



Método del ensayo cometa alcalino para evaluar el daño en el ADN de plantas

Fatima Lagunas-Viveros¹
María Elena Calderón-Segura²
Liliana Díaz-Duque³
Fredderick Arroyo-Díaz^{1*}

¹Posgrado en Recursos Naturales y Ecología, Facultad de Ecología Marina, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Gran Vía Tropical 20, Fraccionamiento Las Playas, Acapulco, 39390, Guerrero, México.

²Laboratorio de Toxicología Ambiental, Departamento de Ciencias Ambientales, Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México.

³Maestría en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero. Carretera Iguala-Tuxpan, km 2.5, Iguala de la Independencia, 40101, Guerrero, México.

*Autor de correspondencia
fredderickdiaz@uagro.mx

Resumen

El ensayo cometa alcalino es un ensayo genético versátil para evaluar daño en el ADN en células eucariotas individuales. Debido a su sensibilidad, esta técnica se ha utilizado en plantas para evaluar el efecto genotóxico inducido por factores bióticos y abióticos. En este trabajo presentamos una descripción detallada de la metodología del ensayo cometa alcalino, aplicada a hojas de plantas, desde la selección y recolección de muestras, preparación de reactivos, extracción y fijación de células vegetales, y el proceso de electroforesis, hasta la tinción con núcleos con y sin daño en el ADN (con y sin cometa) aislados para su observación y lectura bajo el microscopio de fluorescencia. Asimismo, se describen, algunos ejemplos de aplicación de esta técnica en plantas sometidas a estrés por diferentes factores bióticos y abióticos. Asimismo, se realiza una comparación de las ventajas y desventajas de la técnica del ensayo cometa alcalino con otras ocho técnicas de evaluación del daño genotóxico en plantas. Finalmente, se presentan sugerencias para incluir el ensayo cometa alcalino con otros estudios fisiológicos, morfológicos, nutrimentales y estadísticos.

Palabras clave: Genotoxicidad, ADN, Plantas, Agroecosistemas, Metodología.

Información del Artículo

Cómo citar el artículo:

Lagunas-Viveros, F., Calderón-Segura, M.E., Díaz-Duque, L.R., Arroyo-Díaz, F. (2025). Método del ensayo cometa alcalino para detectar daño en el ADN en plantas. *Tlamati Sabiduría*, 22, 74-85.

Manejo editorial: Norberto Edwin Sandoval-Maldonado



Abstract

The alkaline comet assay is a versatile and sensitive method for evaluating DNA damage in individual eukaryotic cells. Due to its simplicity and sensitivity, the use of the alkaline comet assay in plants has been employed to study the genotoxic effect induced by biotic and abiotic factors. In this work, we present a detailed description of the methodology for the alkaline comet assay technique applied to plants leaves, covering sample selection and collection, reagent preparation, extraction and fixation of plant cells, the electrophoresis process and staining of isolated DNA for reading under a fluorescence microscope. Additionally, some applications of this technique in plant species subjected to stress from various biotic and abiotic factors are described. Furthermore, a comparison is made of the advantages and disadvantages of the comet assay versus eight different techniques for measuring genotoxic damage in plants. Finally, we show some suggestions to complement the alkaline comet assay technique with other physiological, morphological, nutritional, and statistical studies in order to discriminate which biotic or abiotic factors are the potential causes of the genetic damage observed in the studied plants.

Keywords: Genotoxicity, DNA, Plants, Agrosystems, Methodology.

Introducción

Las plantas son organismos sésiles que están sujetas a diferentes tipos de estrés tanto bióticos como abióticos que comprometen la integridad estructural de su genoma (Chatterjee y Walker, 2017). Los daños ocasionados en el ADN de las plantas son atribuidos a diversos factores genotóxicos primarios y secundarios (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Los factores genotóxicos primarios son inducidos por hongos, virus y bacterias, la salinidad, la temperatura, el déficit hídrico, la radiación ultravioleta, los plaguicidas, y los metales y metaloides tóxicos (Tabassum *et al.*, 2021; Zeyad *et al.*, 2022; Gateva *et al.*, 2022; Darwish *et al.*, 2023; Tyutereva *et al.*, 2024). Los factores genotóxicos secundarios son inducidos por la producción de especies reactivas de oxígeno, carbono o nitrógeno que causan rupturas en el ADN (Liu *et al.*, 2014; Zvanarou *et al.*, 2020; Prajapati *et al.*, 2023). La integridad genómica de las plantas es crucial para asegurar su ciclo de vida y la estabilidad de la genómica (Tyutereva *et al.*, 2024).

La detección del efecto genotóxico en plantas puede identificarse mediante técnicas genéticas tales como micronúcleos (Ciniglia *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2011; Ribeiro y Leitão *et al.*, 2020), aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas entre otros (Kaur *et al.*, 2019; Kwasniewska y Bara, 2020; Liman *et al.*, 2021; Badr *et al.*, 2021; Kwasniewska y Bara, 2022), y el ensayo cometa o electroforesis unicelular. Este último es de las técnicas más utilizadas para evaluar el daño del ADN en células eucariotas *in vivo* o *in vitro* (e.g., Kumaravel *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2023). El principio teórico-experimental se basa en la migración de fragmentos de ADN desnaturalizados y rotos fuera del núcleo celular mediante electroforesis adquiriendo una figura de cometa, mientras que el ADN no dañado no migra (Kumaravel *et al.*, 2009). Existen dos técnicas de ensayo cometa. El ensayo cometa neutro que detecta rupturas en cadenas dobles y el ensayo cometa alcalino que detecta rupturas de cadenas simples, dobles y sitios de reparación por escisión incompleta y entrecruzamientos, mediante la medición de longitud de cauda (distancia de fragmentos de ADN migrados desde el núcleo a la periferia), momento de

cauda (cantidad de ADN del punto final del núcleo al punto final de la cauda) e intensidad de cauda (cantidad de ADN contenido en la cauda con respecto al ADN contenido en el núcleo) (Miyamae *et al.*, 1997; Kumaravel *et al.*, 2009; Zúñiga Venegas, 2009).

El aislamiento de núcleos vegetales para realizar el ensayo cometa alcalino fue estandarizada por Gichner *et al.* (2004). Sin embargo, no es común encontrar el procedimiento detallado para realizar la extracción de núcleos vegetales, preparación y tinción de geles para obtener un resultado exitoso. El objetivo de esta revisión es describir a detalle la técnica de ensayo cometa alcalino en hojas de plantas como una guía de apoyo, describiendo las sustancias, amortiguadores, la elaboración de geles de agarosa, la selección y recolección de hojas, la extracción de núcleos vegetales su inclusión en geles de agarosa, lisis celular, y electroforesis y análisis de daño en el genoma en microscopia de fluorescencia.

Metodología

Selección y recolección de hojas de las plantas

La selección de hojas de la planta o del cultivo para el ensayo cometa alcalino es muy importante. Se debe de elegir hojas adultas de la parte intermedia de la planta (Figura 1) que no presenten clorosis, partes secas, necrosis, algún tipo de plaga, residuo químico o biológico. De cada planta, se colecta un mínimo de 15 hojas cuando el tamaño de la hoja es pequeño (e.g., alfalfa, verdolaga, cilantro, perejil), 5 hojas cuando es de tamaño medio (e.g., jitomate, chile, frijol), o dos hojas si es grande (e.g., maíz, caña, calabaza). Las hojas colectadas se guardan en cajas Petri o bolsas plásticas debidamente etiquetadas (Fig. 1) en una hielera para ser transportadas al laboratorio y ser procesadas en un máximo de dos horas después del corte.

Preparación de reactivos

En esta sección se describen los procedimientos para elaborar las sustancias para realizar el ensayo cometa alcalino.

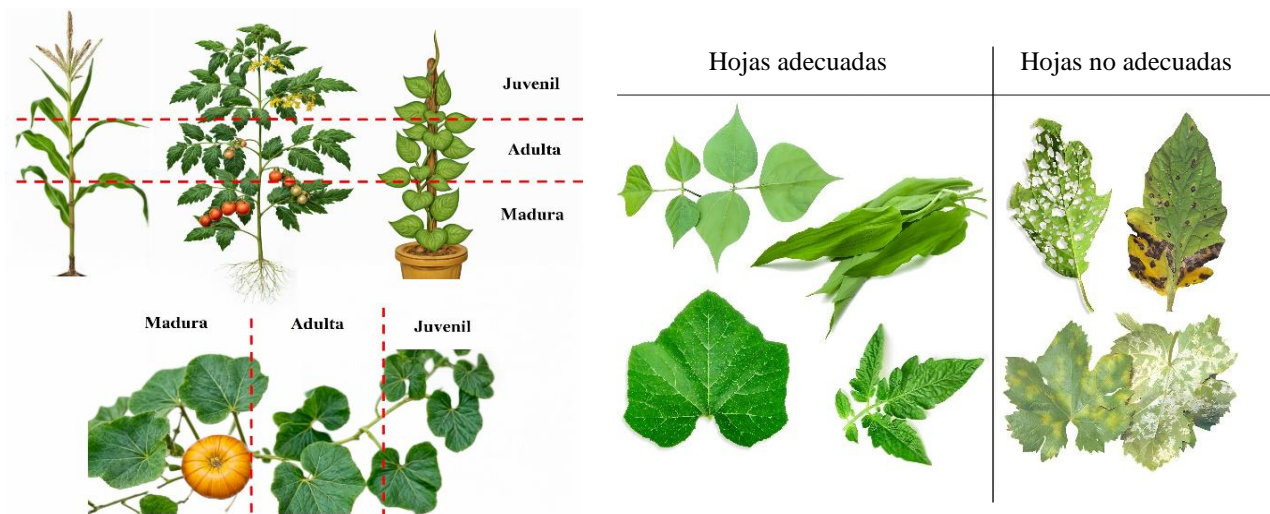


Figura 1. En el lado izquierdo se muestra las etapas de vida de las hojas de algunas plantas para orientar a los usuarios del ensayo cometa alcalino durante la selección de hojas para la prueba. En el lado derecho se muestra la apariencia de las hojas adecuadas y cuáles son las hojas que se deben evitar al momento de la selección para realizar la prueba de ensayo cometa alcalino.

Elaboración del amortiguador de fosfato (PBS, pH 7) para diferentes tipos de agarosa. Para preparar 1000 ml de PBS se requieren 0.2 g de KCl, 0.24 g de KH_2PO_4 , 8 g de NaCl y 2.47 g de Na_2HPO_4 . Estos reactivos se agregan en un matraz volumétrico con aproximadamente 900 ml de agua desionizada y se agitan hasta disolver. El pH de la solución debe ajustarse a 7 con NaOH o HCl y aforarse a un litro.

Elaboración de geles de agarosa

Se requieren dos geles de agarosa por planta: uno de fusión normal (NMPA por sus siglas en inglés) y otro de bajo punto de fusión (LMPA por sus siglas en inglés). La preparación de estos dos microgeles es exactamente igual. Para preparar 100 ml, se pesa 1g de NMPA o LMPA y se colocan en frascos estériles con tapa. Se agrega 100 ml de PBS y los frascos se introducen en un horno de microondas durante 60 segundos. Transcurrido el tiempo, la solución debe de agitarse manualmente para homogenizarse. La solución resultante debe ser incolora y sin partículas sólidas, de lo contrario, se debe seguir calentando en el horno de microondas en intervalos de 15 segundos sin dejar hervir la solución. En caso que las soluciones no se utilicen en el momento deben permanecer en refrigeración a 4 °C.

Elaboración de lisis celular (pH 10). Se requieren dos soluciones, una de lisis inicial y otra lisis final. Para la lisis inicial, se colocan un vaso de precipitado 14.61 g de NaCl, 3.72 g de Na_2EDTA y 0.12 g de TRIS. Posteriormente, se agregan aproximadamente 50 ml de agua desionizada y la mezcla se agita hasta disolver por completo los reactivos. Una vez homogenizada la mezcla, se agregan 0.8 g de NaOH y se agita nuevamente hasta homogenizar nuevamente la solución. La solución resultante se pasa a

un matraz volumétrico de 100 ml con ayuda de un embudo para evitar derrames. El vaso de precipitado debe enjuagarse con agua desionizada y el sobrenadante verterse en el matraz de 100 ml hasta un volumen aproximado de 80 ml. El pH de la solución debe ajustarse a 10 con NaOH o HCl y aforarse a 100 ml. Para la lisis final, en un matraz volumétrico de 100 ml se agrega 1 ml de Triton X-100 grado reactivo y 10 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) grado reactivo. Finalmente, se afora a 100 ml con la solución de lisis inicial. La mezcla se debe agitar hasta homogenizarse. La lisis final debe prepararse máximo 24 horas antes de iniciar el proceso del ensayo cometa alcalino y debe permanecer en refrigeración a 4 °C. La lisis final se coloca en los vasos couplin (cada vaso couplin tiene un volumen de 35 ml y puede almacenar 10 portaobjetos).

Preparación del amortiguador de electroforesis alcalino (pH 13). Para preparar 1 L de solución, se agregan en un vaso de precipitado de 250 ml 12 g de NaOH y 744.5 mg de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y la mezcla se disuelve en aproximadamente 100 ml de agua desionizada. La mezcla resultante se coloca en un matraz volumétrico de 1L con aproximadamente 800 ml de agua desionizada con ayuda de un embudo para evitar derrames. El pH debe ajustarse a 13 con NaOH o HCl y, posteriormente, aforarse a 1L. La mezcla debe ser refrigerada a 4 °C. El amortiguador de electroforesis puede ser preparado con un día de anticipación. Para una cámara con capacidad para 30 laminillas se requieren 2 L de la solución de amortiguador alcalino. El amortiguador de electroforesis se puede reutilizar hasta 5 veces máximo o hasta que este se muestre turbio.

Elaboración del amortiguador neutralizante (pH 7.5).
 Para preparar 500 ml de solución se agregan en un vaso de precipitado de 250 ml 24.22 g de TRIS y la mezcla se disuelve en aproximadamente 100 ml de agua desionizada. La mezcla resultante se coloca en un matraz volumétrico de 500 ml con aproximadamente 200 ml de agua desionizada con ayuda de un embudo. El pH debe ser ajustado a 7.5 con NaOH o HCl y, posteriormente, aforar a 500 ml con agua desionizada. La solución se debe almacenar a temperatura ambiente.

Impregnación de portaobjetos con agarosa de fusión normal (NMA)

El NMA debe estar a 37° para evitar la formación de grumos. El NMA se vierte en recipientes de vidrio de dimensiones más amplias y altas al de un portaobjetos biológico como se observa en la Figura 2. A los recipientes de vidrio se le agrega NMA hasta un 90 % de su capacidad. Los portaobjetos biológicos esmerilados se sumergen en NMA hasta cubrir el 80 o 90 % de la superficie para crear una monocapa. Los portaobjetos se retiran del NMA y se limpia el exceso de NMA de la parte no esmerilada. Los portaobjetos con la monocapa de NMA se colocan sobre una placa de acero en hielo durante un minuto para solidificar el NMA y se dejan secar a temperatura ambiente (Figura 2). Es importante respetar el tiempo de un minuto de los portaobjetos con NMA sobre la placa de acero fría para evitar desprendimientos de la NMA en los siguientes procedimientos.

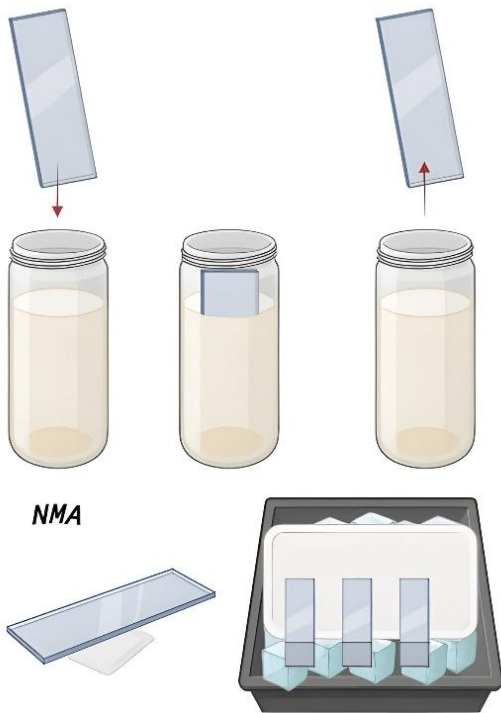


Figura 2. Impregnación de portaobjetos con agarosa de fusión normal (NMA).

Aislamiento y fijación de células vegetales

Las hojas se lavan dos veces con agua destilada para retirar cualquier partícula adherida sobre la superficie (Figura 3) incompleta. Los siguientes pasos se realizan en un cuarto completamente cerrado y se debe reemplazar la luz blanca por luz amarilla para evitar posibles daños al DNA de las células y alterar los resultados del ensayo. Las hojas se colocan en una caja Petri con la parte del envés hacia arriba y se agrega 1 ml de PBS frío (Figura 4). La caja de Petri junto con la hoja se coloca a ~45° y con una navaja de afeitar nueva se procede a realizar cortes muy finos a la hoja (1-2 mm de amplitud) de manera perpendicular al ápice (Figura 5). Los cortes realizados liberan las células vegetales en el PBS. Una vez terminados los cortes de la hoja, la caja de Petri debe permanecer inclinada de dos a tres minutos para que se sedimenten las células vegetales (Figura 6). Con una micropipeta se toman 2 ml de la solución sedimentada y se colocan en un microtubo (previamente etiquetado) sobre hielo (Figura 7). Los microtubos se colocan en hielo durante cinco minutos para dejar que las células vegetales se sedimenten. Transcurrido el tiempo, se extrae el sobrenadante de la parte superior del microtubo hasta dejar un volumen aproximado de 0.5 ml donde estarán las

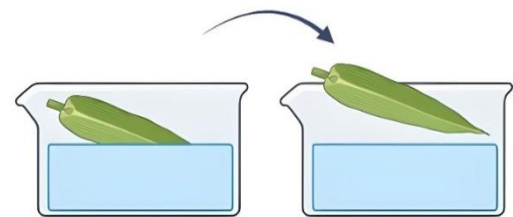


Figura 3. Lavado de las hojas con agua destilada.

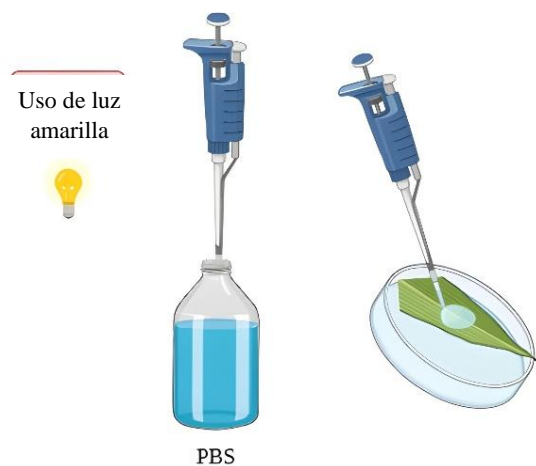


Figura 4. Ilustración para colocar la muestra de hoja que se va a procesar y para agregar el amortiguador de fosfato para recuperar las células vegetales.

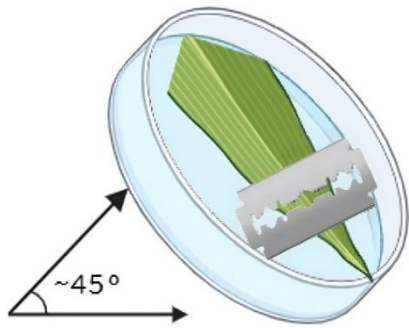


Figura 5. Ilustración para colocar la caja de Petri y para realizar los cortes de las hojas para realizar una buena extracción de células vegetales.

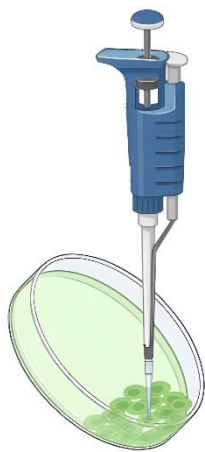


Figura 6. Sedimentación y extracción de las células de la caja de Petri.



Figura 7. Almacenamiento y reposo de las células vegetales extraídas.

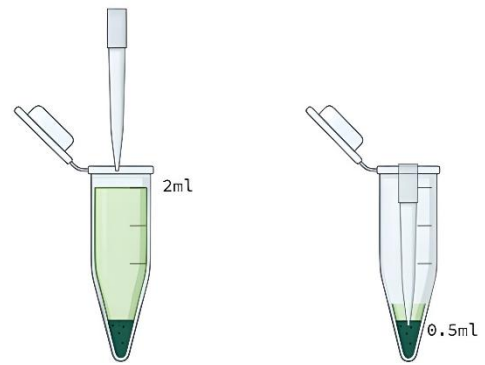


Figura 8. Extracción del sobrenadante.

células vegetales (Figura 8). Posteriormente, se agregan 100 microlitros de LMP a 35-37 ° C y se mezcla tres veces rápidamente con ayuda de la micropipeta. Se colocan 100 microlitros en un cubreobjetos y sobre éste, se coloca un cubreobjetos para que cuidadosamente y, por capilaridad, las células se adhieran a la monocapa de NMA de manera homogénea. El portaobjeto con su cubreobjetos, se coloca sobre hielo por cinco minutos para solidificar las agarosas con las células vegetales (Figura 9). Trascurrido el tiempo, el cubreobjetos debe ser retirado, deslizándolo hacia un lado con el dedo pulgar. Los portaobjetos se colocan por par con las caras opuestas al gel y se sumergen en la lisis final dentro de los vasos couplin (Figura 10). Los vasos couplin con los geles se colocan en el refrigerador entre 1 y 24 horas para posteriormente hacer la electroforesis.

Electroforesis unicelular alcalina

En la cámara de electroforesis se vierten de 1000 a 1300 ml de la solución amortiguadora de electroforesis. Los portaobjetos de los vasos couplin se colocan dentro de la cámara de electroforesis en forma horizontal con la etiqueta en dirección del ánodo. Posteriormente, se agrega más solución amortiguadora hasta que los portaobjetos queden cubiertos por completo (Figura 11). Los portaobjetos se dejan reposando en la cámara sin corriente eléctrica por 20 minutos. La fuente de poder se enciende a los 18 minutos. Trascurridos los 20 minutos, se inicia la electroforesis con 25 voltios y 283-300 mA durante 20 minutos (Figura 12). Durante la electroforesis se vigila que las condiciones se mantengan constantes, de lo contrario, con ayuda de una jeringa se puede agregar o quitar amortiguador de electroforesis para mantener las condiciones establecidas (Figura 12). Trascurrido el tiempo, se retiran los portaobjetos evitando el contacto con el gel (Figura 13).

Neutralización de geles

Después de la electroforesis, los portaobjetos se colocan en una bandeja y se agrega de 50 a 100 ml de solución amortiguadora neutralizante. Se realizan tres lavados de cinco minutos cada uno. Los lavados se deben hacer con

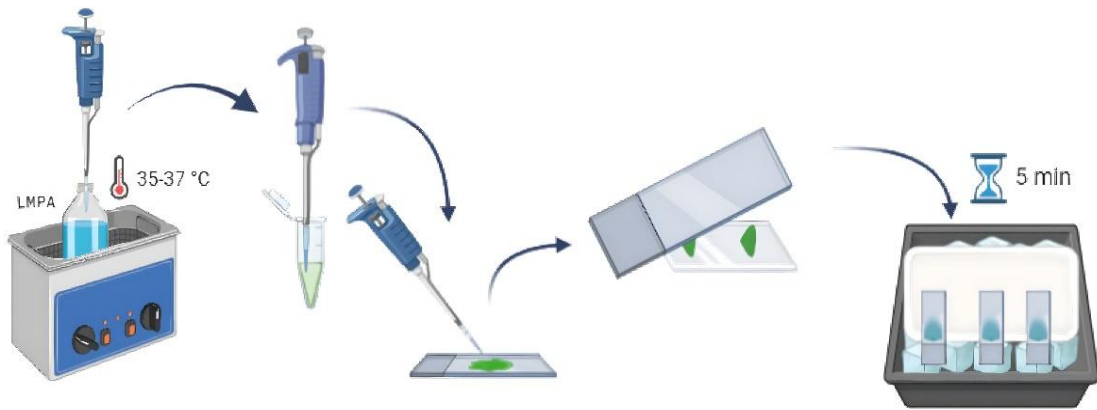


Figura 9. Mezcla de las células vegetales extraídas con la agarosa de bajo punto de fusión colocada en un cubreobjetos para su fijación y solidificación en los portaobjetos.

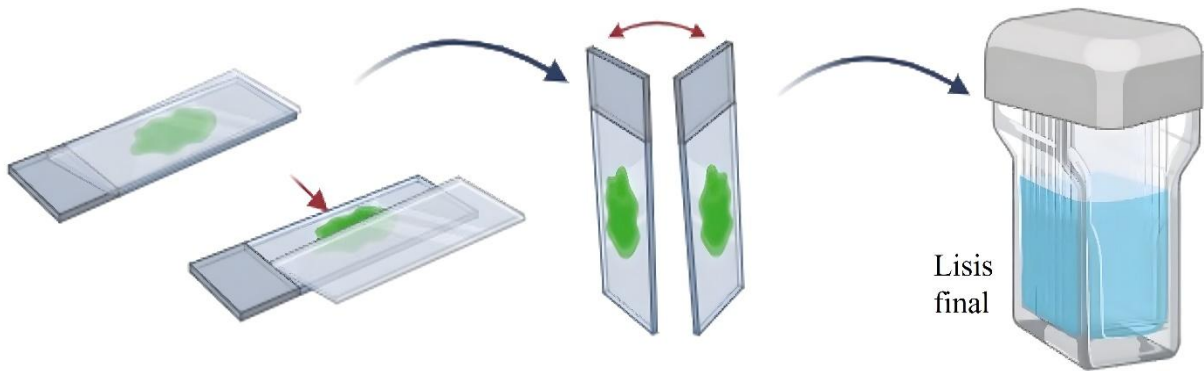


Figura 10. Retiro de cubreobjetos y fijación de geles en lisis final.

movimientos suaves y lentos de un costado a otro. Se debe cambiar la solución neutralizante en cada lavado (Figura 14).

Fijación de geles

En vasos couplin se agregan 35 ml de etanol a 4° C y se colocan los portaobjetos por pares y con las caras opuesta al gel por 10 minutos (Figura 15). Finalizando el tiempo, los portaobjetos se sacan y se colocan en gradillas para secarlos a temperatura ambiente. Una vez secos, los portaobjetos se almacenan en una caja negra debidamente sellada (Figura 15). Es muy importante que los portaobjetos permanezcan dentro de la caja y se debe evitar cualquier contacto con luz blanca para evitar que el ADN en los geles se atrofie.

Tinción con el colorante gel red para teñir el ADN.

Para teñir los geles de agarosa, se debe trabajar en un cuarto libre de luz blanca. Los portaobjetos se colocan con los geles de agarosa hacia arriba sobre una toalla húmeda en una superficie forrada con aluminio. Sobre un cubreobjetos limpio, se colocan 50 µl del reactivo gel red. Posteriormente, se coloca un portaobjeto con gel de agarosa sobre un cubreobjetos con gel red para que, por capilaridad y sin ejercer presión, se adhieran (Figura 16). Los geles teñidos se deben dejar reposar de 10 a 15 minutos para proceder a realizar las lecturas en el microscopio de fluorescencia (Figura 17).

Aplicaciones del ensayo cometa en plantas

Existen estudios donde utilizan el ensayo cometa alcalino para evaluar el efecto genotóxico que inducen los

25V 283-300 mA

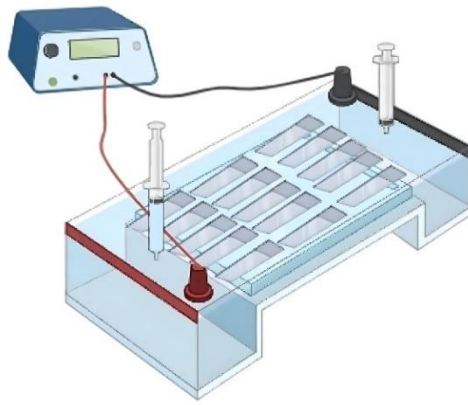


Figura 12. Realización y monitoreo de las condiciones de la fuente de poder y cámara de electroforesis.

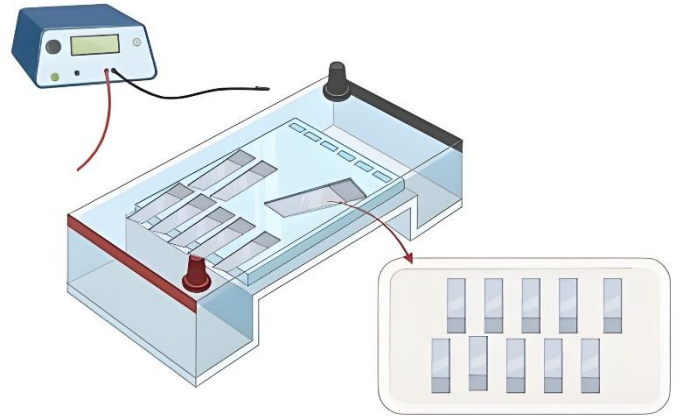


Figura 13. Extracción cuidadosa de los portaobjetos de la cámara de electroforesis.

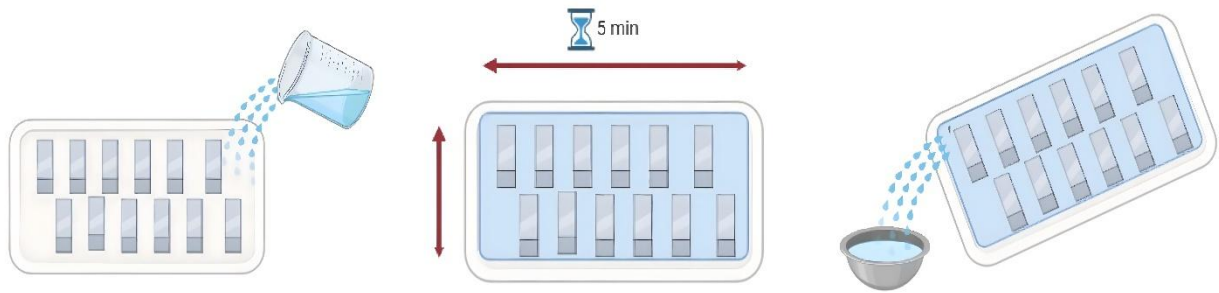


Figura 14. Neutralización de geles.

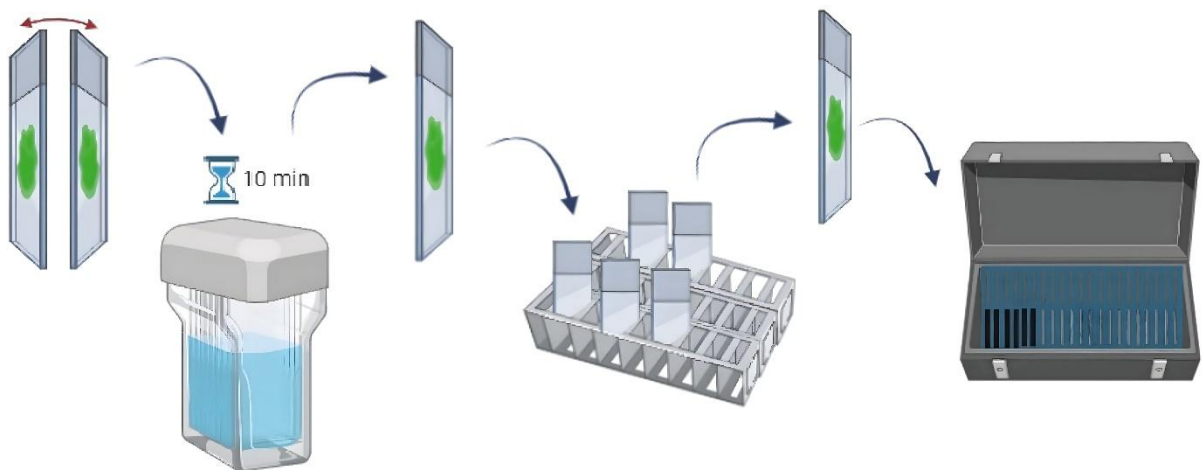


Figura 15. Fijación de geles en etanol frío, secado y almacenamiento de los portaobjetos.



Figura 16. Tinción con el colorante gel red.

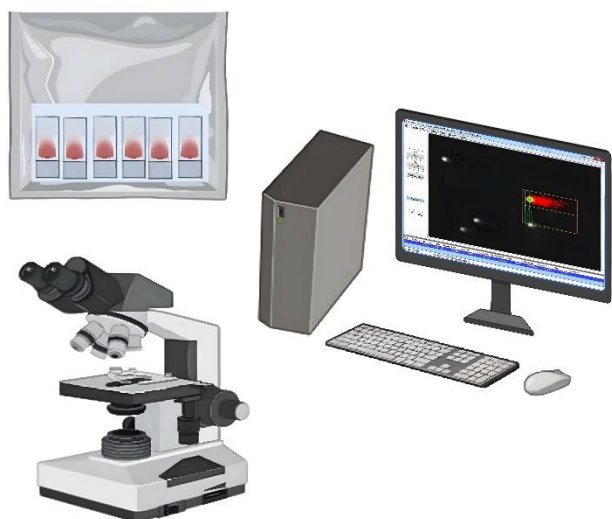


Figura 17. Lectura de portaobjetos con agarosa en el microscopio de fluorescencia.

factores bióticos y abióticos en plantas de *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* y *Lycopersicon esculentum* infestada con patógenos (Cеровска *et al.*, 2014; Ray *et al.*, 2015); en células de raíces, hojas o brotes en *Vicia faba* (Pourrut *et al.*, 2011), *Miscanthus giganteus* (Nsanganwimana *et al.*, 2014), *Vitis vinifera* (Castro *et al.*, 2021), *Cucumis melo* (Surgun-Acar, 2021), *Solanum Lycopersicum* (Gupta y Seth, 2019), *Brassica juncea* (Agnihotri y Seth, 2020) y *Allium cepa* (Naf'i y EK, 2022) expuestas a metales y metaloides tóxicos; en células de raíces, hojas o brotes de *Brassica juncea* (Jabeen *et al.*, 2020), *Hordeum vulgare* (Oney-Birol, 2019), *Vicia faba* (Omar *et al.*, 2023) y raíces de *Allium cepa* (Prajapati *et al.*, 2023) expuestos a

salinidad, así como los efectos causados por temperatura ambiente utilizando *Oryza sativa* (Xia *et al.*, 2022). Por otra parte, existen investigaciones que evalúan efectos genotóxicos de plaguicidas en células de raíces, hojas o brotes de *Allium Cepa* (Liman *et al.*, 2011; Türkoğlu, 2012; Liman *et al.*, 2015) y *Phaseolus Vulgaris* (Cenkci *et al.*, 2010). Finalmente, otros estudios evalúan efectos genotóxicos inducidos por radiación en células de raíces, hojas o plantulas de *Slanum lycopersicum*, *Capsicum annum* (Taha y Shoaib, 2021) y *Allium cepa* L. (Bolsunovsky *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020).

Ventajas y desventajas del ensayo cometa frente a ocho técnicas diferentes para medir el daño genotóxico en plantas

Las técnicas de tinción basan su diagnóstico en la intensidad del color que se genera en la reacción (Álvarez Gonçalvez *et al.*, 2015). El Azul de Toluidina, Azul de Anilina y Naranja de Acridina detectan indirectamente los daños al ADN de las células. Estos indicadores reaccionan con la cromatina, los grupos fosfatos, grupos sulfatos y grupos carboxilos (Álvarez Gonçalvez *et al.*, 2015). Aun cuando son de bajo costo y de fácil elaboración, los resultados pueden sesgarse debido a que la intensidad del color puede ser subjetiva para los usuarios (Álvarez Gonçalvez *et al.*, 2015). Por otra parte, el Naranja de Acridina es una prueba destructiva progresiva de las cadenas de ADN y puede generar resultados muy variables al transcurrir el tiempo (Torres-Bugarín *et al.*, 2014). El ensayo de micronúcleos basa su diagnóstico en la frecuencia con la que aparecen estos pequeños cuerpos en las células. La identificación y cuantificación más efectiva de estos cuerpos es de manera manual, por lo que los usuarios deben ser experimentados (Kwasniewska y Bara, 2022). Además, el indicador colorimétrico también tiñe otros fragmentos de ADN, organelos o desechos celulares, por lo que este método puede ser propenso a subjetividad por los usuarios (Nüsse y Marx, 1997). Las pruebas de Aberraciones Cromosómicas y de retardo de anafase-telofase (RAT) son técnicas que a menudo utilizan células divididas mitóticamente para detectar cromosomas anormales, roturas de cromosomas o cromátidas y translocaciones ocasionados por el agente genotóxico estudiado (Udroiu, 2007, Arencibia Arrebola *et al.*, 2010; Turkez *et al.*, 2017). Sin embargo, la mayoría de los agentes mutágenos disminuyen la actividad mitótica, causando que los análisis del ensayo de aberraciones cromosómicas en células en división, especialmente en metafases, representen un desafío para los usuarios (Kwasniewska y Bara, 2022). El intercambio de cromátidas hermanas implica la ruptura y reunificación de dos cromátidas hermanas durante la replicación del ADN, donde las partes de las cadenas parentales en los cromosomas duplicados se intercambian físicamente mediante la adición de reactivos como 5-bromodeoxiuridina con 2'-desoxiuridina y 5-fluoro-2'-desoxiuridina (Pardo *et al.*, 1987). Sin embargo, la incorrecta aplicación de las concentraciones de los

reactivos puede sesgar los resultados de la técnica (Kwasniewska y Bara, 2020). El ensayo cometa alcalino es un método estandarizado utilizado en múltiples investigaciones para la detección de daños en el ADN en pruebas de genotoxicidad y estudios de biomonitorio (Tyutereva *et al.*, 2024). Sin embargo, aunque puede ser aplicado a células eucariotas de diferentes organismos, es necesario consultar los protocolos apropiados para el aislamiento y procesamiento de células de las diferentes muestras para lograr la máxima especificidad del ensayo (Collins *et al.*, 2023). Asimismo, una limitante potencial del ensayo cometa alcalino es la dificultad logística para procesar grandes cantidades de muestras el mismo día ya que la metodología descrita en este documento tiene la capacidad para procesar noventa muestras de plantas en un solo día.

Sugerencias para complementar la técnica del ensayo cometa

A pesar de que las técnicas de identificación de daño al ADN aportan información valiosa sobre el daño genotóxico de las plantas expuestas a factores bióticos y abióticos, no aportan información que indique de manera puntual cuál o cuáles factores son los responsables de las lesiones genéticas de las plantas estudiadas sobre todo en estudios *in vivo*. Se sugiere complementar la técnica del ensayo cometa con estudios fisiológicos como la caracterización de trastornos del metabolismo del calcio, ensayo de inhibición del crecimiento de raíces, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), ensayo de peroxidación lipídica, respuestas de defensa antioxidante y magnitud de la respuesta adaptativa, contenido de proteína total, contenido de malondialdehído, clorofilas A y B, cantidad de prolina, superóxido dismutasa, actividad de catalasa (e.j. Liman *et al.*, 2019; Chakrabarti y Mukherjee, 2021; Ali *et al.*, 2022; Üstündağ *et al.*, 2023; Al-Hasnawi *et al.*, 2023) y especies reactivas de oxígeno, carbono y nitrógeno (e.j. Yen *et al.*, 2006; Feigl *et al.*, 2015; Goyal, *et al.*, 2016; Murali Achary y Panda 2010; Abdelhaliem y Al-Huqail 2016; Tyutereva *et al.*, 2024). Asimismo, se sugiere complementar la técnica con la medición de parámetros morfológicos como altura de la planta, diámetro del tallo, número de hojas, dimensiones y pesos de frutos, índice y densidad estomáticos (e.j. Üstündağ *et al.*, 2023; Hasnain *et al.*, 2024; Acosta-Núñez *et al.*, 2024). Finalmente, el uso de herramientas estadísticas como medidas de tendencia central, pruebas de correlación de Pearson o de Spearman, pruebas de t-Student, ANOVA, pruebas de rango múltiple (Duncan, Tukey, Diferencia Mínima Significativa), análisis de componentes principales y análisis de correspondencia canónica pueden ser de gran ayuda para demostrar cuál o cuáles factores bióticos o abióticos son los probables responsables del daño genotóxico en las plantas (e.j. Uriol *et al.*, 2013; Lovell, 2016; Liman *et al.*, 2019; Chakrabarti y Mukherjee, 2021; Ali *et al.*, 2022; Üstündağ *et al.*, 2023; Al-Hasnawi *et al.*, 2023; Hasnain *et al.*, 2024; Acosta-Núñez *et al.*, 2024).

Conclusiones

A pesar de que el ensayo cometa alcalino ha sido probado en múltiples estudios donde utilizan plantas para evaluar los daños genotóxicos generados por factores bióticos y abióticos se debe tener cuidado en la metodología utilizada para procesar muestras de plantas, sobre todo al momento de realizar los cortes de los órganos para la extracción de núcleos vegetales, en la temperatura del ambiente y de la luz del laboratorio donde se procesan las muestras ya que estos dos últimos podrían inducir daño al ADN en los núcleos ya aislados. Todos estos estudios para medir el daño genotóxicos en plantas expuestas a factores bióticos y abióticos no aportan información que discrimine cuáles factores bióticos o abióticos producen los daños genotóxicos en estos organismos. Actualmente el ensayo cometa alcalino debe ser complementado en plantas con otros ensayos fisiológicos, morfológicos, nutrimentales y herramientas estadísticas para poder demostrar cuál o cuáles factores bióticos o abióticos estén causando daños genotóxicos a las plantas.

Agradecimientos

Este documento se deriva de una estancia de investigación realizada por FLV en el Instituto de Ciencias Atmosféricas y Cambio Climático de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión y apoyo de la Dra. María Elena Calderón Segura.

Referencias

- Abdelhaliem, E., Al-Huqail, A.A. (2016). Detection of protein and DNA damage induced by elevated carbon dioxide and ozone in *Triticum aestivum* L. using biomarker and comet assay. *Genetics and Molecular Research*, 15, 1-19.
- Acosta-Núñez, L.F., Mussali-Galante, P., Castrejón-Godínez, M.L., Rodríguez-Solís, A., Castañeda-Espinoza, J.D., Tovar-Sánchez, E. (2024). In Situ Phytoremediation of Mine Tailings with High Concentrations of Cadmium and Lead Using *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae). *Plants*, 14, 69.
- Agnihotri, A., Seth, C.S. (2020). Does jasmonic acid regulate photosynthesis, clastogenecity, and phytochelatin in *Brassica juncea* L. in response to Pb-subcellular distribution? *Chemosphere*, 243, 125361.
- Al-Hasnawi, A.H.K., Guda, M.A. (2023). Comet Assay Technique Value as a Response on Zinc Oxide Nanoparticales in *Trigonella foenum-graecum* Plant. *International Journal of Advanced Multidisciplinary Research and Studies Search*, 3, 809-814.
- Ali, M.M., Fatima, A., Nawaz, S. Rehman, A., Javed, M., Nadeem, A. (2022). Cytotoxic and genotoxic evaluation of bisphenol S on onion root tips by *Allium cepa* and comet tests. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 88803-88811.
- Alvarez-Gonçalvez, C.V., Arellano, F.E., Pérez-Carrera, A.L. (2015). Técnicas de estudio para la evaluación del

- daño al ADN y su aplicación en la producción animal. *SNS*, 7, 21-37.
- Arencibia-Arrebola, D.F., Rosario-Fernández, L.A., Hernández-Rodríguez Y. (2010). Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6/cenp. *Revista Cubana de Farmacia*, 44, 503-511.
- Badr, A., El-Shazly, H.H., Mohamed, H.I. (2021). Plant responses to induced genotoxicity and oxidative stress by chemicals. In Khan, Z., Ansari, M.Y.K., Shahwar, D. (Ed.), *Induced genotoxicity and oxidative stress in plants*, 103-131.
- Bolsunovsky, A.Y., Dementyev, D.V., Frolova, T.S., Trofimova, E.A., Iniatkina, E.M., Vasilyev, S.A., Sinitsyna, O.I. (2019). Effects of Gamma-Radiation on DNA Damage in Onion (*Allium cepa* L.) Seedlings. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 489, 199-204.
- Cao, Y., Lou, Y., Han, Y., Shi, J., Wang, Y., Wang, W., Ming, F. (2011). Al toxicity leads to enhanced cell division and changed photosynthesis in *Oryza rufipogon* L. *Molecular Biology Reports*, 38, 4839-4846.
- Castro, C., Carvalho, A., Gaivão, I., Lima-Brito, J. (2021). Evaluation of copper-induced DNA damage in *Vitis vinifera* L. using Comet-FISH. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 6600-6610.
- Cenkci, S., Yildiz, M., Cigerci, İ.H., Bozdağ, A., Terzi, H., Terzi, E.S.A. (2010). Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1558-1564.
- Cerovska, N., Plchova, H., Vaculik, P., Moravec, T., Gichner, T. (2014). Potato virus X induces DNA damage in leaf nuclei of the host plant *Nicotiana tabacum* L. var. xanthi. *Biologia plantarum*, 58, 783-787.
- Chakrabarti, M., Mukherjee, A. (2021). Investigating the underlying mechanism of cadmium-induced plant adaptive response to genotoxic stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111817.
- Chatterjee, N., Walker, G.C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58, 235-263.
- Ciniglia, C., Pinto, G., Sansone, C., Pollio, A. (2010). Acridine orange/Ethidium bromide double staining test: A simple In-vitro assay to detect apoptosis induced by phenolic compounds in plant cells. *Allelopathy Journal*, 26, 301-308.
- Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., Bankoglu, E.E., Bonassi, S., Boutet-Robinet, E., Brunborg, G., Chao, C., Cooke, M.S., Costa, C., Dhawan, C., Lapuente, J., Bo, C., Dubu, J., Dusinska, M., Duthie, S.J., ... Azqueta A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature Protocols*, 18, 929-989.
- Darwish, H., Al-Osaimi, G. S., Al Kashgry, N. A. T., Sonbol, H., Alayafi, A. A., Alabdallah, N. M., ... & Noureldeen, A. (2023). Evaluating the genotoxicity of salinity stress and secondary products gene manipulation in lime, *Citrus aurantifolia*, plants. *Frontiers in plant science*, 14, 1211595.
- Feigl, G., Lehotai, N., Molnár, Á., Ördög, A., Rodríguez-Ruiz, M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Erdei, L., Kolbert, Z. (2015). Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress. *Annals of Botany*, 116, 613-625.
- Gateva, S. P., Jovtchev, G., Angelova, T. V., Nonova, T. P., Tyutyundzhiev, N., Geleva, E. G., ... & Angelov, C. V. (2022). Effect of UV radiation and other abiotic stress factors on DNA of different wild plant species grown in three successive seasons in alpine and subalpine regions. *Phyton*, 9, 293.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., Demnerová, K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research*, 559, 49-57.
- Goyal, S., Amar, S.K., Srivastav, A.K., Chopra, D., Pal, M.K., Arjaria, N., Ray, R.S. (2016). La diafonía mediada por ROS entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias por floxina B bajo irradiación UV ambiental. *Revista de Fotoquímica y Fotobiología B: Biología*, 161, 284-294.
- Gupta, P., Seth, C.S. (2019). Nitrate supplementation attenuates As (V) toxicity in *Solanum lycopersicum* L. cv Pusa Rohini: Insights into As (V) sub-cellular distribution, photosynthesis, nitrogen assimilation, and DNA damage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 44-55.
- Hasnain, A., Dadkhah-Aghdash, H., Luqman, M., Muhammad, S., Sardar, A.A., Ali, S., Mehmood, F., Khan, U.A., Mehmood, Z., John, A., Binyameen, Khan, Z.I., Yang, H.H., Awan, M.U.F. (2024). Impact of automobile exhaust on biochemical and genomorphic characteristics of *Mimusops elengi* L. growing along roadsides of Lahore city, Pakistan. *Heliyon*, 10, e28157.
- Jabeen, Z., Hussain, N., Irshad, F., Zeng, J., Tahir, A., Zhang, G. (2020). Physiological and antioxidant responses of cultivated and wild barley under salt stress. *Plant, Soil and Environment*, 66, 334-344.
- Kaur, M., Sharma, A., Soodan, R.K., Chahal, V., Kumar, V., Katnoria, J.K., Nagpal, A.K. (2019). *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a tool to assess genotoxicity of environmental contaminants. *Environmental Contaminants and Natural Products*, 65-93.
- Kumar, A., Kaur, S., Chandel, S., Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (2020). Comparative cyto-and genotoxicity of 900 MHz and 1800 MHz electromagnetic field radiations in root meristems of *Allium cepa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 188, 109786.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N. (2009). Comet Test Measurements: A Perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 53-64.

- Kwasniewska, J., Bara, A. (2020). EdU-Based Step-by-Step Method for the Detection of Sister Chromatid Exchanges for Application in Plant Genotoxicity Assessment. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1146.
- Kwasniewska, J., Bara, A.W. (2022). Plant Cytogenetics in the Micronuclei Investigation—The Past, Current Status, and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1306.
- Liman, R., Acikbas, Y., Ciğerci, İ.H. (2019). Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by *Allium* and Comet tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 408-414.
- Liman, R., Ciğerci, İ.H., Akyıl, D., Eren, Y., Konuk, M. (2011). Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 61-64.
- Liman, R., Ciğerci, İ.H., Öztürk, N.S. (2015). Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 118, 38-42.
- Liu, M.Y., Sun, J., Wang, K.Y., Liu, D., Li, Z.Y., Zhang, J. (2014). Spermidine enhances waterlogging tolerance via regulation of antioxidant defence, heat shock protein expression and plasma membrane H⁺-ATPase activity in *Zea mays*. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200, 199-211.
- Lovell, D.P. (2016). Statistical analysis of comet assay data. in *The Comet Assay in Toxicology*, ed. D. Anderson and A. Dhawan, The Royal Society of Chemistry, 2nd edn, ch. 20, pp. 551-580.
- Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M., Sasaki, Y.F. (1997). Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay.: 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 393, 107-113.
- Murali Achary, V.M., Panda, B.B. (2010). Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. *Mutagenesis*, 25, 201-209.
- Naf'i AL, E.K., Khalil, M.I. (2022). Estimation of DNA damage in the roots of *Allium cepa* exposed to heavy metals using the comet assay. *Revista Bionatura*, 7, 70.
- Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Mench, M., Douay, F. (2014). Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *Journal of Environ Manage*, 143, 123-134.
- Nüsse, M.; Marx, K. (1997). Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: Advantages and disadvantages. *Mutation Research/Genetic Toxicology Environmental Mutagenesi*, 392, 109-115.
- Omar, S.A., Elsheery, N.I., Pashkovskiy, P., Kuznetsov, V., Allakhverdiev, S.I., Zedan, A.M. (2023). Impact of titanium oxide nanoparticles on growth, pigment content, membrane stability, DNA damage, and stress-related gene expression in *Vicia faba* under saline conditions. *Horticulturae*, 9, 1030.
- Oney-Birol, S. (2019). Exogenous L-carnitine promotes plant growth and cell division by mitigating genotoxic damage of salt stress. *Scientific reports*, 9, 17229.
- Pardo, E.G., Hernandez, P., Gutiérrez, C. (1987). The incorporation of deoxyuridine monophosphate into DNA increases the sister-chromatid exchange yield. *Experimental Cell Research*, 168, 507-517.
- Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J., Pinelli, E. (2011). Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: Potential involvement of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726, 123-128.
- Prajapati, P., Gupta, P., Kharwar, R.N., Seth, C.S. (2023). Nitric oxide mediated regulation of ascorbate-glutathione pathway alleviates mitotic aberrations and DNA damage in *Allium cepa* L. under salinity stress. *International Journal of Phytoremediation*, 25, 403-414.
- Ray, S., Mondal, S., Chowdhury, S., Kundu, S. (2015). Differential responses of resistant and susceptible tomato varieties to inoculation with *Alternaria solani*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 90, 78-88.
- Ribeiro, V.C., Leitão, C.A.E. (2020). Utilisation of Toluidine blue O pH 4.0 and histochemical inferences in plant sections obtained by free-hand. *Protoplasma*, 257, 993-1008.
- Surgun-Acar, Y. (2021). Estimation of arsenic-induced genotoxicity in melon (*Cucumis melo*) by using RAPD-PCR and comet assays. *Botanica Serbica*, 45, 97-106.
- Szurman-Zubrzycka, M., Jędrzejek, P., & Szarejko, I. (2023). ¿Cómo afrontan las plantas el daño en el ADN? Una revisión concisa sobre la vía DDR en plantas. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 24(3), 2404.
- Tabassum, Jeena, A.S., Pandey, D. (2021). Metal-induced genotoxicity and oxidative stress in plants, evaluation methods, and role of various factors in the regulation of genotoxicity. *Induced genotoxicity and oxidative stress in plants*, 133-149.
- Taha, E., Shoab, R.M. (2021). Impact of gamma irradiation on tomato, and pepper growth parameters, phytochemical, nematode infectivity and detection of DNA damage by comet assay. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 12, 599-608.
- Torres-Bugarín, O., Zavala-Cerna, M.G., Nava, A., Flores-García, A., Ramos-Ibarra, M.L. (2014). Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Disease Markers*, 14, 956835.
- Turkez, H., Arslan, M.E., Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert opinion on drug metabolism and toxicology*, 13, 1089-1098.
- Türkoğlu, Ş. (2012). Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA

- content, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103, 224-230
- Tyutereva, E.V., Strizhenok, A.D., Kiseleva, E.I., Voitsekhovskaja, O.V. (2024). Comet Assay: Multifaceted Options for Studies of Plant Stress Response. *Horticulturae*, 10, 174.
- Udroiu, I. (2007), Pruebas citogenéticas aplicadas al control de alimentos de origen animal. *Revista veterinaria*, 18, 62-64.
- Uriol, E., Sierra, M., Comendador, M.A., Fra, J., Martínez-Cambor, P., Lacave, A.J., Sierra, L.M. (2013). Long-term biomonitoring of breast cancer patients under adjuvant chemotherapy: the comet assay as a possible predictive factor. *Mutagenesis*, 28, 39-48.
- Üstündağ, Ü., Macar, O., Kalefetoğlu Macar, T.K., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K. (2023). Effect of *Melissa officinalis* L. leaf extract on manganese-induced cytogenotoxicity on *Allium cepa* L. *Scientific Reports*, 13, 22110.
- Xia, S., Liu, H., Cui, Y., Yu, H., Rao, Y., Yan, Y., Zeng, D., Hu, J., Zhang, G., Gao, Z., Zhu, L., Shen, L., Zhang, Q., Li, Q., Dong, G., Guo, L., Qian, Q., Ren, D. (2021). UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase enhances rice survival at high temperature. *New Phytologist*, 233, 344-359.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Su, H.J., Yeh, C.T., Wu, C.H. (2006). Scavenging effects of lotus seed extracts on reactive nitrogen species. *Food chemistry*, 94, 596-602.
- Zeyad, M. T., Khan, S., & Malik, A. (2022). Genotoxic hazard and oxidative stress induced by wastewater irrigated soil with special reference to pesticides and heavy metal pollution. *Heliyon*, 8, e10534.
- Zúñiga-Venegas, L.A. (2009). Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Universitat Autònoma de Barcelona, 243. Tesis doctoral.
- Zvanarou, S., Vágnerová, R., Mackievic, V., Usnich, S., Smolich, I., Sokolik, A., Yu, M., Huang, X., Angelis, K.J., Demidchik, V. (2020). Salt stress triggers generation of oxygen free radicals and DNA breaks in *Physcomitrella patens* protonema. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104236.