

# *Comparación de protocolos de extracción de ADN en *Calliandra molinae* Standl. para futuros análisis moleculares*

*Comparison of DNA extraction protocols in *Calliandra molinae* Standl. for future molecular analyses*

Yoel Fabricio Sosa González<sup>1</sup>  
Katerine Celeste López Vásquez<sup>2</sup>

Recibido: 7 de febrero de 2025  
Aceptado: 15 de marzo de 2025

<sup>1</sup> Escuela de Biología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras. [yoel.sosa@unah.hn](mailto:yoel.sosa@unah.hn)  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-6755-6958>

<sup>2</sup> Escuela de Biología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras. [kclopezv@unah.hn](mailto:kclopezv@unah.hn)  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-4919-8908>.

## Resumen

*Calliandra molinae* es un arbusto o árbol pequeño de la familia Fabaceae, distribuido en Mesoamérica y catalogado como “en peligro” por la Lista Roja de la UICN debido a la fragmentación de su hábitat. Su conservación requiere estudios moleculares que dependen de ADN de alta calidad, cuya extracción en plantas es complicada por la presencia de metabolitos secundarios que afectan su pureza y amplificación.

Este estudio comparó tres protocolos de extracción de ADN (Collins, CTAB y el kit de Promega) para evaluar su eficiencia en concentración, pureza y capacidad de amplificación por PCR, con el fin de identificar el método más adecuado para futuros análisis genéticos en *C. molinae*. Los resultados indicaron que el protocolo de Collins, especialmente con muestras preservadas en gel de sílice, proporcionó las mejores concentraciones de ADN ( $86.33 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 50.61$ ) y los valores de pureza más altos. El kit comercial obtuvo la mayor concentración ( $149.83 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 132.49$ ), pero con menor pureza, mientras que el método CTAB mostró las concentraciones más bajas, probablemente por la interferencia de polisacáridos y metabolitos secundarios.

En general, la pureza del ADN fue inferior a los valores óptimos en todos los protocolos, lo que sugiere contaminación con proteínas, fenoles y otros compuestos. En la prueba de amplificación mediante secuencias ITS, solo una de las ocho muestras procesadas logró un resultado positivo (12.5% de éxito), correspondiente a una extracción con el protocolo de Collins y preservación en gel de sílice. Ninguno de los otros métodos logró amplificación exitosa.

Los hallazgos indican que la presencia de contaminantes limita la eficiencia de la PCR y que es necesario optimizar la purificación del ADN para mejorar los resultados en estudios posteriores. En conclusión, aunque el protocolo de Collins con gel de sílice ofreció mejores resultados, la baja tasa de amplificación destaca la necesidad de mejorar y estandarizar los métodos para obtener ADN de mayor pureza y reproducibilidad en *C. molinae* y especies afines.

**Palabras clave:** Extracción de ADN, PCR, marcadores ITS, Fabaceae, método CTAB, método Collins, Promega Wizard®

## Abstract

*Calliandra molinae* is a shrub or small tree in the Fabaceae family, distributed in Mesoamerica and classified as "endangered" by the IUCN Red List due to habitat fragmentation. Its conservation requires molecular studies that depend on high-quality DNA, but DNA extraction in plants is challenging due to secondary metabolites that affect its purity and amplification.

This study compared three DNA extraction protocols (Collins, CTAB, and the Promega kit) to evaluate their efficiency in terms of concentration, purity, and PCR amplification, aiming to identify the most suitable method for future genetic analyses in *C. molinae*. Results showed that the Collins protocol, especially with samples preserved in silica gel, yielded the best DNA concentrations ( $86.33 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 50.61$ ) and the highest purity values. The commercial kit produced the highest concentration ( $149.83 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 132.49$ ), but with lower purity, while the CTAB method resulted in the lowest concentrations, likely due to interference from polysaccharides and secondary metabolites.

Overall, DNA purity was below optimal values for all protocols, suggesting contamination with proteins, phenols, and other compounds. In the ITS amplification test, only one of the eight processed samples yielded a positive result (12.5% success), corresponding to an extraction using the Collins protocol and silica gel preservation. None of the other methods produced successful amplifications.

The findings suggest that the presence of contaminants limits PCR efficiency and that optimization of DNA purification is necessary to improve performance in future studies. In conclusion, although the Collins protocol combined with silica gel showed better results, the low amplification rate highlights the need to further improve and standardize methods to obtain DNA with greater purity and reproducibility in *C. molinae* and related species.

**Key words:** DNA extraction, PCR, ITS markers, Fabaceae, CTAB method, Collins method, Promega Wizard®.



# Comparación de protocolos de extracción de ADN en *Calliandra molinae* Standl. para futuros análisis moleculares

## Comparison of DNA extraction protocols in *Calliandra molinae* Standl. for future molecular analyses

### Introducción

La extracción de ADN es una técnica fundamental en estudios moleculares que permiten la identificación, caracterización y conservación de especies vegetales. Es un paso importante previo para realizar análisis moleculares y la fiabilidad de los resultados de la investigación dependen del protocolo utilizado en la extracción (Ye y Lei, 2023). En los últimos años, esta herramienta se ha considerado fundamental para investigaciones enfocadas en la conservación de la diversidad genética de especies amenazadas, especialmente aquellas con información científica limitada. Un ejemplo destacado es *Calliandra molinae*, conocida comúnmente como “palo de corcho”, una planta de la familia Fabaceae catalogada “en peligro” según la Lista Roja de la UICN en 2020 (Linares, 2021).

*Calliandra molinae* Standl. es un arbusto o árbol pequeño que alcanza hasta seis metros de altura, con ramas gruesas y una corteza suberosa de color gris sulcado, tiene hojas que son trifoliadas, con folíolos oblongo-ovales y una textura hirsuta, produce flores en capítulos densos, con brácteas ovadas y un cáliz campanulado (Standley, 1950). Esta especie ha sido registrada en cuatro países de Mesoamérica, habitualmente en parches de bosque seco, suelos rocosos y cerca de arroyos (Standley, 1950; Tropicos, 2025). En Honduras, se encuentra en dos departamentos: Francisco Morazán y El Paraíso (Linares, 2021). Dado su estado de conservación y la limitada información disponible, la obtención de muestras genéticas de alta calidad es fundamental para preservar este recurso fitogenético y facilitar futuros estudios enfocados en su conservación y manejo sostenible.

La extracción de ADN de tejidos vegetales presenta diversos desafíos, principalmente debido a la presencia de compuestos secundarios que pueden interferir en el proceso. Entre los métodos más destacados, el protocolo basado en Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Doyle y Doyle (1987) es ampliamente reconocido por su eficacia en la eliminación de polisacáridos y fenoles, logrando buenos resultados en la extracción

de ADN de diferentes grupos de plantas. Además del método CTAB, existen alternativas como los kits comerciales diseñados específicamente para la extracción de ADN vegetal, aunque su uso suele implicar un costo económico más elevado (Whitehouse y Hottel, 2007). Otra opción es el protocolo desarrollado por Collins et al. (1987), inicialmente estandarizado para *Anopheles gambiae* y comúnmente empleado en insectos. Este protocolo ha mostrado resultados satisfactorios en términos de cantidad y calidad del ADN extraído de plantas, así como en la amplificación por PCR (Cadavid-Sánchez, 2013).

El rendimiento de los métodos de extracción de ADN se evalúa mediante espectrofotometría y electroforesis, ya que cada técnica proporciona información sobre distintos parámetros de calidad. La espectrofotometría permite cuantificar la concentración total de ADN en la muestra, expresada en nanogramos por microlitro (ng/μL), además de evaluar su pureza mediante la medición de la absorbancia a longitudes de onda específicas, lo que ayuda a detectar contaminantes como proteínas, ARN o compuestos fenólicos (Bhat et al., 2010). Por otro lado, la electroforesis en gel permite analizar la integridad del ADN al visualizar su grado de fragmentación, lo que facilita la identificación de muestras con ADN de alta calidad frente a aquellas con degradación. Adicionalmente, la capacidad de amplificación por PCR se emplea como un criterio funcional para determinar si la calidad del ADN extraído es suficiente para estudios posteriores (Wittmeier y Hummel, 2022; Hiramatsu et al., 2023).

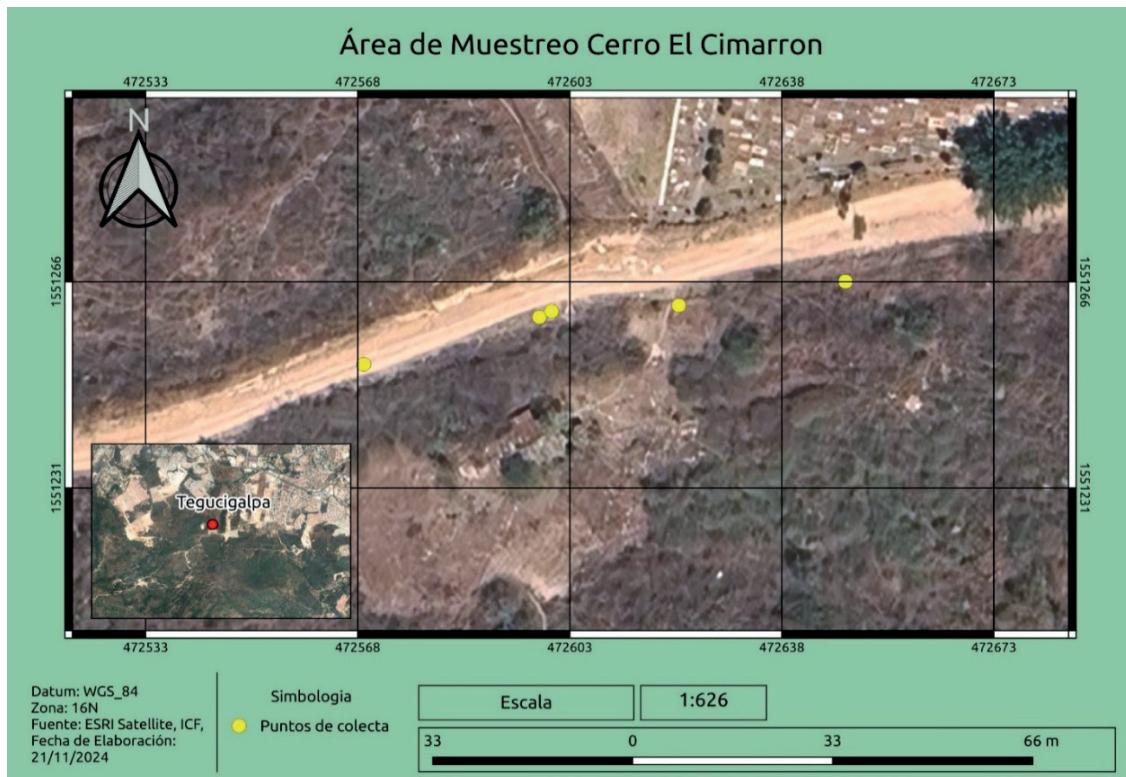
La extracción de ADN es un pilar fundamental en la investigación molecular, es debido a esto que el objetivo de este estudio fue comparar la eficiencia de distintos protocolos de extracción de ADN a partir de tejido vegetal de *Calliandra molinae* con miras a futuros análisis moleculares. Para ello, se evaluaron la cantidad y pureza del ADN obtenido mediante técnicas de espectrofotometría, electroforesis y PCR, y se probó su capacidad de amplificación utilizando cebadores específicos del marcador molecular ITS. Además, se buscó identificar el método más adecuado para la extracción de ADN de esta especie, considerando criterios de eficiencia y su aplicabilidad en estudios genéticos posteriores. Así, se espera que los resultados de este trabajo no solo fortalezcan la base científica para la conservación de *Calliandra molinae*, y a su vez sirvan como modelo para la extracción de ADN de otras especies similares.

## **Materiales y métodos**

### ***Área de estudio***

Las muestras se recolectaron en el cerro El Cimarrón, ubicado en Comayagüela, mu-

nicipio del Distrito Central, Honduras (Figura 1), en las coordenadas 16P 481947 1557268, a una altitud de 1206 m s.n.m. Este cerro pertenece al ecosistema de bosque seco subtropical, característico de Tegucigalpa. La vegetación del bosque tiene una altura que varía entre 3 y 15 metros, compuesta principalmente por árboles y arbustos decíduos. Las familias vegetales predominantes incluyen Fabaceae, Cactaceae, Bromeliaceae y Orchidaceae (House, 2008). El área presenta actividad antrópica, ya que cuenta con acceso para actividades recreativas y se encuentra cerca de proyectos habitacionales y construcciones.



**Figura 1.** Área de muestreo, calle camino al Cerro El Cimarron.

## Recolección y preservación del tejido vegetal

Se recolectaron muestras de hojas frescas, jóvenes y sanas de cinco individuos de *C. molinae*. Para su preservación, se emplearon dos métodos. En el primer método, las

muestras se almacenaron en frascos plásticos estériles que fueron transportadas en hieleras a 4 °C al laboratorio y posteriormente se conservaron congeladas a temperaturas inferiores a 4 °C. En el segundo método, las muestras se preservaron utilizando gel de sílice, estas se colocaron en bolsitas de papel manteca, se añadió el desecante y se sellaron en bolsas con cierre hermético. En total, se llevaron a cabo 30 extracciones de ADN, con 10 muestras procesadas mediante cada uno de los tres protocolos evaluados.

## Extracción de ADN

### *Método de Doyle y Doyle (1987 y 1990), modificado con CTAB*

Se maceró la muestra en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió 800  $\mu$ L de buffer de extracción (2% de CTAB, 1.4 M de NaCl, 0.1M de Tris-HCL (pH 8.0), 0.02M de EDTA y 0.2% de  $\beta$ -mercaptoetanol). Posteriormente se trasvasó la mezcla a viales Eppendorf de 1.5 mL y se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Se añadió cloroformo OH isoamílico (24:1) a la mezcla para precipitar proteínas y otros contaminantes y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Recuperando la fase acuosa se transfirió a otro tubo Eppendorf y se precipitó el ADN obtenido con isopropanol frío. Centrifugando a 12,000 rpm por 10 minutos se formó el pellet de ADN que posteriormente se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70%, seguido de una centrifugación a 12,000 rpm por 5 minutos. Después de dejar secar el pellet al aire, se resuspendió en 40 $\mu$ L de buffer TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) y se almacenó en frío para posterior uso.

### *Método de Collins et al. (1987) modificado*

En el segundo protocolo igual se maceró la muestra en nitrógeno líquido. Se añadió 700  $\mu$ L de buffer de tampón lisis (0,08 M NaCl, 0,16 M sucrosa, 0,06 M EDTA, 0,5% SDS, 0,1 M Tris-CL, pH 8,6) homogenizando y se trasvasó a un vial de 1,5mL. Se incubó a 64°C durante 30 minutos. Se agregó 600  $\mu$ L de cloruro de sodio al 5M para la precipitación de proteínas y se incubó durante 60 minutos a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 4000 RPM durante 15 min. Recuperando el sobrenadante a un vial nuevo se adicionó 100  $\mu$ L de etanol al 100%, luego llevando a centrifugar a 4000 RPM durante 15 min, luego se descartó el sobrenadante y se adicionaron 100  $\mu$ L de etanol al 70%, repitiendo la centrifugación, descartando el sobrenadante y dejando secar el pellet, finalmente se resuspendió en 40  $\mu$ L de

buffer TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) y se almacenó en frío para posterior uso.

### ***Kit de extracción Wizard Genomic de Promega® (2023)***

Para este protocolo se siguieron las instrucciones proporcionadas en el manual técnico Wizard® Genomic DNA Purification Kit actualizado del 2023 para extracción de ADN a partir de tejido foliar. Primero, las hojas se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, del cual se tomaron 0.05g en un vial eppendorf. Luego, se agregó la solución de lisis dejando en incubación a 65 °C, seguido de un tratamiento con ARNasa a 37°C. Se precipitaron las proteínas con una solución específica y se centrifugó, dejando el ADN en el sobrenadante, que se transfirió a otro tubo con isopropanol para su precipitación. Tras centrifugar, se lavó con etanol al 70% y se secó antes de rehidratar. Finalmente, el ADN se almacenó entre 2-8 °C.

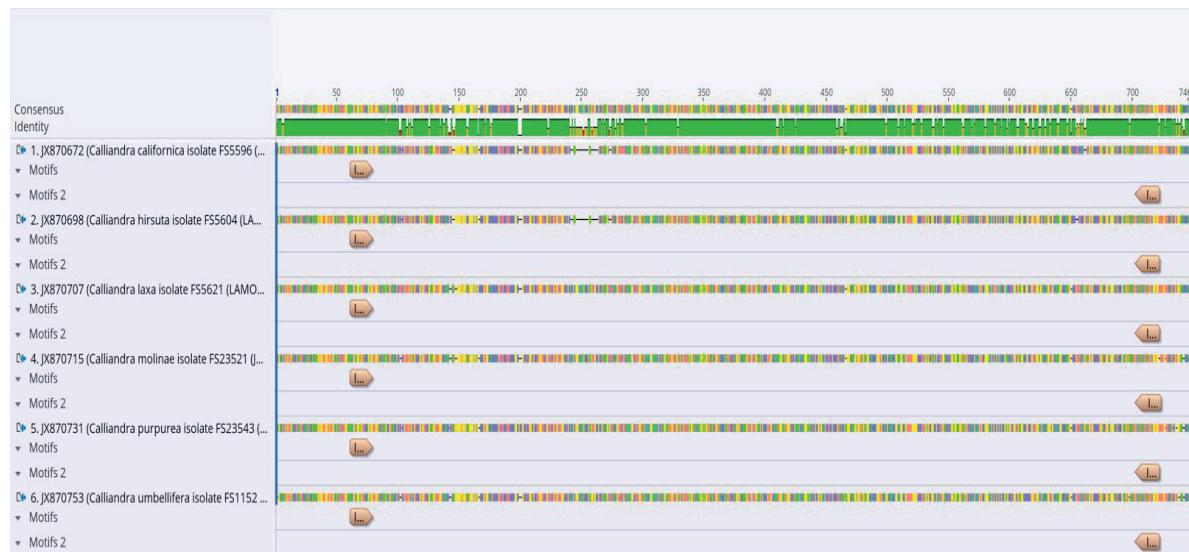
### **Cantidad y Pureza del ADN**

Para cuantificar el ADN obtenido se utilizó el espectrofotómetro UV5Nano de Mettler Toledo obteniendo los datos de concentración de ADN en ng/μL y la relación de absorbancias 260/280 y 260/230 para obtener índices para evaluar la pureza. Posteriormente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v), utilizando buffer TBE 1x. Para preparar la muestra se utilizó buffer de carga y posteriormente se visualizó en un transiluminador con luz UV.

### **Amplificación con ITS**

La región Internal Transcribed Spacer (ITS) es uno de los marcadores genéticos preferidos para la identificación molecular de especies, ya que está altamente repetida y combina secuencias conservadas con regiones variables que contienen una amplia información filogenética, facilitando el diseño de cebadores universales para la amplificación por PCR. (Kauserud, 2023; Manokar et al, 2018). Para comprobar la utilidad y calidad del ADN obtenido en técnicas moleculares PCR, se amplificó la región ITS con los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3'); esto basándose en el estudio de Martín y Álvaro (2001) donde utilizaron dos protocolos de amplificación para las parejas de cebadores ITS5/

ITS4, ITS1/ITS4, ITS1/ITS2 e ITS3/ITS4 siendo la pareja ITS1/ITS4 más exitosa. Además, en el programa Geneious prime, se realizó un blasteo y análisis de capacidad e hibridación de cebadores, para secuencias del género *Calliandra*, incluida una para *C. molinae* (Figura 2) donde se puede observar qué efectivamente los cebadores ITS1/IS4 sí hibridarían en las regiones de interés y generarían un amplímero de 664pb. Se empleó un protocolo con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 37 ciclos consistentes en desnaturalización a 95.4 °C durante 30 segundos, hibridación a 56.7 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos para finalmente realizar una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.



**Figura 2.** Análisis de hibridación de primers ITS./ITS4 para amplificación de región ITS de *Calliandra*,

## Análisis estadístico

Para cada uno de los métodos de extracción, se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los resultados de concentración. Se utilizaron las pruebas estadísticas de Tukey y Dunnett para identificar diferencias significativas en las concentraciones del

ADN (Miller, 1996); realizadas por Microsoft Excel 2016.

## Resultados y Discusión

### *Concentración del ADN*

El protocolo de Collins et al. (1987), tanto en muestras congeladas como en aquellas preservadas con gel de sílice, mostró concentraciones más altas en comparación con el método CTAB de Doyle y Doyle. En particular, el protocolo de Collins con preservación en gel de sílice alcanzó una media de 86.33 ng/μL ( $\pm$  50.61) y alcanzó los mejores rangos de pureza (Cuadro 1). Mientras que, el Kit de extracción Wizard mostró valores de concentración, con un promedio de 149.83 ng/μL ( $\pm$  132.49) en muestras preservadas en gel de sílice.

**Cuadro 1.** Medias y desviaciones estándar de los valores de cuantificación} de cada muestra.

Método	Concentración ng/ul (340nm) $\mu$ ( $\pm$ DS)	Relación 260/280 $\mu$ ( $\pm$ DS)	Relación 260/230 $\mu$ ( $\pm$ DS)
Doyle y Doyle (1990) congelado	1.26 ( $\pm$ 3.34)	1.07 ( $\pm$ 0.19)	-0.04 ( $\pm$ 0.78)
Doyle y Doyle (1990) silica gel	0.41 ( $\pm$ 1.68)	-0.2374 ( $\pm$ 1.16)	0.982 ( $\pm$ 1.26)
Collins et al. (1987) congelado	103.81 ( $\pm$ 54.20)	1.32 ( $\pm$ 0.19)	0.46 ( $\pm$ 0.10)
Collins et al. (1987) silica gel	86.33 ( $\pm$ 50.61)	1.52 ( $\pm$ 0.08)	0.54 ( $\pm$ 0.24)
Kit de extracción congelado	157.21 ( $\pm$ 223.32)	1.4 ( $\pm$ 0.27)	0.42 ( $\pm$ 0.09)
Kit de extracción silica gel	149.83 ( $\pm$ 132.49)	1.22 ( $\pm$ 0.26)	0.37 ( $\pm$ 0.13)

Las concentraciones obtenidas usando el protocolo CTAB de Doyle y Doyle (1987 y 1990), en su versión modificada, presentó los resultados más bajos de todos los protocolos evaluados, registrando desde concentraciones nulas hasta niveles muy bajos. Este resultado fue inesperado debido a que buena parte de los protocolos existentes, para aislar y purificar ADN de buena calidad, se basan en la técnica CTAB (Sahu et al., 2012), y este método ha sido utilizado exitosamente con otras plantas del mismo género, amplificando ITS con una alta eficiencia (Arias et al, 2024; Mattagajasingh et al, 2005). Estos resultados pueden atribuirse a un margen de error en la preparación de las soluciones del método o a la necesidad de estandarizar el procedimiento para esta planta. Un estudio previo realizado por Sharma et al. (2002) reportó el uso de CTAB en concentraciones cinco veces superiores a las empleadas en el presente estudio, lo que permite un aislamiento más eficiente del ADN en plantas con altas concentraciones de polisacáridos y otros metabolitos secundarios.

El protocolo de Collins et al. (1987) mostró resultados positivos en términos de concentración de ADN y fue el que más se aproximó, en promedio, al rango de pureza adecuado. Es relevante señalar que este protocolo fue originalmente diseñado para mosquitos, lo que hace notable su adaptación y éxito en aplicaciones con plantas, en concordancia con lo reportado por Cadavid et al. (2013). Para este estudio, se realizó una ligera modificación en la etapa de precipitación: Collins et al. (1987) recomiendan el uso de acetato de potasio, un reactivo que no estaba disponible en el laboratorio. Como alternativa, se optó por el uso de sal común, siguiendo las recomendaciones de Lopera-Barrero et al. (2008), quienes destacan su eficacia para obtener ADN de alta concentración y calidad.

Se aplicaron las pruebas de Tukey y Dunnett para comparar los tres métodos de extracción e identificar si existen diferencias significativas de concentración entre estos. Los resultados obtenidos para la concentración de ADN en ambas pruebas estadísticas no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), lo que indica que los valores de concentración son estadísticamente similares entre los protocolos analizados (Cuadro 2, Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Resultados obtenidos en la concentración de ADN aplicando prueba de Tukey.

Grupo 1	Grupo 2	p-value	Observaciones
Doyle y Doyle (1990)	Collins et al. (1987)	0.9557	no hay diferencia
Doyle y Doyle (1990)	Kit de Extracción	0.2173	no hay diferencia
Collins et al. (1987)	Kit de Extracción	0.3401	no hay diferencia

**Cuadro 3.** *Resultados obtenidos en la concentración de ADN aplicando prueba de Dunnett utilizando el kit de extracción como control.*

Métodos	p-value	Observaciones
Doyle y Doyle (1990)	1	no hay diferencia
Collins et al. (1987)	1	no hay diferencia

Estos resultados estadísticos deben ser interpretados con cautela debido a que aún no se ha determinado un tamaño de la muestra óptimo.

## Pureza del ADN

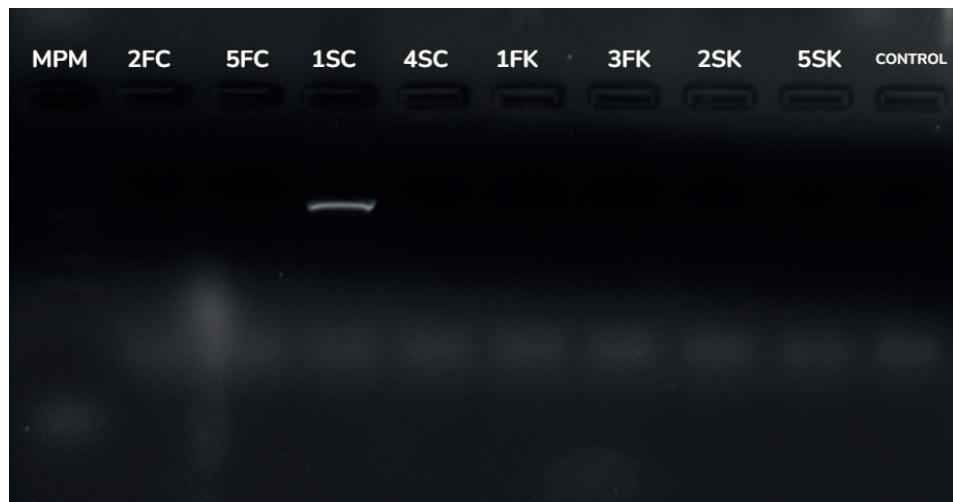
Un aspecto de interés de este estudio fueron las relaciones de pureza A260/280 y A260/230. Según la Red Nacional de Biobancos – ISCI (2011), la relación A260/280 debería de tener valores de 1.8-2.0 para un ADN no contaminado y la relación A260/230 debería tener valores en torno a 1.5-2.2 para un ADN no contaminado. Se encontraron valores considerablemente bajos en todas las muestras procesadas lo que indica que en todas las muestras hay presencia principalmente de proteínas, fenoles y otros compuestos secundarios (Cuadro 1). Como menciona Rocha (2002), el ADN al estar asociado e inmerso a un medio que contiene estructuras de composición química diversa y a los reactivos empleados en distintos pasos de la extracción está propenso a la contaminación de las muestras de ADN, que influye en los resultados de pureza.

Los metabolitos secundarios en tejidos vegetales son determinantes para las características fisiológicas y ecológicas de las plantas. Las especies de la familia Fabaceae, según Wink (2013), producen compuestos como alcaloides, flavonoides, terpenoides y taninos, esenciales en la defensa química y la interacción ecológica. En particular, *Calliandra calothrysus*, una especie del mismo género que el objeto de estudio, presenta altos niveles de taninos hidrolizables, los cuales afectan la pureza del ADN e inhiben la actividad enzimática necesaria para la amplificación y digestión del ADN (García y Medina, 2006; Nugroho et al., 2022). Esto sugiere que la especie estudiada podría contener metabolitos similares, complicando la extracción y purificación del ADN. Muchas plantas presentan polisacáridos y polifenoles que interfieren en estos procesos, requiriendo protocolos más complejos para minimizar contaminantes (Friar, 2005; Amani, 2011; Nugroho, 2022).

Por estos motivos, se infiere que las muestras analizadas no alcanzaron rangos adecuados de pureza.

## Amplificación de Espaciador Transcrito Interno (ITS)

De las 30 muestras de ADN extraídas en total, 10 fueron procesadas con el protocolo de Collins, 10 con el kit de Promega y 10 con el método CTAB. Para la amplificación por PCR, se seleccionaron ocho muestras en función de sus valores de concentración y pureza: cuatro extraídas con el protocolo de Collins y cuatro con el kit de Promega. Entre estas, solo una muestra logró amplificarse exitosamente con los cebadores ITS1/ITS4. Esta muestra, identificada como 01SC, fue extraída mediante el protocolo de Collins y preservada con gel de sílice, representando un éxito de amplificación del 12.5% (Figura 3). Es importante destacar que, de las 10 muestras procesadas con el protocolo de Collins, esta fue la que presentó un mejor índice de pureza, con una relación 260/280 de 1.64. Estos resultados sugieren que la presencia de contaminantes o metabolitos secundarios en las muestras podría estar afectando la eficiencia de amplificación del ADN y que su reducción podría mejorar significativamente el éxito en la PCR.



**Figura 3.** Resultados de la PCR de la muestra amplifico l. Códigos de las muestras: MPM (marcador de peso molecular), FC (tejido fresco, protocolo Collins), SC (tejido seco, protocolo Collins), FK (tejido fresco, protocolo kit de extracción), SK (tejido seco, protocolo kit de extracción).

## Conclusiones

El protocolo de Collins, especialmente en combinación con la preservación en gel de sílice, demostró ser el más adecuado para la extracción y amplificación de ADN de *Calliandra molinae*. Este método proporcionó una concentración de ADN adecuada y una calidad suficiente para su amplificación mediante ITS. No obstante, es necesario mejorar la pureza de las muestras para optimizar los resultados. A pesar de los avances logrados, se requiere una mayor estandarización de los procedimientos. Por ello, es fundamental llevar a cabo estudios adicionales para optimizar estos parámetros y garantizar resultados más consistentes y reproducibles en futuros análisis moleculares de *C. molinae* y otras especies relacionadas.

## Agradecimientos

Esta investigación fue factible gracias al apoyo técnico del Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de Ciudad Universitaria, UNAH, y con el respaldo del Centro de Investigaciones Genéticas (CIG) que pertenece al Instituto de Investigaciones en Microbiología (IIM). Asimismo, agradecemos a los revisores anónimos por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar este manuscrito.

## Referencias

- AMANI, J., KAZEMI, R., ABBASI, A., & SALMANIAN, A. (2011). A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9, 69-71.
- AMIGO, Q., GARBARELLO, M. F., OTAROLA, E. M., NARDI, M. A., FRECHA, C. A., FURCI, A., & OYHAMBURU, J. (2018). Aseguramiento de calidad en el Laboratorio de Biología Molecular: Control de Contaminación Ambiental. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 52 (2), 205-211.
- ARIAS, T., SALDARRIAGA, J., ARENAS-CASTRO, H., IDÁRRAGA-PIEDRAHÍTA, Á., LÓPEZ-ÁLVAREZ, N., LUQUE, E., TORRES-MORALES, G., GONZÁLEZ, M., & SOTO-CALDERÓN, I. (2023). Reconstructing the Phylogeny of Calliandra sect. Androcallis (Fabaceae): Insights from the inclusion of Colombian species, with a focus on the enigmatic taxon *Calliandra medellinensis*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.10.02.560511>.

- BHAT, S., CURACH, N., MOSTYN, T., BAINS, G., GRIFFITHS, K., & EMLIE, K. (2010). Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Analytical Chemistry*, 82 (17), 7185-7192. <https://doi.org/10.1021/ac100845m>.
- CADAVID SÁNCHEZ, I. C., ROSERO GARCÍA, D. A., Y URIBE SOTO, S. I. (2013). Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 186-192.
- COLLINS, F.H., MENDEZ, M.A., RASMUSSEN, M.O., MEHAFFEY, P.C., BESANSKY, N.J., & FINNERTY, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37 (37).
- DOYLE J. J., & DOYLE J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- DOYLE, J.J., & DOYLE, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- FRIAR, E. (2005). Isolation of DNA from plants with large amounts of secondary metabolites. *Methods in enzymology*, 395, 3-14. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95001-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95001-5).
- GARCÍA-GARCÍA, J. A., REDING-BERNAL, A., & LÓPEZ-ALVARENGA, J. C. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en Educación Médica*, 2(8), 217-224.
- GARCÍA, D. E., & MEDINA, M. G. (2006). Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Zootecnia Tropical*, 24(3), 233-250.
- GARCÍA-GARCÍA, J. A., REDING-BERNAL, A., & LÓPEZ-ALVARENGA, J. C. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en Educación Médica*, 2(8), 217-224.
- HALOS, L., JAMAL, T., VIAL, L., MAILLARD, R., SUAU, A., LE MENACH, A., BOULOUIS, H.J., & VAYSSIER-TAUSSAT, M. (2004). Determination of an efficient and reliable method for ADN extraction from ticks. *Veterinary research*. 35, 709-713.
- HIRAMATSU, K., MATSUDA, C., MASAGO, K., TORIYAMA, K., SASAKI, E., FUJITA, Y., HANEDA, M., EBI, H., SHIBATA, N., & HOSODA, W. (2023). Diagnostic utility of DNA integrity number as an indicator of sufficient DNA quality in next-generation sequencing-based genomic profiling. *American Journal of Clinical Pathology*, 160(3), 261-267. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqad046>.

- HOUSE, P. (2008). Bosque Seco Subtropical de Tegucigalpa. AFE COHDEFOR, Tegucigalpa, Honduras. Disponible en: [https://repositorio.credia.hn/bitstream/handle/123456789/143/2008\\_bosque\\_seco\\_subtropical\\_de\\_tegucigalpa\\_%282%29.pdf?sequence=1](https://repositorio.credia.hn/bitstream/handle/123456789/143/2008_bosque_seco_subtropical_de_tegucigalpa_%282%29.pdf?sequence=1)
- KAUSERUD, H. (2023). ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. *Fungal Ecology*, 65, 101274. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101274>
- LINARES, J. (2021). *Calliandra molinae. Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2021: e.T150705003A154368839*. Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/species/150705003/154368839>
- LOPERA-BARRERO, N. M., POVH, J. A., RIBEIRO, R. P., GOMES, P. C., JACOMETO, C. B., & LOPES, T. D. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e Investigación Agraria* 35 (1), 77-86.
- MANOKAR, J., BALASUBRAMANI, S. P., & VENKATASUBRAMANIAN, P. (2018). Nuclear ribosomal DNA – ITS region based molecular marker to distinguish *Gmelina arborea* Roxb. Ex Sm. From its substitutes and adulterants. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 9(4), 290-293. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.10.001>
- MARTÍN M., & ÁLVARO I. (2001). Notas preliminares sobre las técnicas de amplificación y variación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) en el género *Encalypta* (Encalyptaceae, Bryophyta). *Botánica Complutensis* 25, 233-239.
- MATTAGAJASINGH, I., ACHARYA, L., MUKHERJEE, A., PANDA, P., & DAS, P. (2006). Genetic relationships among nine cultivated taxa of *Calliandra* Benth. (Leguminosae: Mimosoideae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Scientia Horticulturae*, 110, 98-103. <https://doi.org/10.1016/J.SCIEN- TA.2006.06.020>.
- MILLER, R.G. (1996). *Simultaneous Statistical Inference*. McGraw-Hill. New York, 272.
- NUGROHO, K., SATYAWAN, D., TASMA, I., & LESTARI, P. (2022). Genomic DNA Extraction: The Critical Stage in Plant Molecular Analysis Activities. *Jurnal AgroBiogen*. <https://doi.org/10.21082/jbio.v18n1.2022.p33-44>.
- PARDO, E., CORONADO, J., & BEGAMBRE, M. (2021). Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de hojas secas de guayaba (*Psidium guajava* L.) para estudios moleculares. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 24(1), 1-5. <http://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1504>
- PROMEGA. (2023). *Technical Manual. Wizard Genomic DNA Purification Kit*. Promega Corporation.
- RED NACIONAL DE BIOBANCOS - ISCIII. (2011). *Protocolo de extracción de ADN*. Instituto

- de Salud Carlos III. Financiado por el Subprograma de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud del Instituto de Salud Carlos III, RD09/0076/00113.
- ROCHA, P. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas*, 23 (3), 9-16.
- SHARMA, A., GILL, P., & SINGH, P. (2002). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 415. <https://doi.org/10.1007/BF02772129>.
- STANDLEY, P. (1950). New plants from Honduras. *Ceiba*, 1 (1), 38-49.
- Tropicos. (2025). Missouri Botanical Garden. Disponible en: <https://tropicos.org>
- WHITEHOUSE, C., & HOTTET, H. (2007). Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Molecular and Cellular Probes*, 21, 92-96. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.08.003>.
- WINK, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2013.06.006>.
- WITTMEIER, P., & HUMMEL, S. (2022). Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: Comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR. *BioTechniques*, 72(4), 155–158. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>
- YE, X., & LEI, B. (2023). The current status and trends of DNA extraction. *BioEssays*, 45 (8). <https://doi.org/10.1002/bies.202200242>.