



OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DEL AISLAMIENTO DEL ADN Y DE UN SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN ISSR-PCR PARA *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae).

OPTIMIZATION OF A PROTOCOL FOR DNA ISOLATION AND ISSR-PCR AMPLIFICATION SYSTEM FOR *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae).

Nadia Guadalupe Sánchez-Coello¹; Mauricio Luna-Rodríguez²; Mario Vázquez-Torres³; Lázaro Rafael Sánchez-Velásquez¹; Nancy Santana-Buzzy⁴; Pablo Octavio-Aguilar¹; Lourdes Georgina Iglesias-Andreu¹.

¹Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana. Av. de las Culturas Veracruzanas Núm.101 Col. E. Zapata C. P. 91090 Xalapa, Veracruz, México. Correo-e: xliglesias@gmail.com. (¹Autor para correspondencia).

²Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa, Universidad Veracruzana. Calle Médicos Núm. 5, Col. Unidad del Bosque C. P. 91010. Xalapa, Veracruz, México.

³Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas, C.P. 91190, Apartado Postal 294. Xalapa, Veracruz, México.

⁴Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 Núm. 130 Col. Chuburná de Hidalgo. C. P. 97200, Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN

La mayoría de las cícadas contienen altas concentraciones de aceites esenciales, flavonoides, polifenoles y polisacáridos que interfieren en la extracción de ADN, causando productos de amplificación errados o inhibiendo la PCR. La optimización del aislamiento del ADN y el empleo de iniciadores de secuencias intergénicas repetidas simples (ISSRs) se investigaron en *Ceratozamia mexicana* Brongn., una cícada mexicana en peligro de extinción. El ADN obtenido de tejido foliar fresco, con un amortiguador modificado de cetil trimetil amonio, nos permitió obtener un ADN de buena calidad, sin pigmentos coloridos o contaminantes. La modificación al protocolo de extracción de ADN, basado en CTAB, fue un prelavado por 1 h, del tejido foliar, con una solución de 0.7 M de NaCl, para facilitar la lisis celular. El ADN extraído exitosamente se amplificó por PCR, usando seis iniciadores arbitrarios ISSR. Se observaron productos de amplificación reproducibles en todas las reacciones de PCR. Nuestros resultados muestran que la implementación mejora significativamente la calidad del ADN obtenido, usando una concentración baja de iniciadores (25 pM). Se detectaron 23 bandas fuertes, nueve de las cuales fueron polimórficas. Los resultados indican que el protocolo de optimización del aislamiento del ADN y en el sistema de PCR es viable para futuros trabajos en esta especie. Este trabajo es el primer protocolo de extracción de ADN y de ISSR reportado para esta especie ornamental en peligro de extinción.

Recibido: 16 de marzo, 2011
Aceptado: 1 de noviembre, 2011
DOI: 10.5154/r.rchscfa, 2011.03.024
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE: *Ceratozamia mexicana*, Cícadas, extracción de ADN, especies en peligro, ISSR.

ABSTRACT

Most of the cycads contain high concentrations of essential oils, flavonoids, polyphenols, and polysaccharides that interfere with DNA extraction, causing erroneous or no PCR products. The optimization of DNA isolation, employing inter-simple sequence repeats (ISSRs) primers were investigated in *Ceratozamia mexicana* Brongn., an endangered Mexican cycad. The DNA obtained from fresh-leaf tissues with a modified cetyltrimethylammonium bromide buffer protocol gave a good quality of DNA with no colored pigments and contaminants. The main modification to the CTAB-based DNA extraction protocol was the one hour leaf tissue soaking pre-treatment with a 0.7 M NaCl solution, to facilitate the cell lysis. The DNA extracted was successfully amplified by PCR using six arbitrary ISSR primers. Reproducible amplifiable products were observed in all PCR reactions. Our results show a significant improvement in the DNA quality obtained using low primer concentration (25 pM). 23 strong bands were detected, 9 of which were polymorphic. The results indicated that the optimized protocol for DNA isolation and PCR system is suitable for further work in this specie. This work is the first DNA extraction and ISSR protocols reported for this ornamental and endangered species.

KEYWORDS: *Ceratozamia mexicana*, Cycads, DNA extraction, endangered species, ISSR.

INTRODUCCIÓN

Ceratozamia mexicana Brongn. (Zamiaceae) es una planta dioica (Norstog y Nicholls, 1997). Es una cícada endémica de México distribuida en la zona central del país, particularmente en Coacoatzintla, Veracruz (Vovides, 1983). Esta cícada, al igual que el resto del grupo, tiene un alto valor comercial como planta ornamental y constituye un importante recurso genético mexicano por su larga vida (Vovides y Iglesias, 1994). Debido a la pérdida y fragmentación de su hábitat, su distribución limitada y los atributos de su historia de vida (cruzamiento obligado, larga vida y dioicidad), esta especie se encuentra en la categoría de vulnerable y está protegida por el gobierno mexicano bajo la NOM-059 (SEMARNAT, 2010).

Con el fin de contribuir a la conservación de este importante recurso genético, es necesario desarrollar protocolos moleculares que permitan determinar los niveles de variación genética dentro de las poblaciones en diferentes condiciones ambientales (Avisé, 1994, González-Astorga *et al.*, 2006), entre sexos (Reamon-Büettner y Jung, 2000; Flachowsky *et al.*, 2001; Prakash y Staden, 2006) y entre categorías de tamaño o edad (Octavio-Aguilar *et al.*, 2009).

En el estado actual del conocimiento, contar con una técnica efectiva para el proceso de extracción de ADN es un paso crítico en todos los estudios de genética molecular (Boiteux *et al.*, 1999). Contar con protocolos rápidos, fiables y de bajo costo para la extracción de ADN resulta siempre deseable. El ADN extraído de tejidos proveniente de la especie *Ceratozamia mexicana*, suele estar degradado o contaminado por aceites esenciales, polifenoles y proteínas. En particular, la cantidad de polisacáridos como componente de las hojas en las cícadas es alta (Yagi *et al.*, 2002) y éstos dificultan la extracción y purificación del ADN (Aljanabi *et al.*, 1999). En general, es difícil extraer y purificar ADN de buena calidad en cícadas debido a la presencia además de los polisacáridos, de grandes cantidades de metabolitos secundarios, proteínas así como taninos, alcaloides y polifenoles. Estos compuestos interfieren al precipitar junto con el ADN, por lo tanto degradan su calidad y reducen su rendimiento (Katterman and Shattuck, 1983).

Las técnicas basadas en PCR, como los Inter-microsatélites (Inter Simple Sequences Repeats-ISSR), desarrollado por Zietkiewicz *et al.* (1994), han demostrado ser muy útiles en los estudios de variación genética en cícadas (Jianguang *et al.*, 2005), así como para determinar el sexo de las plantas (Gangopadhyay *et al.*, 2007). La técnica ISSR es una modificación de la técnica de microsatélites (SSR) que utiliza un solo iniciador, consistente en repeticiones de di o trinucleótidos abundantes en el genoma. Los iniciadores ISSRs son ligeramente mayores (16-20 pb) por lo que pueden anclarse mejor al ADN y mejorar la fiabilidad y reproducibilidad del sistema (Reddy *et al.*, 2002). Además, los ISSRs son marcadores moleculares significativamente más baratos que otros como los AFLPs

INTRODUCTION

Ceratozamia mexicana Brongn. (Zamiaceae) is a dioecious plant (Norstog and Nicholls, 1997). It is an endemic Mexican cycad distributed on the central zone of the country, particularly in Coacoatzintla, Veracruz (Vovides, 1983). This cycad, like the rest of the group, has commercial value as ornamental plant; also because of its long live, has a relevant value as genetic Mexican resource (Vovides and Iglesias, 1994). Because of the loss and fragmentation of its habitat, narrow distribution and attributes of life history (obligate outcrossing, long live and dioecious), this specie is located into the threatened category, and protected by the Mexican government by the NOM-059 (SEMARNAT, 2010).

In order to contribute to the conservation of this valuable genetic resource, it is necessary to develop molecular protocols to determine the levels of genetic variation within populations among different environmental condition (Avisé, 1994, González-Astorga *et al.*, 2006), sexes (Reamon-Büettner and Jung 2000; Flachowsky *et al.*, 2001; Prakash and Staden, 2006) and sizes or ages categories (Octavio-Aguilar *et al.*, 2009).

At current state of knowledge, a standard technique of DNA extraction process is a critical step in all molecular genetic studies (Boiteux *et al.*, 1999). The quick, reliable and inexpensive protocols for DNA isolation are always desirable. DNA extracted from processed materials from *Ceratozamia* species is usually degraded or contaminated by essential oils, polyphenols and proteins. In particular, the sugar composition from cycads leaves is high (Yagi *et al.*, 2002) and the polysaccharides hinder the extraction and purification of DNA (Aljanabi *et al.*, 1999). In general, it is difficult to extract and purify high-quality DNA from cycads plants because of the presence of large quantities of secondary metabolites, polysaccharides and proteins such as tannins, alkaloids, and polyphenols. These compounds interfere by precipitating along with the DNA, thus degrading its quality and reducing yields (Katterman and Shattuck, 1983).

Techniques based on PCR, like Inter Simple Sequences Repeats (ISSR), developed by Zietkiewicz *et al.* (1994), have been proved to be very useful to reveal genetic variation in cycads (Jianguang *et al.*, 2005) as well as to determine plant sex (Gangopadhyay *et al.*, 2007). ISSR technique is a modification of the SSR approach that uses a single primer based on SSR (microsatellites repeated sequences) that are abundant in the genome. The longer ISSRs primers (16 - 20 bp) can precisely target the template DNA and improve reliability and reproducibility (Reddy *et al.*, 2002). In addition, ISSRs are significantly lower in cost than other molecular markers like AFLPs (amplified fragment length polymorphism). In order to obtain the efficient management and conservation of *C. mexicana*, extensive research on DNA-based molecular markers is necessary.

(Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados). Con el fin de realizar un manejo y conservación eficiente de *C. mexicana*, es necesario realizar extensas investigaciones sobre la estandarización de las técnicas basadas en el uso de marcadores moleculares del ADN.

El objetivo del presente estudio es desarrollar un método eficiente, sencillo y económico de extracción de ADN, a partir del tejido foliar de *C. mexicana* Brongn. (Zamiaceae) para obtener un protocolo óptimo de extracción para futuras aplicaciones en esta especie ornamental y en peligro de extinción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Como material de estudio se utilizaron quince plantas masculinas y femeninas (el sexo se identificó a través de la observación del cono) de *C. mexicana* Brongn., de la población ubicada en Coacoatzintla, Ver., México. Se colectaron muestras de hoja fresca en los meses de febrero a abril de 2009. Las muestras fueron almacenadas en bolsas de plástico, colocadas dentro de una hielera de unicel y trasladadas al laboratorio, donde se mantuvieron a una temperatura de 4 °C, por pocos días hasta ser utilizadas en la extracción del ADN.

Aislamiento y detección de ADN

Los tejidos foliares colectados se lavaron con una solución de etanol (70 % v/v). Posteriormente 0.060 g (aproximadamente 1 cm²) de tejido foliar fue sumergido durante 1 hora en una solución de 0.70 M de NaCl (Cloruro de Sodio) con el fin de facilitar la lisis del tejido. Las muestras de hojas sin tratamiento de inmersión fueron utilizadas como control. La extracción de ADN se realizó por duplicado, siguiendo el método de Stewart y Vía (1993), basado en el uso de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y una purificación adicional.

Las cuantificaciones de ADN fueron realizadas en un espectrofotómetro UV (Perkin Elmer) a 260 y 280 nm. La pureza se determinó mediante el cálculo de la relación de absorbancias (A260/A280) para todas las muestras. El ADN resuspendido se diluyó a una concentración de 50 ng·µL⁻¹ de agua destilada doblemente esterilizada. Las muestras, debidamente etiquetadas, se conservaron hasta su uso a una temperatura de -20 °C. La integridad del ADN de los individuos masculinos y femeninos en estudio, fue analizada mediante electroforesis horizontal (CONSORT), en geles al 0.8 % de agarosa. Se usó una solución amortiguadora TBE 0.5 x y se aplicó una corriente constante de 130 V durante 60 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 mg·mL⁻¹) y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV (CONSORT TFX-20M).

Optimización del sistema ISSR-PCR

La amplificación del ADN purificado se basó en el sistema ISSR-PCR. El ADN de quince individuos (masculino

The aim of the present study is to develop an efficient, simple and inexpensive DNA isolation method from leaf tissue of *C. mexicana* Brongn. (Zamiaceae) to obtain an optimal protocol of extraction for future applications in this ornamental and threatened species.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Fifteen male and female plants (sex was identified through observation of the cone) of *C. mexicana* Brongn., from population located in Coacoatzintla Ver., Mexico, were used as study material. Fresh leaf samples were collected from February to April of 2009. The samples were stored in plastic bags inside a Styrofoam cooler and transported to the laboratory where it was kept at 4 °C few days to until it was required for DNA isolation.

DNA isolation and detection

The leaf tissues collected were cleaned with ethanol solution (70 % v/v). 0.060 g (1 cm² of leaf tissue approximately) of leaf were soaked for 1 hour in a 0.70 M NaCl solution in order to facilitate the tissue lysis; in addition leaf samples without soaking treatment were used as a control. The DNA extractions were made by duplicate, following the method of Stewart and Vía (1993), based on the use of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and a further purification.

DNA quantifications were performed by UV-spectrophotometer (Perkin Elmer) at 260 and 280 nm and the purity was then determined by calculating the ratio of absorbance (A260/A280) for all samples. The re-suspended DNA was then diluted in sterilized double distilled water to the concentration of 50 ng·µL⁻¹. Later they were kept at -20 °C, properly labeled until ready to use. DNA integrity, from the male and female individuals, was analyzed by horizontal electrophoresis (CONSORT), on 0.8 % agarose in 0.5 x TBE buffer with a constant current of 130 V for 60 min. Gels were stained with ethidium bromide (1 µg·mL⁻¹) and the bands were visualized in a UV light transilluminator (CONSORT TFX-20M).

Optimization of ISSR-PCR system

ISSR-based amplification of the purified DNA, from fifteen male and female DNA individuals, grouped in "bulks", according to bulk segregant analysis method (Michelmore *et al.*, 1991), since this protocol forms the basis for future studies to early differentiation of sex in this plant. Each amplifications was carried out in a 25 µL reaction mixture containing (pH 8.3 1x PCR buffer), 3.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 1.25 U Taq DNA polymerase (INVITROGEN®) and 50 ng template male and female DNA bulk. A set of 6 ISSRs

y femenino), previamente mezclados en "grupos", según el sexo, fue analizado mediante el método de análisis masal segregante (Michelmores *et al.*, 1991). Cada una de las amplificaciones se llevó a cabo empleando 25 µL de una mezcla de reacción que contenía (1x amortiguador PCR, pH 8.3), 3.0 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 1.25U de Taq ADN polimerasa (INVITROGEN®) y 50 ng de ADN de los grupos de individuos masculinos y femeninos previamente formados. Se utilizó un conjunto de 6 iniciadores ISSRs (Cuadro 1), provenientes de la Universidad Columbia Británica, Canadá. Para la amplificación y estandarización de las condiciones de PCR. Los ISSRs fueron seleccionados en base al polimorfismo mostrado en otras especies vegetales (Pollegioni *et al.*, 2006).

Para optimizar las condiciones de reacción se estudiaron dos variables: concentración de iniciadores y temperaturas de anillamiento, como se describe en el Cuadro 2.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador de ADN (marca eppendorf®.AG PTC-200) bajo las siguientes condiciones térmicas: paso inicial de desnaturalización de 94 °C durante 7min, seguido por 40 ciclos de 30s a 94 °C, 60 s, a diferentes temperaturas de anillamiento, por cada iniciador (52-55 °C), 90 s a 72 °C

primers (Table 1) from British Columbia University in Vancouver Canada, were used for amplification to standardize the PCR conditions. ISSRs were selected because some plant species show polymorphism (Pollegioni *et al.*, 2006).

To optimize the reaction conditions two variables primer concentration and annealing temperatures were investigated as described in Table 2.

The PCR reactions were carried out in a DNA Thermocycler eppendorf® (AG PTC-200) under the following conditions: initial denaturation step of 94 °C for 7 min, followed by 40 cycles of 30 s at 94 °C, 60 s, at different annealing temperature for each primer (52-55 °C), 90 s at 72 °C for 10 min. Negative controls were included in all ISSR. 7 µL of PCR products were submitted to electrophoresis on 2 % (w/v) agarose gels, in 0.5X TBE buffer at 100 V for 1 hour and stained with ethidium bromide (0.5 µg·mL⁻¹). DNA ladder (mark Axygen CA 94587) were used two ladders as 200 pb and 50 pb molecular weight.

After electrophoresis, gels were visualized under UV transilluminator and documented using the CONSORT SP-TF12 Gel Documentation System.

CUADRO 1. Número de bandas amplificadas y secuencias de los 6 iniciadores ISSR en estudio de grupos de individuos masculinos y femeninos,(UBC):iniciadores ISSR provenientes de la Universidad Columbia Británica, Canadá.

Iniciadores ISSR	Secuencias 5'-3'	Ta (°C)	No. alelos	Rango pb	PPB (%)
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52	3	250-450	0
UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	54	8	200-600	50
UBC-856	ACACACACACACACACYA	55	5	300-600	60
UBC-888	BDBCACACACACACACA	52	2	280-500	0
UBC-890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	54	3	230-430	0
UBC-891	HVHTGTGTGTGTGTGT	54	4	200-400	50

H = (A, G, T); V = (A, C, G); Ta: Temperatura de alineamiento; PPB (%): Porcentaje de bandas polimórficas obtenidos mediante el análisis masal del ADN .

TABLE 1. Sequences and amplification band numbers of 6 selected ISSR primers of University of British Columbia, Canada (UBC).

ISSR Primer	Sequence 5'-3'	Ta (°C)	No alleles	Range bp	PPB (%)
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52	3	250-450	0
UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	54	8	200-600	50
UBC-856	ACACACACACACACACYA	55	5	300-600	60
UBC-888	BDBCACACACACACACA	52	2	280-500	0
UBC-890	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	54	3	230-430	0
UBC-891	HVHTGTGTGTGTGTGT	54	4	200-400	50

H = (A, G, T) ; V = (A, C, G); Ta: Annealing temperature; PPB (%): Percentage of polymorphism bands by Male and Female DNA bulk.

CUADRO 2. Condiciones de amplificación para detectar marcadores ISSR-PCR en *Ceratozamia mexicana* Brongn.

Condiciones PCR	Rango Probado
Concentración de iniciadores (pM)	25, 50 y 100 pM
Temperatura de anillamiento (°C)	52-55°

durante 10 min. En todos los casos se incluyeron controles negativos. 7 µL de productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2 % (w / v) en una solución amortiguadora TBE 0.5X a 100 V, durante 1 hora y finalmente fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹). Se utilizaron dos marcadores de peso molecular de 50 y 200pb (marca Axygen CA 94587).

Después de la electroforesis, los geles se visualizaron bajo un transiluminador UV y fueron registrados utilizando el Sistema de Documentación de Gel (marca CONSORT SP-TF12).

Se determinó el número y el peso molecular de cada banda ISSRs obtenida; sin embargo, para el análisis, sólo las bandas reproducibles y bien definidas fueron consideradas en este estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y detección de ADN

Para la extracción de ADN se siguió el método propuesto por Stewart y Vía (1993), basado en uso del CTAB. Se obtuvieron 0,060 g de ADN por gramo de tejido de hoja fresca. Sin embargo, el análisis de la absorbancia (A260/A280) del ADN que dio un valor de 1.4 evidenció la presencia de altos niveles de contaminación por proteínas, polisacáridos y fenoles. La muestra de ADN obtenida resultó muy viscosa denotando la presencia de polisacáridos muy similar a lo reportado por Yagi *et al.* (2002). Tras la electroforesis, los patrones de bandas obtenidos (Figura 1a), mostraron que el ADN estaba un poco degradado. No se visualizaron, mediante electroforesis, la presencia de bandas bien definidas. En la Figura 1 se muestra el resultado de la electroforesis del ADN genómico extraído en 5 individuos masculinos y femeninos, respectivamente, de *C. mexicana*.

Se evaluó la eficacia en términos de cantidad y calidad del ADN el protocolo de extracción de ADN de Stewart y Vía (1993) para *C. mexicana* y se perfeccionó. El protocolo modificado, incluyó un pre-tratamiento del ADN con una solución de 0.70 M of NaCl. Esto permitió obtener un ADN de alta pureza (libre de aceites esenciales, polifenoles, flavonoides y polisacáridos) a partir de muestras frescas de hoja. La pureza de las muestras de ADN fue confirmada por el valor de absorbancias (A260/A280) de 1.8 o más obtenido. Valores entre 1.8 - 2.0 de absorbancia denota generalmente que el ADN es de alta calidad. Las bandas, después de la electroforesis, fueron más nítidas (Figura 1b).

TABLE 2. Conditions of the ISSR-PCR protocol for *Ceratozamia mexicana* Brongn.

PCR parameter	Tested range
Primer concentration (pM)	25, 50 and 100
Annealing temperature (°C)	52-55°

The number and molecular weight of each ISSR bands was determined however, for the analysis, only the reproducible and well defined bands were considered.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA isolation and detection

The CTAB-based DNA extractions method proposed by Stewart and Via (1993) yielded 0.060 g per gram of fresh leaf tissue. However, heavy contamination with polysaccharides and phenolics was revealed by absorbance (A260/A280) ratios, which were 1.4 mean, indicating high levels of contaminating proteins and polysaccharides. The sample was very viscous denoting the polysaccharide presence similar to that reported by Yagi *et al.* (2002). Upon electrophoresis, shading patterns obtained (Figure 1a) suggested poor migration and DNA degradation (smeared DNA pattern). Neither lagging and unbinding band was found in each lane by electrophoresis. Figure 1 show the electrophoresis result of genomic DNA extracted from 5 male and female individuals of *C. mexicana* respectively.

The modified CTAB- based DNA extraction protocol for *C. mexicana* was further tested and refined to compare its efficiency in terms of quantity and quality of the DNA. The modified protocol, including a 0.70 M of NaCl pretreatment, yielded DNA of high purity, free from essential oils, polyphenols, flavonoides, and polysaccharides from fresh leaf samples. The purity of the DNA samples was confirmed by absorbance (A260/A280) ratio, which was 1.8 or more, and the bands following electrophoresis were sharper (Figure 1b). A ratio of 1.8 - 2.0 is generally accepted high quality of DNA.

ISSR-PCR system

The two tested parameters for the ISSR-reactions were primer concentration of and annealing temperature as they have an effect on amplification, banding patterns and reproducibility. Optimized conditions for ISSR-PCR protocol are given in Table 3.

The DNA obtained was suitable for PCR applications. It was observed high intensity amplification bands employing different UBC 834 primer concentration (Figure 2). The preliminary primer results showed 25 µl concentration UBC oligonucleotides could amplify clear, reproducible and distinctive bands which were selected for further examination (Figures 2 and 3).

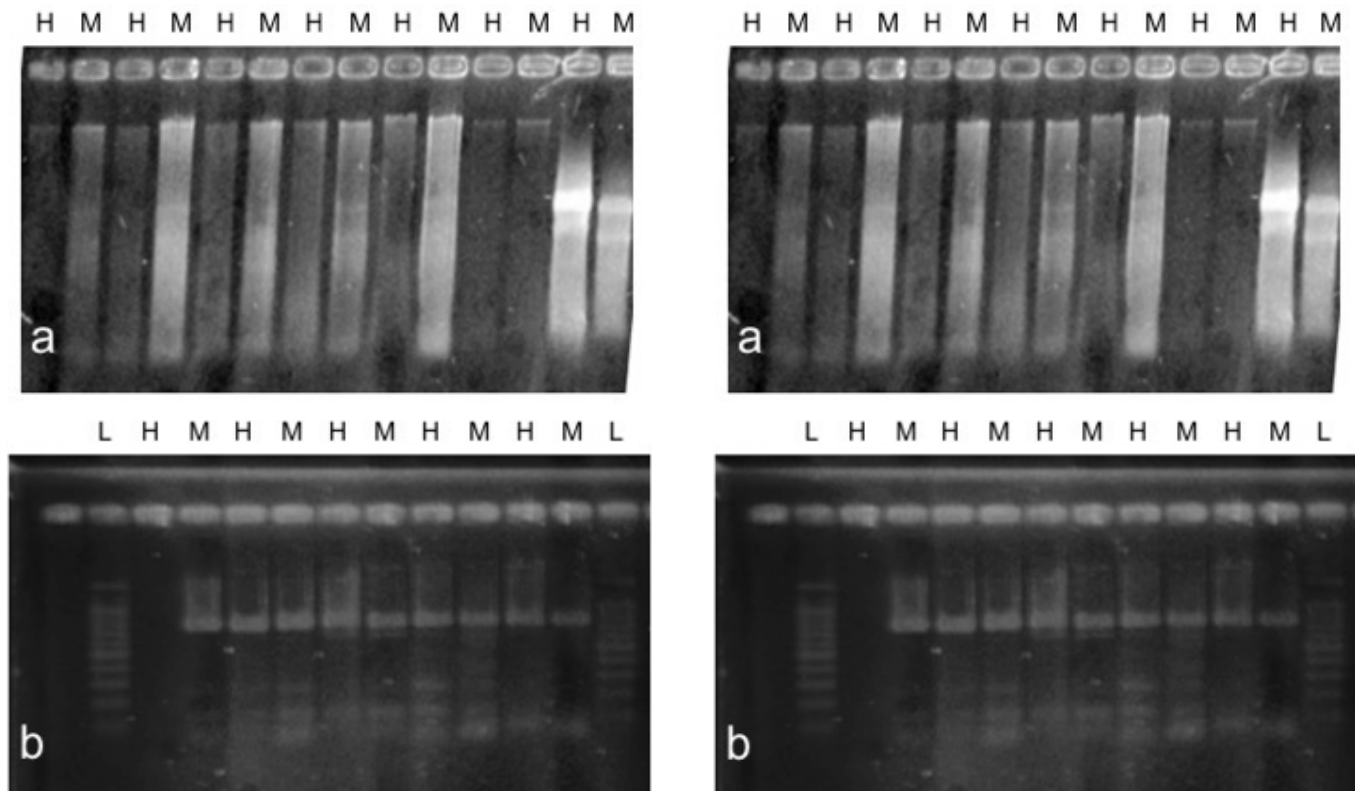


FIGURA 1. Resultados de la electroforesis de ADN genómico extraído de 1-5 individuos masculinos, 6-10 individuos femeninos de *Ceratozamia mexicana*, a) Método de extracción de ADN de Stewart y Vía (1993), b) Método de Stewart y Vía (1993) modificado con tratamiento de NaCl (L: Marcador de peso molecular de 100 pb).

FIGURE 1. Electrophoresis results of genomic DNA extracted from 1-5 male; 6-10 female individuals of *Ceratozamia mexicana*, a) Stewart and Via DNA isolation method and, b) Stewart and Via modified method with NaCl treatment (L: 100 bp DNA ladder size standard marker).

CUADRO 3. Mezcla de reacción optimizada (1x) por cada iniciador ISSR examinado. (MgCl₂: Cloruro de magnesio; mM: micromoles; dNTPs: dinucleótidos; Taq Pol: Taq ADN polimerasa; U: unidades; pM: picomoles; ng: nanogramos, µl: microlitros). UBC: iniciadores ISSR de la Universidad Columbia Británica, Canadá.

Mezcla de reacción 1X	UBC 834	UBC 856	UBC 888	UBC 891	UBC 841	UBC 890
Amortiguador Taq 5X	1x	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂ (25 mM)	3.0 mM	3.0 mM	2.5 mM	3.0 mM	3.0 mM	3.0mM
dNTPs (10 mM)	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM
Taq ADN Pol. (5U)	1.25 U	1.25 U	1.25 U	1.25 U	1.25 U	1.25 U
Iniciador (25 pM·µl ⁻¹)	25 pM	25 pM	25 pM	25 pM	25 pM	25 pM
ADN (50 ng·µl ⁻¹)	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
Concentración final	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

TABLE 3. Mixture reaction optimized (1x) for each ISSRs primer examined. (MgCl₂: Magnesium chlorure; mM: micromoles; dNTPs: Dinucleotides; Taq DNA Pol: Taq-polimerase; U: units; pM: picomoles; ng: nanograms, µl: microlitres). UBC: ISSR primers of the University of British Columbian.

Reaction mix 1X	UBC 834	UBC 856	UBC 888	UBC 891	UBC 841	UBC 890
5X Taq Buffer	1x	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂ (25 mM)	3.0 mM	3.0 mM	2.5 mM	3.0 mM	3.0 mM	3.0 mM
dNTPs (10 mM)	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM	0.4 mM
Taq DNA Pol. (5 U)	1.25 U	1.25 U	1.25 U	1.25 U	1.25 U	1.25 U
Primer (25 pM·µl ⁻¹)	25 pM	25 pM	25 pM	25 pM	25 pM	25 pM
DNA (50 ng·µl ⁻¹)	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
Final concentration	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Sistema ISSR-PCR

Las dos condiciones evaluadas en las reacciones ISSRs fueron: la concentración de los iniciadores y la temperatura de anillamiento, ya que ambas tienen un efecto en los resultados de la amplificación y en los patrones y reproducibilidad de las bandas obtenidas. En el Cuadro 3 se muestran las condiciones optimizadas para detectar marcadores ISSR-PCR en *C. mexicana*.

El ADN extraído resultó adecuado para efectuar las amplificaciones por PCR. Se observó la presencia de bandas de alta intensidad al emplear distintas concentraciones del iniciador UBC 834 (Figura 2). Los resultados preliminares del análisis de los iniciadores mostraron que

A total of 23 bands were amplified, among which 9 were polymorphic (39.13 % of polymorphism). A mean of 4.16 ± 2.13 bands were amplified by each primer. The ISSRs bands detected in *C. mexicana* have uncovered fragments from 200 bp (UBC 841 and 891) to 600 bp (UBC 841 and 856). The UBC 841, 856 and 891 primers were polymorphic while the UBC 890, 834 and 888 primers were monomorphic (Table 1). Although we could not generalize that all individuals in the grouped bulks were monomorphic for those primers.

An array of DNA isolation protocols have been optimized and were used in various combinations to isolate quality DNA from plants for analyses (Dellaporta *et al.*, 1983; Doyle and Doyle, 1990; Suman *et al.*, 1999; Shah

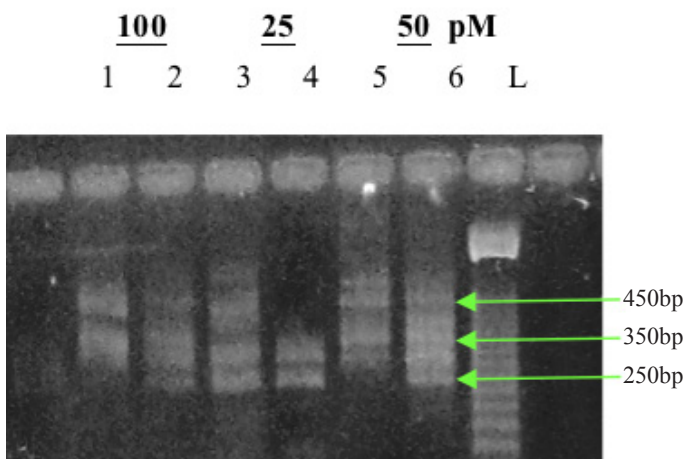


FIGURA 2. Resultados ISSR-PCR en *Ceratozamia mexicana* obtenidos del análisis de ADN de grupos de individuos masculinos y femeninos amplificados con distintas concentraciones de iniciadores UBC 834 (25, 50 y 100 pM). (L: Marcador de Peso molecular de 50pb. 1-3: grupos de individuos masculinos, 4-6: grupos de individuos femeninos).

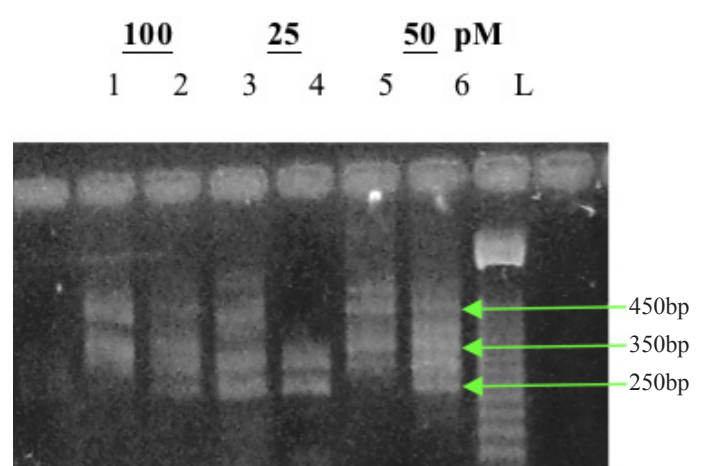


FIGURE 2. ISSR-PCR results in *Ceratozamia mexicana* male and female DNA bulk samples amplified by different UBC 834 primer concentration (25, 50 and 100 pM) (L: 50bp DNA ladder marker. 1-3 Male DNA bulk, 4-6 Female DNA bulk).

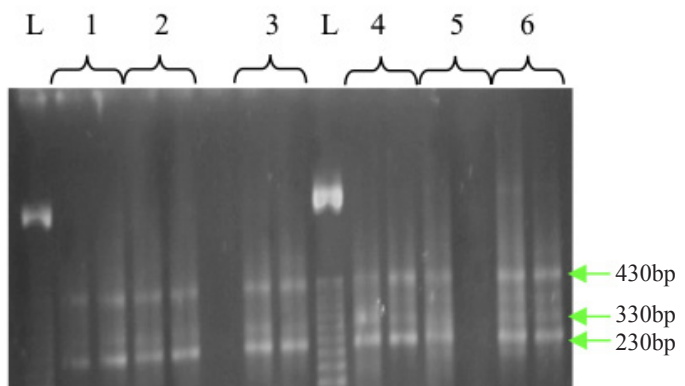


FIGURA 3. Resultados ISSR-PCR en *Ceratozamia mexicana* obtenidos del análisis de ADN de grupos de individuos masculinos y femeninos amplificados con el iniciador UBC 890 (25 pM). (L: Marcador de peso molecular de 100pb. 1-3: grupos de individuos masculinos, 4-6: grupos de individuos femeninos).

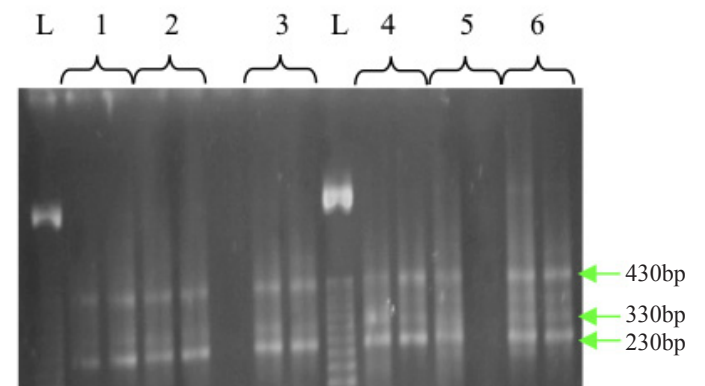


FIGURE 3. ISSR-PCR results in *Ceratozamia mexicana* male and female DNA bulk samples amplified with 25pM UBC 890 primer. (L: 100bp DNA ladder marker. 1-3 Male DNA bulk, 4-6 Female DNA bulk).

la concentración de 25µl de oligonucleótidos (UBC), podría ser suficiente para obtener bandas claras, distintivas y reproducibles, que pudiesen ser seleccionadas para estudios posteriores (Figura 2 y 3).

Un total de 23 bandas fueron amplificadas con los 6 iniciadores en estudio, de las cuales 9 fueron polimórficas (39,13 % de polimorfismo). Por cada iniciador se amplificaron en promedio 4.16 ± 2.13 bandas. Las bandas ISSRs detectadas en *C. mexicana* revelaron la presencia de fragmentos desde 200pb (UBC: 841 y 891) hasta 600 pb (UBC: 841 y 856). Los iniciadores UBC 841, 856 y 891 fueron los más polimórficos, mientras que los iniciadores UBC 890, 834 y 888 fueron monomórficos (Cuadro 1). No obstante no se puede generalizar que todos los individuos en los grupos examinados sean monomórficos para esos iniciadores.

Abunda en la literatura, protocolos de extracción de ADN en plantas que se han optimizado para obtener ADN de adecuada calidad (Dellaporta *et al.*, 1983; Doyle y Doyle, 1990; Suman *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2000; Warude *et al.*, 2003; Sarwat *et al.*, 2006; Deshmukh *et al.*, 2007) pero en la práctica estos procedimientos han sido empíricos, debido a la variabilidad en la composición de los tejidos vegetales. Las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de extracción y purificación que se han utilizado en plantas han sido previamente discutidos (Aljanabi *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2000). Aunque en cícadas se han evaluado distintos procedimientos de extracción de ADN, se encontró que el método basado en el uso del CTAB resulta el más efectivo en *Cycas circinalis* L. Miq. y en *C. micholitzii* Dyer (Gangopadhyay *et al.*, 2007)

El proceso de extracción de ADN implica romper o digerir las paredes celulares para liberar los constituyentes celulares. A esto le sigue la lisis de las membranas celulares para liberar el ADN para su posterior amplificación. Los problemas encontrados en la extracción y purificación de ADN de alto peso molecular en ciertas especies vegetales conlleva la presencia de diferentes contaminantes. Entre ellos, los polisacáridos se encuentran entre los contaminantes más difíciles de separar del ADN (Murray y Thompson, 1980). Los polisacáridos pueden interferir con la actividad de varias enzimas tales como las polimerasas, ligasas y enzimas endonucleasas de restricción. La eliminación de los inhibidores de la polimerasa, tales como los polisacáridos, favorecen la amplificación por PCR del ADN (Lodhi *et al.*, 1994).

El método de Stewart y Vía (1993) ha sido utilizado con éxito en la extracción del ADN de varias especies vegetales, como *Pinus patula* Schiede ex Schlechtendal et Chamisso (Luna-Rodríguez *et al.*, 2005). Este procedimiento utiliza una mayor concentración (2 % p/v) de Polivinilpirrolidona (PVP) de elevado peso molecular es decir, (40000 a 2 % p/v). Este es un compuesto comúnmente utilizado por suprimir la oxidación polifenólica (Porebski *et al.*, 1997) en protocolos de extracción de ADN basado

et al., 2000; Warude *et al.*, 2003; Sarwat *et al.*, 2006; Deshmukh *et al.*, 2007) but in practice these procedures are empirical due to variability in plant tissue composition. The strengths and weaknesses of the various complete extraction and purification methods have been discussed previously (Aljanabi *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2000). Although different DNA isolation procedures have been evaluated in cycads it was observed in *Cycas circinalis* L. Miq. (Gangopadhyay *et al.*, 2007) and *C. micholitzii* Dyer. (Peng Quiao *et al.*, 2008) that the CTAB DNA isolation method were more effective.

The DNA extraction process involves breaking or digesting away cell walls to release the cellular constituents. This is followed by disruption of the cell membranes to release DNA into the extraction buffer. Problems encountered in the isolation and purification of high molecular weight DNA from certain plant species includes the presence of different contaminants. Among them, highly viscous polysaccharides contaminants are particularly difficult to separate from DNA (Murray and Thompson, 1980). Polysaccharides may interfere with several biological enzymes such as polymerases, ligases and restriction endonucleases and the removal of polymerase inhibitors such as polysaccharides favors of the DNA amplification by PCR (Lodhi *et al.*, 1994).

The Stewart and Via (1993) method has been used with success in several plants such as *Pinus patula* Schiede ex Schlechtendal et Chamisso (Luna-Rodríguez *et al.*, 2005). This procedure use a higher-molecular-weight Polyvinylpyrrolidone (PVP), (i.e., 40000 at 2 % w/v), a compound known to suppress polyphenolic oxidation (Porebski *et al.*, 1997), has been used frequently in CTAB extraction protocols (Doyle and Doyle, 1990). The polyphenol compounds occur in many plants and are one of the major bioactive constituents in many cycads species (Yagi *et al.*, 2002; Peng-Quiao *et al.*, 2008). In the present study, enough PVP and ascorbic acid were added when the tissue was grinded. Addition of PVP along with CTAB may bind to the phenolic compounds by forming a complex with hydrogen bonds and may help in removal of impurities to some extent. Repeated chloroform: isoamyl alcohol treatment ensured removal of chlorophyll, other colouring substances such as pigments and proteins, etc. DNA degradation was avoided to some extent by carrying out all the steps at 4 °C. Thus, we concluded that present protocol described a reliable, rapid, simple and consistent DNA isolation method for *Ceratozamia mexicana*.

The addition of NaCl at concentrations of 0.7M, together with CTAB, is known to remove polysaccharides (Murray and Thompson, 1980; Fang *et al.*, 1992). The concentration ranges mentioned in the literature varies between 0.5 M (Clark, 1997) and 6 M (Aljanabi *et al.*, 1999) and is dependent on the plant species under investigation. Most of the polysaccharides remove effectively in a single salt precipitation at 0.5-2.5 M NaCl. The use of Stewart and

en el uso del CTAB (Doyle y Doyle, 1990). La presencia de compuestos polifenólicos que se producen en muchas especies vegetales son también uno de los principales componentes bioactivos que se encuentran presentes en muchas de las especies de cícadas (Yagi *et al.*, 2002; Peng-Quiao *et al.*, 2008). En el presente estudio, se añadió suficiente PVP y ácido ascórbico en el momento de la homogenización del tejido. La adición de PVP, conjuntamente con el CTAB, puede contribuir a eliminar la presencia de compuestos fenólicos, mediante la formación de un complejo y hasta cierto punto, también pudo ayudar en la eliminación de otras impurezas. El tratamiento que repetidamente se realizó con una solución de cloroformo y alcohol isoamílico, garantizó asimismo la eliminación de la clorofila, y otros pigmentos colorantes, proteínas, etc. La degradación del ADN se evitó, en cierta medida, mediante la realización del procedimiento de extracción a 4 °C. Por lo tanto, el presente protocolo describe un método confiable, rápido, sencillo y consistente de extracción de ADN para la detección de marcadores moleculares (ISSR-PCR) en *Ceratozamia mexicana*.

La adición de concentraciones de NaCl a 0.7 M, junto con CTAB es un método conocido para eliminar polisacáridos (Murray y Thompson, 1980; Fang *et al.*, 1992). Los rangos de concentración mencionados en la literatura varía entre 0.5 M (Clark, 1997) y 6 M (Aljanabi *et al.*, 1999) y depende de la especie de planta bajo investigación. La mayoría de los polisacáridos se eliminan de manera eficaz una sola precipitación de sales en 0.5-2.5 M NaCl. El uso del procedimiento de Stewart y de la Via (1993) con 0,7 M de NaCl fue muy útil para obtener la mejor calidad y cantidad de ADN en hojas de *C. mexicana*. Los resultados del presente estudio mostraron métodos modificados de CTAB combinados con la adición de 0,7 M de NaCl para mejorar la lisis extrayendo un ADN de mayor calidad. Por lo tanto, se concluye que el protocolo actual describe un método de aislamiento de ADN fiable, rápido, sencillo y consistente para *Ceratozamia mexicana*. La simplicidad del procedimiento hace que sea muy práctico para la extracción de ADN del tejido de la hoja, especialmente para especies como las cícadas, en el que polisacáridos y polifenoles son un problema.

Después de obtener un ADN genómico total con una adecuada pureza y rendimiento, se llevó a cabo un sistema óptimo de PCR basado en cada cebador ISSR. En resumen, el ADN aislado por el método CTAB modificado generó productos de amplificaciones fuertes y fiables mostrando su compatibilidad para los 6 cebadores estudiados. El presente protocolo optimizado para la técnica ISSR puede servir como una herramienta eficaz para futuros estudios moleculares en genética de poblaciones. El presente estudio podría ayudar a establecer un programa eficaz de conservación para esta especie en peligro de extinción.

Via (1993) procedure with 0.7 M NaCl was very useful to obtain the best quality and quantity of DNA from *C. mexicana* leaves. The results from the present studies showed modified CTAB methods combined with the addition of 0.7 M NaCl in the lyses buffer effectively extract DNA with higher quality. Thus, we concluded that present protocol described a reliable, rapid, simple and consistent DNA isolation method for *C. mexicana* DNA isolation. The simplicity of the procedure makes it very practical for DNA extraction from leaf tissue especially for species like cycads in which polysaccharides and polyphenols are a problem.

After obtaining a total genomic DNA with an adequate purity and yield, an optimal PCR system based on each ISSR primer was carried on. In short, DNA isolated by this modified CTAB method yielded strong and reliable amplification products showing its compatibility for the 6 ISSR primers tested. The present optimized protocol for ISSR technique may serve as an efficient tool for further molecular studies of population genetics. The present study is necessary to establish an efficient conservation program for this endangered species.

CONCLUSIONS

The system of DNA extraction modified of CTAB-protocol, show a good quality and quantity of DNA suitable for further studies in population genetic, evolution of cycads and systematic; as show the results of ISSRs amplification.

The NaCl facilitates cell lysis and optimize the DNA extraction by release of nuclear material and precipitation of polysaccharides, improving the quality of the extract and therefore the amplification products.

Finally, this work is part of a larger project on the biology and population ecology of Mexican cycads, so the importance of this protocol resides in future studies to the conservation and management of these species of ornamental and ecological importance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Council of Science and Technology (Projects No: 83156 and 152073). The authors wish to thank to the National Council of Science and Technology by the grant awarded and to the Veracruz Council of Science and Technology, by the support in to the exposed work in the World Forestry Congress. To Maricela Durán Sánchez by the support in the ISSRs analysis and to José Manuel Cabrera Hernández for his comments and suggestions.

End of English Version

CONCLUSIONES

El sistema de extracción de ADN modificado del protocolo CTAB, muestra una buena calidad y cantidad de ADN, adecuado para realizar nuevos estudios en genética de poblaciones, evolución de las cícadas y sistemática, como muestran los resultados de la amplificación ISSR.

El NaCl facilita la lisis celular y optimiza la extracción de ADN por la liberación de los materiales nucleares y la precipitación de los polisacáridos, lo que mejora la calidad del extracto y por lo tanto, de los productos de amplificación.

Por último, este trabajo forma parte de un proyecto más amplio sobre la biología y la ecología poblacional de cícadas mexicanas, por lo que la importancia de este protocolo se encuentra en los estudios futuros hacia la conservación y el manejo de esta especie con importancia ornamental y ecológica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con apoyo por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyectos Núm: 83156 y 152073). Los autores desean agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la ayuda otorgada y al Consejo Veracruzano de Ciencia y Tecnología, por el apoyo en el trabajo expuesto en el Congreso Forestal Mundial. Se agradece a Maricela Durán Sánchez por el apoyo en los análisis moleculares y a José Manuel Cabrera Hernández por sus comentarios y sugerencias.

LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S., Forget, L. & Dookun, A. (1999). An improved rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biological Report*, 17, 1-8.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. New York. Chapman & Hall.
- Boiteux, L. S., Fonseca, M. & Simon, P. W. (1999). Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot. *American Society of Horticulture Science*, 124, 32-38.
- Clark, M.S. (1997). *Plant Molecular Biology, a Laboratory Manual*. Berlin. Springer-Verlag.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hocks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Report*, 1, 19-21.
- Deshmukh, A. S., Treeback, J. T., Long, Y. C., Viollet, B., Wojtaszewski, J., F. & Zierat, H. J. R. (2007). Role of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase subunits in skeletal muscle mammalian target of rapamycin signaling. *Molecular Endocrinology*, 22(5), 1105-1112.
- Doyle, J. J. & Doyle J. L. (1990). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Fang, G., Hammar, S. & Rebecca, R. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, 13, 52-56.
- Flachowsky, H., Schumann, E., Weber, W. E. & Peil, A. (2001). Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in hemp. *Plant Breeding*, 120, 305-309.
- González-Astorga, J., Vovides, A. P., Octavio-Aguilar, P., Aguirre-Fey, D., Nicolalde-Morejon, F. & Iglesias, C. (2006). Genetic diversity and structure of the cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152, 533-544.
- Gangopadhyay, G., Roy, R. S., Ghose, K., Poddar, R., Bandyopadhyay, T., Basu, D. & Mukherjee, K. K. (2007). Sex detection of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD. *Current Science*, 92(4), 524-526.
- Jianguang, X., Shuguang, J. & Nian, L. (2005). Genetic variation in the endemic plant *Cycas debaoensis* on the basis of ISSR analysis. *Australian Journal of Botany*, 53, 141-145.
- Katterman F. & Shattuck, V. L. (1983). An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Preparative Biochemical*, 13, 347-359.
- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F. & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA lysis from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biological Report*, 12, 6-13.
- Luna-Rodríguez, M., López-Upton, J. & Iglesias-Andreu L. G. (2005). Variabilidad morfológica y molecular (RAPD) en una plantación de *Pinus patula* en Veracruz, México. *Agrociencia*, 39, 231-235.
- Michelmore, R. W., Paran, I. & Kesseli, R. V. (1991). Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academic of Science*, 88, 9828-9832.
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
- Norstog, K. J. & Nicholls, T. J. (1997). *The Biology of the Cycads*. Ithaca, USA. Cornell University Press.
- Octavio-Aguilar, P., González-Astorga, J. & Vovides, A. P. (2009). Genetic diversity through life history of *Dioon edule* Lindley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Biology*, 11, 525-536.
- Prakash, S. & Staden, J. (2006). Sex identification in *Encephalartos natalensis* (Dyer and Verdoorn) using RAPD markers. *Euphytica*, 152(2), 197-200.
- Peng-Quiao, M. O., Yu-Yuan, H., Xiao-Qing, Z., Guang-Lin, L., Zheng-Wen, L. & Bao-Xuan, N. (2008). Establishment

- of *Cycas micholitzii* ISSR-PCR optimal conditions with orthogonal optimization method. *Bulletin of Botanical Research*, 28(3), 304-309.
- Pollegioni, P., Major, A., Bartoli, S., Ducci, F., Proietti, R., Malvolti, M. E. & Anazato, D., (2006). Application of microsatellite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus *Juglans*. *Acta Horticulture*, 705, 191-197.
- Porebski, S., Bailey, L. G. & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biological Report*, 15, 8-15.
- Reddy, G S. N., Prakash, J. S. S., Matsumoto, G. I., Stackebrandt, E. & Shivaji, S. (2002). *Arthrobacter roseus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology*, 52, 1017-1021.
- Reamon-Büettner, S. M. & Jung, C. (2000). AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 432-438.
- Sarwat, M., Negi, M. S., Lakshmikumaran, M. & Tyagi, A. K. (2006). A standardized protocol for genomic DNA isolation from *Terminalia arjuna* for genetic diversity analysis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 86-91.
- SEMARNAT (2010). *Protección Ambiental de Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestre. Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio. Lista de Especies en Riesgo*. México. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Shah, M. M., Yen, Y., Gill, K. S. & Baenzinger, P. S. (2000). Comparisons of RFLP and PCR-based markers to detect polymorphism between wheat cultivars. *Euphytica*, 114, 135-142.
- Sharma, K. K., Lavanya, M. & Anjaiah, V. (2000). A Method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18, 393a-393h.
- Stewart, C. N. & Via, L. E. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques*, 14, 748-751.
- Suman, P. S. K., Ajit, K. S., Darokar, M. P. & Kumar, S. (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Report*, 17, 1-7.
- Vovides, A. P. (1983). Zamiaceae. In: V. Sosa, ed., Flora de Veracruz, Fasc. 26, 29. Xalapa, México. *Instituto Nacional de Recursos Bióticos*.
- Vovides, A. P. & Iglesias, C. G. (1994). An integrated conservation strategy for the cycad *Dioon edule* Lindl. *Biodiversity and Conservation*, 3, 137-141.
- Warude, D., Chavan, P., Joshi, K. & Patwardhan, B. (2003). DNA isolation from fresh, dry plant samples with highly acidic tissue extracts. *Plant Molecular Biological Report*, 21, 467.
- Yagi, F., Iwaya, T., Haraguchi, T. & Goldstein, I. J. (2002). The lectin from leaves of Japanese cycad, *Cycas revoluta* Thunb. (Gymnosperm) is a member of the jacalin-related family. *European Journal Biochemistry*, 269, 4335-4341.
- Zietkiewicz, E., Rafalaski, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.