

Optimización de un método de extracción de ADN utilizando *Subepidermis de Austrocyllindropuntia* y *Opuntia-Opuntioideae*

Optimization of a DNA extraction method using *Subepidermis from Austrocyllindropuntia* and *Opuntia-Opuntioideae*

Leidy Yanira Rache-Cardenal¹
Adriana Sofía Albesiano-Hoyos²
Hamidou Tall³

Recibido: febrero 15 de 2022

Aceptado: junio 27 de 2022

Resumen

La identificación taxonómica de especies mediante análisis de variación de secuencias de ADN ortólogas, complementan la información obtenida con caracteres morfológicos. Estudios citogenéticos muestran taxones poliploides en la subfamilia Opuntioideae, *Opuntia ficus-indica*, contribuyendo a la variabilidad morfológica en los individuos de una población, e influyendo en la correcta identificación de las especies. Sin embargo, las longitudes de las secuencias en Opuntioideae están afectadas por la extracción de ADN puro. Se evaluaron y modificaron diferentes métodos de extracción y se estableció un procedimiento para obtener ADN de buena calidad, libre de inhibidores para amplificación de genes por reacción en cadena de la polimerasa. Las relaciones A260/A280 y A260/A230 variaron entre 1.6 a 2.1, revelando ausencia de contaminación con el protocolo modificado para la extracción de ADN a partir de hojas de algodón. Este método es de bajo costo comparado con los de casas comerciales y, por lo tanto, se puede aplicar en estudios con recursos limitados.

Palabras clave: biotecnología, cactaceae, mucílago, secuenciación Sanger.

Abstract

The taxonomic identification of species through analysis of the variation of orthologous DNA sequences, complement the information obtained with morphological characters. Cytogenetic studies indicate that polyploid taxa occur in the subfamily Opuntioideae, *Opuntia ficus-indica*, contributing to morphological variability in the individuals of a population, and influencing the correct identification of species. However, the lengths of the sequences in Opuntioideae are affected by the extraction of pure DNA. Different extraction methods were evaluated and modified, and a procedure was established to obtain good quality DNA, free of inhibitors for gene amplification by polymerase chain reaction. The ratio A260/A280 and A260/A230 ranged from 1.6 to 2.1, revealing absence of contamination with the modified protocol for DNA extraction from cotton leaves. This method is inexpensive compared to those of commercial manufacturers and, therefore, can be applied in studies with limited resources.

Keywords: biotechnology, cactaceae, polysaccharides, Sanger sequencing.

1 Bióloga, Doctora en Ciencias Biología, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. E-mail: leidy.rache@uptc.edu.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9275-6205>

2 Bióloga, Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. E-mail: adriana.albesiano@uptc.edu.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8672-6018>

3 Cadre Supérieur Technique en Ucad Dakar, Doctor of Phytopathology, Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA), Dakar, Sénégal. E-mail: midoutalel@yahoo.fr

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8452-0454>

1. Introducción

La familia Cactaceae incluye entre 1500 a 2000 especies (Porrás-Flores et al., 2017), las cuales son de gran interés por las adaptaciones físicas y fisiológicas; además por la coevolución con microorganismos endófitos, como las bacterias, *Rhizobium*, *Burkholderia* y hongos *Aspergillus*, *Fusarium*, ayudando a la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, a la solubilización de los fosfatos, y a la protección contra estrés salino y térmico, permitiendo colonizar ambientes rocosos, con suelos superficiales y déficit hídrico (Rodríguez-Mendoza et al., 2021).

Los cladodios, las flores y los frutos de las especies del género *Opuntia* son claves como vectores de polinización, pero son utilizados en la industria agrícola, alimentaria y farmacéutica, razón por la cual algunos taxones han llegado a ser catalogados como especies en vía de extinción (Cardeño-Londoño & Rodríguez-Herrera, 2020; Dennis et al., 2007). Para mantener las poblaciones naturales sanas y hacer uso sostenible de las mismas es importante conocer su variabilidad genética, para proponer planes de conservación y manejo. A nivel molecular, se utilizan diferentes marcadores moleculares para evaluar la variabilidad genética de estas especies, caracterizar el germoplasma, conservarlas, mejorarlas genéticamente y/o realizar análisis de genética de poblaciones (Dennis et al., 2007; Hoisington et al., 1999).

Sin embargo, para realizar ese tipo de análisis es indispensable obtener ácido desoxirribonucleico (ADN) en altas cantidades y de buena calidad, con procesos de extracción que sean económicos, eficientes y rápidos y, que permitan obtener resultados confiables y reproducibles (Mondragon-Jacobo & Bordelon, 1996; Wang et al., 1998; Mondragón-Jacobo et al., 2000). Generalmente se utilizan kits comerciales porque reúnen todas esas características, aunque se ha evidenciado que los tejidos contienen diferente cantidad de polifenoles, polisacáridos y componentes ácidos que afectan el proceso de extracción y los futuros análisis (Shedbalkar et

al., 2010; Sánchez-Hernández & Gaytán-Oyarzún, 2006). Para contrarrestar estas dificultades se han descrito protocolos de extracción de ADN en plantas utilizando el método bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y modificaciones de este, que se basan en ajustar las concentraciones según las especies estudiadas (Doyle & Doyle, 1990; Sue-Porebski et al., 1997).

En las especies de Cactaceae, los procesos de extracción de ácidos nucleicos se ven afectados por la cantidad y presencia en la zona cortical (en las células del tejido de clorénquima y parénquima) de mucílago, sustancia viscosa, compuesta por polisacáridos (pectina) y metabolitos secundarios en altas cantidades (Lorenzo et al., 2017). También, el mucílago se presenta en otras familias suculentas como *Asphodelaceae*, *Portulacaceae*, *Malvaceae* (Sánchez-Olaya et al., 2019) entre otras, su contenido es variable entre los taxones, puede unirse con el agua y se libera al causar lesiones en la planta (Nobel & Cavelier, 1992).

En las especies cultivadas y silvestres de *Opuntia* se ha encontrado mucílago en los cladodios e hipanto (De la Cruz et al., 1997). También, se ha reportado una tendencia a la formación de complejos insolubles entre los polisacáridos y los ácidos nucleicos, lo cual dificulta su aislamiento a partir de material fresco (Shedbalkar et al., 2010; De la Cruz et al., 1997; Guillemaut & Maréchal-Drouard, 1992), he inhiben la actividad de las taq polimerasas y las enzimas de restricción (Pandey et al., 1996). Durante la extracción, cuando el mucílago se libera en el macerado del tejido, se forma una textura viscosa parecida al pegante (Rowland & Nguyen, 1993), la cual se adhiere a los componentes celulares y moléculas orgánicas como proteínas y fenoles, dificultando su separación del ADN en los siguientes pasos de extracción.

Utilizando plantas ricas en polisacáridos, se han reportado métodos de extracción de ADN partiendo de material fresco de las hojas (Doyle & Doyle, 1990; Rowland & Nguyen, 1993; Haymes, 1996; Dellaporta et al., 1983). En cactus, incluyendo *Opuntia* se ha aislado ADN de pequeños segmentos de tejido (Wang et al., 1998; De la

Cruz et al., 1997; Keb-Llanes et al., 2002), utilizando CTAB o dodecil sulfato de sodio (SDS) para la lisis celular. Sin embargo, no se modificaron para realizar extracciones de especies de *Opuntia* y ecotipos (Keb-Llanes et al., 2002; Cota-Sánchez et al., 2006), ni para las especies del presente estudio (*Austrocyllindropuntia subulata*, *Opuntia dillenii* y *Opuntia ficus-indica*).

Para evitar el problema del mucílago, también se ha realizado la extracción a partir de las espinas, con un protocolo extenso que incluye el secado de las espinas y el rompimiento del tejido, teniendo bajos rendimientos de ADN (Fehlberg et al., 2013). En contraste y con el fin de aumentar los rendimientos y disminuir el tiempo de extracción, se ensayaron diferentes métodos de extracción de ADN para cuatro especies del género *Opuntia* (*O. dillenii*, *O. elata*, *O. ficus-indica* y *O. robusta*), encontrándose un método combinado que permitió obtener ADN genómico con el mejor rendimiento y calidad, que puede ser utilizado para analizar la diversidad genética de las poblaciones a través de microsatélites (Raimundo et al., 2018).

Algunos estudios sobre análisis de la composición química de las cactáceas, específicamente de *O. ficus-indica*, mostraron que el contenido de calcio, cenizas de base húmeda, cobalto, cobre, fósforo, hierro, magnesio, proteínas y sílice varían entre las distintas especies y dentro de una misma especie (Guzmán & Chávez, 2007; Abraján, 2008). Para *O. ficus-indica* se demostró la variación del contenido de calcio, carbohidratos, cenizas, fibra, hierro, minerales, potasio, proteínas, sodio y vitamina C de acuerdo con la edad de los cladodios (Guzmán & Chávez, 2007). En el mucílago extraído de los cladodios de esta especie se encontraron azúcares (% en moles) como arabinosa (44.54%), galactosa (18.16%), (ramnosa 6.58%), xilosa (23.98%), y ácido galacturónico (6.80%) (Abraján, 2008). En *O. dillenii* se presentaron azúcares como arabinosa (38.8%), galactosa (33%), glucosa (5.1%), ramnosa (15.70%), y xilosa (5.1%) (Kalegowda et al., 2017; Qiu et al., 2007). Para las tres especies de nuestro interés (*A. subulata*, *O. dillenii* y *O. ficus-indica*)

el contenido de cenizas, fibra, proteína, Ca, P y compuestos fenólicos presentes en el mucílago es variable (Pérez et al., 2015; Abraján 2007).

Teniendo en cuenta las diferencias en la composición química de los cladodios y el mucílago de las especies estudiadas, y su efecto en la obtención de ADN de buena calidad, en este trabajo se propusieron los siguientes objetivos: i) evaluar diferentes protocolos de extracción de ADN, ii) encontrar el método que brinde el mayor rendimiento y calidad de ADN, y iii) probar el protocolo mediante la amplificación de dos regiones del cloroplasto *rpl16* y *trnL-trnF*.

2. Metodología

2.1 Selección y colecta del material vegetal

Muestras de tallo de *A. subulata*, *O. dillenii* y *O. ficus-indica* fueron recolectadas en las regiones semiáridas de los municipios de Cucaita, Motavita, Oicatá, Ráquira, Sáchica, Samacá, Soatá, Soracá, Sutamarchán, Tipacoque y Tunja, en el departamento de Boyacá, y fueron mantenidas en macetas en el laboratorio del grupo de estudios en Genética y Biología Molecular (GEBIMOL), de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, sede Tunja (UPTC), hasta la extracción de ADN.

El muestreo fue completamente al azar, dejando mínimo 1 km de distancia entre los individuos muestreados y se seleccionaron individuos maduros y saludables. El número de individuos colectados en cada municipio dependió de la abundancia de los taxones en cada lugar. En total se recolectaron 63 segmentos.

2.2 Extracción y amplificación del intrón *rpl16* y el espaciador intergénico *trnL-trnF*

Los procedimientos de extracción de ADN y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron realizados en el Laboratorio GEBIMOL.

Para superar los problemas de contaminación del ADN debido a la presencia de componentes ácidos, polifenoles, polisacáridos y proteínas, se modificaron y adaptaron los métodos de extracción de ADN de los protocolos de Albesiano y Terrazas (2012), y Martínez-González et al., (2017); además de utilizar columnas de purificación del kit de purificación de ADN genómico de plantas PureLink®. Se utilizó el kit de purificación de ADN genómico de Wizard (Promega Corp., Madison,

WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante e incluyendo un paso adicional. Finalmente, se utilizó el método propuesto por Phillips et al., (2003), combinado con el protocolo de limpieza propuesto por Falcón y Valera (2007), utilizado para extraer ácidos nucleicos de hojas de algodón (*Gossypium hirsutum*) (Rache-Cardenal et al., 2013). El método fue ajustado para obtener ADN de buena calidad y las modificaciones para cada protocolo se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Modificaciones a los protocolos de extracción de ADN utilizados.

Protocolos de extracción ensayados	Modificaciones
Albesiano y Terrazas (2012) modificado	Buffer de lisis CTAB 2X. Eliminación de lípidos y proteínas: dos lavados adicionales con fenol y cloroformo. Precipitación y eliminación de sales: adición de 300 µl de etanol 76% y 10 mM de acetato de amonio durante 15 minutos a -20°C.
Martínez-González et al., (2017) modificado	Precipitación con: - 10 µl de NaCl (3M) con 260 µl de etanol (100%) durante 1 hora a -80°C. Centrifugar a máxima velocidad durante 20 minutos, lavar con etanol (75%).
Kit Wizard modificado	Eliminación de lípidos, proteínas y grasas: Adición de 400µl de PCIA (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico), centrifugación a 14000 rpm por 5 minutos.
Rache-Cardenal et al., (2013) modificado	Buffer de lisis CTAB 2X. Precipitación con: - 10 µl de NaCl (2M) y 250 µl de isopropanol durante 30 minutos a -20°C.

Cada uno de los protocolos se evaluó utilizando tejido subepidérmico fresco y pulverizado con nitrógeno líquido almacenado a -80°C, tomando una muestra de cada especie. El ADN de cada una de las muestras se cuantificó en un varioscan™ Thermo Scientific™ multimode microplate reader. El protocolo completo y modificado utilizado para extraer ADN de estas especies se describe a continuación:

Uno a dos fragmentos de cladodio de 1.5 cm² se colocaron en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se adicionaron 200 µl de 2x CTAB, se maceraron los fragmentos de tallo, se adicionaron 300 µl más de tampón 2x CTAB, se continuó macerando, luego se adicionaron 300 µl de 2x CTAB y se mezcló utilizando un vórtex. Las muestras se centrifugaron a 12 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, se agregaron 500 µl de 2x CTAB y

7 µl de β- mercaptoetanol, se mezcló en vórtex y se colocaron los tubos en baño María 50°C por 50 minutos dando vórtex cada 10 minutos a las muestras. Pasado el tiempo, a cada muestra se le agregaron 50 µl de fenol y 50 µl de cloroformo, se agitó en vórtex y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos, se rescató la fase superior y se colocó en un tubo limpio. Posteriormente, se agregaron 50 µl de fenol y 100 µl de cloroformo, se agitó utilizando un vórtex y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos, se rescató la fase superior con cuidado y se colocó en un tubo limpio. Se repitió el paso anterior. Luego se agregaron 100 µl de cloroformo, se mezcló en vórtex, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y se rescató la fase superior en un tubo limpio. Para precipitar el ADN se adicionaron 10 µl de NaCl (2M) y 250 µl de isopropanol y se dejaron las muestras a -20°C durante 30 minutos. Pasado

este tiempo se centrifugaron a 12000 rpm, 4°C durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 90% frío, se dejó secar y se resuspendió el ADN en 50 µl de tampón TE, adicionando 2 µl de RNasa.

La identificación de los taxones recolectados se realizó utilizando como marcadores moleculares de cloroplasto la secuencia del espaciador intergénico trnL-trnF y el intrón rpl16. La amplificación de estos dos marcadores se realizó en tubos de 200 µl con 10X taq buffer, 0.2 mM de cada dNTP, 0.1 µM de cada primer, 25 mM de MgCl₂, 1.25u de Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific Inc., Waltham, M.A, USA.) y ADN a 30 ng/µl en un volumen total de 50 µl de reacción. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: denaturación inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos comprendiendo denaturación a 95°C por 30 segundos, 61°C para amplificar el gen rpl16, 62°C para el gen trnL-F y extensión a 72°C por 1.40 minutos, una extensión final a 72°C por 10 minutos. Se utilizaron los cebadores reportados por Albesiano y Terrazas (2012), los cuales fueron sintetizados por Macrogen.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los amplicones obtenidos se secuenciaron por Sanger dos sentidos en Macrogen con 30 µl del producto de PCR (no purificado) a una concentración de 100 ng/µl y 2 µl de cada uno de los cebadores a una concentración de 5 pmoles/µl (5pM). Los cromatogramas de las secuencias fueron analizados, editados y ensamblados utilizando el programa Sequencher 5.4.6.

2.3 Edición y ensamblaje de las secuencias

Se realizó en el programa CLC Genomics Workbench, versión 3.6.5, usando como estándar una secuencia obtenida del GenBank (*Opuntia monacantha*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT359369.1>).

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en la Unidad Genómica de Macrogen (Korea), utilizando como método de rutina la técnica de Sanger, y la electroforesis en secuenciador automático de capilares (Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer).

3. Resultados y discusión

3.1 Selección y colecta material vegetal

Se sembraron 63 segmentos de los cuales 18 correspondieron a *A. subulata*, 10 a *O. dillenii* y 35 a *O. ficus-indica*. Los resultados de cuantificación y calidad del ADN extraído utilizando tejido pulverizado y fresco fueron mejores al trabajar con tejido fresco (resultados no mostrados), por lo cual los ensayos subsecuentes se realizaron utilizando tejido fresco.

3.2 Amplificación del gen rpl16 y el espaciador intergénico trnL-trnF

La calidad del ADN se consideró buena cuando se obtuvo una proporción de absorbancia A₂₆₀/A₂₃₀ entre 1.8 a 2.2 y A₂₆₀/A₂₈₀ entre 1.8 a 2.0. Las relaciones de absorbancia 260/230 menores a 1.8 indican presencia de EDTA, carbohidratos y fenol, mientras que relaciones 260/280 menores a 1.8 indican contaminación por proteínas, fenoles u otros contaminantes que se absorben a 280 nm (Sambrook et al., 1982). De esta forma, ensayando el protocolo de Albesiano y Terrazas (2012), se obtuvieron relaciones 260/280 muy bajas (0.1) y 260/280 mayores a 2,2; aunque las modificaciones que se realizaron al protocolo como aumento de lavados con fenol y cloroformo incrementaron los valores 260/280, éstos no superaron 1.0.

Con el protocolo propuesto por Martínez-González et al. (2017), se observaron valores mayores a 2.2 para la relación 260/280, los cuales disminuyeron con las modificaciones realizadas al protocolo, que incluyeron un paso de precipitación con NaCl 3 M. Las relaciones 260/230 mejoraron con la modificación; sin embargo, solo en una de las especies se llegó a un valor de 1,8 para la relación 260/280. Resultados similares fueron obtenidos utilizando columnas de purificación y el kit de extracción Wizard con modificaciones, obteniéndose un aumento en la relación 260/280, pero disminución en la relación 260/230 (valores menores a 0,7, Figura 1A). A pesar de la mejoría en la calidad del ADN, los contaminantes inhibieron la amplificación de los genes de interés.

Respecto a la cantidad de ADN obtenida, es de resaltar la alta concentración alcanzada aplicando el protocolo de Martínez-González *et al.* (2017). Este

resultado puede explicarse teniendo en cuenta que se estaría sobrestimando la cantidad por contaminación del ácido nucleico con fenol (Figura 1B).

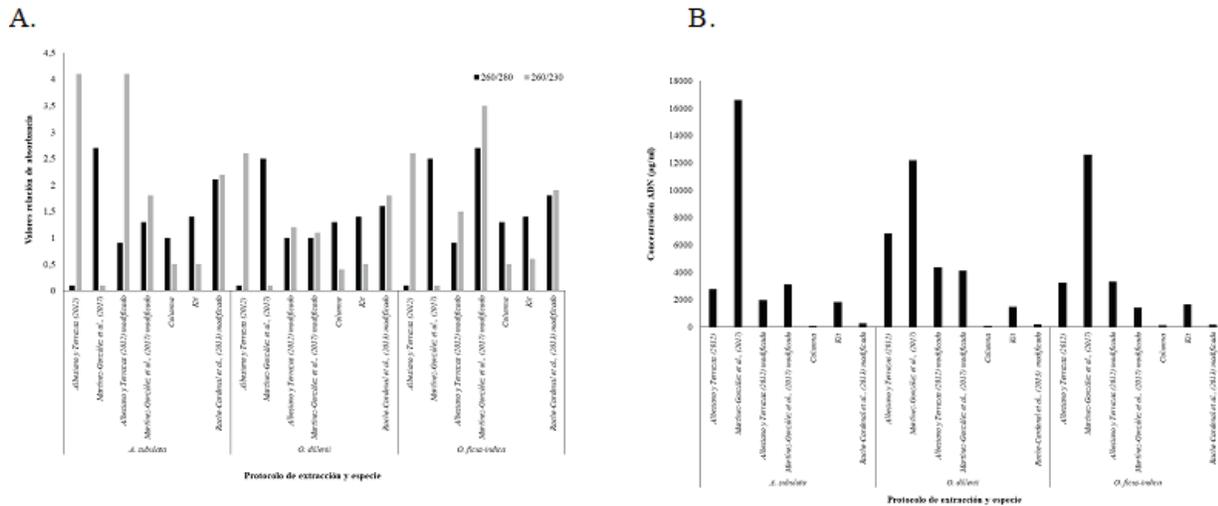


Figura 1. Cuantificación ADN obtenido utilizando diferentes protocolos y tejido fresco de una muestra de cada taxón. A) Calidad del ADN según las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. B) Concentración del ADN.

Finalmente, después de realizar diferentes modificaciones al protocolo utilizado para extraer ADN de hojas de algodón (Rache-Cardenal et al., 2013), se obtuvo ADN de las tres especies evaluadas, de buena calidad (relaciones 260/280 y 260/230 entre 1.6-2.1 y 1.8-2.2, respectivamente, Figura 1A) lográndose amplicones del intrón

rpl16 y el espaciador intergénico trnL-trnF en cada una de las muestras analizadas (Figura 2). Los productos de PCR se enviaron a secuenciar, obteniéndose buenos electroferogramas con picos muy bien definidos de buena resolución (Figura 3).

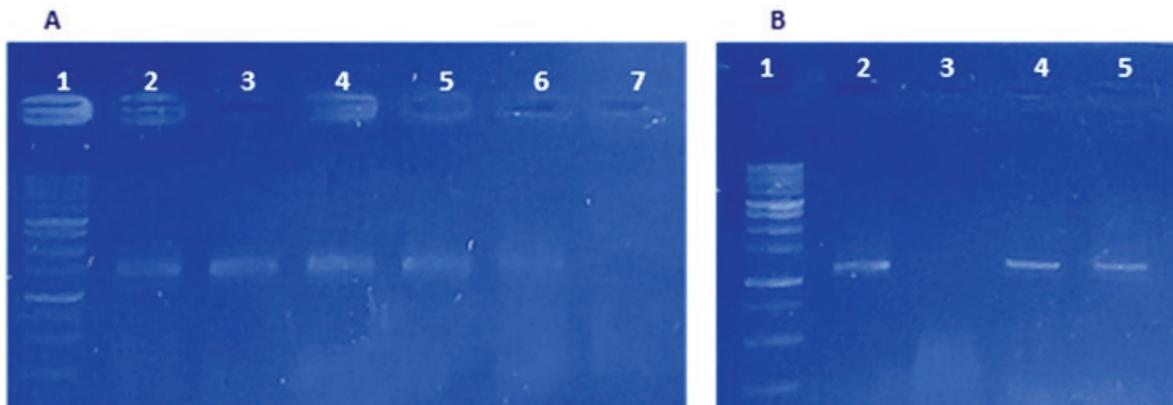


Figura 2. Amplificación del gen rpl 16 y del espaciador intergénico trnL-trnF. A) rpl 16: (1) Marcador de peso molecular 1Kb, (7) Control negativo, (2) *A. subulata*, (3 y 4) *O. dillenii*, (5 y 6) *O. ficus-indica*. B) Espaciador intergénico trnL-trnF: (1) Marcador de peso molecular 1Kb. (3) Control negativo, (2) *A. subulata*, (4) *O. dillenii*, (5) *O. ficus-indica*.

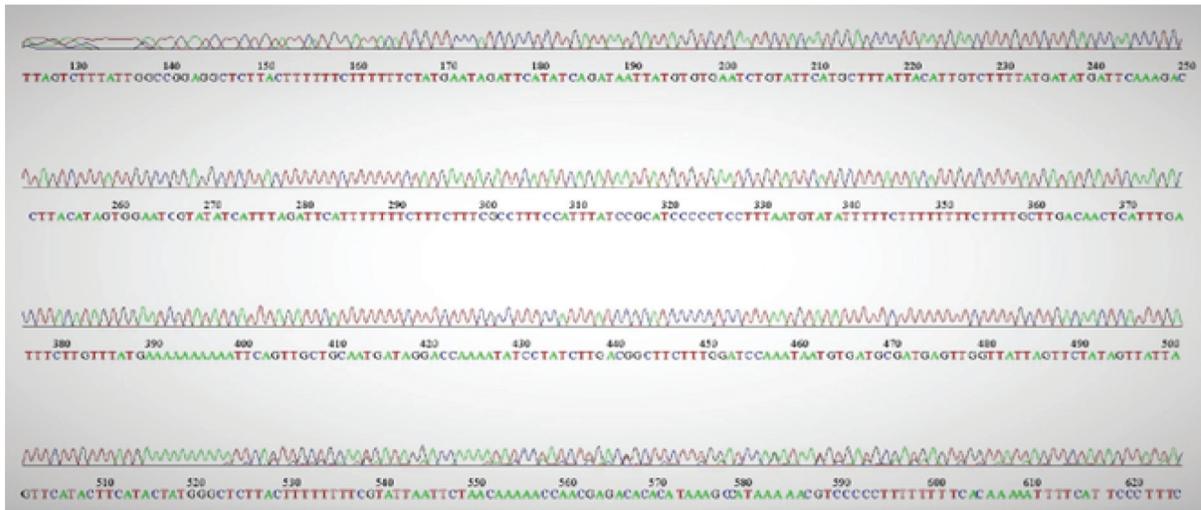


Figura 3. Electroferograma del gen rpl 16 reverso de *O. ficus-indica*, cuyos nucleótidos presentan una buena señal.

3.3 Edición y ensamblaje de las secuencias

Se editaron y ensamblaron 56 secuencias correspondientes a 224 reacciones; sin embargo, solo se cargaron en GenBank las secuencias de una muestra de cada taxón. *Opuntia ficus-indica* (OM685013) que tiene un alto grado de similitud, 98%, con *O. monacantha* MT359369.1, lo cual puede explicarse por una mala identificación taxonómica de esta última especie. *Austrocylindropuntia subulata* (ON241265) y *Opuntia dillenii* (ON256561).

3.4 Discusión

En especies de cactáceas, distintos protocolos de extracción de ADN se utilizan con éxito para análisis de diversidad genética con diferentes marcadores moleculares (Mondragón-Jacobo et al., 2000; Mihalte et al., 2008; Barbosa et al., 2020; Díaz et al., 2006; Rosas-Reinhold et al., 2022; Realini et al., 2015; Yáñez et al., 2016; Mondragón-Jacobo et al., 2000; Paz-Guerrero et al., 2019). En particular, para dos de las especies de interés en este estudio (*O. ficus-indica* y *O. dillenii*) se encontraron varios reportes con procedimientos de extracción de ADN; en la mayoría de los estudios se menciona la dificultad para extraer su ADN de-

bido a las diferencias en contenido de mucílago que presentan (Raimundo et al., 2018). En esos reportes se identificó la necesidad de realizar diferentes modificaciones a los protocolos para obtener ADN de buena calidad, concordando con los ensayos que se realizaron en este estudio. Sin embargo, cabe destacar que para la especie *A. subulata* no se encontraron protocolos de extracción de ADN y que fue difícil obtenerlo, debido a que presenta diferencias morfológicas y de contenido de mucílago que dificultan su manejo y la extracción de ADN de buena calidad, con protocolos rápidos y económicos.

Parece ser que *A. subulata* presenta mayor cantidad de mucílago, el cual se adhiere al ADN y actúa como inhibidor de PCR. A pesar de las modificaciones realizadas a las metodologías ensayadas en este estudio, principalmente respecto a componentes del buffer lisis y utilización de diferentes procesos de precipitación, se observó presencia de sales catiónicas en el ADN las cuales disminuyeron la calidad del mismo e inhibieron la amplificación de los genes de interés.

En este estudio, aunque se combinaron protocolos de extracción usando kit con pasos de purificación adicionales, aumentaron los valores de las relaciones 260/280 y 260/230, pero no

se alcanzó a tener relaciones entre los rangos sugeridos por Sambrook et al. (1982). Mientras que Raimundo et al. (2018), usaron un protocolo en el cual combinaron lisis con CTAB y SDS y DNeasy® plant mini kit, obteniendo relaciones de absorbancia 260/280 de 1.91 y 2.01 para *O. ficus indica* y *O. dillenii*, respectivamente, plantas con contenido de mucílago variable.

La adaptación del protocolo modificando el proceso de precipitación y el buffer de lisis, permitió superar los problemas relacionados con la contaminación del ADN, tanto la formación de complejos insolubles del ADN con polisacáridos (De la Cruz et al., 1997; Guillemaut & Maréchal-Drouard, 1992), como con sales catiónicas de las tres especies en estudio, particularmente con *A. subulata*.

4. Conclusiones

Los valores por debajo de 1.8 en la relación de absorbancia A260/230 inhibieron la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa, indicando presencia de impurezas como fenoles, hidratos de carbono y sales.

En la extracción del ADN de los taxones de cactáceas generalmente se usa el protocolo de CTAB en Cactoideae, Echinopsis, Lobivia y Trichocereus, pero este presenta problemas al utilizarse con los géneros de la subfamilia Opuntioideae, los cuales presentan especies poliploides y variaciones en el contenido de ceras, fibras y mucílago.

Un protocolo de extracción modificado permitió obtener ADN de buena calidad, a partir del cual se amplificaron las regiones rpl16 y trnL-trnF de cloroplasto de *A. subulata*, *O. dillenii* y *O. ficus indica*, el cual se puede aplicar en estudios con recursos limitados, al ser de bajo costo. Este es el primer protocolo de extracción efectivo para obtener ADN de la especie *A. subulata*.

Agradecimientos

Agradecemos al Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías

administrado por Minciencias, Colombia BIO y la Gobernación de Boyacá por la financiación y al Dr. Diego E. Garzón por su asesoría en el sometimiento de secuencias en GenBank.

Referencias

- Abraján, V. M. A. (2008). *Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (Opuntia ficus-indica) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible*. Universidad Politécnica de Valencia. <https://doi.org/10.4995/THESIS/10251/3794>
- Abraján, V. P. M. (2007). *Evaluación de tres métodos de secado para la extracción y recuperación del gel de tuna (Opuntia subulata)* (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Albesiano, S., & Terrazas, T. (2012). Cladistic analysis of *Trichocereus* (Cactacea: Cactoideae: Trichocereaceae) based on morphological data and chloroplast DNA sequences. *Haseltonia*, 17, 3-23. <https://doi.org/10.2985/1070-0048-17.1.2>
- Barbosa, F. dos A., Barbosa, A. da S., Medeiros, G. D. A., Andrade, A. P. de, Rêgo M. M. do, Silva, J. H. C. S. (2020). Genetic variability in populations of *Pilosocereus catingicola* (Gürke) Byles & Rowley subsp. *salvadorensis* (Werderm.) Zappi (Cactaceae). *Research, Society and Development*, 9 (8), 1–23. <http://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5521>
- Cardeño-Londoño, E., & Rodríguez-Herrera, M. P. (2020). *Biología reproductiva de tres especies vulnerables Mammillaria columbiana, Opuntia pittieri y Opuntia ficus-indica Cactaceae en Boyacá, Colombia* (Tesis de grado). Universidad de la Salle, Colombia. <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/82/>
- Cota-Sánchez, J. H., Remarchuk, K., & Ubayasena, K. (2006). Ready to use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 161–167. <https://doi.org/10.1007/BF02914055>
- De la Cruz, M., Ramirez, F., & Hernández, H. (1997). DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15, 319–325. <https://doi.org/10.1023/A:1007428818078>
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular*

- Biology Reporter*, 1, 19–21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Dennis, E. S., Ellis, J., Green, A., Llewellyn, D., Morell, M., Tabe, L., & Peacock, P. W. (2007). Genetic contributions to agricultural sustainability. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 363, 591–609. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2172>
- Díaz, C. B., Gómez, F. R. L., Rosas-Espinoza, V. C., Pérez, V. L. I., & Castro-Félix, P. (2006). Obtención de ADN de cactáceas: comparación de dos métodos de extracción en *Ferocactus histrix*. *Avances en la Investigación Científica en el Cuba*, 19, 123–130.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Madison)*, 12, 13–15.
- Falcón, L. I., & Valera, A. (2007). Extracción de ácidos nucleicos. En L. E. Eguarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds). *Ecología Molecular* (pp. 499–515). Instituto Nacional de Ecología, Conabio, México.
- Fehlberg, S. D., Allen, J. M., & Church, K. (2013). A novel method of genomic DNA extraction for Cactaceae. *Applications in Plant Sciences*, 1(3), 1–4. <https://doi.org/10.3732/apps.1200013>
- Guillemaut, P., & Maréchal-Drouard, L. (1992). Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10, 60–65. <https://doi.org/10.1007/BF02669265>
- Guzmán, L. D., & Chávez, J. (2007). Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(1), 41–45.
- Haymes, K. M. (1996). Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14, 280–284. <https://doi.org/10.1007/BF02671664>
- Hoisington, D., Khairallah, M., Reeves, T., Ribaut, J. M., Skovmand, B., Taba, S., & Warburton, M. (1999). Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5937–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5937>
- Kalegowda, P., Chauhan, A. S., & Mysore, N. S. (2017). *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw cladode mucilage: Physico-chemical, rheological and functional behavior. *Carbohydrate Polymers*, 157(10), 1057–1064. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.070>
- Keb-Llanes, M., Gonzalez, G., Chi-Manzanero, B., & Infante, D. (2002). A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 299a–299e. <https://doi.org/10.1007/BF02782465>
- Lorenzo, F. D., Silipo, A., Molinaro, A., Parrilli, M., Schiraldi, C., D'Agostino, A., Izzo, E., Rizza, L., Bonina, A., Bonina, F., & Lanzetta, R. (2017). The polysaccharide and low molecular weight components of *Opuntia ficus indica* cladodes: structure and skin repairing properties. *Carbohydrate Polymers*, 157, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.073>
- Martínez-González, C. R., Ramírez-Mendoza, R., Jiménez-Ramírez, J., Gallegos-Vázquez, C., & Luna-Vega, I. (2017). Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods*, 13(82). <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0234-y>
- Mihalte, L. A., Sestras, R., & Feszt, G. (2008). Assessing genetic variability at different genotypes of cacti plants by means of RAPD analysis. *Bull. University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Cluj-Napoca. Horticulture*, 65(1), 110–115. <http://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:471>
- Mondragon-Jacobo, C., & Bordelon, B. B. (1996). Cactus pear (*Opuntia* spp. Cactaceae) breeding for fruit production. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 1, 19–35.
- Mondragón-Jacobo, C., Doudareva, N., & Bordelon, B. P. (2000). DNA extraction from several cacti. *Horticultural Science*, 35(6), 1124–1126. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.6.1124>
- Nobel, P. S., & Cavelier, J. (1992). Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *Journal of Experimental Botany*, 43, 641–648. <http://www.jstor.org/stable/23694093>
- Pandey, R. N., Adams, R. P., & Flournoy, L. E. (1996). Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14, 17–22. <https://doi.org/10.1007/BF02671898>
- Paz-Guerrero, F., Casas, A., & Alvarado-Sizzo, H. (2019). Habitat fragmentation and population genetics of *Stenocereus quevedonis* (Cacta-

- ceae) in Michoacán, México: bases for in situ conservation of silvicultural managed genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(3), 633–643. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-00737-7>.
- Pérez, M. L., Tejera, F. F., Darías, M. J., Rodríguez, R. E. M., & Díaz, R. C. (2015). Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica*. *Food Chemistry*, 188(1), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.011>
- Phillips, M. W., Astorga, D. C., & Quirós, S. O. (2003). Método 2X CTAB-minipreparaciones. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
- Porras-Flores, D., Albesiano, S., & Arrieva-Violet, L. (2017). El género *Opuntia* (Opuntioideae-Cactaceae) en el departamento de Santander, Colombia. *Biota Colombiana*, 18(2), 111-131. <https://doi.org/10.21068/c2017.v18n02a07>
- Qiu, Y. K., Zhao, Y. Y., Dou, D. Q., Xu, B. X., & Liu, K. (2007). Two New alpha-pyrone and other components from the cladodes of *Opuntia dillenii*. *Archives of Pharmacal Research*, 30 (6), 665–669. <https://doi.org/10.1007/BF02977624>
- Rache-Cardenal, L. Y., Mora-Oberlaender, J., & Chaparro-Giraldo, A. (2013). Study of gene flow from GM cotton (*Gossypium hirsutum*) varieties in 'El Espinal' (Tolima, Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 18 (3), 489–498.
- Raimundo, J., Gaspar, R. C. M., & Ribeiro, M. M. (2018). Rapid, simple and potentially universal method for DNA extraction from *Opuntia* spp. fresh cladode tissues suitable for PCR amplification. *Molecular Biology Reports*, 45 (5), 1405–1412. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4303-8>
- Realini, M. F., González, G. E., Font, F., Picca, P. I., Poggio, L., & Gottlieb, A. M. (2015). Phylogenetic relationships in *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae) from southern South America. *Plant Systematics and Evolution*, 301(4), 1123–1134. <http://doi.org/10.1007/s00606-014-1154-1>
- Rodríguez-Mendoza, C., Hernández, L., Pérez-Armendáriz, B., & Juárez, Z. (2021). Bacterias y hongos endófitos de la familia Cactaceae y sus aplicaciones. TIP. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24, 1-14. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.328>
- Rosas-Reinhold, I., Sánchez, D., & Arias, S. (2022). Systematic study and niche differentiation of the genus *Aporocactus* (Hylocereae, Cactoideae, Cactaceae). *Botanical Sciences*, 1(1). <http://doi.org/10.17129/botsoci.2893>
- Rowland, L. J., & Nguyen, B. (1993). Use of polyethylene glycol for purification of DNA from leaf tissue of woody plants. *Biotechniques*, 14 (5), 734–736.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. [http://doi.org/10.1016/0307-4412\(83\)90068-7](http://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90068-7)
- Sánchez-Hernández, C., & Gaytán-Oyarzún, J. C. (2006). Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites. *African Journal of Biotechnology*, 5(20), 1864–1867.
- Sánchez-Olaya, D. M., Rodríguez-Perez, W., Castro-Rojas, D. F., & Trujillo-Trujillo, E. (2019). Respuesta agronómica de mucilago de cacao (*Theobroma cacao* L.) en cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Ciencia en Desarrollo*, 10 (2), 43–58. <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.7958>
- Shedbalkar, U. U., Adki, V. S., Jadhav, J. P., & Bapat V. A. (2010). *Opuntia* and other cacti: applications and biotechnological insights. *Tropical Plant Biology*, 3, 136–150. <https://doi.org/10.1007/s12042-010-9055-0>
- Sue-Porebski, Grant-Bailey, L., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15, 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Wang, X. N., Felker, P., Burow, M. D., & Paterson, A. H. (1998). Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 3: 3–14.
- Yáñez-López, M. de L., Barbosa-Martínez, C., Serrato-Díaz, A., Balderas-Morales, A., Campos-Muñiz, C., Fernández, F. J., & Armella-Villalpando, M. A. (2016). Genetic relationships between varieties of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the states of Puebla and Oaxaca, Mexico, by means of AFLP markers. *Agrociencia*, 50 (5), 595–601.