

MINIPREP FOR CHLOROPLAST AND MITOCHONDRIA ENRICHMENT AND DNA EXTRACTION

MICROTÉCNICA DE ENRIQUECIMIENTO Y EXTRACCIÓN DE ADN DE CLOROPLASTOS Y MITOCONDRIAS

Ma. Emma **Morales-Gutiérrez**¹, Ma. Alejandra **Gutiérrez-Espinosa**¹, Amalio **Santacruz-Varela**², Iván **Ramírez-Ramírez**³, Mario **Pérez-Grajales**⁴, Víctor A. **González-Hernández**^{3*}

¹Fruticultura, ²Genética and ³Fisiología Vegetal, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México. (vagh@colpos.mx). ⁴Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carr. México-Texcoco. 56235. Chapingo, Estado de México.

ABSTRACT

Published protocols for chloroplast and mitochondrial DNA enrichment are based on large samples (more than 5 g) which imply high costs and plenty of sample material. Reduction of tissue sample and reagent quantities is possible and convenient. This work describes an efficient miniprep for chloroplast and mitochondria DNA enrichment and extraction from 500 mg of pericarp samples of Manzano chili fruits (*Capsicum pubescens* R. & P.). Extraction efficiency from fresh fruit samples was 20 $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ for chloroplasts and 33 $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ for mitochondria. Isolation using the recommended miniprep resulted in costs reduction of 160x for chloroplast and up to 8x for mitochondria. PCR amplification of reference marker genes for chloroplast (*rbcL*, Rubisco large subunit) and mitochondria (*coxI*, Cytochrome oxidase) confirmed DNA identity of each extraction.

Keywords: *Capsicum pubescens*, chloroplast DNA, mitochondria DNA, DNA extraction.

INTRODUCTION

Chloroplast and mitochondrial DNA analysis (chloroplast DNA and mitochondrial DNA, respectively) may reveal information about evolutionary processes by phylogenetic analysis using uni-parental inheritance patterns and conserved gene sequences across generations (Ravi *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2011). It may also describe

RESUMEN

Los protocolos publicados para enriquecimiento de ADN de cloroplasto y mitocondrial están basados en muestras grandes (más de 5 g) que implican costos altos y abundante material de muestra. La reducción en cantidades de muestra de tejido y de reactivos es posible y conveniente. Esta investigación describe una microtécnica eficiente para enriquecimiento y extracción de ADN de cloroplasto y mitocondria desde muestras de 500 mg de pericarpio de frutos de chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. & P.). La eficiencia de la extracción en muestras de fruto fresco fue 20 $\mu\text{g ADN g}^{-1}$ para cloroplastos, y 33 $\mu\text{g g}^{-1}$ ADN de mitocondrias. El aislamiento con la microtécnica recomendada redujo costos en 160x para cloroplastos y hasta 8x para mitocondrias. La amplificación por PCR de los genes marcadores de referencia de cloroplasto (*rbcL*, subunidad grande de la Rubisco) y mitocondria (*coxI*, citocromo oxidasa) confirmó la identidad de ADN de cada extracción.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, ADN de cloroplasto, ADN de mitocondria, extracción de ADN.

INTRODUCCIÓN

El análisis de ADN de cloroplastos (cpADN) y mitocondrias (mtADN) puede revelar información sobre procesos evolutivos mediante análisis filogenéticos usando patrones de herencia uniparental y secuencias génicas conservadas a través de generaciones (Ravi *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2011). También puede describir la composición y organización de la información genética dentro de cloroplastos y mitocondrias (Kahlau *et al.*, 2006), y proporcionar la función, orden y secuencia de los genes

*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: June, 2015. Approved: July, 2016.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 50: 977-988. 2016.

the composition and organization of the genetic information inside chloroplasts and mitochondria (Kahlau *et al.*, 2006), and provide their genes sequence, order and function (Sugiyama *et al.*, 2005; Kahlau *et al.*, 2006). On this regard, in our lab we have identified two important genetic components that significantly modify pungency expression in Manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R. y P.). First, Cruz *et al.* (2007) showed the existence of heterosis in Manzano pungency, and afterwards Sánchez *et al.* (2010) showed maternal inheritance effects of fruit pungency based entirely on traditional plant breeding techniques. To confirm maternal inheritance effects on the Manzano pungency by a more precise method, DNA had to be extracted from chloroplasts and mitochondria obtained from plenty Manzano pepper fruits. The downstream molecular analysis required the isolation or enrichment of intact organelles in a reliable, accurate and repeatable way.

There are studies related to chloroplast and mitochondrial DNA isolation and extraction (Douce *et al.*, 1987; Hájek *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2005; Kahlau *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Millar *et al.*, 2001; Mourad and Polacco, 1988; Rahman and Huber, 1996; Rowan and Bendich, 2011; Salvi *et al.*, 2008; Triboush *et al.*, 1998). The methods mentioned above prioritized structural integrity of isolated organelles and low levels of contaminants to ensure high-quality DNA. Some strategies focused on intensity and duration of the homogenization (Hájek *et al.*, 2004), as well as on usage of quality reagents for extraction, washing, purification and lysis. Appropriate buffers keep organelle integrity by maintaining adequate osmotic pressure and pH when cells are broken (Millar *et al.*, 2007). However, the reference protocols recommend a starting sample amount from tens of grams to kilograms of fresh plant tissue. For example, Rahman and Huber (1996) used 100 g of fruit pericarp homogenized in 150 mL of extraction buffer, Kahlau *et al.* (2006) used 50 g of leaves in 2 L, Shi *et al.* (2012) used 20 g of leaves in 400 mL, and Vieira *et al.* (2014) used 25 g of leaves in 400 mL of buffer. These sample amounts could be difficult to obtain, and some protocols address this concern without affecting DNA yield or quality, through a series of strategies. Mourad and Polacco (1989) used 10 g of fresh leaves in 10 volumes of extraction buffer, and O'Hara and Capwell (1993)

(Sugiyama *et al.* 2005; Kahlau *et al.*, 2006). En este sentido, en nuestro laboratorio hemos identificado dos componentes genéticos importantes que modifican significativamente la expresión del picor del chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.). Primero Cruz *et al.* (2007) mostraron la existencia de heterosis en el picor de este chile, y después mediante técnicas convencionales de mejoramiento Sánchez *et al.* (2010) mostraron efectos de herencia materna en el picor del fruto. Para confirmar los efectos de la herencia materna en el picor del chile Manzano por un método más preciso, se debe extraer y analizar ADN de cloroplastos y mitocondrias en muchos frutos de este chile. El análisis molecular descendente requiere el aislamiento o enriquecimiento de organelos intactos en forma confiable, precisa y repetible.

Hay estudios acerca del aislamiento y extracción de ADN de cloroplastos y mitocondrias (Douce *et al.*, 1987; Mourad y Polacco, 1988; Rahman y Huber, 1996; Triboush *et al.*, 1998; Millar *et al.*, 2001; Hajek *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2005; Kahlau *et al.*, 2006; Salvi *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2011; Rowan y Bendich, 2011). Esos métodos priorizaron la integridad estructural de organelos aislados y niveles bajos de contaminantes que aseguren ADN de alta calidad. Algunas estrategias se enfocaron en la intensidad y duración de la homogeneización (Hájek *et al.*, 2004), así como el uso de reactivos de calidad para la extracción, lavado, purificación y lisis. Los amortiguadores adecuados mantienen la integridad del organelo al conservar la presión osmótica y pH adecuados cuando las células se rompen (Millar *et al.*, 2007). Sin embargo, los protocolos de referencia recomiendan muestras de tejido vegetal fresco, desde decenas de gramos hasta kilogramos. Por ejemplo, Rahman y Huber (1996) usaron 100 g de pericarpio de fruto homogeneizado en 150 mL de amortiguador de extracción, Kahlau *et al.* (2006) usaron 50 g de hoja en 2 L, Shi *et al.* (2012) usaron 20 g de hoja en 400 mL y Vieira *et al.* (2014) usaron 25 g de hoja en 400 mL del amortiguador. Estas cantidades de muestra podrían ser difíciles de obtener y algunos protocolos abordan este problema mediante una serie de estrategias para no afectar el rendimiento o calidad del ADN. Mourad y Polacco (1989) usaron 10 g de hojas frescas en 10 volúmenes de amortiguador de extracción, y O'Hara y Capwell (1993) y Triboush *et al.* (1998) usaron 5 g de tejido en 20-25 mL de amortiguador.

and Triboush *et al.* (1998) used 5 g of tissue in 20-25 mL of buffer.

Most methods describing organelle isolation use density gradient centrifugation. This type of purification requires centrifugation after layering the cell homogenate onto a density gradient created by viscous sucrose, percoll or cesium chloride. Proper separation requires ultra-centrifugation to obtain a concentrated organelle fraction (Millar *et al.*, 2007). Recommended gradients have shortcomings, for example, sucrose might enter the mitochondrial matrix when a sucrose gradient is employed, thus hindering proteomics analysis (Nikaido and Rosenberg, 1983; Benz, 1994); and a percoll gradient is occasionally difficult to remove (Beavis and Vercesi, 1992; Yang and Mulligan, 1996).

The most efficient protocols consume high buffer quantities, which significantly increase costs when hundreds of samples are processed, such as in genotyping studies. Our research relies on a miniprep that reduces costs and produces intact chloroplasts and mitochondria destined to DNA extraction in large-scale studies. The proposed miniprep allows processing numerous samples, in our case Manzano chili samples, while reducing volumes of reagents and using rather common lab equipment.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Samples for this research were taken from inbred lines of Manzano pepper derived from previous breeding and selection efforts. Originally, commercial varieties Zongolica and Puebla were crossed, and an F2 population derived by selfing. From this F2 population, two individuals contrasting in spiciness were selected. From both selected individuals, an inbred line was created by 5 selfing cycles. The resulting lines were then crossed both ways (*i.e.* L4×L6 and L6×L4), and the F1 progeny was sampled. The above description depicts a common genotyping experiment that requires analysis of a high number of individuals. All Manzano pepper plants were grown in a greenhouse, in accordance with the management techniques recommended by Pérez-Grajales and Castro-Brindis (2008) for this plant species. Fruits were sampled at the beginning of the ripening process when the pericarp color changes from green to yellow. Fresh harvested fruits were washed with soap and rinsed with distilled water. A 500 mg pericarp sample was taken and cut in small pieces.

La mayoría de los métodos que describen el aislamiento de organelos utilizan centrifugación en gradientes de densidad. Este tipo de purificación requiere centrifugación después de estratificar el homogeneizado celular en un gradiente de densidad creado por sacarosa viscosa, “percoll” o cloruro de cesio. La separación adecuada requiere ultra centrifugación para obtener una fracción concentrada del organelo (Millar *et al.*, 2007). Los gradientes recomendados tienen deficiencias, como que la sacarosa pueda entrar a la matriz mitocondrial al utilizar un gradiente de sacarosa, lo cual dificulta el análisis proteómico (Nikaido y Rosenberg, 1983; Benz, 1994); y un gradiente de “percoll” en ocasiones es difícil de eliminar (Beavis y Vercesi, 1992; Yang y Mulligan, 1996).

Los protocolos más eficientes consumen altas cantidades de amortiguador, lo cual aumenta significativamente los costos cuando se procesan cientos de muestras, como en los estudios de genotipado. Nuestra investigación se basa en una microtécnica que reduce los costos y produce cloroplastos y mitocondrias intactos para la extracción de ADN en estudios de gran escala. La microtécnica aquí propuesta permite procesar muchas muestras, en este caso de chile Manzano, porque reduce los volúmenes de reactivos y usa equipos comunes de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las muestras para esta investigación provienen de líneas endogámicas de chile Manzano derivadas de mejoramiento y selección previa. Originalmente se cruzaron las variedades comerciales Zongolica y Puebla, y derivó una población F2 por autofecundación. De esta población F2 se seleccionaron dos individuos contrastantes en picor, y de ambos se derivó una línea mediante cinco ciclos de autofecundación. Las líneas resultantes se cruzaron en dos sentidos (*i.e.* L4×L6 y L6×L4), y se muestrearon las progenies F1. La descripción anterior muestra un experimento común de genotipado que requiere analizar un número alto de individuos. Todas las plantas de chile Manzano se cultivaron en invernadero, de acuerdo con las técnicas de producción recomendadas por Pérez Grajales y Castro-Brindis (2008). Los frutos se muestrearon al principio de la maduración cuando el pericarpio cambia de color verde al amarillo. Los frutos cosechados se lavaron con jabón y enjuagaron con agua destilada. Una muestra de pericarpio de 500 mg se cortó en trozos pequeños.

Chloroplast enrichment

The method proposed in this research is based on Kahlau *et al.* (2006). The tissue was kept in 2 mL plastic tubes on ice. Steel disruptor balls and 1 mL of cold extraction buffer (350 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 15 mM β ME and 0.1 % BSA) were added. Tissue was disrupted using a TissueLyzer (QIAGEN™, Germany), set at 30 hertz, for 3.5 min. The homogenate was filtered through a nylon net (0.25 mm hole size) into a clean 2 mL test tube; the nylon net and its contents were discarded. The cell debris and nuclei in the filtered homogenate were pelleted by spinning at 500 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was again transferred to a clean 2 mL test tube, and then used for chloroplast enrichment. All samples and reagents were kept cold in an ice bath. The supernatant from the previous step was centrifuged at 2000 g for 10 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant was removed carefully without touching the chloroplast pellet at the bottom. The pellet was dissolved and washed in 500 μ L of cold wash buffer (350 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA and 0.1 % BSA). The suspension was washed and centrifuged at 2000 g for 10 min at 4 °C twice, removing the supernatant after each centrifugation. The resulting pellet was suspended in 500 μ L of cold wash buffer.

To selectively enrich the suspension for chloroplasts, we employed the density gradient centrifugation method. The gradient was constructed by preparing two molecular-grade sucrose solutions at 1.75 M and 1.08 M. The required sucrose was dissolved in adequate volumes of 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 25 mM EDTA pH 8.0. Seven hundred (700) μ L of the 1.75 M sucrose solution were poured into a new 2 mL tube, and then 900 μ L of 1.08 M sucrose solution was delicately placed on top of it. Three hundred (300) μ L of the chloroplast suspension was gently and slowly placed on top of the sucrose gradient, one drop at a time to avoid mixing. The tube was closed and centrifuged at 7000 g for 1 hour at 4 °C. After centrifugation, a small, green pellet formed on the sidewall of the test tube; this pellet was carefully collected with a micropipette and placed in a new tube. The pellet was suspended in three volumes of cold dilution buffer (175 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA). Finally, the tube was centrifuged at 2000 g for 10 min at 4 °C.

Mitochondria enrichment

Our protocol is based on the method suggested by Rahman and Huber (1996) for mitochondrial DNA isolation. Extra steps were added to improve DNA precipitation and extraction. The tissue was kept in 2 mL plastic tubes on ice. Tissue was disrupted

Enriquecimiento de cloroplastos

El método propuesto en esta investigación se basa en el de Kahlau *et al.* (2006). El tejido se mantuvo en tubos de plástico de 2 mL en hielo, al que añadieron bolas de acero y 1 mL de amortiguador de extracción en frío (sorbitol 350 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, β ME 15 mM y 0.1 % de BSA). El tejido se desbarató con un TissueLyzer (QIAGEN™, Alemania), fijado a 30 hertz por 3.5 min. El homogeneizado se filtró a través de una malla de nailon (orificio de 0.25 mm) en un tubo de ensayo limpio de 2 mL; luego se desechó la malla y su contenido. Los restos de células y núcleos en el homogeneizado filtrado se centrifugaron 5 min a 500 g a 4 °C. El sobrenadante se transfirió otra vez a un tubo de ensayo limpio de 2 mL y luego se utilizó para el enriquecimiento del cloroplasto. Todas las muestras y reactivos se mantuvieron en baño de hielo. El sobrenadante del paso anterior se centrifugó 10 min a 2000 g a 4 °C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se quitó con cuidado sin tocar el sedimento de cloroplastos en la parte inferior. El precipitado se disolvió y lavó en 500 μ L de amortiguador para lavado frío (sorbitol 350 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 25 mM y 0.1 % de BSA). La suspensión se lavó y centrifugó dos veces a 2000 g por 10 min a 4 °C, con remoción del sobrenadante después de cada centrifugación. La pastilla resultante se suspendió en 500 μ L de amortiguador para lavado frío.

Para selectivamente enriquecer la suspensión de cloroplastos se usó el método de centrifugación del gradiente de densidad. El gradiente se construyó preparando dos soluciones de sacarosa grado molecular, 1.75 M y 1.08 M. La sacarosa necesaria se disolvió en los volúmenes adecuados de 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 25 mM EDTA pH 8.0. De la solución de sacarosa de 1.75 M se vertieron 700 μ L en un nuevo tubo de 2 mL y luego 900 μ L de solución de sacarosa de 1.08 M se colocó suavemente en la parte superior. De la suspensión de cloroplastos se colocaron 300 μ L suave y lentamente en la parte superior del gradiente de sacarosa, una gota a la vez para evitar la mezcla. El tubo se cerró y centrifugó 1 h a 7000 g a 4 °C. Después, un precipitado verde delgado se formó en la pared lateral del tubo de ensayo; esta lámina se recogió con cuidado usando una micropipeta y se colocó en un tubo nuevo. La pastilla se suspendió en tres volúmenes de amortiguador frío de dilución (sorbitol 175 mM, Tris-HCl 50 mM de pH 8.0, EDTA 25 mM). Al final, el tubo se centrifugó a 2000 g por 10 min a 4 °C.

Enriquecimiento de mitocondrias

Nuestro protocolo se basa en el método de Rahman y Huber (1996) para aislar ADN mitocondrial y se agregaron unos pasos

using a TissueLyzer (QIAGEN™, Germany). Steel disruptor balls and 1 mL of cold extraction buffer (400 mM sucrose, 50 mM Trizma base, 1 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 , 4 mM cysteine and 1 % BSA; pH 7.6) were added to the tube containing the tissue sample. The TissueLyzer was set at 30 hertz for 3.5 min, and the homogenate was filtered through nylon net (0.25 mm hole size) into a clean 2 mL test tube; the nylon net and its contents were discarded. Cell debris and nuclei in the homogenate were pelleted by spinning the tube at 500 $\times g$ for 5 min at 4 °C. The supernatant was carefully transferred by pipette to a clean 2 mL test tube, and then centrifuged at 2000 $\times g$ for 10 min at 4 °C to pellet chloroplasts for removal. This step was repeated twice. After centrifugation, the supernatant was transferred to a new test tube, and mitochondria were pelleted by centrifuging the supernatant at 16000 $\times g$ for 10 min at 4 °C. Without disturbing the pellet at the bottom, the supernatant was removed. The mitochondria pellet was then dissolved in 500 μL of cold wash buffer (400 mM mannitol, 10 mM KH_2PO_4 and 0.5 % BSA, pH 7.2). The suspension was centrifuged at 16 000 $\times g$ for 10 min at 4 °C; the wash step was repeated one more time, removing the supernatant after every centrifugation.

Density gradient centrifugation was employed to selectively separate mitochondria from other subcellular organelles. Two sucrose solutions at 0.6 and 1.8 M were prepared by dissolving molecular-grade sucrose into the appropriate volume of 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 10 mM KH_2PO_4 pH 8.0. The gradient was constructed in a 2 mL test tube by adding 700 μL of 1.8 M sucrose, followed by careful and slow addition of 900 μL of 0.6 M sucrose on top, without mixing. Three hundred (300) μL of mitochondrial suspension were added, one drop at a time to avoid mixing. This tube was centrifuged at 22 000 $\times g$ for 1 hour at 4 °C. The mitochondria settled on the tube sidewall as a green-yellow pellet. The mitochondrial fraction was collected with a micropipette and placed in a new test tube. Three volumes of cold dilution buffer (175 mM mannitol, 10 mM KH_2PO_4 without BSA, pH 7.2) were added, and the test tube was centrifuged at 16 000 $\times g$ for 10 min at 4 °C. Steps for both minipreps are briefly illustrated in Figure 1.

DNA extraction

The pellet obtained from chloroplasts or mitochondria enrichment was dissolved in 500 μL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 2 % N-lauroylsarcosine sodium salt). The mix was kept at room temperature for 15 min to promote organelle rupture. At the end of the incubation time, 1 mL of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) solution was added. The tube was shaken in a vortex and then centrifuged at 14 000 $\times g$ for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and mixed again with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)

extras para mejorar la precipitación y extracción del ADN. El tejido se mantuvo en tubos de plástico de 2 mL en hielo. El tejido se desmenuzó con un TissueLyzer (QIAGEN™, Alemania). En el tubo con la muestra de tejido se pusieron bolas de acero y 1 mL del amortiguador de extracción en frío (sacarosa 400 mM, Trizma base 50 mM, EDTA 1 mM, KH_2PO_4 10 mM, cisteína 4 mM y 1 % de BSA, pH 7.6). El TissueLyzer se operó 3.5 min a 30 hertz y el homogeneizado se filtró en una malla de nailon (orificio de 0.25 mm) hacia un tubo de ensayo limpio de 2 mL; la malla de nailon y su contenido se desecharon. Los restos de células y núcleos en el homogeneizado se centrifugaron 5 min a 500 $\times g$ a 4 °C. El sobrenadante se transfirió con cuidado con una pipeta a un tubo de ensayo limpio de 2 mL y se centrifugó 10 min a 2000 $\times g$ a 4 °C para sedimentar y retirar los cloroplastos. Este paso se repitió dos veces. Después el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de ensayo y se centrifugó 10 min a 16 000 $\times g$ a 4 °C para obtener el precipitado de mitocondrias. Sin perturbar el sedimento del fondo, se eliminó el sobrenadante. La pastilla de las mitocondrias se disolvió en 500 μL de amortiguador de lavado frío (manitol 400 mM, KH_2PO_4 10 mM y 0.5 % de BSA, pH 7.2). La suspensión se centrifugó a 16 000 $\times g$ por 10 min a 4 °C; la fase de lavado se repitió una vez más, con remoción del sobrenadante después de cada centrifugación.

Para separar selectivamente las mitocondrias de otros orgánulos subcelulares se usó la centrifugación en gradiente de densidad. Dos soluciones de sacarosa a 0.6 y 1.8 M se prepararon mediante la disolución de sacarosa grado molecular en el volumen adecuado de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y KH_2PO_4 10 mM, pH 8.0. El gradiente se construyó en un tubo de ensayo de 2 mL al depositar 700 μL de sacarosa 1.8 M, seguido por la adición cuidadosa y lenta de 900 μL de sacarosa 0.6 M en la parte superior, sin mezclar, y se agregaron 300 μL de suspensión mitocondrial, una gota a la vez para evitar la mezcla. El tubo se centrifugó 1 h a 22 000 $\times g$ a 4 °C. Las mitocondrias se precipitaron en la pared lateral del tubo como una pastilla verde-amarillo. La fracción mitocondrial se recolectó con una micropipeta y se colocó en un nuevo tubo de ensayo. Tres volúmenes de amortiguador de dilución en frío (manitol 175 mM, KH_2PO_4 10 mM sin BSA, pH 7.2) se añadieron, y el tubo se centrifugó 30 min a 16 000 $\times g$ a 4 °C. Los pasos abreviados de ambas microtécnicas se muestran en la Figura 1.

Extracción de ADN

La pastilla obtenida del enriquecimiento de cloroplastos o mitocondrias se disolvió en 500 μL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, sal de sodio 2 % N-lauroilsarcosina). La mezcla se mantuvo 15 min a temperatura ambiente para promover la ruptura de organelos. Al final de la incubación se agregó 1 mL de solución de

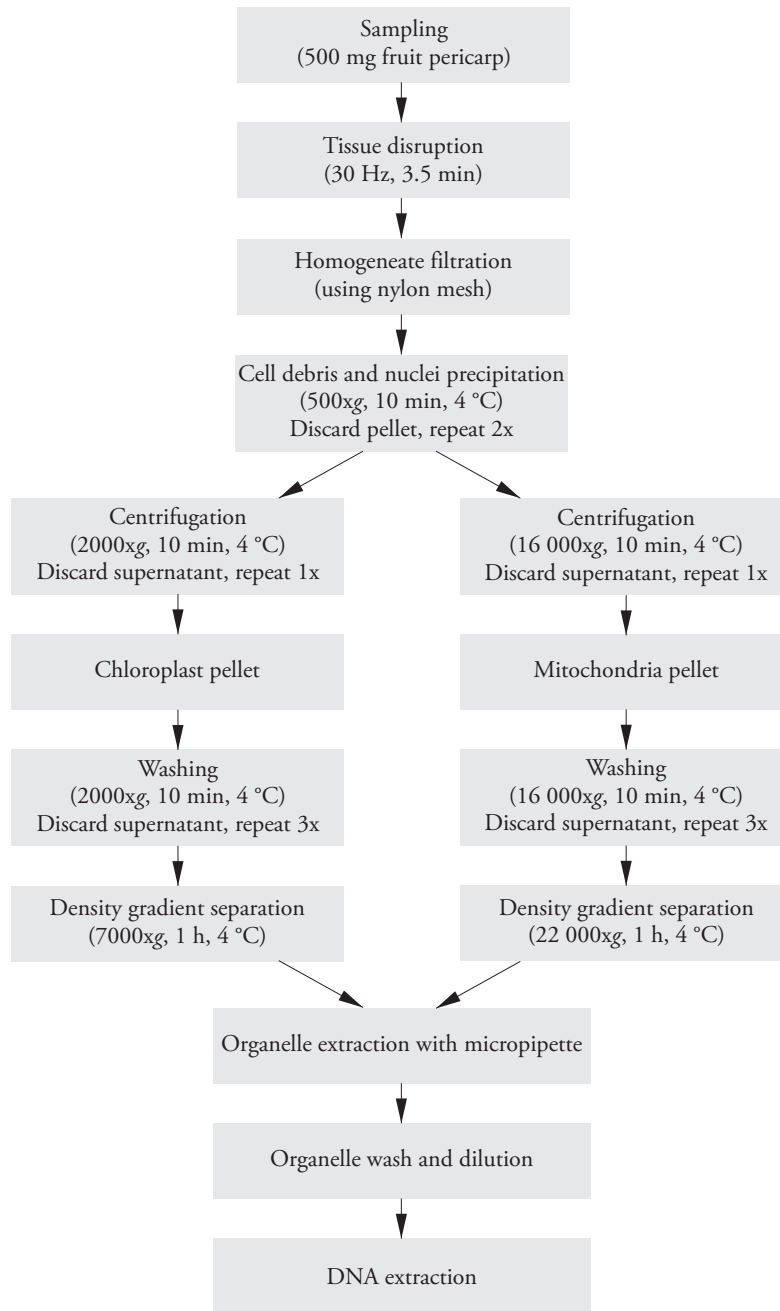


Figure 1. Workflow of the chloroplast and mitochondria isolation and purification.
Figura 1. Diagrama de flujo del aislado y purificación de cloroplastos y mitocondrias.

solution. The DNA was precipitated with 2.5 volumes of cold absolute ethanol and maintained overnight at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The next day, the tubes were centrifuged at $14\ 000\ \text{xg}$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to pellet DNA. The supernatant was discarded, and the remaining ethanol was evaporated at room temperature for 1 hour. The DNA pellet was dissolved in $30\ \mu\text{L}$ of $0.1\ \text{M}$ TE buffer ($10\ \text{mM}$ Tris, $\text{pH}\ 8.0$ and $1\ \text{mM}$ EDTA), and it was kept at

fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El tubo se sacudió en un vórtex y se centrifugó 10 min a $14\ 000\ \text{xg}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se recogió y mezcló otra vez con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El ADN se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la noche. Al día siguiente los tubos se centrifugaron 10 min a $14\ 000\ \text{xg}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener la pastilla de ADN. El

room temperature for 1 hour. DNA integrity was checked on a 0.8 % agarose gel, using 6 μ L of each sample per well. The separation conditions were 90 V and 400 mA for 90 min. Gels were then stained with 10 % of ethidium bromide for 15 min and photographed under UV light for documentation. DNA quality was determined in a Nanodrop (Thermo Scientific™, Mod. 2000, USA) by absorbance.

DNA integrity verification and cross contamination

The extracted DNA from chloroplast and mitochondria fractions was amplified in a Maxygene™ II thermal cycler (Axygen®, USA). Primers for reference genes were designed based on Genebank information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Three genes were selected for their exclusive location to the nucleus (GenBank accession AY489050.1), chloroplast (GenBank accession AB586585.1) or mitochondria (Genebank accession EU701225.1) (Table 1). Primers were designed according to their coding sequence (CDS) using Primer3 v.4 (<http://primer3.ut.ee/>) with standard criteria. The PCR reaction mix was setup as follows: 40 ng of DNA, PCR buffer 1x, 2.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of DNTP and 20 pM for each primer. The PCR program ran as follows: 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 40 s, and 72 °C during 10 min. After PCR completion, a 6 μ L volume of PCR product per well was separated in a 1.2 % agarose gel in TAE 1x; the running conditions were 90 V and 150 - 180 mA for 90 min. The gel was stained in 10 % ethidium bromide for 15 min. PCR band size was calculated using LabWorks® software.

RESULTS AND DISCUSSION

Miniprep step sequences for chloroplast and mitochondria enrichment and their DNA extraction

sobrenadante se desechó y el etanol restante se evaporó a temperatura ambiente por 1 h. El precipitado de ADN se disolvió en 30 μ L de amortiguador E a 0.1 M (Tris, pH 8.0 y EDTA 1 mM) y se mantuvo a temperatura ambiente por 1 h. La integridad del ADN se comprobó en un gel de agarosa 0.8 %, con 6 μ L de muestra por pozo. Las condiciones de separación fueron 90 V y 400 mA por 90 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 10 % por 15 min y se fotografiaron con luz UV para su documentación. La calidad del ADN se determinó por absorbancia en un Nanodrop (Thermo Scientific™, Mod. 2000, USA).

Confirmación de integridad y contaminación cruzada

El ADN extraído de las fracciones de cloroplasto y mitocondria se amplificó en un termociclador Maxygene™ II (Axygen®, USA). Los iniciadores para los genes de referencia se diseñaron con base en información del Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Tres genes se seleccionaron por su ubicación exclusiva en el núcleo (GenBank accesión AY489050.1), cloroplasto (GenBank accesión AB586585.1) o las mitocondria (GenBank accesión EU701225.1) (Cuadro 1). Los iniciadores fueron diseñados según su secuencia de codificación (CDS) con criterios estándar del programa Primer3 v.4 (<http://primer3.ut.ee/>). La mezcla de reacción de PCR se hizo así: 40 ng de ADN, amortiguador 1x de PCR, MgCl₂ 2.5 mM, DNTP 0.2 mM y 20 pM de cada iniciador. El programa PCR operó así: 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 40 s y 72 °C por 10 min. Al terminar la polimerización en cadena, 6 μ L del producto de PCR se depositó en cada pozo, y la separación se hizo en un gel de agarosa a 1.2 % en TAE 1x; las condiciones de funcionamiento fueron 90 V y 150 - 180 mA por 90 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio 10 % por 15 min. El tamaño de banda de PCR se calculó con el programa LabWorks®.

Table 1. Primers for reference genes from nucleus, chloroplast and mitochondria.
Cuadro 1. Iniciadores para genes de referencia del núcleo, cloroplasto y mitocondria.

Gen	Location	Name	Sequence
Ubiquitin ^a	Nucleus	<i>CaUBIf</i>	CTGGAAAGCAGCTTGAGGAC
		<i>CaUBIr</i>	TGGCCTTAACGTTGTGCGATT
Rubisco large subunit ^b	Chloroplast	<i>CaRBCLf</i>	TCACGCTGGTACCGTAGTAGG
		<i>CaRBCLr</i>	CTCATTACCTTCCCGAGCAA
Cytochrome oxidase ^c	Mitochondria	<i>SoCOXIf</i>	TACCAGCCATTTCTGGAGGAG
		<i>SoCOXIr</i>	CTGCCAGTACCGGAAGTGAT

Primer designed from ^a*Capsicum annuum* (GenBank accession AY489050.1), ^b*Capsicum* sp. (GenBank accession: AB586585.1), and ^c*Solanum nigrum* (GenBank accession EU701225.1) sequences ❖ Iniciador diseñado desde la secuencia de ^a*Capsicum annuum* (GenBank accession AY489050.1), ^b*Capsicum* sp. (GenBank accession: AB586585.1) y ^c*Solanum nigrum* (GenBank accession EU701225.1) sequences.

were successfully scaled down to volumes equal or lower than 2 mL. Chloroplast DNA extractions produced average contents of 10.6 μg and an average absorbance ratio A_{260}/A_{280} of 1.84, while average mitochondrial DNA content was 16.7 μg and A_{260}/A_{280} average absorbance ratio of 1.75. These values show higher efficiency for the mitochondrial DNA extraction than for the chloroplast DNA extraction (the average yield difference was 12 μg DNA g^{-1} fresh tissue) (Table 2). Both DNA samples on agarose gels revealed clear and defined bands without sweeping (Figure 2A).

The steps of tissue disruption, tissue homogenization, and organelle separation by density gradient centrifugation in our miniprep are similar to other reported methods. The distinguishing feature of our method is the greatly reduced sample size and reagents quantities; we efficiently created a sucrose gradient in 2 mL tubes. Based on O'Hara-Mais and Capwell (1993), DNA extracted from chloroplast and mitochondria using our technique showed acceptable quality. So, our modifications to the cited protocols for chloroplast and mitochondria isolation rendered good quality DNA.

DNA yields obtained with these minipreps are greater than those reported by Mourad and Polacco (1988) for maize chloroplast DNA (0.1-0.2 μg DNA g^{-1} of sample tissue), and those recorded by Triboush *et al.* (1988) in organelle DNA extraction from sunflower (5-10 μg DNA g^{-1} tissue). While the maize protocol used 1 kg of leaves, the sunflower

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pasos de la microtécnica para el enriquecimiento de cloroplastos y mitocondrias y la extracción de su ADN fueron reducidos con éxito hasta volúmenes iguales o inferiores a 2 mL. Los extractos de ADN de cloroplasto dieron contenidos promedios de 10.6 μg y una proporción media de absorbancias A_{260}/A_{280} de 1.84, mientras que el contenido promedio de ADN mitocondrial fue 16.7 μg y la proporción media de absorbancias A_{260}/A_{280} fue de 1.75. Estos valores muestran una mayor eficiencia para la extracción de ADN mitocondrial que para la extracción de DNA de cloroplasto (la diferencia de rendimiento promedio fue 12 μg ADN g^{-1} tejido fresco) (Cuadro 2). En geles de agarosa ambas muestras de ADN revelaron bandas claras y definidas sin barrido (Figura 2A).

Los pasos de separación de tejido, homogenización de tejido y separación de organelos por centrifugación del gradiente de densidad en nuestra microtécnica son similares a otros métodos reportados. El aspecto distintivo de nuestro método es la gran reducción en cantidades de reactivos y tamaño de muestra; con eficiencia nosotros creamos un gradiente de sucrosa en tubos de 2 mL. Con base en O'Hara-Mais y Capwell (1993), el ADN extraído de cloroplasto y mitocondria con nuestra técnica mostró una calidad aceptable. Así, nuestras modificaciones a los protocolos citados para aislamiento de mitocondria y cloroplasto proporcionaron ADN de buena calidad.

Table 2. Quantity and quality of chloroplasts and mitochondrial DNA extracted from 500 mg of pericarp from Manzano pepper (*Capsicum pubescens* R. and P.) fruits at ripening.

Cuadro 2. Cantidad y calidad del ADN en cloroplastos y mitocondrias extraídos de 500 mg de pericarpio de frutos en maduración de chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.).

Organelle	Sample	Average DNA quantity (μg)	Average $A_{260}/280$	Average yield (μg DNA g^{-1} fresh tissue)
Chloroplast	P ₁	9.09 \pm 0.02	1.89 \pm 0.02	21.0 \pm 4.23
	P ₂	13.32 \pm 0.04	1.73 \pm 0.04	
	H ₁	11.24 \pm 0.09	1.96 \pm 0.09	
	H ₂	8.78 \pm 0.04	1.79 \pm 0.04	
Mitochondria	P ₁	15.36 \pm 0.09	1.85 \pm 0.09	33.4 \pm 6.41
	P ₂	14.72 \pm 0.12	1.72 \pm 0.12	
	H ₁	15.19 \pm 0.16	1.76 \pm 0.14	
	H ₂	21.48 \pm 0.06	1.69 \pm 0.06	

N=3; \pm standard deviations; P₁: inbred line 4; P₂: inbred line 6; H₁: hybrid 4 \times 6; H₂: hybrid 6 \times 4 \diamond N=3; \pm desviación estándar; P₁: línea endogámica 4; P₂: línea endogámica 6; H₁: híbrido 4 \times 6; H₂: híbrido 6 \times 4.

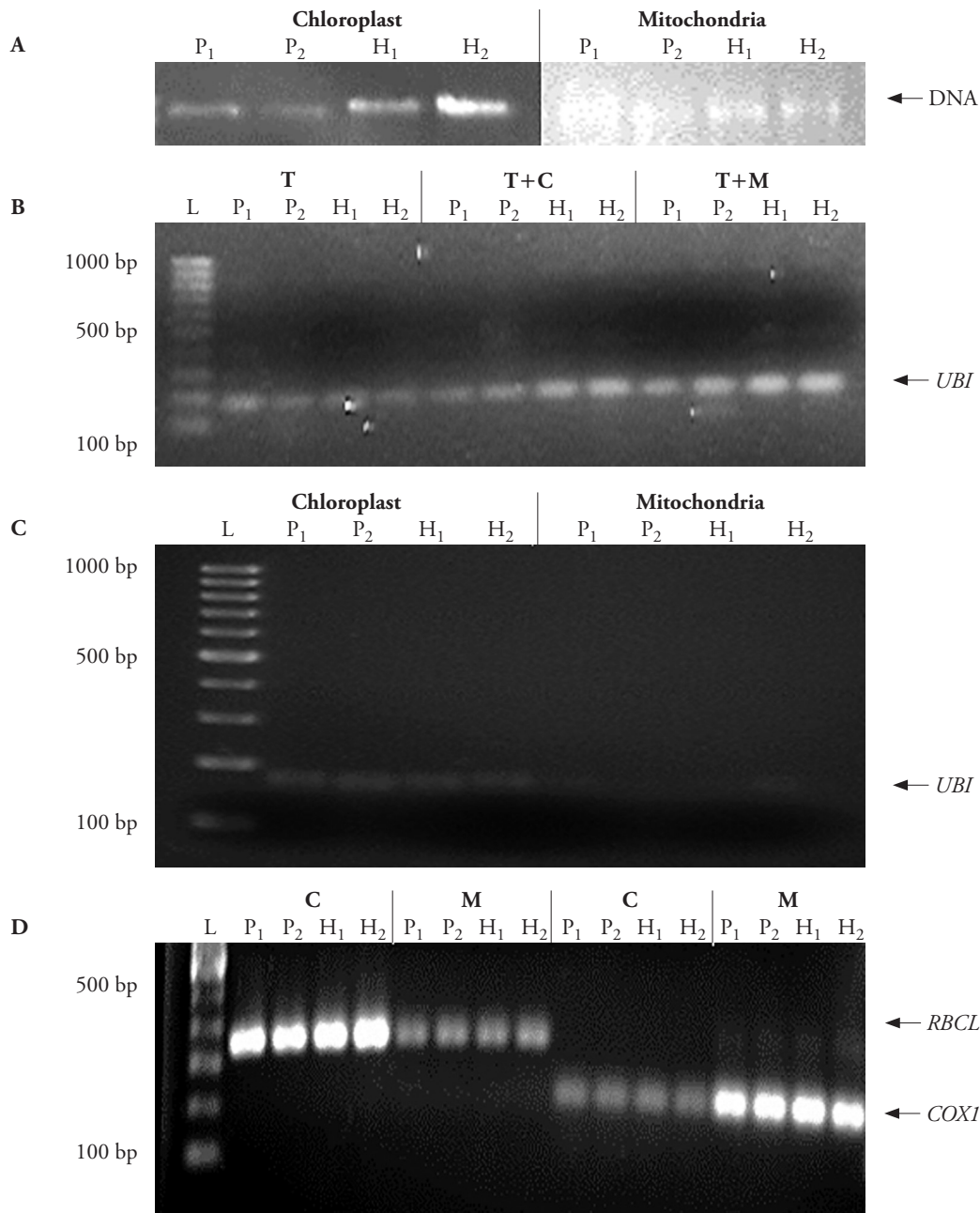


Figure 2. Integrity and purity check for DNA extracted from chloroplast and mitochondria isolated using the proposed method via PCR amplification of reference genes present only in nucleus, chloroplast and mitochondria. A) DNA integrity test. B) Nuclear DNA contamination using ubiquitin (UBI) as marker: T, total DNA; T+C, total DNA mixed with chloroplast DNA; T+M, total DNA mixed with mitochondrial DNA. C) Cross contamination from nuclear DNA determined by UBI presence in chloroplast and mitochondrial DNA. D) Amplification of Rubisco large subunit (*RBCL*) and cytochrome oxidase (*COXI*) in chloroplast (C) and mitochondria (M) DNA samples. P₁: inbred line 4, P₂: inbred line 6, H₁: hybrid 4×6, H₂: hybrid 6×4; L: size marker.

Figura 2. Verificación de la integridad y pureza del ADN extraído de cloroplastos y mitocondrias aislados con el método propuesto, mediante amplificación por PCR de genes de referencia presentes solamente en el núcleo, el cloroplasto y la mitocondria. A) Prueba de integridad del ADN. B) Contaminación nuclear del ADN con el uso de ubiquitina (ubi) como marcador: T, ADN total; T+C, ADN total mezclado con ADN de cloroplasto; T+M, ADN total mezclado con el ADN mitocondrial. C) Contaminación del ADN nuclear, determinada por la presencia de UBI en ADN de cloroplasto y de mitocondria. D) Amplificación de la subunidad grande de la Rubisco (*rbcl*) y de citocromo oxidasa (*coxI*) en muestras de cloroplasto (C) y de mitocondrias (M). P₁: línea endogámica 4, P₂: línea endogámica 6, H₁: híbrido 4×6, H₂: híbrido 6×4; L: marcador de tamaño.

methodology employed between 5 and 10 g of young leaves as sample plant material. Our results show that using higher sample quantities do not necessarily produce better DNA yields. The DNA obtained throughout our minipreps has the required quality for subsequent DNA analysis.

Compared to the Kahlau *et al.* (2006) protocol, our chloroplast miniprep used 1 % of sample tissue, 0.05 % of extraction buffer, 0.13 % of wash buffer and 40 % of dilution buffer. Compared to the Rahman and Huber (1996) protocol our mitochondrial miniprep used 0.5 % of tissue, 0.66 % of extraction buffer and 12.5 % of wash buffer per sample (Table 3). As a result, reagent costs were reduced up to 160 times when 100 samples of chloroplast DNA extraction were processed, and up to 8 times when the same sample quantity was used for mitochondrial DNA extraction (Table 3).

PCR amplification of reference genes in DNA extracted from enriched organelle fractions was employed to identify the level of cross contamination from nuclear sources. The *ubi*, *rbcL* and *coxI* PCR products coincided with the expected fragment sizes as reported by Primer3. Contamination of nuclear DNA for chloroplast DNA extraction was minimal, while mitochondrial DNA extraction showed almost no contamination (Figure 2 B-C). However, as evidenced by PCR amplification of *rbcL* and *coxI* in each enriched organelle fraction (Figure 2D), there is residual cross-contamination of each organelle type, but the quantity observed from contaminating DNA is clearly less than the DNA obtained from the enriched organelle.

Cross contamination was also reported by Bathgate *et al.* (1985), Diekmann *et al.* (2008), Gillman *et al.* (2007), Jo *et al.* (2011), Shi *et al.* (2012); it is attributed to organelle size plasticity

Los rendimientos de ADN obtenidos con estas microtécnicas son mayores que los reportados por Mourad y Polacco (1988) para ADN de cloroplasto en maíz (0.1-0.2 $\mu\text{g DNA g}^{-1}$ de tejido), y que los registrados por Triboush *et al.* (1988) en la extracción de ADN de organelos en girasol (5-10 $\mu\text{g de DNA g}^{-1}$ tejido). Mientras que el protocolo de maíz usaba 1 kg de hoja, el método de girasol empleaba 5 a 10 g de hojas jóvenes como muestra del material vegetal. Nuestros resultados muestran usar cantidades mayores de muestra no necesariamente produce mejores rendimientos de ADN. Además, el ADN obtenido con nuestras microtécnicas tiene la calidad requerida para los análisis subsecuentes de ADN.

Comparado con el protocolo de Kahlau *et al.* (2006), nuestra microtécnica para cloroplasto usó 1 % de muestra de tejido, 0.05 % de amortiguador de extracción, 0.13 % de amortiguador de lavado y 40 % de amortiguador de dilución. Comparado con el protocolo de Rahman y Huber (1996), nuestra microtécnica mitocondrial usó 0.5 % de tejido, 0.66 % de amortiguador de extracción y 12.5 % de amortiguador de lavado por muestra (Cuadro 3). Como resultado, los costos de reactivos se redujeron hasta 160 veces al procesar 100 muestras de ADN de cloroplasto, y hasta 8 veces cuando la misma cantidad de muestra se usó para la extracción de ADN mitocondrial (Cuadro 3).

La amplificación por PCR de los genes de referencia en el ADN extraído de fracciones enriquecidas de organelos se empleó para identificar el nivel de contaminación cruzada procedente de fuentes nucleares. Los productos PCR de *ubi*, *rbcL* y *coxI* coincidieron con el tamaño del fragmento esperado según el programa Primer3. La contaminación con ADN nuclear en los extractos de ADN de cloroplasto fue mínima, mientras que el extracto de ADN mitocondrial casi

Table 3. Comparison of reagents and total cost between the reference method and the method proposed in this research.
Cuadro 3. Comparación de reactivos y de costo total entre el método de referencia y el método propuesto en esta investigación.

Organelle	Protocol	Starting tissue quantity (g)	Buffer quantity (mL)				Relative cost per 100 samples (USD)
			Extraction	Wash	Dilution	Lysis	
Chloroplast	Kahlau <i>et al.</i> (2006)	50	2000	400	5	5	1
	Miniprep	0.5	1	1	2	0.5	0.0058
Mitochondria	Rahman and Huber (1996)	100	150	8	-	-	1
	Miniprep	0.5	1	1	2	0.5	0.125

from frequent fusion and division processes. It is thus difficult to obtain absolute organelle separation via density gradient centrifugation.

CONCLUSIONS

The miniprep methods proposed in this research for chloroplast and mitochondrial isolation proved reliable for DNA extraction and subsequent PCR amplification. The starting sample size is greatly minimized. These methods were tested only in samples from Manzano pepper, but little or no modification should be required to enrich organelles from other species. The methods described here have various advantages over other methods: cost reduction, proteinase disuse, percoll or cesium chloride replacement, and ultracentrifuge requirements.

LITERATURE CITED

- Bathgate B., M. E. Purton, D. Grierson, and P. W. Goodenough. 1985. Plastid changes during the conversion of chloroplasts to chromoplasts in ripening tomatoes. *Planta* 165: 197-204. doi: 10.1007/BF00395042
- Beavis A. D., and A. E. Vercesi. 1992. Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg⁽²⁺⁾-insensitive inner membrane anion channel. *J. Biol. Chem.* 267: 3079-3087.
- Benz R. 1994. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: a review on mitochondrial porins. *Biochim. Biophys. Acta* 291: 167-196. doi:10.1016/0304-4157(94)90004-3
- Diekmann K., T. R. Hodkinson, E. Fricke, and S. Barth. 2008. An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (Poaceae) prove suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection. *PLOS ONE* 3:e2813. doi: 10.1371/journal.pone.0002813
- Cruz P., A. B., V. A. González H., R. M. Soto H., M. A. Gutiérrez E., A. Gardea B., y M. Pérez G. 2007. Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto en chile manzano. *Agrociencia* 41(6): 627-635.
- Douce R., J. Bourgrignon, R. Brouquisse, and M. Neuburger. 1987. Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. *Methods Enzymol.* 148:403-415. doi: 10.1016/0076-6879(87)48039-7
- Gillman J. D., S. Bentolila, and M. R. Hanson. 2007. The petunia restorer of fertility protein is part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated locus. *Plant J.* 49:217-227. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02953.x
- Hájek T., D. Honys, and V. Capkova. 2004. New method of plant mitochondria: isolation and subfractionation for proteomic analyses. *Plant Sci.* 167: 389-395.
- Jansen R. K., L. A. Raubeson, J. L. Boore, C. W. de Pamphilis, T. W. Chumley, R. C. Haberle, S. K. Wyman, A. J. Alverson, R. Peery, S. J. Herman, H. M., J. V. Kuehl, J. R. McNeal, no mostró contaminación (Figura 2 B-C). Sin embargo, como lo evidencia la amplificación por PCR de *rbcL* y *cox1*, en cada fracción enriquecida de organelo (Figura 2D) hay contaminación residual de cada tipo de organelo, pero la cantidad observada de ADN contaminante es claramente menor que el ADN obtenido del organelo enriquecido.
- La contaminación cruzada también la reportaron Bathgate *et al.* (1985), Diekmann *et al.* (2008), Gillman *et al.* (2007), Jo *et al.* (2011), y Shi *et al.* (2012); se atribuye a la plasticidad en el tamaño de los organelos causada por los procesos frecuentes de fusión y división. Por ello es difícil obtener una separación absoluta de organelos mediante centrifugación de gradiente de densidad.

CONCLUSIONES

Las microtécnicas propuestas en esta investigación para aislamiento de cloroplastos y mitocondrias resultaron confiables para la extracción de ADN y la amplificación por PCR. El tamaño de la muestra inicial se redujo grandemente. Estos métodos se evaluaron solo en muestras de chile Manzano, pero se requerirían pocas o ninguna modificación para enriquecer organelos de otras especies. Los métodos aquí descritos tienen varias ventajas sobre otros: reducción de costos y no se requiere el uso de proteinasa, "percoll" o cloruro de cesio, ni usar ultracentrífuga.

—Fin de la versión en Español—



- J. Leebens-Mack, and L. Cui. 2005. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods Enzymol.* 395:348-384. doi:10.1016/S0076-6879(05)95020-9
- Jo Y. D., J. Park, J. Kim, W. Song, C. Hur, Y. Lee, and B. Kang. 2011. Complete sequencing and comparative analyses of the pepper (*Capsicum annuum* L.) plastome revealed high frequency of tandem repeats and large insertion/deletions on pepper plastome. *Plant Cell Rep.* 30:217-229. doi: 10.1007/s00299-010-0929-2
- Kahlau S., S. Aspinall, J. C. Gray, and R. Bock. 2006. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. *J. Mol. Evol.* 63:194-207. doi: 10.1007/s00239-005-0254-5
- Hájek T., D. Honys, and V. Capkova. 2004. New method of plant mitochondria: isolation and subfractionation for proteomic analyses. *Plant Sci.* 167:389-395. doi:10.1016/j.plantsci.2004.01.012

- Lang E. G. E., S. Mueller, S. Hoernstein, J. Porankiewicz-Asplund, M. Vervliet-Scheebaum, and R. Reski. 2011. Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics. *Plant Cell Rep.* 30:205-215. doi: 10.1007/s00299-010-0935-4
- Millar A. H., L. J. Sweetlove, P. Giege, and C. J. Leaver. 2001. Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 127: 1711-1727. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010387>
- Millar A. H., A. Liddell, and C. J. Leave. 2007. Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. *Methods Cell Biol.* 80: 65-90. doi:10.1016/S0091-679X(06)80003-8
- Mourad G., and M. L. Polacco. 1988. Mini-preparation of highly purified chloroplast DNA from Maize. *Plant Mol. Biol. Rep.* 6: 193-199. doi: 10.1007/BF02669249
- Nikaido H., and E. Y. Rosenberg. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bacteriol.* 153: 241-252.
- O'Hara-Mays E. P., and J. C. Capwell. 1993. Miniprep for chloroplast DNA isolation. *Microchem. J.* 47: 245-250. doi: 10.1006/mchj.1993.1039
- Pérez-Grajales M., y R. Castro-Brindis. 2008. El Chile Manzano. Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, México. 135 p.
- Rahman A. S., and D. J. Huber. 1996. Isolation and physiological properties of intact mitochondria from bell pepper (*Capsicum annuum*) fruit. *J. Plant Physiol.* 149: 677-682. doi:10.1016/S0176-1617(96)80091-5
- Ravi V., J. P. Khurana, A. K. Tyagi, and P. Khurana. 2008. An update of chloroplast genome. *Plant Syst. Evol.* 271: 101-122. doi: 10.1007/s00606-007-0608-0
- Rowan B. A., and A. J. Bendich. 2011 Isolation, quantification, and analysis of chloroplast DNA. *Methods Mol. Biol.* 774: 151-170. doi: 10.1007/978-1-61779-234-2_10
- Salvi D., N. Rolland, J. Joyard, and M. Ferro. 2008. Purification and proteomic analysis of chloroplasts and their sub-organellar compartments. *Methods Mol. Biol.* 432: 19-36. doi: 10.1007/978-1-59745-028-7_2
- Sánchez-Sánchez, H., V. A. González-Hernández, A. B. Cruz-Pérez, M. Pérez-Grajales, M. A. Gutiérrez-Espinosa, A. Gardea-Béjar, y M.A. Gómez-Lim. 2010. Herencia de capsaicinoides en chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.). *Agrociencia* 44(6): 655-665.
- Shi C., N. Hu, H. Huang, J. Gao, Y. J. Zhao, and L. Z. Gao. 2012. An improved chloroplast DNA extraction procedure for whole plastid genome sequencing. *PLOS ONE* 7:e31468. doi: 10.1371/journal.pone.0031468
- Sugiyama Y., Y. Watase, M. Nagase, N. Makita, S. Yagura, A. Hirai, and M. Sugiura. 2005. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol. Genet. Genomics.* 272: 603-615. doi: 10.1007/s00438-004-1075-8
- Triboush S. O., N. G. Danilenko, and O. G. Davidenko. 1998 A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 183-189. doi: 10.1023/A:1007487806583
- Vieira L. N., H. Faoro, H. P. Fraga, M. Rogalski, E. M. de Souza, F. de Oliveira, R. Onofre, and M. Guerra. 2014. An improved protocol for intact chloroplasts and chloroplast DNA isolation in conifers. *PLOS ONE* 9(1):e84792. doi: 10.1371/journal.pone.0084792
- Yang A. J., and R. M. Mulligan. 1996. Identification of a 4.5 S-like ribonucleoprotein in maize mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 24: 3601-3606. doi: 10.1093/nar/24.18.3601