







Optimización de extracción de ADN de polen apícola para caracterización molecular

Optimization of DNA extraction from bee pollen for molecular characterization

Lihua Wei¹ ,
Rosalinda Mendoza-Villareal² ,
Jazmín Solano-Sánchez³ ,
Ana Sofía Ibarra-Rivera⁴ ,
Flor Cristina Pacheco-Reyes⁵ ,
Miguel Ángel Pérez-Rodríguez^{6*} 

¹Laboratorio de Biomedicina Molecular, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro S/N Esq. Elías Piña. Col. Narciso Mendoza. CP. 88710. Reynosa, Tamaulipas, México.

²Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calz. Antonio Narro 1923, Buenavista, CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

³Estudiante de Ingeniero en Biotecnología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calz. Antonio Narro 1923, Buenavista, CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

⁴Estudiante de Ingeniero en Agrobiología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calz. Antonio Narro 1923, Buenavista, CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

⁵Estudiante de Doctorado en Recursos Fitogenéticos para Zonas Áridas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calz. Antonio Narro 1923, Buenavista, CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

⁶Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calz. Antonio Narro 1923, Buenavista, CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México.

* Autor de correspondencia: miguel_cbg@hotmail.com

Artículo científico

Recibido: 15 de febrero 2023

Aceptado: 27 de noviembre 2023

Como citar: Wei L, Mendoza-Villareal R, Solano-Sánchez J, Ibarra-Rivera AS, Pacheco-Reyes FC, Pérez-Rodríguez MA (2023) Optimización de extracción de ADN de polen apícola para caracterización molecular. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. III: e3656. DOI: 10.19136/era.a10nIII.3656

RESUMEN. La procedencia botánica del polen apícola es crucial para sus propiedades nutricionales. Aunque su identificación mediante análisis microscópico es precisa, resulta laboriosa. Los códigos de barras de ADN ofrecen una alternativa eficiente, utilizando secuencias estandarizadas para identificar la especie. No obstante, esta técnica demanda ADN de alta calidad para la amplificación y secuenciación. En este trabajo, se evaluó cómo distintas variaciones en tres etapas específicas (tiempo de incubación, número de lavados y el solvente empleado para la precipitación de proteínas) afectan la cantidad y calidad del ADN genómico extraído de polen apícola mediante un método basado en CTAB. El análisis de varianza reveló que el tiempo de incubación no afectó el rendimiento del ADN, mientras que el número de lavados tiene un efecto crítico negativo en el rendimiento del ADN. El solvente de precipitación de proteínas también tuvo un efecto significativo en el rendimiento del ADN, el cual alcanzó los mayores valores con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Para saber si las variaciones en los pasos de extracción afectan los análisis moleculares subsecuentes, se realizó una PCR de verificación con todas las muestras extraídas, obteniendo amplificaciones exitosas del fragmento ITS2 en todos tratamientos y la identificación precisa de 11 especies de plantas. Este estudio provee información importante de la optimización de un método de extracción de ADN de alta calidad, y provee bases sólidas para realizar códigos de barras, detección de especies invasivas, transgénicas o tóxicas en muestras de polen apícola.

Palabras clave: ADN genómico, CTAB, Identificación, ITS2, clonación.

ABSTRACT. The botanical origin of bee pollen plays a key role in its nutritional properties, while its determination by microscopic analysis demands experience and time. Another alternative method of identification is the use of DNA barcoding, which allows the determination of the species of a biological sample through standardized DNA. However, this technique requires quality DNA to perform amplification and sequencing. In this work, we compared the effect of different variations of the three steps (incubation time, number of washes, and protein precipitation solvent) in the CTAB-based method on the extraction of genomic DNA from bee pollen. The analysis of variance revealed that the incubation time did not affect the DNA yield, while the number of washes had a critical impact on DNA yield, which had a negative effect. In addition, protein precipitation solvent also had a significant effect on DNA yield, which achieved better yields with chloroform-isoamyl alcohol (24:1). To investigate whether the variations in the steps of DNA extraction could affect the subsequent molecular analysis, we performed PCR verification on all processed DNA and compared the results. Our results showed that amplification of the ITS2 fragment was successful with all treatments of genomic DNA samples, and accurately identified 11 plant species. This study provides important information on the optimization of a high-quality DNA extraction method, and provides a solid basis for subsequent barcoding research, detection of invasive species, transgenic or toxic plants.

Key words: Genomic DNA, CTAB, Identification, ITS2, Cloning.

INTRODUCCIÓN

Los granos de polen son estructuras microscópicas que se encuentran en las anteras de los estambres de las plantas angiospermas. Esos granos se adhieren a los cuerpos de las abejas obreras que visitan las flores por medio de fuerzas electrostáticas débiles (Clarke *et al.* 2017), varios granos de polen son aglutinados con las patas traseras y son humedecidos con secreciones salivales y néctar para formar gránulos de 1 a 4 mm, los cuales son transportados en las cúbiculas de la abeja y almacenados en alveolos del panal para su posterior consumo (Thakur y Nanda 2020).

El polen apícola se puede recolectar colocando una trampa en la entrada de las colmenas, la cual permite desprender el polen de las patas traseras de las abejas que regresan a la colmena. El polen apícola debe consumirse fresco o secarse cuidadosamente para que conserve sus propiedades nutricionales (Kieliszek *et al.* 2018). La composición del polen apícola varía dependiendo de factores como la estacionalidad, la ubicación geográfica, la humedad, entre otros. Estas variaciones le confieren diferentes propiedades nutricionales, fisicoquímicas y funcionales, no solo al polen sino también a los otros productos apícolas tales como la jalea real, la miel y el propóleo (Galimberti *et al.* 2014). El polen de abeja es rico en carbohidratos, proteínas y lípidos, contiene todos los aminoácidos y minerales esenciales, ácidos grasos y vitaminas principalmente del complejo B, carotenoides y flavonoides (Thakur y Nanda 2018, 2020). Actualmente se consume principalmente como suplemento dietético, por lo cual ha suscitado gran interés la investigación sobre este alimento, desde poder caracterizarlo fisicoquímicamente hasta la determinación de su origen botánico (Thakur y Nanda 2018, Végh *et al.* 2021).

El origen botánico del polen afecta el color de los gránulos de polen el cual puede variar desde blanco hasta café oscuro (Thakur y Nanda 2020). El polen se considera monofloral si presenta un único origen botánico en una frecuencia mayor al 90%, o bien no contar con polen accesorio en una frecuencia mayor al 60%, cuando no hay un polen pre-

dominante se considera polen multifloral (Thakur y Nanda 2020). Conocer cuáles son las plantas que son visitadas por las abejas es de gran importancia para los apicultores, para asegurar la calidad y seguridad de sus productos. Esta información proporciona datos valiosos sobre cuáles son las fuentes relevantes de néctar y la preferencia alimenticia de las abejas en diferentes épocas del año (Tanaka *et al.* 2020). Lo anterior permite elaborar estrategias para preservar la salud y productividad de las colmenas, determinar las características florales de una región y sus cambios fenológicos, detectar la presencia de especies invasivas, derivado de lo anterior, funciona como herramienta de monitoreo de la vegetación (Milla *et al.* 2022). Tradicionalmente el origen botánico del polen ha sido identificado por medio de análisis microscópico del tamaño, forma y superficie de los granos de polen, para asociarlo con una especie de plantas. Sin embargo, este método demanda un amplio conocimiento de las características distintivas del polen de cada especie, y frecuentemente este método resulta en una identificación imprecisa (Galimberti *et al.* 2014, Végh *et al.* 2021).

Las técnicas basadas en biología molecular muestran un gran potencial para superar esas limitaciones, ya que el análisis de secuencias estandarizadas como los códigos de barras de ADN permiten identificar y discriminar exitosamente plantas, incluso de taxones cercanos. En plantas, los marcadores propuestos por el Consortium for the Barcode of Life (CBOL) son las regiones del gen de la Maturasa K (*matK*), y de la ribulosa bifosfato carboxilasa (*rbcl*), adicionalmente se agregó el espaciador interno transcrito (*ITS2*) debido a su alto poder de discriminación de especies (Chen *et al.* 2010). Aunque estos fragmentos estandarizados permiten la discriminación entre especies, en muchos casos prácticos, no son capaces de identificar a todas las especies de plantas o incluso diferenciar entre plantas de un mismo grupo taxonómico (Shneyer y Rodionov, 2019). Un punto clave para obtener exitosamente códigos de barras de ADN, es la extracción del material genético, donde se requiere un método rápido, fácil y económico, del cual resulte un alto rendimiento y calidad de ADN. Para

garantizar la reproducibilidad de los resultados es necesario descartar la presencia de inhibidores de la PCR (Safeena *et al.* 2021). Un ADN libre de inhibidores permite realizar no solo la amplificación de los códigos de barras, si no también hace posible la detección de polen de plantas transgénicas, alergénicas o bien de plantas invasoras (Guertler *et al.* 2014). En el presente estudio, se evaluó el efecto del tiempo de incubación, número de lavados y el solvente utilizado sobre la cantidad y calidad del ADN genómico extraído de polen extraído por medio de la técnica con bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB). Además, se determinó la utilidad del ADN extraído para identificar molecularmente algunas de las plantas que son visitadas por las abejas para colectar polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación del ADN genómico de polen apícola

Se utilizó polen apícola multifloral colectado en la comunidad de Las Rosas, Chiapas (16° 22' 00" LN 92° 21' 00" LO). Para la extracción del ADN, se llevaron a cabo 12 variantes del protocolo previamente documentado para extraer ADN de plantas (Sharma *et al.* 2003). Las variaciones fueron en el tiempo de incubación inicial (tres variaciones), lavados (dos variaciones) y el solvente utilizado (dos variantes) (Tabla 1). El protocolo consistió en que 1 g de polen fue sometido a diferentes tiempos de incubación a 50 °C (0, 10 y 30 minutos) en 12 mL de tampón de fosfatos salino (PBS). Posterior a la incubación se centrifugó a 4 000 rpm por 5 min, el sobrenadante se decantó lentamente cuidando de no desprender la pastilla. Se realizaron lavados agregando 8 mL de agua ultrapura a la pastilla, se agitó durante 30 s con un agitador vortex y se centrifugó a 4 000 rpm por 20 min y se descartó el sobrenadante, este proceso se realizó de una o tres veces según el tratamiento. Posterior al lavado, se agregaron 500 µL de amortiguador de extracción CTAB comercial (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y se mezcló durante 40 s con un agitador vortex. La solución se transfirió a un microtubo de 1.5 mL estéril y los tubos fueron incubados a 65 °C a 200 rpm, durante 30 min. Luego

se agregaron 0.6 volúmenes del solvente cloroformo-alcohol isoamílico (C-I) en proporción 24:1 o fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (F-C-I) en proporción 25:24:1 según el tratamiento. Se agitó durante 10 s en un agitador vortex y se centrifugó cada tubo a 15 000 rpm durante 10 min. Con la ayuda de una micropipeta se tomó la fase acuosa y se depositó en un microtubo de 1.5 mL estéril y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto para posteriormente centrifugar a 15 000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y para lavar la pastilla formada se agregaron 400 µL de etanol al 70%, se volvió a centrifugar a 15 000 rpm por 5 min y se descartó el exceso de etanol y dejó secar a temperatura ambiente. La pastilla fue rehidratada con 100 µL de agua ultrapura libre de nucleasas y se incubó a 50 °C a 200 rpm por 15 min. La integridad del ADN genómico extraído fue verificada por medio de una electroforesis en gel de agarosa (Tris-acetato-EDTA 1x, 0.8% agarosa, 90V).

Cuantificación del ADN genómico

Con el equipo Nanodrop (NANODROP 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) se realizó por triplicado la cuantificación del rendimiento de ADN genómico y las proteínas obtenidas, utilizando la aplicación para ácidos nucleicos NANODROP 2000/2000c v.1.0 la cual arroja como resultados la cantidad de ADN en ng y las absorbancias a 280, 260 y 230 nm. Para esto se utilizó 1 µL agua ultrapura como solución de referencia (blanco) y de las muestras de ADN, las cuales fueron depositadas individualmente en la superficie de medición. La intensidad de luz de la muestra y del blanco son requeridas para calcular la absorbancia de una longitud de onda determinada (Thermo Scientific; v1.0 User Manual, NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, 2009).

Índices A260/A280 y A260/A230

Los índices A260/A280 y A260/A230 de cada muestra fueron determinados automáticamente por la aplicación NANODROP 2000/2000c v.1.0. Se calculan dividiendo el valor de absorbancia a 260 nm entre el valor a 280 nm y, dividiendo el valor de absorbancia a 260 nm entre el valor a 230 nm, respectivamente.

Tabla 1. Variantes de los tratamientos analizados.

Tiempo de Incubación (min)	Numero de Lavados	Solvente	Tratamiento
0	1	C-I	T1
		F-C-I	T2
	2	C-I	T3
		F-C-I	T4
10	1	C-I	T5
		F-C-I	T6
	2	C-I	T7
		F-C-I	T8
30	1	C-I	T9
		F-C-I	T10
	2	C-I	T11
		F-C-I	T12

C-I: cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 24:1, F-C-I: fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1

Amplificación del marcador ITS2

El ADN obtenido en cada tratamiento se utilizó para la amplificación por PCR del fragmento ITS2 usando cebadores específicos (ITS-2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', ITS-2R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3') previamente documentados (Chen *et al.* 2010). Para la PCR se utilizó el kit comercial GoTaq Green Master Mix, 2XTM (Promega Corporation, Madison, WI, USA), con reacciones de 25 μ L de mezcla según las especificaciones del fabricante, las cuales se colocaron bajo un programa de amplificación (95 °C, 4min; 35x (94 °C, 45 s; 56 °C, 1 min; 72 °C, 1 min); 72 °C, ∞ min) en un termociclador (Axygen[®] MaxyGene™ Thermal Cycler II), de cada tratamiento se establecieron reacciones por triplicado. Los productos de PCR fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa (Tris-acetato-EDTA 1x, 0.8% agarosa, 90V), la banda putativa correspondiente al fragmento ITS2, amplificada utilizando el DNA genómico del tratamiento T1 (Tabla 1), fue purificada utilizando el kit Wizard[®] SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Clonación y secuenciación de los fragmentos ITS2

Los amplicones purificados fueron clonados usando el kit comercial pGEM-T Easy Vector System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. El resultado de la ligación se utilizó para transformar cepas de *E. coli*

DH5 α calcio competentes. Las cepas transformantes resultantes fueron cultivadas en placas que contenían medio agar LB con 50 mg mL⁻¹ de ampicilina. Las colonias que resultaron resistentes a la ampicilina fueron cultivadas en medio LB líquido con 50 mg mL⁻¹ de ampicilina con la finalidad de realizar la extracción de los vectores recombinantes utilizando el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Corporation, Madison, WI, USA), según las especificaciones del fabricante. El ADN plásmidico fue verificado por medio de electroforesis en gel de agarosa y utilizado como sustrato para realizar la PCR utilizando cebadores universales M13. Un total de 15 vectores presentaron un amplicon del tamaño esperado los cuales fueron secuenciados de forma unidireccional con el cebador M13F en Langebio-CINVESTAV (Irapuato, México) según las especificaciones del servicio.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de tres vías (factores: tiempo de incubación * número de lavados * tipo de solvente, $p \leq 0.05$). Para determinar si hubo diferencias entre los rendimientos de ADN, proteínas, índices A260/A280 y A260/A230 y, además determinar si hay interacción entre los factores. Se realizaron graficas comparativas de las medias (+/- error estándar) de cada variable evaluada (rendimiento de ADN, rendimiento de proteínas, índice 260/280 e índice 260/230) con respecto a cada factor (tiempo de incubación * número de lavados * tipo de solvente) y sus variantes. Utilizando el software R-studio

4.1.2. En las secuencias resultantes se delimitó el inserto por medio de la comparación de la secuencia obtenida con la secuencia del pGEM-T Easy Vector, las secuencias obtenidas fueron analizadas con la herramienta BLASTn (NCBI 2022) considerando un valor de $E < 1 \times 10^{-5}$ y aciertos máximos de 98 a 100% para considerarse perteneciente a una especie en particular (Ross *et al.* 2008).

RESULTADOS

Rendimiento de ADN

La electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído permitió verificar la integridad del material genético en todos los tratamientos realizados (Figura 1). El análisis de varianza ($p \leq 0.05$) indica que el tiempo de incubación influye de forma significativa sobre el rendimiento del ADN obtenido, con diferencias altamente significativas derivadas del número de lavados realizados y del tipo de solvente utilizado (Tabla 2). Por otra parte, los tratamientos se tradujeron en diferencias en rendimiento de proteínas ($p \leq 0.05$), jugando un papel relevante el tiempo de incubación, al igual que el número de lavados y el solvente en la proteína obtenida. El rendimiento del ADN y de proteínas, no tuvieron evidencias de interacción entre los tratamientos, por lo que se puede inferir que el tiempo de incubación, lavados y tipo de solvente no tienen influencia entre sí (Tabla 2).

Los resultados de la cuantificación, señalan que el número de lavados reduce el rendimiento de ADN extraído y, a su vez el uso de C:I como solvente resulta en mayores rendimientos del ADN, aunque no hay diferencias estadísticas. Los rendimientos obtenidos en los diferentes tiempos de incubación fueron mayores en ausencia de incubación y más bajos con 10 y 30 min de incubación. Se evidencia que el mejor protocolo para obtener mayor rendimiento de ADN, no incluye tiempo de incubación a 50 °C, un solo lavado del polen y el uso de C:I como solvente (Figura 2A). El uso de C:I tuvo mayor rendimiento de las proteínas comparado con el rendimiento obtenido usando F:C:I (Figura 2B).

Los tratamientos con mayores rendimientos del ADN permitieron obtener valores de hasta 180 ng

μL^{-1} , y los tratamientos con menores rendimientos registraron rendimientos del ADN de hasta 120 ng μL^{-1} , es decir, hasta un 33% menos. El rendimiento de proteínas exhibió un comportamiento similar al del rendimiento del ADN; es decir, los valores más altos del rendimiento de proteínas se presentaron en aquellos tratamientos que tuvieron mayores rendimientos del ADN (Figura 2A y B), siendo ambos afectados por los mismos factores, indicando una fuerte asociación entre ambos tipos de moléculas. Los mayores valores de rendimiento de proteínas alcanzar hasta 2 mg mL^{-1} y los menores que se registraron fueron de hasta 1.32 mg mL^{-1} , es decir, hasta un 35% menos.

Índices 260/280 y 260/230

Se encontraron diferencias significativas en el índice 260/280 relacionadas a los diferentes solventes utilizados. También se detectó interacción entre los tiempos de incubación y el número de lavados (Tabla 2). En cuanto al índice 260/230, se encontró diferencia significativa relacionada con el tiempo de incubación, número de lavados del polen, y solvente utilizado; además de interacción entre los tiempos de incubación y número de lavados (Tabla 2). Los índices 260/280 más bajos se obtuvieron en aquellos tratamientos que no contaron con tiempo de incubación, alcanzando un valor medio de 1.8 cuando se incluyó un tiempo de incubación de 30 min, el cual es considerado óptimo (Figura 3A). Los índices 260/230 obtenidos fueron bajos, oscilando entre 1 y 1.3, aunque ninguna muestra obtuvo un índice 260/230 mayor a 1.8 para ser considerado aceptable (Figura 3B).

Amplificación del fragmento ITS2 y secuenciación

La amplificación de los fragmentos ITS2 por PCR ocurrió en todas las muestras de ADN obtenidas. De las 15 muestras enviadas a secuenciación, se obtuvieron secuencias cuyo tamaño estuvo entre 365 y 482 pares de base, de las cuales fue posible determinar la especie en 11 secuencias. En el análisis por medio de Blastn indicó que cuatro muestras presentaron un porcentaje de identificación menor al 98%, lo cual permite determinar únicamente el género, en la Tabla 3 se indica la especie

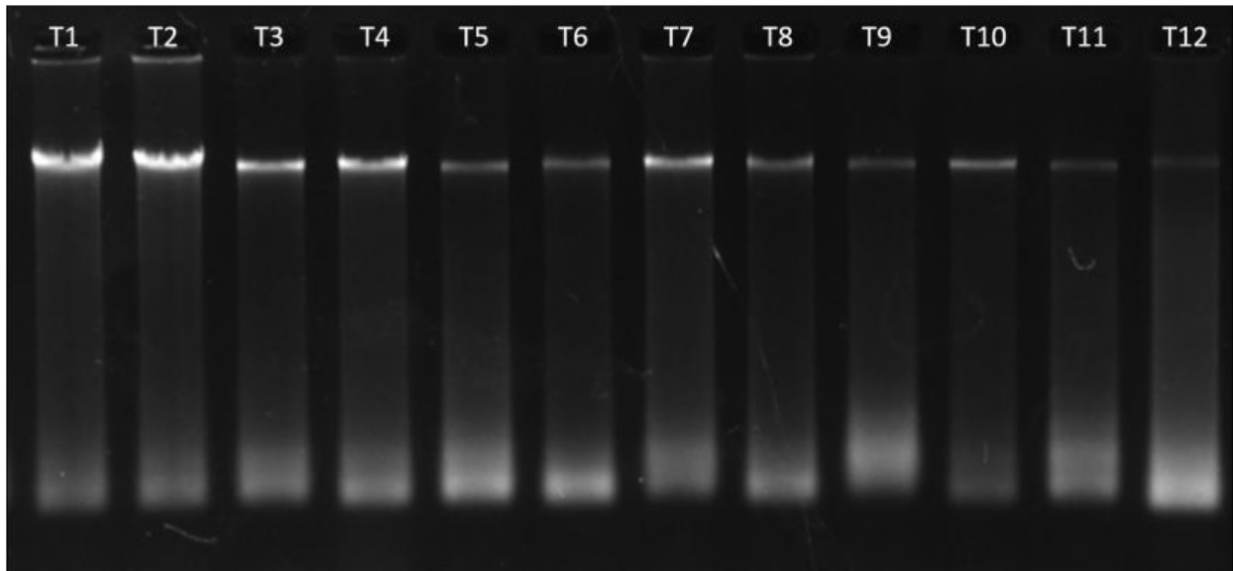


Figura 1. Gel de electroforesis de los ADN genómicos obtenidos en cada tratamiento (T1 a T12).

Tabla 2. Resultados del ANOVA de tres vías de cada una de las variables analizadas.

Factor	ADN p-value	Proteínas p-value	Índice 260/280 p-value	Índice 260/230 p-value
Incubación	0.07165*	0.046*	0.078	0.007**
Lavados	2.19x10-04**	1.69x10-4**	0.066	0.006**
Solvente	0.0022**	7.80x10-4**	0.020*	0.017*
Incubación*lavados	0.0521	0.093	0.0018**	0.002**
Incubación*solvente	0.22943	0.169	0.524	0.588
Lavados*solvente	0.29819	0.394	0.49	0.573
Incubación*lavados*Solvente	0.7463	0.770	0.129	0.661

*,** significativo y altamente significativo, respectivamente.

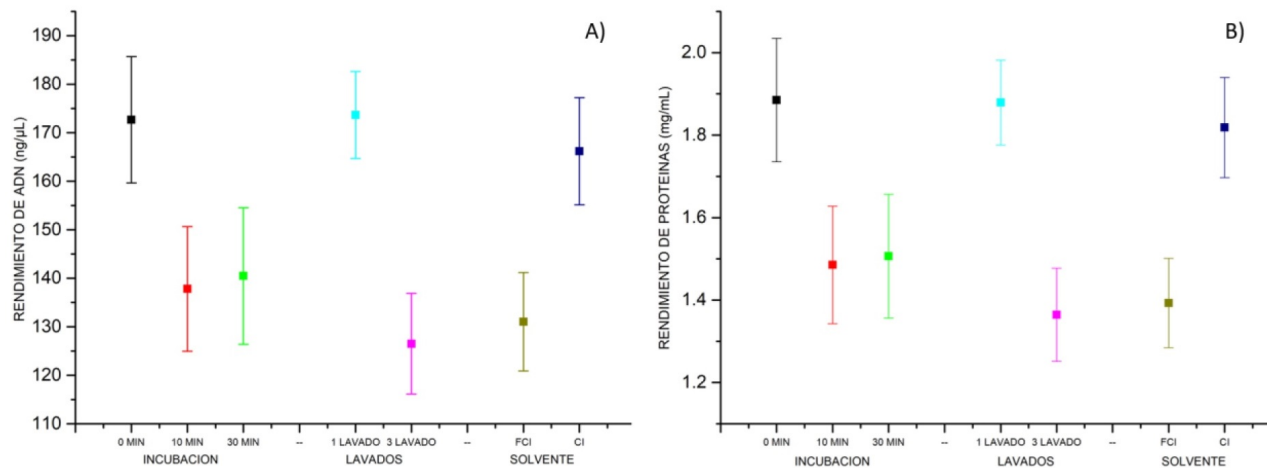


Figura 2. A) Rendimiento de ADN y B) Rendimiento de proteínas promedios obtenidos (+/- error estándar).

más probable. Tres muestras secuenciadas presentaron dos especies probables y, en cuatro mues-

tras se identificó una misma especie (*Melampodium divericatum*).

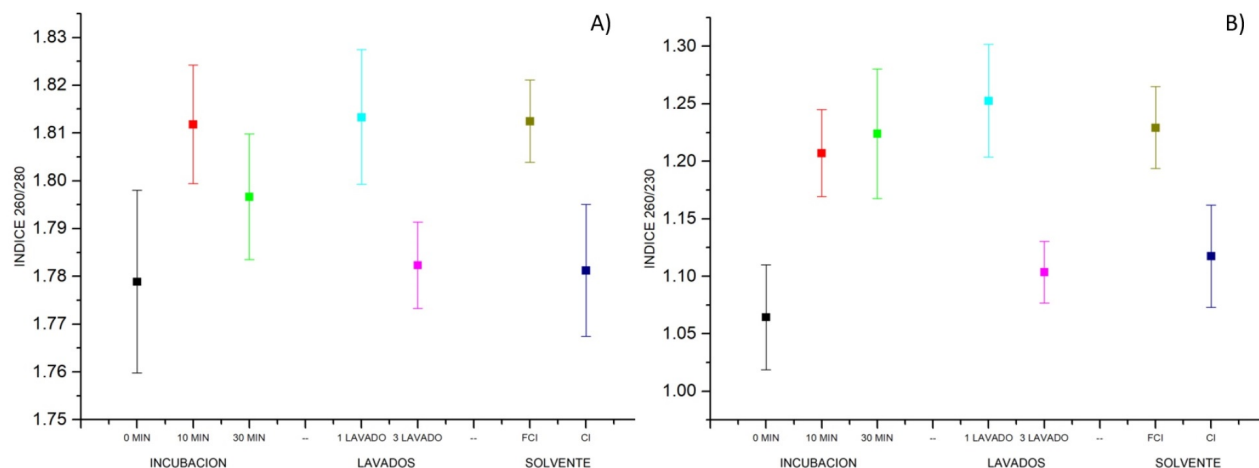


Figura 3. Medias de los índices A) 260/280 y B) 60/230 +/- error estándar.

Tabla 3. Especies identificadas por medio de Blastn.

Género	Especie	Nucleótidos idénticos	Porcentaje de identidad
<i>Helianthus</i>	<i>annus/maximilani</i>	479/495	96.77
<i>Bidens</i>	<i>alba/pilosa</i>	487/492	98.98
<i>Juglans</i>	<i>Regia</i>	437/453	96.47
<i>Brassica</i>	<i>Juncea</i>	441/445	99.1
<i>Alnus</i>	<i>Cordata</i>	482/498	96.79
<i>Melampodium</i>	<i>Divaricatum</i>	365/365	100
<i>Sigesbeckia</i>	<i>Orientalis</i>	423/468	90.4
<i>Melampodium</i>	<i>Divaricatum</i>	368/368	100
<i>Melampodium</i>	<i>Divaricatum</i>	383/383	100
<i>Melampodium</i>	<i>Divaricatum</i>	368/369	99.7
<i>Ageratum</i>	<i>conyzoides/houstonianum</i>	378/378	100

DISCUSIÓN

Rendimiento de ADN

La identificación molecular del origen botánico del polen apícola, requiere un método de extracción de ADN que permita obtener buenos rendimientos y la pureza necesaria para que no interfiera con los análisis posteriores. Uno de los principales retos a vencer en la extracción del ADN de polen apícola es lograr el rompimiento de la exina, la cual es una estructura dura que cubre los granos de polen (Thakur y Nanda 2020, Swenson y Gemeinholzer 2021).

Los protocolos que se han desarrollado, en su mayoría, incluyen mecanismos físicos para la ruptura de la exina, incluyendo el uso de proteinasas o de nitrógeno líquido junto al uso de kits comerciales (Galimberti et al. 2014, Tanaka et al. 2020). Además de los que incluyen el uso de DNAzol (Thermo Fischer Scientific) y amortiguador de extracción CTAB

(125 mM Tris-HCL, 50mM EDTA, 50 mM NaCL) (Torricelli et al. 2016, Manivanan et al. 2018). La mayoría de los reportes previos enfocados al estudio del polen apícola, analizan el polen que está contenido en la miel, lo cual hace necesario adicionar una metodología para extraer los granos de polen de la miel. Los protocolos que se han documentado para este objetivo incluyen ciclos de disolución de la miel en agua y una posterior centrifugación para sedimentar los granos de polen (Guertler et al. 2014, Bell et al. 2016, Manivanan et al. 2018). En este estudio, la extracción se realizó directamente con polen apícola, utilizando un protocolo basado en el uso del amortiguador de extracción CTAB.

El rendimiento del ADN obtenido en este trabajo oscila entre 120-180 ng μL^{-1} , a la fecha existen pocos estudios que permitan establecer una comparativa real. La mayoría los estudios palinológicos

con técnicas moleculares, parten de una muestra de miel a la cual se le extrae el polen y posteriormente realizan la extracción de ADN genómico, obteniendo rendimientos inferiores a $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Galimberti *et al.* 2014, Bruni *et al.* 2015, Torricelli *et al.* 2016). En este estudio se utilizó polen apícola, la cual es una mezcla compleja que contiene moléculas de distinta naturaleza. Un trabajo similar fue realizado por Galimberti *et al.* (2014) quienes extrajeron ADN genómico de polen apícola, utilizando un kit comercial (Plant DNeasy Isolation and Purification kit, Qiagen, Italy) y nitrógeno líquido permitió obtener rendimientos de hasta $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Índices 260/280 y 260/230

Los índices 260/280 y 260/230 son útiles en la detección de como proteínas, sales y polisacáridos en muestras de ADN; los cuales pueden inhibir e interferir con los análisis posteriores como la amplificación o secuenciación. La pureza del ADN puede ser afectada por varios componentes presentes en el polen apícola y las plantas en general, tales como polisacáridos, lípidos, polifenoles o bien compuestos químicos utilizados en la extracción. El índice 260/280 de 1.8 es indicativo que una muestra de ADN tiene alta pureza y es libre de proteínas y fenoles (Lucena-Aguilar *et al.* 2016, Abdel-Latif y Osman 2017). Durante la extracción del ADN, se liberan diversas sustancias endógenas contaminantes, sin embargo, el problema más común es la degradación del ADN genómico por la presencia de formas oxidadas de polifenoles, que se unen covalentemente al ADN dañándolo. El β -mercaptoetanol, que forma parte del amortiguador de extracción CTAB, es un fuerte agente reductor que previene la oxidación de los polifenoles en las muestras vegetales (Youssef *et al.* 2015).

En este estudio, el índice 260/280 se ubicó en el rango de 1.76 a 1.82, pudiendo resaltar la pureza del ADN extraído sin el uso de nitrógeno líquido. Se considera que un índice 260/280 de 1.93 a 2.27 indica niveles insignificantes de contaminación por proteínas, polisacáridos y ARN, y un nivel menor de 1.7 indica la presencia de fenol y otros contaminantes (Pervez *et al.* 2011, Abdel-Latif y Osman 2017, Safeena

et al. 2021). Las variaciones en el índice 260/280 son atribuibles al método de extracción. Este índice resultó más cercano a 1.8 cuando se realiza una incubación de 30 min a 50°C , lo cual disminuye los rendimientos de proteínas, mismas que aumentaron en caso de no realizar la incubación.

En cuanto al índice 260/230, es considerado por diversos autores como una medida secundaria de la pureza del ADN (Lucena-Aguilar *et al.* 2016), las muestras aquí analizadas presentaron valores entre 1.0 y 1.3. Estudios previos consideran que los valores aceptables del índice 260/230 oscilan entre 2.0 y 2.2, mientras que valores menores a 1.8 indican la contaminación con fenoles, compuestos orgánicos, EDTA, carbohidratos y polisacáridos (Lucena-Aguilar *et al.* 2016, Safeena *et al.* 2021). Existen cuestionamientos sobre la confiabilidad de este índice, debido a que el amortiguador de elución incrementa la concentración de sales en la muestra, reduciendo el índice 260/230 (Lucena-Aguilar *et al.* 2016). En este trabajo, la rehidratación del ADN se realizó con agua ultrapura, por lo que los bajos índices 260/230 son atribuibles a otros pasos de la extracción. A pesar del índice 260/230 bajo, la calidad del ADN genómico extraído fue suficiente para amplificar el fragmento ITS2. Estos resultados apoyan los cuestionamientos sobre la confiabilidad de este índice, a la fecha existen diferentes reportes que indican que un índice 260/230 bajo no interfiere en análisis moleculares basados en amplificación (Shepherd *et al.* 2015).

Amplificación del fragmento ITS2 y secuenciación

Los códigos de barras del ADN de origen plastídico (como *rbcL* y *matK*), presentan cierta problemática, debido al número variable de plástidos en diferentes especies y a los casos de herencia biparental, lo cual interfiere en la identificación (Bell *et al.* 2016). Sin embargo, han sido previamente utilizados de modo generalizado en estudios de identificación de polen apícola basado en métodos moleculares (Galimberti *et al.* 2014, Guertler *et al.* 2014, Manivanan *et al.* 2018, Tanaka *et al.* 2020, Milla *et al.* 2022).

A la fecha se reportan cinco marcadores como códigos de barras de ADN para la identificación de

plantas, tres de ellos (rbcL, matK e ITS2) tienen amplia aceptación en el Barcode of Life Database (BOLDSYSTEMS 2022). No obstante, el marcador y cebadores seleccionados pueden representar fuentes de sesgo durante la amplificación por PCR. Todos los marcadores presentan diferente tasa de amplificación en múltiples especies, frecuentemente es necesario rediseñar cebadores para un grupo taxonómico específico, lo cual conlleva a un sesgo en los amplicones producidos, donde el ADN blanco tiene fuentes muy diversas (Kraaijeveld *et al.* 2015, Bell *et al.* 2016). En estudios que involucran una especie o un número limitado de individuos, la combinación de múltiples locus puede resultar en mayor poder de discriminación. Sin embargo, en el caso del polen un análisis multilocus debe ir acompañado de un análisis bioinformático para determinar con mayor exactitud las especies presentes en la muestra.

En este trabajo se utilizó el marcador molecular ITS2 para la identificación de las especies de plantas. Este marcador no plastídico, puede presentar problemas debido a la ploidía de la especie en cuestión, pero al mismo tiempo ha demostrado tener mayor resolución taxonómica (Chen *et al.* 2010) y ser un discriminador eficiente entre especies en innumerables familias de plantas (Timpano *et al.* 2020). A pesar de su alta resolución específica en plantas, este marcador tiene la desventaja de potencialmente poder amplificar ADN fúngico (Bell *et al.* 2016, Timpano *et al.* 2020).

Los cebadores utilizados permitieron la amplificación del fragmento ITS2 en las muestras de ADN de cada uno de los tratamientos, lo cual resalta la buena calidad del ADN obtenido. Con relación a la universalidad de los cebadores ITS2, debido a que el polen apícola es una mezcla con diversos taxones representados, es de esperarse que algunos de ellos permitan la amplificación, no obstante, esto no implica mayor abundancia de una especie en particular, aunque si resalta que cuatro muestras resultaran en una misma especie (*M. diversicatum*). Entre las especies identificadas destaca *Alnus cordata*, considerada endémica de Italia (Smeriglio *et al.* 2019, Villani *et al.* 2021), junto con *Juglans regia* fueron las únicas especies arbóreas identificadas. Mientras que

el porcentaje de identidad de *A. cordata* es marcadamente bajo, por lo cual hay duda sobre su identidad a nivel específico. La mayoría de las especies identificadas son consideradas herbáceas no perennes, entre las que se identificó a *Ageratum conyzoides* especie considerada tóxica (Kotta *et al.* 2020).

La secuenciación de las muestras se realizó con la técnica de Sanger, la cual es útil para hacer inferencias en una escala detallada, pero es impráctica en la aplicación de estudios metagenómicos. La tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) permite la secuenciación de alto rendimiento para realizar análisis metagenómicos, permitiendo el estudio a nivel bioma, incluyendo a los organismos de un hábitat específico. Otros autores han reportado estudios metagenómicos donde la identificación a nivel especie es limitada o nula (Richardson *et al.* 2015, Tanaka *et al.* 2020). A la fecha diversos estudios con ADN genómico de polen demuestran que una herramienta eficiente para el monitoreo ambiental, ya que permite detectar no solo de la flora relevante en la alimentación de las abejas, sino también la identificación de plantas tóxicas (Bruni *et al.* 2015), alergénicas (Kraaijeveld *et al.* 2015), invasoras (Noël *et al.* 2023) y transgénicas (Wu *et al.* 2017, Bayram 2021).

CONCLUSIONES

Las modificaciones realizadas al protocolo de extracción del ADN basado en CTAB, tuvieron efectos en el rendimiento de ADN genómico y la contaminación por proteínas. En términos generales, realizar un lavado y el uso de cloroformo-alcohol isoamílico resultaron en mayor rendimiento del ADN genómico con calidad suficiente para realizar la amplificación del marcador ITS2 y la identificación de especies de plantas. La información es importante para hacer eficiente el uso de recursos y tiempo para extraer ADN genómico de polen apícola. Este método permite la identificación de especies de relevancia ecológica para las abejas y demás polinizadores. Además, su utilidad puede extrapolarse al monitoreo de hábitats para la detección de especies de plantas invasoras, transgénicas, alergénicas, entre otras.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

(CONACYT) por el financiamiento del proyecto
FSSEP02-C-2018-2-A1-S-44946.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Latif A, Osman G (2017) Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant methods* 13: 1-9. DOI: 10.1186/s13007-016-0152-4.
- Bayram NE (2021) Molecular approach to detecting pollen types in honey: DNA barcoding. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 49: 37-41.
- Bell KL, de Vere N, Keller A, Richardson RT, Gous A, Burgess KS, Brosi BJ (2016) Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects. *Genome* 59: 629-640. DOI: 10.1139/gen-2015-0200.
- BOLDSYSTEMS (2022) Barcode of life data systems. <https://www.boldsystems.org/>. Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2022.
- Bruni I, Galimberti A, Caridi L, Scaccabarozzi D, de Mattia F, Casiraghi M, Labra M (2015) A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food chemistry* 170: 308-315.
- Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS one* 5: e8613. DOI: 10.1371/journal.pone.0008613.
- Clarke D, Morley E, Robert D (2017) The bee, the flower and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. *Journal of Comparative Physiology A* 203: 737-748.
- Galimberti A, de Mattia F, Bruni I, Scaccabarozzi D, Sandionigi A, Barbuto M, Casiraghi M, Labra M (2014) A DNA barcoding approach to characterize pollen collected by honeybees. *PLoS One* 9: e109363. DOI: 10.1371/journal.pone.0109363.
- Guertler P, Eicheldinger A, Muschler P, Goerlich O, Busch U (2014) Automated DNA extraction from pollen in honey. *Food Chemistry* 149: 302-306.
- Kieliszek M, Piwoń K, Kot AM, Błażej S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I (2018) Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology* 71: 170-180.
- Kraaijeveld K, de Weger LA, Ventayol García M, Buermans H, Frank J, Hiemstra PS, den Dunnen JT. (2015) Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. *Molecular ecology resources* 15: 8-16.
- Kotta JC, Lestari ABS, Candrasari DS, Hariono M (2020) Medicinal effect, *In silico* bioactivity prediction, and pharmaceutical formulation of *Ageratum conyzoides* L.: A Review. *Scientifica* 6420909. DOI: 10.1155/2020/6420909.
- Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Avila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R (2016) DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking* 14: 264-270.
- Manivanan P, Rajagopalan SM, Subbarayalu M (2018) Studies on authentication of true source of honey using pollen DNA barcoding. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6: 255-261.
- Milla L, Schmidt-Lebuhn A, Bovill J, Encinas-Viso F (2022) Monitoring of honey bee floral resources with pollen DNA metabarcoding as a complementary tool to vegetation surveys. *Ecological Solutions and Evidence* 3: e12120. DOI: 10.1002/2688-8319.12120.

- NCBI (2022) National Center for Biotechnology Information. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2022.
- Noël G, Mestrez A, Lejeune P, Francis F, Kawai J, Miwa M, Uehara K, Nagase A (2023) Pollen meta-barcoding reveals different community structures of foraged plants by honeybees (*Apis mellifera* L.) along space-time gradient in Japan. *Urban Forestry & Urban Greening* 79: 127794. DOI: 10.1016/j.ufug.2022.127794.
- Pervaiz ZH, Turi NA, Khaliq I, Rabbani MA, Malik SA (2011) Methodology: a modified method for high quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants. *Genetics and Molecular Research* 10: 1669-1673.
- Richardson RT, Lin C, Sponsler DB, Quijia JO, Goodell K, Johnson RM (2015) Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Applications in plant sciences* 3: 1400066. DOI: 10.3732/apps.1400066.
- Ross HA, Murugan S, y Sibon Li WL (2008) Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology* 57: 216-230.
- Safeena MIS, Dissanayake Y, Zakeel MCM, Warnakula L, Cooray R, Dayarathna DARK (2021) An improved method for efficient recovery of high quality DNA from date palm (*Phoenix dactylifera* L; *Arecaceae*). *MethodsX* 8: 101384. DOI: 10.1016/j.mex.2021.101384.
- Sharma R, Mahla HR, Mohapatra T, Bhargava SC, Sharma MM (2003) Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 43-50.
- Shepherd ML, Swecker Jr WS, Ponder MA (2015) Effect of two different commercial DNA extraction kits on the bacterial 16S ribosomal RNA gene denaturing gradient gel electrophoresis profile of Arabian gelding feces. *Journal of Equine Veterinary Science* 35: 165-169.
- Shneyer VS, Rodionov AV (2019) Plant DNA Barcodes. *Biology Bulletin Reviews* 9: 295-300.
- Smeriglio A, D'Angelo V, Denaro M, Trombetta D, Raimondo FM, Germanó MP (2019) Polyphenol characterization, antioxidant and skin whitening properties of *Alnus cordata* stem bark. *Chemistry & Biodiversity* 16: e1900314. DOI: 10.1002/cbdv.201900314.
- Swenson SJ, Gemeinholzer B (2021) Testing the effect of pollen exine rupture on metabarcoding with Illumina sequencing. *Plos one* 16: e0245611. DOI: 10.1371/journal.pone.0245611.
- Tanaka K, Nozaki A, Nakadai H, Shiwa Y, Shimizu-Kadota M (2020) Using pollen DNA metabarcoding to profile nectar sources of urban beekeeping in Kōtō-ku, Tokyo. *BMC Research Notes* 13: 515. DOI: 10.1186/s13104-020-05361-2.
- Thakur M, Nanda V (2018) Assessment of physico-chemical properties, fatty acid, amino acid and mineral profile of bee pollen from India with a multivariate perspective. *Journal of Food & Nutrition Research* 57: 328-340.
- Thakur M, Nanda V (2020) Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology* 98: 82-106.
- Timpano EK, Scheible MKR, Meiklejohn KA (2020) Optimization of the second internal transcribed spacer (ITS2) for characterizing land plants from soil. *PLoS One* 15: e0231436. DOI: 10.1371/journal.pone.0231436.
- Torricelli M, Pierboni E, Tovo GR, Curcio L, Rondini C (2016) In-house Validation of a DNA Extraction Protocol from Honey and Bee Pollen and Analysis in Fast Real-Time PCR of Commercial Honey Samples Using a Knowledge-Based Approach. *Food Analytical Methods* 9: 3439-3450.
- Végh R, Csóka M, Sörös C, Sipos L (2021) Food safety hazards of bee pollen-A review. *Trends in Food Science & Technology* 114: 490-509.

- Villani F, Castellana S, Beritognolo I, Cherubini M, Chiocchini F, Battistelli A, Mattioni C (2021) Genetic variability of *Alnus cordata* (Loisel.) duby populations and introgressive hybridization with *A. glutinosa* (L.) Gaertn. in Southern Italy: Implication for conservation and management of genetic resources. *Forests* 12: 655. DOI: 10.3390/f12060655.
- Wu Y, Yang Y, Liu M, Wang B, Li M, Chen Y (2017) Molecular tracing of the origin of six different plant species in bee honey using real-time PCR. *Journal of AOAC International* 100: 744-752.
- Youssef M, Valdez-Ojeda R, Ku-Cauich JR, Escobedo-GraciaMedrano RM (2015) Enhanced protocol for isolation of plant genomic DNA. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences* 4: 172-180.