



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO EN

Pseudococcidae

Trabajo de titulación previo a la obtención del

título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORA: PAULA DOMÉNICA GUILLÉN SÁNCHEZ

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2026

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Paula Doménica Guillén Sánchez con documento de identificación N° 0151199072 manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 09 de febrero del 2026

Atentamente,



Paula Doménica Guillén Sánchez

0151199072

**CERTIFICADO CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Paula Doménica Guillén Sánchez con documento de identificación N° 0151199072, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Comparación de protocolos para la extracción de ADN genómico en *Pseudococcidae*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 09 de febrero del 2026

Atentamente,



Paula Doménica Guillén Sánchez

0151199072

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación COMPARACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO EN *Pseudococcidae*, realizado por Paula Doménica Guillén Sánchez con documento de identificación N° 0151199072, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 09 de febrero del 2026

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD.

0102291044

DEDICATORIA

A mi mamá,

la mujer más importante de mi vida.

A ella, que con su fortaleza me ha enseñado a no rendirme incluso cuando el camino se vuelve difícil. A ella, que ha sido mi ejemplo diario de esfuerzo, valentía y amor incondicional. Todo lo que soy y todo lo que hago nace de su apoyo constante y de su manera única de estar presente en cada etapa de mi vida.

Esta tesis es para ella, porque ha sido mi inspiración y mi mayor motivación. Porque sin su acompañamiento, su paciencia y su confianza en mí, nada de esto habría sido posible. Cada logro que alcanzo lleva un poco de su sacrificio y de su entrega.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento más profundo a mi mamá y papá, gracias por brindarme la oportunidad de estudiar y por su apoyo a lo largo de este proceso. Su esfuerzo y confianza han sido parte esencial de este logro.

A todos los amigos que la universidad me dio, gracias por haber sido mi compañía durante todo este recorrido. Por las jornadas compartidas, por la ayuda mutua en los momentos académicos más exigentes y también por el apoyo fuera de las aulas. Cada experiencia vivida, cada risa y cada dificultad superada juntos formaron parte de este proceso y de mi crecimiento personal. A mis dos mejores amigos, gracias por estar, por escuchar, por apoyar y por convertirse en un pilar fundamental en los momentos difíciles. Su amistad hizo este camino más llevadero y significativo.

Finalmente, agradezco de manera muy especial a mi tutora, la doctora Inés Malo, quien hizo posible la realización de este trabajo. Gracias por su guía, su dedicación y su compromiso, no solo durante el desarrollo de esta tesis, sino también a lo largo de mi formación académica cuando fue mi profesora. Su enseñanza y acompañamiento dejaron una huella importante en mi aprendizaje y en mi crecimiento profesional.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1	3
INTRODUCCIÓN	3
1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.2. Pregunta de investigación.....	5
1.3. Hipótesis.....	6
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. Objetivo general.....	6
1.4.2. Objetivos específicos	6
1.5. Justificación de la investigación.....	6
1.6. Limitaciones.....	8
1.7. Variables	10
1.7.1. Variables de Entrada	10
1.7.2. Variables de Salida.....	10
1.7.3. Variables Intervinientes.....	10
CAPÍTULO 2	12
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	12

2.1. Antecedentes de la investigación.....	12
2.2. Bases teóricas.....	14
2.2.1. El desafío del diagnóstico molecular en <i>Pseudococcidae</i>	14
2.2.2. Importancia económica y taxonómica de <i>Pseudococcidae</i>	14
2.2.3. Fundamentos del diagnóstico molecular y el código de barras de ADN	15
2.2.4. Fundamentos de la extracción de ADN genómico en insectos.....	16
2.2.5. Principios químicos de la lisis celular y la purificación	16
2.2.6. La problemática de los inhibidores de PCR en tejidos de insectos.....	17
2.2.7. Protocolos de extracción a comparar	17
2.2.8. Protocolo CTAB: fundamento químico y ventajas teóricas (calidad)	18
2.2.9. Protocolo SDS: fundamento químico y ventajas teóricas (cantidad)	18
2.2.10. Cuantificación (cantidad) y pureza (calidad) por espectrofotometría	19
2.2.11. Evaluación de la integridad por electroforesis	20
2.2.12. Adopción de la postura teórica	21
2.3. Marco conceptual: definición de términos básicos.....	21
2.3.1. ADN genómico (ADNg)	21
2.3.2. Familia <i>Pseudococcidae</i> (cochinillas).....	22
2.3.3. Diagnóstico molecular.....	22
2.3.4. Código de barras de ADN (ADN <i>barcoding</i>).....	22
2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22

2.3.6. Protocolo de extracción de ADN	23
2.3.7. Detergente CTAB	23
2.3.8. Detergente SDS.....	23
2.3.9. Inhibidores de PCR.....	23
2.3.10. Polisacáridos	24
2.3.11. Compuestos fenólicos	24
2.3.12. Rendimiento de ADN	24
2.3.13. Pureza del ADN (tasas A260/280 y A260/230).....	24
2.3.14. Integridad del ADN.....	25
2.3.15. Muestra fresca de <i>Pseudococcidae</i>	25
CAPÍTULO 3	26
MARCO METODOLÓGICO	26
3.1. Nivel de investigación.....	26
3.2. Diseño de investigación.....	27
3.3. Diseño del experimento.....	28
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	29
3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	30
3.6. Protocolo a implementar	32
3.6.1. Recolección y preservación de las muestras	32
3.6.2. Preparación de unidades experimentales.....	33

3.6.3. Protocolo de extracción con CTAB modificado.....	34
3.6.4. Protocolo de extracción con SDS + NaCl.....	35
3.6.5. Cuantificación y evaluación de pureza por espectrofotometría.....	37
3.6.6. Evaluación de la integridad del ADNg mediante electroforesis.....	38
CAPÍTULO 4	39
ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
4.1. Enfoque general del análisis de resultados	39
4.2. Evaluación descriptiva de los protocolos de extracción.....	39
4.2.1. Protocolo CTAB modificado con tratamiento con RNasa (+RNasa).....	39
4.2.2. Protocolo CTAB modificado sin tratamiento con RNasa (-RNasa).....	41
4.2.3. Protocolo SDS + NaCl con tratamiento con RNasa (+RNasa).....	43
4.2.4. Protocolo SDS + NaCl sin tratamiento con RNasa (-RNasa).....	45
4.2.5. Análisis descriptivo	47
4.3. Análisis comparativo mediante diagramas de caja.....	48
4.4. Análisis estadístico inferencial entre protocolos (+RNasa).....	51
4.4.1. Evaluación de supuestos estadísticos.....	52
4.4.1.1. Normalidad de los datos (prueba de Shapiro-Wilk).....	52
4.4.1.2. Homogeneidad de varianzas (prueba de Levene).....	53
4.4.2. Comparación inferencial entre protocolos mediante la prueba t de Student.....	54
4.5. Evaluación cualitativa de la integridad del ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa	57

CAPÍTULO 5	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
5.1. Conclusiones	62
5.2. Recomendaciones	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Recolección de Pseudococcidae de planta hospedera</i>	32
Figura 2. <i>Pools de Pseudococcidae previo a su separación</i>	34
Figura 3. <i>Implementación de ambos protocolos para la extracción de ADNg</i>	366
Figura 4. <i>Equipo utilizado para la evaluación del ADNg obtenido (NanoDrop)</i>	377
Figura 5. <i>Montaje de la electroforesis utilizada para analizar la integridad del ADNg obtenido</i>	38
Figura 6. <i>Distribución de la concentración de ácidos nucleicos obtenidos mediante los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl, con y sin tratamiento con RNasa</i>	47
Figura 7. <i>Diagrama de caja de la concentración de ADNg (ng/μL) obtenida mediante los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl (+RNasa)</i>	49
Figura 8. <i>Diagrama de caja de la relación A260/280 del ADNg extraído con los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl (+RNasa)</i>	50
Figura 9. <i>Diagrama de caja de la relación A260/230 del ADNg extraído con los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl (+RNasa)</i>	51
Figura 10. <i>Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADNg extraído con los protocolos SDS + NaCl y CTAB modificado bajo condición +RNasa</i>	58
Figura 11. <i>Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADNg extraído con los protocolos SDS + NaCl y CTAB modificado bajo condición -RNasa</i>	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Estadísticos descriptivos del ADNg obtenido mediante el protocolo CTAB modificado bajo condición +RNasa</i>	40
Tabla 2. <i>Estadísticos descriptivos del ADNg obtenido mediante el protocolo CTAB modificado bajo condición -RNasa</i>	42
Tabla 3. <i>Estadísticos descriptivos del ADNg obtenido mediante el protocolo SDS + NaCl bajo condición +RNasa</i>	44
Tabla 4. <i>Estadísticos descriptivos del ADNg obtenido mediante el protocolo SDS + NaCl bajo condición -RNasa</i>	46
Tabla 5. <i>Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para las variables concentración, A260/280 y A260/230 en muestras tratadas con RNasa</i>	52
Tabla 6. <i>Resultados de la prueba de Levene para la evaluación de homogeneidad de varianzas entre protocolos (+RNasa)</i>	53
Tabla 7. <i>Comparación entre protocolos de extracción mediante prueba t de Student</i>	55
Tabla 8. <i>Resultados descriptivos de concentración y pureza del ADNg obtenidos mediante NanoDrop bajo distintas condiciones experimentales (protocolo SDS + NaCl)</i>	72
Tabla 9. <i>Resultados descriptivos de concentración y pureza del ADNg obtenidos mediante NanoDrop bajo distintas condiciones experimentales (protocolo CTAB modificado)</i>	733

RESUMEN

La identificación molecular de insectos plaga es fundamental para el manejo fitosanitario y la toma de decisiones en agricultura. En este contexto, la familia *Pseudococcidae* representa un desafío metodológico debido a su pequeño tamaño y a la presencia de compuestos derivados de la dieta vegetal que pueden interferir en los análisis moleculares. Por ello, la obtención de ADN genómico de calidad constituye un paso crítico para garantizar la confiabilidad de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa y el código de barras de ADN.

El objetivo de este estudio fue comparar la eficiencia de los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl para la extracción de ADN genómico en *Pseudococcidae*, evaluando la cantidad, la calidad y la integridad del material genético obtenido a partir de muestras frescas. Se empleó un diseño experimental completamente al azar, procesando muestras biológicas con y sin tratamiento con RNasa. La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría y la integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa. El análisis de los datos incluyó estadística descriptiva y una prueba t de *Student* aplicada exclusivamente a las muestras tratadas con RNasa.

Los resultados mostraron que el protocolo CTAB modificado permitió obtener una concentración significativamente mayor de ADN genómico en comparación con SDS + NaCl, sin diferencias significativas en los índices de pureza. En conclusión, el protocolo CTAB modificado se perfila como una alternativa adecuada para la extracción de ADN genómico en *Pseudococcidae*, contribuyendo a la optimización de procedimientos de diagnóstico molecular en insectos fitófagos.

Palabras clave: extracción de ADN, CTAB modificado, SDS + NaCl, *Pseudococcidae*, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

The molecular identification of insect pests is essential for phytosanitary management and decision-making in agriculture. In this context, the *Pseudococcidae* family represents a methodological challenge due to its small size and the presence of compounds derived from the plant diet that can interfere with molecular analyses. Therefore, obtaining high-quality genomic DNA is a critical step in ensuring the reliability of techniques such as polymerase chain reaction and DNA barcoding.

The objective of this study was to compare the efficiency of modified CTAB and SDS + NaCl protocols for genomic DNA extraction in *Pseudococcidae*, evaluating the quantity, quality, and integrity of the genetic material obtained from fresh samples. A completely randomized experimental design was used, processing biological samples with and without RNase treatment. DNA quantification was performed by spectrophotometry, and integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. Data analysis included descriptive statistics and a Student's t-test applied exclusively to RNase-treated samples.

The results showed that the modified CTAB protocol yielded a significantly higher concentration of genomic DNA compared to SDS + NaCl, with no significant differences in purity indices. In conclusion, the modified CTAB protocol appears to be a suitable alternative for genomic DNA extraction in *Pseudococcidae*, contributing to the optimization of molecular diagnostic procedures in phytophagous insects.

Keywords: DNA extraction, modified CTAB, SDS + NaCl, *Pseudococcidae*, molecular diagnosis.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La aplicación de la Biotecnología a la agricultura representa una herramienta esencial para la seguridad alimentaria y la creación de cultivos sostenibles. En este contexto, el control fitosanitario de plagas exige diagnósticos taxonómicos precisos, los cuales son necesarios para la elección de diferentes técnicas de control efectivas. La familia *Pseudococcidae* (cochinillas), insectos hemípteros de gran impacto económico, presenta un desafío diagnóstico importante. La identificación morfológica de este tipo de plaga es compleja, debido a esto, técnicas de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se ha convertido en una de las mejores opciones para la identificación precisa de especies.

La efectividad e importancia de optimizar los estudios moleculares radican en un obstáculo persistente: el éxito de la PCR depende directamente de la calidad de ADN genómico (ADNg) obtenido. En el caso de *Pseudococcidae*, este proceso en particular es teóricamente complejo. Generalmente los tejidos de los insectos poseen compuestos inhibidores de PCR, como los polisacáridos y compuestos fenólicos (Kashyap & Jaiswal, 2020). Estos contaminantes pueden ser co-purificados junto con el ADN e inhibir la actividad de la polimerasa, dando como resultados falsos negativos e invalidando el diagnóstico.

En respuesta a esta problemática, actualmente existen kits comerciales para la extracción de ADN, los cuales garantizan la obtención de ADN de alta pureza, sin embargo, muchos de ellos tienen un elevado costo que limita su accesibilidad para laboratorios de diagnóstico con recursos limitados, así como para investigaciones a gran escala. Como una alternativa a esto, se han desarrollado protocolos manuales de menor costo, entre los que destacan teóricamente el protocolo

basado en CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y el protocolo basado en SDS (dodecilsulfato de sodio) con NaCl.

Por lo tanto, esta investigación está guiada hacia la comparación de la eficiencia de los dos protocolos anteriormente mencionados, para la extracción de ADNg, específicamente en muestras frescas de *Pseudococcidae*. Se busca determinar experimentalmente cuál de los dos protocolos ofrece un mejor balance entre el rendimiento (cantidad de ADN) y la pureza (calidad del ADN), estableciendo un método óptimo, económico y fiable para esta familia de insectos.

La perspectiva teórica que asume este estudio se basa en las propiedades químicas de los detergentes empleados en ambos protocolos. Por su parte, el protocolo CTAB modificado emplea un detergente catiónico (CTAB) que es teóricamente mejor para eliminar polisacáridos, un inhibidor clave, cuya modificación va justamente direccionada para tejidos “difíciles” (Schenk, Becklund, Carey, & Fabre, 2023). Mientras que, el protocolo SDS + NaCl, emplea un detergente aniónico (SDS), conocido por tener una alta capacidad de lisis celular, lo que propone un mayor rendimiento (Wang, Dai, Tian, Wan, & Zhang, 2019). No obstante, existe una falta de fundamento teórico en la literatura sobre una comparación experimental directa que analice el equilibrio entre una óptima cantidad de ADN obtenido con el método SDS y una alta pureza con el método CTAB modificado en *Pseudococcidae*.

1.1. Planteamiento del problema

La Biotecnología actual va de la mano con múltiples análisis moleculares precisos para la identificación taxonómica de diferentes especies, una base sumamente importante para el diagnóstico y manejo fitosanitario de plagas en el sector agrícola, como lo es el caso de la familia *Pseudococcidae* (cochinillas). Actualmente, la obtención de ADN genómico de alta calidad a partir

de este tipo de insecto es significativamente compleja, a causa de algunos aspectos biológicos como su tamaño o la concentración alta de inhibidores de PCR (fenoles y polisacáridos) en sus tejidos. Se sabe que hoy en día, en respuesta a esta problemática, ya existen kits comerciales de extracción, los cuales pueden ser efectivos, sin embargo, sus altos costos representan una limitación a su viabilidad.

Existen también, protocolos alternativos como lo son el protocolo CTAB modificado (bromuro de cetiltrimetilamonio) y SDS + NaCl que son realizados manualmente y tienen un costo menor, sin embargo, la teoría reportada hasta la actualidad indica un vacío de conocimiento analítico. Por su parte el uso del protocolo SDS + NaCl ya ha demostrado ser eficiente específicamente en *Pseudococcidae*, con cifras de 8,589 ng/mg según Wang y colaboradores (2019). Mientras que teóricamente el protocolo CTAB modificado demuestra ser una opción más adecuada para eliminar inhibidores y ha sido empleado exitosamente en otros insectos, existe una falta de datos experimentales directos en cuanto al rendimiento en *Pseudococcidae*. Frente a esta carencia de una validación comparativa directa se genera la necesidad del actual estudio, cuya finalidad será medir tres indicadores clave como lo son la calidad, cantidad e integridad del ADN obtenido. Por lo tanto, el objetivo que se persigue es demostrar experimentalmente cuál de los dos protocolos, ya mencionados, resulta en un mejor balance en cuanto al rendimiento y calidad del ADN extraído exclusivamente en *Pseudococcidae*.

1.2. Pregunta de investigación

¿Qué diferencias se evidencian en el ADN genómico obtenido de *Pseudococcidae* (cochinillas) al comparar dos protocolos de extracción: CTAB modificado y SDS + NaCl?

1.3. Hipótesis

Se espera que existan diferencias significativas en los resultados de los dos protocolos: El protocolo SDS + NaCl generará una mayor cantidad (rendimiento) de ADN genómico en *Pseudococcidae*. Mientras que el protocolo CTAB modificado producirá ADN con una mayor calidad (pureza) debido a su reconocida capacidad para eliminar polisacáridos e inhibidores.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Comparar la eficiencia de los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl en la extracción de ADN genómico de *Pseudococcidae* (cochinillas) a partir de muestras frescas, determinando cuál protocolo ofrece la mayor recuperación del material genético, analizando cantidad, calidad e integridad.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el ADN genómico recuperado de *Pseudococcidae* mediante el protocolo CTAB modificado y pruebas de laboratorio determinando su calidad, cantidad e integridad.
- Evaluar el ADN genómico recuperado de *Pseudococcidae* mediante el protocolo SDS + NaCl y pruebas de laboratorio determinando su calidad, cantidad e integridad.
- Comparar los resultados de rendimiento, pureza e integridad obtenidos de ambos protocolos, utilizando pruebas estadísticas para su análisis, estableciendo cuál es el más eficiente para la extracción de ADN de *Pseudococcidae* en muestras frescas.

1.5. Justificación de la investigación

El presente estudio se justifica frente a la necesidad de optimizar las técnicas de diagnóstico molecular para el control de plagas que impactan negativamente al sector agrícola, como es el caso

de las cochinillas de la familia *Pseudococcidae*. Este tipo de insectos no solo dañan directamente los cultivos, sino que también pueden actuar como vectores de virus patógenos, poniendo en riesgo a la salud alimentaria y causando grandes pérdidas económicas en cultivos de importancia global (Tanaka & Uesato, 2012). La relevancia social y contemporánea de un control fitosanitario eficaz es, por lo tanto, innegable. La caracterización taxonómica precisa es de suma importancia para toda estrategia de Manejo Integrado de Plagas (MIP), actualmente, esta caracterización depende de muchas de las técnicas de Biología Molecular utilizadas, como lo es el código de barras de ADN, cuya veracidad está directamente relacionada con la calidad del material genético de partida (Jalali, Ojha, & Venkatesan, 2015). Sin embargo, el éxito de dichas técnicas moleculares se ven enfrentadas a una problemática metodológica persistente: la obtención de ADNg de alta calidad a partir de esta familia de insectos es claramente compleja. El *porqué* de esta investigación radica en la necesidad real de contar con protocolos de extracción que garanticen resultados reproducibles, evitando diagnósticos equívocos que podrían causar estrategias de control mal dirigidas.

La obtención de ADN en *Pseudococcidae* enfrenta, además, otras dificultades a causa de la abundancia de polisacáridos y compuestos fenólicos en sus tejidos, los cuales entorpecen la PCR y pueden generar fallos en la amplificación o falsos negativos (Oppert, Stoss, Monk, & Smith, 2019). A pesar de que el protocolo CTAB modificado es conocido por su eficacia para la eliminación de polisacáridos, la teoría también reporta que el protocolo SDS + NaCl puede resultar mejor en cochinillas (Schenk, Becklund, Carey, & Fabre, 2023). No obstante, todavía no existe una comparación directa entre estos dos métodos de extracción bajo condiciones iguales que permita determinar cuál ofrece un mejor equilibrio entre cantidad, calidad e integridad del ADN. El *para qué* del presente estudio reside, por tanto, en generar evidencia comparativa rigurosa que

permita determinar cuál de los protocolos utilizados es más eficiente para la obtención de ADNg específicamente para *Pseudococcidae*, proporcionando así también una solución que rompa la barrera del costo sin sacrificar la fiabilidad del diagnóstico.

La importancia de este estudio es, por consiguiente, eminentemente práctica. El aporte práctico principal será la validación y recomendación de un protocolo de extracción de ADN optimizado, robusto y de bajo costo. Disponer de un método estandarizado facilitará el procesamiento de muestras en diferentes laboratorios fitosanitarios con los mismos recursos y confiabilidad del diagnóstico. En cuanto al plano teórico, el estudio aportará evidencia empírica sobre la efectividad real de los detergentes catiónicos (CTAB) frente a los aniónicos (SDS) en la lisis y purificación de ADNg de insectos ricos en inhibidores, validando o refutando las suposiciones teóricas actuales en el contexto específico de *Pseudococcidae*.

Los resultados beneficiarán directamente a laboratorios de diagnóstico, investigadores y entidades regulatorias, y, de forma indirecta, a productores y exportadores agrícolas mediante diagnósticos más eficientes y accesibles. En última instancia, la sociedad en general se verá favorecida por una mayor seguridad alimentaria y por la reducción del impacto económico y ambiental asociado a un control ineficaz de plagas.

1.6. Limitaciones

Aunque el estudio se desarrolla bajo un control metodológico riguroso en el laboratorio, se reconocen limitaciones inevitables que pueden influir en los resultados y que no dependen directamente del equipo investigador. La principal limitación es de naturaleza biológica y está relacionada con la dieta de las cochinillas (*Pseudococcidae*). No es posible estandarizar qué han consumido, ya que las muestras serán recolectadas directamente en campo. La composición

química de las plantas hospederas varía ampliamente entre especies, especialmente en la concentración y el tipo de metabolitos secundarios, como fenoles y taninos (Chamani, y otros, 2025). Estos compuestos ingeridos por el insecto, constituyen la fuente principal de los inhibidores de PCR que este estudio busca gestionar. En consecuencia, una variabilidad no medida en la dieta de las muestras podría modificar, de forma diferencial, la eficiencia de purificación de los protocolos CTAB y SDS, introduciendo un sesgo potencial en las mediciones de calidad (A260/230).

Una segunda limitación relevante es de carácter logístico y temporal. El desarrollo del estudio depende de la disponibilidad estacional de poblaciones suficientes de *Pseudococcidae* en las zonas de muestreo definidas. Condiciones climáticas atípicas o aplicaciones imprevistas de plaguicidas en las áreas de recolección podrían reducir de manera considerable la disponibilidad de muestras frescas y alterar el cronograma planteado. Además, aunque se plantea estandarizar el manejo de las muestras, cualquier retraso no previsto entre la recolección en campo y la estabilización en el laboratorio puede favorecer la acción de nucleasas endógenas y desencadenar la degradación del ADNg (Asghar, Faheem Malik, Anwar, Javed, & Raza, 2015). Esto afectaría principalmente la variable “integridad” y dificultaría la comparación objetiva entre los protocolos, en especial si parte de la degradación ocurre antes de la lisis celular.

En última instancia, el estudio está sujeto a las limitaciones técnicas propias de los análisis de Biología Molecular. Entre ellas se incluyen la dependencia de la calidad e integridad de los reactivos (en particular, la actividad de enzimas como la Proteínasa K), el correcto funcionamiento y calibración de equipos sensibles, como el espectrofotómetro, y el riesgo de contaminación con ADN exógeno durante el procesamiento manual. Adicionalmente, el ADNg de endosimbiontes bacterianos frecuente en *Pseudococcidae* (Rosenblueth, y otros, 2018), será coextraído de forma

inevitable junto con el ADN del insecto. Aunque esta situación se presenta por igual en ambos protocolos, podría influir en la cuantificación espectrofotométrica (A260), aun cuando no se espera que altere la evaluación de la integridad en gel de agarosa.

1.7. Variables

En el presente proyecto, las variables son básicamente el puente entre el problema planteado, los objetivos y los resultados. El “protocolo de extracción” se asume como factor de estudio porque es la condición que cambia deliberadamente (CTAB modificado frente a SDS + NaCl), mientras que la calidad, cantidad e integridad del ADN_g se usan como respuestas observables de este cambio. Conceptualizar con precisión cada variable y la forma en la que serán medidas permite responder preguntas generales, como cuál protocolo es más eficiente, en indicadores concretos que pueden analizarse de manera objetiva.

1.7.1. Variables de Entrada

- Nivel 1: CTAB modificado
- Nivel 2: SDS + NaCl

1.7.2. Variables de Salida

- Cantidad (rendimiento) de ADN: medida cuantitativamente.
- Calidad (pureza) de ADN: medida cuantitativamente mediante tasas de absorbancia (A260/280 y A260/230).
- Integridad de ADN: medida cualitativamente por observación en gel de agarosa.

1.7.3. Variables Intervinientes

- Población: *Pseudococcidae* (cochinillas).
- Condición de la muestra: muestras frescas.

- Masa inicial: la misma cantidad de tejido o número de insectos por extracción.
- Equipos y reactivos: el uso de los mismos equipos y reactivos en todo el proceso.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Antecedentes de la investigación

La optimización de protocolos dirigidos a la extracción de ADN genómico en insectos es de constante evaluación, porque de esta depende la fiabilidad de los diferentes análisis moleculares posteriores. En la teoría se ejemplifican tres aspectos que frecuentemente causan tensión: el rendimiento del ADN, la pureza y el costo del procedimiento, al comparar protocolos manuales frente a kits comerciales. En análisis comparativos con insectos de fisonomía similar a las cochinillas, los protocolos fundamentados en el uso de detergentes suelen dar como resultado mayor cantidad de ADN, mientras que ciertos kits comerciales que usan columnas de sílice tienden a ofrecer resultados menos contaminados, pero a un mayor costo, lo que los prioriza como alternativas según el objetivo de estudio a realizar (Chen, Rangasamy, Yee Tan, Wang, & Siegfried, 2010).

En insectos fitófagos, como los *Pseudococcidae*, la problemática no es solo el romper el tejido como tal, sino también controlar la alta carga de compuestos inhibidores de PCR que tienen su origen en la dieta del insecto y en su propia cutícula. Experimentos realizados en especies vegetales u otros tejidos con alto contenido en metabolitos secundarios han evidenciado que polisacáridos y polifenoles pueden coextraerse con el ADN, disminuir las razones A260/230 e inhibir la actividad de la Taq polimerasa, y que las modificaciones del protocolo CTAB (altas concentraciones de NaCl, uso de agentes retenedores de fenoles) aumentan notablemente la pureza de ADN obtenido (Sahu, Thangaraj, & Kathiresan, 2012). Estos resultados respaldan la implementación de

variaciones en el protocolo CTAB directamente utilizado para muestras con alta carga de metabolitos derivados de la planta hospedera.

Por otro lado, existen también alternativas de bajos costos basados en SDS y otros *buffers* simples, dirigidas para el análisis de grandes números de muestras o para laboratorios con recursos limitados. Por ejemplo, en insectos de cuerpo pequeño y blando se han comparado métodos de extracción rápidos frente a un protocolo estándar con CTAB y a un kit comercial, demostrando que algunos procesos simplificados permiten obtener ADN con cantidad y pureza suficientes para PCR en poco tiempo y con un costo sumamente bajo, siempre que el diseño de estudio no exija niveles estrictos de pureza (Jangra & Ghosh, 2022). Este análisis coloca a los métodos basados en SDS y sales como opciones válidas cuando el objetivo es maximizar el rendimiento.

El antecedente más cercano al presente estudio, directamente por el enfoque es *Pseudococcidae*, es el análisis comparativo de Wang y colaboradores, quienes evaluaron ocho métodos de extracción de ADN en cochinillas, integrando kits comerciales y protocolos manuales basados en SDS y sales (Wang, Dai, Tian, Wan, & Zhang, 2019). Cuyo trabajo concluyó que el método con SDS era el mejor y más eficiente en relación costo/tiempo/rendimiento, ya que no solo proporcionó altos niveles de ADN adecuados para PCR de individuos completos, sino también de individuos aún en desarrollo y en diferentes tiempos de preservación. Sin embargo, en dicho estudio no se incluyó ningún método basado en CTAB, a pesar de que este detergente se considera químicamente adecuado para la eliminación de polisacáridos y fenoles en muestras con alto contenido en metabolitos secundarios. En este vacío metodológico se justifica la necesidad de comparar directamente el protocolo SDS frente a CTAB modificado específicamente para *Pseudococcidae*, con el objetivo de determinar cuál garantiza un mejor equilibrio entre cantidad, calidad e integridad de ADN para aplicaciones de diagnóstico molecular con estos insectos.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. El desafío del diagnóstico molecular en *Pseudococcidae*

El perfeccionamiento de un método de extracción de ADN en Biología Molecular siempre depende del organismo a estudiar. Específicamente en el caso de la familia *Pseudococcidae*, el tamaño corporal pequeño, la alta carga de metabolitos derivados de la savia vegetal de la que se alimentan y la composición de su propia cutícula cerosa, componen una matriz biológica compleja. Debido a esto existe la necesidad de modificar ciertos protocolos de acuerdo a las características del tejido y a los inhibidores propios de insectos fitófagos, de tal manera que se pueda obtener ADN de buena calidad como resultado de la extracción (Jangra & Ghosh, 2022).

2.2.2. Importancia económica y taxonómica de *Pseudococcidae*

La familia *Pseudococcidae*, conocidas también como cochinillas harinosas, se encuentran en el grupo de insectos plaga más importante a nivel mundial, por su gran capacidad de reproducción, su recubrimiento ceroso protector y su marcada polifagia. Colonizan grandes cantidades de plantaciones de alto valor económico, como lo son los cultivos de piña, algodón, cítricos y diversas ornamentales (Vercher, González, Sánchez, & Sorribas, 2023).

El impacto negativo que causan este tipo de plagas no solo se limita al daño directo por succión de savia, sino también a su papel como vectores de virus de plantas. Numerosas especies de cochinillas están envueltas en la transmisión de virus del enrollamiento de la hoja de la vid (GLRaVs) y otros fitovirus, lo que compromete seriamente el rendimiento de viñedos y demás sistemas agrícolas, reforzando la necesidad de sistemas de control biológico precisos para su manejo (Ahmed, Apori, & Karim, 2023).

Teniendo esto en cuenta, la caracterización taxonómica precisa de *Pseudococcidae* es esencial pero compleja. Varias especies poseen morfologías crípticas y son casi indistinguibles a simple vista; además, la caracterización clásica se fundamenta en el montaje en láminas de especímenes adultos, generalmente machos, y se requiere experiencia taxonómica especializada y un trabajo minucioso al microscopio. La suma de esta dificultad diagnóstica y de alta relevancia económica ha favorecido a la implementación de herramientas moleculares como apoyo y alternativa a los procesos tradicionales (Mani & Shivaraju, 2016).

2.2.3. Fundamentos del diagnóstico molecular y el código de barras de ADN

El diagnóstico molecular mediante “código de barras de ADN” se ha definido como una visión estándar para la caracterización de insectos plaga, incluyendo *Pseudococcidae*. En este método se secuencian un fragmento corto y estandarizado del genoma, generalmente la región del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI), que identifica específicamente la especie y permite eliminar taxones morfológicamente parecidos independientemente del estado de desarrollo del individuo (Wang, y otros, 2016).

La validez de cualquier estudio molecular (PCR convencional, qPCR o secuenciación) depende de la calidad del ADN de partida. Algunos fallos de amplificación, señales bajas o secuencias de mala calidad están relacionados usualmente con ADN degradado o contaminado, más que con problemas de la propia PCR. Por consiguiente, el proceso de extracción y purificación de ADN es considerado un paso sumamente importante, y la validación sistemática de pureza e integridad del ADN se ha considerado también una recomendación básica antes de cualquier análisis *downstream* (Lucena, y otros, 2016).

2.2.4. Fundamentos de la extracción de ADN genómico en insectos

El principal objetivo de un protocolo de extracción es separar el ADNg de los demás componentes celulares, de modo que se conserve su integridad y se eliminen contaminantes y sustancias que puedan inhibir la actividad de las enzimas utilizadas en una PCR u otras técnicas moleculares. En pequeños insectos, el desafío radica en la baja cantidad de tejido disponible y en la alta cantidad de metabolitos derivados de la planta hospedera presentes en el cuerpo del insecto (Rao & Doddamane, 2022).

2.2.5. Principios químicos de la lisis celular y la purificación

A grandes rasgos, un protocolo de extracción de ADNg se puede separar principalmente en estos se procesos:

- **Lisis:** ruptura de la membrana celular y nuclear para liberar el ADN. Se da la combinación tanto de una lisis mecánica como química, fundamentada en agentes caotrópicos y detergentes.
- **Purificación:** separación del ADN de contaminantes, usualmente se realiza una digestión con proteinasa K y posterior extracción con solventes orgánicos.
- **Precipitación:** concentración del ADN por adición de alcoholes y sales, en donde se genera un *pellet* visible que se lava y resuspende en un *buffer* adecuado.

En esta secuencia, el detergente es una sustancia esencial en la lisis, ya que solubiliza los lípidos de la membrana y ayuda a la liberación del contenido nuclear, el detergente utilizado define la química del protocolo en sí y condiciona la capacidad de separar el ADN de polisacáridos y fenoles (Sambrook & Russell, 2001).

2.2.6. La problemática de los inhibidores de PCR en tejidos de insectos

En insectos fitófagos, como *Pseudococcidae*, el desafío principal para conseguir un ADN apto para PCR no es solo la contaminación por lípidos o proteínas, sino también los inhibidores que tienen origen en la dieta del insecto y en la propia cutícula del mismo. Entre ellos se pueden nombrar principalmente los siguientes:

- **Polisacáridos:** al alimentarse del floema, este tipo de insecto ingiere grandes cantidades de azúcares complejos que pueden mantenerse estables en los *buffers* acuosos de extracción y se pueden precipitar con el ADN durante la etapa de alcohol. Este tipo de polisacáridos incrementan la viscosidad de la muestra e interfieren con la Taq polimerasa, generalmente a través del secuestro de iones Mg^{2+} o interacción directa con la enzima (Schrader, Née Schielke, Ellerbroek, & Johne, 2012).
- **Fenoles:** provenientes de los metabolitos secundarios de la planta hospedera, incluyendo taninos y otros polifenoles. Estos compuestos, en cuanto se oxidan, pueden generar enlaces con proteínas e incluso con el ADN, formando así ADN oxidado que pierde su capacidad eficiente en reacciones de PCR, lo que causa reducción de sensibilidad o falsos negativos (Schrader, Née Schielke, Ellerbroek, & Johne, 2012).

La eliminación de estos tipos de inhibidores constituye el enfoque principal de los protocolos basados en CTAB y SDS contrastados en esta investigación.

2.2.7. Protocolos de extracción a comparar

La hipótesis principal de este estudio radica en las diferencias químicas entre los dos protocolos a utilizar: CTAB modificado y SDS + NaCl. Los cuales han sido implementados para extraer ADN en insectos pequeños y ricos en polisacáridos en su composición como tal, pero

teniendo en cuenta también la importancia del rendimiento, pureza y costo por muestra (Wang, Dai, Tian, Wan, & Zhang, 2019).

2.2.8. Protocolo CTAB: fundamento químico y ventajas teóricas (calidad)

El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) es un detergente catiónico cuyo comportamiento frente a polisacáridos y fenoles establece su amplio uso en tejidos con alto contenido en metabolitos secundarios. En *buffers* de lisis con gran contenido en sal, el CTAB crea uniones con proteínas y la mayoría de los polisacáridos, lo que luego facilita su separación. Cuando la fuerza iónica disminuye en los lavados, el CTAB se une preferentemente con el ADN de carga negativa, mientras que los polisacáridos ácidos se quedan en la solución, permitiendo así purificar el ADN.

Las modificaciones del protocolo CTAB añaden NaCl a altas concentraciones y agentes como el PVP (polivinilpirrolidona) o β -mercaptoetanol para atrapar y reducir fenoles, lo que ha mejorado notablemente la pureza del ADN obtenido a partir de especies vegetales e insectos acumuladores de metabolitos secundarios. Teóricamente, este tipo de formulación debería resultar en un ADN con mejores tasas de pureza frente a polisacáridos y fenoles, lo que sostiene que el protocolo CTAB modificado genere mayor calidad en *Pseudococcidae* (Rao & Doddamane, 2022).

2.2.9. Protocolo SDS: fundamento químico y ventajas teóricas (cantidad)

El dodecilsulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico usado en Biología Molecular por su habilidad de desnaturalizar proteínas y solubilizar lípidos de membrana. Durante el proceso de extracción de ADN, el SDS rompe las membranas celulares eficientemente y libera una alta cantidad de contenido intracelular, incluyendo el ADN, lo que produce grandes rendimientos

cuando se trabajan con masas limitadas de tejido (Perumal, Zhang, Morono, Inagaki, & Wang, 2016).

En contraste con el CTAB, el SDS no discrimina bien entre ADN y polisacáridos, por lo que la combinación con altas concentraciones de NaCl y solventes orgánicos ayuda a la precipitación de proteínas desnaturalizadas y ciertos contaminantes también. En estudios comparativos con cochinillas se ha demostrado que, considerando tiempo/rendimiento/costo, un protocolo basado en SDS puede ser la alternativa más conveniente para su extracción de ADN, incluso superando a algunos kits comerciales en cantidad de ADN obtenido por muestra (Wang, Dai, Tian, Wan, & Zhang, 2019).

Este descubrimiento empírico es el punto de partida para la hipótesis del estudio: se espera que el protocolo SDS + NaCl resulte en mayores concentraciones de ADN que el protocolo CTAB modificado, cuando ambos se apliquen a muestras en las mismas condiciones.

2.2.10. Cuantificación (cantidad) y pureza (calidad) por espectrofotometría

La espectrofotometría en el rango UV es una herramienta estandarizada para estimar la cantidad y calidad del ADN extraído. Las métricas básicas son:

- **Cantidad (A260):** los ácidos nucleicos absorben con máximo a 260 nm, a partir de esta absorbancia se calcula la concentración de ADN (ng/μL).
- **Pureza frente a proteínas (A260/280):** las proteínas presentan un máximo de absorbancia en torno a 280 nm, tasas A260/280 cercanos a 1,8 se consideran valores con baja contaminación proteica, mientras que valores inferiores suelen reflejar proteínas residuales.

- **Pureza frente a inhibidores (A260/230):** polisacáridos, fenoles, sales o algunos detergentes absorben significativamente alrededor de 230 nm; tasas A260/230 entre 2,0 y 2,2 se consideran con una baja carga de contaminantes, mientras que valores muy debajo de 2,0 indican niveles de contaminación que pueden comprometer las reacciones *downstream* (Rofael, 2022).

En el presente estudio el análisis de todos estos valores se toma como métrica importante para comparar la capacidad de los protocolos CTAB y SDS para eliminar contaminantes propios de *Pseudococcidae*.

2.2.11. Evaluación de la integridad por electroforesis

Aunque la espectrofotometría es una herramienta muy útil para evaluar tanto cantidad como calidad de ADN, esta no permite evaluar si el ADN está íntegro o fragmentado. La integridad del ADN_g hace referencia al estado físico de la molécula como tal, ya que un ADN con alto peso molecular, es esencial para una amplificación de fragmentos relativamente largos en *barcoding* y otras aplicaciones.

La electroforesis en gel de agarosa permite una evaluación cualitativa de esta integridad. Si se obtiene un ADN genómico bien conservado se podrá observar una banda definida y poco difusa cerca del pozo de carga, mientras que, si el ADN se encuentra degradado este se va a manifestar como un barrido a lo largo del carril, este patrón es la guía básica para la evaluación de la calidad del ADN que se puede utilizar en secuenciación u otros análisis de alta demanda en Biología Molecular (Rofael, 2022).

2.2.12. Adopción de la postura teórica

La postura teórica que toma este estudio, se basa en la hipótesis de una compensación metodológica entre el rendimiento, pureza e integridad del ADN. No necesariamente se intenta asumir que uno de los protocolos sea superior en todos los sentidos al otro, sino demostrar las ventajas y limitaciones que se deben contrastar experimentalmente en *Pseudococcidae*.

Además, la evidencia ya disponible, sugiere que el protocolo basado en SDS tiende a maximizar la lisis celular y generar altos rendimientos de ADN, por lo que se ha tomado este enfoque para *Pseudococcidae* en específico cuando el objetivo es obtener mayor cantidad de ADN a un bajo costo (Wang, Dai, Tian, Wan, & Zhang, 2019).

Por otro lado, los protocolos basados en CTAB y cuyas modificaciones han demostrado ser eficaces para remover polisacáridos y otros metabolitos secundarios, generan ADN con mayores tasas de pureza en matrices ricas en compuestos vegetales (Wang, y otros, 2023)

El objetivo final de este estudio es formar una discusión entre el plano teórico y experimental para determinar cuál protocolo ofrece un mejor equilibrio en cuanto cantidad, calidad e integridad de ADN genómico para el diagnóstico molecular rutinario de *Pseudococcidae* en condiciones de laboratorio.

2.3. Marco conceptual: definición de términos básicos

2.3.1. ADN genómico (ADNg)

En este estudio se define como ADN genómico al conjunto de información genética completa de un organismo, que incluye regiones codificantes y no codificantes organizadas en cromosomas y que se usa como guía para las reacciones de PCR o secuenciación utilizadas en diagnósticos moleculares (Zymo Research, 2024).

2.3.2. Familia *Pseudococcidae* (cochinillas)

La familia *Pseudococcidae* asocia insectos hemípteros, conocidos como cochinillas harinosas, las cuales son una plaga polífaga de numerosos sistemas agrícolas y ornamentales a nivel mundial, distinguidas por su cutícula cerosa y por una morfología críptica que hace compleja su identificación taxonómica a simple vista (Zarkani, Fauzi, Apriyanto, & Bora, 2023).

2.3.3. Diagnóstico molecular

Teniendo en cuenta este estudio, el diagnóstico molecular se conceptualiza como la agrupación de técnicas basadas en la detección, amplificación y análisis de secuencias de ADN, utilizadas específicamente para identificar especies de *Pseudococcidae* y analizar en su totalidad, la calidad del material genético obtenido a partir de sus tejidos (Khehra, Padda, & Zubair, 2025).

2.3.4. Código de barras de ADN (ADN *barcoding*)

Es un enfoque empleado para la identificación de especies en donde se utiliza la secuencia de un fragmento corto y estandarizado del genoma (generalmente COI), con el fin de poder diferenciar taxones y delimitar ciertas especies en grupos morfológicamente complejos como *Pseudococcidae* (Zheng, y otros, 2018).

2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En este contexto, la PCR se define como una técnica de amplificación *in vitro* que genera múltiples copias de un segmento específico de ADN mediante ciclos repetitivos de desnaturalización, uso de *primers* y extensión. Esta constituye la base de los ensayos de *barcoding* y verificación de la viabilidad del ADNg extraído (Khehra, Padda, & Zubair, 2025).

2.3.6. Protocolo de extracción de ADN

Se denomina protocolo de extracción de ADN a la organización de reactivos y pasos de lisis, purificación y precipitación armados para aislar ADNg partiendo de tejidos biológicos. En este caso, el término se restringe a los dos procedimientos comparados: CTAB modificado y SDS + NaCl, aplicados en nuestras frescas de *Pseudococcidae* (Masoomi-Aladizgeh, y otros, 2023).

2.3.7. Detergente CTAB

El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) es un detergente catiónico empleado en *buffers* de lisis para extraer ácidos nucleicos de tejidos ricos en polisacáridos y polifenoles, junto con la presencia de altas concentraciones de sal, aumenta la división del ADN de estos metabolitos secundarios, lo que lo posiciona como una alternativa eficiente para matrices complejas (Schenk, Becklund, Carey, & Fabre, 2023).

2.3.8. Detergente SDS

El dodecilsulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico con gran poder desnaturalizante, frecuentemente utilizado en Biología Molecular debido a su capacidad de romper membranas celulares y desnaturalizar proteínas, ayudando así a la liberación del ADNg, aunque con menor selectividad frente a polisacáridos y otros contaminantes (Wong, 2024).

2.3.9. Inhibidores de PCR

Se denomina inhibidores de PCR a los compuestos presentes en la muestra que dificultan la actividad de la polimerasa o la disponibilidad de cofactores, disminuyendo la eficiencia de amplificación o bloqueando completamente la reacción (Schrader, Née Schielke, Ellerbroek, & Johne, 2012).

2.3.10. Polisacáridos

En el contexto de *Pseudococcidae*, los polisacáridos son azúcares complejos que provienen principalmente de la savia de la planta hospedera, los cuales se acumulan en el cuerpo del insecto. Pueden precipitarse con el ADN durante la extracción y posteriormente actuar como inhibidores de PCR al modificar la viscosidad de la muestra o atrapar iones metálicos esenciales (Zafeiriadou, Nano, Thomaidis, & Markou, 2024).

2.3.11. Compuestos fenólicos

Son metabolitos secundarios de origen vegetal, incluyendo taninos y otros polifenoles, que al oxidarse se unen con proteínas y ácidos nucleicos, generando ADN oxidado y de baja calidad, lo que reduce su viabilidad para PCR u otras aplicaciones moleculares (Peña, y otros, 2023).

2.3.12. Rendimiento de ADN

Se define como rendimiento de ADN a la cantidad de ADN_g obtenida tras la extracción. Usualmente se expresa en ng/ μ L o en masa total por muestra, se mide a partir de la absorbancia 260 nm, en este estudio, es una de las variables indispensables para comparar la eficiencia cuantitativa de los dos protocolos utilizados (García, y otros, 2020).

2.3.13. Pureza del ADN (tasas A260/280 y A260/230)

La pureza del ADN obtenido se analiza a partir de las tasas de absorbancia A260/280 y A260/230 obtenidas por espectrofotometría: la primera es un indicador para la contaminación por proteínas, mientras que la segunda indica la contaminación de inhibidores como polisacáridos, fenoles y detergentes. Determinando valores mayores a 1,8 como viables para la mayoría de aplicaciones (DeNovix, 2019).

2.3.14. Integridad del ADN

La integridad del ADN se define como el grado en el que la molécula de ADNg mantiene un buen tamaño y no está fragmentado, se evalúa cualitativamente por electroforesis en gel de agarosa, en donde un ADN con buena integridad forma una banda de alto peso molecular, y un ADN degradado se visualiza como un barrido difuso (García, y otros, 2020).

2.3.15. Muestra fresca de *Pseudococcidae*

Se considera muestra fresca de *Pseudococcidae* al grupo de insectos recolectados en campo y procesados en un intervalo corto de tiempo, de tal manera que la degradación del ADN por nucleasas endógenas sea mínima y el ADN obtenido represente la calidad adecuada que se espera en condiciones rutinarias de diagnóstico (Masoomi-Aladizgeh, y otros, 2023).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Nivel de investigación

La investigación se desarrolla bajo un enfoque cuantitativo con finalidad aplicada y un diseño experimental de laboratorio. El estudio se centra en la comparación de dos protocolos de extracción de ADN genómico, CTAB modificado y SDS + NaCl, aplicados a individuos de la familia *Pseudococcidae* bajo condiciones controladas y mediante variables susceptibles de medición numérica. Este planteamiento metodológico permite la formulación de hipótesis y el análisis objetivo de la relación entre el tipo de protocolo empleado y los resultados obtenidos en concordancia con los principios de la investigación cuantitativa orientada al estudio de relaciones causales entre variables (Hernández-Sampieri & Mendoza, 2018).

En cuanto a su alcance, el estudio se ubica en un nivel descriptivo, ya que busca caracterizar el comportamiento de cada protocolo de extracción a partir de indicadores específicos tales como el rendimiento del ADN (ng/ μ L), los índices de pureza (relaciones A260/280 y A260/230) y la integridad del ADN observada mediante electroforesis en gel de agarosa. Este tipo de caracterización detallada del desempeño de métodos de extracción es frecuente en investigaciones orientadas a la optimización de protocolos para insectos de pequeño tamaño, en las cuales las condiciones de lisis y purificación deben adaptarse a las particularidades biológicas del organismo de estudio (Nascimento, y otros, 2025).

De manera complementaria, la investigación presenta un alcance explicativo dado que pretende determinar en qué medida el protocolo de extracción utilizado actúa como un factor

determinante sobre la cantidad, calidad e integridad del ADN genómico obtenido. Para ello, se emplea un diseño experimental con control de las condiciones de trabajo y un análisis estadístico de las diferencias entre tratamientos siguiendo el enfoque de estudios comparativos que evalúan el impacto de distintos métodos de extracción en la idoneidad del ADN para aplicaciones moleculares posteriores (Stazione, Lantschner, Corley, & Soliani, 2024).

Finalmente, por su orientación práctica, el estudio se clasifica como aplicado ya que tiene como propósito seleccionar el protocolo de extracción que proporcione el mejor equilibrio entre rendimiento, pureza e integridad del ADN para su utilización en el diagnóstico molecular rutinario de *Pseudococcidae*. La disponibilidad de ADN de adecuada calidad resulta fundamental para herramientas de identificación molecular, como el código de barras de ADN, ampliamente empleado en la delimitación e identificación de especies de cochinillas harinosas en contextos agrícolas y taxonómicos (Wang, y otros, 2016).

3.2. Diseño de investigación

La investigación opta por un diseño experimental de laboratorio, con enfoque cuantitativo, en el cual se maneja de forma directa una variable independiente (el protocolo de extracción de ADN genómico: CTAB modificado y SDS + NaCl) y se evalúan sus efectos sobre variables dependientes objetivamente medibles, como el rendimiento, la pureza y la integridad del ADN obtenido. Este tipo de diseño se caracteriza por el control riguroso de las condiciones experimentales y la aplicación de tratamientos definidos a las unidades experimentales, lo que permite establecer relaciones de causa y efecto con mayor grado de solidez en comparación con enfoques no experimentales (Hernández-Sampieri & Mendoza, 2018).

Dentro de este marco metodológico, el estudio se estructura como un experimento comparativo entre dos tratamientos, en el cual grupos de muestras de *Pseudococcidae* son procesados mediante uno u otro protocolo de extracción, manteniendo constantes las condiciones de laboratorio, tales como el uso de los mismos equipos, reactivos, tiempos de incubación y volúmenes de trabajo. Este planteamiento es coherente con los diseños experimentales empleados en Biología Molecular, donde resulta habitual comparar distintos métodos de extracción de ADN con el fin de determinar cuál proporciona material genético con mayor rendimiento y calidad para análisis posteriores, como la amplificación por PCR o la secuenciación (Green & Sambrook, 2012).

Asimismo, el diseño del estudio se considera aplicativo y confirmatorio, ya que no se limita a describir el comportamiento de los protocolos evaluados, sino que busca contrastar una hipótesis previamente planteada sobre su desempeño en términos de cantidad y calidad del ADN genómico obtenido. En este contexto, el uso de réplicas experimentales, el control de posibles fuentes de variación y la aplicación de análisis estadísticos para la comparación entre tratamientos constituyen elementos centrales del diseño experimental, en concordancia con los principios metodológicos usados para estudios de laboratorio orientados a la optimización de procedimientos analíticos (Montgomery, 2022).

3.3. Diseño del experimento

El diseño de este experimento se basa en una estructura lógica en la cual se organizan y controlan las condiciones en las que se desarrolla una investigación experimental, con el fin de analizar el efecto de uno o más factores sobre determinadas variables de respuesta. Según Hernández-Sampieri y Mendoza (2018), el diseño experimental posibilita establecer comparaciones bajo condiciones controladas minimizando la influencia de factores externos que causan sesgos en los resultados.

En este estudio en específico, se implementó un diseño completamente al azar (DCA), ya que se analizó un solo factor de interés, correspondiente al protocolo de extracción de ADNg con dos niveles: CTAB modificado y SDS + NaCl. Este diseño es adecuado para unidades experimentales homogéneas y condiciones experimentales constantes lo que permite aludir las diferencias en los resultados exclusivamente al tratamiento aplicado (Montgomery, 2022).

Ambos protocolos de extracción se llevaron a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio y utilizando durante todo el proceso el mismo equipo, reactivos, operador y protocolos estandarizados, con el propósito de disminuir la variabilidad en el experimento. La distribución de las muestras en cada protocolo fue de manera aleatoria para así garantizar la independencia en las observaciones del diseño experimental.

Este diseño permitió comparar el rendimiento de los dos protocolos en términos de cantidad, calidad e integridad del ADNg extraído, asegurando así la validez interna del estudio y la confiabilidad de los resultados.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La recolección de datos se realizó mediante dos métodos: análisis documental y experimentación en laboratorio.

En primera instancia, se ejecutó un análisis documental guiado a sostener el diseño metodológico y a contextualizar los resultados. Para esto se revisaron artículos científicos, tesis y protocolos técnicos sobre extracción de ADN en insectos, diagnóstico molecular y evaluación de ADNg con la ayuda de bases de datos académicas. Esta revisión permitió establecer métodos y protocolos optimizados en múltiples sistemas biológicos y contrastar los resultados obtenidos específicamente en *Pseudococcidae* con la teoría disponible.

Luego, se estableció una técnica principal para la recolección de datos empíricos, el ensayo experimental en el laboratorio, donde se aplicaron los dos protocolos de extracción ya establecidos (CTAB modificado y SDS + NaCl) a las unidades experimentales de *Pseudococcidae*. Para esta fase se utilizaron equipos e instrumentos básicos de un laboratorio de Biología Molecular orientados a la obtención de ADNg, los cuales ayudaron a estandarizar los protocolos a utilizar durante todo el estudio.

La cuantificación y evaluación de la calidad del ADN obtenido se realizó mediante dos instrumentos analíticos: un espectrofotómetro de micro volúmenes (NanoDrop) y un sistema completo de electroforesis. El espectrofotómetro permitió obtener datos acerca de la concentración de ADNg y las tasas A260/280 y A260/230, mientras que la electroforesis permitió evaluar cualitativamente la integridad del ADN a partir de la observación de las bandas en gel de agarosa, siguiendo así criterios comunes en controles de calidad de ADN para aplicaciones moleculares (Rofael, 2022).

Por último, para el registro de los datos experimentales se utilizaron hojas de cálculo digitales que permitieron organizar los valores obtenidos de concentración, tasas de pureza y categoría de integridad asignada a cada réplica.

3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

La información generada a partir de cada extracción de ADN fue registrada de manera sistemática en una hoja de cálculo digital, en la cual cada observación se identificó según el protocolo de extracción empleado, la condición experimental (con o sin tratamiento con RNasa), el tipo de muestra (muestra biológica o control negativo) y la réplica correspondiente. Esta organización permitió construir una matriz de datos en la que cada fila representó una unidad

experimental independiente y cada columna una variable de respuesta, incluyendo la concentración de ADN genómico, las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230, y la evaluación de la integridad del ADN. Sobre esta base se desarrolló el análisis estadístico descriptivo, mediante el cálculo de medidas de tendencia central y dispersión, tales como medias, desviación estándar, valores mínimos y máximos, error estándar y coeficiente de variación, así como la elaboración de gráficos exploratorios que facilitaron la visualización del comportamiento de los protocolos evaluados.

Con el fin de asegurar que el análisis inferencial se sustentara en una cuantificación real del ADN genómico, se consideraron exclusivamente los datos correspondientes a las muestras biológicas tratadas con RNasa (+RNasa). Esta decisión metodológica se adoptó para evitar la sobreestimación de la concentración asociada a la presencia de ARN en las mediciones espectrofotométricas.

Antes de realizar las comparaciones inferenciales, se examinó el comportamiento de las variables cuantitativas mediante la prueba de Shapiro-Wilk aplicada por grupo, complementada con una revisión gráfica de los datos, considerando el tamaño muestral reducido del experimento. De manera adicional, se evaluó la homogeneidad de varianzas entre protocolos mediante la prueba de Levene, cuyos resultados se utilizaron con fines descriptivos y de contextualización estadística. Para contrastar las diferencias entre los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl se aplicó la prueba t de *Student* para muestras independientes, de forma separada para cada variable de interés. Este procedimiento es apropiado para diseños experimentales simples de laboratorio en los que se comparan dos tratamientos bajo condiciones controladas, y permite identificar diferencias estadísticamente significativas entre protocolos sin basar la interpretación únicamente en la inspección visual de los datos (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

3.6. Protocolo a implementar

3.6.1. Recolección y preservación de las muestras

Los ejemplares de *Pseudococcidae* se recolectaron de una sola planta hospedera seleccionada, la cual presentaba una infestación visible y constante. Los individuos se recogieron con un pistilo estéril desde las hojas, tallos y demás órganos de la planta infestados y sin signos de contaminación por hongos u otros microorganismos, almacenándolos en microtubos rotulados con el número de muestra y la fecha. El material se trasladó al laboratorio inmediatamente, en donde se mantuvo en refrigeración con el fin de minimizar la degradación del ADN por actividad de nucleasas, siguiendo las recomendaciones comunes para insectos pequeños utilizados en estudios moleculares (Wang, Dai, Tian, Wan, & Zhang, 2019).

Figura 1.

Recolección de Pseudococcidae de planta hospedera



Nota. La imagen muestra una hoja de la planta hospedera con signos visibles de infestación por insectos de la familia *Pseudococcidae*. La muestra fue recolectada directamente desde el tejido

vegetal mediante el uso de una punta estéril, con el fin de evitar contaminación cruzada y preservar la integridad del material biológico. Elaboración propia.

3.6.2. Preparación de unidades experimentales

Las cochinillas recolectadas se agruparon en *pools* ya estandarizados, en donde tres individuos correspondieron a cada unidad experimental con un peso aproximado de 3 mg. Cada *pool* se colocó en microtubos de 1,5 mL y se asignaron aleatoriamente a uno de los dos protocolos de extracción. Esta organización permitió que la variación observada responda al efecto del protocolo y a la variabilidad biológica entre *pools*, en concordancia con estudios de extracción de ADN en este tipo de insectos los cuales trabajan con pocos individuos por muestra (Sahu , Thangaraj, & Kathiresan, 2012). Para ambos protocolos se trabajó con dos condiciones iguales: una con un tratamiento de RNasa (+RNasa) utilizada para el análisis comparativo principal y otra sin RNasa (-RNasa) conservada para evidenciar el efecto de la contaminación por ARN sobre las lecturas en el espectrofotómetro.

Figura 2.

Pools de Pseudococcidae previo a su separación



Nota. Se observan microtubos que contienen las muestras recolectadas, agrupadas de manera preliminar antes de ser separadas en los respectivos *pools* de extracción. Elaboración propia.

3.6.3. Protocolo de extracción con CTAB modificado

El protocolo CTAB modificado usa un detergente catiónico que favorece la eliminación de polisacáridos y fenoles. Para cada *pool* de cochinillas se usa 500 μ L de *buffer* CTAB precalentado a 65 °C, formulado a 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA y 1,4 NaCl, al cual se le añadió justo antes β -mercaptoetanol al 0,2% como agente reductor. Tras una homogenización y lisis física, se añadió Proteinasa K y se incubó entre 30 y 60 minutos a 65 °C con agitaciones suaves periódicas. A las muestras +RNasa se les añadió 5 μ L de RNasa (10 mg/mL) y se les incubó a 37 °C durante 30 minutos, mientras que en las muestras -RNasa se omitió este paso. Para remover proteínas y restos de lípidos se adicionó un volumen equivalente de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó hasta formar una emulsión y se centrifugó para formar una fase superior acuosa

que contiene el ADN, una interfase proteica y una fase inferior orgánica. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al que se le añadió entre 0,6 y 1 volumen de isopropanol frío, para favorecer la precipitación del ADN se realizó una incubación de toda la noche a -20°C y una posterior centrifugación. El *pellet* resultante se lavó con etanol al 70%, se dejó evaporar completamente y se resuspendió en $50\ \mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas. Este procedimiento retoma la lógica de los protocolos CTAB utilizados en matrices con alta carga de polisacáridos y fenoles, ampliamente documentados para tejidos vegetales y adaptados también a insectos que se alimentan de savia (Schenk, Becklund, Carey, & Fabre, 2023). Para garantizar la validez de las extracciones y verificar la estabilidad de los reactivos se realizaron controles negativos, es decir, sin adición de tejido, en ambas variantes del protocolo.

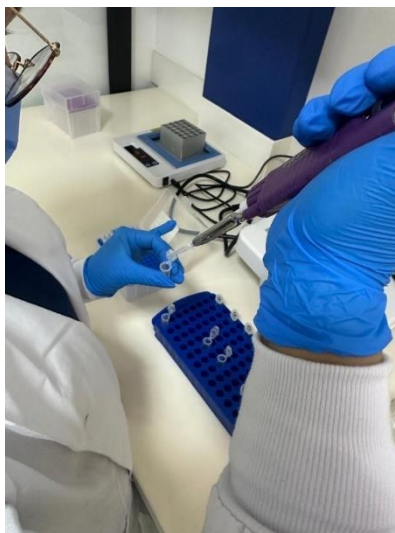
3.6.4. Protocolo de extracción con SDS + NaCl

El protocolo SDS + NaCl se basa en una lisis fuerte por el uso de un detergente aniónico y precipitación de proteínas por “*salting-out*”, seleccionado por su sencillez y buen rendimiento reportado específicamente en *Pseudococcidae* y otros insectos de cuerpo blando. En este caso los *pools* de tres cochinillas se homogenizaron con $600\ \mu\text{L}$ de un *buffer* de lisis SDS compuesto por 1% SDS, 50 mM Tris-HCL pH 8, 50 mM EDTA y 100 mM NaCl. Se añadió proteinasa K y se incubó a $55\ ^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas con inversiones periódicas hasta lograr la disolución del tejido. A las muestras +RNasa se les incorporó $5\ \mu\text{L}$ de RNasa (10 mg/mL) y se incubaron a $37\ ^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, en las muestras -RNasa se omitió este paso. Se añadió aproximadamente la tercera parte del volumen total de NaCl 5 M, se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo durante 10 minutos para favorecer la precipitación de proteínas y otros complejos, seguidamente se centrifugó y se recuperó el sobrenadante limpio en un nuevo tubo. El ADN se precipitó con la adición de un volumen total igual de isopropanol frío y con una incubación a $-20\ ^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Tras

una nueva centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con etanol al 70%, para finalmente resuspenderlo en 50 μ L de agua libre de nucleasas. Este esquema sigue el principio de los métodos de extracción con SDS y *salting-out* descritos para insectos de cuerpo blando, donde se ha mostrado que proporcionan rendimientos elevados de ADN adecuado para PCR (Wang, Dai, Tian, Wan, & Zhang, 2019). Para garantizar la validez de las extracciones y verificar la estabilidad de los reactivos se realizaron controles negativos, es decir, sin adición de tejido, en ambas variantes del protocolo.

Figura 3.

Implementación de ambos protocolos para la extracción de ADNg



Nota. Se observa la realización de distintas etapas correspondientes a ambos protocolos de extracción de ADN evaluados en el estudio. Elaboración propia.

3.6.5. Cuantificación y evaluación de pureza por espectrofotometría

La cuantificación y estimación de pureza del ADN_g obtenido se llevó a cabo con un espectrofotómetro de microvolúmenes (NanoDrop), para cada muestra se midió la absorbancia a 260, 230 y 280 nm, es decir, que el equipo calculó automáticamente la concentración de ADN (ng/ μ L) y las tasas A260/280 y A260/230. Se consideraron como rangos de referencia valores de A260/280 cercanos a 1,8 y A260/230 entre 2,0 y 2,2 para muestras de ADN relativamente libre de proteínas y de inhibidores, tal como se ha establecido en estudios de validación de cuantificación espectrofotométrica de ADN y en documentos técnicos específicos para el uso de NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, 2010; García, y otros, 2020).

Figura 4.

Equipo utilizado para la evaluación del ADN_g obtenido (NanoDrop)



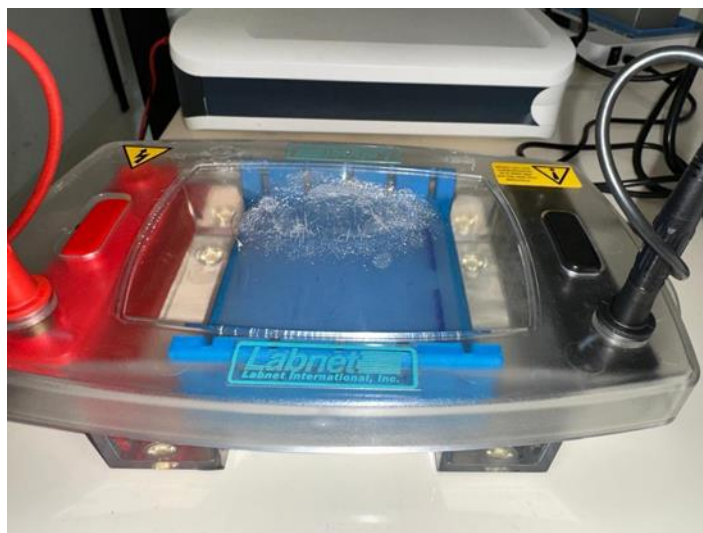
Nota. Se muestra el equipo NanoDrop utilizado para la cuantificación y evaluación de la pureza del ADN extraído, mediante la medición de la concentración y de las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230. Elaboración propia.

3.6.6. Evaluación de la integridad del ADNg mediante electroforesis

Para analizar la integridad del ADNg obtenido se preparó un gel de agarosa al 1% con *buffer* TAE 1X, en donde se cargaron alícuotas estandarizadas de cada muestra y un marcador de peso molecular de 1 kb. Se efectuó una corrida a 90 voltios durante 30 a 40 minutos, hasta que la migración de las muestras alcanzó una distancia suficiente para distinguir el patrón de bandas. Una vez finalizada la electroforesis, se visualizó el gel en un transiluminador para registrar el resultado con la cámara y el programa ajustado al sistema. El ADN íntegro se observó como una banda compacta de alto peso molecular cercana al pozo, mientras que el ADN degradado se manifestó como un barrido o cola de fragmentos hacia la parte inferior del gel, siguiendo los criterios descritos en guías de electroforesis de ácidos nucleicos (Fierro, 2026).

Figura 5.

Montaje de la electroforesis utilizada para analizar la integridad del ADNg obtenido



Nota. La imagen corresponde a la cámara de electroforesis ensamblada durante la corrida del gel de agarosa, empleada para la evaluación de la integridad del ADN. Elaboración propia.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Enfoque general del análisis de resultados

El presente capítulo expone y analiza los resultados obtenidos experimentalmente de los protocolos de extracción de ADN genómico CTAB modificado y SDS + NaCl, incluyendo sus dos variantes metodológicas (con y sin tratamiento con RNasa), aplicadas a muestras frescas de *Pseudococcidae*.

El análisis inicia con una evaluación descriptiva individual de cada protocolo y variante en términos de cantidad, calidad e integridad del ADN, para posteriormente abordar la comparación inferencial entre protocolos bajo la condición metodológicamente válida (+RNasa). Esta secuencia permite diferenciar con claridad los efectos propios del método de extracción de aquellos asociados a artefactos analíticos, como la presencia de ARN coextraído.

Los controles negativos se incluyen sistemáticamente como parte del control de calidad experimental, con el objetivo de validar la ausencia de contaminación cruzada; sin embargo, estos no se consideran unidades experimentales y, por tanto, no forman parte de los análisis inferenciales.

4.2. Evaluación descriptiva de los protocolos de extracción

4.2.1. Protocolo CTAB modificado con tratamiento con RNasa (+RNasa)

Los resultados descriptivos del protocolo CTAB modificado con tratamiento con RNasa (tabla 1) evidencian una recuperación moderada de ADN genómico, acompañada de índices de pureza consistentes con los valores teóricos esperados para ADN de buena calidad. Las relaciones

A260/280 próximas a 1,8 indican una remoción eficiente de proteínas, mientras que los valores A260/230, cercanos o superiores a 2,0, sugieren una eliminación adecuada de polisacáridos, fenoles y otros compuestos derivados de la dieta vegetal del insecto.

Tabla 1.

Estadísticos descriptivos del ADNg obtenido mediante el protocolo CTAB modificado bajo condición +RNasa

Protocolo CTAB modificado (+RNasa)								
Variable	n	Media	DE	EE	Min	Max	Rango	CV (%)
Concentración (Muestras)	3	69.6	13.6	7.84	56.9	83.9	27.0	19.5
A260/280 (Muestras)	3	1.85	0.0569	0.0328	1.80	1.91	0.11	3.08
A260/230 (Muestras)	3	1.98	0.291	0.168	1.70	2.28	0.58	14.7
Concentración (Controles negativos)	2	0.30	0.566	0.40	-0.10	0.70	0.80	189.0
A260/280 (Controles negativos)	2	0.265	0.559	0.395	-0.13	0.66	0.79	211.0
A260/230 (Controles negativos)	2	0.625	0.488	0.345	0.28	0.97	0.69	78.1

En cuanto a la calidad, las relaciones A260/280 cercanas a 1,8 indican una eliminación eficiente de proteínas, mientras que los valores A260/230, en su mayoría próximos o superiores a 2,0, sugieren una remoción adecuada de polisacáridos, fenoles y otros compuestos inhibidores de la PCR. Este comportamiento es consistente con el fundamento químico del CTAB como detergente catiónico, cuya capacidad para formar complejos insolubles con polisacáridos en presencia de altas concentraciones salinas facilita su separación del ADN durante la purificación. (Sahu , Thangaraj, & Kathiresan, 2012; Schenk, Becklund, Carey, & Fabre, 2023).

Desde una perspectiva biológica, este resultado adquiere especial relevancia en *Pseudococcidae*, insectos fitófagos cuya dieta basada en savia vegetal favorece la acumulación de azúcares complejos y metabolitos fenólicos que actúan como inhibidores de reacciones enzimáticas. La eficacia del CTAB para mitigar este problema ha sido ampliamente documentada en matrices vegetales y, de forma creciente, en insectos asociados a plantas hospedantes ricas en metabolitos secundarios (Rao & Doddamane, 2022).

Los controles negativos correspondientes a esta variante presentaron concentraciones cercanas a cero y valores de absorbancia inconsistentes, lo que confirma la ausencia de contaminación cruzada y respalda la validez interna del procedimiento experimental.

4.2.2. Protocolo CTAB modificado sin tratamiento con RNasa (-RNasa)

En contraste, la omisión del tratamiento con RNasa en el protocolo CTAB modificado (tabla 2) produjo un incremento marcado en la concentración aparente de ácidos nucleicos. Este aumento no refleja una mayor eficiencia real del protocolo, sino la coextracción de ARN, fenómeno ampliamente documentado cuando no se incluye una digestión específica de este ácido nucleico (Green & Sambrook, 2012).

Tabla 2.

Estadísticos descriptivos del ADNg obtenido mediante el protocolo CTAB modificado bajo condición -RNasa

Protocolo CTAB modificado (-RNasa)								
Variable	n	Media	DE	EE	Min	Max	Rango	CV (%)
Concentración (Muestras)	3	606.0	139.0	80.3	466.0	744.0	278.0	23.0
A260/280 (Muestras)	3	2.07	0.0153	0.00882	2.06	2.09	0.03	0.74
A260/230 (Muestras)	3	2.31	0.0115	0.00667	2.30	2.32	0.02	0.50
Concentración (Controles negativos)	2	-0.05	0.354	0.25	-0.30	0.20	0.50	-707.0
A260/280 (Controles negativos)	2	-0.11	0.594	0.42	-0.53	0.31	0.84	-540.0
A260/230 (Controles negativos)	2	1.12	0.926	0.655	0.46	1.77	1.31	83.1

Aunque las relaciones A260/280 y A260/230 permanecieron dentro de rangos considerados aceptables, estos valores deben interpretarse con cautela. La contribución del ARN a la señal espectrofotométrica puede generar una falsa impresión de pureza, enmascarando posibles

contaminaciones o degradación del ADN genómico. En este sentido, diversos autores coinciden en que la cuantificación de ADN sin tratamiento previo con RNasa carece de validez para comparaciones metodológicas, especialmente cuando los resultados se destinan a aplicaciones *downstream* exigentes como PCR, *barcoding* o secuenciación (Schrader, Née Schielke, Ellerbroek, & Johne, 2012).

Estos resultados confirman que, si bien el protocolo CTAB modificado en la condición - RNasa maximiza la recuperación total de ácidos nucleicos, no proporciona una estimación fiable del ADN genómico, lo que justifica la exclusión de esta variante del análisis inferencial.

4.2.3. Protocolo SDS + NaCl con tratamiento con RNasa (+RNasa)

La evaluación del protocolo SDS + NaCl con tratamiento con RNasa (tabla 3) permitió la obtención de ADN genómico cuantificable; sin embargo, no superó al protocolo CTAB modificado cuando se analizan de forma conjunta la cantidad, la calidad y la integridad del ADN obtenido.

Tabla 3.

Estadísticos descriptivos del ADNg obtenido mediante el protocolo SDS + NaCl bajo condición +RNasa

Protocolo SDS + NaCl (+RNasa)								
Variable	n	Media	DE	EE	Min	Max	Rango	CV (%)
Concentración (Muestras)	3	20.3	5.37	3.10	14.1	23.6	9.5	26.5
A260/280 (Muestras)	3	1.77	0.0379	0.0219	1.74	1.81	0.07	2.14
A260/230 (Muestras)	3	1.77	0.209	0.121	1.53	1.91	0.38	11.8
Concentración (Controles negativos)	2	0.7	0.424	0.30	0.4	1.0	0.6	60.6
A260/280 (Controles negativos)	2	1.65	0.849	0.60	1.05	2.25	1.20	51.4
A260/230 (Controles negativos)	2	0.67	0.0424	0.0300	0.64	0.70	0.06	6.33

Si bien el SDS es un detergente aniónico con una elevada capacidad de lisis celular, su menor selectividad frente a polisacáridos, sales y otros compuestos derivados de la matriz biológica se reflejó en una mayor variabilidad de los índices de pureza, particularmente en la relación A260/230. Este comportamiento ha sido descrito previamente en protocolos basados en SDS y se asocia a una mayor probabilidad de coextracción de inhibidores cuando se prioriza la lisis intensa sobre la purificación selectiva (Perumal, Zhang, Morono, Inagaki, & Wang, 2016).

En el caso específico de *Pseudococcidae*, cuyos tejidos presentan una elevada carga de metabolitos derivados de la planta hospedera, esta limitación adquiere especial relevancia. Los resultados obtenidos indican a primera instancia que, aun con el tratamiento con RNasa, el protocolo SDS + NaCl no logra el mismo nivel de control sobre contaminantes que el protocolo CTAB modificado, lo que compromete el equilibrio global entre rendimiento y calidad.

4.2.4. Protocolo SDS + NaCl sin tratamiento con RNasa (-RNasa)

La variante SDS + NaCl sin tratamiento con RNasa (tabla 4) presentó las concentraciones aparentes más elevadas del estudio. No obstante, este incremento responde casi exclusivamente a la acumulación de ARN coextraído, efecto que se ve amplificado por la elevada eficiencia de lisis del SDS.

Tabla 4.

Estadísticos descriptivos del ADNg obtenido mediante el protocolo SDS + NaCl bajo condición -RNasa

Protocolo SDS + NaCl (-RNasa)								
Variable	n	Media	DE	EE	Min	Max	Rango	CV (%)
Concentración (Muestras)	3	648.0	88.0	50.8	547.0	703.0	156.0	13.6
A260/280 (Muestras)	3	2.00	0.0404	0.0233	1.96	2.04	0.08	2.02
A260/230 (Muestras)	3	1.96	0.161	0.0929	1.79	2.11	0.32	8.21
Concentración (Controles negativos)	2	0.25	0.212	0.15	0.10	0.40	0.30	84.9
A260/280 (Controles negativos)	2	0.57	0.339	0.24	0.33	0.81	0.48	59.5
A260/230 (Controles negativos)	2	-2.52	6.10	4.31	-6.84	1.79	8.63	-242.0

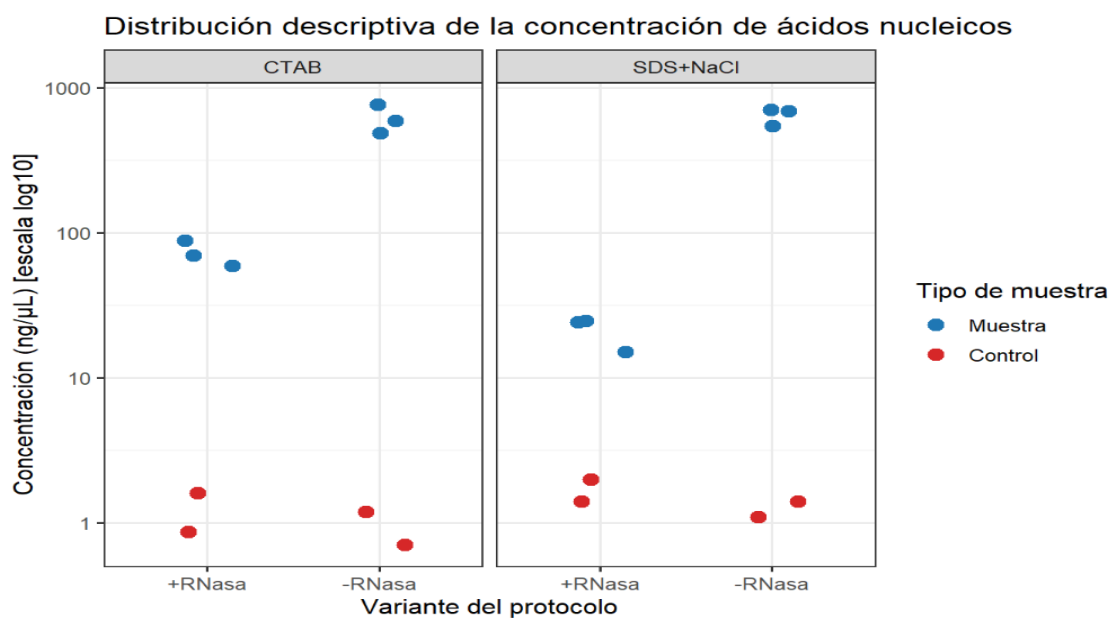
Si bien esta característica podría resultar útil en aplicaciones orientadas a la obtención de ARN total, no es adecuada para estudios centrados en ADN genómico, ya que dificulta la interpretación de los resultados y compromete la comparación objetiva entre protocolos.

4.2.5. Análisis descriptivo

La figura 6 generada a partir de los datos experimentales permite visualizar de forma clara el comportamiento diferencial de los cuatro protocolos evaluados. La separación nítida entre controles negativos y muestras biológicas confirma la ausencia de contaminación, mientras que la diferencia entre condiciones +RNasa y -RNasa evidencia el papel crítico de este tratamiento en la cuantificación real del ADN genómico. Asimismo, se observa que el protocolo CTAB modificado +RNasa presenta una distribución más homogénea y consistente de los valores obtenidos.

Figura 6.

Distribución de la concentración de ácidos nucleicos obtenidos mediante los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl, con y sin tratamiento con RNasa



Nota. Gráfico de puntos que representa la distribución de la concentración de ácidos nucleicos obtenidos mediante los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl, con y sin tratamiento con RNasa. Se incluyen las muestras experimentales y los controles negativos. Elaboración propia.

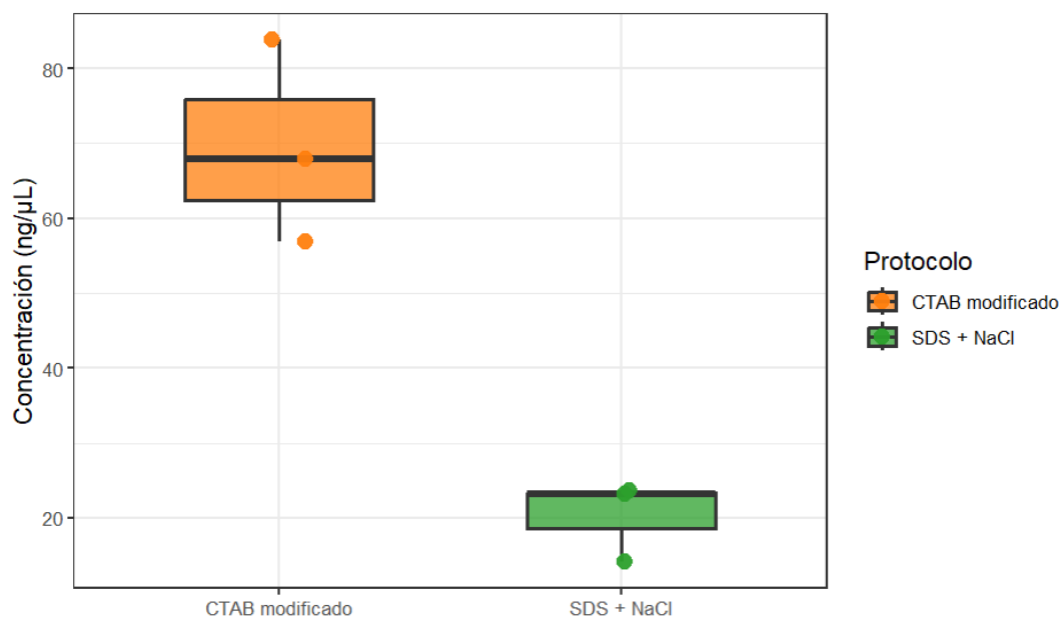
4.3. Análisis comparativo mediante diagramas de caja

Para complementar el análisis y facilitar una interpretación visual de las diferencias entre protocolos, se emplearon diagramas de caja (*boxplots*) para comparar la distribución de los valores obtenidos en las muestras tratadas con RNasa (+RNasa) correspondientes a los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl. Este tipo de representación gráfica permite evaluar simultáneamente la tendencia central, la dispersión de los datos y la presencia de valores atípicos, aspectos particularmente relevantes en estudios experimentales con tamaños muestrales reducidos y alta variabilidad biológica, como ocurre frecuentemente en investigaciones con insectos recolectados en campo (Weissgerber, Milic, Winham, & Garovic, 2015). En todos los casos, los diagramas se construyeron considerando exclusivamente muestras biológicas, excluyendo controles negativos, con el propósito de reflejar únicamente el comportamiento real del ADNg extraído.

El *boxplot* de concentración (figura 7) evidencia una separación clara entre protocolos, con valores consistentemente más altos para CTAB modificado en comparación con SDS + NaCl. La posición elevada de la mediana y el escaso solapamiento entre rangos intercuartílicos concuerdan con la diferencia estadísticamente significativa detectada en la prueba t de *Student*. Este patrón visual confirma que CTAB modificado permite una recuperación superior y más consistente de ADNg bajo la condición +RNasa.

Figura 7.

Diagrama de caja de la concentración de ADNg (ng/ μ L) obtenida mediante los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl (+RNasa)

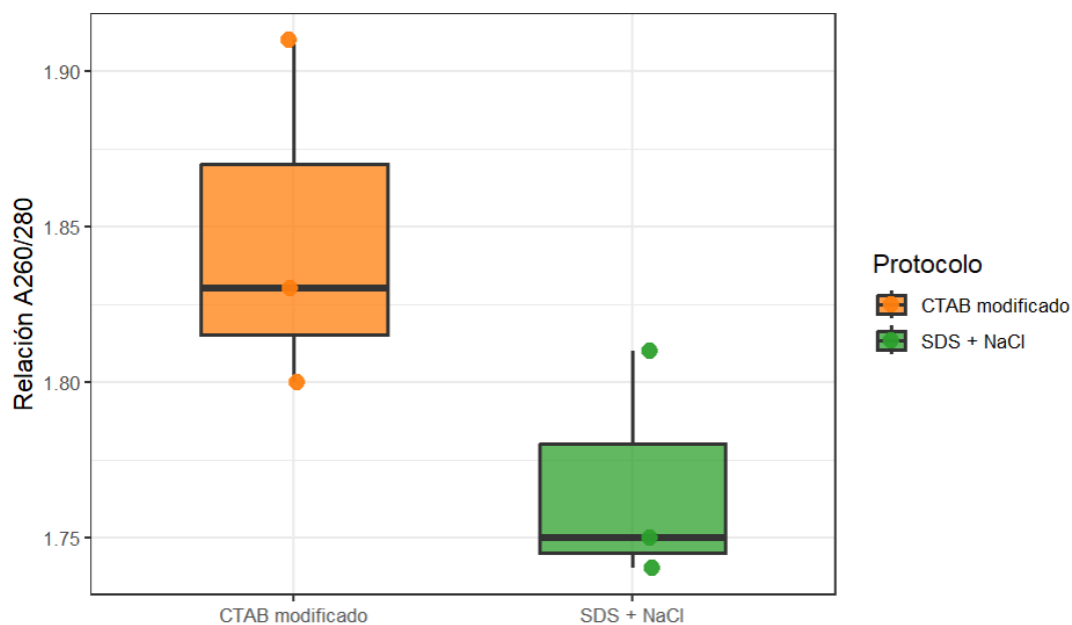


Nota. Boxplot que muestra la comparación de la concentración de ADN (ng/ μ L) entre los protocolos evaluados, mostrando la distribución de los datos, mediana y rangos intercuartílicos. Elaboración propia.

En la relación A260/280 se observa un amplio solapamiento entre ambos protocolos, con medianas próximas y rangos intercuartílicos similares (figura 8). No obstante, los valores de CTAB modificado muestran una ligera mayor concentración alrededor del rango óptimo, sugiriendo un comportamiento más homogéneo entre réplicas.

Figura 8.

Diagrama de caja de la relación A260/280 del ADNg extraído con los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl (+RNasa)

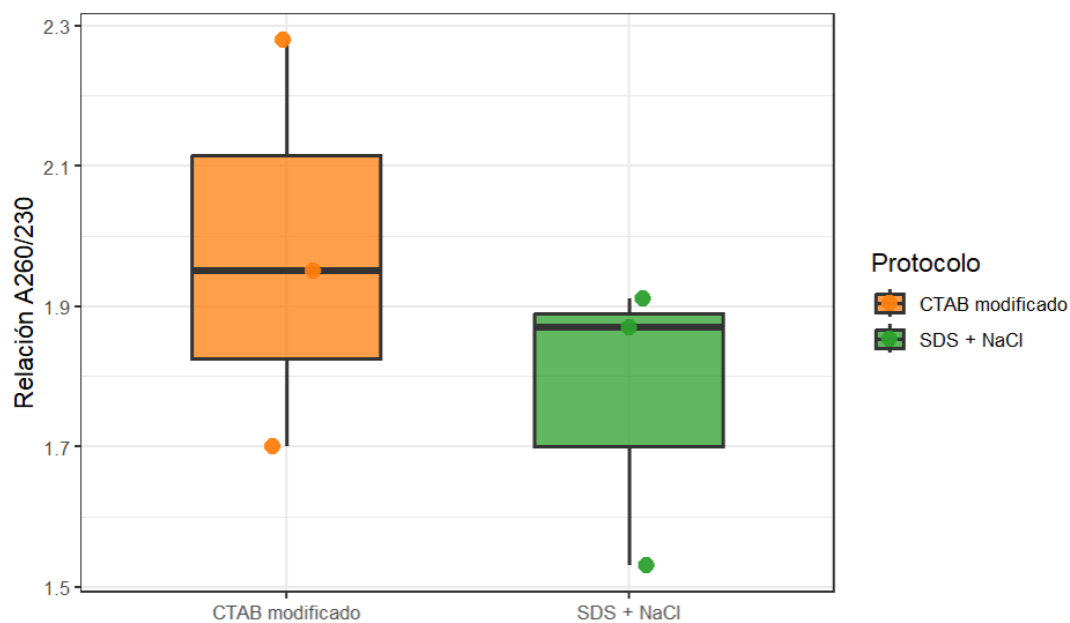


Nota. *Boxplot* correspondiente a la comparación de la relación de absorbancia A260/280 entre los protocolos de extracción, mostrando la distribución de los datos, mediana y rangos intercuartílicos. Elaboración propia.

El *boxplot* de A260/230 presenta una superposición considerable entre protocolos, lo que demostraría una falta de diferencias significativas (figura 8). Sin embargo, CTAB modificado exhibe una mediana ligeramente superior, con valores más cercanos al rango considerado adecuado para ADN con baja carga de inhibidores. Esta tendencia, aunque no significativa, respalda la mayor eficiencia teórica del CTAB en la remoción de contaminantes propios de insectos fitófagos.

Figura 9.

Diagrama de caja de la relación A260/230 del ADNg extraído con los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl (+RNasa)



Nota. Boxplot que representa la comparación de la relación A260/230 entre los protocolos de extracción evaluados, mostrando la distribución de los datos, mediana y rangos intercuartílicos. Elaboración propia.

4.4. Análisis estadístico inferencial entre protocolos (+RNasa)

El análisis estadístico inferencial se realizó con el objetivo de comparar directamente el desempeño de los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl, considerando únicamente las muestras tratadas con RNasa (+RNasa). Esta decisión metodológica se fundamenta en que el tratamiento con RNasa permite una cuantificación más precisa del ADN genómico, evitando la sobreestimación asociada a la presencia de ARN, tal como se evidenció en la etapa descriptiva del estudio.

Para este análisis se trabajó con $n = 3$ réplicas biológicas por protocolo, razón por la cual las pruebas estadísticas se interpretaron de manera cuidadosa, priorizando la integración de la evidencia estadística con el sustento biológico y metodológico.

4.4.1. Evaluación de supuestos estadísticos

4.4.1.1. Normalidad de los datos (prueba de Shapiro-Wilk)

La normalidad de las variables concentración de ADN, A260/280 y A260/230 se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk de forma independiente para cada protocolo. Los resultados obtenidos (tabla 5) indican que no se detectaron desviaciones severas de la normalidad en ninguno de los casos evaluados.

Tabla 5.

Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para las variables concentración, A260/280 y A260/230 en muestras tratadas con RNasa

Variable	Protocolo de extracción	Estadístico W	p-valor
A260/230	SDS + NaCl	0.82798	0.18321
A260/230	CTAB modificado	0.99370	0.84823
A260/280	SDS + NaCl	0.85465	0.25297
A260/280	CTAB modificado	0.93557	0.50984
Concentración (ng/μL)	SDS + NaCl	0.78152	0.07111
Concentración (ng/μL)	CTAB modificado	0.98957	0.80466

No obstante, es importante destacar que, debido al tamaño muestral reducido ($n = 3$), la prueba de Shapiro-Wilk posee una potencia estadística limitada, por lo que sus resultados deben interpretarse como exploratorios y no como una confirmación absoluta de normalidad. En estudios experimentales con bajo número de réplicas, la literatura recomienda utilizar estas pruebas como herramientas diagnósticas complementarias, sin que constituyan un criterio excluyente para la aplicación de pruebas paramétricas (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

4.4.1.2. Homogeneidad de varianzas (prueba de Levene)

La homogeneidad de varianzas entre protocolos se evaluó mediante la prueba de Levene (tabla 6). Los resultados obtenidos indican que no se observaron diferencias marcadas en la variabilidad de las variables analizadas entre CTAB modificado y SDS + NaCl.

Tabla 6.

Resultados de la prueba de Levene para la evaluación de homogeneidad de varianzas entre protocolos (+RNasa)

Variable	gl₁	gl₂	Estadístico F	p-valor
A260/230	1	4	0.2078	0.6722
A260/280	1	4	0.2000	0.6779
Concentración (ng/μL)	1	4	1.0982	0.3538

Al igual que en el caso de la normalidad, la interpretación de la prueba de Levene debe realizarse con cautela debido al tamaño muestral reducido. Sin embargo, la ausencia de evidencias claras de heterocedasticidad sugiere que la comparación entre medias puede realizarse de forma

razonable mediante una prueba t de *Student*, sin que la varianza desigual represente un sesgo crítico en este contexto experimental.

4.4.2. Comparación inferencial entre protocolos mediante la prueba t de Student

Con el propósito de contrastar de manera directa el desempeño de los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl bajo la condición +RNasa (solo muestras biológicas; $n = 3$ por protocolo), se aplicó una prueba t de *Student* para muestras independientes. Para facilitar la lectura, en esta sección la diferencia de medias se reporta como CTAB modificado - SDS + NaCl, por lo que valores positivos indican mayor promedio para CTAB (tabla 7).

Para la aplicación de la prueba t de *Student* se formularon las siguientes hipótesis estadísticas, considerando de manera independiente cada una de las variables analizadas y empleando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$:

- **Hipótesis nula (H_0):**

No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas con los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl; es decir, las medias poblacionales son iguales ($\mu_{CTAB} = \mu_{SDS}$).

- **Hipótesis alternativa (H_1):**

Existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas con los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl; es decir, las medias poblacionales son diferentes ($\mu_{CTAB} \neq \mu_{SDS}$).

La decisión estadística se estableció en función del valor p obtenido en cada contraste: cuando $p < 0.05$ se rechazó la hipótesis nula, y cuando $p \geq 0.05$ no se contó con evidencia suficiente para rechazarla.

Tabla 7.

Comparación entre protocolos de extracción mediante prueba t de Student

Variable	Media grupo CTAB	Media grupo SDS	Diferencia de medias	t	gl	p-valor	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)
Concentración (ng/μL)	69.60	20.30	49.30	5.85	4	0.0043	25.90	72.70
A260/280	1.85	1.77	0.08	2.03	4	0.1124	-0.03	0.19
A260/230	1.98	1.77	0.21	1.00	4	0.3741	-0.37	0.78

Bajo este criterio, la comparación de la concentración de ADN evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre protocolos: el promedio obtenido con CTAB modificado fue de 69.60 ng/ μ L, mientras que con SDS + NaCl fue de 20.30 ng/ μ L, con una diferencia de medias de 49.30 ng/ μ L ($t = 5.85$; $gl = 4$; $p = 0.0043$) y un intervalo de confianza del 95% completamente por encima de cero (25.90 a 72.70 ng/ μ L), lo que confirma que, una vez controlado el sesgo por ARN mediante RNasa, CTAB modificado recupera significativamente más ADN genómico que SDS + NaCl en *Pseudococcidae*.

Este resultado es biológicamente coherente con la naturaleza de la matriz de estos insectos fitófagos, donde la eficiencia de extracción no depende únicamente de la fuerza de lisis, sino del

equilibrio entre liberación del ADN y remoción de compuestos que pueden co-precipitar o interferir en la recuperación neta del ADN; en particular, el CTAB ha sido descrito como un detergente eficaz para separar ADN de polisacáridos y otros metabolitos asociados a tejidos con alta carga de compuestos secundarios, lo cual resulta crítico en organismos vinculados a dietas vegetales (Sambrook & Russell, 2001).

En cambio, para los índices de pureza no se detectaron diferencias estadísticas concluyentes entre protocolos: la relación A260/280 presentó medias de 1.8467 (CTAB) y 1.7667 (SDS), con una diferencia de 0.0800 ($t = 2.03$; $gl = 4$; $p = 0.112$) y un intervalo de confianza que incluye el cero (-0.0295 a 0.1895), mientras que A260/230 mostró medias de 1.9767 (CTAB) y 1.7700 (SDS), con diferencia de 0.2067 ($t = 1.00$; $gl = 4$; $p = 0.374$) e intervalo igualmente compatible con ausencia de diferencia (-0.3674 a 0.7807).

En términos interpretativos, estos resultados indican que, en condición +RNasa, la evidencia estadística robusta del estudio se concentra en la variable “concentración”, donde CTAB supera a SDS de manera clara, mientras que las diferencias en pureza, aunque descriptivamente favorecen a CTAB, no alcanzan significancia con el tamaño muestral disponible; esto no invalida la tendencia, sino que sugiere que la variabilidad biológica inherente a muestras de campo y el n reducido limitan la potencia para detectar cambios pequeños en razones espectrofotométricas (Ruxton, 2006).

En conjunto, el análisis inferencial respalda que el protocolo CTAB modificado +RNasa ofrece el mejor desempeño cuantitativo para recuperar ADN genómico en *Pseudococcidae* sin evidenciar desventajas estadísticas en pureza, lo cual fortalece su selección como método recomendado cuando el objetivo es obtener ADN apto para aplicaciones moleculares posteriores,

donde la confiabilidad del material de partida condiciona la reproducibilidad de PCR y secuenciación (Green & Sambrook, 2012).

4.5. Evaluación cualitativa de la integridad del ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa

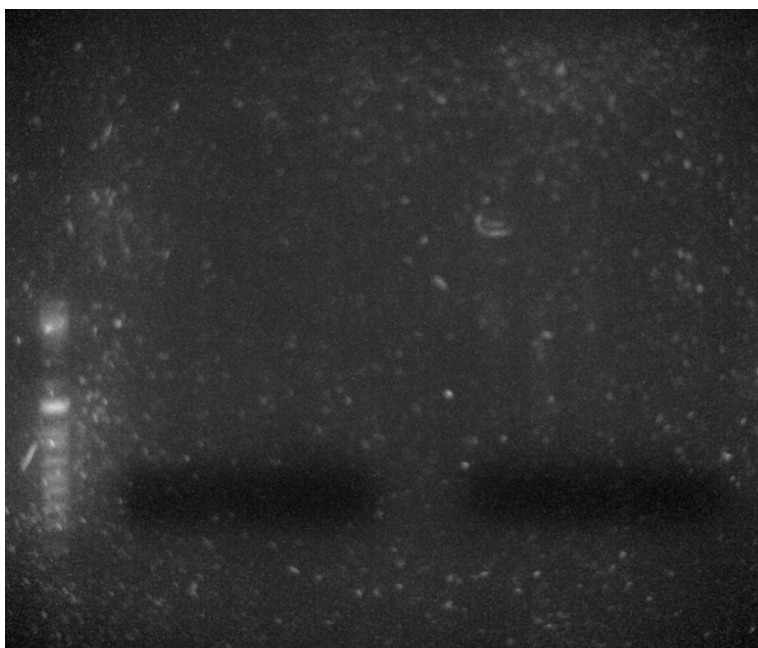
La integridad del ADN_g obtenido mediante los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl fue evaluada de forma cualitativa mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, utilizando buffer TAE y tinción con SYBR Safe. Se analizaron dos condiciones experimentales: muestras tratadas con RNasa (+RNasa) y muestras sin tratamiento con RNasa (-RNasa), manteniendo en ambos casos la misma disposición de carriles y condiciones de corrida (90 V durante 45 minutos).

En el gel correspondiente a las muestras +RNasa (Figura 10), el marcador de peso molecular de 1 kb ubicado en el primer carril se visualiza con claridad, confirmando una correcta preparación del gel y una adecuada migración electroforética. Sin embargo, en los carriles correspondientes a las muestras extraídas mediante ambos protocolos no se observaron bandas intensas ni definidas asociadas a ADN_g. Tampoco se detectaron señales difusas de bajo peso molecular en la región inferior del gel. Los controles negativos, tanto para CTAB como para SDS, no presentaron bandas visibles, lo que descarta contaminación cruzada durante el proceso de extracción y carga.

Figura 10.

Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADNg extraído con los protocolos SDS + NaCl y

CTAB modificado bajo condición +RNasa



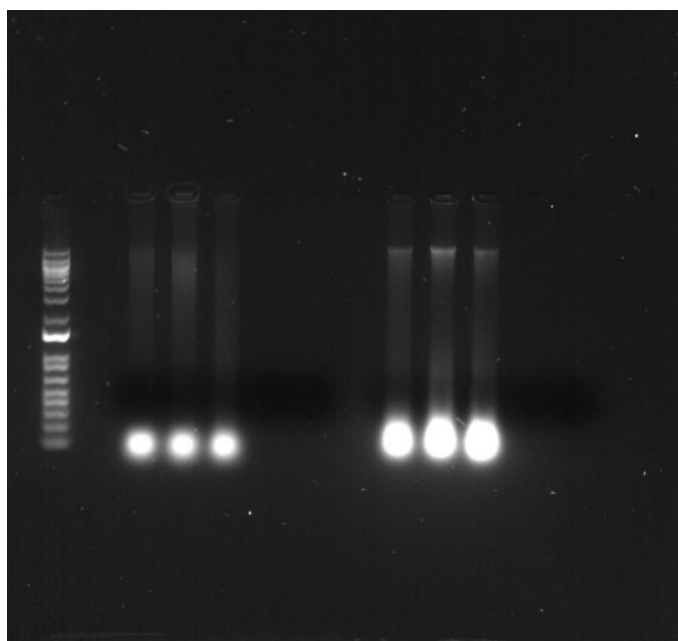
Nota. Gel de agarosa visualizado bajo luz UV correspondiente a las muestras de ADN obtenidas mediante los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl bajo la condición de tratamiento con RNAsa. Elaboración propia.

En contraste, en el gel correspondiente a las muestras -RNasa (Figura 11) se observó un patrón claramente distinto. Además del marcador de peso molecular correctamente definido, se evidenció una señal intensa y difusa en la región inferior del gel en varios carriles correspondientes a las muestras sin tratamiento con RNasa. Esta señal fue particularmente evidente en las muestras obtenidas mediante el protocolo CTAB, donde además se distinguieron bandas más marcadas en comparación con las obtenidas mediante SDS, aunque sin la presencia de una única banda nítida

de alto peso molecular. Los controles negativos no mostraron bandas definidas de alto peso molecular.

Figura 11.

Electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADNg extraído con los protocolos SDS + NaCl y CTAB modificado bajo condición -RNasa



Nota. Gel de agarosa visualizado bajo luz UV correspondiente a las muestras de ADN obtenidas mediante los protocolos CTAB modificado y SDS + NaCl sin tratamiento con RNAsa. Elaboración propia.

Los patrones observados en ambos geles permiten una interpretación coherente cuando se analizan en conjunto con los resultados espectrofotométricos obtenidos mediante NanoDrop y con los principios fisicoquímicos que rigen la extracción y visualización de ácidos nucleicos.

En primer lugar, la escasa o nula visualización de bandas en el gel correspondiente a las muestras +RNasa no debe interpretarse como ausencia de ADNg. Por el contrario, este resultado es consistente con la eliminación efectiva del ARN y con las concentraciones moderadas de ADN cuantificadas espectrofotométricamente bajo esta condición. El ADNg, al ser una molécula de alto peso molecular y presentarse en cantidades relativamente bajas, puede no producir bandas visibles en geles de agarosa al 1 %, especialmente cuando la masa total de ADN cargada es limitada. Diversos autores han señalado que la electroforesis en gel no es una técnica sensible para detectar pequeñas cantidades de ADNg intacto y que su capacidad de visualización depende en gran medida de la concentración, el grado de fragmentación y el método de tinción utilizado (Green & Sambrook, 2012).

Adicionalmente, la ausencia de señales difusas de bajo peso molecular en el gel con muestras +RNasa sugiere que el tratamiento con RNasa fue eficaz en la eliminación del ARN total. Este aspecto resulta clave, ya que el ARN suele ser el principal responsable de señales intensas en la región inferior de los geles y puede intervenir en la interpretación de la integridad real del ADNg cuando no se elimina adecuadamente (Sambrook & Russell, 2001).

En el gel correspondiente a las muestras -RNasa, la presencia de una mancha intensa y difusa en la parte inferior del gel constituye una evidencia visual clara de la coextracción de ARN. Este patrón es característico de muestras con alto contenido de ARN ribosomal y fragmentos pequeños de ARN, los cuales migran rápidamente a través del gel y se acumulan cerca del frente de corrida, generando una señal fluorescente intensa y poco definida. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado y explica por qué las muestras -RNasa presentaron concentraciones artificialmente elevadas y cocientes A260/280 cercanos o superiores a 2.0 en el análisis por NanoDrop (Sambrook & Russell, 2001).

La mayor intensidad de señal observada en las muestras -RNasa obtenidas mediante el protocolo CTAB puede atribuirse a la capacidad de este método para retener una mayor cantidad de ácidos nucleicos totales cuando no se incorpora una etapa de digestión con RNasa. Sin embargo, esta observación no implica necesariamente una mayor calidad de ADNg, sino más bien una mayor carga de material nucleico combinado, en el que el ARN constituye una fracción significativa. En este sentido, el gel refuerza la decisión metodológica de no utilizar las muestras -RNasa para el análisis inferencial, ya que su señal está dominada por ARN y no refleja de manera certera el ADNg purificado.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los hallazgos de este estudio confirman, en términos generales, lo reportado en investigaciones previas que señalan al protocolo CTAB como una alternativa eficiente para la extracción de ADN genómico a partir de matrices biológicas complejas (Sambrook & Russell, 2001; Sahu, Thangaraj, & Kathiresan, 2012). El mejor desempeño del protocolo CTAB modificado observado en este trabajo concuerda con estudios realizados en insectos y otros organismos con alto contenido de compuestos interferentes, donde se ha descrito una mayor recuperación de ADN en comparación con métodos basados en detergentes aniónicos como el SDS (Rao & Doddamane, 2022; Schenk, Becklund, Carey, & Fabre, 2023). Estas coincidencias sugieren que la eficiencia del CTAB está estrechamente vinculada a su capacidad para manejar matrices tisulares químicamente complejas.

Al mismo tiempo, los resultados evidencian que, bajo una condición optimizada que incluye tratamiento con RNasa, ambos protocolos pueden generar ADN con índices de pureza espectrofotométrica comparables. Este comportamiento coincide con lo descrito en la literatura, donde se indica que la eliminación del ARN reduce de manera significativa la variabilidad de los cocientes A260/280 y A260/230 entre distintos métodos de extracción (Thermo Fisher Scientific, 2010; Rofael, 2022). En este sentido, el estudio no contradice trabajos previos, sino que refuerza la idea de que la pureza aparente del ADN depende más del control del ARN que del método de lisis empleado como tal.

Por otro lado, la marcada diferencia observada entre las muestras tratadas y no tratadas con RNasa pone en evidencia una consecuencia metodológica relevante. La coextracción de ARN en ausencia de RNasa conduce a sobreestimaciones del rendimiento y a patrones electroforéticos dominados por señales de bajo peso molecular, tal como ha sido documentado en estudios clásicos de Biología Molecular (Green & Sambrook, 2012). Este hallazgo justifica de manera sólida la exclusión de dichas muestras del análisis inferencial y subraya la necesidad de incorporar sistemáticamente la digestión con RNasa cuando se evalúa ADN genómico.

Desde un enfoque práctico, los resultados obtenidos implican que la selección del protocolo de extracción debe considerar no solo la simplicidad del método, sino su adecuación al tipo de muestra y al objetivo del análisis. En el caso de *Pseudococcidae*, el uso del protocolo CTAB modificado se perfila como una opción más adecuada cuando se requiere maximizar la recuperación de ADN genómico, lo que puede traducirse en una mayor confiabilidad de análisis moleculares posteriores, como PCR o código de barras de ADN (Wang, y otros, 2016; Schrader, Née Schielke, Ellerbroek, & Johne, 2012). Asimismo, el estudio destaca la importancia de interpretar la electroforesis en gel como una herramienta cualitativa complementaria y no como un criterio único de evaluación, sustentando un enfoque integrado para la validación del ADN extraído.

5.2. Recomendaciones

Para estudios futuros orientados a la obtención de ADN genómico en *Pseudococcidae* u otros insectos con matrices tisulares complejas, se recomienda el uso del protocolo CTAB modificado incorporando de manera sistemática un tratamiento con RNasa, dado su mejor desempeño en rendimiento y su capacidad para generar ADN evaluable mediante técnicas moleculares posteriores.

Se sugiere incrementar el tamaño muestral en investigaciones posteriores, incorporando un mayor número de réplicas biológicas y, de ser posible, individuos provenientes de diferentes plantas hospederas o localidades, con el fin de fortalecer la inferencia estadística y evaluar la variabilidad intraespecífica en la eficiencia de los protocolos.

Desde el punto de vista metodológico, se recomienda mantener el uso combinado de análisis paramétricos y enfoques robustos, especialmente en estudios con tamaños muestrales reducidos, ya que esta estrategia permite una interpretación más prudente y transparente de los resultados.

Finalmente, se sugiere que futuros trabajos integren técnicas adicionales de cuantificación y evaluación de integridad, como electroforesis de alta resolución, con el fin de obtener una caracterización más completa del ADN genómico y reducir las limitaciones inherentes a cada técnica individual.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, A. R., Apori, S. O., & Karim, A. A. (2023). *Mealybug vectors: A review of their transmission of plant viruses and their management strategies*. Obtenido de AIMS Agriculture and Food, 8(3), 736–761: <https://doi.org/10.3934/agrfood.2023040>
- Asghar, U., Faheem Malik, M., Anwar, F., Javed, A., & Raza, A. (2015). *DNA Extraction from Insects by Using Different Techniques: A Review*. Obtenido de Advances in Entomology, Vol.3 No.4: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=59151>
- Chamani, M., Dadpour, M., Dehghanian, Z., Panahirad, S., Chenari Bouket , A., Oszako, T., & Kumar, S. (2025). *From Digestion to Detoxification: Exploring Plant Metabolite Impacts on Insect Enzyme Systems for Enhanced Pest Control* . Obtenido de Insects, 16(4), 392: <https://doi.org/10.3390/insects16040392>
- Chen, H., Rangasamy, M., Yee Tan, S., Wang, H., & Siegfried, B. (2010). *Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles*. Obtenido de PLOS ONE, 5(8): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- DeNovix. (2019). *Explicación de las proporciones de pureza del TN 130*. Obtenido de DeNovix: <https://www.denovix.com/tn-130-purity-ratios-explained>
- Fierro, F. (2026). *Electroforesis de ADN*. Obtenido de Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa: <https://walebuble.com/wp-content/uploads/Electroforesis.pdf>
- García, A., Anduro, I., Pérez, C., Corella, M., Rascón, M., & Astiazaran, H. (2020). *Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using*

- Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA*. Obtenido de Int J Anal Chem. 2020:8896738: <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Obtenido de Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gutiérrez Pulido, H., & de la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*.
- Hernández-Sampieri, R., & Mendoza, C. (2018). *Metodología de la investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta (7.ª ed.)*. Obtenido de McGraw-Hill Education: <https://doi.org/10.22201/fesc.20072236e.2019.10.18.6>
- Jalali, S. K., Ojha, R., & Venkatesan, T. (2015). *DNA Barcoding for Identification of Agriculturally Important Insects*. Obtenido de New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-2089-3_2
- Jangra, S., & Ghosh, A. (2022). *Rapid and zero-cost DNA extraction from soft-bodied insects for routine PCR-based applications*. Obtenido de PLOS ONE, 17(7): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271312>
- Kashyap, D., & Jaiswal, K. (2020). *An Efficient Method of Genomic DNA Extraction and Quantification from Insects*. Obtenido de Bulletin of Pure and Applied Sciences Vol.39A (Zoology), No.1: 10.5958/2320-3188.2020.00011.X
- Khehra, N., Padda, I., & Zubair, M. (2025). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Obtenido de In StatPearls. StatPearls Publishing: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>

- Lucena, G., Sánchez, A., Barberán, C., Carrillo, J., López, J., & Aguilar, R. (2016). *DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis*. Obtenido de *Biopreserv Biobank*; 14(4):264-70: <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Mani, M., & Shivaraju, C. (2016). *Mealybugs and their management in agricultural and horticultural crops*. Obtenido de Springer Nature Link.
- Masoomi-Aladizgeh, F., Jabbari, L., Nekouei, R. K., Aalami, A., Atwell, B., & Haynes, P. (2023). *A universal protocol for high-quality DNA and RNA isolation from diverse plant species*. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295852>
- Montgomery, D. C. (2022). *Design and analysis of experiments (9th ed.)*. Obtenido de Wiley.
- Nascimento, E., Queiroz, E., Vidal, L., Junqueira, C., Souza, B., Manigat, D., . . . Albuquerque, É. (2025). *Optimization of genomic DNA and total RNA extraction protocols from microlepidopterans for high-fidelity long-read sequencing*. Obtenido de *BMC Methods*, 2(1), 19: <https://doi.org/10.1186/s44330-025-00038-3>
- Oppert, B., Stoss, S., Monk, A., & Smith, T. (2019). *Optimized Extraction of Insect Genomic DNA for Long-Read Sequencing*. Obtenido de *Methods Protoc*: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31771236/>
- Peña, A., Gil, M., Ubeda, C., Pastenes, C., Villalobos, L., Contador, L., . . . Gómez, C. (2023). *Phenolic, Polysaccharides Composition, and Texture Properties during Ripening and Storage Time of New Table Grape Cultivars in Chile*. Obtenido de *Plants* 2023, 12(13), 2488: <https://doi.org/10.3390/plants12132488>

- Perumal, V., Zhang, X., Morono, Y., Inagaki, F., & Wang, F. (2016). *A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments*. Obtenido de Sec. Extreme Microbiology: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00986>
- Rao, K. V., & Doddamane, M. (2022). *A method for isolation of DNA from Polyphagous Insects by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB-PVPP method)*. Obtenido de JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES; 10(6):117-120: [10.22271/j.ento.2022.v10.i6b.9099](https://doi.org/10.22271/j.ento.2022.v10.i6b.9099)
- Rao, K., & Doddamane, M. (2022). *A method for isolation of DNA from Polyphagous Insects by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB-PVPP method)*. Obtenido de Journal of Entomology and Zoology Studies: <https://doi.org/10.22271/j.ento.2022.v10.i6b.9099>
- Rofael, S. (2022). *DNA Quality Assessment [Presentación]*. Obtenido de University College London: https://media.tghn.org/medialibrary/2022/09/4._DNA_QC_Dr_Sylvia_Rofael.pdf
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J., Ramírez, S. T., Vera, A., Rosas, T., Bustamante, R., . . . Martínez, E. (2018). *Endosymbiotic microorganisms of scale insects*. Obtenido de Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(1): [10.1016/j.recqb.2017.08.006](https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.08.006)
- Ruxton, G. D. (2006). *The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test*. Obtenido de Behavioral Ecology, Volume 17: <https://doi.org/10.1093/beheco/ark016>
- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). *DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol*. Obtenido de [10.5402/2012/205049](https://doi.org/10.5402/2012/205049).

- Sahu, S., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). *DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol*. Obtenido de SRN Molecular Biology: <https://doi.org/10.5402/2012/205049>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual (3.^a ed.)*. Obtenido de Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J., & Fabre, P. P. (2023). *What is the "modified" CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol*. Obtenido de Appl Plant Sci: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37342162/>
- Schrader, C., Née Schielke, A. M., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). *PCR inhibitors – Occurrence, properties and removal*. Obtenido de Journal of Applied Microbiology, 113(5):1014-26: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Stazione, L., Lantschner, V., Corley, J., & Soliani, C. (2024). *DNA isolation in bark beetles: reliability of extraction methods and application in downstream molecular procedures*. Obtenido de bioRxiv: <https://doi.org/10.1101/2024.04.06.588396>
- Tanaka, H., & Uesato, T. (2012). *New records of some potential pest mealybugs (Hemiptera:Coccoidea: Pseudococcidae) in Japan*. Obtenido de Applied Entomology and Zoology:
https://www.researchgate.net/publication/233406116_New_records_of_some_potential_pest_mealybugs_HemipteraCoccoidea_Pseudococcidae_in_Japan
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific.

- Vercher, R., González, S., Sánchez, A., & Sorribas, J. (2023). *A Novel Insect Overwintering Strategy: The Case of Mealybugs*. Obtenido de *Insects*, 14(5), 481: <https://doi.org/10.3390/insects14050481>
- Wang, H., Zhao, G., Zhang, T., Li, Y., Zhang, G., & Li, Y. (2023). *Comparative Study of DNA Barcode Integrity Evaluation Approaches in the Early-Stage Development of DNA-Compatible Chemical Transformation*. Obtenido de *ACS Pharmacol Transl Sci*. 6(11):1724-1733.: <https://doi.org/10.1021/acsptsci.3c00181>
- Wang, X.-B., Zhang, J.-T., Deng, J., Zhou, Q.-S., Zhang, Y.-Z., & Wu, S.-A. (2016). *DNA Barcoding of Mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) From Mainland China*. Obtenido de *Annals of the Entomological Society of America*, Volume 109, Issue 3: <https://doi.org/10.1093/aesa/saw009>
- Wang, Y.-S., Dai, T.-M., Tian, H., Wan, F.-H., & Zhang, G.-F. (31 de Diciembre de 2019). *Comparative analysis of eight DNA extraction methods for molecular research in mealybugs*. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226818>
- Weissgerber, T., Milic, N., Winham, S., & Garovic, V. (2015). *Beyond Bar and Line Graphs: Time for a New Data Presentation Paradigm*. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002128>
- Wong, M. (2024). *SDS: Sodium Dodecyl Sulfate | What does SDS do in DNA extraction?* Obtenido de https://www.dnatestingexperts.com/sds-sodium-dodecyl-sulfate-what-does-sds-do-in-dna-extraction/?srsltid=AfmBOoprW_aEe5xfxIxex5pCEm4_K9ZTUcKuq1Pxxgqf6lXRPgZeQA62W&

- Zafeiriadou, A., Nano, K., Thomaidis, N., & Markou, A. (2024). *Evaluation of PCR-enhancing approaches to reduce inhibition in wastewater samples and enhance viral load measurements*. Obtenido de Science of The Total Environment. Volume 955: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176768>
- Zarkani, A., Fauzi, A., Apriyanto, D., & Bora, M. (2023). *Mealybugs (Hemiptera, Coccoomorpha, Pseudococcidae) on parasitic plants (Loranthaceae) in Indonesia with description of a new species and a new country record*. Obtenido de ZooKeys 1167: 199-210: <https://zookeys.pensoft.net/article/106012/>
- Zheng, S., Li, Y., Yang, X., Chen, J., Hua, J., & Gao, Y. (2018). *DNA barcoding identification of Pseudococcidae (Hemiptera: Coccoidea) using the mitochondrial COI gene*. Obtenido de Mitochondrial DNA B Resour. 3(1):419–423. : <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1457988>
- Zymo Research. (2024). *Purpose of Genomic DNA Extraction & Tips For Success*. Obtenido de Zymo Research: <https://zymoresearch.eu/blogs/blog/purpose-of-gdna-extraction-tips-for-success>

ANEXOS

Tabla 8.

Tabla. Resultados descriptivos de concentración y pureza del ADNg obtenidos mediante NanoDrop bajo distintas condiciones experimentales (protocolo SDS + NaCl)

Protocolo SDS + NaCl					
Muestra (#)	Condición	Conc. (ng/μL)	A260/280	A260/230	Estado / Diagnóstico
1	+ RNasa	14.1	1.74	1.91	ADN Puro (Cantidad baja pero limpio).
2	+ RNasa	23.6	1.75	1.53	ADN Funcional (Leve contaminación).
3	+ RNasa	23.2	1.81	1.87	ADN Excelente.
4	Control Neg.	1.0	2.25	0.70	Limpio (Sin ADN).
5	Control Neg.	0.4	1.05	0.64	Limpio (Sin ADN).
6	- RNasa	546.9	2.04	1.98	Contaminación ARN (Exceso de absorbancia).
7	- RNasa	695.3	1.96	1.79	Contaminación ARN (Exceso de absorbancia).
8	- RNasa	702.9	2.01	2.11	Contaminación ARN (Exceso de absorbancia).
9	Control Neg.	0.1	0.33	-6.84	Limpio (Sin ADN).
10	Control Neg.	0.4	0.81	1.79	Limpio (Sin ADN).

Tabla 9.

Resultados descriptivos de concentración y pureza del ADNg obtenidos mediante NanoDrop bajo distintas condiciones experimentales (protocolo CTAB modificado)

Protocolo CTAB modificado					
Muestra (#)	Condición	Conc. (ng/μL)	A260/280	A260/230	Estado / Diagnóstico
1	+ RNasa	56.9	1.80	1.70	ADN Excelente.
2	+ RNasa	68.0	1.83	1.95	ADN Excelente (Puro y buena cantidad).
3	+ RNasa	83.9	1.91	2.28	ADN Excelente (Puro y buena cantidad).
4	Control Neg.	0.7	0.66	0.97	Limpio (Sin ADN).
5	Control Neg.	-0.1	-0.13	0.28	Limpio (Sin ADN).
6	- RNasa	465.7	2.06	2.30	Contaminación ARN (Ratio > 2.0).
7	- RNasa	607.3	2.09	2.32	Contaminación ARN.
8	- RNasa	744.0	2.07	2.30	Contaminación ARN.
9	Control Neg.	0.2	0.31	1.77	Limpio (Sin ADN).
10	Control Neg.	-0.3	-0.53	0.46	Limpio (Sin ADN).