



Optimization of DNA extraction in *Bursera* using the CTAB protocol and comparison with commercial methods †

[Optimización de la extracción de ADN en *Bursera* mediante protocolo CTAB y comparación con métodos comerciales]

Iris J. Cruz-Larios¹, Martha Hernández-Rodríguez*²
and Alejandra C. Moreno-Letelier¹

¹ Jardín Botánico Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, CP 04510, México. Email: iris.cruz@st.ib.unam.mx, Email: amletelier@ib.unam.mx

² Colegio de Postgraduados, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. Email: hernandez.martha@colpos.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background. DNA extraction from plant species with high levels of secondary metabolites poses a major technical challenge, particularly in the genus *Bursera*, where substances such as tannins, terpenes, and resins compromise DNA purity and integrity. This limits genomic and conservation research in endemic Mexican species. **Objective.** To develop and standardize a CTAB-based DNA extraction protocol tailored to the chemical properties of *Bursera linanoe* and to compare its performance with widely used commercial kits. **Methodology.** Three commercial kits and two CTAB-based protocols (Doyle & Doyle and Saghai-Marooft) were tested using leaf tissue from *Bursera linanoe*. DNA yield, purity (A260/280 and A260/230), and integrity were assessed via spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. **Results.** The optimized CTAB protocol yielded high-quality DNA (average 310.56 ng μL^{-1}), with purity ratios in the optimal range for molecular applications. In contrast, commercial kits yielded low DNA concentrations or failed to recover detectable material, highlighting their inefficiency in tissues rich in secondary metabolites. **Implications.** The observed variability and DNA absence in some samples emphasize the need to tailor extraction protocols to the specific chemistry of plant tissues. The optimized method offers a valuable approach for similar species and supports future genomic and conservation studies. **Conclusion.** The modified CTAB protocol outperforms commercial methods for DNA extraction in *Bursera linanoe*.

Key words: linaloe; DNA extraction; CTAB protocol; secondary metabolites; DNA quality; plant genomics.

RESUMEN

Antecedentes. La extracción de ADN en especies vegetales con altos niveles de compuestos secundarios representa un reto técnico, especialmente en géneros como *Bursera*, donde metabolitos como terpenos interfieren con la pureza e integridad del ADN. Esta dificultad limita el avance de estudios genómicos y de conservación en especies endémicas mexicanas. **Objetivo.** Desarrollar y estandarizar un protocolo de extracción de ADN basado en CTAB, adaptado a las características de *Bursera linanoe* y compararlo con métodos comerciales. **Metodología.** Se evaluaron tres kits comerciales y dos variantes del protocolo CTAB (modificado y Saghai-Marooft). Se compararon la concentración, pureza (A260/280 y A260/230) e integridad del ADN mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. **Resultados.** El protocolo CTAB optimizado produjo ADN de alta calidad (310.56 ng μL^{-1} en promedio). En contraste, con los kits comerciales se obtuvo ADN de baja concentración, lo que indica su limitada eficacia frente a metabolitos secundarios complejos. **Implicaciones.** La variabilidad en los resultados y la ausencia de ADN en algunas muestras subrayan la importancia de adaptar los protocolos a las características químicas del tejido vegetal. El protocolo optimizado puede aplicarse a otras especies con perfiles similares y es clave para futuras investigaciones genómicas y

† Submitted July 31, 2025 – Accepted April 20, 2026. <http://doi.org/10.56369/tsaes.6476>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = I.J. Cruz-Larios: <https://orcid.org/0000-0002-4736-4114>; M. Hernández-Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0001-8637-5142>; A.C. Moreno-Letelier: <https://orcid.org/0000-0001-7524-7639>

de conservación. **Conclusión.** El protocolo CTAB modificado es más eficiente que los métodos comerciales para la extracción de ADN en *Bursera linanoe*.

Palabras clave: lináloe; protocolo CTAB; compuestos secundarios; calidad de ADN; genómica vegetal.

INTRODUCCIÓN

La extracción de ADN de alta calidad es un paso fundamental en estudios genómicos, filogenéticos y de conservación. Sin embargo, este proceso puede verse significativamente complicado en especies no convencionales que presentan altas concentraciones de compuestos secundarios, como fenoles, taninos, polisacáridos y otros metabolitos que interfieren con la purificación del material genético (Khan *et al.* 2014; Porebski *et al.*, 1997). Estos compuestos no solo inhiben las enzimas utilizadas en aplicaciones posteriores, como PCR, sino que también pueden degradar el ADN o precipitar con él, reduciendo su calidad y rendimiento (Abdel-Latif and Osman, 2017).

Estas dificultades adquieren relevancia en estudios de microbiomas asociados a plantas resinosas, donde la calidad del ADN extraído determina la eficiencia en la amplificación de marcadores, la cual es fundamental para la caracterización de comunidades microbianas (Fierer *et al.*, 2005). En este contexto, la presencia de metabolitos secundarios durante la extracción puede interferir con la obtención de perfiles microbianos representativos, sesgando las estimaciones de diversidad o incluso imposibilitando el análisis molecular (Sagova-Mareckova *et al.*, 2008; Delmont *et al.*, 2011).

Aunque los kits comerciales de extracción de ADN son ampliamente utilizados por su rapidez y estandarización, su eficacia puede verse limitada en especies como las del género *Bursera*, las cuales presentan altos niveles de metabolitos secundarios y lípidos, tales como terpenos, flavonoides, ácidos fenólicos y compuestos resinosos (Gigliarelli *et al.* 2015; Guevara-Fefer *et al.*, 2017; Sánchez-Monroy *et al.*, 2020; Antúnez-Mojica *et al.*, 2021; Infante-Rodríguez *et al.*, 2022). Los kits no están diseñados para manejar eficientemente las sustancias complejas presentes en este tipo de tejidos, lo que resulta en bajos rendimientos y ADN de menor calidad (Štorchová *et al.*, 2000).

Ante esta problemática, el método de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) surge como una alternativa robusta y adaptable para la extracción de ADN en especies con altos contenidos de fenoles y otros metabolitos secundarios (Doyle and Doyle, 1987; Murray and Thompson, 1980). A diferencia de los kits comerciales, este protocolo puede ajustarse para abordar las particularidades de cada especie, por ejemplo, mediante la modificación de la concentración

de CTAB, la adición de agentes reductores como el β -mercaptoetanol para neutralizar los fenoles, o el uso de pasos adicionales de purificación (Porebski *et al.*, 1997). Estas adaptaciones permiten obtener ADN de alta calidad, libre de inhibidores, y pueden ser adecuadas para aplicaciones moleculares avanzadas, como la secuenciación de siguiente generación.

En México, el género *Bursera* representa un grupo de gran interés ecológico, evolutivo y cultural. Conocidos comúnmente como "árboles de copal" o "cuajotes", las especies de este género son endémicas y desempeñan un papel crucial en los ecosistemas locales (Becerra, 2005; Rzedowski and Kruse, 1979). Además, muchas especies de *Bursera* producen resinas ricas en terpenos y otros metabolitos (Becerra *et al.*, 2009), lo que las convierte en un modelo desafiante para la extracción de ADN. A pesar de su importancia, los estudios genómicos en este grupo han sido limitados, en parte debido a la falta de protocolos eficientes para la obtención de material genético de calidad.

La optimización de un protocolo de extracción de ADN en *Bursera* permitirá obtener material genético adecuado para aplicaciones moleculares como PCR y secuenciación de nueva generación, contribuyendo al avance en el conocimiento de este género. En este sentido, el desarrollo de metodologías eficientes no solo favorece la investigación básica, sino que también aporta herramientas para la conservación y aprovechamiento sostenible de estos recursos biológicos, fundamentales para la biodiversidad mexicana (Sarukhán *et al.*, 2017; Mastretta-Yanes *et al.*, 2019).

Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo desarrollar y estandarizar un protocolo de extracción de ADN basado en CTAB, adaptado a las particularidades de las especies de *Bursera*, considerando la presencia de compuestos interferentes y las características específicas de sus tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN

Métodos kits comerciales

Para la extracción de ADN de tejido foliar de lináloe se utilizaron tres kits comerciales: Wizard Genomic DNA Purification System (Promega), Quick-DNA™ F/B y Quick-DNA™ Plus (ambos de Zymo Research).

Las extracciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron estos protocolos para su comparación frente al método de Saghai-Marooof *et al.* (1984) y una versión optimizada de CTAB basada en el protocolo de Doyle y Doyle (1987). Esta selección tuvo como objetivo contrastar el rendimiento de los métodos comerciales frente a protocolos clásicos optimizados.

Para la extracción de ADN se utilizaron 50 mg de tejido foliar, los cuales fueron pulverizadas con nitrógeno líquido. Posteriormente, se añadieron 1 ml de buffer de extracción compuesto con Tris-HCl 150 mM (pH 7.5), NaCl 1.5 M, EDTA 25 mM (pH 8.0), CTAB 3.5 % (p/v) y β -Mercaptoetanol 0.03 %. La mezcla se agitó en vórtex y se incubó a 65 °C durante 90 minutos.

Método CTAB optimizado

Se realizaron algunas modificaciones para obtener el protocolo más adecuado a la especie de interés (Figura 1).

A continuación se describen los pasos a seguir:

1. Colocar 50 mg de tejido molido y homogenizado en un microtubo Eppendorf de polipropileno de base cónica de 2 ml.
2. Añadir 1 ml de solución de lisis, mezclar 5 s en vórtex y enseguida colocar 3 μ l de β -mercaptoetanol y volver a mezclar de la misma manera.
3. Incubar los tubos en un termobloque (Select Bio Products) durante 90 minutos a 65 °C. Cada 10 minutos, colocar los tubos en un agitador vortex (Benchmark).
4. Retirar los tubos de la incubación. Enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 5

minutos y agregar 500 μ l de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1 v/v). Mezclar por inversión durante 10 min.

5. Centrifugar a 13 500 rpm a 4 °C durante 10 minutos para permitir la separación de fases.
6. Transferir cuidadosamente la capa acuosa superior a otro tubo de 1.7 ml.
7. Agregar isopropanol en proporción 1:1 con base en el volumen de la fase acuosa recuperada. Mezclar agitando en vortex e invirtiendo suavemente los tubos. Almacenar durante 1 hora en refrigeración.
8. Centrifugar a 13 500 rpm durante 15 minutos para precipitar el ADN y formar la pastilla en el fondo del tubo. Decantar el isopropanol.
9. Agregar 1 ml de etanol al 70 % para lavar suavemente la pastilla de ADN. Decantar el etanol y repetir el lavado si es necesario (si la pastilla se desprende, centrifugar durante 10 minutos a 13 500 rpm). Dejar evaporar el alcohol restante en cámara de extracción hasta que la pastilla esté seca.
10. Resuspender la pastilla de ADN en 100 μ l de agua destilada. Conservar las muestras a 4 °C para uso inmediato o almacenar a -20 °C para conservación a largo plazo.

Calidad de ADN

Cada método de extracción se realizó con seis muestras biológicas independientes (n = 6), correspondientes a muestras foliares procesadas de manera individual. Cada extracción fue evaluada una sola vez en términos de concentración e integridad del ADN, por lo que no se realizaron repeticiones técnicas adicionales.

Tabla 1. Buffer de extracción de ADN por método CTAB optimizado.

Componente	Concentración inicial	Concentración final	1 mL	10 mL
Tris-HCl (pH 7.5)	1 M	150 mM	0.15 mL	1.5 mL
NaCl	5 M	1.5 M	0.30 mL	3.0 mL
EDTA (pH 8.0)	0.5 M	25 mM	0.05 mL	0.5 mL
CTAB	-	3.5 % (p/v)	0.035 g	0.35 g
β -Mercaptoetanol	-	0.03 % (v/v)	0.3 μ L	3 μ L
PVP40	-	3% (p/v)	0.03 g	0.3 g
Agua destilada			Completar a 1 mL	Completar a 10 mL

Para evaluar la calidad del ADN obtenido mediante los métodos comparados, se evaluó su concentración, pureza e integridad. Los valores de los dos primeros criterios se obtuvieron mediante absorbancia utilizando un espectrofotómetro de ultra bajo volumen Nanodrop ND2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Para ello, se depositó 1 μL de cada muestra en el pedestal del Nanodrop, registrando la relación de absorbancia A260/A280 y A260/A230. Valores entre 1.8 y 2.0 indicaron una buena pureza del ADN (Wilfinger *et al.*, 1997). Para determinar el rendimiento del ADN, se calculó el promedio de concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) junto con los valores mínimo y máximo obtenidos.

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Sigma®, St. Louis MO, EUA). Se depositaron 6 μL de ADN en cada pocillo, junto con 2 μL de buffer de carga (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 5 mM pH 8.0, sacarosa al 25 %, azul de bromofenol 25 mg mL^{-1}). Como marcador de referencia, se cargaron 4 μL de ADN del fago lambda sin digerir (Invitrogen) a una concentración de 12.5 ng mL^{-1} en los carriles laterales del gel.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 90 minutos en buffer TBE 1X (Tris-borato-EDTA). Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 5 minutos y los fragmentos de ADN fueron visualizados mediante luz ultravioleta en un fotodocumentador (MiniBis Pro 16 mm, DNR Bio-Imaging Systems®, Israel).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de ADN presentaron una calidad aceptable, evidenciada por la presencia de bandas bien definidas en el gel de agarosa, una concentración adecuada y curvas de absorbancia dentro de los rangos esperados en el espectro UV-Vis.

La obtención de ADN de alta calidad es fundamental para garantizar la fiabilidad y precisión en diversas aplicaciones moleculares, incluyendo estudios genéticos, secuenciación, genotipado y análisis de marcadores moleculares (Porebski *et al.*, 1997). Una pureza adecuada minimiza la presencia de inhibidores que podrían afectar la eficiencia de técnicas como PCR, qPCR y electroforesis capilar, asegurando resultados reproducibles y de alta resolución. Por lo tanto, asegurar la calidad de las muestras desde el

inicio es un paso clave para el éxito de cualquier investigación o diagnóstico basado en técnicas moleculares.

Calidad de ADN

Los valores de concentración de ADN obtenidos mediante el método de CTAB fueron de 310.56 ng mL^{-1} en promedio, lo que confirma la eficacia de este protocolo para la extracción de material genético (Tabla 2).

Sin embargo, se observó un intervalo amplio en los valores de concentración, lo que sugiere una alta variabilidad en la eficiencia del procedimiento entre las distintas muestras. Esta variación podría atribuirse a diferencias en la calidad del tejido inicial o la homogenización incompleta de las muestras. Por otro lado, los métodos de extracción con kits comerciales no mostraron resultados, debido a concentraciones muy bajas o incluso nulas de ADN (15.61 ng mL^{-1} en promedio).

El valor promedio de la relación de pureza A260/280 fue de 2.14 para el protocolo de CTAB optimizado. Este valor estuvo arriba de lo indicado para un ADN puro, el cual debe ser de 1.8 debido a que no se empleó RNasa para tratar los ADN. En cuanto a la relación de pureza A260/230, el valor promedio obtenido con el protocolo optimizado se encuentra dentro del intervalo considerado óptimo (2.0) para ADN libre de contaminantes orgánicos y compuestos fenólicos (Matlock, 2015). En contraste, los valores obtenidos con los métodos comerciales estuvieron por debajo de 1.0, lo cual indica la presencia de impurezas como polisacáridos, fenoles o restos de solventes. Esta baja pureza se reflejó también en la forma de la curva espectrofotométrica, la cual presentó una pendiente pronunciada en el flanco izquierdo, un patrón indicativo de la presencia de contaminantes que interfieren con la absorción del ADN (Figura 2).

Estos resultados resaltan la importancia de utilizar el método de extracción adecuado según el tipo de muestra y el objetivo del estudio. Mientras que el método de CTAB demostró ser más robusto y confiable para las muestras analizadas, los kits comerciales podrían requerir optimización o no ser compatibles con el tipo de tejido o con las condiciones de almacenamiento de las muestras (Schneider and Excoffier, 1999).

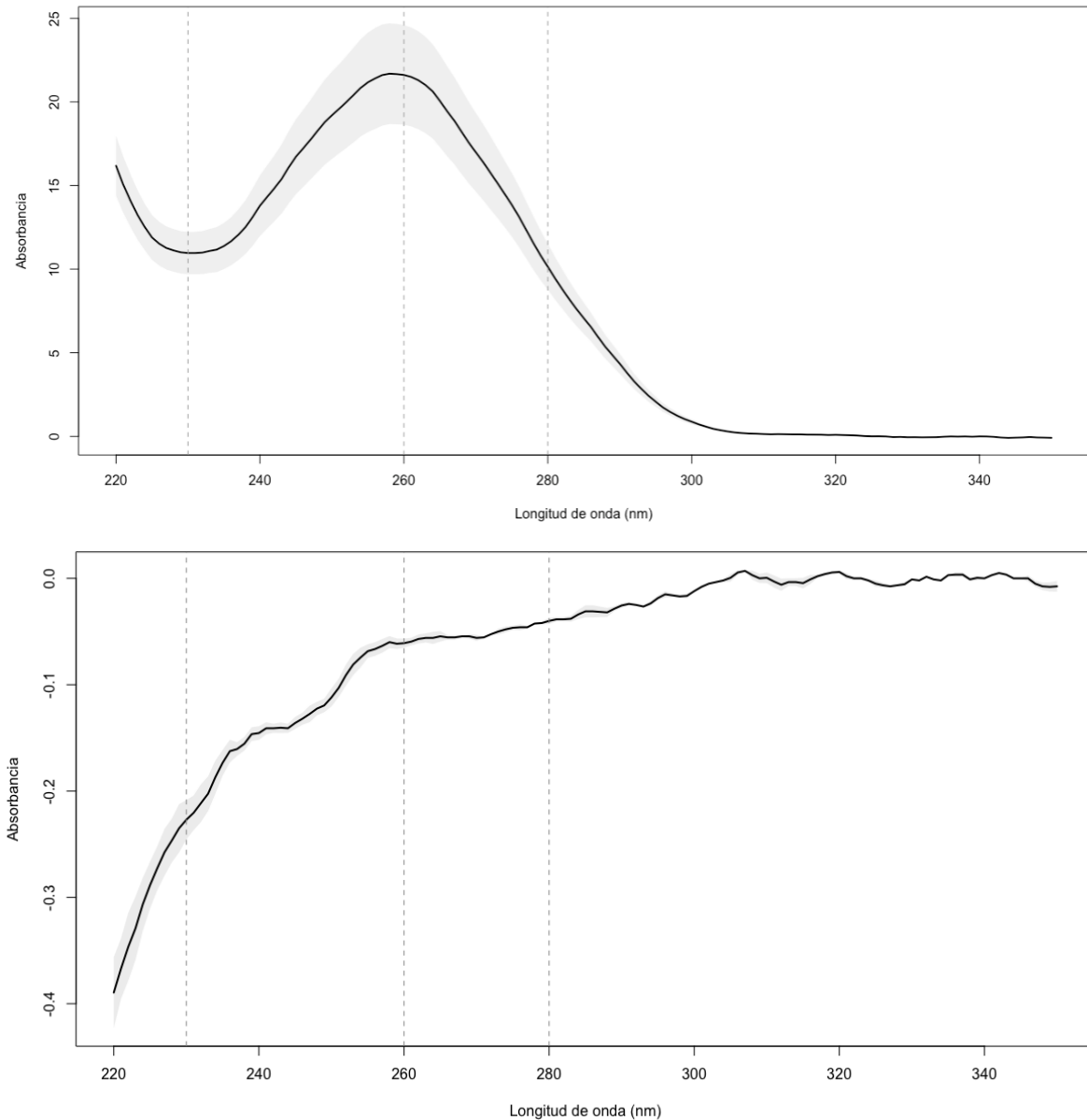


Figura 2. Espectro de absorción UV del ADN obtenido mediante NanoDrop de muestras de ADN obtenidas con el método CTAB (arriba) en comparación con métodos comerciales. La curva representa la media \pm desviación estándar calculada a partir de las muestras con mayor calidad espectral.

De acuerdo a las imágenes obtenidas de los geles de agarosa se obtuvo ADN íntegro con el protocolo CTAB optimizado, esto quiere decir que el proceso se realizó adecuadamente y puede servir para posteriores estudios sobre el análisis genético de *Bursera*. Al establecer el protocolo, se notó una mejoría al incrementar los lavados con alcohol de tal forma que se presentó un menor barrido de ADN.

En contraste con los resultados obtenidos con el protocolo CTAB optimizado, en los geles de agarosa correspondientes a los kits comerciales no se observó material genético de las especies de *Bursera*

analizadas. La ausencia de bandas visibles sugiere que los métodos estandarizados de los kits no logran eliminar eficientemente los inhibidores o recuperar el ADN, reforzando la necesidad de emplear protocolos adaptados a las particularidades químicas de las muestras, como el CTAB modificado en este estudio.

Al implementar el método de Saghai-Marooif *et al.* (1984) a muestras que pueden presentar altos contenidos de fenoles, como las hojas de cítricos y de aguacate, únicamente se pudo obtener ADN de kumquat (*Fortunella sp.*), mientras que en las especies de *Bursera* no se logró extraer material genético bajo

este método (Figura 4). Esto sugiere que, aunque el protocolo de Shagai-Marroof es eficaz para ciertas especies con bajos niveles de compuestos interferentes, no es adecuado para tejidos ricos en fenoles y otros metabolitos secundarios, como los presentes en el género *Bursera*.

Por lo tanto, se confirma que el protocolo modificado en este estudio es el método más adecuado para la extracción de ADN en especies con altos contenidos de compuestos secundarios. Este método, basado en el uso de CTAB, ha demostrado ser eficaz para desnaturalizar proteínas, eliminar polisacáridos y neutralizar fenoles, lo que permite obtener ADN de alta calidad incluso a partir de muestras especialmente difíciles. Este protocolo altamente versátil, permite ajustar la concentración de CTAB, incorporar agentes reductores como el β -mercaptoetanol y añadir pasos adicionales de purificación. Esta flexibilidad lo convierte en una opción ideal para especies no convencionales con perfiles metabólicos complejos.

Otra recomendación importante para lograr una extracción eficiente de ADN es controlar adecuadamente el tiempo de precipitación bajo condiciones de refrigeración. Las bajas temperaturas contribuyen a preservar la integridad del material genético al inhibir la actividad de enzimas degradativas, como las nucleasas, que pueden fragmentar el ADN (Green and Sambrook, 2012).

La calidad del ADN extraído puede evaluarse mediante técnicas como la electroforesis en gel de agarosa. Un ADN de alta calidad e integridad se visualiza como una banda única, nítida y de alto peso molecular, lo que indica la ausencia de fragmentación significativa de las cadenas (Varma *et al.*, 2007). En contraste, un ADN degradado se presenta como un patrón difuso o con múltiples bandas de menor tamaño, lo cual sugiere ruptura del material genético, ya sea por actividad enzimática, condiciones inadecuadas de almacenamiento o un proceso de extracción deficiente (Sambrook and Russell, 2006).

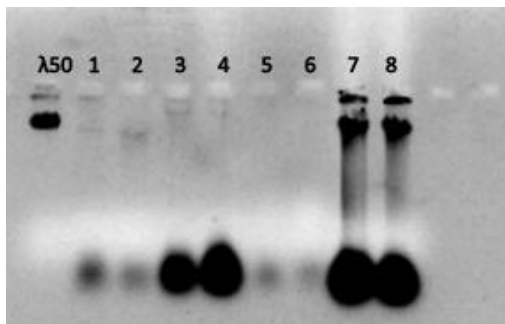


Figura 4. Método Shagai-Marroof et al. (1984) para extracción de ADN. Se utilizaron muestras foliares de aguacate (carriles 1 y 2), *Bursera fagaroides*

(carriles 3 y 4), *Bursera linanoe* (carriles 5 y 6), Kumquat (carriles 7 y 8). Como referencia de alto peso molecular, se cargaron 50 ng de ADN del fago lambda sin digerir en el carril lateral del gel.

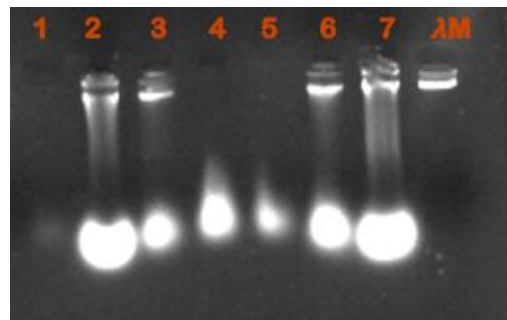


Figura 5. Extracción de ADN con el método de Shagai-Marroof et al. (1984) (carril 1: *Bursera linanoe*, 2: aguacate, 3: kumquat), y el método de CTAB modificado (carril 4: aguacate, 5: kumquat, 6: *Bursera linanoe* y 7: *Bursera fagaroides*), λM: ADN del fago lambda sin digerir (50 ng) como referencia de alto peso molecular.

El CTAB es un detergente catiónico ampliamente utilizado en biología molecular para la lisis celular y la desintegración de membranas, incluidas las membranas nucleares (Murray and Thompson, 1980; Amani *et al.* 2011). La alta concentración de CTAB (3×) se utiliza para romper las paredes celulares y las membranas plasmáticas, liberando el contenido intracelular. Una vez que las células y las membranas nucleares se han desintegrado, los componentes genéticos (ADN, ARN) quedan expuestos y pueden ser separados de otros componentes celulares, como proteínas y polisacáridos, mediante técnicas adicionales como la extracción con fenol-cloroformo o la precipitación con alcohol (Clark, 1998).

El protocolo utilizado consideró una alta concentración de CTAB (3.5 %) para desintegrar las células y las membranas nucleares con el fin de exponer los componentes genéticos. En el método modificado presente, el buffer 3× CTAB también contiene la concentración máxima recomendada (0.3%) de 2- β -mercaptoetanol, lo que permitió eliminar con éxito los polifenoles. El buffer de extracción con CTAB también incluye 1.5 M de NaCl, lo que mejoró la calidad del ADN extraído (Sahu *et al.*, 2012).

Las diferencias observadas en la concentración de ADN entre las muestras pueden atribuirse, en gran medida, a la variabilidad interespecífica en el contenido y composición de metabolitos secundarios presentes en los tejidos vegetales analizados de cada individuo. Se ha documentado ampliamente que compuestos como fenoles, taninos, polisacáridos y

resinas pueden interferir con la extracción, purificación y amplificación del ADN, reduciendo su recuperación efectiva o promoviendo su precipitación con contaminantes (Schrader *et al.*, 2012).

En este caso, los resultados obtenidos respaldan la utilidad de las muestras para estudios posteriores, aunque se recomienda realizar controles adicionales (como electroforesis en geles de alta resolución o análisis de fragmentación) para confirmar la ausencia de degradación en muestras que podrían ser críticas para aplicaciones más sensibles, como la secuenciación de nueva generación (Walden *et al.*, 2017). La optimización de los protocolos de extracción de ADN es esencial para garantizar la reproducibilidad y la calidad de los resultados.

La presencia residual de ARN en las muestras puede atribuirse a la ausencia de un paso de digestión con RNasa durante el proceso de extracción. Aunque la presencia de ARN no suele interferir de manera significativa en aplicaciones como PCR convencional, su eliminación resulta recomendable cuando el ADN se destina a secuenciación de nueva generación (NGS), donde la cuantificación precisa del ADN es esencial (Head *et al.*, 2014).

Se requieren más investigaciones para profundizar en la optimización de los protocolos de extracción de ADN basados en CTAB. Estos estudios deben emplear criterios claros para evaluar la eficacia del proceso y abordar desafíos persistentes, como la interferencia de metabolitos secundarios, el rendimiento del ADN y la longitud promedio de los fragmentos obtenidos (Schenk *et al.*, 2023).

La obtención de protocolos de extracción de ADN específicos y optimizados para las especies mexicanas es de vital importancia para avanzar en el estudio de su diversidad genética y biológica. Las particularidades de estas especies, como la presencia de metabolitos secundarios que interfieren con la extracción de ADN, requieren metodologías adaptadas que permitan superar estos desafíos técnicos. El desarrollo de protocolos adecuados no solo facilita la obtención de ADN de alta calidad, sino que también reduce el tiempo y los recursos invertidos en la adecuación de métodos genéricos, lo que agiliza la generación de información genética confiable.

Estos avances son fundamentales para impulsar investigaciones en áreas como la genómica, la filogenética, la conservación y el manejo sostenible de los recursos naturales. Además, contar con protocolos específicos para especies mexicanas contribuye a fortalecer la capacidad científica del país, permitiendo estudios más precisos y representativos de su biodiversidad. En un contexto global donde la pérdida de diversidad biológica es una preocupación creciente,

la generación de conocimiento genético robusto y accesible se convierte en una herramienta esencial para la conservación (Allendorf *et al.*, 2010) y el aprovechamiento responsable de los recursos naturales.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el protocolo de extracción de ADN basado en CTAB, optimizado para *Bursera linanoe*, supera ampliamente en rendimiento, pureza e integridad del material genético a los métodos comerciales evaluados. La alta eficiencia del protocolo modificado se atribuye a su capacidad para neutralizar compuestos secundarios inhibidores, como fenoles y resinas, que son abundantes en esta especie. En contraste, los kits comerciales mostraron limitaciones significativas al no recuperar ADN en concentraciones utilizables, lo cual subraya la necesidad de adaptar los métodos de extracción a las características bioquímicas específicas del tejido vegetal. Esta optimización representa un avance técnico crucial para estudios moleculares en especies no convencionales, y sienta las bases para investigaciones futuras en genómica, conservación y filogenia en *Bursera* y otros taxa con perfiles metabólicos complejos.

Acknowledgements

This work was made possible through funding provided by the postdoctoral fellowship granted by SECIHTI (Secretariat of Science, Humanities, Technology and Innovation). We also thank the Institute of Biology of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) and the Botanical Garden for their technical support during the course of this research.

Funding. This research did not receive external funding.

Conflict of Interest. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Compliance with Ethical Standards. This study did not require approval from a (bio)ethical committee, as it did not involve living organisms or sensitive biological material.

Data Availability. All data generated or analyzed during this study are included in this manuscript.

Author Contribution Statement (CRediT). **I.J. Cruz-Larios** – Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – Original Draft. **M. Hernández-Rodríguez** – Conceptualization, Supervision, Methodology, Resources, Formal analysis, Writing-Original Draft, Writing- Review & editing. **A.C. Moreno-Letelier** – Writing- Review & editing.

REFERENCES

- Abdel-Latif, A. and Osman, G., 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13, pp.1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Amani, J., Kazemi, R., Abbasi, A. R. and Salmanian, A. H. 2011. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(1), pp. 69-71.
- Allendorf, F., Hohenlohe, P. and Luikart, G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 11, pp. 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrg2844>
- Antúnez-Mojica, M., Romero-Estrada, A., Hurtado-Díaz, I., Miranda-Molina, A. and Alvarez, L. 2021. Lignans from *Bursera fagaroides*: Chemistry, pharmacological effects and molecular mechanism. A current review. *Life*, 11(7), pp. 685. <https://doi.org/10.3390/life11070685>
- Becerra, J. X., Noge, K. and Venable, D. L., 2009. Macroevolutionary chemical escalation in an ancient plant-herbivore arms race. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43), pp. 18062-18066. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904456106>
- Becerra, J. X., 2005. Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), pp. 10919-10923. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409127102>
- Clark, M.S., 1998. *Plant molecular biology: A laboratory manual*. Berlin: Springer.
- Delmont, T.O., Robe, P., Clark, I., Simonet, P. and Vogel, T.M. 2011. Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 86(3), pp. 397–400. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.013>
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), pp. 11-15.
- Fierer, N. and Jackson, R.B., 2005. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), pp. 626–631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
- Gigliarelli, G., Becerra, J. X., Curini, M. and Marcotullio, M. C., 2015. Chemical composition and biological activities of fragrant Mexican copal *Bursera* spp. *Molecules*, 20(12), pp. 22383-22394. <https://doi.org/10.3390/molecules201219849>
- Green, M. R. and Sambrook, J., 2012. *Molecular cloning—A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Guevara-Fefer, P., Muñoz-Ocotero, V., Llanos-Romero, R. E., Zúñiga-Ruiz, B., Cárdenas-Vázquez, R. J., Contreras-Jiménez, J. L., and Ocampo-Bautista, F., 2017. Flavonoides de trece especies del género *Bursera* con potencial antioxidante. *Polibotánica*, 44, pp. 185-193. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.44.14>
- Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., and Ordoukhanian, P., 2014. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *BioTechniques*, 56(2), pp. 61–77. <https://doi.org/10.2144/000114133>
- Infante-Rodríguez, D. A., Landa-Cansigno C., Gutiérrez-Sánchez, A., Murrieta-León, D. L., Reyes-López, C., Castillejos-Pérez, A. B., Pucheta-Fiscal, J. E., Velázquez-Narváez, A. C., Monribot-Villanueva, J. L. and Guerrero-Analco, J. A., 2022. Análisis fitoquímico y actividad antidiabética, antibacteriana y antifúngica de hojas de *Bursera simaruba* (Burseraceae). *Acta Botanica Mexicana*, 129, pp. e2109. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2109>
- Khan, S., Al-Qurainy, F., and Nadeem, M., 2014. Biotechnological approaches for conservation and improvement of rare and endangered plants of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), pp. 437-448. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.11.001>
- Mastretta-Yanes, A., Bellon M. R., Acevedo, F., Burgeff, C., Piñero D., and Sarukhán, J., 2019. Un programa para México de conservación y uso de la diversidad genética de las plantas domesticadas y sus parientes silvestres. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(4), pp. 321-334. Recuperado en 17 de abril de 2026, de <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=>

- [sci arttext&pid=S0187-73802019000400321&lng=es&tlng=es.](https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321)
- Matlock, B., 2015. *Assessment of Nucleic Acid Purity*. NanoDrop Technical Bulletin, Thermo Scientific.
- Murray, M. G., and Thompson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), pp. 4321-4325. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Porebski, S., Bailey, L. G., and Baum, B. R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), pp. 8-15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Rzedowski, J., and Kruse, H., 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon*, 28(1-3), pp. 103-116. <https://doi.org/10.2307/1219565>
- Saghai-Marooif, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W., 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24), pp. 8014-8018. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>
- Sagova-Marečková, M., Cermák, L., Novotná, J., Plhachová, K., Forstová, J. and Kopecký, J., 2008. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), pp. 2902-2907. <https://doi.org/10.1128/AEM.02161-07>
- Sahu, S.K., Thangaraj, M., and Kathiresan, K., 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Molecular Biology*, 2012(1), pp. 1-6. <https://doi.org/10.5402/2012/205049>
- Sambrook, J. and Russell, D.W., 2006. Detection of DNA in agarose gels. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4022>
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., et al. 2017. *Capital natural de México: Síntesis*. *Evaluación del conocimiento y tendencias de cambio, perspectivas de sustentabilidad, capacidades humanas e institucionales*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J. and Fabre, P. P., 2023. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences*, 11(3), pp. e11517. <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and John, R., 2012. PCR inhibitors — occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), pp. 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Schneider, S. and Excoffier, L., 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152(3), pp. 1079-1089. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.3.1079>
- Sánchez-Monroy, M. B., García-Bores, A. M., Contreras-Jiménez, J. L., Torres, D. E., San Miguel-Chávez, R. and Guevara-Fefer, P., 2020. Biological activity and flavonoid profile of five species of the *Bursera* genus. *Botanical Sciences*, 98(4), pp. 545-553. <https://doi.org/10.17129/botsci.2624>
- Štorchová, H., Hrdličková, R., Chrtek, J., Jr., Tetera, M., Fitz, D. and Fehrer, J., 2000. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon*, 49, pp. 79-84. <https://doi.org/10.2307/1223934>
- Varma, A., Padh, H., and Shrivastava, N., 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal*, 2(3), pp. 386-392. <https://doi.org/10.1002/biot.200600195>
- Walden, C., Carbonero, F., and Zhang, W., 2017. Assessing impacts of DNA extraction methods on next generation sequencing of water and wastewater samples. *Journal of Microbiological Methods*, 141, pp. 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.07.007>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., and Chomczynski, P., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic

acid purity. *Biotechniques*, 22(3), pp. 474-481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>