociados a cada protocolo se desglosaron en reactivos, consumibles y equipos utilizados durante el proceso de extracción de ADN. Se presentó una tabla comparativa para evaluar el balance costo-eficiencia de cada método, lo que permitió realizar una comparación clara de los resultados obtenidos en términos de costo y rendimiento (Nikitina et al., 2022).

Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza (ADEVA), utilizando la cantidad y calidad de ADN como variables dependientes y los cuatro protocolos como variables independientes. Antes de aplicar el ANOVA, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La prueba de Tukey se utilizó para identificar diferencias significativas entre los tratamientos a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, utilizando el software Infostat (2020) (Ma et al., 2023).

El análisis estadístico se integró con la evaluación de costos, permitiendo una identificación clara del protocolo más equilibrado en términos de rendimiento y costo (Carey et al., 2023).

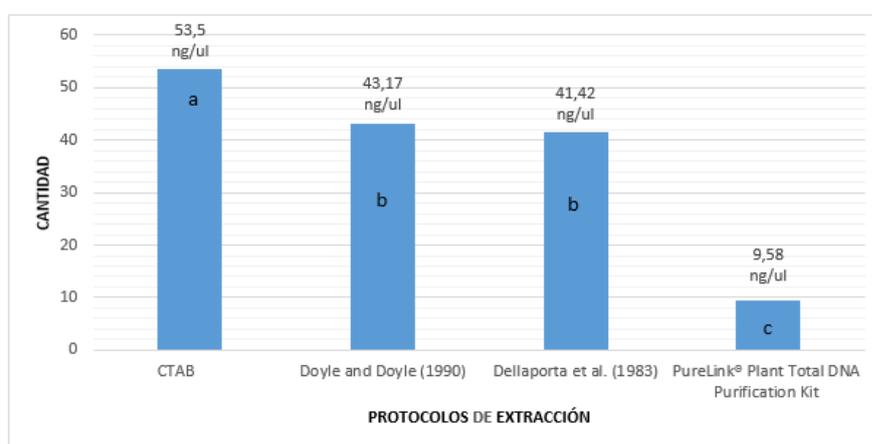
Resultados

1.1. Cantidad de ADN

El protocolo basado en CTAB demostró ser el más eficiente para la extracción de ADN en *E. urograndis*, gracias a su capacidad para eliminar compuestos inhibidores como polisacáridos y polifenoles, presentes en las hojas de esta especie. Este método permitió una mayor recuperación de ADN en comparación con otros protocolos, destacándose significativamente en términos de rendimiento. En contraste, los protocolos de Doyle y Doyle (1990), Dellaporta et al. (1983) y el Kit PureLink® mostraron una menor capacidad para extraer ADN. Las diferencias estadísticas en el rendimiento se señalaron en la figura, con la letra "c" indicando los rendimientos menores y "b" y "c" las diferencias significativas entre grupos (Figura 1)

Figura 1

Comparación de la cantidad de ADN obtenida en diferentes protocolos en clones de *E. urograndis*.



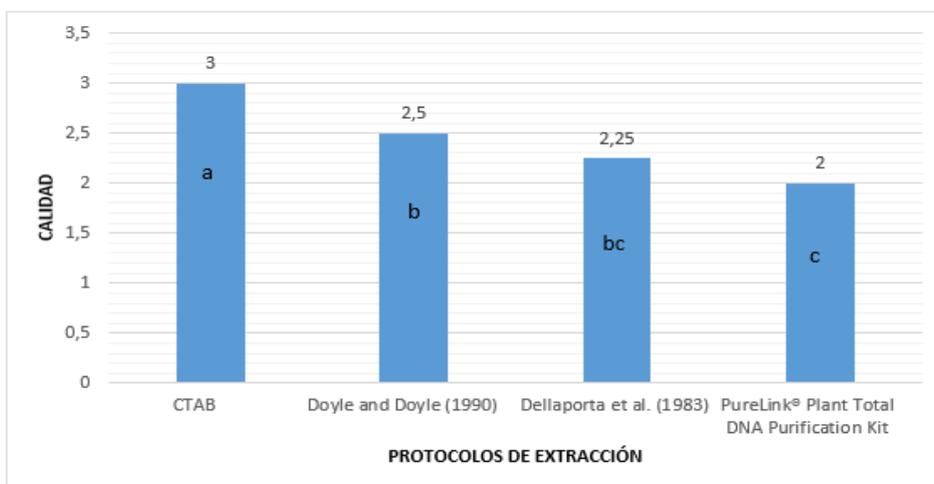
Nota: Las medias con letras iguales no muestran diferencias estadísticas significativas entre ellas, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Autores (2024).

1.2. Calidad de ADN

La calidad del ADN extraído se evaluó utilizando una escala cualitativa de 1 a 3, basada en la observación directa de las bandas en gel de agarosa. El protocolo CTAB, que empleó 1 μ L de RNasa, demostró ser el más efectivo, produciendo ADN de alta pureza adecuado para aplicaciones avanzadas como la secuenciación de próxima generación, sin requerir análisis espectrofotométrico adicional. A pesar de no haberse aplicado esta técnica, la consistencia observada entre la pureza obtenida y la clasificación cualitativa proporciona suficiente evidencia para garantizar la calidad del ADN (Figura 2).

Figura 2

Análisis comparativo de la calidad del ADN obtenido en diferentes protocolos de *E. urograndis*.



Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Autores (2024).

1.3. Validad de protocolos

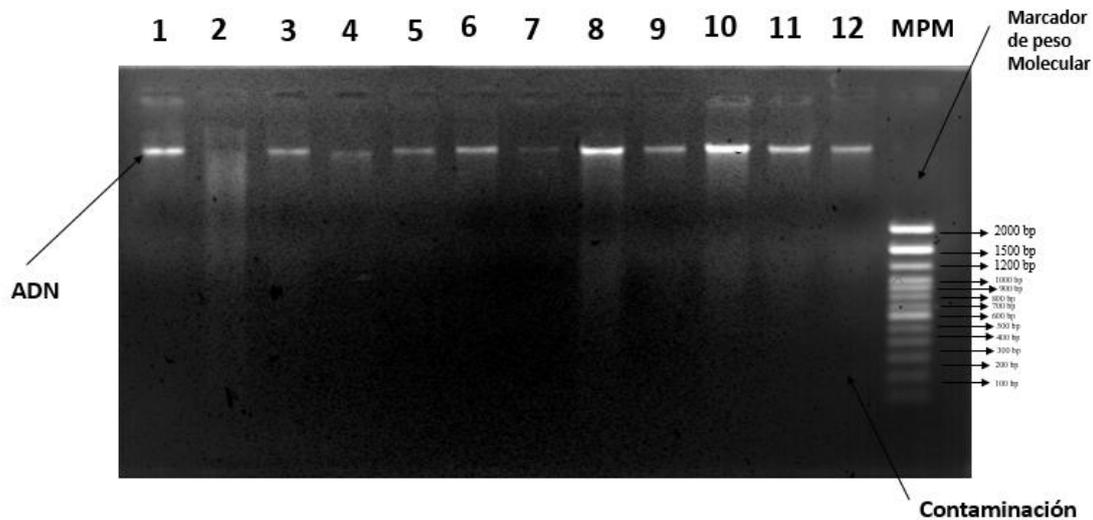
El protocolo de Dellaporta et al. (1983), mostró una eficiencia notable en la extracción de ADN, garantizando tanto la pureza como la cantidad necesaria para aplicaciones avanzadas en biología molecular. Su capacidad para preservar la integridad del ADN, incluso en condiciones que requieren un manejo delicado de los reactivos, lo convierte en una opción confiable para estudios genéticos en los individuos de *E. urograndis*.

No obstante, un enfoque menos riguroso en la etapa de purificación final podría haber permitido la retención de contaminantes secundarios, lo que indica que este protocolo es

particularmente adecuado para aplicaciones donde la obtención de grandes volúmenes de ADN es más crítica que la pureza absoluta del mismo (Figura 3).

Figura 3

Extracción de ADN del método Dellaporta et al. (1983) en doce clones de *E. urograndis*, laboratorio de biología molecular campus la María UTEQ 2024.

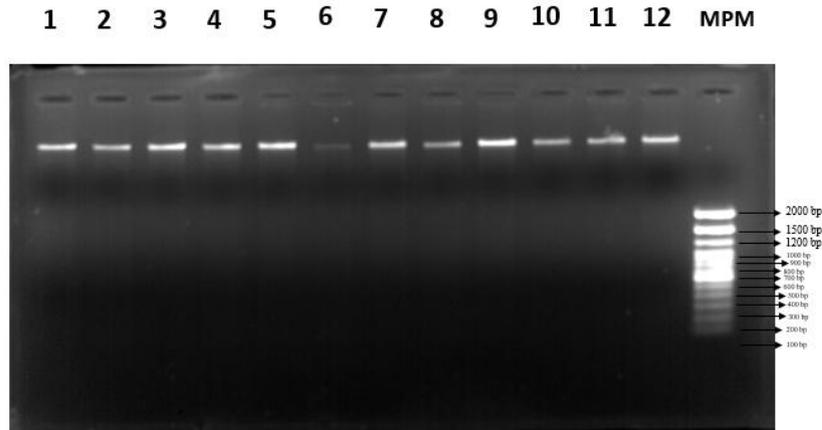


Nota: La imagen muestra un gel de agarosa al 1% con ADN extraído de distintas muestras. Autores (2024).

El protocolo Doyle and Doyle (1990), demostró ser altamente eficiente para la extracción de ADN, especialmente en tejidos vegetales ricos en polisacáridos y polifenoles. Su capacidad para manejar estos compuestos sin afectar significativamente la recuperación de ADN destaca su utilidad en estudios que priorizan la cantidad de material genético. Este método, aunque implica un manejo cuidadoso de reactivos y tiempos de incubación específicos, resultó en una pureza satisfactoria del ADN, lo que lo hace adecuado para aplicaciones en estudios genéticos que requieren fidelidad en la información genética (Figura 4).

Figura 4

Extracción de ADN del método Doyle and Doyle (1990) en doce clones de E. urograndis, laboratorio de biología molecular campus la María UTEQ 2024.

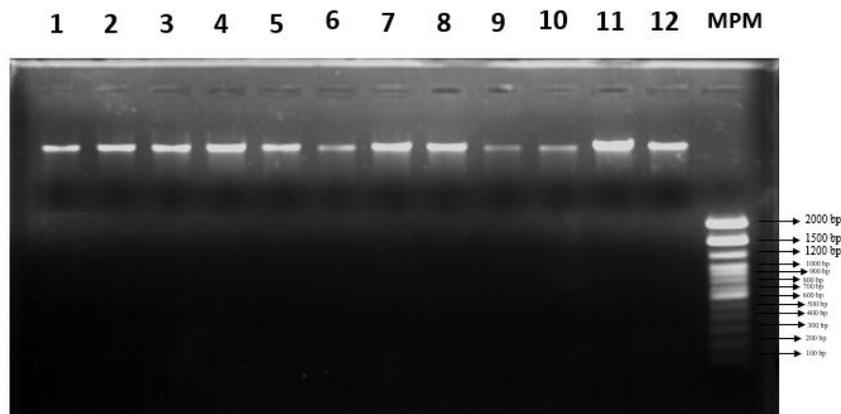


Nota: La imagen muestra un gel de agarosa al 1% con ADN extraído de distintas muestras. Autores (2024).

El protocolo CTAB demostró ser altamente efectivo para obtener ADN de alta pureza en *E. urograndis*, gracias a su formulación que incluye un detergente potente, lo que permite eliminar contaminantes como polisacáridos y proteínas, comunes en las hojas de esta especie. Este método es ideal para estudios avanzados, como la secuenciación de próxima generación (NGS), donde la calidad del ADN es fundamental, consolidándose como una opción confiable debido a la cuidadosa selección de reactivos y el control preciso de las condiciones de extracción (Figura 5).

Figura 5

Extracción de ADN del método CTAB en doce clones de E. urograndis, del laboratorio de biología molecular campus la María UTEQ 2024.



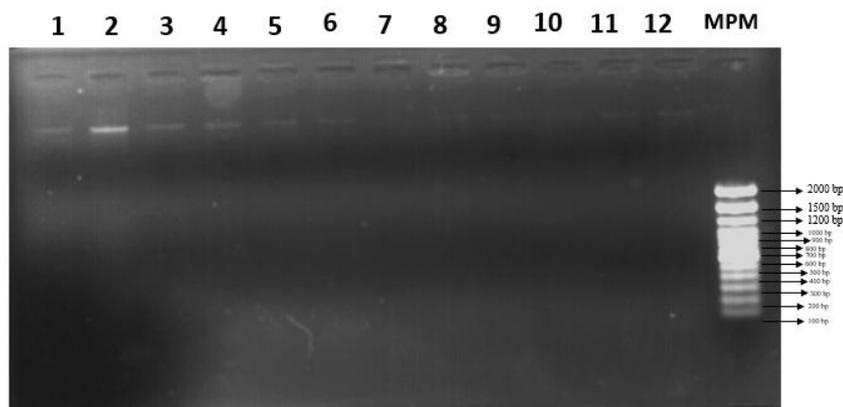
Nota: La imagen muestra un gel de agarosa al 1% con ADN extraído de distintas muestras. Autores (2024).

El protocolo PureLink® demostró ser una opción confiable para la obtención de ADN con alta pureza y consistencia, diseñado específicamente para la extracción rápida y eficiente en muestras vegetales. Este método, basado en el uso de columnas de sílica y tampones optimizados, mostró una capacidad destacada para eliminar contaminantes como proteínas y restos celulares, logrando un ADN adecuado para aplicaciones avanzadas como PCR y análisis genómicos. A pesar de su menor rendimiento en cantidad de ADN comparado con otros protocolos, la estandarización y facilidad de uso del kit lo convierten en una opción ideal para laboratorios que buscan rapidez y reproducibilidad en procesos moleculares.

Este protocolo es particularmente útil en estudios donde la pureza del ADN es prioritaria sobre el volumen obtenido, como los ensayos de marcadores moleculares o las bibliotecas de secuenciación. Sin embargo, su costo elevado lo hace más adecuado para proyectos con un número reducido de muestras o con recursos financieros amplios (Figura 6).

Figura 6

Extracción de ADN del método PureLink® Plant Total DNA Purification Kit en doce clones de E. urograndis, laboratorio de biología molecular campus la María UTEQ 2024.



Nota: La imagen muestra un gel de agarosa al 1% con ADN extraído de distintas muestras. Autores (2024).

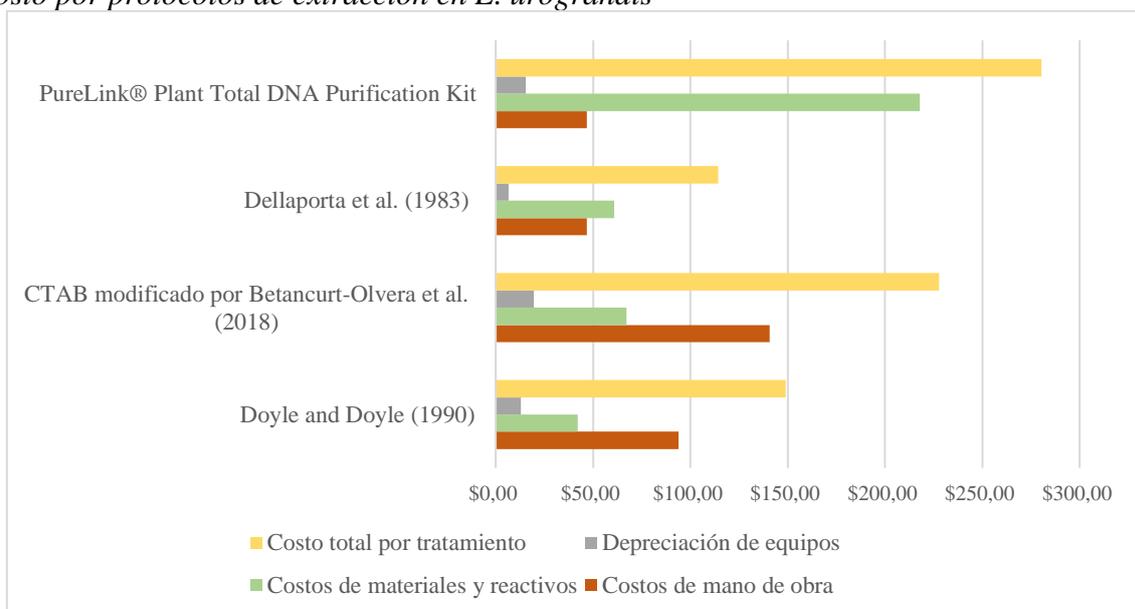
1.3. Determinación de costos

El protocolo de Dellaporta et al. (1983) se destaca como la opción más rentable para la extracción de ADN en *E. urograndis*, con un costo total de \$114.42 USD, haciéndolo ideal para estudios con grandes volúmenes de muestras o recursos limitados. Su bajo costo en reactivos y equipos lo convierte en una alternativa adecuada para investigaciones preliminares

que priorizan la cantidad de ADN sobre su pureza. En contraste, los protocolos CTAB y PureLink® requieren una mayor inversión, pero son preferibles cuando la calidad y precisión del ADN son cruciales, ya que el CTAB ha demostrado ser muy efectivo en la eliminación de contaminantes, garantizando ADN de alta pureza. Por su parte, el PureLink® Kit ofrece rapidez y consistencia, aunque a un costo más elevado. Estos resultados resaltan la necesidad de balancear costo y calidad al elegir el método adecuado según los objetivos específicos y las limitaciones presupuestarias (Figura 7).

Figura 7

Costo por protocolos de extracción en *E. urograndis*



Nota: Autores (2024).

Discusión

Calidad del ADN

El protocolo CTAB modificado demostró una superioridad notable en la obtención de ADN de alta pureza, destacándose por su capacidad para eliminar eficientemente inhibidores como polisacáridos y polifenoles, frecuentes en las hojas de *E. urograndis*. Este resultado está respaldado por estudios como los de Aboul-Maaty y Oraby (2019), quienes demostraron que

la inclusión de β -mercaptoetanol y PVP mejora significativamente la pureza del ADN extraído en especies vegetales ricas en compuestos secundarios (Aboul-Maaty & Oraby, 2019).

La evaluación visual de las bandas en gel de agarosa confirmó una integridad óptima del ADN extraído mediante CTAB, lo que concuerda con investigaciones previas en otras especies, como las de Silva et al. (2023), quienes validaron la eficacia de este protocolo en especies de *Eucalyptus* (Silva et al., 2023). Aunque no se realizaron mediciones espectrofotométricas (A260/A280) en este estudio, los resultados observados coinciden con los de Schenk et al. (2023), quienes validaron el CTAB como una opción confiable para aplicaciones genómicas avanzadas (Schenk et al., 2023).

Cantidad de ADN

El protocolo CTAB destacó por su rendimiento en cantidad de ADN, con una recuperación promedio de 53,5 ng/ μ l, superando significativamente a otros métodos como Doyle y Doyle (1990), Dellaporta et al. (1983) y PureLink®. Este hallazgo es consistente con estudios como el de Sánchez et al. (2021), quienes reportaron ADN suficiente para estudios genómicos avanzados en especies tropicales (Sánchez et al., 2021). Investigaciones adicionales, como las de Guillardín y MacKay (2023), resaltan que ajustes en las concentraciones de CTAB y NaCl pueden optimizar aún más los rendimientos en especies vegetales complejas.

En contraste, el protocolo PureLink® mostró un menor rendimiento, consistente con lo reportado por Bhau et al. (2015), quienes concluyeron que los kits comerciales priorizan la estandarización sobre el rendimiento, limitando su utilidad en estudios de gran escala (Bhau et al., 2015).

Validez de los Protocolos

El protocolo de Dellaporta et al. (1983) se presenta como una opción confiable para investigaciones preliminares que priorizan la cantidad de ADN sobre su pureza. Sin embargo, su incapacidad para eliminar completamente contaminantes limita su aplicabilidad en estudios avanzados. Este comportamiento es similar a lo reportado por Inglis et al. (2018), quienes sugirieron pasos adicionales de purificación para mejorar la calidad en métodos económicos (Inglis et al., 2018).

Por su parte, el protocolo Doyle y Doyle (1990) destacó por su robustez en la extracción de ADN en tejidos ricos en polisacáridos y polifenoles. Healey et al. (2014) sugieren que modificaciones simples, como el uso de prelavados con sorbitol, pueden mejorar aún más la pureza obtenida en este método (Healey et al., 2014).

Análisis Económico

El análisis de costos reveló que el protocolo Dellaporta et al. (1983) es el más económico, con un costo de \$114,42 USD, siendo ideal para estudios con limitaciones presupuestarias. Sin embargo, su baja pureza restringe su uso en aplicaciones avanzadas. El protocolo CTAB, aunque más costoso (\$227,71 USD), ofrece un equilibrio óptimo entre calidad y cantidad, haciéndolo adecuado para investigaciones genómicas críticas (Mavrodiiev et al., 2021). Por su parte, el kit PureLink®, a pesar de su estandarización y rapidez, resulta prohibitivo en estudios con grandes volúmenes debido a su costo elevado (Arseneau et al., 2017).

El protocolo CTAB modificado se consolida como la mejor opción para la extracción de ADN en *E. urograndis*, destacándose en calidad, cantidad y eficiencia económica para aplicaciones avanzadas. Los protocolos de Doyle y Dellaporta, aunque viables en estudios preliminares, presentan limitaciones en pureza que los restringen en investigaciones genéticas más exigentes.

Conclusión

La investigación concluye que, de los cuatro protocolos evaluados para la extracción de ADN en *E. urograndis*, el protocolo CTAB es el más efectivo, destacándose por su capacidad para obtener ADN de alta pureza y en cantidades significativas, gracias a su eficacia en la eliminación de inhibidores como polifenoles y polisacáridos. Aunque los métodos de Doyle and Doyle (1990) y Dellaporta et al. (1983) proporcionaron rendimientos aceptables, no lograron la misma pureza, limitando su utilidad en estudios que requieren ADN de alta calidad. El Kit PureLink®, a pesar de su rapidez y facilidad de uso, produjo una cantidad y calidad de ADN inferior, siendo menos adecuado para aplicaciones genéticas avanzadas. La elección del protocolo debe alinearse con los objetivos específicos de la investigación, priorizando el CTAB para estudios que exigen alta calidad de ADN, mientras que los métodos de Doyle y Dellaporta son opciones viables para estudios preliminares o con limitaciones presupuestarias.

Referencias bibliográficas

- Aboul-Maaty, N., & Oraby, H. A. S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Agbagwa, I. O., Datta, S., Patil, P. G., Singh, P., & Nadarajan, N. (2012). A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. *Genet. Mol. Res*, 11(4), 4632-4639.
- Aguirre, N. (2020). Desarrollo y aplicación de metodologías genómicas para el mejoramiento molecular de *Eucalyptus dunnii* mediante Mapeo por Asociación y Selección Genómica. Universidad de Buenos Aires.
- Araújo, P., Tolentino, F. T., Domingues Junior, A. P., Schimpl, F. C., Feltrim, D., Tofanello, V., Volpi, N., Sobczak, J. C. M. S. M., & Mazzafera, P. (2018). Stem transcriptome of cold stressed *Eucalyptus globulus* and *E. urograndis*. *Trends in Horticulture*, 1(2), 1-20.
- Arseneau, J., Steeves, R., & Laflamme, M. (2017). Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues. *Molecular Ecology Resources*, 17. <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>
- Bhau, B. S., Gogoi, G., & Baruah, D. (2015). Development of an effective and efficient DNA isolation method for *Cinnamomum* species. *Food Chemistry*, 188, 264-270. <https://doi.org/10.18805/IJARE.A-5212>
- Carey, S., Becklund, L., Fabre, P. P., & Schenk, J. J. (2023). Optimizing the lysis step in CTAB DNA extractions of silica-dried and herbarium leaf tissues. *Applications in Plant Sciences*, 11. <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>
- da Silva, O. A. P., Silva, D. B. da, Teixeira-Filho, M. C. M., Silva, T. B., Campos, C. N. S., Baio, F. H. R., Azevedo, G. B. de, Faria, G. A., Teodoro, L. P. R., & Teodoro, P. E.

- (2023). Macro-and Micronutrient Contents and Their Relationship with Growth in Six *Eucalyptus Species*. *Sustainability*, 15(22), 15771.
- Fonseca, E. da S., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Balieiro, F. de C., Tiedje, J. M., & Rachid, C. T. C. da C. (2018). The microbiome of *Eucalyptus roots* under different management conditions and its potential for biological nitrogen fixation. *Microbial Ecology*, 75(1), 183-191.
- Guillardín, E., & MacKay, P. (2023). Advances in CTAB DNA extractions: A high-purity approach for polysaccharide-rich tissues. *Plant Biology Journal*, 15.
- Healey, A., Furtado, A., & Henry, R. J. (2014). Structural genomics of eucalypts. *Genetics, Genomics, and Breeding of Eucalypts*. CRC Press, Boca Raton, FL, 103-120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252011>
- Inglis, P., Pappas, M., Resende, L. V., & Grattapaglia, D. (2018). Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high-quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLOS ONE*, 13. <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>
- Lear, G., Dickie, I., Banks, J., Boyer, S., Buckley, H. L., Buckley, T. R., Cruickshank, R., Dopheide, A., Handley, K. M., & Hermans, S. (2018). Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology*, 42(1), 10-50A.
- Lutz, Í., Miranda, J., Santana, P., Martins, T., Ferreira, C., Sampaio, I., Vallinoto, M., & Gomes, G. E. (2023). Quality analysis of genomic DNA and authentication of fisheries products based on distinct methods of DNA extraction. *PLOS ONE*, 18(2), e0282369.
- Ma, Y., Li, B., Yang, D., Wang, S., Yu, L., Zhan, H., & Li, J. (2023). An optimal genomic DNA extraction method for shoots of four *Dendrocalamus* species based on membership function analysis. *BioTechniques*, 76(3), 94-103. <https://doi.org/10.2144/BTN-2023-0087>
- Mavrodiev, E. V., Dervinis, C., Whitten, W. M., et al. (2021). A new, simple, highly scalable, and efficient protocol for genomic DNA extraction from diverse plant taxa. *Applications in Plant Sciences*, 9. <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>
- Quintana, R. (2020). Análisis de la diversidad genética de tres procedencias de Costa Rica de *Tectona grandis* L. f.(Teca), mediante el empleo de marcadores moleculares RAPD. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Silva, J. do N., Linhares, A. C. dos S., Palmieri, D. A., et al. (2023). Optimized method for DNA extraction and PCR amplification in aroeira tree. *Bioscience Journal*, 39. <https://doi.org/10.14393/BJ-v39n0a2023-62577>
- Wang, Z., Li, L., & Ouyang, L. (2021). Efficient genetic transformation method for *Eucalyptus genome* editing. *PLOS ONE*, 16(5), e0252011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252011>