

Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*

Comparison of two ADN extraction methods from plants belonging *Solanum* genus *Leptostemonum* subgenus.

*Isabel Cristina Cadavid Sánchez**, *Doris Amanda Rosero García**, *Sandra Inés Uribe Soto**

Resumen

Se evaluaron dos métodos para la extracción de ADN en plantas del género *Solanum*, con el fin de obtener ADN disponible y de buena calidad para la obtención de secuencias. El producto comercial DNeasy® Plant Mini Kit se comparó con un método que incluye el uso de una solución tampón de lisis. Para este último método también se evaluó si el rendimiento mejoraba cuando las muestras se maceraron previamente con nitrógeno líquido. Los resultados en términos de calidad (A260/A280) no mostraron diferencias significativas entre los métodos de extracción (índice < 1,5). Sin embargo, se encontraron diferencias en la concentración de ADN obtenida (prueba de Dunnett, $p < 0,05$) y en los porcentajes de amplificación mediante PCR (X^2 , $p < 0,05$). Los mejores resultados, en cuanto al éxito en la PCR (89%), se obtuvieron con el producto comercial, sin embargo la dilución 1:100 de las muestras obtenidas con el método de solución de lisis, permitió obtener resultados de PCR comparables. La maceración de las muestras con nitrógeno líquido, también mejoró el rendimiento (éxito de PCR) del método con solución de lisis. Se propone este método como una alternativa costo-efectiva para la extracción de ADN a partir de plantas del género evaluado, con base en los resultados obtenidos.

Palabras clave: extracción, ADN, planta, solución tampón, PCR.

Abstract

Two methods were evaluated for ADN extraction in plants belonging to the *Solanum* genus. The objective was to isolate adequate ADN amount and of enough quality for obtaining sequences. The commercial product DNeasy® Plant Mini Kit was compared with a method that includes a lysis buffer. For the last method it was also evaluated the improvement when samples were previously macerated with liquid nitrogen. The quality results (A260/A280) did not show significant differences between the extraction methods (index < 1.5). However, there were differences in the ADN concentration obtained (Dunnett test, $p < 0.05$) and in the PCR amplification percentages (X^2 , $p < 0.05$). The best results, in terms of success in PCR (89%) were obtained with the commercial product, however the PCR with 1:100 dilution of extracted ADN using the buffer lysis method achieve comparable results. Grounding the samples with liquid nitrogen with this method, also upgraded the PCR results. Based on the results in this study the lysis buffer method is proposed as a cost-effective alternative for ADN extraction in plants belonging to the evaluated genus.

Key words: ADN, extraction, plant, Buffer solution, PCR.

Recibido: febrero 15 de 2013

Aprobado: noviembre 20 de 2013

* Ingeniera Biológica, MSc. Ciencias-Biotecnología, isacadavid9@gmail.com **Microbióloga y Bioanalista, MSc., estudiante de Doctorado, roserodoris@hotmail.com ***Ingeniera Agrónoma, MSc., PhD., suribesoto@gmail.com
Grupo de Investigación en Sistemática Molecular-GSM, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Introducción

En las plantas (Reino Plantae), el género *Solanum* es uno de los más diversos de la familia Solanaceae, con aproximadamente 1.500 especies (Weese y Bohs, 2007). Dentro de este género se encuentra el subgénero *Leptostemonum* conocido como “spiny *Solanum*” o *Solanum* con espinas, en el que se incluyen plantas caracterizadas por poseer espinas en hojas y tallos, con un número estimado de 350 a 450 especies (Levin et al., 2006).

Entre las especies de este subgénero se encuentran algunas de importancia económica en la industria alimenticia y medicinal, relacionada con propiedades antitumorales, antioxidantes y antimicrobianas (Chah et al., 2000; Kuo et al., 2000; Medina et al., 2009). En este grupo de plantas también se reconocen plantas hospederas o fuentes de alimento de algunas mariposas con las cuales establecen relaciones ecológicas de importancia en estudios evolutivos (Giraldo y Uribe, 2010a, 2010b).

A pesar de la importancia de muchas de las especies del subgénero *Leptostemonum* y de la relevancia de su adecuada identificación, su taxonomía es relativamente poco conocida y estudiada, lo que se relaciona con la gran variación morfológica y la poca disponibilidad de taxónomos especializados en el grupo (Spooner et al., 2001; Miz et al., 2008; Yousaf et al., 2010). En este sentido se considera que el uso de caracteres moleculares, podría contribuir considerablemente en el conocimiento y separación de las especies del género *Solanum* de forma rápida, económica y acertada. La obtención de ADN de buena calidad y en cantidad adecuada para la realización de procedimientos moleculares, es un aspecto fundamental para el éxito de cualquier iniciativa que apunte a la identificación molecular de especies, como la que se adelanta con gran éxito para animales (Fazekas et al., 2009) y avanza para plantas (Hollingsworth et al., 2009). Esta iniciativa es conocida como “código de barras genético de especies o BARCODE” (Ausubel et al., 2002; Hebert et al., 2003).

Para el género *Solanum*, el protocolo de extracción de ADN reportado en la literatura corresponde al basado en Bromuro de Cetilmetilamonio (CTAB) de Doyle y Doyle (1987) el cual se ha utilizado con buenos resultados en la extracción de ADN de otros géneros de la familia Solanaceae y también en especies de la familia Juncaceae (Drabkova et al., 2002; Weese y Bohs, 2007; Turci et al., 2010). Este método de extracción aunque aún se utiliza de rutina en muchos laboratorios, hace uso de solventes orgánicos como el cloroformo, generando un riesgo relativo para la salud humana

y el ambiente principalmente por las dificultades para su eliminación (Valter de Oliveira et al., 2009; Niu et al., 2010).

Productos comerciales para la extracción de ADN como el DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) son útiles y recomendados para obtener y amplificar ADN de plantas aunque con mayores costos (Drabkova et al., 2002; Vural, 2009). Otros métodos como los llamados caseros que incluyen maceración y soluciones de lisis como el detallado por Collins et al. (1987), son económicos y exitosos para la obtención de ADN y han sido usados en organismos como los insectos (Gómez et al., 2009; Marín et al., 2012). Sin embargo, no se conoce el uso de este método para la extracción de ADN a partir de plantas y sería importante evaluar su utilidad en relación con algunas dificultades reportadas en métodos similares, para remover polisacáridos presentes en las plantas lo que puede afectar la calidad del ADN y disminuir el éxito de amplificación por PCR.

En el presente estudio se evaluó para las plantas *Solanum* con espinas, la efectividad en la extracción de ADN con calidad para PCR, del método de Collins et al. (1987) en comparación con el método comercial DNeasy® Plant Mini Kit. El objetivo de este estudio fue seleccionar el mejor método de extracción de ADN para este grupo de plantas, en términos de eficiencia, costos y que representara un bajo riesgo para la salud y el medio ambiente. Es de interés de los autores implementar el método seleccionado en estudios de taxonomía y sistemática del género *Solanum*, incluyendo además de los genes estudiados aquí, otros que se encuentran en evaluación de acuerdo a su utilidad taxonómica en el grupo.

Materiales y métodos

Material vegetal y preparación

Se procesaron en total nueve plantas del subgénero *Leptostemonum*: dos ejemplares de *Solanum torvum* y uno de *Solanum hirtum*, dos de *Solanum jamaicense*, tres de *Solanum pseudolulo* y uno de *Solanum viarum*. La identidad de las plantas se verificó usando claves taxonómicas (Whalen et al., 1981) y por comparación con especímenes del herbario MEDEL de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, y verificación con el especialista. Los especímenes se depositaron como colección de referencia en el mismo herbario MEDEL. Se utilizó como fuente para la extracción de ADN el tejido foliar de los nueve especímenes y se evaluó si existían diferencias al usar tejido fresco y/o seco.

La cantidad de material vegetal usada fue 0,1 g cuando se encontraba fresco y 0,02 g seco, cantidad que recomienda el producto comercial DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA.). Se procesó el tejido fresco almacenado a temperatura ambiente y el tejido seco, previamente se sometió a una temperatura de 40 °C en un horno durante tres días según recomendación del herbario.

Extracción de ADN

Método comercial, DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN). Se siguió el procedimiento indicado por la casa comercial, el cual incluyó una resuspensión final de la muestra en buffer AE (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). La muestra se almacenó a -20°C.

Método Collins et al. (1987) con base en solución tampón de lisis. Se agregó 400 uL del tampón de lisis (0,08 M NaCl, 0,16 M sucrosa, 0,06 M EDTA, 0,5% SDS, 0,1 M Tris-CL, pH 8,6) a la muestra y se homogenizó en un vial de 1,5mL. Se incubó a 64°C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó 56 uL de acetato de potasio 8 M para la precipitación de proteínas. Se incubó durante 60 minutos a -20°C. Después de la incubación se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 min, para luego remover el sobrenadante y pasarlo a un tubo nuevo. A éste se le adicionó 100 uL de etanol al 100% y se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 min. Después de descartar el sobrenadante, se adicionó 100 uL de etanol al 75%, el producto final se secó y se resuspendió en 100 uL de agua ultrapura. El producto de ADN fue tratado con un uL de RNAasa (Fermentas®) a 37°C durante 60 min. Finalmente la muestra se almacenó a -20°C.

Método de Collins et al. (1987), modificado. Se adicionó un paso inicial de maceración de la muestra con nitrógeno líquido, posteriormente, la muestra pulverizada se sometió a los pasos descritos en el método de Collins et al (1987). El producto final se trató con un uL de RNAasa (Fermentas®) a 37°C durante 60 min. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta la cuantificación del ADN y la realización de la PCR.

Evaluación de la calidad y cantidad de ADN

Se verificó la extracción del ADN genómico mediante una electroforesis con gel de agarosa al 0,8%, usando TBE 1 X (Tris-Borato-EDTA) y el colorante EZ-vision® (Amresco Inc., USA). Se corrió a 80 V, durante 45 min. Adicionalmente el ADN se cuantificó en un NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) obteniendo los datos de concentración de ADN en ng/uL y la relación de absorbancias 260/280 nm como índice de la calidad.

Finalmente la calidad del ADN extraído se verificó a través de la amplificación de dos regiones del ADN cloroplastídico. El espaciador intergénico del *trnH-psbA* se amplificó usando los oligonucleótidos *psbA* (5´GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3´) y *trnH*^{GUG} (5´CGCGCATGGTGGATTACAATCC 3´) (Hamilton, 1999) y el siguiente perfil térmico: 80 °C por 5min, (94 °C por 30 s, 56 °C por 40 s, 72 °C por 1 min) por 35 ciclos, 72 °C por 10 min. La segunda región amplificada fue el intrón *trnL*, usando los oligonucleótidos *tab c* (5´CGAAATCGGTAGACGCTACG 3´) y *tab d* (5´GGG-GATAGAGGGACTTGAAC 3´) (Taberlet et al., 2007) y el perfil térmico de PCR: 95 °C por 10 min, (95 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, 72 °C por 2 min) por 35 ciclos.

Para la amplificación de las dos regiones se utilizó un volumen final de 50 uL y concentraciones constantes de otros componentes: 2 mM de MgCl₂, 1 X de Buffer, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 uM de cada primer, 0,4 uL de Taq polimerasa a 5 U/uL (Fermentas®) y un uL de ADN. Se usó como control positivo, una muestra de ADN extraída con DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN), para la cual se obtuvo resultados positivos en las amplificaciones previas. Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% usando 5uL de la muestra y EZ-vision® como colorante, se corrió a 70 V durante 45 min. Los tamaños de las bandas fueron analizados mediante comparación con el marcador de peso molecular, Generuler 100pb (Fermentas®). Las reacciones de amplificación se repitieron dos veces, una en el año 2010 y otra en el año 2012 con el fin de verificar la reproducibilidad de los experimentos.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS para Windows, versión 15 (SPSS Inc., 2008). Para cada uno de los métodos de extracción, se calcularon las medias y desviaciones estándar (DS). Para identificar el método que presenta diferencias significativas en la concentración y calidad de ADN se utilizaron las pruebas de Tukey y Dunnet (Miller, 1996). Para el análisis de las amplificaciones de los marcadores *trnH-psbA* y *trnL* se determinó el porcentaje de éxito y se utilizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para establecer si existían diferencias significativas entre los porcentajes obtenidos (Halos et al., 2004).

Resultados y discusión

Se logró la extracción de ADN con calidad para PCR a partir de muestras frescas y secas de plantas del género *Solanum* (tabla 1). Estos resultados son impor-

tantes teniendo en cuenta que para la ejecución de estudios con marcadores moleculares y en particular con secuencias, uno de los métodos más usado en la actualidad, es importante contar con ADN de buena calidad y cantidad. Además la realización de dichos estudios incluye muestras frescas provenientes del campo o muestras secas como las disponibles en los herbarios o procesadas para conservación. En la actualidad el éxito de iniciativas mundiales como la del código genético de barras para identificar plantas, depende del ADN con el cual se inicia el proceso de identidad molecular para el material vegetal, en particular si se considera que algunos compuestos polifenólicos, azúcares de cadenas largas y otros metabolitos secundarios pueden afectar el proceso de extracción y amplificación de las regiones de interés en algunas plantas (Zhu *et al.* 2006).

Los geles de verificación de las extracciones mostraron productos de ADN de buena calidad y sin degradación (figura 1). En general, para una misma muestra no se observó diferencias entre los protocolos, sin embargo, para una muestra procesada con el método de Collins *et al.* (1987), se obtuvo una banda más fuerte cuando se maceró con nitrógeno líquido que cuando éste no se usó, lo cual indica, que este procedimiento adicional podría mejorar los resultados como se observó al realizar lo mismo en un mayor número de muestras. Estudios previos en plantas, mostraron que el uso del nitrógeno líquido puede mejorar los resultados de la extracción (Dellaporta *et al.*, 1983), razón por la cual se implementó esta fase en el método de extracción.

Al aplicar la prueba de Tukey, los resultados obtenidos en la concentración de ADN en ambos métodos

no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) (tabla 1), lo cual indica que en todos los casos fue posible obtener buena cantidad de ADN, independiente del estado de la muestra. Al comparar los resultados mediante la prueba de Dunnett, en donde se utilizó como control el resultado con el método comercial, aunque se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) y mayores concentraciones de ADN para el método de Collins *et al.* (1987) (tabla 1), no se encontraron diferencias en cuanto a la relación A260/A280 ($P > 0,05$). Es importante resaltar que la relación A260/A280 fue < 1.5 (tabla 1) para los métodos evaluados, sugiriendo la probable presencia de contaminantes, tales como proteínas (Manning, 1991). En algunos casos fue necesario diluir la muestra a 1:100 para realizar la PCR, debido a la alta concentración del ADN en la muestra y a la posibilidad de inhibidores de la PCR (tabla 1).

En cuanto a la evaluación mediante PCR se usó la amplificación de dos regiones como un indicador de la concentración y la calidad del ADN extraído. En este análisis se encontraron diferencias significativas entre los métodos para los valores de las amplificaciones (χ^2 , $P < 0,05$). El mayor porcentaje de éxito en la amplificación de la región intrón *trnL* se obtuvo con el método comercial (89%) seguido por el método de Collins *et al.* (1987) (78%) partiendo de la muestra fresca y macerada con nitrógeno líquido (tabla 2). Para la región *trnH-psbA* se obtuvo el mismo resultado en ambos métodos (78%). Los resultados obtenidos con el método comercial fueron similares a los obtenidos en otros estudios (Drabkova *et al.*, 2002; Vural, 2009), los cuales demostraron que este método produce ADN

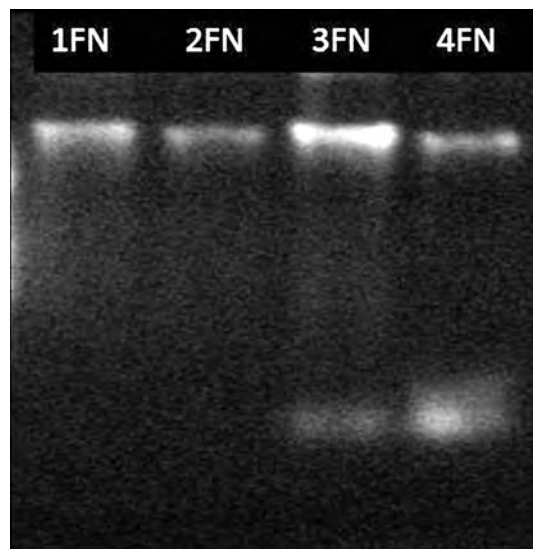


Figura 1. Productos de extracción de ADN (5 μ L) usando el método de Collins *et al.* (1987). Códigos de las muestras: 1, 2, 3, 4. FN: muestra fresca macerada previamente con nitrógeno.

Tabla 1. Cuantificación del ADN extraído.

Método	Concentración ng/ul (260nm) Valor mínimo-valor máximo	μ (\pm DS)	Índice de calidad (260/280) Valor mínimo-valor máximo	μ (\pm DS)
C-S	185,98 - 457,1	356,1 a (\pm 90,3)	1,02- 1,37	1.22 a (\pm 0.12)
C-F	126,04- 523,9	358,5 a (\pm 148,8)	1,14-1,65	1.32 a (\pm 0.2)
C-F-N	143,44-851,6	421,2 a (\pm 238,9)	0,52- 1,72	1.27 a (\pm 0,39)
C-S-N	109.03- 436,21	278,3 a (\pm 110,8)	1,09 - 1,48	1.27 a (\pm 0.14)
K-F	21,89- 65,87	43,9 b (\pm 15,6)	1,06-1,55	1.30 a (\pm 0.2)
K-S	41,09-119,69	68,1 b (\pm 25,6)	0,83-1,25	1.07 a (\pm 0.12)

Métodos: C: método de Collins *et al.* (1987), K: kit DNeasy, N: muestra macerada con nitrógeno líquido. Muestra: S: hoja seca, F: hoja fresco. Valores promedios (μ) acompañados por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$).

Tabla 2. Porcentaje de muestras con amplificación de las regiones intrón *trnL* y *TrnH-PsbA*.

Método	Total amplificaciones intrón <i>trnL</i> <i>n</i> =9	% Amplificación	Total amplificaciones <i>TrnH-PsbA</i> <i>n</i> =9	% Amplificación
C-S	6	67	1	11
C-F	6	67	3	33
C-F-N	7	78	7	78
C-S-N	6	67	1	11
K-F	8	89	7	78
K-S	6	67	5	55

Métodos: C: método de Collins *et al.* (1987), K: kit DNeasy, N: muestra macerada con nitrógeno líquido. Muestra: S: hoja seca, F: hoja fresco.

de buena calidad para obtener productos de PCR. Es importante tener en cuenta que la valoración del método de extracción a través de este parámetro es una de las más importantes (Ausubel *et al.*, 2002), razón por la cual el hecho de obtener productos por PCR a partir de muestras de ADN procesadas con el método casero, permite demostrar la utilidad de este método en plantas. Además, al comparar los métodos evaluados en términos de costos de los reactivos, los valores aproximados para cada método son, con el método comercial de QIAGEN 10.000 COP y con el método de Collins *et al.* (1987) 1 COP, por cada muestra. Los reac-

tivos requeridos para la preparación de las soluciones de trabajo del método casero son mucho más económicos en comparación de los costos del kit comercial, lo que hace que este método sea más asequible.

Los resultados obtenidos para la región intrón *trnL*, utilizando muestras extraídas con el método Collins *et al.* (1987), indicaron disminución en el éxito de PCR en el tiempo, mientras que con el método comercial los resultados se mantuvieron estables. Esto puede deberse a que estas últimas muestras fueron almacenadas en buffer AE, suministrado en el producto comercial,

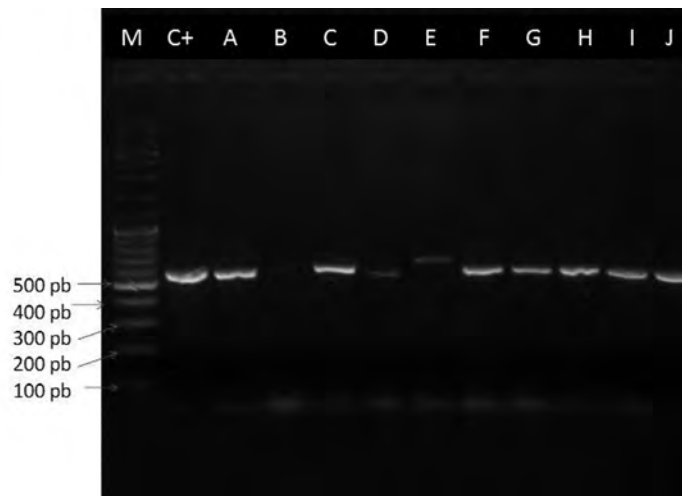


Figura 2. Productos de amplificación del marcador *trnH-psbA*, ADN obtenido con el método de Collins *et al.* (1987) usando muestra fresca macerada con nitrógeno líquido. Gel de agarosa al 1,2%. Carriles: M: Marcador de peso molecular de 100 pb. C+: Control positivo. A-J: Códigos de las muestras.

el cual protege a las muestra de la degradación por ADNasas y mantiene el pH constante, brindando mayor estabilidad de la muestra en el tiempo. Debido a que las muestras con el método Collins *et al.* (1987) se resuspendieron en agua, se recomienda el uso de buffer TE para trabajos que requieran almacenar muestras de ADN por largos periodos de tiempo (Micklos y Freyer, 2003). Por otro lado, se observó que para algunas muestras procesadas con el mismo protocolo, la amplificación de la región intrón *trnL* tuvo mejores resultados que la región *trnH-psbA*. Esto puede tener relación con el diseño de los oligonucleótidos de la región *trnH-psbA* que al no ser específicos del grupo de estudio, no permitieron obtener mejores resultados que los observados.

Finalmente, se sugiere con base en los resultados que el método de Collins *et al.* (1987) permite obtener productos deseables en la extracción de ADN, con buena cantidad a un menor costo y sin riesgos para la salud. El mayor rendimiento en la amplificación de regiones por PCR se obtuvo al macerar la muestra con nitrógeno líquido y diluir los productos de la extracción (figura 2). Por lo tanto este método se recomienda para el estudio taxonómico y sistemático de plantas del género *Solanum*.

Conclusión

Se usó con éxito el producto comercial DNeasy® Plant Mini Kit para extraer y amplificar ADN de plantas del subgénero *Leptostemonun*. Así mismo se encontró que el método de Collins *et al.* (1987) nunca antes utilizado en plantas en Colombia, permitió obtener resultados comparables en extracción y amplificación. A

partir de muestras secas o frescas y pequeñas cantidades de tejido (0,02g - 0,1g) se obtuvo entre 278,3 ng/uL y 421,2 ng/uL de ADN y se amplificaron fragmentos de las regiones del espaciador intergénico *trnH-psbA* e intrón *trnL*. La maceración con nitrógeno líquido y la muestra fresca mejoraron los resultados. A pesar de que los datos obtenidos sugieren mejores resultados para el método comercial, el método de Collins *et al.* (1987) es más económico, produce ADN de buena calidad, y un mínimo riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Por esta razón se seleccionó para los trabajos de la línea de taxonomía molecular del grupo de investigación.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigaciones DIME Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, proyecto código Quipú- 2010100954 por la financiación. y al Grupo de Investigación en Sistemática Molecular. A Jorge Mario Vélez del Herbario de MEDEL de la Universidad Nacional de Colombia, por la colaboración en la identificación del material vegetal.

Referencias bibliográficas

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 2002. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Hoboken. NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Chah, K.F., Muko, K.N., Oboegbulem, S.I. 2000. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. *Fitoterapia*. 71: 187-189.
- Collins, F.H., Mendez, M.A., Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Bensansky, N.J., Finnerty, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe

- differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 37: 37.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant ADN miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1, 19–21.
- Doyle, J. 1987. A rapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 19: 11–15.
- Drabkova, L., Kirschner, J.A.N., Vlček, Ā. 2002. Comparison of seven ADN extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*. 20: 161–175.
- Giraldo S, C.E., Uribe S, S.I. 2010a. *Solanum hirtum* as a host plant for *Mechanitis menapis menapis* (Lepidoptera: Ithomiinae) in Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 36: 169–171.
- Giraldo S, C.E., Uribe S, S.I. 2010b. Registro de *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Ithomiinae) en *Solanum jamaicense* y ciclo de vida en laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*. 36: 165–168.
- Gómez, L.M., Giraldo, C., López, A., Uribe, S. 2009. Diferenciación morfológica y molecular de *Oleria makrena* (Hewitson) y *Oleria fumata* (Haensch) (Lepidoptera: Ithomiinae); Molecular and morphological differentiation of *Oleria makrena* (Hewitson) and *Oleria fumata* (Haensch) (Lepidoptera: Ithomiinae). *Neotropical entomology*. 38: 616–623.
- Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le Menach, A., Boulouis, H.J., Vayssier-Taussat, M. 2004. Determination of an efficient and reliable method for ADN extraction from ticks. *Veterinary research*. 35: 709–713.
- Hamilton, M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*. 8: 521–523.
- Hoyos, R., Uribe, S., Vélez, I. 2012. Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) mediante “Código de Barras”. *Revista Colombiana de Entomología*. 38: 134–140.
- Kuo, K.W., Hsu, S.H., Li, Y.P., Lin, W.L., Liu, L.F., Chang, L.C., Lin, C.C., Lin, C.N., Sheu, H.M. 2000. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine: Triggering apoptosis in human hepatoma cells. *Biochemical pharmacology*. 60: 1865–1873.
- Levin, R.A., Myers, N.R., Bohs, L. 2006. Phylogenetic relationships among the “spiny solanums” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae). *American Journal of Botany*. 93: 157–169.
- Manning, K. 1991. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Analytical biochemistry*. 195: 45–50.
- Marín, M.A., López, A., Uribe, S.I. 2012. Interspecific variation in mitochondrial serine transfer RNA (UCN) in *Euptychiina butterflies* (Lepidoptera: Satyrinae): Structure and alignment. *Mitochondrial ADN* 23: 208–215.
- Medina, C., Inés, C., Lobo Arias, M., Martínez, B. 2009. Revisión del estado del conocimiento sobre la función productiva del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) en Colombia. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 10: 167–179.
- Miller, R.G. 1996. Simultaneous Statistical Inference. McGraw-Hill. New York, pp. 272 .
- Miz, R.B., Mentz, L.A., Souza-Chies, T.T. 2008. Overview of the phylogenetic relationships of some southern Brazilian species from section Torva and related sections of “spiny Solanum” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae). *Genetica*. 132: 143–158.
- Micklos DA, Freyer GA. ADN science. 2003. In: Crotty D, editor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Niu, C., Kebede, H., Auld, D.L., Woodward, J.E., Burow, G., Wright, R.J. 2010. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal ADN in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*. 7(16) : 2818-2822 .
- Soto, S.I.U., Lehmann, T., Rowton, E.D., Vélez B, I.D., Porter, C.H. 2001. Speciation and Population Structure in the Morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as Derived from the Mitochondrial ND4 Gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18: 84–93.
- Spooner, D.M., Van Den Berg, R.G., Rivera-Peña, A., Velguth, P., Del Rio, A., Salas-López, A. 2001. Taxonomy of Mexican and Central American members of *Solanum* Series Conicibaccata (sect. Petota). *Systematic botany*. 26: 743–756.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C., Willerslev, E. 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant ADN barcoding. *Nucleic Acids Research*. 35: e14–e14.
- Turci, M., Sardaro, M.L.S., Visioli, G., Maestri, E., Marmioli, M., Marmioli, N. 2010. Evaluation of ADN extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food control*. 21: 143–149.
- Valter de Oliveira, L.F., Wallau, G.L., Silva Loreto, E.L. 2009. Isolation of high quality ADN: a protocol combining “rennet” and glass milk. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12: 11–12.
- Vural, H.C. 2009. Genomic ADN isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey. *Scientific Research Essays*. 4: 59–64.
- Weese, T.L., Bohs, L. 2007. A Three-Gene Phylogeny of the Genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany*. 32: 445–463.
- Whalen, M.D., Costich, D.E., Heiser, C.B. 1981. Taxonomy of *Solanum* section lasiocarpa. *Gentes Herb.(Ithaca)* 12: 41–129.
- Yousaf, Z., Shinwari, Z.K., Khan, M.A. 2010. Phenetic Analysis of Medicinally Important Species Of The Genus *Solanum* From Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*. 42: 1827–1833.
- TY. Zhu, B. Wang, Q. Guo, 2006. Isolate high quality DNA from varieties of plant specimens with E.Z.N.A.TM plant DNA systems from Omega Bio-Tek. 10–11.