

Protocols for extraction of total RNA from pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) embryo tissue

Protocolos de extracción de ARN total a partir del tejido embrionario de nuez pecanera (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch)

Mayela Rodríguez-González¹; Jesús G. Arreola-Ávila¹; Verónica Ávila-Rodríguez²; Fabian García-González¹; Jesús J. Quezada-Rivera^{2*}; María del S. Mota-Ituarte¹; Amparo Borja-de la Rosa³

¹Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. km 40 Carretera Torreón-Chihuahua. C. P. 35230. Bermejillo, Durango, México.

²Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Biológicas. Fracc. Universidad, Filadelfia. C. P. 35010. Gómez Palacio, Durango, México.

³Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. Carretera México- Texcoco km 38.5. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

*Corresponding author: josafath.quezada@ujed.mx; tel.: 871 715 2077

Abstract

Introduction: Gene expression studies require extraction protocols that allow obtaining high quality RNA, especially when working with tissues rich in polysaccharides, lipids and polyphenols such as pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) embryo tissue.

Objective: To evaluate the efficiency of eight methods of total RNA extraction from pecan nut embryo tissue.

Materials and methods: Eight total RNA extraction protocols based on TRI Reagent[®], CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) buffer and a commercial kit were evaluated. Total RNA yield and quality were determined by spectrophotometry (UV/visible). RNA viability and integrity were analyzed by RT-PCR using actin as a reference gene.

Results and discussion: Extraction protocols based on TRI Reagent[®] provided high concentrations of total RNA, but with a high degree of contamination. The commercial kit was used to extract total RNA, but without the expected optimal purity. Finally, protocols based on CTAB buffer achieved total RNA yields of optimal quality.

Conclusions: The quality of total RNA varies according to the efficiency of the method used. The CTAB 4 protocol represents an efficient alternative for the isolation of RNA from embryonic tissues of *C. illinoensis*.

Resumen

Introducción: Los estudios de expresión génica requieren protocolos de extracción que permitan la obtención de ARN de alta calidad, especialmente cuando se trabaja con tejidos ricos en polisacáridos, lípidos y polifenoles como el tejido embrionario de nuez pecanera (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch).

Objetivo: Evaluar la eficiencia de ocho métodos de extracción de ARN total a partir de tejido embrionario de nuez pecanera.

Materiales y métodos: Se evaluaron ocho protocolos de extracción de ARN total basados en el reactivo TRI Reagent[®], *buffer* CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y un kit comercial. El rendimiento y calidad de ARN total se determinaron por espectrofotometría (UV/visible). La viabilidad e integridad del ARN se analizó mediante RT-PCR utilizando actina como gen de referencia.

Resultados y discusión: Los protocolos de extracción basados en el reactivo TRI Reagent[®] permitieron la obtención de concentraciones altas de ARN total, pero con grado elevado de contaminación. Mediante el uso del kit comercial fue posible la extracción de ARN total, pero sin la pureza óptima esperada. Finalmente, los protocolos basados en el *buffer* CTAB consiguieron rendimientos de ARN total de calidad óptima.

Conclusiones: La calidad del ARN total varía de acuerdo con la eficiencia del método utilizado. El protocolo CTAB 4 representa una alternativa eficaz para el aislamiento de ARN de tejidos embrionarios de *C. illinoensis*.

Keywords: pecan nut; ribonucleic acid; cetyltrimethylammonium bromide; polyphenols; reverse transcription PCR.

Palabras clave: nogal pecanero; ácido ribonucleico; bromuro de cetiltrimetilamonio; polifenoles; PCR de transcripción inversa.

Introduction

Pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch), due to its extensive climatic adaptation and high profitability, is a widely cultivated species in northern Mexico (Cruz-Álvarez et al., 2020; Orona Castillo, Sangerman-Jarquín, Fortis Hernández, Vázquez Vázquez, & Gallegos Robles, 2013). Regions with populations of *Carya* genus have extreme conditions with high temperatures and low precipitation, especially in autumn, a situation that, combined with high humidity, favors nut viviparity in native trees growing in spontaneous populations (Sparks, 2005), and in commercial orchards (Rodríguez-González et al., 2022). The commercial importance of *C. illinoensis* has led to the study of viviparity and several investigations report the control of this phenomenon (Barrera, Guillen, Tamargo, Rangel, & Murrieta, 2017; García-Moreno, Báez-Sañudo, Mercado-Ruiz, García-Robles, & Núñez-Moreno, 2020; Wood, 2015); however, the molecular mechanism of gene expression related to viviparity is scarcely documented, so it is important to study them. Gene expression analyses have been widely used in biological research and have contributed significant advances in understanding the molecular mechanisms of complex physiological problems such as premature seed germination, even when the seed is still attached to the plant.

Advances in molecular biology provide the necessary tools for the study of plants at the molecular level. Some techniques are useful for germplasm characterization, genome-wide identification and gene expression contributing to a better understanding of genetics and transcriptional regulation (Liu et al., 2012). However, these studies would not be possible without the isolation of quality total RNA (ribonucleic acid), because it is the first step for the development of other molecular techniques and secures the results of downstream procedures (after the RNA extraction stage) (Sandoval-Pineda, Ochoa-Corona, & Torres-Rojas, 2017).

Obtaining quality RNA from woody and perennial plant tissues is challenging due to high concentrations of polysaccharides, polyphenols and other secondary metabolite (Gambino, Perrone, & Gribaudo, 2008). In the particular case of pecan embryonic tissue, obtaining low-quality RNA is frequent due to the presence of total phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins or condensed tannins that can be easily oxidized, in addition to fatty acids such as tocopherols and phytosterols (Flores-Cordova, Muñoz-Márquez, Ojeda-Barrios, Soto-Parra, & Preciado-Rangel, 2017; Reyes, 2016).

As a result of interference from these secondary compounds, standard extraction protocols require modifications for the isolation of high-quality nucleic acids with good yields. To date, the use of some

Introducción

El nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch), por su extensa adaptación climática y alta rentabilidad, es una especie cultivada ampliamente en el norte de México (Cruz-Álvarez et al., 2020; Orona Castillo, Sangerman-Jarquín, Fortis Hernández, Vázquez Vázquez, & Gallegos Robles, 2013). Las regiones con poblaciones del género *Carya* poseen condiciones extremas de temperaturas elevadas y precipitación baja, particularmente en otoño, situación que, en combinación con la humedad elevada, propicia la viviparidad de la nuez en árboles criollos que crecen en poblaciones espontáneas (Sparks, 2005), así como en huertas comerciales (Rodríguez-González et al., 2022). Debido a la importancia comercial de *C. illinoensis*, la viviparidad ha sido objeto de estudio y varias investigaciones reportan el control de este fenómeno (Barrera, Guillen, Tamargo, Rangel, & Murrieta, 2017; García-Moreno, Báez-Sañudo, Mercado-Ruiz, García-Robles, & Núñez-Moreno, 2020; Wood, 2015); sin embargo, el mecanismo molecular de la expresión de genes relacionados con la viviparidad se encuentra poco documentado, por lo que resulta importante el estudio de estos. Los análisis de expresión génica se han utilizado ampliamente en la investigación biológica y han contribuido en avances significativos para la comprensión de los mecanismos moleculares de problemas fisiológicos complejos como la germinación prematura de la semilla, aun cuando todavía está unida a la planta.

Los avances en biología molecular proveen las herramientas necesarias para el estudio de las plantas a nivel molecular. Algunas técnicas son útiles en la caracterización del germoplasma, identificación a nivel genómico y expresión de genes contribuyendo a un mejor entendimiento de la genética y la regulación transcripcional (Liu et al., 2012). No obstante, estos estudios no serían posibles sin el aislamiento de ARN total (ácido ribonucleico) de calidad, ya que constituye el primer paso para el desarrollo de otras técnicas moleculares y asegura los resultados de procedimientos *downstream* (posteriores a la etapa de extracción de ARN) (Sandoval-Pineda, Ochoa-Corona, & Torres-Rojas, 2017).

La obtención de ARN de calidad a partir de tejidos de plantas leñosas y perennes es desafiante debido a las concentraciones altas de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios (Gambino, Perrone, & Gribaudo, 2008). En el caso particular del tejido embrionario de la nuez pecanera, la obtención de ARN de baja calidad es frecuente debido a la presencia de compuestos fenólicos totales, flavonoides y proantocianidinas o taninos condensados que pueden ser fácilmente oxidados, además de ácidos grasos como tocoferoles y fitoesteroles (Flores-Cordova, Muñoz-Márquez, Ojeda-Barrios, Soto-Parra, & Preciado-Rangel, 2017; Reyes, 2016). Debido a la interferencia de estos compuestos secundarios, los protocolos de extracción

protocols for RNA and DNA extraction from root, stem, leaf and fruit from the *Carya* genus has been reported (Mattison et al., 2017; Qiu et al., 2016; Zheng et al., 2010). These protocols use phenol, trizole, sodium dodecyl sulfate (SDS), lithium chloride and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB). Commercial extraction kits have also been used due to their high sensitivity, specificity and reproducibility, such as the RNeasy mini kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA) and the mirVana miRNA isolation kit (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for RNA extraction from *Carya cathayensis* Sarg. flower buds (Tongqiang, Qixiang, Yuanyuan, Wang, & Huang, 2020; Wang, Huang, Sun, & Zheng, 2015); however, the quality and yield of total RNA varies between methodologies and the plant tissue used. This is because several secondary compounds co-precipitate with RNA exposing it to degradation by RNAases (George, 2018). In the present study, the extraction efficiency of high-quality total RNA extraction for use in downstream gene expression assays was evaluated from the embryonic tissue of pecan nuts from *C. illinoensis* from a spontaneous population.

Materials and Methods

Plant material and growing conditions

Pecan nut samples were collected from adult criollo pecan trees belonging to a spontaneous population over 50 years old. The criteria for tree selection was a height of approximately 15 m and a circumference of 90 cm (measured at 60 cm from the ground). Nuts were collected from 10 trees during the ripening stage (September) in 2020, with two characteristics: normal mature nut and mature nut with germinated embryo. The nuts were wrapped in aluminum foil for analysis, immediately put on ice and then stored at -20 °C until processing.

The criollo pecan tree population is located in the municipality of Nazas, Durango, Mexico, with geographical coordinates 25° 13' 34" LN and 104° 06' 39" LW and elevation of 1250 m. The climate is dry (BWhw(w)(e)) with summer rainfall, annual precipitation of 330.8 mm and mean annual evaporation of 2259.3 mm. Mean annual temperature of 20.2 °C (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2020).

Total RNA extraction

The RNA extraction process was carried out in the Microbial Ecology Laboratory and Molecular Biology Laboratory of the Faculty of Biological Sciences of the Universidad Juárez del Estado de Durango.

Protocols were performed in a decontaminated and nuclease-free area to avoid RNA degradation. Extraction

estándar requieren modificaciones para el aislamiento de ácidos nucleicos de alta calidad y con buen rendimiento. A la fecha, se ha reportado el uso de algunos protocolos para la extracción de ARN y ADN de raíz, tallo, hoja y fruto del género *Carya* (Mattison et al., 2017; Qiu et al., 2016; Zheng et al., 2010). Dichos protocolos usan fenol, trizol, dodecil sulfato de sodio (SDS), cloruro de litio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). También se han utilizado kits comerciales de extracción debido a su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, como el mini kit RNeasy (QIAGEN, Germantown, MD, EUA) y el mirVana miRNA isolation kit (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para la extracción de ARN de brotes florales de *Carya cathayensis* Sarg. (Tongqiang, Qixiang, Yuanyuan, Wang, & Huang, 2020; Wang, Huang, Sun, & Zheng, 2015); sin embargo, la calidad y rendimiento de ARN total varía entre las metodologías y el tejido vegetal utilizado. Esto debido a que varios compuestos secundarios coprecipitan con el ARN exponiéndolo a degradación por ARNasas (George, 2018). En el presente estudio se evaluó la eficiencia de extracción de ARN total de alta calidad para ser utilizado en ensayos posteriores de expresión génica, a partir de tejido embrionario de nuez pecanera de nogales criollos (*C. illinoensis*) de una población espontánea.

Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones del cultivo

Las muestras de nuez pecanera se obtuvieron de nogales criollos adultos pertenecientes a una población espontánea de más de 50 años. El criterio de selección de los árboles fue una altura aproximada de 15 m y circunferencia de 90 cm (medida a 60 cm a partir del suelo). Las nueces se colectaron de 10 árboles durante la etapa de maduración (septiembre) en el 2020, con dos características: nuez madura normal y nuez madura con embrión germinado. Para el análisis, las nueces se envolvieron en papel aluminio, se pusieron en hielo inmediatamente y luego se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

La población de árboles criollos está situada en el municipio de Nazas estado de Durango, México, con coordenadas geográficas 25° 13' 34" LN y 104° 06' 39" LO y elevación de 1250 m. El clima es seco (BWhw(w)(e)) con lluvias en verano, precipitación anual de 330.8 mm y evaporación media anual de 2259.3 mm. La temperatura media anual es 20.2 °C (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2020).

Extracción de ARN total

El proceso de extracción de ARN se realizó en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

buffers and solutions were sterilized using 0.22 μm filters. The supplies were heat and pressure sterilized in an autoclave. The electrophoresis chambers and photodocumenter were treated with DEPC (diethylpyrocarbonate) water.

For the total RNA extraction process, 100 mg of pecan embryo tissue previously homogenized by maceration with liquid nitrogen was used. Eight protocols that have been documented for their effectiveness for RNA extraction from plant samples with high lipid, phenol and polysaccharide contents were evaluated. These protocols are described as follows.

TRIzol 1 (TRI Reagent[®]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Total RNA was extracted according to the protocol reported by Li, Zhang, Liao, and Liu (2014). The extraction solutions used were TRI Reagent[®], β -mercaptoethanol, potassium acetate 2.5 M (pH 5.2) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Total RNA was precipitated with isopropanol for 30 min at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by two washes with 70 % ethanol. The pellet was dried at room temperature and rehydrated in DEPC water.

TRIzol 2 (TRI Reagent[®]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Total RNA was extracted according to the protocol provided by the supplier. The extraction solution is a mixture of guanidine thiocyanate and phenol. Total RNA was precipitated with isopropanol for 10 min at room temperature, followed by washing with 70 % ethanol. The pellet was dried at room temperature and resuspended in DEPC water.

TRIzol 3 (TRI Reagent[®]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Total RNA extraction was carried out using the procedure reported by Ortega-González et al. (2018). Total RNA was precipitated in a mixture of isopropanol and 3 M sodium acetate overnight at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by two washes with 70 % ethanol, and again precipitated for 30 min at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The pellet was dried at room temperature and dissolved in DEPC water.

Kit RNeasy[®] Power Plant[®] (QIAGEN, Germantown, MD, USA): Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. The method uses BML (guanidine salts) solution as lysis buffer, β -mercaptoethanol and phenolic separation solution (PSS). RNA was purified by centrifugation on silica membrane columns; 50 μL of RNAase-free water was added for elution, incubated 1 min at room temperature and centrifuged 1 min at 14 000 rpm for subsequent storage.

CTAB 1: Total RNA was isolated using the protocol described by Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011). Extraction was carried out using extraction buffer 1

Los protocolos se desarrollaron en un área descontaminada y libre de nucleasas para evitar la degradación del ARN. Los *buffers* de extracción y soluciones se esterilizaron mediante filtros de 0.22 μm . Los insumos se esterilizaron por calor y presión en una autoclave. Las cámaras de electroforesis y fotodocumentador se trataron con agua DEPC (dietilpirocarbonato).

Para el proceso de extracción de ARN total se inició con 100 mg de tejido embrionario de nuez previamente homogeneizado mediante maceración con nitrógeno líquido. Se evaluaron ocho protocolos que han sido documentados por su efectividad para la extracción de ARN de muestras vegetales con contenidos altos de lípidos, fenoles y polisacáridos. Dichos protocolos se describen a continuación.

TRIzol 1 (TRI Reagent[®]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): El ARN total se obtuvo de acuerdo con el protocolo reportado por Li, Zhang, Liao, y Liu (2014). Las soluciones de extracción utilizadas fueron TRI Reagent[®], β -mercaptoetanol, acetato de potasio 2.5 M (pH 5.2) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ARN total se precipitó con isopropanol durante 30 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de dos lavados con etanol al 70 %. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y rehidrató en agua DEPC.

TRIzol 2 (TRI Reagent[®]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): El ARN total se extrajo de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor. La solución de extracción es una mezcla de tiocianato de guanidina y fenol. El ARN total se precipitó con isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de un lavado con etanol al 70 %. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua DEPC.

TRIzol 3 (TRI Reagent[®]; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): La extracción de ARN total se realizó mediante el procedimiento reportado por Ortega-González et al. (2018). El ARN total se precipitó en una mezcla de isopropanol y acetato de sodio 3 M durante toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de dos lavados con etanol al 70 % y nuevamente se precipitó por 30 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se disolvió en agua DEPC.

Kit RNeasy[®] Power Plant[®] (QIAGEN, Germantown, MD, EUA): El ARN total se extrajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El método utiliza la solución BML (sales de guanidina) como *buffer* de lisis, β -mercaptoetanol y una solución de separación fenólica (PSS). El ARN se purificó mediante centrifugación en columnas con membrana de sílice; para su elución se añadieron 50 μL de agua libre de ARNasas, se incubó 1 min a temperatura ambiente y centrifugó 1 min a 14 000 rpm para su almacenamiento posterior.

based on CTAB ionic detergent (CTAB 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM [pH 8], PVP 2 %) and β -mercaptoethanol (added just before use), followed by two more extractions with phenol:chloroform (1:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Precipitation of total RNA was with LiCl (8 M) for 4 h at -20 °C, followed by a first wash with 96 % ethanol and a second wash with 70 % ethanol. The pellet was dried at room temperature and resuspended in DEPC water.

CTAB 2: Total RNA extraction was carried out using the protocol described by Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011) with modifications. Total RNA was collected with extraction buffer 1 CTAB (CTAB 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM [pH 8], PVP 2 %) and β -mercaptoethanol (added just before use). The variation from the previous protocol was to perform two more extractions with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1). RNA was precipitated in LiCl (8 M) for 4 h at -20 °C, followed by a first wash with 96 % ethanol and a second wash with 70 % ethanol. The pellet was dried at room temperature and dissolved in DEPC water.

CTAB 3: To obtain total RNA, the process reported by Salinas et al. (2019) was followed, modifying the volumes handled. 600 μ L of CTAB-based extraction buffer 2 (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 2 M, EDTA 25 mM, espermidine 0.05 %) and 100 μ L de β -mercaptoethanol were added just before use. The sample was incubated 10 min at 65 °C. Subsequently, 500 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added and vortex mixed. The sample was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant (yellow color) was transferred to a new tube and reserved on ice. The precipitate was extracted a second time with an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). The supernatants were combined, and the total RNA was precipitated in 10 M LiCl overnight at 4 °C. This was followed by washing with 75 % ethanol. The sample was centrifuged at 10 000 rpm for 20 min at 4 °C and the pellet was dried at room temperature and rehydrated in DEPC water.

CTAB 4: Total RNA was obtained based on the method described by Chang, Puryear, and Cairney (1993) with some modifications. The volumes used were smaller than those reported and the 65 °C incubation of the extraction buffer was omitted. For extraction, 600 μ L of extraction buffer 2 (CTAB 2 %, PVP 2 %, 100 mM Tris-HCl [pH 8], 2 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.05 % spermidine) and 100 μ L of β -mercaptoethanol were added just before use. The volume was vortex mixed and 600 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added. The sample was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at 4 °C, followed by a second extraction with 600 μ L phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), vortexed

CTAB 1: El ARN total se aisló mediante el protocolo descrito por Rubio-Piña y Zapata-Pérez (2011). La extracción se llevó a cabo mediante el *buffer* de extracción 1 basado en el detergente iónico CTAB (CTAB 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM [pH 8], PVP 2 %) y β -mercaptoetanol (adicionado justo antes de su uso), seguido de dos extracciones más con fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La precipitación del ARN total fue con LiCl (8 M) durante 4 h a -20 °C, seguido de un primer lavado con etanol al 96 % y un segundo lavado con etanol al 70 %. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua DEPC.

CTAB 2: La extracción de ARN total se realizó mediante el protocolo descrito por Rubio-Piña y Zapata-Pérez (2011) con modificaciones. El ARN total se obtuvo con el *buffer* de extracción 1 CTAB (CTAB 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM [pH 8], PVP 2 %) y β -mercaptoetanol (adicionado justo antes de su uso). La variante respecto al protocolo anterior fue la realización de dos extracciones más con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ARN se precipitó en LiCl (8 M) durante 4 h a -20 °C, seguido de un primer lavado con etanol al 96 % y un segundo lavado con etanol al 70 %. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se disolvió en agua DEPC.

CTAB 3: Para la obtención de ARN total se siguió el proceso reportado por Salinas et al. (2019), modificando los volúmenes manejados. Se añadieron 600 μ L del *buffer* de extracción 2 basado en CTAB (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 2 M, EDTA 25 mM, espermidina 0.05 %) y 100 μ L de β -mercaptoetanol justo antes de su uso. La muestra se incubó 10 minutos a 65 °C. Posteriormente se agregaron 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló en vortex. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante (color amarillo) se transfirió a un tubo nuevo y se reservó en hielo. Al precipitado se realizó una segunda extracción con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Los sobrenadantes se combinaron y el ARN total se precipitó en LiCl 10 M durante toda la noche a 4 °C. Seguido de un lavado con etanol al 75 %. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 min a 4 °C y el *pellet* se secó a temperatura ambiente y rehidrató en agua DEPC.

CTAB 4: El ARN total se obtuvo con base en el método descrito por Chang, Puryear, y Cairney (1993) con algunas modificaciones. Los volúmenes utilizados fueron menores que los reportados y se eliminó la incubación a 65 °C del *buffer* de extracción. Para la extracción se añadieron 600 μ L del *buffer* de extracción 2 (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM [pH 8], NaCl 2 M, EDTA 25 mM, espermidina 0.05 %) y 100 μ L de β -mercaptoetanol justo antes de su

and centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at 4 °C; in the original report they used chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Total RNA was precipitated in 175 µL of 8 M LiCl (in the original report they used 10 M LiCl), overnight at 4 °C. The next day, the RNA was centrifuged 20 min at 10 000 rpm. The precipitate was dissolved in 500 µL of SSTE buffer (1 M NaCl, 0.5 % SDS and 10 mM Tris-HCl [pH 8]) and a new extraction was carried out with 500 µL phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1); in the original report they used chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Additionally, total RNA was washed with 800 µL of 70 % ethanol and precipitated for 2 h at -20 °C. The pellet was dried at room temperature and dissolved in DEPC water.

Evaluation of RNA integrity and quality

Total RNA extraction was evaluated for quantity, purity and integrity by spectrophotometry (NanoDrop 2000, UV/Vis, Thermo Scientific) and horizontal electrophoresis on 1 % agarose gels.

Total RNA concentration was measured by optical density at 260 nm and purity was confirmed by the ratio of absorbance indices at 260 and 280 nm ($A_{260/280}$), and at 260 and 230 nm ($A_{260/230}$) to evaluate the presence of proteins or phenolic compounds. An $A_{260/230}$ ratio between 1.8 and 2.0 indicates good quality RNA while below 1.8 suggests contaminated RNA and <1.5 RNA highly contaminated with phenolic compounds, carbohydrates, EDTA and other contaminants with UV absorption at 230 nm. While the $A_{260/280}$ ratio should be between 2.0 and 2.2 to consider optimal purity and >1.7 for acceptable purity. If the ratio is less than 1.7 it indicates contamination with proteins or other contaminants with UV absorption at 280 nm (Silveira de Campos et al., 2017).

RNA integrity was assessed by agarose-MOPS-formaldehyde gel electrophoresis at 50 V for 45 min, using MOPS 1X as electrophoresis buffer. Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, USA) was used for RNA staining. Gels were visualized with ultraviolet light on a UVP® MultiDoc It Imaging System UVP® photodocumenter.

cDNA synthesis by RT-PCR

The quality of RNA extracted with each protocol was assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). All total RNA samples were treated with DNase I (RNAase-free) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's specifications and then retrotranscribed to first-strand cDNA by using an Oligo-(dT) primer and M-MLV RT Reverse Transcriptase (Promega, Fitchburg, WI, USA) following the supplier's instructions. The cDNA was amplified using Taq polymerase enzyme (Jena Bioscience, Dortmund, Germany)

uso. El volumen se mezcló en vortex y se añadieron 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La muestra se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C, seguido de una segunda extracción con 600 µL fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C; en el protocolo original reportaron el uso de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ARN total se precipitó en 175 µL de LiCl 8 M (en el protocolo original reportaron el uso de LiCl 10 M), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, el ARN se centrifugó 20 min a 10 000 rpm. El precipitado fue disuelto en 500 µL de *buffer* SSTE (NaCl 1 M, SDS 0.5 % y Tris-HCl 10mM [pH 8]) y se realizó una nueva extracción con 500 µL fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1); en el protocolo original reportaron el uso de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Adicionalmente, el ARN total se lavó con 800 µL de etanol al 70 % y se precipitó durante 2 h a -20 °C. El *pellet* se secó a temperatura ambiente y se disolvió en agua DEPC.

Evaluación de la integridad y calidad del ARN

La extracción de ARN total se evaluó mediante la cantidad, pureza e integridad, a través de espectrofotometría (NanoDrop 2000, UV/Vis, Thermo Scientific) y por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 %.

La concentración del ARN total se midió mediante la densidad óptica a 260 nm y la pureza se confirmó por la relación de los índices de absorbancia a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$), así como a 260 y 230 nm ($A_{260/230}$) para evaluar la presencia de proteínas o compuestos fenólicos. Una relación $A_{260/230}$ entre 1.8 y 2.0 indica ARN de buena calidad mientras que por debajo de 1.8 sugiere ARN contaminado y <1.5 ARN altamente contaminado con compuestos fenólicos, carbohidratos, EDTA y otros contaminantes con absorción UV a 230 nm. Mientras que la relación $A_{260/280}$ debe estar entre 2.0 y 2.2 para considerar una pureza óptima y >1.7 para una pureza aceptable. Si la proporción es menor de 1.7 indica contaminación con proteínas u otros contaminantes con absorción UV a 280 nm (Silveira de Campos et al., 2017).

La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa-MOPS-formaldehído, a 50 V durante 45 min, utilizando MOPS 1X como tampón de electroforesis. Se utilizó Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, EUA) para tinción del ARN. Los geles se visualizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP® MultiDoc It Imaging System.

Síntesis de ADNc por RT-PCR

La calidad de ARN extraído con cada protocolo se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

according to the manufacturer's specifications. Oligonucleotides from the constitutive actin gene of *C. illinoensis*: F 5'CGATGCCCTGAGGTTCTATTC 3' and R 5'GATCCTCCAATCCAGACACTATAC 3' were used to amplify a 266 bp product. Those primers were designed via the IDT (Integrated DNA Technologies) online platform based on the whole genome sequence of *C. illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 (CM028997.1) (Platts et al., 2021), obtained through the GenBank of the Center for Biotechnology Information (NCBI). For a standard 25 μL RT-PCR reaction, 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ of total RNA was used. The PCR amplification program included an initial denaturation of 2 min at 92 °C; subsequently, 35 cycles comprising the following steps: denaturation at 95 °C for 15 s, alignment 55 °C for 15 s and extension 72 °C for 1 min 30 s; and a final extension of 2 min at 72 °C. The amplified products were separated on a 2 % agarose gel, stained with Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, USA), at 75 V for 45 min and visualized with ultraviolet light in a UVP® MultiDoc It Imaging System photodocumenter.

Statistical analysis

Differences between the absorbances and concentrations obtained, for each of the protocols, were determined with an ANOVA model with three replicates and a Tukey's mean test ($P < 0.05$). The SAS program version 9.4 was used for this purpose (SAS Institute, 2017).

Results

RNA extraction protocols are usually evaluated based on quantity, quality and integrity for RT-PCR, qPCR, cDNA library construction and gene expression analysis (Zhihui et al., 2015).

Regarding the extraction protocols based on TRI Reagent® reagent, the concentration of total RNA (Table 1) was higher with the TRIzol 3 method, both in mature and germinated pecans, with average values of 2298.9 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and 1456.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, respectively. Furthermore, an average of 1333.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in mature pecan and 537.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in germinated walnut was obtained with TRIzol 1 protocol. The average RNA yield obtained with TRIzol 2 was 240.2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for mature nut and 359.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for germinated nut. In terms of quality, the samples presented a ratio $A_{260/230} < 1.5$ and $A_{260/280} < 1.7$ (Table 2), values below the acceptable purity range, indicating high contamination by proteins and phenolic compounds.

RNA extraction using RNeasy® Power Plant® Kit produced samples with average concentrations of 663.3 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for mature nut tissue and 60.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for germinated nut samples (Table 1). For mature pecan nut, acceptable purity values were obtained ($A_{260/280}$

Todas las muestras de ARN total se trataron con DNasa I (libre de ARNasa) (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) según las especificaciones del fabricante y luego se retrotranscribieron a ADNc de primera cadena mediante el uso de un cebador Oligo-(dT) y Transcriptasa Reversa M-MLV RT (Promega, Fitchburg, WI, EUA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El ADNc se amplificó utilizando la enzima Taq polimerasa (Jena Bioscience, Dortmund, Alemania) con las especificaciones del fabricante. Se utilizaron oligonucleótidos del gen constitutivo actina de *C. illinoensis*: F 5'CGATGCCCTGAGGTTCTATTC 3' y R 5'GATCCTCCAATCCAGACACTATAC 3' para amplificar un producto de 266 pb. Dichos iniciadores se diseñaron a través de la plataforma en línea IDT (Integrated DNA Technologies) con base en la secuencia del genoma completo de *C. illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 (CM028997.1) (Platts et al., 2021), obtenida a través del GenBank del Centro de Información Biotecnológica (NCBI). Para una reacción estándar de RT-PCR de 25 μL , se utilizaron 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de ARN total. El programa de amplificación por PCR incluyó una desnaturalización inicial de 2 min a 92 °C; posteriormente, 35 ciclos que comprenden las etapas siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineamiento 55 °C durante 15 s y extensión 72 °C durante 1 min 30 s; y una extensión final de 2 min a 72 °C. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 2 %, teñidos con Gel Red® (Biotium, Hayward, CA, EUA), a 75 V durante 45 min y se visualizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UVP® MultiDoc It Imaging System.

Análisis estadístico

Las diferencias entre las absorbancias y concentraciones obtenidas, para cada uno de los protocolos, se determinaron con un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con tres repeticiones y una prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$). Para ello se usó el programa SAS versión 9.4 (SAS Institute, 2017).

Resultados

Los protocolos de extracción de ARN generalmente se evalúan en términos de cantidad, calidad e integridad para RT-PCR, qPCR, construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión de genes (Zhihui et al., 2015).

En cuanto a los protocolos de extracción basados en el reactivo TRI Reagent®, la concentración de ARN total (Cuadro 1) fue mayor con el método TRIzol 3, tanto en nuez madura como en germinada, con valores promedio de 2298.9 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y 1456.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, respectivamente. Asimismo, con el protocolo TRIzol 1 se obtuvo un promedio de 1333.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en nuez madura y 537.6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en nuez germinada. El rendimiento promedio de ARN obtenido con TRIzol 2 fue de 240.2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en nuez madura y 359.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en

Table 1. Spectrophotometric readings used to evaluate the total RNA quantity from embryonic tissues of normal mature pecan and mature pecan with germinated embryo of *Carya illinoensis*.**Cuadro 1. Lecturas espectrofotométricas usadas para evaluar la cantidad del ARN total de tejidos embrionarios de nuez madura normal y nuez madura con embrión germinado de *Carya illinoensis*.**

Protocol/ Protocolo	Mature pecan nut (ng· μ L ⁻¹)/ Nuez madura (ng· μ L ⁻¹)	Germinated pecan nut (ng· μ L ⁻¹)/ Nuez germinada (ng· μ L ⁻¹)
TRIzol 1	1333.4 ab	537.6 b
TRIzol 2	240.2 b	359.4 b
Kit	663.3 b	60.1 c
TRIzol 3	2298.9 a	1456.6 a
CTAB 1	685.2 b	712.2 ab
CTAB 2	739.4 ab	372.9 b
CTAB 3	611.7 b	485.3 b
CTAB 4	421.6 b	425.1 b

Mean concentrations (n = 3) with the same letters in the same column are statistically equal according to Tukey's test ($P > 0.05$).

Concentraciones medias (n = 3) con las mismas letras dentro de una misma columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

Table 2. Spectrophotometric readings used to evaluate the RNA quality of embryonic tissues of normal mature pecan nut and mature pecan nut with *Carya illinoensis* germinated embryo.**Cuadro 2. Lecturas espectrofotométricas usadas para evaluar la calidad del ARN de tejidos embrionarios de nuez madura normal y nuez madura con embrión germinado de *Carya illinoensis*.**

Protocol/Protocolo	Mature pecan nut/Nuez madura		Germinated pecan nut/Nuez germinada	
	A _{260/230}	A _{260/280}	A _{260/230}	A _{260/280}
TRIzol 1	0.41 d	1.66 b	0.62 c	1.13 b
TRIzol 2	0.48 d	1.20 c	0.41 d	1.63 b
Kit	1.30 b	1.97 b	0.32 d	1.25 b
TRIzol 3	0.39 d	1.06 c	0.45 d	1.07 b
CTAB 1	1.16 b	1.87 b	1.25 b	1.80 a
CTAB 2	1.11 b	1.79 b	1.07 c	1.77 a
CTAB 3	0.86 c	1.70 b	1.29 b	1.84 a
CTAB 4	1.89 a	2.07 a	1.87 a	1.86 a

Mean concentrations (n = 3) with the same letters in the same column are statistically equal according to Tukey's test ($P > 0.05$).

Valores medios (n = 3) de pureza con las mismas letras dentro de una misma columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

> 1.7) although with possible contamination with proteins and phenols ($A_{260/230} < 1.5$). For germinated pecan nut, absorbance values indicated highly contaminated RNA ($A_{260/230} < 1.5$ and $A_{260/280} < 1.7$) (Table 2).

The average concentration of total RNA with the CTAB 1 method and the use of phenol:chloroform (1:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1) in the extraction process was 600 to 700 ng· μ L⁻¹ with an acceptable quality range ($A_{260/280} > 1.7$), although with the presence of contaminating compounds ($A_{260/230} < 1.5$). In the case of the CTAB 2 protocol and the addition of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) and chloroform:isoamyl alcohol (24:1), up to 739.4 ng· μ L⁻¹ of total RNA from mature pecan nut and 372.9 ng· μ L⁻¹

nuez germinada. En cuanto a la calidad, las muestras presentaron una relación $A_{260/230} < 1.5$ y $A_{260/280} < 1.7$ (Cuadro 2), valores por debajo del rango de pureza aceptable, lo que indica alta contaminación por proteínas y compuestos fenólicos.

La extracción de ARN mediante RNeasy® Power Plant® Kit produjo muestras con concentraciones promedio de 663.3 ng· μ L⁻¹ para el tejido de nuez madura y 60.1 ng· μ L⁻¹ para muestras de nuez germinada (Cuadro 1). Para nuez madura se obtuvieron valores de pureza aceptable ($A_{260/280} > 1.7$) aunque con posible contaminación con proteínas y fenoles ($A_{260/230} < 1.5$). En el caso de nuez germinada, los valores de absorbancia indicaron ARN altamente contaminado ($A_{260/230} < 1.5$ y $A_{260/280} < 1.7$) (Cuadro 2).

of total RNA from germinated pecan nut were obtained, with no differences in quality with reference to the CTAB 1 protocol. Moreover, with the CTAB 3 protocol, total RNA concentrations were similar to those obtained with CTAB 1 and CTAB 2 (400-600 ng· μL^{-1}) with acceptable absorbance values ($A_{260/280} > 1.7$) and presence of contaminants ($A_{260/230} < 1.5$).

Finally, the CTAB 4 protocol led to total RNA concentrations of 400 ng· μL^{-1} and increased purity in both mature nut ($A_{260/230} = 1.89$ and $A_{260/280} = 2.07$) and germinated nut ($A_{260/230} = 1.87$ and $A_{260/280} = 1.86$), decreasing the presence of lipids and phenolic compounds compared to the seven protocols cited above. Therefore, the lower volume RNA extraction and the use of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) represent an efficient alternative for RNA isolation from pecan embryonic tissues, since this protocol provides good quality total RNA for subsequent qPCR analysis.

Integrity and quality assessment of the total RNA

Regarding the integrity of total RNA, in most protocols two consecutive clear bands, characteristic of ribonucleic acid, were seen, confirming its purity. Integrity was null for TRIzol 1 and TRIzol 3 methods, indicating RNA degradation, but was preserved in the four CTAB-based protocols. The RNA samples obtained with the kit were also able to confirm their integrity, although with remnants of certain compounds that interfered with their quality (Figure 1).

RT-PCR and cDNA synthesis

A reference primer pair for detection of the *C. illinoensis* actin gene was designed to evaluate the effectiveness of the RNA extraction protocols.

La concentración promedio de ARN total con el método CTAB 1 y el uso de fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) en el proceso de extracción, fue de 600 a 700 ng· μL^{-1} con un rango de calidad aceptable ($A_{260/280} > 1.7$), aunque con presencia de compuestos contaminantes ($A_{260/230} < 1.5$). En el caso del protocolo CTAB 2 y la adición de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) se obtuvieron hasta 739.4 ng· μL^{-1} de ARN total de nuez madura y 372.9 ng· μL^{-1} de ARN total de nuez germinada, sin diferencias en calidad con referencia al protocolo CTAB 1. Asimismo, con el protocolo CTAB 3, las concentraciones de ARN total fueron similares a las obtenidas con CTAB 1 y CTAB 2 (400-600 ng· μL^{-1}) con valores de absorbancia aceptables ($A_{260/280} > 1.7$) y presencia de contaminantes ($A_{260/230} < 1.5$).

Finalmente, el protocolo CTAB 4 permitió la obtención de concentraciones de ARN total de 400 ng· μL^{-1} y el incremento de la pureza tanto en nuez madura ($A_{260/230} = 1.89$ y $A_{260/280} = 2.07$) como en nuez germinada ($A_{260/230} = 1.87$ y $A_{260/280} = 1.86$), disminuyendo la presencia de lípidos y compuestos fenólicos en comparación con los siete protocolos antes citados. Por tanto, la extracción de ARN en menor volumen y el uso de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) representan una alternativa eficaz para el aislamiento de ARN de los tejidos embrionarios de la nuez pecanera, ya que dicho protocolo permite la obtención de ARN total de buena calidad para análisis de qPCR posteriores.

Evaluación de la integridad y calidad del ARN obtenido

En cuanto a la integridad del ARN total, en la mayoría de los protocolos se visualizaron dos bandas consecutivas claras, características del ácido ribonucleico, confirmando su pureza. La integridad

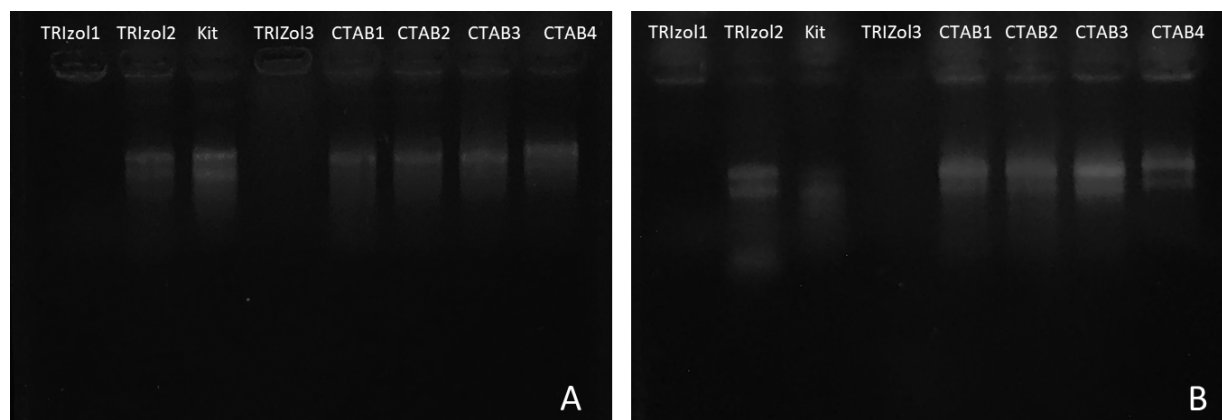


Figure 1. Agarose gel electrophoresis (2 %) of total RNA collected from mature pecan nut embryo tissue (A) and pecan nut with germinated embryo (B) using eight extraction protocols.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (2 %) del ARN total obtenido del tejido embrionario de nuez pecanera madura (A) y nuez pecanera con embrión germinado (B) mediante ocho protocolos de extracción.

Electrophoresis showed high specificity and proved the presence of this gene in pecan embryo tissue.

Extraction using protocols based on TRI Reagent® showed high RNA concentration; however, since it was contaminated with phenolic compounds and used in the RT-PCR reaction, it produced low yields in the amplified products for the two pecan nut conditions (Figure 2). For RNA obtained using the kit and CTAB 1, amplification was achieved only in germinated pecan. The negative amplification in mature pecan could have been due to the presence of inhibitors such as lysis buffer or some detergents that interfered with the efficiency of the RT-PCR reaction (Sandoval-Pineda et al., 2017). On the other hand, RNA obtained with CTAB 2, CTAB 3 and CTAB 4 protocols generated a clear band compared to the rest of the protocols; this indicates that RNA purity is closely related to amplification efficiency in the RT-PCR reaction. These results confirm that, although relatively low amounts of RNA were collected with the CTAB protocols, total RNA had good quality and can be used in downstream gene expression studies.

Discussion

A large number of protocols for the extraction of quality nucleic acids from plant tissues have been reported; however, the methods remain empirical, due to the variability in their composition (Sánchez-Coello et al., 2012).

The TRI Reagent® has been successfully used in the extraction of RNA from plant species, because as a single phase solution it solubilizes the biological material and denatures the proteins and, when

fue nula en los métodos TRIzol 1 y TRIzol 3, indicando la degradación del ARN, mientras que en los cuatro protocolos basados en CTAB se conservó. De igual forma, en las muestras de ARN obtenidas con el kit se logró confirmar su integridad, aunque con remanentes de ciertos compuestos que interfirieron en su calidad (Figura 1).

Síntesis de ADNc y RT-PCR

Con el fin de evaluar la efectividad de los protocolos de extracción de ARN se diseñó un par de iniciadores de referencia para la detección del gen *actina* de *C. illinoensis*. La electroforesis mostró alta especificidad y demostró la presencia de este gen en el tejido embrionario de nuez pecanera.

En particular, la extracción mediante los protocolos basados en el reactivo TRI Reagent® presentó concentración alta de ARN; sin embargo, al estar contaminado con compuestos fenólicos y ser usado en la reacción de RT-PCR, produjo bajos rendimientos en los productos amplificados para las dos condiciones de nuez pecanera (Figura 2). En el caso del ARN obtenido mediante el kit y CTAB 1, la amplificación se logró solo en nuez germinada. La amplificación negativa en nuez madura pudo deberse a la presencia de inhibidores como el *buffer* de lisis o algunos detergentes que interfirieron en la eficiencia de la reacción RT-PCR (Sandoval-Pineda et al., 2017). Por otra parte, el ARN obtenido con los protocolos CTAB 2, CTAB 3 y CTAB 4 generó una banda clara en comparación con el resto de los protocolos; esto indica que la pureza del ARN está estrechamente relacionada con la eficiencia de amplificación en la reacción de RT-PCR. Estos resultados confirman que, aunque se obtuvieron cantidades de

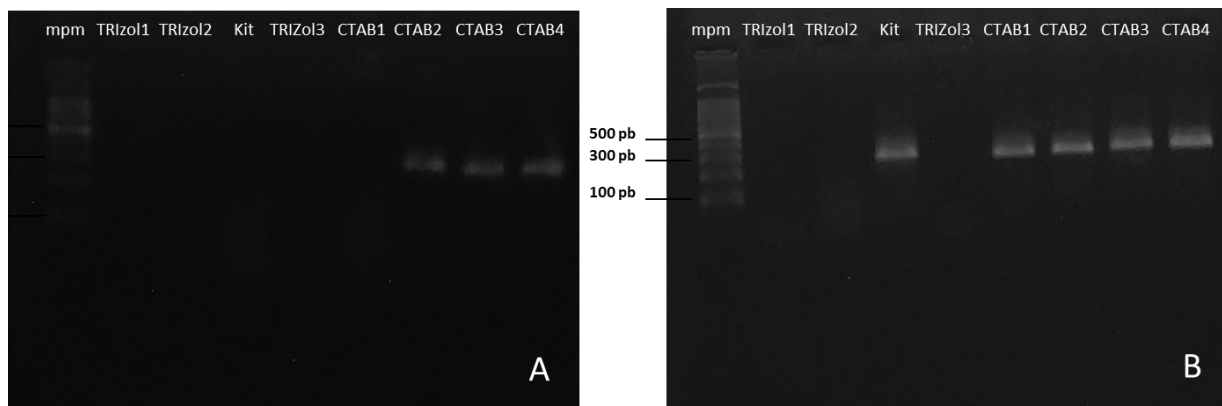


Figure 2. Assessment of the efficiency of the RT-PCR reaction from RNA extracted from embryonic tissue of mature pecan nut (A) and germinated embryo (B) of *Carya illinoensis* using eight extraction methodologies and the actin gene (266 bp). Well 1 corresponds to the molecular weight (mpm) marker of 100 pb (Promega, Fitchburg, WI, USA).

Figura 2. Evaluación de la eficiencia de la reacción de RT-PCR a partir de ARN obtenido del tejido embrionario de nuez pecanera madura (A) y con embrión germinado (B) de *Carya illinoensis* mediante ocho metodologías de extracción y el gen actina (266 pb). El pocillo 1 corresponde al marcador de peso molecular (mpm) de 100 pb (Promega, Fitchburg, WI, EUA).

combined with chloroform, allows phase separation, where the protein is extracted to the organic phase, the DNA remains at the interface and the RNA remains in the aqueous phase (Martínez-López, Leshner, & Jiménez-García, 2013; Ma & Li, 2022). In this study, protocols based on TRI Reagent® reagent showed the highest concentration yields, but with higher degree of contamination. It is possible that the low RNA quality obtained in these protocols is due to contamination by phenolic compounds and lipids characteristic of pecan nut. Some authors have reported that RNA from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. and ascomycetous fungi *Xylaria* sp., extracted using TRI Reagent® may have low quality due to the presence of mucilage, secondary metabolites, polysaccharides, phenols and carbohydrates (Michel-López et al., 2018; Ortega-González et al., 2018; Sandoval-Pineda et al., 2017). Some authors also mention that polyphenols are released and mixed with nucleic acids during the cell lysis process and, consequently, RNA quality and yield decrease (Ferriol-Marchena, Luis-Pantoja, Ruiz, Hernández-Rodríguez, & Pérez-Castro, 2015). The above due to the catecholase activity of polyphenols that allows them to couple to nucleic acids degrading them or causing them to precipitate with them. It has been reported that the use of concentrated sodium acetate (3 M) allows an effective precipitation of RNA by removing contaminating polysaccharides and protein (George, 2018); however, the results in this study differ, since, although high concentrations were obtained, viability and integrity of total RNA was not achieved, which could be due to the type of tissue and the species used for the extraction procedure.

For the commercial kit, the RNeasy® Power Plant® Kit system is recommended by the manufacturer for effective extraction of total RNA from various plant tissues with high phenol and polysaccharide contents. In this study, although it was possible to extract total RNA from pecan nut, the expected optimal purity was not achieved. According to Sánchez-Rodríguez and collaborators (2008), when extraction kits are used, contamination can occur due to the presence of residual sugars, since these are capable of establishing hydrophobic interactions with the matrix.

Protocols using CTAB as an essential part of the extraction buffer are conventional methods to isolate nucleic acids from plant tissues rich in polysaccharides and polyphenols. CTAB is commonly used in interaction with detergents such as SDS, denaturing organic solvents such as phenol and chloroform, and reducing agents such as β -mercaptoethanol (Gambino et al., 2008). In this study, the CTAB buffer-based protocols produced acceptable total RNA yields by increasing purity and decreasing the presence of contaminants. Specifically, the CTAB 4 protocol showed

RNA relativamente bajas con los protocolos CTAB, el ARN total fue de buena calidad y puede ser utilizado en estudios *downstream* de expresión génica.

Discusión

Se ha reportado gran cantidad de protocolos de extracción de ácidos nucleicos de calidad a partir de tejidos vegetales; no obstante, los métodos siguen siendo empíricos, debido a la variabilidad en su composición (Sánchez-Coello et al., 2012).

El reactivo TRI Reagent® se ha utilizado con éxito en la extracción de ARN de especies vegetales, ya que al ser una solución monofásica solubiliza el material biológico y desnaturaliza las proteínas y, cuando es combinado con cloroformo, permite la separación de fases, donde la proteína se extrae a la fase orgánica, el ADN se queda en la interfaz y el ARN permanece en la fase acuosa (Martínez-López, Leshner, & Jiménez-García, 2013; Ma & Li, 2022). En este estudio, los protocolos basados en el reactivo TRI Reagent® mostraron los mayores rendimientos en concentración, pero con mayor grado de contaminación. Es posible que la baja calidad de ARN obtenida en estos protocolos se deba a la contaminación de compuestos fenólicos y lípidos característicos de la nuez pecanera. Algunos autores han reportado que el ARN de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. y hongos ascomicetes *Xylaria* sp., extraído mediante TRI Reagent® puede ser de baja calidad debido a la presencia de mucílago, metabolitos secundarios, polisacáridos, fenoles y carbohidratos (Michel-López et al., 2018; Ortega-González et al., 2018; Sandoval-Pineda et al., 2017). Asimismo, algunos autores mencionan que los polifenoles son liberados y mezclados con los ácidos nucleicos durante el proceso de lisis celular y, en consecuencia, la calidad y el rendimiento del ARN disminuyen (Ferriol-Marchena, Luis-Pantoja, Ruiz, Hernández-Rodríguez, & Pérez-Castro, 2015). Lo anterior debido a la actividad catecolasa de los polifenoles que les permite acoplarse a los ácidos nucleicos degradándolos o provocando que precipiten con ellos. Se ha reportado que el uso de acetato de sodio concentrado (3 M) permite una precipitación efectiva de ARN eliminando los polisacáridos y proteínas contaminantes (George, 2018); sin embargo, los resultados en este estudio difieren, ya que, aunque se obtuvieron concentraciones altas no fue posible la viabilidad e integridad del ARN total, lo cual podría deberse al tipo de tejido y la especie utilizada para el procedimiento de extracción.

En el caso del kit comercial, el sistema RNeasy® Power Plant® Kit es recomendado por el fabricante para una extracción efectiva de ARN total de diversos tejidos vegetales con altos contenidos de fenoles y polisacáridos. En este estudio, aunque se logró extraer ARN total de la

the best results in both concentration and quality for the two nut types, which was confirmed by RT-PCR amplification of the 266-bp actin gene fragment. The CTAB protocol as buffer in interaction with Tris-HCl, NaCl, EDTA, PVP, spermidine, β -mercaptoethanol and LiCl is an efficient process, since it includes a combination of extractions with chloroform:isoamyl alcohol (24:1) and phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1); these reduce total RNA losses due to the formation of insoluble complexes at the interface, protein denaturation and correct separation of nucleic acids (Djami-Tchatchou & Straker, 2012; Thermo Fisher Scientific, 2021).

Similar studies have reported that the use of agents such as CTAB and LiCl increases RNA purity significantly for organisms with high contaminant content (Martínez et al., 2013; Sánchez et al., 2008). CTAB is able to form complexes with polysaccharides and polyphenols removing them from solution (Orek, 2018; Zhao et al., 2012), while LiCl allows a differential precipitation of RNA and other substances such as DNA, proteins and carbohydrates (Hernández-Guzmán & Guzmán-Barney, 2013). The use of SDS and EDTA in the extraction buffer has also been studied proving to be good inhibitors of RNAases (George, 2018), as they dissolve membranes and denature proteins allowing purification of nucleic acids (Rio, Ares, Hannon, & Nilsen, 2010). Furthermore, PVP and β -mercaptoethanol, compounds frequently used because they improve RNA yield and quality, help suppress oxidation, remove ribonucleases released during cell lysis, and deactivate proteins, allowing extraction of nucleic acids from plants (George, 2018; Michel-López et al., 2018; Mommaerts, Sanchez, Betsou, & Mathieson, 2015).

The interaction of these compounds led to high-quality total RNA from pecan nut embryo tissue, making CTAB 4 an effective protocol for future molecular studies in *C. illinoensis*. The CTAB 4 protocol was designed based on other protocols and to be performed in a microextraction format, starting from a minimum amount of sample and using a much smaller volume of reagents. A microextraction is important because it produces a minimum amount of toxic waste and optimizes the use of resources.

Conclusions

The efficiency of eight protocols for the extraction of total RNA from was evaluated in this study, and significant differences were determined regarding quality and quantity, from the embryonic tissue of normal mature pecan nut and germinated embryo. With the protocols based on TRIzol reagent and the commercial kit, high concentrations of total RNA were obtained; however, the quality was deficient,

nuez pecanera no se alcanzó la pureza óptima esperada. Según Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2008), cuando se emplean kits de extracción puede existir contaminación por la presencia de azúcares residuales, ya que estos son capaces de establecer interacciones hidrofóbicas con la matriz.

Los protocolos que utilizan al CTAB como parte esencial del *buffer* de extracción son métodos convencionales para el aislamiento de ácidos nucleicos de tejidos vegetales ricos en polisacáridos y polifenoles. Generalmente, el CTAB se usa en interacción con detergentes como el SDS, disolventes orgánicos desnaturizantes como el fenol y el cloroformo, y agentes reductores como el β -mercaptoetanol (Gambino et al., 2008). En este estudio, los protocolos basados en el *buffer* CTAB produjeron rendimientos de ARN total aceptables, al incrementar la pureza y disminuir la presencia de contaminantes. Específicamente, el protocolo CTAB 4 mostró los mejores resultados tanto de concentración como de calidad para los dos tipos de nuez, lo cual se confirmó con la amplificación por RT-PCR del fragmento del gen actina de 266 pb. El protocolo de CTAB como *buffer* en interacción con Tris-HCl, NaCl, EDTA, PVP, espermidina, β -mercaptoetanol y LiCl es un proceso eficiente, ya que consta de la combinación de extracciones con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); estas logran reducir las pérdidas de ARN total, debido a la formación de complejos insolubles en la interfase, desnaturización de proteínas y separación correcta de ácidos nucleicos (Djami-Tchatchou & Straker, 2012; Thermo Fisher Scientific, 2021).

Estudios similares han reportado que el uso de agentes como CTAB y LiCl incrementa la pureza de ARN de manera significativa en organismos con contenido alto de contaminantes (Martínez et al., 2013; Sánchez et al., 2008). El CTAB es capaz de formar complejos con los polisacáridos y polifenoles removiéndolos de la solución (Orek, 2018; Zhao et al., 2012), mientras que el LiCl permite una precipitación diferencial del ARN y otras sustancias como DNA, proteínas y carbohidratos (Hernández-Guzmán & Guzmán-Barney, 2013). También se ha estudiado el uso de SDS y EDTA en el *buffer* de extracción resultando ser buenos inhibidores de RNAsas (George, 2018), ya que disuelven las membranas y desnaturizan proteínas permitiendo la purificación de los ácidos nucleicos (Rio, Ares, Hannon, & Nilsen, 2010). Asimismo, el PVP y β -mercaptoetanol, compuestos frecuentemente utilizados debido a que mejoran el rendimiento y la calidad del ARN, ayudan a suprimir la oxidación, eliminan las ribonucleasas liberadas durante la lisis celular y desactivan las proteínas, permitiendo la extracción de los ácidos nucleicos de las plantas (George, 2018; Michel-López et al., 2018; Mommaerts, Sanchez, Betsou, & Mathieson, 2015).

which was corroborated by the null amplification of the actin control gene by RT-PCR. Protocols based on CTAB extraction buffer, established for RNA extraction, are useful in downstream applications. Specifically, the CTAB 4 protocol was the most efficient for the extraction of high-quality total RNA from pecan embryonic tissues, which guarantees obtaining samples for gene expression analysis in *C. illinoensis*.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the support granted through postgraduate grant number 735324. This project was also supported by the Universidad Autónoma Chapingo and the Universidad Juárez del Estado de Durango.

End of English version

References / Referencias

- Barrera, A. A. A., Guillen, J. A. A., Tamargo, E. M., Rangel, P. P., & Murrieta, A. L. (2017). Efecto de la longitud de los brotes fructíferos de nogal pecanero sobre la producción, calidad de almendra y viviparidad de la nuez. *Agrofaz*, 17(1), 35-42. Retrieved from <https://1library.co/document/q5mggw7w-efecto-longitud-fruct%C3%ADferos-pecanero-producci%C3%B3n-calidad-almendra-viviparidad.html>
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113 – 116. doi: 10.1007/BF02670468
- Cruz-Álvarez, O., Hernández-Rodríguez, O. A., Jacobo-Cuellar, J. L., Ávila-Quezada, G., Morales-Maldonado, E., Parra-Quezada, R. Á., ... Ojeda-Barrios, D. L. (2020). Nitrogen fertilization in pecan and its effect on leaf nutrient concentration, yield and nut quality. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 26(3), 163 – 173. doi: 10.5154/r.rchsh.2019.10.021
- Djami-Tchatchou, A. T., & Straker, C. J. (2012). The isolation of high-quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.). *South African Journal of Botany*, 78(1), 44 – 46. doi: 10.1016/j.sajb.2011.04.009
- Ferriol-Marchena, X. R., Luis-Pantoja, M., Ruiz, Y., Hernández-Rodríguez, L., & Pérez-Castro, J. M. (2015). Comparación de métodos de extracción de ARN y ADN de hojas de fresa (*Fragaria x Ananassa* Duch) para ensayos de reacción en cadena de la polimerasa. *CitriFruit*, 32(1), 23 – 30. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/303752147_COMPARACION_DE_METODOS_DE_EXTRACCION_DE_ARN_Y_ADN_DE_HOJAS_DE_FRESA_FRAGARIA_X_ANANASSA_DUCH_PARA_ENSAYOS_DE_REACCION_EN_CADENA_DE_LA_POLIMERASA
- Flores-Córdova, M., Muñoz-Márquez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Soto-Parra, J. M., & Preciado-Rangel, P. (2017). Phytochemical composition and antioxidant capacity in Mexican pecan
- La interacción de dichos compuestos permitió la obtención de ARN total de calidad a partir del tejido embrionario de nuez pecanera, siendo CTAB 4 un protocolo eficaz para futuros estudios moleculares en *C. illinoensis*. El protocolo CTAB 4 se diseñó tomando como base otros protocolos y para realizarse en formato de microextracción, partiendo de una cantidad mínima de muestra y utilizando un volumen mucho menor de reactivos. Una microextracción tiene especial importancia debido a que se genera una cantidad mínima de residuos tóxicos además de la optimización de los recursos.

Conclusiones

En este estudio fue posible evaluar la eficiencia de ocho protocolos de extracción de ARN total de *Carya illinoensis*, obteniendo diferencias significativas respecto a la calidad y cantidad, a partir del tejido embrionario de nuez pecanera madura normal y con embrión germinado. Con los protocolos basados en el reactivo TRIzol y en el kit comercial se obtuvieron concentraciones altas de ARN total; sin embargo, la calidad fue deficiente, lo cual se corroboró con la nula amplificación del gen control actina por RT-PCR. Los protocolos basados en el *buffer* de extracción CTAB, establecidos para la extracción de ARN, son útiles en aplicaciones *downstream*. Específicamente, el protocolo CTAB 4 fue más eficiente para la extracción de ARN total de alta calidad a partir de tejidos embrionarios de nuez pecanera, lo cual garantiza la obtención de muestras para análisis de expresión génica en *C. illinoensis*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca de postgrado número 735324. Este proyecto fue apoyado en conjunto por la Universidad Autónoma Chapingo y la Universidad Juárez del Estado de Durango.

Fin de la versión en español

nut. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(5), 346 – 350. doi: 10.9755/ejfa.EJFA-2016-08-1075

Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520 – 525. doi: 10.1002/pca.1078

García-Moreno, B. Y., Báez-Sañudo, R., Mercado-Ruiz, J. N., García-Robles, J. M., & Núñez-Moreno, J. H. (2020). Bioregulación de la germinación prematura de nuez pecanera mediante aplicaciones precosecha con ácido 2-hidroxibenzoico. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 21(2).

- Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81365122005>
- George, A. (2018). Simple and efficient method for functional RNA extraction from tropical medicinal plants rich in secondary metabolites. *Tropical Plant Research*, 5(1), 08–13. doi: 10.22271/tpr.2018.v5.i1.002
- Hernández-Guzmán, A. K., & Guzmán-Barney, M. M. (2013). Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 71–81. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/39752/41696>
- Liu, S., Caia, P., Houa, N., Piao, X., Wang, H., Hunga, T., & Chen, Q. (2012). Genome-wide identification and characterization of a panel of housekeeping genes in *Schistosoma japonicum*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 182(1), 75–82. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.12.007
- Li, J., Zhang, Y., Liao, C., & Liu, X. (2014). Optimization of the procedure for extracting nucleic acids from aloe. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 276–282. doi: 10.4238/2014.January.17.12
- Ma, Y., & Li, S. (2022). Purification of total RNAs and small RNAs from fruit tree leaf tissues. In Wang, A., & Li, Y. (Eds.), *Plant virology. Methods in molecular biology* (pp. 217–224). Humana, New York, NY: Springer. doi: 10.1007/978-1-0716-1835-6_21
- Martínez-López, A. A., Leshner, J. M., & Jiménez-García, M. E. (2013). Comparación de tres métodos para la extracción de ARN total a partir de hojas de cacao. *Biotecnología Vegetal*, 13(2). Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/100/82>
- Mattison, C. P., Rai, R., Settlege, R. E., Hinchliffe, D. J., Madison, C., Bland, J. M., ...Bechtel, P. J. (2017). RNA-Seq analysis of developing pecan (*Carya illinoensis*) embryos reveals parallel expression patterns among allergen and lipid metabolism genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(7), 1443–1455. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04199.
- Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., & Bermúdez-Guzmán, M. D. J. (2018). Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(6), 1259–1267. doi: 10.29312/remexca.v9i6.788
- Mommaerts, K., Sanchez, I., Betsou, F., & Mathieson, W. (2015). Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Analytical Biochemistry*, 479, 51–53. doi: 10.1016/j.ab.2015.03.027
- Orek, C. O. (2018). An optimized cetyltrimethylammonium bromide (ctab)-based protocol for extracting RNA from young and cassava leaves. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 19(4). doi: 10.13140/RG.2.2.24459.75046
- Orona Castillo, I., Sangerman-Jarquín, D. M., Fortis Hernández, M., Vázquez Vázquez, C., & Gallegos Robles, M. Á. (2013). Producción y comercialización de nuez pecanera (*Carya illinoensis* Koch) en el norte de Coahuila, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(3), 461–476. Retrieved from <https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n3/v4n3a10.pdf>
- Ortega-González, C., Iturriaga, G., Ramírez-Pimentel, J. G., García-González, F., Raya-Pérez, J. C., & Aguirre-Mancilla, C. L. (2018). Extracción de RNA total a partir de semilla de chan (*Hyptis suaveolens*). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(1), 1–7. Retrieved from <http://www.somecta.org.mx/Revistas/2018-1/2018-1/EXTRACCION%20DE%20RNA%20TOTAL%20A%20PARTIR%20DE%20SEMILLA%20DE%20CHAN.pdf>
- Platts, A., Shu, S., Wright, S., Barry, K., Edger, P., Pires, J. C., & Schmutz, J. (2021). *Carya illinoensis* cultivar 87MX3-2.11 chromosome 1 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MU179928.1Qju>, L., Jiang, B., Fang, J., Shen, Y., Fang, Z., Rm, S. K., ...Zheng, B. (2016). Analysis of transcriptome in hickory (*Carya cathayensis*) and uncover the dynamics in the hormonal signaling pathway during graft process. *BMC genomics*, 17(1), 1–13. doi: 10.1186/s12864-016-3182-4
- Reyes Vázquez, N. C. (2016). Aprovechamiento integral de la nuez pecanera como fuente de fitocompuestos. In Reyes Vázquez, N. C., & Urrea López, R. (Eds.), *Retos y oportunidades para el aprovechamiento de nuez pecanera en México* (pp. 96–109). Guadalajara, Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Retrieved from https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b790138f4.pdf
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA by SDS solubilization and phenol extraction. *Cold Spring Harbor Protocols*. doi: 10.1101/pdb.prot5438
- Rodríguez-González, M., Arreola-Ávila, J. G., Trejo-Calzada, R., Cueto-Wong, J. A., Zegbe-Domínguez, J. A., Reyes-Juárez, I., ...Borja-de la Rosa, A. (2022). Yield and vivipary of pecan nut (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) in relation to soil moisture. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 28(1), 155–167. doi: 10.5154/r.rchscfa.2021.07.046
- Rubio-Piña, J. A., & Zapata-Pérez, O. (2011). Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(5), 11–11. doi: 10.2225/vol14-issue5-fulltext-8
- Salinas, P., Salinas, C., Contreras, R. A., Zuñiga, G. E., Dupree, P., & Cardemil, L. (2019). Water deficit and abscisic acid treatments increase the expression of a glucomannan mannosyltransferase gene (GMMT) in *Aloe vera* Burm. F. *Phytochemistry*, 159, 90–101. doi: 10.1016/j.phytochem.2018.12.009
- Sánchez-Coello, N. G., Luna-Rodríguez, M., Vázquez-Torres, M., Sánchez-Velásquez, L. R., Santana-Buzzy, N., Octavio-Aguilar, P., & Iglesias-Andreu, L. G. (2012). Optimization of a protocol for DNA isolation and ISSR-PCR amplification system for *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(1), 123–133. doi: 10.5154/r.rchscfa.2011.03.024

- Sánchez-Rodríguez, A., Portal, O., Rojas, L. E., Ocaña, B., Mendoza, M., Acosta, M., ... Hofte, M. (2008). An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. interaction. *Molecular Biotechnology*, 40(3), 299–305. doi: 10.1007/s12033-008-9092-1
- Sandoval-Pineda, J. F., Ochoa-Corona, F. M., & Torres-Rojas, E. (2017). Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 42–52. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57114
- SAS Institute. (2017). Statistical analysis system. The SAS system for Windows version 9.4. Cary, North Carolina, USA: Author
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). (2020). Normales climatológicas por estado. Retrieved from <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/normales-climatologicas-por-estado>
- Silveira de Campos, G., Ayub, R. A., Mazer Etto, R., Weigert Galvão, C., Stroka, M. A., & Inaba, J. (2017). High-quality total RNA isolation from melon (*Cucumis melo* L.) fruits rich in polysaccharides. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(4), 2201–2207. doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n4p2201
- Sparks, D. (2005). Adaptability of pecan as a species. *HortScience*, 40(5), 1175–1189. doi: 10.21273/HORTSCI.40.5.1175
- Thermo Fisher Scientific (2021). The basics: RNA isolation. Retrieved from www.thermofisher.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html
- Tongqiang, F., Qixiang, Z., Yuanyuan, H., Wang, Z., & Huang, Y. (2020). Genome-wide identification of lncRNAs during hickory (*Carya cathayensis*) flowering. *Functional & Integrative Genomics*, 20(4), 591–607. doi: 10.1007/s10142-020-00737-w
- Wang, Z., Huang, J., Sun, Z., & Zheng, B. (2015). Identification of microRNAs differentially expressed involved in male flower development. *Functional & Integrative Genomics*, 15(2), 225–232. doi: 10.1007/s10142-014-0409-9
- Wood, B. W. (2015). Regulation of vivipary in pecan. *Acta Horticultura*, 1070, 33–42. doi: 10.17660/ActHortic.2015.1070.3
- Zhao, L., Ding, Q., Zeng, J., Wang, F. R., Zhang, J., Fan, S. J., & He, X. Q. (2012). An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 647–650. doi: 10.1002/pca.2368
- Zheng, B. S., Chu, H. L., Jin, S. H., Huang, Y. J., Wang, Z. J., Chen, M., & Huang, J. Q. (2010). cDNA-AFLP analysis of gene expression in hickory (*Carya cathayensis*) during graft process. *Tree Physiology*, 30(2), 297–303. doi: 10.1093/treephys/tpp102
- Zhihui, Ma., Binlong., H., Xu, S., Chen, Y., Li, S., & Lin, S. (2015). Isolation of high-quality total RNA from chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook). *PloS ONE*, 10(6), e0130234. doi: 10.1371/journal.pone.0130234