

Extracción de ADN total de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* L., con el método CTAB

Extraction of total DNA from wild forms of *Phaseolus vulgaris* L., with
the CTAB method

Liliana Wallander Compeán^{*1,2}, Norma Almaraz Abarca¹, José Antonio Ávila Reyes¹, Erika Berenice León Espinosa²

¹ Instituto Politécnico Nacional CIIDIR Unidad Durango, Av. Sigma 119, Fraccionamiento 20 de noviembre II, Durango, Durango. C.P.34220.

² Tecnológico de Estudios Superiores de San Felipe del Progreso, Av. Instituto Tecnológico s/n Ejido de San Felipe, Edo. De México. C.P. 50640

*Correspondencia: lwallanderc@ipn.mx (Liliana Wallander Compeán)

DOI:

Recibido: 05 de octubre de 2023; Aceptado: 21 de febrero de 2024

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Editor de Sección: Dr. Guillermo Fuentes-Dávila

Resumen

Uno de los principales objetivos de la extracción de ADN es obtener material con alta pureza y en cantidad suficiente. Se han reportado métodos para aislar ADN total a partir de tejido foliar de *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, la alta variabilidad genética, la cual se manifiesta en diferentes capacidades de acumulación de carbohidratos y compuestos fenólicos, dificulta los procesos de extracción de ADN. En el presente estudio se evaluó la eficiencia de extracción de ADN foliar de dos métodos basados en el uso de CTAB. Se usaron dos métodos: método 1, el cual incluyó el uso de Proteinasa K y RNAsa y el método 2, sin las enzimas. El método 1, permitió obtener entre 115.55 y 1138.23 ng/ μ L de ADN, en cambio el método 2, permitió obtener mayor cantidad de ADN, entre 354.90 y 2513.10 ng/ μ L. La amplificación por PCR de marcadores ISTR generó bandas mejor resueltas en las muestras de ADN obtenidas con el método 2 que con el método 1. El método 2 es efectivo y económico para obtener ADN en cantidad y calidad adecuadas de genotipos silvestres de *P. vulgaris*, que puede ser usado en estudios moleculares.

Palabras clave: proteinasa K, frijol común silvestre, enzimas, ADN, pureza.

Abstract

One of the main objectives of DNA extraction is to obtain material with high purity and in sufficient

quantity. Methods to isolate total DNA from leaf tissue of *Phaseolus vulgaris* have been reported. However, the high genetic variability, which manifests itself in different carbohydrate and phenolic compound accumulation capacities, makes DNA extraction processes difficult. In the present study, the leaf DNA extraction efficiency of two methods based on the use of CTAB was evaluated. Two methods were used: method 1, which included the use of Proteinase K and RNAsa, and method 2, without the enzymes. Method 1 yielded between 115.55 and 1138.23 ng/ μ L of DNA, whereas method 2 yielded more DNA, between 354.90 and 2513.10 ng/ μ L. PCR amplification of ISTR markers generated better resolved bands in the DNA samples obtained with method 2 than with method 1. Method 2 is effective and economical for obtaining DNA in adequate quantity and quality from wild genotypes of *P. vulgaris*, which can be used in molecular studies.

Keywords: proteinase K, wild common bean, enzymes, DNA, purity.

1. Introducción

El género *Phaseolus* es originario del Continente Americano, comprende alrededor de 70 especies (Saburido y Herrera, 2015; Freytag y Debouck, 2002), de las cuales 50 se encuentran en México (Pech, 2020). Actualmente cinco especies han sido domesticadas y se cultivan en mayor o menor grado en todo el mundo, estas son *Phaseolus vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray, y *P. polyanthus* Greenman (Mateo, 2016). La especie más importante del género, en términos económicos, alimenticios, agronómicos, y sociales es el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (CEDRSSA, 2019). En este sentido, en México, el frijol común se encuentra distribuido desde el norte del estado de Chihuahua hasta el sur del estado de Chiapas, a lo largo de la sierra madre Occidental y en el Eje Neovolcánico del centro de México (Saburido y Herrera, 2015; Freytag y Debouck, 2002).

En el centro-norte de México, en el estado de Durango, crecen poblaciones silvestres de *P. vulgaris* en condiciones semiáridas, de menos de 35 mm de precipitación anual y altitudes de 2200 m (Wallander *et al.*, 2022). Estas condiciones contrastan con las que predominan en el sur del estado de Chiapas, donde la precipitación anual alcanza hasta 2000 mm a altitudes de 800 msnm, en donde también se encuentran poblaciones silvestres de frijol común (Freytag y Debouck, 2002; Debouck, 2020). Esta capacidad de crecer bajo condiciones ambientales tan variables sugiere que *P. vulgaris* tiene una capacidad biológica sobresaliente sustentada en una importante variabilidad genética (Ríos *et al.*, 2014; Curay, 2019). No obstante, para este tipo de estudios (variabilidad genética) el aislamiento de ADN se debe realizar mediante un protocolo que permita obtenerlo en cantidades suficientes y con alta pureza. Diversos laboratorios han estandarizado sus propios métodos de extracción según la especie a estudiar, así mismo, algunos otros emplean kits comerciales que garantizan el aislamiento de ADN a partir de una amplia gama de especies. Sin embargo, el costo es elevado y no siempre se obtiene la cantidad y la calidad adecuadas. Los diferentes métodos que existen para aislar ADN total de especies vegetales, utilizan el cloroformo y el etanol como solventes orgánicos y después se purifica el ADN presentando la desventaja de ser complicados y su realización requiere periodos largos de tiempo (Reyes, 2014).

Actualmente, se usa el detergente catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como componente de los reguladores de extracción de ADN en sustitución del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) por medio del cual Shagai *et al.* (1984) amplificaron y redujeron el tiempo empleado para aislar ADN de especies vegetales. El CTAB precipita los ácidos nucleicos en presencia de

concentraciones bajas de cloruro de sodio, reduciendo la precipitación de polisacáridos y proteínas contaminantes (Shagai *et al.*, 1984; Reyes *et al.*, 2011).

Se han reportado métodos para aislar ADN total a partir de tejido foliar de *P. vulgaris* de algunas variedades (Miranda *et al.*, 2006; Castellanos *et al.*, 2017) y formas silvestres (López *et al.*, 2010; Wallander *et al.*, 2022). Sin embargo, dada la alta variabilidad genética reportada para esta especie (Castellanos *et al.*, 2017), que se puede manifestar en diferentes capacidades de acumulación de carbohidratos y compuestos fenólicos en los tejidos, los cuales dificultan los procesos de extracción de ADN (Rojas *et al.*, 2014; Aboul y Oraby, 2019), es importante evaluar la eficiencia de esos métodos para diferentes genotipos de *P. vulgaris*. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de extracción de ADN foliar de dos métodos basados en el uso de CTAB, en 10 formas silvestres de *P. vulgaris*.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Las semillas de diez formas silvestres del estado de Durango, México, se recolectaron de siete municipios en el año 2017. Diez semillas de cada forma silvestre obtenidas de diferentes municipios del estado de Durango (Fig. 1) se germinaron, posteriormente se recolectó de manera individual el material foliar de las plántulas de entre 20 y 35 días posteriores a la germinación para extraer el ADN por el método de CTAB descrito por Coelho *et al.* (2009).

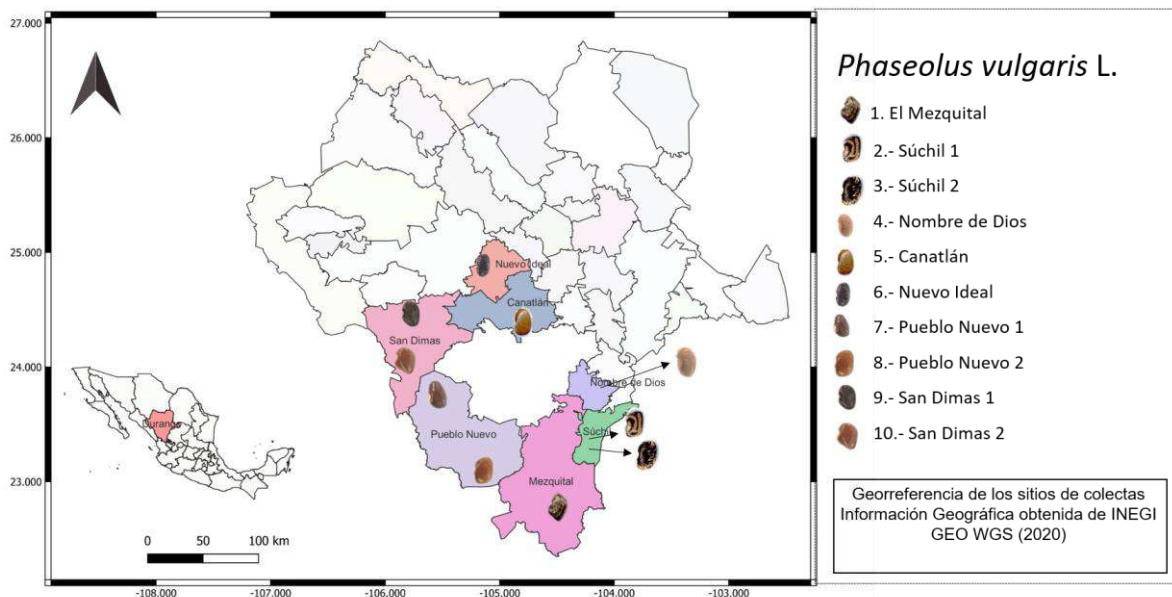


Figura 1. Mapa de los municipios donde se colectaron las semillas de las formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* de Durango, México, analizadas en el presente estudio.

Figure 1. Map of the municipalities where the seeds of the wild forms of *Phaseolus vulgaris* from Durango, Mexico, were analyzed in the present study.

2.2 Métodos

2.2 Extracción de ADN

La extracción del material genético se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Coelho *et al.* (2009).

2.2.1 Método 1: agregando Proteinasa K y RNAsa

El ADN total se extrajo a partir de 100 mg de tejido foliar. Se prescindió del primer paso del protocolo de Coelho *et al.* (2009), que era la pulverización del tejido foliar con nitrógeno líquido. Los tejidos se homogeneizaron en 800 μ L de regulador de extracción [CTAB al 2 %, NaCl 1.4 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol al 2 %, y polyvinylpyrrolidone (PVP peso molecular 40 000) al 3 %]. Después, se agregaron 2 μ L de Proteinasa K, y las muestras se incubaron a 37 °C por 30 min. Posteriormente, las muestras se incubaron a 65 °C durante 60 minutos. Después, las muestras se combinaron con 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitaron y se centrifugaron (10 000 rpm durante 10 min, a temperatura ambiente). El sobrenadante, fase acuosa conteniendo el ADN disuelto, se recuperó y se volvió a fraccionar con cloroformo: alcohol isoamílico. La fase acuosa resultante se recuperó y combinó con 500 μ L de isopropanol frío y se incubó durante 30 min a -20 °C para precipitar el ADN. Se centrifugó (10 000 rpm durante 10 min), se descartó el sobrenadante, la pastilla conteniendo el ADN se resuspendió en 300 μ L de TE (Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA-Na 1.0 mM), y se agregaron 150 μ L de NaCl 5.0 M. Después, se adicionaron 900 μ L de etanol absoluto frío. Después de incubar a -20 °C durante 30 minutos, las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 μ L de etanol al 75 %. Se repitió el último paso de lavado con etanol al 75 %. Estos dos lavados con etanol fueron adicionales al protocolo original de Coelho *et al.* (2009). Después de centrifugar (10 000 rpm durante 10 min), el sobrenadante se descartó, la pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente, y se resuspendió en 50 μ L de TE y 2 μ L de RNAsa.

2.2.2 Método 2: sin agregar Proteinasa K y RNAsa

En este protocolo se eliminó del método original de Coelho *et al.* (2009) el paso de agregar los 2 μ L de Proteinasa K después de agregar el buffer de extracción. Además, se eliminó el último paso donde se agrega la RNAsa, al final, después de centrifugar en el último lavado, el sobrenadante se descartó, la pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente, y se resuspendió en 50 μ L de TE. Los efectos de la Proteinasa K ayuda a digerir proteínas y eliminar contaminantes que pueden degradar el ADN y el ARN durante la purificación, y la enzima RNAsa permite que el ADN extraído quede limpio de ARN, lo que hace es catalizar la degradación del RNA en componentes más pequeños (Fernández, 2023).

2.2.3 Cuantificación, pureza y evaluación del tamaño molecular y de la integridad del ADN obtenido

La cuantificación de ADN obtenido se realizó de manera espectrofotométrica. Se tomaron 2 μL de cada solución individual de ADN. Se registraron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm, con los cuales se estimó la cantidad de ADN presente en cada muestra (Chan *et al.*, 1992). La pureza del ADN obtenido para cada muestra se evaluó con métodos espectrométricos de acuerdo a Sambrook *et al.* (2001). Se registraron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm y se calcularon los valores de la relación A_{260}/A_{280} . Valores de esas proporciones iguales o mayores de 1.7 indicaron que el ADN se encontraba lo suficientemente libre de proteínas para poder ser amplificado por PCR. La evaluación del tamaño molecular y de la integridad de las muestras de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa (0.8 %), de acuerdo con Andrews (1994). La electroforesis se desarrolló a 70 volts. Los geles se tiñeron con Syber Green.

2.2.4 Amplificación del ADN obtenido por PCR

Para determinar que las muestras de ADN obtenido podían ser amplificadas, se utilizó un par de iniciadores de marcadores ISTR (Inverse Sequence Tagged Repeat, por sus siglas en inglés, en español "Secuencias Inversas, Etiquetadas y Repetidas) (De Jesús *et al.*, 2011). La amplificación de loci ISTR se realizó de acuerdo con el método de Osorio *et al.* (2006), con los iniciadores F9 (TTACCTCCTCCATCTCGT) y B8 (ATACCTTTCAGGGGGATG). Para cada muestra individual se preparó una mezcla de reacción conteniendo los iniciadores F9 y B8 a 10 mM, 3 μL de regulador de la enzima Taq polimerasa, 1.2 μL de una solución de MgCl_2 50 mM, 0.5 μL de la mezcla de nucleótidos 10 mM, 0.3 μL de Taq polimerasa 1U, ADN molde a 25 nM, y agua para ajustar el volumen de reacción a 20 μL . Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 min; 40 ciclos, comprendiendo un paso de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, uno de alineación a 45 °C durante 1 min, y uno de extensión a 72 °C durante 2 min; finalizando con 10 min a 72 °C. Las bandas amplificadas se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 5 %.

2.3 Diseño experimental y análisis de datos

Los datos se sometieron a análisis de varianza y prueba de discriminación de medias de Tukey ($P < 0.05$), se calcularon coeficientes de variación (Gutiérrez 1996), para determinar la contribución de la diferenciación entre poblaciones silvestres de frijol común a la concentración y pureza del ADN, se sometieron a la prueba de análisis de componentes principales (PCA) utilizando el programa XLSTAT versión 2021 2.2 (Addison, 2024).

3. Resultados y discusión

3.1 Extracción de ADN

Los valores de A_{260} , A_{280} y $A_{260/280}$ aislado de cada una de las 10 formas silvestres de frijol común con cada uno de los dos métodos evaluados se muestran en la Tabla 1. Se ha reportado que valores de la relación A_{260}/A_{280} mayores o iguales a 1.7 representan muestras de ADN con pureza adecuada (Reyes *et al.*, 2011; Guzmán *et al.*, 2018), las cuales se pueden utilizar en la mayoría de las técnicas moleculares. De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 1), el 40 % de las muestras de ADN extraídas con el método 1 cumplió con esa consideración de pureza, mientras que el 100 % de las muestras obtenidas con el método 2 alcanzaron el valor de pureza señalado. Sin embargo, todas las muestras obtenidas con los dos métodos evaluados pudieron ser amplificadas con los iniciadores de ISTR usados, como se mostrará más adelante. Los resultados del presente estudio sugieren que los requerimientos de pureza de muestras de ADN podrían en realidad ser más amplios. Los valores de pureza de los ADN de las 10 formas silvestres, obtenidos con el método 2 fueron más altos que el valor de pureza reportado por Reyes *et al.* (2011) para *P. vulgaris* cultivado ($A_{260}/A_{280} = 1.65$).

Tabla 1. Valores promedios ($n=10 \pm$ desviación estándar?) de A_{260} , A_{280} , $A_{260/280}$ de 10 formas silvestres de *Phaseolus vulgaris*, obtenido con dos métodos de extracción modificados del de Coelho *et al.* (2009).

Table 1. Average values of A_{260} , A_{280} , $A_{260/280}$ of 10 wild forms of *Phaseolus vulgaris*, obtained with two extraction methods modified from that of Coelho *et al.* (2009).

Forma Silvestre	Abs ₂₆₀	Abs ₂₈₀	Abs _{260/280}
Método 1			
El Mezquital	0.73 ± 0.14 bcde	0.37 ± 0.07 bcd	1.98 ± 0.03 ab
Súchil 1	0.82 ± 0.50 bcde	0.44 ± 0.24 bcd	1.91 ± 0.09 ab
Súchil 2	1.13 ± 0.63 bcd	0.58 ± 0.28 abc	1.85 ± 0.26 ab
Nombre de Dios	0.81 ± 0.52 bcde	0.43 ± 0.24 bcd	1.78 ± 0.25 b
Canatlán	0.43 ± 0.37 cde	0.29 ± 0.25 bcd	1.49 ± 0.02 c
Nuevo Ideal	0.40 ± 0.29 cde	0.28 ± 0.21 bcd	1.43 ± 0.06 c
Pueblo Nuevo 1	0.53 ± 0.37 cde	0.36 ± 0.25 bcd	1.49 ± 0.07 c
Pueblo Nuevo 2	0.18 ± 0.11 e	0.12 ± 0.07 cd	1.46 ± 0.12 c
San Dimas 1	0.11 ± 0.06 e	0.07 ± 0.03 d	1.44 ± 0.19 c
San Dimas 2	0.19 ± 0.08 de	0.12 ± 0.05 cd	1.56 ± 0.09 c
Método 2			
Súchil 1	0.88 ± 0.28 bcde	0.46 ± 0.13 bcd	1.90 ± 0.13 ab
Súchil 2	2.02 ± 0.36 a	0.99 ± 0.17 a	2.03 ± 0.02 a

Nombre de Dios	1.03 ± 0.26 bcd	0.55 ± 0.68 bc	1.86 ± 0.06 ab
Canatlán	1.56 ± 0.88 ab	0.77 ± 0.43 ab	2.02 ± 0.03 a
Nuevo Ideal	1.07 ± 0.31 bcd	0.54 ± 0.14 bc	1.97 ± 0.09 ab
Pueblo Nuevo 1	0.77 ± 0.24bcde	0.39 ± 0.11 bcd	1.94 ± 0.09 ab
Pueblo Nuevo 2	0.57 ± 0.24 cde	0.29 ± 0.12 bcd	1.91 ± 0.05 ab
San Dimas 1	0.29 ± 0.21 de	0.16 ± 0.11 cd	1.77 ± 0.16 b
San Dimas 2	1.04 ± 0.25 bcd	0.54 ± 0.14 bc	1.90 ± 0.08 ab
Súchil 1	1.28 ± 0.60 abc	0.65 ± 0.30 ab	1.94 ± 0.02 ab

Media ± desviación estándar, n= 10, por cada forma silvestre. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las poblaciones $P < 0.05$ (prueba de Tukey).

3.1.1 Cuantificación del ADN obtenido

En la Fig. 2 se presentan las diferencias significativas en la concentración de ADN obtenido para cada una de las 10 formas silvestres de frijol común con los dos métodos evaluados. Se observa que el método 2 permitió obtener entre 185.90 ng/ μ L para la forma silvestre de Pueblo Nuevo 2, y 2513.10 ng/ μ L para la forma de Súchil 1, mientras que el método 1 permitió obtener entre 130.10 ng/ μ L para la población San Dimas 1, y 1502.40 ng/ μ L para la forma Súchil 2. La cantidad obtenida de ADN fue muy variable entre las formas silvestres, lo cual se puede deber a los diferentes contenidos de compuestos fenólicos que cada una de ellas acumula, como fue corroborado por (Wallander *et al.* 2022). Sin embargo, el método 2 permitió obtener mayores concentraciones de ADN que el método 1 en el 70 % de las muestras.

Se ha reportado que las cantidades de ADN requeridas para llevar a cabo estudios moleculares varían entre 20 y 50 ng/ μ L (Mellado, 2020). Como se observa en la Fig. 2, las cantidades obtenidas con ambos métodos para las 10 formas silvestres fueron mayores que esos valores.

El protocolo de extracción 2 permitió obtener cantidades mayores de ADN que el método 1 (Fig. 2), y esos ADN tuvieron una pureza también mayor que los obtenidos con el método 1 (Tabla 1). El método de CTAB de Coelho *et al.* (2009) fue utilizado para obtener ADN de *Phaseolus vulgaris* cultivado por Reyes *et al.* (2011); estos autores obtuvieron una cantidad de ADN superior a cualquiera de las obtenidas en el presente trabajo (3996.249 ng/ μ L).

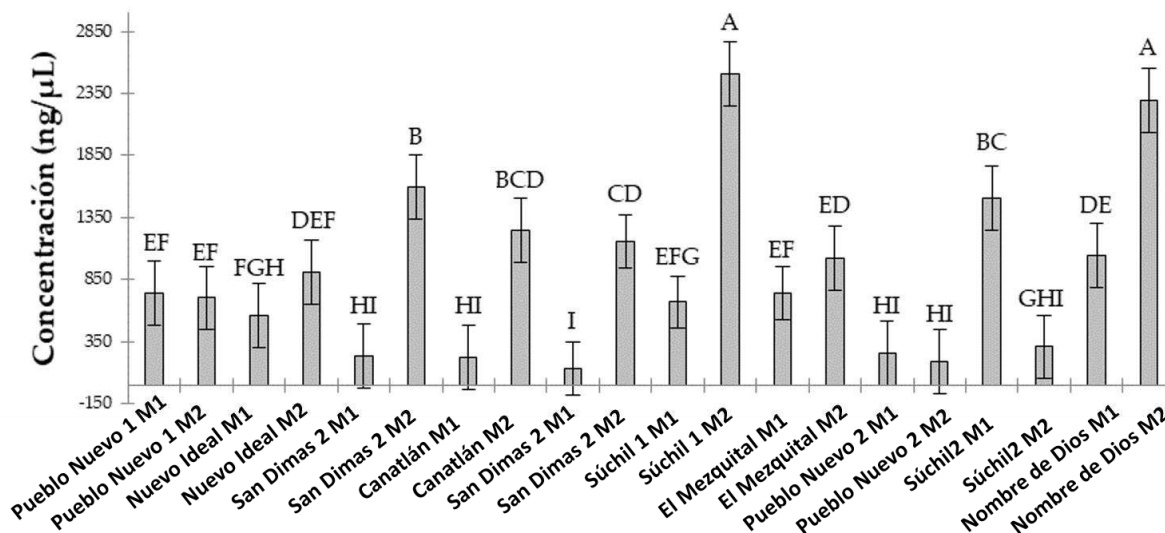


Figura 2. Concentración de ADN obtenido de tejido foliar de 10 formas silvestres de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) de Durango, México. M1: método; agregando Proteinasa K y RNAsa. M2: método sin agregar enzimas. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las poblaciones $P < 0.05$ (prueba de Tukey), las barras de error son \pm DS.

Figure 2. Concentration of DNA obtained from leaf tissue of 10 wild forms of common bean (*Phaseolus vulgaris*) from Durango, Mexico. M1: method; adding Proteinase K and RNase. M2: method without adding enzymes. Different letters indicate significant differences between populations $P < 0.05$ (Tukey's test), error bars are \pm SD.

3.1.2 Coeficiente de variación

El coeficiente de variación más bajo en la eficiencia de extracción entre formas silvestres de frijol común fue en el método 1 (Tabla 2); para concentración Súcil 2 (1.24 %) y San Dimas 2 (9.08 %), y para pureza Canatlán (0.48 %) y Súcil 2 (1.43 %), en el método 2; para concentración Súcil 1 (4.18 %), Súcil 2 (6.57 %) y San Dimas 1 (9.73 %) y Nuevo Ideal (4.85 %), y para pureza para San Dimas 2 (0.82 %), Súcil 1 (1.07 %), Nombre de Dios (2.25 %), Pueblo Nuevo 1 (2.23 %), Súcil 2 (4.04 %), Nuevo Ideal (4.25 %). De los métodos probados, recomendamos utilizar el método 2. Estos resultados son ampliamente aplicables para estudios de laboratorio en ISTR. Las recomendaciones también se pueden utilizar para informar la elección de la metodología para los estudios de campo.

Tabla 2. Coeficiente de variación (CV, %) de la concentración y pureza del ADN
Table 2. Coefficient of variation (CV, %) of the concentration and purity of DNA

Forma silvestre	Concentración (ng/ μ L)	Pureza A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Método 1		
El Mezquital	18.70	1.39
Súchil 1	34.36	3.88
Súchil 2	1.24	1.43
Nombre de Dios	63.35	3.38
Canatlán	14.29	0.48
Nuevo Ideal	21.71	6.09
Pueblo Nuevo 1	13.30	5.94
Pueblo Nuevo 2	10.88	2.74
San Dimas 1	38.58	4.31
San Dimas 2	9.08	7.11
Método 2		
El Mezquital	14.02	8.87
Súchil 1	4.18	1.07
Súchil 2	6.57	4.04
Nombre de Dios	13.41	2.25
Canatlán	14.16	5.80
Nuevo Ideal	4.85	4.25
Pueblo Nuevo 1	23.51	2.23
Pueblo Nuevo 2	20.51	11.27
San Dimas 1	9.73	4.45
San Dimas 2	22.93	0.82

N= 10, Coeficiente de variación (Ángel, 1996)

3.2 Evaluación del tamaño molecular y de la integridad del ADN obtenido

La integridad de ADN se visualizó en geles de agarosa al 0.8 %. Los resultados mostrados en la Fig. 3 indican que una mayor degradación del ADN se produjo con el método 2, como lo indicó la presencia de un fondo fluorescente a lo largo de los carriles, en las muestras de ADN obtenidas con ese método. Los resultados de la Fig. 3 también indican que los dos protocolos de aislamiento evaluados permitieron obtener ADN de alto peso molecular a partir de tejido foliar de frijol común silvestre.

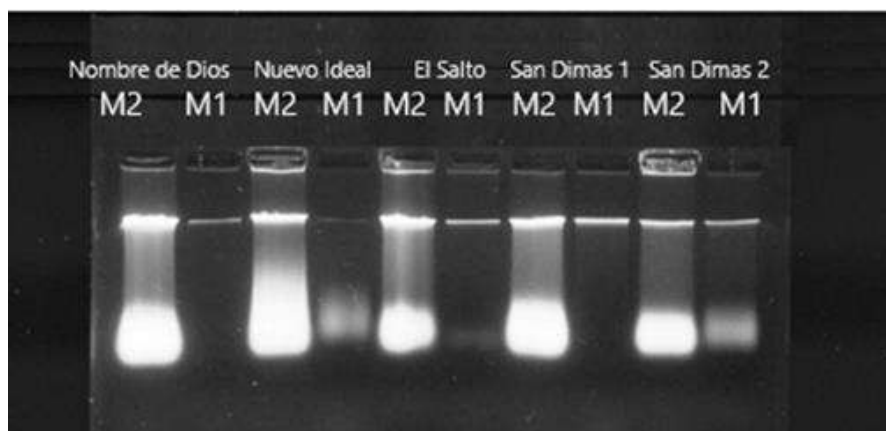


Figura 3. Integridad del ADN de cinco formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* obtenido con los dos métodos evaluados. M1: método 1, M2: método 2. (Descrito en materiales y métodos).

Figure 3. DNA integrity of five wild forms of *Phaseolus vulgaris* obtained with the two methods evaluated. M1: method 1, M2: method 2. (Described in materials and methods)

3.3 Amplificación del ADN obtenido por PCR

En la Fig. 4 se muestran, los resultados de la separación electroforética en geles de acrilamida al 6 % de la amplificación de marcadores ISTR, revelados por la combinación de iniciadores F9/B8, de la forma silvestre de El Mezquital. Se observa que los ADN obtenidos con el método 2 generaron perfiles de amplificación formados por un mayor número de bandas, las cuales estuvieron mejor definidas que con el método 1. Las bandas representaron secuencias ISTR de alrededor de 1000 y 1500 pb. Estos resultados sugieren que valores de pureza de ADN menores de 1.7 pueden ser amplificados con los iniciadores de marcadores ISTR.

El método 2, modificado del de Coelho *et al.* (2009), simplifica a este último en términos de uso de reactivos y en pasos durante el desarrollo, por tanto, tiene un menor costo y tiempo. El método 2, que prescinde de la adición de enzimas puede ser usado para estudios de variabilidad genética de formas silvestres de frijol común, empleando marcadores ISTR.

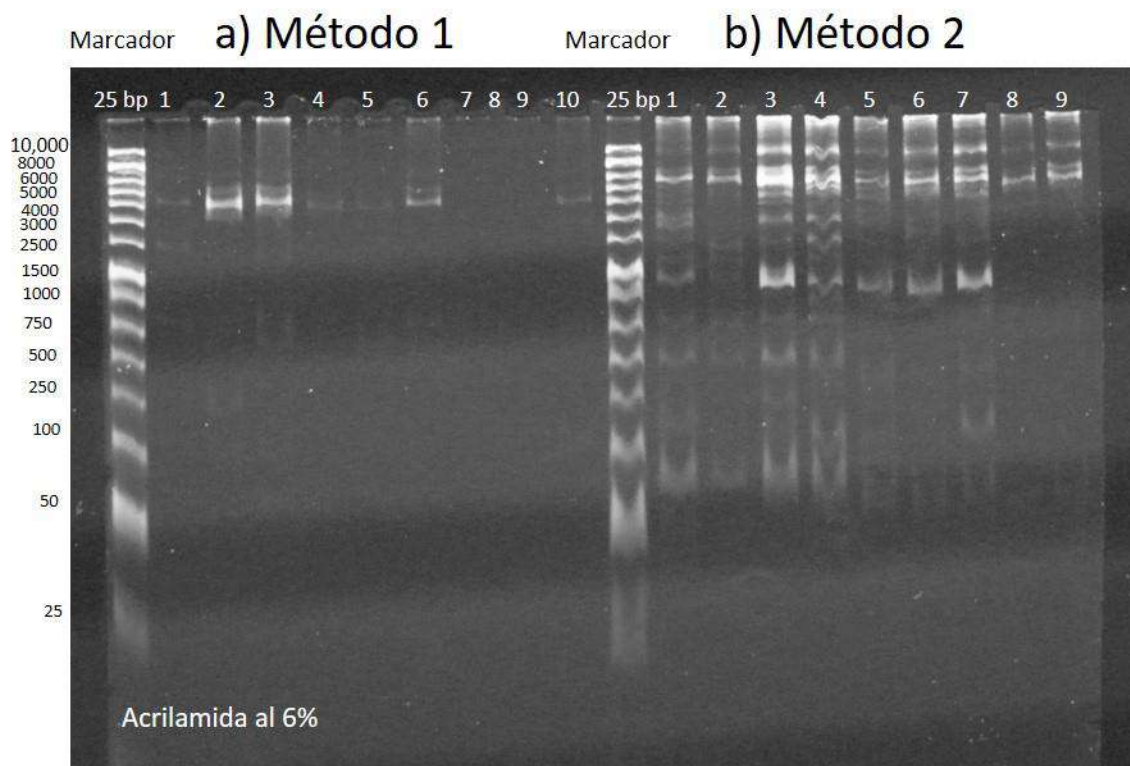


Figura 4. Amplificación de los iniciadores F9/B8 de marcadores ISTR del ADN obtenido con los dos métodos evaluados, de nueve individuos de la forma silvestre de El Mezquital de *Phaseolus vulgaris*. A) Método 1. Carril 1: marcador de tamaño molecular de 25pb. Carriles 1 a 10: individuos de la población El Mezquital y B) Método 2. Carril 1: marcador de tamaño molecular 25pb. Carriles de 2 a 9: individuos de la población, de El Mezquital.

Figure 4. Amplification of the F9/B8 primers of ISTR markers from the DNA obtained with the two methods evaluated, from nine individuals of the wild form of *Phaseolus vulgaris* from El Mezquital. A) Method 1. Lane 1: 25pb molecular size marker. Lanes 1 to 10: individuals from the population, from El Mezquital and B) Method 2. Lane 1: 25pb molecular size marker. Lanes 1 to 9: individuals from the population, from El Mezquital

3.4 Análisis de Componentes Principales

Se determinó la contribución del comportamiento del coeficiente de variación de la concentración y pureza del ADN por medio de un análisis de PCA. Un componente principal, asociado con la pureza del ADN en el método 2, explicó el 51.19 % de la varianza encontrada, el Componente 2 explicó el 48.81 % y se observó que está asociado al coeficiente de variación de la concentración obtenida por medio del método 1 (Fig. 5).

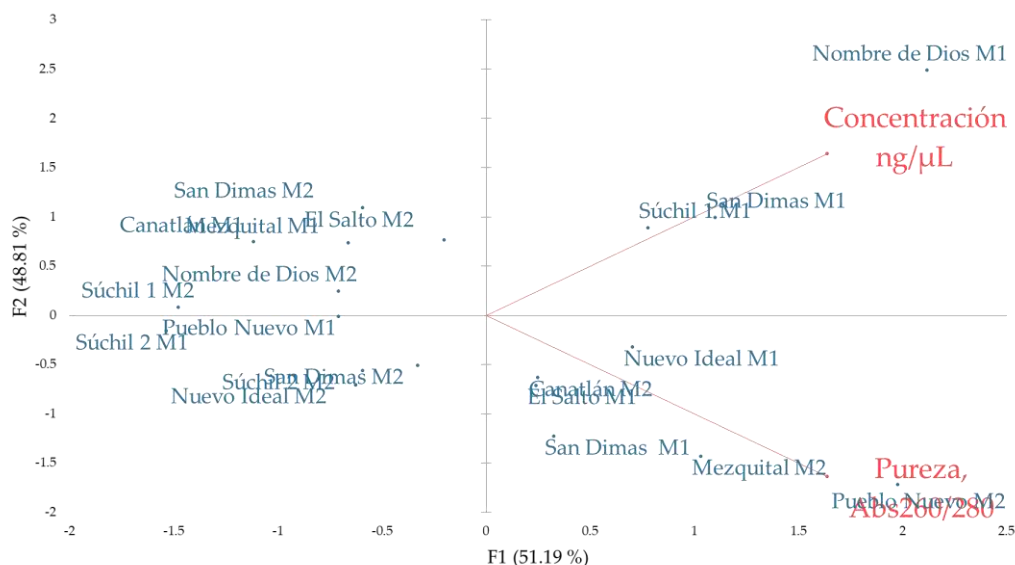


Figura 5. Resultados del análisis de agrupamiento basados en los resultados del coeficiente de variación de la concentración de ADN (ng/μL) y la pureza ($A_{260/280}$) de formas silvestres de frijol común de Durango, México.

Figure 5. Results of clustering analysis based on the results of the coefficient of variation of DNA concentration (ng/μL) and purity ($A_{260/280}$) of wild forms of common bean from Durango, Mexico.

4. Conclusiones

Se concluye que las modificaciones que se hicieron al método de Coelho *et al.* (2009), minimiza costos ya que se prescinde de agregar el nitrógeno líquido para la pulverización de la muestra, además de no incluir las enzimas Proteinasa K y RNasa. La cantidad y pureza del ADN obtenido con ambas modificaciones en el método fue variable entre las diez formas silvestres de frijol común evaluados. Sin embargo, el método 2, el cual prescinde del uso de Proteinasa K y RNasa permitió obtener mayor cantidad y mejor pureza de ADN que el método 1 en todos los genotipos. A pesar de que algunas muestras de ADN obtenidas con el método 1 no cumplieron con el valor estándar de pureza, todas las muestras de ADN pudieron amplificarse con iniciadores de los marcadores moleculares ISTR; sin embargo, las muestras obtenidas con el método 2 generaron un mayor número de bandas y éstas se resolvieron mejor en los geles de acrilamida. Aunque fue variable entre genotipos, el método 2 es más eficiente, rápido y económico que el método 1 para obtener ADN de los genotipos de frijol común analizados e idóneo para estudios moleculares.

Agradecimientos

Al Instituto Politécnico Nacional y al CONAHCYT por los apoyos para realizar el presente trabajo.

Conflicto de interés

Los autores declaran no hay conflicto de intereses, en la publicación de estos resultados.

5. Referencias

- Addinsoft. (1995-2024). XLSTAT. Statistical Software. BroNY, USA: Addinsoft, Inc. <https://www.xlstat.com/en/>
- Aboul, M. N. A. F. & Oraby, H. A. S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. Bulletin of the National Research Centre 43: 25. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Andrews, A. T. 1994. Electrophoresis of nucleic acids. In: T. A. Brown (Ed.) Essential Molecular Biology. A Practical Approach. IRL Press, 89-106. ISBN-10: 0-19-963644-3
- Ángel, G. J. (1996). La variación y su significado. Revista Universidad Eafit, 101: 87-96. <https://goo.su/y9cd>
- Castellanos, H. O. A., Lépiz, I. R., Castellanos, E. G. E., Rodríguez, S. A. & Torres, M. M. I. (2017). Relaciones genéticas basadas en marcadores ISTR entre formas silvestres, cultivadas e intermedias de frijol de guía colectado en Jalisco, México. Acta Botánica Mexicana 118: 53-63. <https://doi.org/10.21829/abm118.2017.1200>
- CEDRSSA. (2019). Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Mexico's reliance on key grains like maize, beans, rice, and wheat is governed by the Ley de Desarrollo Rural Sustentable (Law of Sustainable Rural Development) <https://goo.su/u0up>
- Chan, S. Y., Bernard, H. U., Ong, C. K., Chan, S. P., Hofmann, B. & Delius, H. (1992). Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. Journal of Virology 66 (10): 5714-5725. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.10.5714-5725.1992>
- Coelho, R. C., Faria, M. A., Rocha, J., Reis, A., Oliveira, P. P. & Nunes, E. (2009). Assessing genetic variability in germplasm of *Phaseolus vulgaris* L. collected in Northern Portugal. Scientia Horticulture 122(3): 333-338. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.05.035>
- Curay, P. J. D. (2019). Evaluación agronómica de tres variedades de Fréjol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo las condiciones climáticas de la comunidad de Rumichaca del cantón Pelileo. (Bachelor's thesis). Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cevallos, Ecuador. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/30037>
- Debouck, D. G. (2020). La agricultura en Mesoamérica. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). <https://www.fao.org/3/cb1447es/cb1447es.pdf>

- De Jesús, R., Rodríguez, N., Torres, W., Moreno, Y. & O'Callaghan, J. (2011). Uso de marcadores moleculares microsatélites para determinar condición de homocigosis y heterocigosis en roedores producidos en el Bioterio de la Universidad de Los Andes, Venezuela. *Avances en Investigación Agropecuaria* 15 (2): 45-63. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83719236004>
- Fernández, G. L. (2023). Desarrollo de métodos de referencia para la cuantificación de citosinas metiladas en fragmentos de ADN. (Tesis Maestría). Universidad de Oviedo, España. <https://hdl.handle.net/10651/69159>
- Freytag, G. F. & Debouck, D. G. (2002). Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae-Papilionoideae*) in North America, Mexico and Central America. *Sida, Botanical Miscellany* 23. Botanical Research Institute of Texas, USA. <https://hdl.handle.net/10568/54291>
- Guzmán, R. L. F., Cortés, C. M. A., Pichardo, G. J. M. & Arteaga, G. R. (2018). Comparación de protocolos de aislamiento de DNA a partir de semilla de soya. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 9(8): 1691-1701. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i8.872>
- Lépiz, I. R., López, J. A., Sánchez, J. J. G., Santacruz, D. E., Romero, E. N. & Rodríguez, E. G. (2010). Características morfológicas de formas cultivadas, silvestres e intermedias de frijol común de hábito trepador. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(1): 21-28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61012290003>
- Mateo, S. B. F. (2016). Selección de líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) que combinan resistencia al gorgojo común (*Acanthoscelides obtectus* Say) con resistencia a los virus BGYMV, BCMV y BCMNV (Disertación Doctoral). Universidad de Puerto Rico <https://hdl.handle.net/20.500.11801/42>
- Mellado, O. M. S. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, 3 (30): 88-111. Mellado, O. M. S. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, 3 (30): 88-111. <https://goo.su/EjFik>
- Miranda, L. S., Rosas, S. J. C., Aranda, R. L. L., Ortiz, P. R., Ponce, B. M. & Ríos, L. H. (2006). Análisis molecular de la diversidad genética de frijol común manejada por campesinos en Cuba. *Agronomía Mesoamericana* 3(17): 369-382. <https://doi.org/10.15517/am.v17i3.5172>
- Osorio, Z. M. A., Infante, D. & Molina, S. (2006). Variación genética asexual en *Agave cocui* Trelease. *Boletín Nakari*, 17: 1-7.
- Pech, M. H. (2020). Flujo genético e introgresión entre poblaciones domesticadas y silvestres del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en la península de Yucatán, México. (Tesis de Maestría, Mauricio Heredia Pech) Pech, M. H. (2020). Flujo genético e introgresión entre poblaciones domesticadas y silvestres del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en la península de Yucatán, México. (Tesis de Maestría, Mauricio Heredia Pech). <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1859>
- Reyes, M. A., Barriada, B. L. G., Rivera, R. D. M., Pajarito, R. A., Delgado, A. E. A., Almaraz, A. N., Herrera, C. J., Uribe, S. J. N. & Naranjo, J. N. (2011). Comparación de dos métodos para obtener ADN total de *Phaseolus vulgaris* para análisis de ISTR. *Vidsupra* 3(1): 23-29. <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8247>

- Reyes, M. A. (2014). Variabilidad genética de frijol *Phaseolus vulgaris* L. cultivado y silvestre en el estado de Durango (Disertación Doctoral, Reyes Martínez Alfonso). <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/21641>
- Ríos, D. K., Viteri, S. E. & Delgado, H. (2014). Evaluación agronómica de líneas avanzadas de frijol voluble *Phaseolus vulgaris* L. en Paipa, Boyacá. Revista de Ciencias Agrícolas 31(1): 42-54. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5104175>
- Rojas, L. E., Reyes, M., Pérez, A. N., Olóriz, M. I., Posada, P. L., Ocaña, B., y Pérez, J. L. P. (2014). Extracción in situ de ADN genómico para el análisis por PCR de regiones de interés en cuatro especies vegetales y un hongo filamentoso. Biotecnología Vegetal, 14(3): 151-154. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/70>
- Saburido, M., y Herrera, A. (2015). El frijol en la Era Genómica. RDU. Revista Digital Universitaria, 16 (2). Disponible en: <https://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art11/>
- Sambrook, J., Fritish, E. F. & Maniatis, T. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. <https://goo.su/s27SjU>
- Shagai, M. M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences USA (81)24: 8014-8018. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>
- Wallander, C. L., Almaraz, A. N., Alejandre, I. G., Uribe, S. J. N., Ávila, R. J. A., Torres, R. R., Herrera, A.Y. & Delgado, A. E. A. (2022). Variación fenológica y morfométrica de *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) de cinco poblaciones silvestres de Durango, México. Botanical Sciences, 100 (3): 563-578. <https://doi.org/10.17129/botsci.2981>

2024 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>