

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



**“Efecto del Método de Conservación de Muestras de *Quercus spp*, sobre
la Extracción, Amplificación y Secuenciación de ADN”**

Por:

FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Agosto de 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Efecto del Método de Conservación de Muestras de *Quercus spp*, Sobre Extracción,
Amplificación y Secuenciación de ADN

Por:

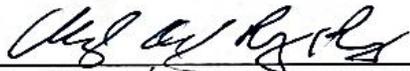
FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TESIS

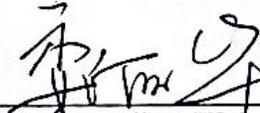
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

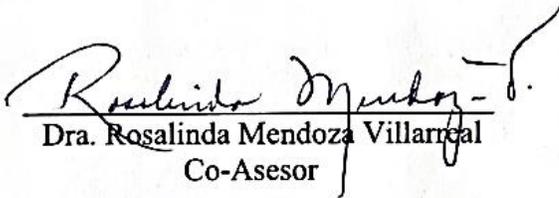
Aprobada por el Comité de Asesoría:



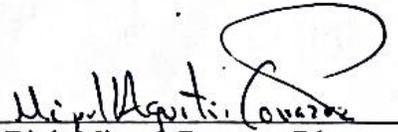
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor Principal Interno



Dra. Lihua Wei
Asesor Principal Externo



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Co-Asesor



Biol Miguel Carranza Pérez
Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Efecto del Método de Conservación de Muestras de *Quercus spp*, Sobre Extracción,
Amplificación y Secuenciación de ADN

Por:

FRANCISCO JAVIER HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el
título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:

M.C. Fidel Maximiano Peña Ramos
Presidente

Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Secretario

Dra. Lihua Wei
Sinodal

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto 2022

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Francisco Javier Hernández Hernández
Autor Principal

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN)**. Por todos los años que pertencí a la mejor casa de estudios, por todas las facilidades y oportunidades brindadas, en donde me recibieron con los brazos abiertos y siempre con la mejor disposición de ayudar, impulsándome a conseguir el éxito ¡BUITRES POR SIEMPRE!

Al **Departamento de Botánica**; Laboratorio de Zoología, por abrirme las puertas para poder desarrollarme tanto de forma teórica como práctica, y así poder desarrollar y aprender nuevas técnicas y habilidades para la complementación de mi formación profesional.

Al **Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez**, por su entero profesionalismo y disposición en el desarrollo de este proyecto, por la confianza que depositó en mi desde el primer día de trabajo y por todos los conocimientos transmitidos en este lapso de tiempo, guiándome para lograr llegar a una conclusión satisfactoria de mis estudios de licenciatura. Por mostrar su lado más humano al brindarme un trato más que alumno – profesor, llegando a considerarlo mi amigo, ayudándome en lo personal con consejos y llamadas de atención que nunca estuvieron de más, pero sobre todo por todos los momentos de diversión y risas que pasamos dentro y fuera del laboratorio, las bromas, los chistes y las reuniones. Una eterna gratitud porque el proceso no fue sencillo, pero siempre estuvo ahí, en todo momento para brindarme la mano, y por todo lo que no puedo escribir, mis más sinceros agradecimientos a mi buen amigo MIGUEL.

A la **Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes**, por todos los conocimientos transmitidos en este proceso, por su interminable paciencia durante las enseñanzas y la convivencia diaria. Pero sobre todo por ser de gran ayuda incluso más allá de lo académico, gracias a los regaños y consejos dados, las risas que siempre estaban a la orden del día, por permitirme llamarla mi amiga, muchas gracias Florecita.

Al **Jardín Botánico**. A los encargados de dicha área dentro de la Universidad. Especialmente al **Ing., Froylan Meráz Saavedra** por el gran apoyo técnico durante las colectas en campo con alta relevancia en este estudio presente.

A todos mis **compañeros** de generación CXXXII por esas grandes amistades, la confianza, por todos los momentos buenos y malos que se vivieron juntos.

DEDICATORIA

A mis padres **FLOR MARÍA HERNÁNDEZ VÁSQUEZ** y **JOSÉ ARTURO HERNÁNDEZ DÍAZ** por haberme dado ese amor y ese apoyo incondicional desde el primer día de mi vida, sin importar los sacrificios que esto conllevó para ustedes, han sido mi guía en todo, ofreciéndome siempre un consejo, un regaño, un abrazo o palabras que me ayudan a seguir. Siempre han sido motivo de orgullo para mí, fundaron las bases de la gran familia que somos con los valores como estandarte, pero sobre todo con amor.

A mi hermana **YOLANDA** y a mi cuñado **ALEJANDRO**, por abrirme las puertas de su casa en cuando decidí emprender este viaje a Saltillo, brindándome un segundo hogar lleno de cariño y comprensión, por su apoyo, pero sobre todo por ser una guía para mi superación personal. A su lado fue más fácil llevar todo este proceso.

A mis hermanos **LAURA** y **CARLOS** por ser mis compañeros de vida en aventuras, por todo lo que pasamos juntos, los juegos, las peleas y los momentos de reflexión. Marcando un posible camino a seguir con sus consejos y palabras de aliento.

A mis sobrinos **KAMILA, XIMENA, CESAR** y **JAVIER ANTONIO** por todas las alegrías que nos hacen pasar en la familia, su llegada sin lugar a dudas marco la vida de todos.

A **ULISES NERI, DIEGO PARRA, BRAYAN AMAYA, LUIS RODRIGO, JUAN JOSÉ** y **JUAN DE DIOS** se convirtieron en parte de mi familia, pasamos mil aventuras juntos, me apoyaron en todo momento sin importar las circunstancias, por todos esos momentos de diversión que se presentaron en nuestro recorrer juntos, todo eso se quedara para siempre conmigo. Por sus palabras de aliento, su apoyo tanto en lo personal como en lo académico, pero sobre todo por enseñarme a ver que después de todo la vida no es tan seria. Gracias a mis **MEJORES AMIGOS**.

A mis amigos y compañeros de laboratorio **FABIOLA SUAREZ, ARACELI, MARIEL, SOFIA, ANEL, SANTIAGO** y **HUGO** a su lado fue más fácil llevar todo este proceso de aprendizaje, haciendo los días más divertidos con todas las risas que nunca faltaron. Por su ayuda, pero sobre todo por la amistad que me ofrecieron.

A **TODOS** aquellos que me apoyaron, que estuvieron conmigo, pero me sería difícil agradecer, este logro también lo comparto con ustedes.

ÍNDICE

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIA.....	III
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
PALABRAS CLAVE.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivo general.....	3
1.3 Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Familia Fagaceae.....	4
2.2 Género <i>Quercus</i>	6
2.2.1 Género <i>Quercus</i> en México.....	7
2.2.2 Género <i>Quercus</i> en Coahuila.....	9
2.2.3 Problemáticas en la taxonomía de <i>Quercus</i>	11
2.3 Códigos de barras de ADN.....	13
2.4 Marcadores utilizados como códigos de barras de ADN.....	14
2.5 Metodología para producir códigos de barras de ADN.....	16
2.6 Importancia de las muestras de herbario.....	18
2.7 Extracción de ADN de muestras vegetales frescas y de herbario.....	20

2.8 Parámetros importantes en la calidad de ADN extraído.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Colecta de material vegetal y establecimiento de tratamientos	23
3.2 Extracción de ADN.....	25
3.3 Amplificación	26
3.4 Cuantificación de ADN.....	27
3.5 Análisis de varianza	27
3.6 Índices A260/A280 y A260/A230	27
3.7 Secuenciación	28
3.8 Análisis de código de barras de ADN.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Colecta de material vegetal.....	29
4.2 Eficiencia en la extracción y amplificación.....	33
4.3 Secuenciación	36
4.4 Cuantificación de concentración de ADN y proteínas.....	36
4.5 Análisis de varianza (ANOVA).....	37
4.6. Análisis de pureza de ADN	39
4.7 Análisis de códigos de barras de ADN	42
5. DISCUSIÓN.....	47
6. CONCLUSIONES.....	52
7. BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.	22
Tabla 2. Componentes de la Mezcla para la reacción de PCR.	26
Tabla 3. Cebadores y programa de PCR utilizados para la amplificación de ADN.	26
Tabla 4. Especies, sección y ubicación geográfica de muestras colectadas.	29
Tabla 5. Porcentajes de extracción y amplificación en tres tratamientos analizados y muestras de herbario.	36
Tabla 6. Medias de concentración de ADN y proteína en cada uno de los tratamientos. ...	37
Tabla 7. Resultado del análisis de varianza de dos vías	38
Tabla 8. Delimitación y porcentajes de identidad a nivel de género	44
Tabla 9. Resumen de variabilidad de la región ITS2 en género Quercus.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución generalizada de Fagaceae.....	5
Figura 2. Resumen de la filogenia de Fagaceae	6
Figura 3. Regiones prioritarias de conservación del Bosque Mesófilo de Montaña en México	8
Figura 4. Distribución del género <i>Quercus</i> en el estado de Coahuila.	10
Figura 5. Características de la sección <i>Quercus</i>	23
Figura 6. Características de la sección <i>Lobatae</i>	24
Figura 7. Especímenes depositados como respaldo en Herbario ANSM.....	33
Figura 8. Genómicos de muestras en tratamiento con etanol.....	34
Figura 9. Genómicos de muestras de herbario	34
Figura 10. Productos de PCR de muestras conservadas en alcohol	35
Figura 11. Productos de PCR de muestras de herbario	35
Figura 12. Medias de la concentración de ADN en todos los tratamientos estudiados.....	38
Figura 13. Medias de la concentración de proteína en todos los tratamientos estudiados ..	39
Figura 14. Pureza de las muestras mediante espectrofotometría relación A260/A280.	40
Figura 15. Pureza de las muestras mediante espectrofotometría relación A260/A230.	41
Figura 16. Electroferograma de mala calidad.....	42
Figura 17. Electroferograma <i>Quercus hypoxantha</i>	43
Figura 18. Alineamiento de secuencias de referencia y de consulta	45
Figura 19. Árbol filogenético de encinos mexicanos usando la región ITS2.....	46

RESUMEN

El género *Quercus* es de gran importancia en México, representa una gran oportunidad económica debido a su alto aprovechamiento como biomasa, madera y en algunos casos incluso como fuente de alimentos, sin embargo, no podemos dejar de lado su impacto ambiental, porque representa la diversificación de los ecosistemas ayudando a la proliferación de la vida silvestre. Es por ello que es suma importancia el tener un registro de todas las posibles especies que se localizan en el territorio nacional, esto puede ser posible gracias a los códigos de barras de ADN, que consisten en el análisis molecular de especímenes seleccionados, partiendo de una clasificación taxonómica, extracción de ADN genómico, amplificación con cebadores aceptados por CBOL en este caso ITS2, su posterior secuenciación y la realización de un análisis filogenético que derive en la discriminación a nivel especie. Es importante el desarrollar este tipo de estudios porque datos reportados en BOLDSYSTEMS mencionan que solamente un 5% de los encinos mexicanos cuentan con una secuencia en código de barras.

A su vez recalcar la importancia de la calidad del ADN extraído de los especímenes, todo esto basándonos en parámetros establecidos por estudios anteriores, siendo uno de los más destacados los índices de absorbancia A260/A280 y A230/A260, estos nos ayudan a discernir si las muestras obtenidas son óptimas para realizar todos los análisis posteriores que se requieran, además de que nos ayuda a conocer los efectos que pueden tener sobre el ADN, los métodos de conservación y los tratamientos que los herbarios aplican sobre las plantas.

PALABRAS CLAVE

Extracción, Herbario, Código de barras, ITS, ITS2, cebador, *Fagaceas*, *Quercus*, *Lobatae*.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Fagaceae incluye más de 1000 especies de árboles y arbustos, como los familiares robles (género *Quercus*), hayas (*Fagus*) y castaños (*Castanea*), que están muy extendidos en el hemisferio norte. Sin embargo, la familia también incluye géneros relacionados como *Castanopsis* y *Lithocarpus* que comprenden cientos de especies en Asia, mientras que las hayas del sur pertenecen a una familia estrechamente relacionada (Nothofagaceae) distribuida en América del Sur y Australasia (Wheeler & Sederoff, 2009). Se compone principalmente por árboles o arbustos monoicos, perennifolios o caducifolios. Cuentan con pelos simples, capitados, fasciculados o estrellados, glandulares o no, rara vez con collares resiníferos o escamas en hoyos del envés de las hojas. Estas son simples, pecioladas, estipuladas, alternas, raramente se encuentra verticiladas en verticilos de tres; cuentan con margen entero, almenado, aserrado o sinuoso; con estipulas caducas, que raramente persisten o a veces adheridas peltadamente. Sus inflorescencias son pendulares, muy pocas veces erectas o reducidas en espigas, cabezuelas o cimulos, o reducidas a flores solitarias (Kubitzki, 1993). El género *Quercus* dentro de la familia Fagaceae, es el que presenta la mayor distribución alrededor del mundo. Se encuentran casi en todos los bosques templados del hemisferio norte, así como en regiones tropicales y subtropicales del mismo, algunas especies existen incluso en hábitats más secos, como en el sureste de Asia y el nororiente de África. En el continente americano se localizan desde Canadá hasta Colombia. Se reconocen dos centros de diversidad para el género, el primero se localiza en el sureste de Asia con alrededor de 125 especies (Govaerts & Frodin, 1998). El segundo se presenta en México, particularmente en las regiones montañosas, en donde forman parte importante de los bosques templados (Govaerts & Frodin, 1998).

El código de barras de ADN fue ampliamente anunciado como una herramienta revolucionaria de descubrimiento taxonómico, porque representa quizás el marco más confiable disponible para organizar especímenes y datos basados en especímenes para la investigación sistemática. La disposición de los especímenes por haplotipo de código de barras al principio del proceso de estudio permite una inspección eficiente

del material y facilita la organización y gestión de una gran cantidad de datos de caracteres e información del historial de vida, según la cantidad disponible para los especímenes con código de barras. Si bien las secuencias de ADN se han utilizado para identificar especímenes o partes de especímenes desde la década de 1980, su uso como una herramienta de historia natural más amplia no se formalizó hasta 2003 (Hebert *et al.*, 2003). Desde sus inicios el código de barras de ADN fue visto como un programa de gran ciencia o el renacimiento de la taxonomía, sin embargo, la secuencia de la citocromo oxidasa 1 (CO1), que se ha desarrollado como un código de barras universal en animales, no discrimina a la mayoría de las plantas debido a una tasa de mutación más lenta (Kress *et al.*, 2009). Aunque muchos estudios han buscado un código de barras de planta universal, ninguno de los loci disponibles funciona en todas las especies (Chase & Fay, 2009; Chen *et al.*, 2010). El Consortium for the Barcode of Life-Plant Working Group (CBOL) recomendó recientemente la combinación de dos locus de matK + rbcL como el mejor código de barras de plantas con una eficiencia discriminatoria de solo el 72 % (Group *et al.*, 2009) (CBOL Plant Working Group, 2009). Los taxónomos han sugerido que puede ser necesario un método multi-locus para discriminar especies de plantas (Chase *et al.*, 2007; Hebert *et al.*, 2003). Sin embargo, CBOL demostró que el uso de múltiples loci no mejoró claramente la capacidad de discriminación a nivel de especie de estas técnicas (CBOL Plant Working Group, 2009)(Group *et al.*, 2009).

Ha de manera de presentar una visión diferente, el grupo BOL de plantas de China argumento recientemente que cuando la secuenciación directa era posible, la región ITS debería incorporarse en los códigos de barras principales debido a su mayor poder discriminatorio que los códigos de barras de plastidios. Para resolver las dificultades involucradas en la secuenciación de todo el ITS, sugirieron ITS2 como respaldo debido a sus caracteres de secuencia conservados que reducen los problemas de amplificación y secuenciación. Se aceptó que ITS2 podría usarse como un nuevo código de barras universal para la identificación de una gama más amplia de taxones de plantas (Gao *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013) incluso en especímenes de herbario con ADN degradado (Chiou *et al.*, 2007).

1.1 Hipótesis

Existen diferencias en la calidad del ADN, amplificación y secuenciación de ADN, extraído a partir de muestras vegetales con diferente método de conservación.

1.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de la conservación de una muestra vegetal en la purificación de ADN

1.3 Objetivos específicos

1. Determinar la calidad del ADN obtenido de una muestra vegetal en cuatro diferentes tratamientos de conservación
2. Determinar el impacto de cuatro diferentes tratamientos de conservación de muestras vegetales en la amplificación del ADN
3. Determinar el impacto de cuatro diferentes tratamientos de conservación de muestras vegetales en la secuenciación de amplicones y el uso de estas secuencias

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Familia Fagaceae

Las Fagaceas son una familia de angiospermas, con especies presentes por todo el hemisferio norte, abarcando desde regiones tropicales hasta las boreales. Los robles (*Quercus*), castaños (*Castanea*) y hayas (*Fagus*) son los únicos géneros que se distribuyen en Asia, Europa y América del Norte, donde cubren bosques continuos muy grandes y constituyen importantes recursos forestales que se aprovechan para una amplia gama de usos (biomasa, fibra, productos de madera y alimentos). Además de sus contribuciones a la economía, son especies clave en los ecosistemas forestales y son los principales impulsores de la biodiversidad terrestre en sus ecosistemas. En la mayoría de los países, también se consideran importantes recursos patrimoniales y culturales (Logan, 2005). Independientemente de la importancia económica, ecológica y cultural que esta familia representa, la investigación genética en las fagaceas tiene menos interés que en las coníferas, esto debido a las limitaciones biológicas (largo periodo de generación y su longevidad) (Kremer *et al.*, 2012). Las pocas investigaciones de procedencias en robles se iniciaron en el siglo XX por Cieslar en 1923 y ha continuado a lo largo del siglo XX por Kleinschmit en 1993. La genómica en las Fagaceae comenzó con el mapeo de enlaces en castaño (Kubisiak *et al.*, 1997), roble (Lexer *et al.*, 1998) y haya (Scalfi *et al.*, 2004) y más tarde con el mapeo comparativo entre robles y castaños (Barreneche *et al.*, 2004; Casasoli *et al.*, 2006).

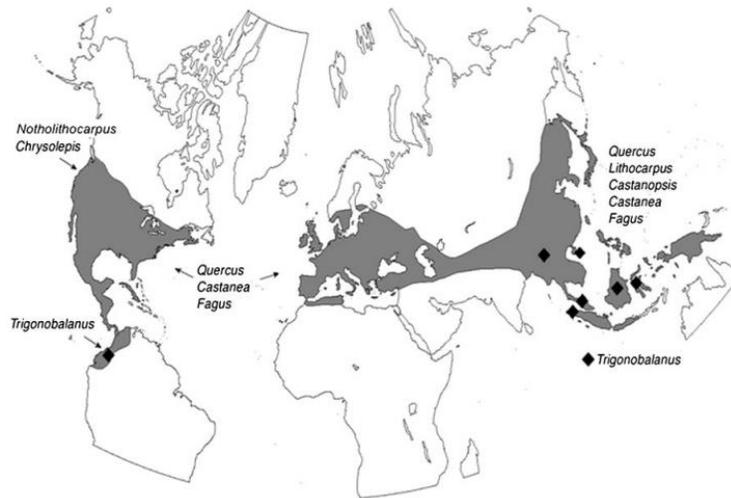


Figura 1. Distribución generalizada de Fagaceae (adaptado de Manos y Stanford 2001).

Esta familia de angiospermas comprende de ocho a diez géneros y un aproximado de 900 especies leñosas, de igual manera abarca dos grupos morfológicos muy diversos que se localizan en una gran variedad de hábitats en todo el hemisferio norte (Kremer *et al.*, 2012). Estas floras templadas, subtropicales y semiáridas son muy ricas en especies de *Quercus* (alrededor de 415), mientras que los bosques más cálidos del sudeste asiático son comparativamente diversos en los géneros de castaños *Lithocarpus* (300 especies) y *Castanopsis* (120 especies). La disparidad en el tamaño de los clados es sorprendente en Fagaceae, ya que al menos 4 géneros tienen menos de 12 especies (Manos & Stanford, 2001). El Museo Sueco de Historia Natural puntualizó que el linaje formado por el género *Fagus* (aprox.10 especies) es muy contrastante comparado con su linaje hermano el género *Quercus* (600 especies) que es altamente diverso.

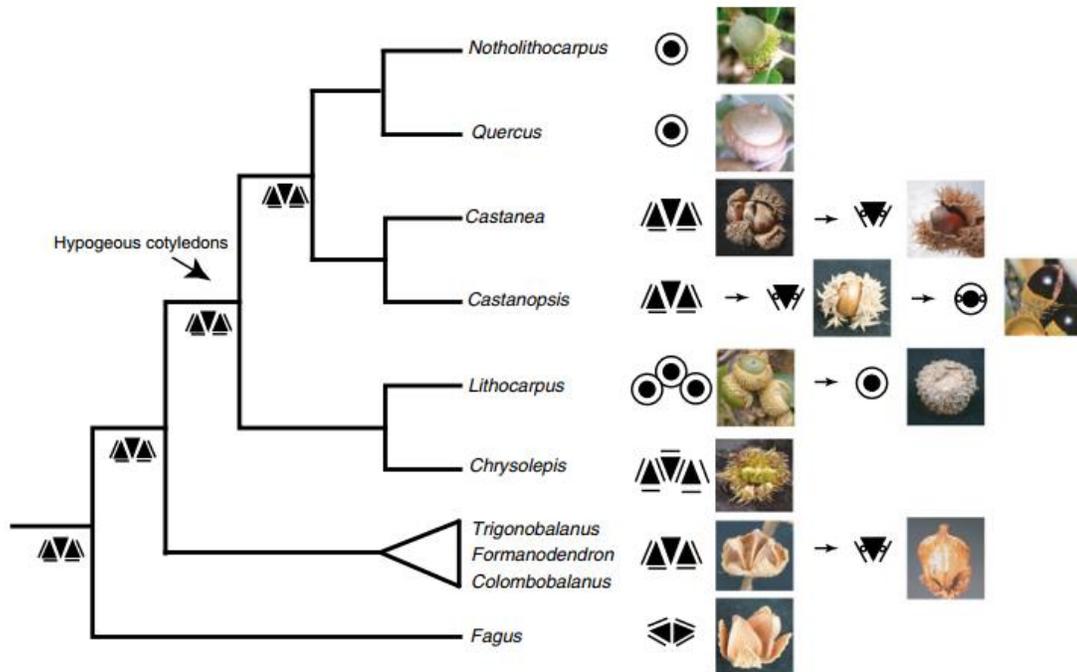


Figura 2. Resumen de la filogenia de Fagaceae con un conjunto de diagramas e imágenes de tipos representativos de cúpula/fruto (adaptado de Manos et al. 2008).

Estas diferencias en las tasas de especiación han sido discutidas a fondo, evidenciando que, si bien las frutas parecidas a bellotas han evolucionado independientemente varias veces, no se asocian directamente con mayores tasas de diversificación (Petit *et al.*, 2013). Este fenómeno de innovaciones clave en frutos se comprende mejor analizando a la familia Fagaceae en las áreas tropicales y subtropicales donde se produce la mayor riqueza de especies, es decir, el sudeste de Asia y México

2.2 Género *Quercus*

Para el género *Quercus*, el más grande de la familia Fagaceae, Nixon (1993), reconoce dos subgéneros en este taxón, que son *Quercus* y *Cyclobalanopsis*, al primero lo divide en tres secciones: Lobatae, Protobalanus y *Quercus*, estando presentes las tres en

México. El clado *Quercus* se ha denominado como el de los robles del nuevo mundo con robles rojos y negros (Lobatae), robles de copa oro (Protobalanus) y los robles blancos (*Quercus*). Bajo este concepto se enfatiza un origen putativo y una posterior diversificación en las Américas, seguido de por al menos una dispersión de un grupo ancestral de robles blancos a Eurasia que dio lugar a encontrar una mínima de 20 especies en la sección *Quercus* (por ejemplo, *Quercus robur*, *Quercus mongólica*). Por otro lado, el clado Cyclobalanopsis es estrictamente de la región Euroasiática y une dos grupos: los robles Cerris (50 especies) y los robles tropicales de hoja perenne Cyclobalanopsi (90 especies) (Denk & Grimm, 2010).

El género *Quercus* (L), comprende arbustos o árboles que tienen hojas alternas simples y de madera muy característica, flores que se polinizan por el viento, su fruto son las bellotas y tienen una longevidad importante. Estos árboles varían de tamaño que van desde especies arbustivas pequeñas hasta robles con grandes alturas, teniendo el registro como el árbol más alto de este género, un roble negro que se localiza en Warrensville Heights, Ohio con medidas de 37.5 metros de altura.

2.2.1 Género *Quercus* en México

Quercus es el género en la familia Fagaceae que presenta mayor distribución mundial. Es posible encontrarlo en todos los bosques templados del hemisferio norte, así como en zonas tropicales y subtropicales del mismo. El sureste de Asia y México son reconocidos como los dos centros de diversidad de este género, el primero cuenta con alrededor de 125 especies (Govaerts & Frodin, 1998); el número de especies para México no se conoce con exactitud, pero existen autores que dan cifras aproximadas como las descritas por Trelease (1924) que calcula que hay alrededor de 253 especies. Por otra parte, las estimaciones de Nixon (1993) arrojan entre 135 y 150 especies, otras cifras registradas son las de Gonzales (1993) quien considera que en el territorio mexicano hay entre 173 y 213 especies del género *Quercus*.

El bosque mesófilo de montaña incluye un conjunto de comunidades heterogéneas que difieren en cuanto a la fisiografía en la que se desarrollan, en su estructura y composición florística. Una característica importante de este ecosistema es la mezcla de elementos de afinidad boreal y tropical (González-Espinosa *et al.*, 2012). Con una distribución natural de forma fragmentada en las regiones de montaña y húmedas de México se estima que ocupa entre el 0.5% y 7% del territorio nacional (Cruz-Cárdenas *et al.*, 2012), su límite norte se encuentra en el estado de Nuevo León, en la región del oeste se localiza desde Sinaloa hasta Chiapas, así como en las regiones más húmedas de la Faja Volcánica Transmexicana (Cruz-Cárdenas *et al.*, 2012) y una pequeña área que se localiza en el municipio de Huimanguillo, Tabasco representa su distribución más oriental.

La familia Fagaceae es representada en este tipo de bosques principalmente por los géneros *Quercus* y *Fagus*. en nuestro país el género *Fagus* (Hayas), solo cuenta con una especie con una distribución limitada a las regiones montañosas y templadas del noreste, por su parte el género *Quercus* (roble y encinos) tiene una amplia distribución y se estiman más de 160 especies mexicanas (Valencia, 2004).

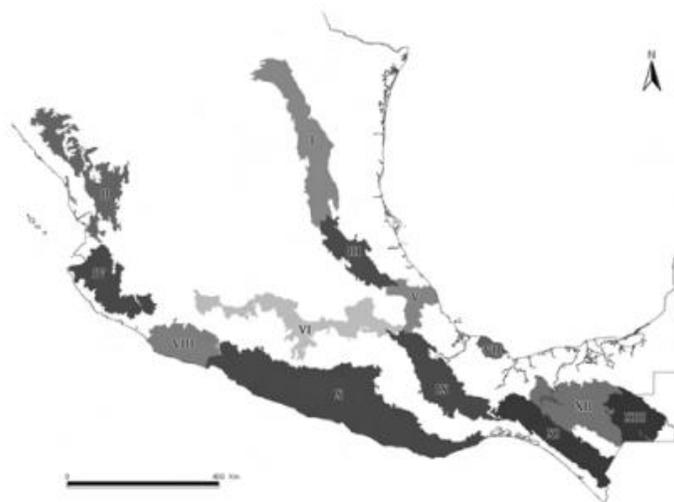


Figura 3. Regiones prioritarias de conservación del Bosque Mesófilo de Montaña en México. I Sierra Madre Oriental Plegada; II Serranías de Nayarit; III Huasteca alta Hidalguense; IV Sierra Madre del Sur y Franja Neovolcánica de Jalisco; V Centro de Veracruz; VI Cuenca alta de Balsas; VII Los Tuxtlas; VIII Sierra Madre sur de Michoacán; IX Sierra Norte de Oaxaca; X Cordillera Costera del Sur; XI Sierra Sur de Chiapas; XII Montaña del Norte y Altos de Chiapas; XIII Cañadas de Ocosingo.

2.2.2 Género *Quercus* en Coahuila

Coahuila está ubicado en el norte de la república mexicana además de situarse en la parte media de la región septentrional y con una extensión territorial que lo coloca como el tercer estado más extenso de México. Dentro de sus fronteras se encuentra la parte terminal de la Sierra Madre Oriental y su continuación en una serie de montañas aisladas que se distribuyen en la región centro y norte del estado, con un clima particularmente árido en todo el territorio y con una escasa precipitación que va de los 300 a 500 mm en todo su extensión, además de la humedad atmosférica baja y una elevada evapotranspiración, se puede encontrar un clima templado y sub húmedo en las zonas montañosas que permite el crecimiento de comunidades de encinos (Villarreal *et al.*, 2008). La mayor representación floral de los encinos se encuentra en las sierras del noroeste y las del sureste sumando en total 32 especies para el estado.

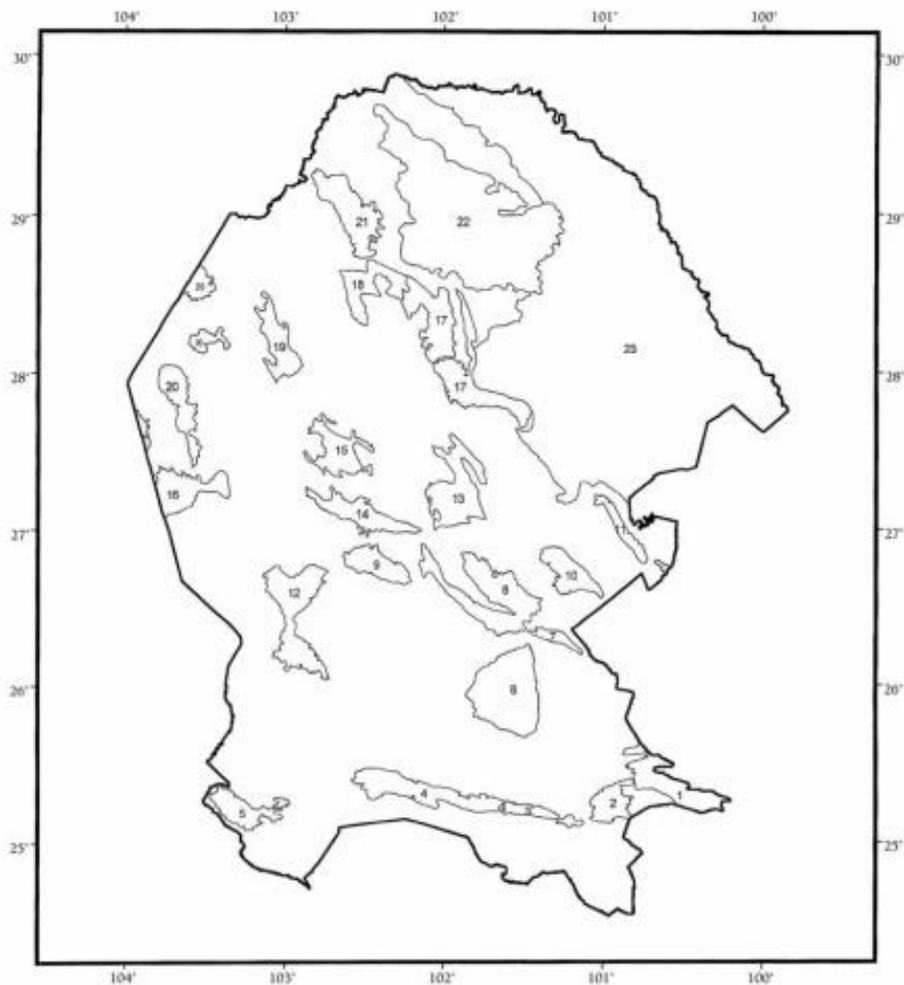


Figura 4. Distribución del género *Quercus* en el estado de Coahuila.

De los seis tipos de vegetación citados para Coahuila por Villarreal y Valdés (1993) los encinos se encuentran principalmente en el matorral submontano y el Bosque de montaña, y de manera ocasional en el Matorral Tamaulipeco y la Vegetación Riparia. El primero ocupa aproximadamente el cinco por ciento del territorio coahuilense, se conforma principalmente de arbustos y árboles pequeños que ocupan las laderas y cañones en condiciones de alta humedad. Es frecuente encontrar varias especies del género *Quercus* en esta región. En cuanto al bosque de montaña específicamente en la comunidad de Bosque de encino, se distribuye en valles intermontanos y cañones de las sierras, donde el clima es templado y subhúmedo, la altura promedio oscila entre los 1200 a 1800 msnm y ocupa menos del 1% de la superficie del estado. Se encuentra

mayormente poblado por árboles en comunidades esparcidas o densas, muy homogéneas donde se encuentran especies pertenecientes al género *Quercus* como lo son *Q. gravessi*, *Q. grisea*, *Q. laceyi*, etc. La comunidad de bosque de pino ocupa cerca del 2% de superficie, es común en laderas y partes altas de sierras con climas templados y sub húmedos, se encuentra dominada por el género *Pinus*, sin embargo, es posible encontrar especies asociadas como lo son *Q. intricata*, *Q. striatula* y *Q. pringlei*. En tanto para las comunidades del Bosque de Oyamel y la Vegetación Subalpina se encuentran en minoría especies de encinos como los son *Q. greggi*, *Q. saltillensis* y *Q. hintoniorum*.

2.2.3 Problemáticas en la taxonomía de *Quercus*

Debido a patrones taxonómicos desconcertantes de variación morfológica intraespecífica las especies de roble son muy conocidas, todo esto puede deberse en gran parte a la hibridación (Howard *et al.*, 1997; June & Müller, 1952). Esta hibridación en robles ha dado solidez al argumento de las alternativas al concepto de especie biológica, así como para sugerir un mecanismo por el cual las especies pueden adaptarse genótipicamente a un paisaje ecológico cambiante. Esta hipótesis de hibridación entre especies de robles está respaldada por varios tipos de observación. El flujo de genes entre especies se informó sobre la base de patrones compartidos de haplotipos de ADN de cloroplasto (ADNcp) en poblaciones simpátricas de especies en roble blanco (Whittemore & Schaal, 1991).

Cualquier tipo de estudio biogeográfico, evolutivo, filogenético, ecológico, de diversidad o uso sobre el reconocimiento de cualquier grupo se basa en su taxonomía. Sin embargo, el género *Quercus* se considera un grupo difícil taxonómicamente, y aunque se han obtenido avances sustanciales en el reconocimiento de especies mexicanas del género, aún prevalecen graves problemas, sobre todo en complejos de especies que hibridan y forman gradientes. Los puntos más comunes que generan problemas en el reconocimiento taxonómico para *Quercus* en México están:

La gran variación morfológica intraespecífica, esta incluso en un solo individuo, que en muchas ocasiones puede conducir a una identificación errónea, lo que refleja la imprecisión de la diversidad específica en las especies de este grupo (Avalos, 2010).

Descripciones deficientes, las primeras características documentadas fueron producidas en el siglo XIX y en la primera mitad del siglo XX, es por ello que ofrecen información limitada sobre la variación de las especies, resultandos ineficientes para la identificación de especies con mucha similitud. La escasez de material para describir nuevas especies, la gran variación morfológica y la escasa comprensión de los grupos, han llevado a interpretar cualquier variación como indicadora de una nueva especie, lo que resulta en una descripción excesiva (Avalos, 2010).

La hibridación común incluso entre robles de la misma sección, ha sido observada en campo y ampliamente documentada en diferentes fuentes bibliográficas, para diferentes especies y lugares. Esta hibridación se ha reconocido con mayor frecuencia entre especies de la sección *Quercus* de amplia distribución. Este fenómeno no ocurre estrictamente entre especies con relación filogenética; es suficiente que las especies que se hibridan sean simpátricas y tengan barreras débiles para el cruzamiento. Los híbridos resultantes en la mayoría de los casos aparecen en campo de forma esporádica y aislada entre los padres, sin formar grandes masas de individuos híbridos. Los híbridos pueden presentar un mosaico de caracteres intermedios, o pueden parecerse más a uno de los padres que al otro; si está involucrada la introgresión, la variación aumentará. En estos casos los límites morfológicos y genéticos se diluyen y la identificación taxonómica se convierte en un problema difícil, requiriendo mucho cuidado en la observación de la variación a fin de identificar adecuadamente la especie o posibles híbridos (Whittemore & Schaal, 1991).

Considerando todo lo anterior se han establecido caracteres de valor taxonómico en la identificación de especies dentro del género *Quercus*, basándose principalmente en las hojas maduras, ya que estas proporcionan la información más útil para la identificación

(Vázquez, 2006). El tamaño, la forma general del limbo, del ápice, de la base, el número de venas, el tipo de margen, la consistencia y el color son muy importantes; aunque es evidente que de solo considerar estas características es posible errar en la identificación del material, por lo que es necesario tomar en cuenta todo el conjunto e incluir también los caracteres de las ramas, brotes, estipulas y frutos, para una mejor identificación de la especie (Valencia & Delgado, 2003). A pesar del gran valor de los caracteres que ofrecen las hojas para el reconocimiento de especies, es necesario tener en cuenta caracteres que convergen por el tipo de hábitat, como es el caso de la coherencia. Por ejemplo, las hojas esclerófilas predominan en las especies de altiplanos (Altiplano Central en México) y áreas semidesérticas, mientras que en zonas más húmedas y templadas las hojas tienden a ser más delicadas. Las flores masculinas y femeninas de los robles no han sido consideradas con alto valor taxonómico, sin embargo, puede haber diferencias en el tipo de pubescencia, en la longitud de los pedicelos y en el tamaño y forma de los tépalos de flores masculinas (Avalos, 2010).

2.3 Códigos de barras de ADN

De manera tradicional la morfología ha sido la base para la identificación de especies (Heinrich *et al.*, 1998), lo que hace a los taxonomistas esenciales para los estudios biológicos, sin embargo, en los últimos años se cuenta con una técnica novedosa que utiliza una región de ADN corta y estandarizada para identificar especies el código de barras de ADN (Hebert *et al.*, 2003), y tiene como objetivo identificar correctamente las muestras además de ampliar el descubrimiento de nuevas especies. Este método no solo facilita el trabajo de los taxonomistas profesionales, sino que también abre las puertas a los no expertos para la identificación de especies de manera rápida, precisa y eficiente. El código de barras de ADN ha sido propuesto como una herramienta taxonómica novedosa y poderosa (Gao *et al.*, 2010), el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL) y Plant Working Group (PWG) han estableció el uso de *rbcL + matK* como códigos de barras de ADN centrales y, el ITS/ITS2 (espaciador transcrito interno / espaciador transcrito interno 2) como un marcador suplementario

para diferenciar plantas. Teniendo como objetivo la creación de una biblioteca de referencia con amplia cobertura de la vida en la tierra, los códigos de barras de ADN se centran en encontrar una o algunas regiones de ADN que distingan entre sí la mayoría de las especies del mundo (Hebert *et al.*, 2003), utilizando secuencias de fragmentos de genes altamente conservados para la identificación de especies, apoyados de información taxonómica altamente sustentada. Su aplicación se basa en la poca variación que existe dentro de las especies comparada con la existente entre estas, es por ello que la diversidad intraespecífica se puede determinar con un pequeño tamaño de muestra, siempre y cuando esta comprenda un grupo representativo de las subpoblaciones. Para ello deben tenerse en cuenta, de manera primordial, las variaciones geográficas y fenotípicas (Dasmahapatra & Mallet, 2006; Moritz & Cicero, 2004). Para establecer el código de barras de ADN es necesario contar con una base de datos uniforme que contenga toda la información que exista de las especies, esta información debe contener su descripción morfológica y ecológica, así como las secuencias de nucleótidos de los mismos genes para todas (Rubinoff, 2006). El estudio de los códigos de barras del ADN en plantas, actualmente, va más allá de comparar el rendimiento de diferentes regiones de ADN, en aplicaciones prácticas que van desde proporcionar información sobre la taxonomía a nivel especie para contribuir a la definición y delimitación de especies, así como el de la identificación de especímenes desconocidos para especies conocidas. La obtención de estas secuencias es un trabajo común en taxonomía molecular, al ir generando información se procede a interpretar y determinar la identidad de la especie, y posteriormente compararla con las disponibles en otras bases de datos ya existentes.

2.4 Marcadores utilizados como códigos de barras de ADN

Los códigos de barras tradicionales se han estudiado ampliamente, pero aún tienen limitaciones importantes. A continuación, se describen algunos de estos códigos de barras de un solo gen que son ampliamente utilizados.

Maturasa K (matK) El gen del cloroplasto está altamente conservado en la sistemática vegetal que está involucrada en el corte y empalme de intrones del Grupo II. Cuenta con una tasa de evolución alta, una longitud adecuada y una divergencia interespecifica obvia, así como una baja tasa de transición/ transversion (Min & Hickey, 2007; Selvaraj *et al.*, 2008). El tamaño del gen es de 1500 pb de longitud, ubicado dentro del intrón de trnK.

rbcL entre los genes de plastidos, rbcL es la secuencia de genes mejor caracterizada, por lo tanto, los grupos de investigación han probado su eficacia en los códigos de barras. Este gen codifica la subunidad grande de la rubilosa 1-5 bifosfato carboxilasa / oxigenasa (RUBISCO), al ser esta una enzima critica implicada en la fotosíntesis, fue el primer gen que se secuencio a partir de las plantas.

ITS2 (espaciador transcrito interno 2). Está situado entre los genes ribosomales 5.8S y 28S y probablemente tiene una función en la regulación de la transcripción de subunidades ribosómicas activas, ya que este espaciador proporciona los elementos estructurales necesarios para el correcto procesamiento del pre-rRNA (Jørgensen *et al.*, 2013). Debido a sus características valiosas, incluida la disponibilidad de regiones conservadas para diseñar cebadores universales, la facilidad de su amplificación y la variabilidad suficiente para distinguir incluso especies estrechamente relacionadas, ITS2 se propuso como código de barras estándar para la autenticación de plantas medicinales (Gao *et al.*, 2010).

La región ITS2 forma parte del espaciador transcrito interno y se utiliza ampliamente como marcador taxonómico molecular (Gao *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013; Hollingsworth *et al.*, 2011). Esta región tiene ventajas bien definidas debido a su corta longitud (412 pb). ITS2 ha mostrado una alta variabilidad de secuencia significativa en un nivel de especie o inferior, lo que lo ha posicionado como uno de los marcadores más importantes en la sistemática molecular y la evolución, al tener de manera disponible su información estructural permite el análisis a un nivel taxonómico superior, lo que proporciona información adicional para la precisión y robustez en la reconstrucción de árboles filogenéticos (Keller *et al.*, 2010). ITS2 se considera uno de los códigos de barras de ADN candidatos debido a sus características valiosas, incluida

la disponibilidad de regiones conservadas para diseñar cebadores universales, la facilidad de su amplificación y la variabilidad suficiente para distinguir incluso especies estrechamente relacionadas. Se ha validado a ITS2 como un poderoso marcador de códigos de barras que identifica 6600 muestras de plantas pertenecientes a 4800 especies de 753 géneros distintos y demostraron que la tasa de identificación exitosa utilizando el código de barras ITS2 fue del 92,7% y el 99,8% a nivel de especie y género, respectivamente (Chen *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013).

2.5 Metodología para producir códigos de barras de ADN

El código de barras de ADN es una herramienta para la identificación de especies que utiliza regiones de ADN acordados internacionalmente para crear una base de datos global de organismos vivos (Hebert *et al.*, 2003). Se están llevando a cabo iniciativas internacionales en cientos de países para codificar con barras de ADN la biodiversidad del mundo y poner estos datos a disposición del público para todos los usuarios (Hebert *et al.*, 2003). El desarrollo de esta técnica en plantas responde a la necesidad de una identificación precisa de las especies tanto para su conservación como su aprovechamiento, sin embargo, en muchas partes del mundo esto puede verse obstaculizado por la falta de conocimientos taxonómicos. Además de poder identificar plantas completas, también es útil poder discriminar especies a partir de materiales como raíces, semillas y polen, o en mezclas de plantas muestreadas del agua o suelo (de Vere *et al.*, 2012). El código de barras de ADN de las plantas ya se está empleando en una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, las secuencias genéticas obtenidas mediante esta herramienta también se han utilizado para crear árboles filogenéticos para su uso en la ecología de comunidades filogenéticas (Kress *et al.*, 2009).

La característica más importante para que el sistema sea universalmente aplicable es la posibilidad de lograr una amplificación universal, es decir, en todos los taxones, usando cebadores estandarizados, y que sea técnicamente simple de secuenciar y lo

suficientemente corto como para hacerlo en una reacción; de igual manera, el código de barras debe tener suficiente variabilidad para la identificación a nivel de especie, idealmente con una divergencia de secuencia interespecifica alta e intraespecifica baja, juntos, estos permiten una fácil referencia y delimitación de especies. Complementariamente el código de barras deber ser fácilmente alineable, una secuencia de ADN con otra, y debe contener pocas inserciones/delecciones que puedan llegar a complicar la comparación e interpretación. Además, para muchas aplicaciones potenciales, el código de barras debe poder recuperarse fácilmente de muestras de herbario y otras muestras degradadas (Chase *et al.*, 2007). Debido a las limitaciones que representa trabajar con el genoma mitocondrial como fuente de un código de barras de ADN en plantas, se han considerado el genoma nuclear y plasmidico, sin embargo, el uso del primero arrastra la dificultad para recuperar ADN adecuado para secuenciación a partir de muestras de herbario o degradadas. Esto se debe en gran parte a que hay muchas más copias por célula del genoma del plástido y a las diferencias en la protección proporcionada por las membranas nuclear y plastidica.

El uso de códigos de barras de ADN como una herramienta de identificación de especímenes también depende de la creación de bases de datos de secuencias de referencia de alta calidad (Hollingsworth *et al.*, 2011). Es esencial que cada secuencia de ADN se encuentre asociada con el espécimen de la planta de donde proviene, aunado a un comprobante de herbario y una etiqueta que contenga los datos de colecta (cuándo, dónde y quien lo recopiló e identificó), aunque en ocasiones para especies muy raras o que se encuentran amenazadas se puede sustituir la muestra con una fotografía (de Vere *et al.*, 2012). De igual manera es primordial registrar los procedimientos de laboratorio a través de los cuales se procesa una muestra, con los cebadores seleccionados, los datos de seguimiento y una estadística de calidad para la secuencia de ADN, todos disponibles para los usuarios finales de los datos (de Vere *et al.*, 2012). Toda esta información debe ser de dominio público; GenBank proporciona un depósito para las secuencias de ADN, pero además se recomienda depositar los datos en el BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007). La plataforma BOLD Systems brinda un medio para gestionar proyectos y permite almacenar archivos de seguimiento, escaneo de especímenes de herbario y fotografías, junto con secuencias de ADN. Sin embargo,

extraer ADN de especímenes de herbario puede ser más problemático en comparación con recolectar nuevas muestras de la naturaleza. La utilidad de las muestras para la extracción de ADN en diferentes herbarios varía según las condiciones en las que se han almacenado los especímenes y cómo se conservaron originalmente. El material más nuevo funciona mejor que el más antiguo y ciertos grupos taxonómicos funcionan menos que otros (Särkinen *et al.*, 2012).

Todos los códigos de barras deben pasar puntos de control rigurosos después de la secuenciación para identificar secuencias incorrectas y verificar la precisión y calidad de las bases. La secuenciación de múltiples individuos por especie es de suma importancia ya que permite realizar comparaciones entre secuencias. Cada una de estas debe editarse y verificarse manualmente mediante la examinación de la ubicación de las especies muestra dentro de árboles filogenéticos. Esta etapa es particularmente importante para las especies de plantas porque los marcadores utilizados, en particular *rbcL*, suelen ser bastante similares entre especies estrechamente relacionadas (Hollingsworth *et al.*, 2011).

A lo largo de la recolección y el procesamiento de muestras en campo, herbario y el laboratorio, se deben implementar procedimientos para garantizar que se evite la contaminación. En el campo, las pinzas y tijeras que se utilizan para la recolección se pueden limpiar en etanol al 70 % antes y entre cada uso. En el laboratorio, se debe utilizar etanol al 70 % o un producto similar para la limpieza regular. Se deben usar batas de laboratorio y guantes de nitrilo o látex en todo momento. Las pipetas, puntas y otros consumibles deben esterilizarse en autoclave antes de su uso o comprarse en paquetes estériles.

2.6 Importancia de las muestras de herbario

La creación de bases de datos de códigos de barras de ADN a gran escala, es muy relevante para todos los herbarios, debido a su posicionamiento único como repositorios de la flora mundial. Una revisión reciente realizada por un destacado

botánico de una institución de colecciones afirma: “Las colecciones son una mina de oro tanto de información como de muestras de tejido y hay más avances en camino” (Escobar *et al.*, 2015). La existencia de los herbarios recae principalmente en la recolección, ayuda en la preservación de la flora mundial y en la interpretación de las relaciones taxonómicas, pero los datos de los herbarios también tienen más aplicaciones importantes (Heberling & Isaac, 2017; James *et al.*, 2018). Se puede argumentar que no se puede garantizar que ninguna identificación sea 100% precisa, pero ese es el propósito de la retroalimentación continua, facilitar las correcciones y actualizaciones de las designaciones taxonómicas de los especímenes (Funk *et al.*, 2005) y además proporcionar los medios para evitar o corregir los errores en serie que pueden resultar de una errónea identificación de materiales de referencia (Bortolus, 2008). Sin embargo, históricamente los herbarios no han sido un lugar de acceso automático para los especímenes de referencia con código de barras, esto principalmente por la disponibilidad de material adecuado para la extracción de ADN. Aunque el problema es doble, primeramente los herbarios muestran una comprensible oposición a permitir un muestreo extremo de sus recursos finitos e irremplazables (aunque generalmente se permite bajo condiciones controladas, excepto en algunas circunstancias especiales, como con especímenes muy raros o cuando el muestreo destructivo dañaría la utilidad futura del mismo); en segundo lugar la influencia de los métodos de recolección, conservación y el tiempo transcurrido desde la colecta de estos especímenes de herbario dejan el ADN que es potencialmente extraíble en varias etapas de degradación, este suele ser de difícil codificación debido a la corta longitud de los fragmentos, especialmente con los códigos de barras de ADN más largos (Dormontt *et al.*, 2018).

Se han realizado varios avances para superar en gran escala las limitantes anteriores, ahora es muy común en la práctica que los herbarios incluyan material adecuado para la extracción de ADN en sus protocolos de recolección en campo; la hoja u otro tejido adecuado ahora se puede usar de manera rutinaria para los protocolos de extracción sin comprometer la integridad de los especímenes de prueba (Funk *et al.*, 2017; Gaudeul & Rouhan, 2013). Estos tejidos son almacenados de manera que se preserven las características para una extracción de ADN de alta calidad, por lo general se desecan

rápidamente y se almacenan en geles. En otros casos especiales se han desarrollado métodos de extracción que evitan el muestreo destructivo (Shepherd, 2017). Además, los avances en los enfoques de secuenciación han reducido los requisitos para secciones largas no fragmentadas de ADN de alto peso molecular (Hart *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2018), lo que ha provocado que el material de herbario sea cada vez más adecuado para la extracción de ADN.

2.7 Extracción de ADN de muestras vegetales frescas y de herbario

Con la llegada de técnicas de análisis de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN, el interés en la sistemática de plantas ha aumentado, haciendo uso de datos de secuencias para estudiar las relaciones entre especies, complementando así la enorme cantidad de datos morfológicos disponibles (Gervais & Bruneau, 2002; Wojciechowski, 2003). Sin embargo, para obtener información precisa sobre la secuencia de interés, es indispensable aislar ADN de buena calidad que este relativamente libre de muchos contaminantes que se encuentran en las células vegetales (Jobes *et al.*, 1995). Una gran mayoría de especies de plantas poseen cantidades característicamente altas de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios, estas sustancias son conocidas por su increíble afinidad a los ácidos nucleicos durante la extracción y de interferir con las reacciones posteriores. Se han establecido varios métodos para superar estos problemas, que incluyen la sedimentación en gradientes de cloruro de cesio o la extracción con CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Couch & Fritz, 1990), uniendo selectivamente el ADN utilizando una columna RPC-5 (Pearson *et al.*, 1971), Sin embargo, no se puede utilizar un método único para obtener grandes cantidades de ADN razonablemente puro de todas las especies de plantas.

Una dificultad general en el aislamiento de ADN de células vegetales es la presencia de una pared celular. Es necesario degradar las paredes celulares de las plantas, ya sea física o enzimáticamente, para aislar de forma eficaz el ADN de las plantas. Además,

algunos tejidos (como el endospermo) o algunas especies contienen altos niveles de almidones o compuestos fenólicos que pueden complicar el aislamiento del ADN. Varios protocolos de aislamiento de ADN de plantas están diseñados para superar las dificultades específicas de la especie. Este es un protocolo relativamente simple que utiliza un tampón de extracción que contiene CTAB; se puede utilizar para muchas especies de plantas. Proporciona una cantidad sustancial de ADN de alta calidad que es adecuado para los procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y es estable durante largos períodos de tiempo.

2.8 Parámetros importantes en la calidad de ADN extraído

Al momento de iniciar un análisis molecular se debe ponderar la identificación de la eficiencia de los protocolos de extracción de ADN genómico, considerando la especie que se va a trabajar. La calidad y cantidad del ADN que se puede obtener es de suma importancia para el uso de marcadores moleculares, por lo que el protocolo debe considerar el tipo de muestra a utilizar, desde el tipo de membrana celular a ser degradada para liberar el ADN, prever acciones de DNAsas, acciones de compuestos fenólicos y polisacáridos (Lombardo *et al.*, 2012).

A través de la espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN, todo esto basado en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. En soluciones que contienen proteínas y ADN, la absorbancia a 260 nm se debe principalmente al ADN presente, sin embargo, una pequeña cantidad se debe a la proteína. En los 280nm, la absorbancia se debe predominantemente a la proteína presente. Por lo tanto, la pureza del ADN se puede calcular examinando la relación de los dos valores de absorbancia. Una relación de los valores de absorbancia a 260/280 nm de aproximadamente 1,7 a 1,8 predice ADN "limpio o puro", mientras que los valores más bajos pueden ser indicativos de una contaminación significativa de proteínas (O'Neill *et al.*, 2011). No obstante, esta relación 260/280 no siempre representa una pureza del ADN, algunas

muestras pueden ser difíciles de evaluar a 280 nm debido a la interferencia. Por lo tanto, los enlaces peptídicos que se absorben a 228 nm, suelen ser un indicador más constante de la presencia de proteínas en la muestra, es por ello que las lecturas de absorbancia medidas tanto a 230 nm como a 280 nm brindan una estimación más precisa de los péptidos que pueden estar presentes en las muestras de ácido nucleico (O’neill *et al.*, 2011). La relación de valores de absorbancia 260/230 debe ser mayor a 1.5, ya que los ácidos nucleicos tienen un mínimo de absorbancia a 230,260 y 280 nm. Las sales tampón pueden contribuir significativamente a las lecturas de absorbancia, especialmente por debajo de 260 nm. Por lo tanto, es imperativo poner en blanco el espectrofotómetro en el mismo tampón en el que se diluye su muestra de ADN (McMillan *et al.*, 2008).

Tabla 1. Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.

Técnica de análisis	Análisis	Parámetros	Criterios de validez
Espectrofotometría	A260/A280	Pureza	≥ 1.8 – 2.1 pureza optima
			≥ 1.6 – 1.7 purea aceptable
			< 1.6 ADN contaminado con compuestos aromáticos
			> 2.1 ADN contaminado con ARN
	A260/A230	Pureza	> 2 – 2.2 pureza optima
			> 1.8 pureza aceptable
			< 1.8 ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono
			< 1.5 ADN altamente contaminado

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de material vegetal y establecimiento de tratamientos

Basándose en la morfología que presenta la sección *Quercus*, árboles o arbustos de corteza normalmente rugosa, escamosa, de color gris o blanca. Hojas con margen entero, dentado o lobado y dientes mucronados. La presencia de flores estaminadas con cáliz de dos a seis lóbulos, anteras apiculadas y flores pistiladas con cáliz adherido al ovario y estilo alargado; fruto anual, cúpula con escamas con base engrosada y nuez glabra a tomentulosa (Villarreal *et al.*, 2008).



Figura 5. Características de la sección *Quercus*. A) tronco de corteza rugosa color blanca; B) hojas con margen dentado.

Y la sección *Lobatae*, árboles o arbustos. Corteza lisa a fisurada, café a negruzca. Hojas con margen entero, dentado o lobado, dientes y lóbulos usualmente terminados en aristas. Flores estaminadas con cáliz de 2–6 lóbulos, anteras usualmente retusas. Flores pistiladas con cáliz libre del ovario y estilo linear a espatulado. Fruto bianual, raramente anual, cúpula con escamas con base plana, algunas veces engrosada y nuez tomentosa (Villarreal *et al.*, 2008).



Figura 6. Características de la sección *Lobatae* A) Corteza lisa y café; B) Lobulos terminados en aristas.

Se establecieron puntos de colecta en la región sureste del estado de Coahuila, México, de acuerdo a una revisión de documentación previa (Villarreal *et al.*, 2008). Se colectó tejido foliar de hojas aparentemente sanas y de brotes jóvenes, los tratamientos que se le dieron a las muestras fueron los siguientes:

- Tratamiento 1. T1. Conservación en etanol al 96% durante un periodo de cuatro horas.
- Tratamiento 2. T2. Conservación en etanol al 96% por un periodo de diez días después de su colecta en campo.
- Tratamiento 3. T3. Conservación en etanol al 96% por un periodo de 20 días después de su colecta en campo.
- Tratamiento herbario. TH. Se procesaron 13 muestras herborizadas de *Quercus*, provenientes del Herbario Antonio Narro, Saltillo, México (ANSM); estas con diferentes tiempos de colecta, siendo la más antigua de 2010 y la más reciente de 2018.

Tomando los datos necesarios para registrarlos bajo el formato Darwin Core (especie, clave de espécimen, coordenadas, altura sobre el nivel del mar y localidad); de igual

manera se tomaron muestras a manera de comprobantes de herbario que se depositaron en el Herbario Antonio Narro, Saltillo, México (ANSM).

3.2 Extracción de ADN

Se realizaron extracciones de ADN genómico, de cada uno de los tratamientos, mediante el método previamente documentado (Sharma *et al.*, 2003), para lo cual se precalentaron 700 μ L de CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) a 60°C; se molieron trozos dos centímetros cuadrados de tejido, en un mortero con 1 ml de alcohol, hasta pulverizar por completo la muestra, el tejido pulverizado fue transferido a un microtubo el CTAB precalentado, se mezcló por inversión diez veces. Se incubo la mezcla a 60° por 30 minutos mezclando ocasionalmente, posteriormente se agregaron 0.6 volúmenes de cloroformo: alcohol isoamilico en relación 24:1, mezclando por inversión e incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos, la mezcla se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos, tras lo cual se transfirieron 400 μ L de la fase acuosa a un nuevo tubo, posteriormente se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto, mezclando levemente por inversión. Posteriormente la muestra se centrifugo a 15000 rpm por cinco minutos, se decantó el etanol absoluto y se añadieron 400 μ L de etanol al 70% y se centrifugó a 15000 rpm durante un minuto, este paso se repitió una vez más. El exceso de etanol fue descartado por decantación y se dejó secar la muestra durante 30 minutos. Posterior al secado, se rehidrato con 100 μ L de agua libre de nucleasas y se llevó a incubación por 15 minutos a 37°. La presencia del ADN genómico se realizó mezclando 2 μ L de la muestra con Blue/Orange Loading Dye, 6X (Promega) como colorante de carga y Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega) como colorante de ADN, según especificaciones del fabricante, y realizando electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, durante 45 minutos a 90 voltios. Después de la electroforesis, el gel fue documentado en un sistema de documentación de geles (Axygen® Gel Documentation Systems). El ADN se conservó a -20 °C para su uso posterior.

3.3 Amplificación

Para llevar a cabo la amplificación de los fragmentos ITS2, se llevó a cabo PCR usando cebadores previamente documentados (Chen *et al.*, 2010). Se utilizó el estuche comercial GoTaq Green Master Mix, 2XTM (Promega, USA), según las especificaciones del fabricante. Se elaboraron las mezclas de reacción como se detalla en la Tabla 2, las cuales se procesaron bajo las condiciones de la PCR que se detallan en la Tabla 3. Posterior a la reacción de amplificación, se realizó electroforesis como se detalla en el paso anterior y utilizando un marcador de peso molecular (1 Kb, Axygen, USA).

Tabla 2. Componentes de la Mezcla para la reacción de PCR.

Componentes	Volumen	Concentración final
GoTaq Green Master Mix,2X	10 μ L	1X
Cebador rio arriba	2 μ L	0.1 – 1 μ M
Cebador rio abajo	2 μ L	0.1 – 1 μ M
Molde de ADN	1 μ L	<250 ng
Agua libre de Nucleasas	5 μ L	N. A

Tabla 3. Cebadores y programa de PCR utilizados para la amplificación de ADN.

Fragmento	Cebadores (5'-3')	Programa de PCR
ITS2	ITS-2F:	95°C, 4min; 35x (94°C, 45 s: 56°C, 1 min: 72°C, 1
	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	
	ITS-2R:	min):72°C, 10 min.
	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	

3.4 Cuantificación de ADN

Mediante el equipo Nanodrop (NANODROP 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) se realizó la cuantificación de la concentración de ADN y proteínas con la aplicación para ácidos nucleicos del software NANODROP 2000/2000c v.1.0. Para esta lectura se deposita una solución de referencia (blanco) de la cual el equipo crea un espectro y lo almacena en la memoria como una matriz de intensidades de luz por longitud de onda. Lo mismo hace con las muestras de ADN y proteínas que son depositadas directamente 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).

3.5 Análisis de varianza

Las lecturas de la cuantificación de la concentración de ADN y las proteínas fueron analizadas por medio de un análisis de varianza de dos vías, donde el factor A son los tratamientos a los que fueron sometidos las muestras, y el factor B son las moléculas cuantificadas (ADN o proteínas), y se realizaron graficas comparativas de las medias de los resultados utilizando el software R-studio (Proc Plot Mean).

3.6 Índices A260/A280 y A260/A230

El índice A260/A280 de cada muestra se determinó dividiendo el valor de absorbancia a 260nm entre el valor de absorbancia a 280nm. El índice A260/A230 de cada muestra se determinó dividiendo el valor de absorbancia a 260nm entre el valor de absorbancia a 230nm. Se realizaron graficas comparativas de las medias de los resultados utilizando el software R-studio (Proc Plot Mean)

3.7 Secuenciación

Se enviaron 200 ng de producto de PCR y 5 ng de primers de cada muestra al servicio de secuenciación LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato, México.

3.8 Análisis de código de barras de ADN.

Se creó una base de datos con secuencias de referencia pertenecientes a especies del género *Quercus* considerando las secciones *Quercus* y *Lobatae*, descargadas de BOLD SYSTEMS. Para evaluar la efectividad del poder discriminatorio de las secuencias de ADN generadas, se utilizaron los métodos de BLAST y unión de vecinos cercanos. Para la identificación con BLAST, se creó una base de datos con las secuencias de consulta y mediante la herramienta de BLASTn (NCBI, 2021) se realizó un BLAST considerando un valor de $E < 1 \times 10^{-5}$ y aciertos máximos de 98 a 100 % con una especie (Ross *et al.*, 2008). La unión del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987), se basó en la matriz de distancia bajo el método de 2 parámetros de Kimura (K2P) (Kimura, 1980). Los árboles se construyeron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018; Stecher *et al.*, 2020). Se evaluó el desempeño discriminatorio mediante el cálculo de la proporción de especies. Únicamente las especies que formaron un clado monofilético en el árbol se consideraron identificadas con éxito.

4. RESULTADOS

4.1 Colecta de material vegetal

En las localidades de la Sierra Zapalinamé, el mirador, Saltillo y el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro del estado de Coahuila, México, se colectaron muestras de 14 especies del género *Quercus*. De las cuales diez pertenecen a la sección *Quercus* y cuatro a la sección *Lobatae* (Tabla 4). También se colectaron muestras de respaldo de cada una de las especies, que fueron depositadas en el Herbario Antonio Narro Saltillo (Figura 7).

Tabla 4. Especies, sección y ubicación geográfica de muestras colectadas.

Espece	Localidad	Latitud	Longitud	Altura	Sección
<i>Quercus grisea</i>	Camino del 4, Saltillo	25°22'35"	100°58'11"	1950	<i>Quercus</i>
<i>Quercus laceyi</i>	Camino del 4, Saltillo	25°22'01"	100°57'56"	1920	<i>Quercus</i>
<i>Quercus laeta</i>	Camino del 4, Saltillo	25°22'03"	100°57'00"	2000	<i>Quercus</i>
<i>Quercus laeta</i> <i>x arizonica</i>	Camino del 4, Saltillo	25°22'01"	100°56'55"	2000	<i>Quercus</i>
<i>Quercus greggi</i>	Jardín Botánico, UAAAN	25°20'25"	101°02'15"	1943	<i>Quercus</i>)
<i>Quercus fusiformis</i>	Jardín Botánico, UAAAN	25°20'25"	101°02'15"	1943	<i>Quercus</i>

<i>Quercus intricata</i>	Jardín Botánico, UAAAN	25°20'01"	101°01'32"	1970	<i>Quercus</i>
<i>Quercus polymorpha</i>	El mirador, Saltillo	25°24'41"	101°00'01"	1673	<i>Quercus</i>
<i>Quercus pringlei</i>	Jardín Botánico, UAAAN	25°21'19"	101°01'58"	1780	<i>Quercus</i>
<i>Quercus muehlenbergii</i>	El mirador, Saltillo	25°24'24"	101°00'01"	1673	<i>Quercus</i>
<i>Quercus gravesii</i>	Jardín Botánico, UAAAN	25°21'24"	101°01'58"	1970	<i>Lobatae</i>
<i>Quercus hypoxantha</i>	Camino del 4, Saltillo	25°23'25"	100°51'55"	2000	<i>Lobatae</i>
<i>Quercus saltillensis</i>	Camino del 4, Saltillo	25°23'40"	100°56'59"	1980	<i>Lobatae</i>
<i>Quercus rubra</i>					<i>Lobatae</i>



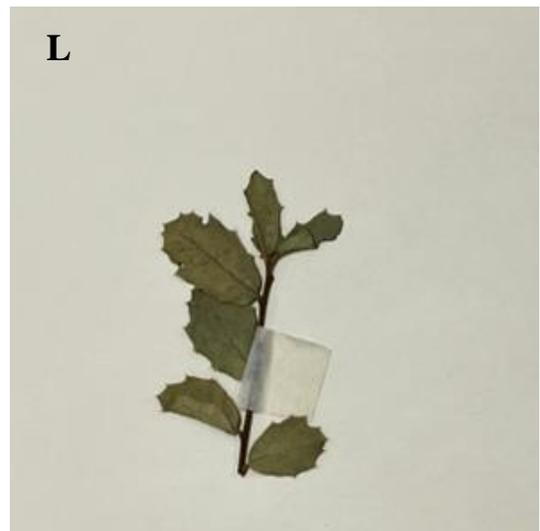




Figura 7. Especímenes depositados como respaldo en Herbario ANSM. A) *Q. laeta*, B) *Q. grisea*, C) *Q. laceyi*, D) *Q. intricata*, E) *Q. laetaxarizonica*, F) *Q. saltillensis*, G) *Q. gravessii*, H) *Q. polymorpha*, I) *Q. fusiformis*, J) *Q. muehlenbergii*, K) *Q. greggii*, L) *Q. hypoxantha*, M) *Q. sp*, N) *Q. rubra*.

4.2 Eficiencia en la extracción y amplificación.

La extracción de genómico realizada en este trabajo para muestras conservadas en alcohol con diferente tratamiento (tiempo de conservación: uno, diez y veinte días), arrojó una efectividad del 92.85% para los dos primeros casos y un 100% para el ultimo tratamiento (Figura 8).

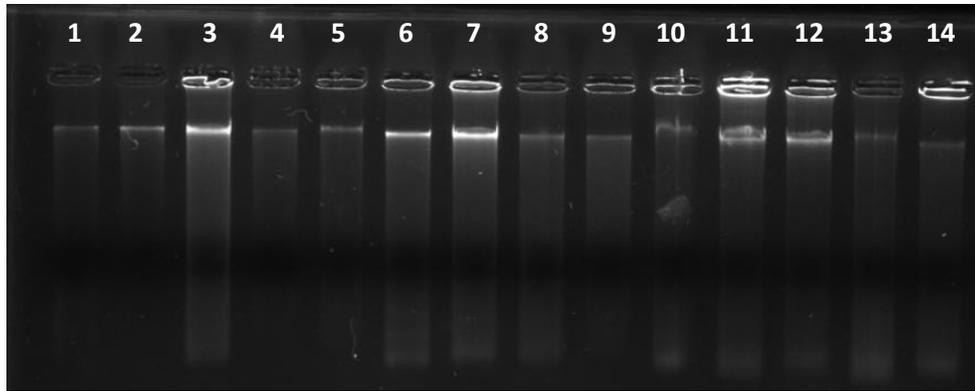


Figura 8. Genómicos de muestras en tratamiento con etanol. Visualizadas en electroforesis en Gel de agarosa a 0.08%. 1) *Q. muehlenbergii*, 2) *Q. laceyi*, 3) *Q. polymorpha*, 4) *Q. grisea*, 5) *Q. fusiformis*, 6) *Q. saltillensis*, 7) *Q. intricata*, 8) *Q. greggii*, 9) *Q. hypoxantha*, 10) *Q. rubra*, 11) *Q. laetaxarizonica*, 12) *Q. gravessii*, 13) *Q. laeta*, 14) *Q. pringlei*.

Por otro lado, en muestras herborizadas se observó un 100% para el mismo proceso. Todos los anteriores con condiciones idóneas para su amplificación mediante PCR, y previamente visualizados en un gel de agarosa (Figura 9).

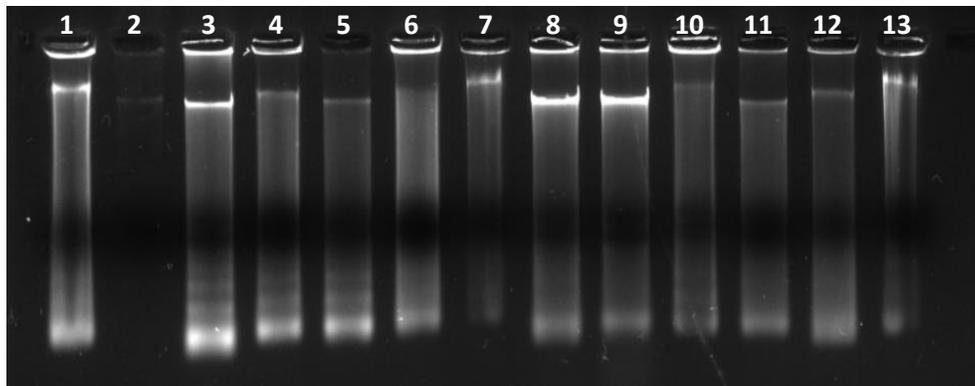


Figura 9. Genómicos de muestras de herbario. Visualizadas en electroforesis en Gel de agarosa a 0.08%. 1 y 2) *Q. intricata*, 3 y 7) *Q. mexicana*, 4) *Q. castanea*, 5 y 9) *Q. pringlei*, 6,8,10,11,12 y 13) *Q. greggii*.

Se puntualiza que en el presente trabajo la amplificación de ADN con el uso de ITS2 como cebadores y con la previa extracción mediante el método de CTAB modificado (Sharma *et al.*, 2003) varía de acuerdo a cada régimen, siendo los tratamientos 1 y 2 en los que mejores porcentajes de obtuvieron llegando hasta el 92.85% respectivamente. Los amplicones fueron

visualizados en gel de agarosa (Figura 10). Por su parte, en las muestras herborizadas con hasta 10 años de antigüedad se obtuvo un 100% de efectividad en amplificación por PCR con los cebadores previamente mencionados (Tabla 5), esto combinando la extracción con la purificación por columnas (Figura 11).

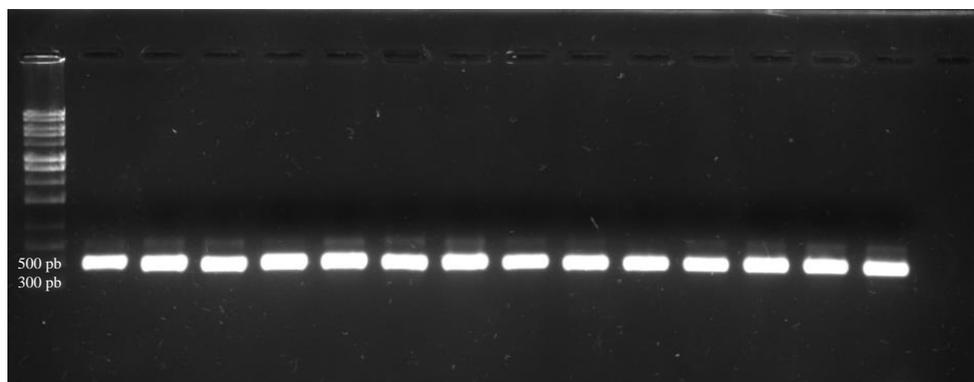


Figura 10. Productos de PCR de muestras conservadas en alcohol, visualizadas en electroforesis en Gel de agarosa a 0.08%. 1) *Q. muehlenbergii*, 2) *Q. laceyi*, 3) *Q. polymorpha*, 4) *Q. grisea*, 5) *Q. fusiformis*, 6) *Q. saltillensis*, 7) *Q. intricata*, 8) *Q. greggii*, 9) *Q. hypoxantha*, 10) *Q. rubra*, 11) *Q. laetaxarizonica*, 12) *Q. gravessii*, 13) *Q. laeta*, 14) *Q. pringlei*.

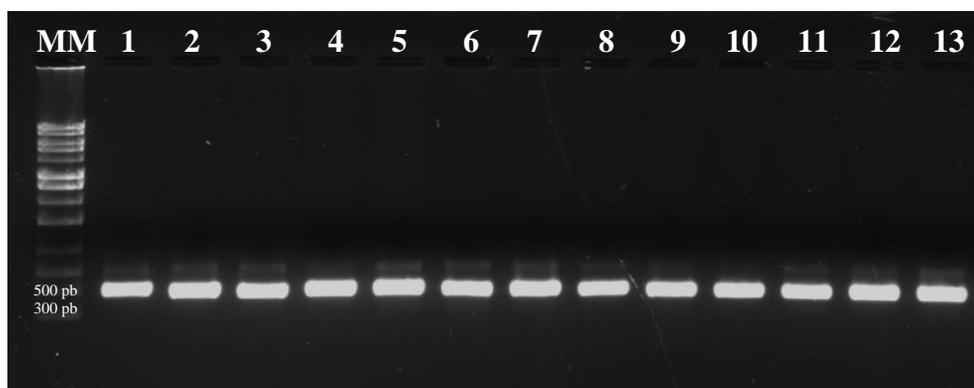


Figura 11. Productos de PCR de muestras de herbario. Visualizadas en electroforesis en Gel de agarosa a 0.08%. 1 y 2) *Q. intricata*, 3 y 7) *Q. mexicana*, 4) *Q. castanea*, 5 y 9) *Q. pringlei*, 6,8,10,11,12 y 13) *Q. greggii*.

Tabla 5. Porcentajes de extracción y amplificación en tres tratamientos analizados y muestras de herbario.

Tratamiento	T1	T2	T3	Herbario
Extracción	92.85%	92.85%	100%	100%
Amplificación	92.85%	92.85%	71.42%	100%

4.3 Secuenciación

Las muestras seleccionadas para secuenciación, se determinaron basándose en los datos existentes en el repositorio CBOL, esto con la finalidad de alimentar con nueva información de encinos mexicanos. Dentro de estas muestras se encontraban 6 especímenes conservados en alcohol al 96% (*Quercus hipoxantha*, *Quercus fusiformis*, *Quercus greggii*, *Quercus muehlenbergii*, *Quercus rubra* y *Quercus polymorpha*) y 2 de las obtenidas de herbario (*Quercus mexicana* y *Quercus Castanea*). Los amplicones obtenidos con el fragmento ITS2 de ocho especies presentaron una recuperabilidad del 75% en secuencias.

4.4 Cuantificación de concentración de ADN y proteínas

La cuantificación arrojó concentraciones más altas de ADN en las muestras con mayor tiempo de conservación en alcohol llegando hasta 245.8 ng/μL, de igual manera la cantidad de proteína por muestra fue superior en el mismo contexto presentándose concentraciones de 2321.69 ng/μL (Tabla 6). Para el caso de las muestras herborizadas que fueron extracciones de un solo tiempo se obtuvieron buenas concentraciones de ADN (Tabla 6).

En el presente trabajo se procedió a la extracción de ADN genómico partiendo de muestras de aproximadamente 2 centímetros cuadrados por especie, los ejemplares de herbario con hasta 12 años de antigüedad mostraron concentraciones de ADN bastante aceptables llegando

hasta una media de 205.8 ng/ μ L y con la suficiente calidad para sus análisis posteriores (PCR y secuenciación).

Tabla 6. Medias de concentración de ADN y proteína en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Medias de concentración de ADN	Medias de concentración de proteínas
T1	32.1 ng/ μ L	367.83 ng/ μ L
T2	69.5 ng/ μ L	775.5 ng/ μ L
T3	245.8 ng/ μ L	2321.69 ng/ μ L
Herbario	205.8 ng/ μ L	3004.5 ng/ μ L

4.5 Análisis de varianza (ANOVA)

Las medias de concentración de ADN tanto como de proteínas en cada uno de los tratamientos previamente mencionados se analizaron mediante ANOVA de dos vías, considerando un nivel de significancia de 0.05, arrojando que, A) hay diferencias significativas en la media de concentración de ADN entre los tratamientos, B) hay diferencias significativas entre las medias de la concentración de proteínas entre los tratamientos, y C) hay interacción entre la concentración de ADN y la concentración de proteínas de los tratamientos (Tabla 7). En términos generales la concentración de ADN aumenta considerablemente en base al tiempo de conservación, pasando de 32.1 ng/ μ L para T1 hasta alcanzar 245.8 ng/ μ L para T3 y presentando números altos para el caso de las muestras de herbario (Figura 12).

Tabla 7. Resultado del análisis de varianza de dos vías (significancia de 0.05), donde el factor A es la concentración de ADN (ng/μL) en cada tratamiento, el Factor B es la concentración de proteínas (ng/μL) en cada tratamiento.

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Valor P
Factor A	1	5.67E+07	2.84E-09
Factor B	3	3.49E+07	3.29E-05
interacción	3	2.57E+07	4.90E-04
Modelo	7	1.18E+08	1.77E-11
Error	96	1.27E+08	--

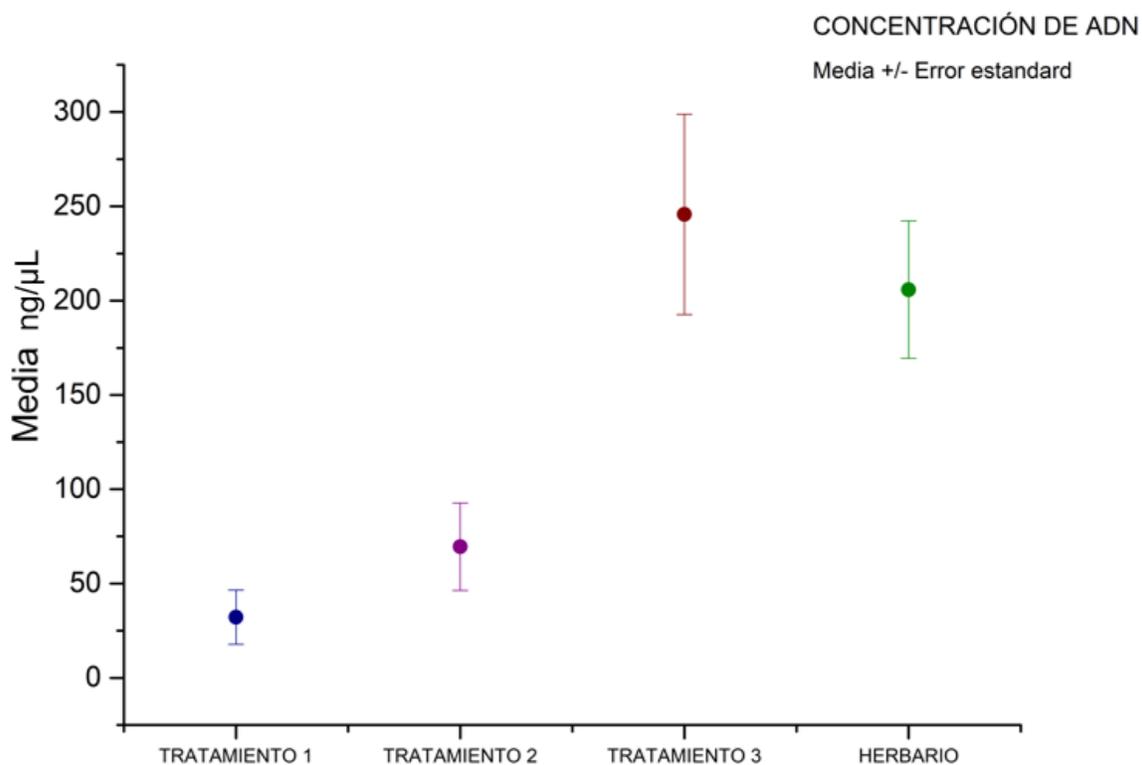


Figura 12. Medias de la concentración de ADN en todos los tratamientos estudiados (+/- error estándar).

Bajo los mismos parámetros previamente explicados la concentración de proteína presentó un comportamiento similar, es decir los promedios son significativamente diferentes para cada tratamiento, observando datos que parten de 367.83 ng/μL para T1 hasta 2321.69 ng/μL para T3. De igual manera se observó que la concentración en muestras herborizadas era incluso mayor a los tratamientos que involucraron alcohol (Figura 13).

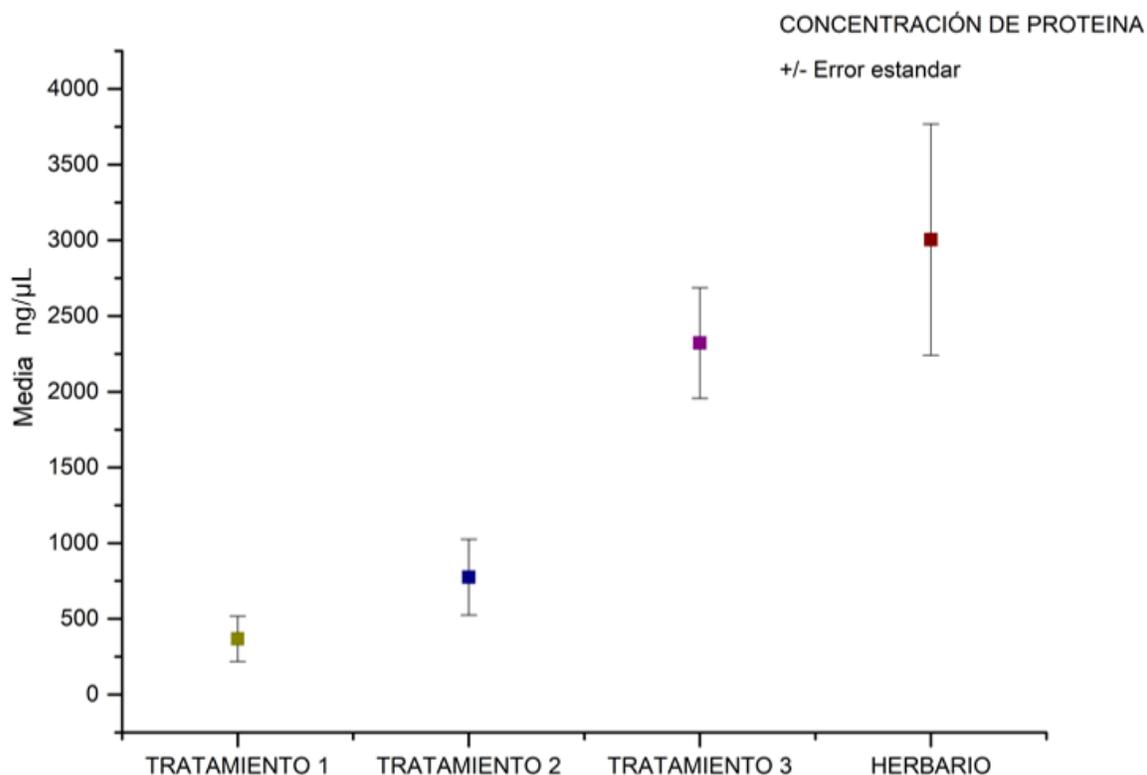


Figura 13. Medias de la concentración de proteína en todos los tratamientos estudiados (+/- error estándar).

4.6. Análisis de pureza de ADN

Durante la cuantificación por espectrofotometría se analizaron las muestras en distintos rangos de densidad óptica, siendo estos a longitud de onda de 280, 260 y 230 nm. Con los valores obtenidos en esas categorías se establecieron relaciones de absorbancias A260/A280 y A260/A230 esto para evaluar la pureza de las muestras. La primera relación A260/A280 es muy estable y nos señala, según los rangos de valores, contaminación por compuestos

aromáticos como fenoles y proteínas o incluso la presencia de ARN. Bajo esta correspondencia se obtuvo una pureza óptima para el tratamiento uno, estando la mayoría de las muestras dentro del rango 2-2.1; caso contrario al siguiente régimen que presento en la totalidad de los especímenes un índice mayor a 2.1, lo que nos pondera la presencia de ARN en la solución; en el caso del tercer tratamiento todas las muestras se ubicaron dentro de un rango aceptable de pureza y para los ejemplares de herbario se observó un 50% de inclusión en pureza aceptable, mientras lo restante se ubicó debajo de 1.6 lo que apunta a una contaminación por compuestos fenólicos y proteínas (Figura 14).

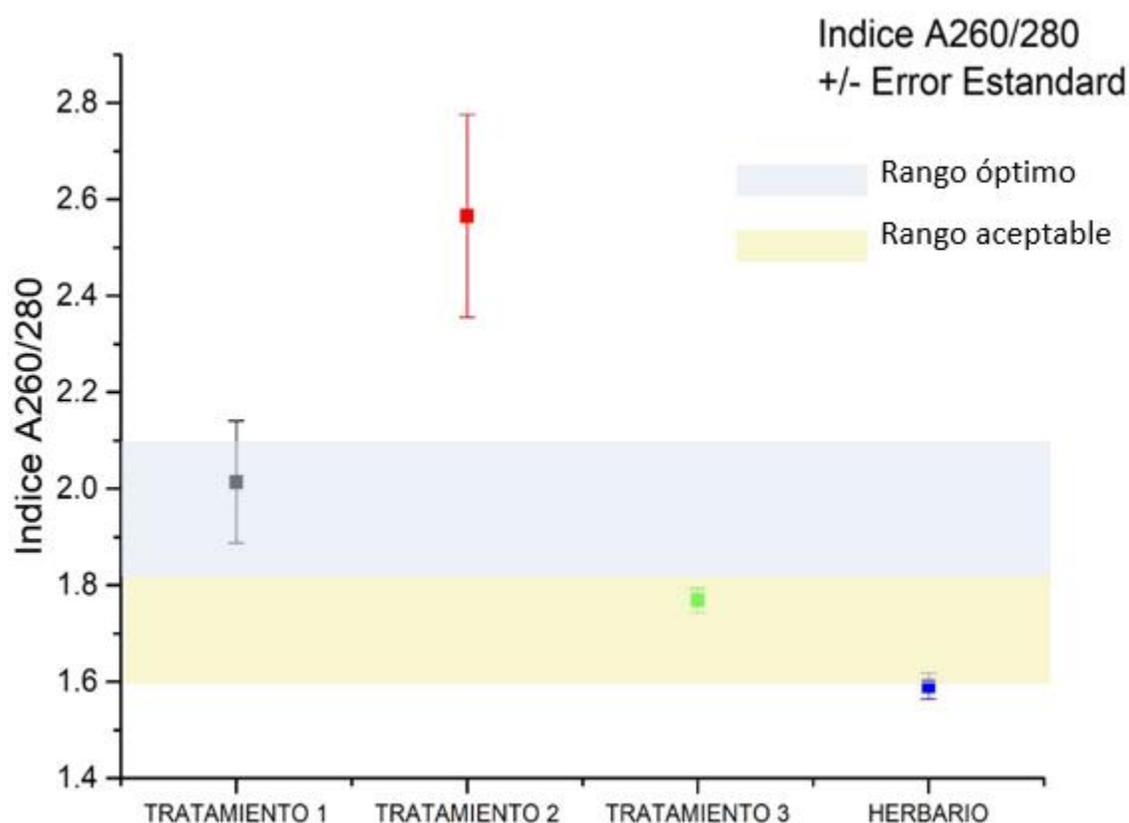


Figura 14. Pureza de las muestras mediante espectrofotometría relación A260/A280.

La relación A260/A230 resulta mucho más variable que la anterior, porque depende de factores como la concentración del ADN o de la composición del tampón de resuspensión de la muestra. A 230 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos; los valores que están bajo el ratio de 1.5 demuestran una impureza que podría

comprometer la funcionalidad del ADN. Para el caso de del tratamiento uno, las muestras se dispersan en un rango que va de 1 a 1.9, esto nos indica que la mayoría no cuenta con una pureza aceptable; el segundo tratamiento se comportó de manera muy diversa para cada espécimen bajo este régimen, llegando a generar un alcance que va desde 1.0 hasta 3.9, solamente cuatro muestras de ADN genómico se ubicaron en los rangos de calidad aceptable y óptima, el resto manifiesta contaminación según los estándares; para el tratamiento tres y los conservados por herborización ninguna muestra presento calidad aceptable, todas se ubicaron por debajo de 1.5 lo que se traduce como una alta contaminación de la solución, puede contener sales , hidratos de carbono y fenoles (Figura 15).

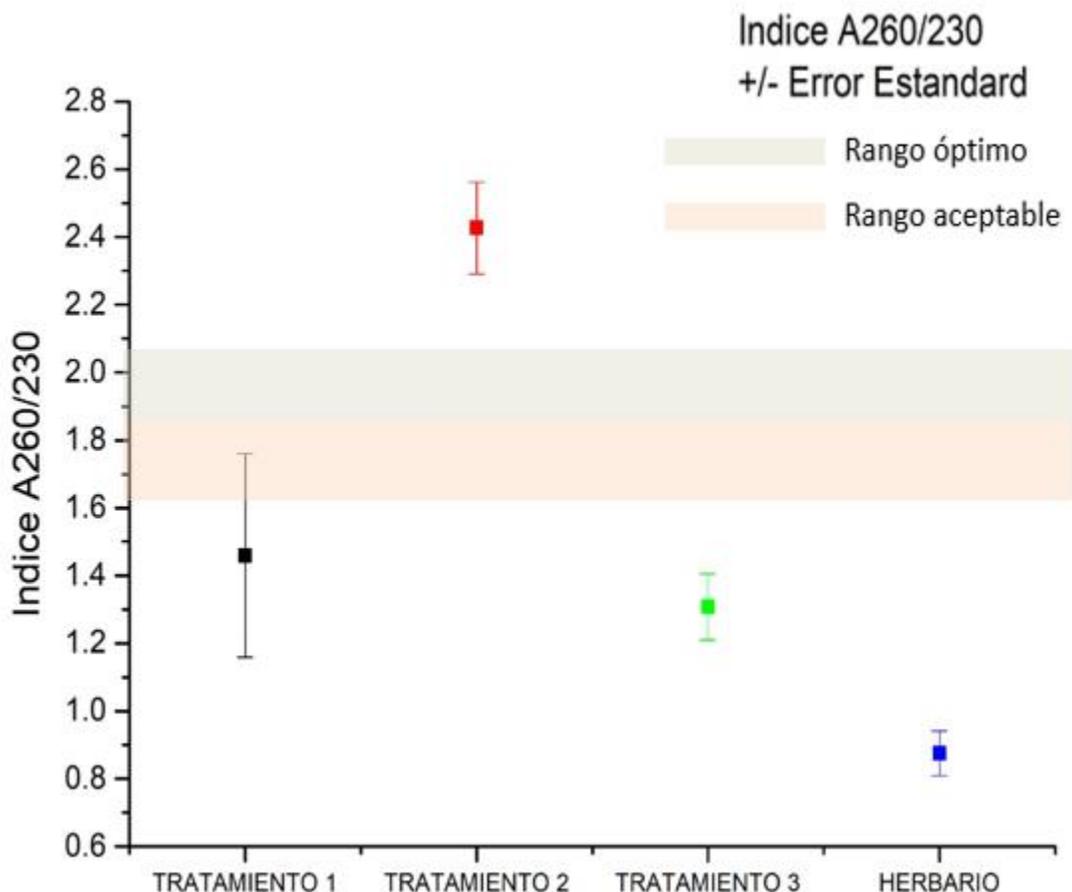


Figura 15. Pureza de las muestras mediante espectrofotometría relación A260/A230.

4.7 Análisis de códigos de barras de ADN

Antes de realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas de los amplicones de ITS2, se debe revisar que cumpla con ciertas normas de calidad. Es necesario visualizar los electroferogramas resultantes de manera individual y verificar que cada base nucleotídica, representada por un pico cromatográfico, esté bien definida, lo cual es indicativo de una buena calidad de secuenciación. De las 8 secuencias de ADN previamente mencionadas, solamente 6 cumplieron con los parámetros para poder ser consideradas en los análisis bioinformáticos posteriores, es decir, presentaban amplificaciones con bandas visibles y brillantes, y secuencias claras con picos unitarios claramente legibles en los electroferogramas, esto nos arrojó un 75% de recuperabilidad de secuencias, las que fueron descartadas presentaban solapamientos de picos y en un caso no se observó una estabilidad de secuenciación representando un 25% (Figura 16). Y de estas últimas mencionadas solamente una pertenece a una muestra herborizada (*Q. mexicana*), con un tiempo de conservación de 6 años.

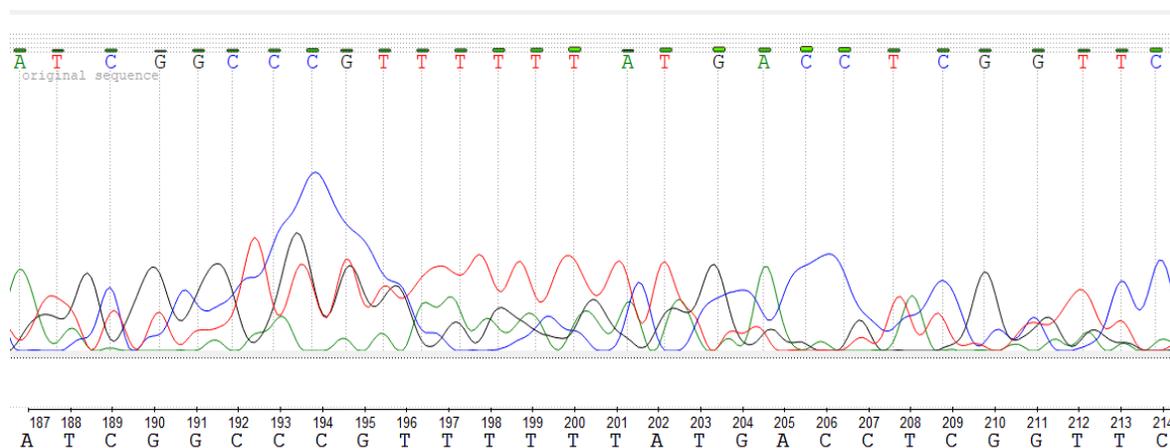


Figura 16. Electroferograma de mala calidad, se observa un alto solapamiento de picos. Secuencia *Quercus fusiformis*. Visualizados con el programa Unipro UGENE versión 33.

Las secuencias de buena calidad se presentan en la Tabla 8. Y podemos observar una alta definición (Figura 17). Normalmente los primeros y los últimos 30 a 40 nucleótidos no están bien definidos por lo que no son considerados en la secuencia consenso, de igual forma cuando existe un excesivo solapamiento de los picos cromatográficos, la calidad de la

secuenciación no es óptima y por ende afectaría el alineamiento con las secuencias de referencia.

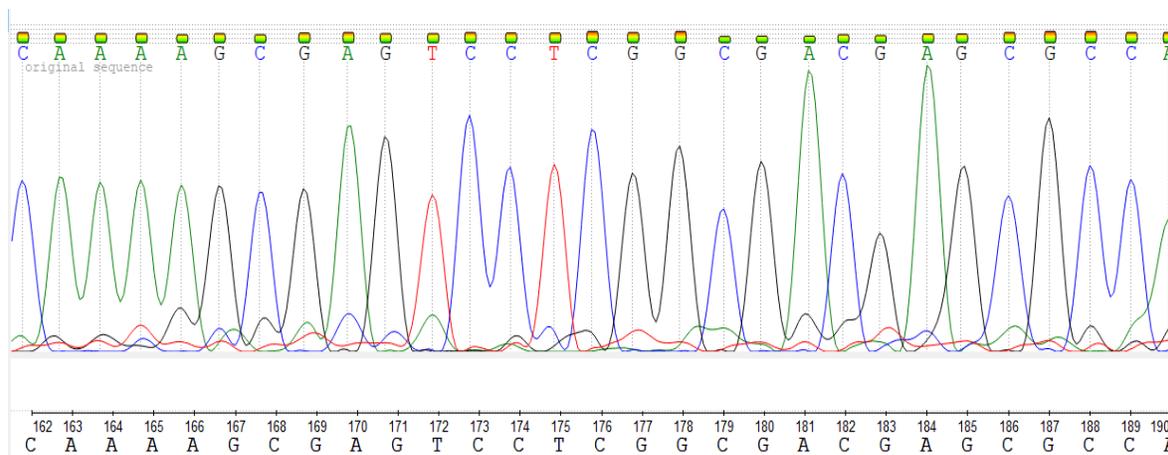


Figura 17. Electroferograma *Quercus hypoxantha*. Calidad de secuencia aceptable con picos bien definidos. Visualizados con el programa Unipro UGENE versión 33

La plataforma GenBank es un ejemplo de base de datos de secuencias nucleotídicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI), es de acceso libre que mantiene una colección de carácter público de secuencias y de traducción de proteínas anotadas, este repositorio se encuentra enlazado a una herramienta llamada Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Para la identificación por el método BLAST del NCBI, todas las secuencias fueron analizadas por el algoritmo de este repositorio, que encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas de consulta contra secuencias de referencia disponibles y calcula la significancia estadística de esta similitud, para este análisis se tomó como mínimo aceptable un 98% de identidad, así mismo se trató de manejar un número estándar de nucleótidos para todas las secuencias (Tabla 8). Todas las secuencias fueron identificadas con secuencias de especies del género *Quercus* del repositorio.

Tabla 8. Delimitación y porcentajes de identidad a nivel de género con otras secuencias mediante BLAST del NCBI.

Especies	Electroferograma	Pb. seleccionadas	Porcentaje de Identificación
<i>Quercus fusiformis</i>	0	0	0
<i>Quercus hypoxantha</i>	1	383	98.7
<i>Quercus greggii</i>	1	335	98.81
<i>Quercus muehlenbergii</i>	1	252	100
<i>Quercus rubra</i>	1	396	98.24
<i>Quercus polymorpha</i>	1	407	98.28
<i>Quercus mexicana</i>	0	0	0
<i>Quercus Castanea</i>	1	300	99.33

Para realizar el alineamiento de secuencias (Figura 18) se alimentó una base de datos con nuestras 6 secuencias de consulta y 10 secuencias referencias descargadas del CBOL (<https://www.boldsystems.org/>), considerando únicamente aquellas que estuvieran registradas bajo el mismo cebador, en este caso ITS2 y además que dichas especies pertenecieran al subgénero *Quercus*. Las secuencias se alinearon con los genomas de referencia de *Q. petraea subsp petraea* (ITSAJ1109-14), *Q. pontical* (ITSAJ1121-14), *Q. pubescens* (ITSAJ1131 14), *Q. fulva* (GBITS27172-21), *Q. arizonica* (GBITS69790-21), *Q.gravesii* (GBITS69807- 21), *Q.hintoniorum* (GBITS27188-21), *Q.sinuata* (GBITS27248-21), *Q. fusiformis* (GBITS27173-21), *Q. laeta* (GBITS27198-21), *Q. mexicana* (GBITS27198-21) y *Q. muehlenbergii* (MKTRT534-12) reportadas en BOLD SYSTEMS. Para editarlas y comparar varias especies, fue necesario recortar las secuencias ITS2 generadas, hasta una secuencia comparable de entre 250 a 400 pb.

obtenidas del CBOL, las cuales se eligieron por ser representantes de las dos secciones, para la sección *Quercus* fueron las secuencias de *Q. laeta* (GBITS27198-21) y *Q. muehlenbergii* (MKTRT534-12); y para la sección *Lobatae* fue *Q. mexicana* (GBITS27207-21).

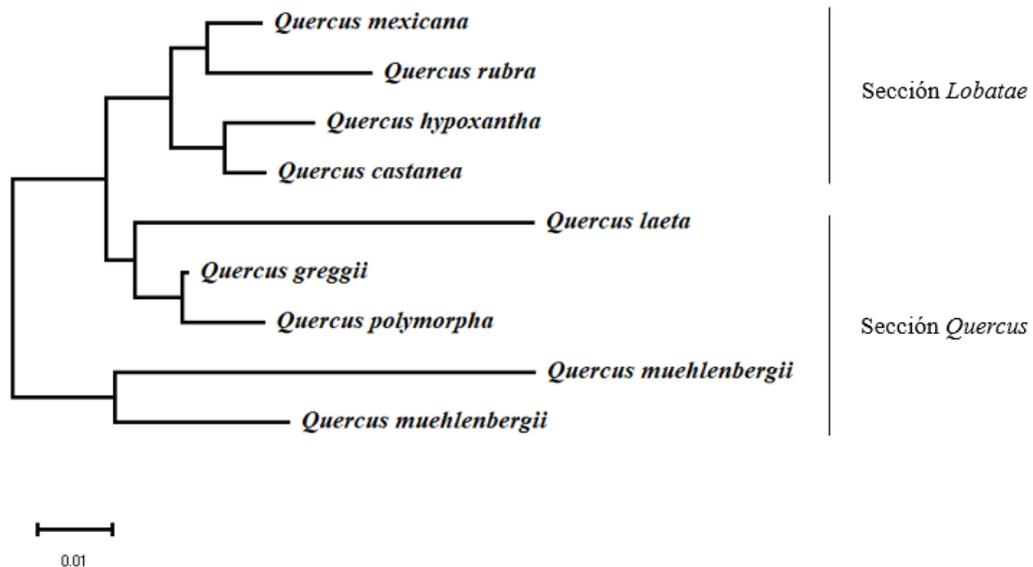


Figura 19. Árbol filogenético de encinos mexicanos usando la región ITS2 para nueve secuencias con base en la distancia genética K2P.

5. DISCUSIÓN

Desde el primer uso del método basado en CTAB para la extracción de ADN en plantas se ha modificado varias veces para reducir los contaminantes presentes en el tejido de las plantas como los son los polifenoles y los polisacáridos (Peterson *et al.*, 1997). Todo esto con el fin de obtener ADN adecuado para amplificación por PCR o digestión por restricción. Con una efectividad por encima del 90% para todos los tratamientos, incluyendo las muestras de herbario, el método empleado para extracción resultó en genómicos con la calidad necesaria para análisis posteriores. Resultados similares han sido reportados en extracciones y posterior digestión por endonucleasas utilizadas para el análisis de PCR utilizando pétalos de flores de una planta suculenta (*Gasteria croucheri*), un arbusto (*Erythrina humeana*) y un árbol (*Calpurnia aurea*) (Ibrahim, 2011). Por otro lado, hubo excepciones en la obtención de genómicos debido a que estos no se visualizaron en los geles de agarosa.

Una alta pureza del ADN y que se encuentre libre de contaminantes ha sido reconocida en estudios de genomas antiguos, y varios de estos se han centrado en desarrollar protocolos de extracción que optimicen no solo el rendimiento sino también la pureza (Rohland & Hofreiter, 2007). Se conoce de un estrecho vínculo entre la pureza del ADN y éxito de la PCR, se puede esperar inconvenientes especialmente en las plantas debido a la gran cantidad de sustancias químicas primarias y secundarias presentes en las células (Särkinen *et al.*, 2012). La amplificación de las muestras de los tratamientos conservados en alcohol evidenció que la gran cantidad de proteínas y algunos polifenoles que se encontraban en los especímenes reducen considerablemente el porcentaje de éxito de la PCR, presentándose así para los dos primeros, una efectividad mayor al 90%, en contraparte en el último tratamiento esta tasa de amplificación cayó hasta un 70%. La gran concentración de proteínas, aunada a todos los componentes que son requeridos para el proceso de herborización de ejemplares son una amenaza constante para la amplificación en este tipo de muestras. Es por ello que para este tipo de especímenes se optó por implementar la purificación por columnas en los genómicos obtenidos de la extracción con CTAB, consiguiendo así un 100% de amplificación, esto gracias a que con este proceso se logra limpiar el ADN de polisacáridos y polifenoles, ya se había documentado que la combinación de métodos durante la extracción

arroja datos aceptables, como lo reportado por Sarkinen *et al.*, (2012) al emplear el CTAB con unión de sílice, obteniendo un 80% de amplificación con *rbcL* en muestras de herbario. Por lo tanto, se puede esperar que la importancia del ADN de alta pureza sea aún mayor para las muestras de plantas degradadas, como el ADN de herbario, en comparación con el ADN antiguo de otros organismos.

El indicador 260/280 se refiere a la relación de absorbancia de la cantidad de ADN medida a 260 nm sobre la cantidad de proteína medida a 280 nm, esta se utiliza constantemente para evaluar la pureza de ADN extraído, es uno de los parámetros más importantes que se deben de tener en cuenta a la hora de observar si un método de extracción es exitoso, además de la cantidad y la integridad de las muestras (Pineda *et al.*, 2021). Con rangos entre 1.8 a 2.2, la mayoría de las muestras procesadas bajo el tratamiento uno presentaron una calidad óptima, el segundo método se localizó totalmente fuera de los parámetros establecidos, evidenciando una contaminación con compuestos fenólicos y proteínas, los dos regímenes restantes (T3 y Herbario) arrojaron resultados sobre el rango de pureza aceptable entre 1.6 a 1.7, con esto se establece que el método de extracción mediante CTAB es efectivo para la obtención de ADN de calidad para procesos posteriores, ponderando la modificación en el precalentado del CTAB y dos lavados extras con etanol al 70%. Debido a las características del tipo de muestra, se implementaron las modificaciones presentadas en el protocolo para la depuración de contaminantes fenólicos y sustancias orgánicas de otros protocolos de extracción. Se reportan estudios similares, con muestras con un alto contenido de compuestos orgánicos y con modificaciones en el protocolo químico, implementando CTAB y dodecilsulfato sódico (SDS) para depuración de contaminantes (Bag *et al.*, 2016; Miao *et al.*, 2014). La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm se utiliza para evaluar la pureza del ADN y el ARN. Una proporción de ~1.8 generalmente se acepta como "pura" para el ADN; una proporción de ~2.0 generalmente se acepta como "pura" para el ARN. Si la relación es apreciablemente más baja en cualquiera de los casos, puede indicar la presencia de proteína, fenol u otros contaminantes que se absorben fuertemente a 280 nm o cerca de ellos (Miao *et al.*, 2014).

La relación 260/230 se utiliza como medida secundaria de la pureza del ácido nucleico. Los valores para el ácido nucleico "puro" suelen ser más altos que los respectivos valores de 260/280. Los valores esperados de 260/230 están comúnmente en el rango de 2.0-2.2. Si la

relación es apreciablemente más baja de lo esperado, puede indicar la presencia de contaminantes que se absorben a 230 nm como carbohidratos y fenoles (Bag *et al.*, 2016). La contaminación por polisacáridos se evalúa calculando la relación de absorbancia A260/230 (Wilson *et al.*, 2018). No obstante, esta relación resulta mucho más variable que la relación A260/280 dependiendo de factores como la concentración de ADN o de la composición del tampón de resuspensión de la muestra. En las gráficas de cuantificación de ADN, para todos los tratamientos con los esquemas de calidad de ADN, se observa una relación en base a la concentración, en el tratamiento uno se obtuvo una media de 30 ng/μL lo que corresponde a una baja acumulación de ácidos nucleicos, pero en contraste, bajo el régimen de la relación 260/280 la media de estas muestras se ubicó sobre el rango 1.8 a 2.15, es decir, cumplen el parámetro de calidad óptima, por otro lado basándonos en la relación 260/230 se localizan debajo del rango de pureza aceptable, observándose la media en 1.4, Se ha reportado que el método CTAB de extracción sin modificación arroja un rendimiento de ADN de 255,23 μg por gramo de material foliar. Sin embargo, las lecturas espectrofotométricas revelaron una gran contaminación con polisacáridos y compuestos fenólicos, que dieron una relación A260/230 de 0,782 y una relación A260/280 de 1,750. La muestra era muy viscosa y de color rosado (Puchooa & Khoyratty, 2004).

La secuenciación de especímenes de herbario es extremadamente útil para buscar soluciones a muchos problemas ecológicos, epidemiológicos, filogenéticos y de taxonomía (Bieker & Martin, 2018). La recuperabilidad alcanzó un 75% de efectividad, presentándose dos secuencias con picos no definidos, siendo una de ellas de las conservadas en alcohol y la otra obtenida del herbario. Resultados similares fueron reportados por Pacheco *et al.*, (2021) en un estudio con cebadores ITS2, obtuvieron secuencias de alta calidad en un 86% de las muestras analizadas en especies de encinos. Efectos parecidos fueron registrados en la recuperación de secuencias del genoma de plastidos y secuencias de rADN en especímenes de herbario, algunos con hasta 80 años (Zeng *et al.*, 2018). De igual manera en especímenes de herbario con tamaño similar de muestra (1 cm cuadrado) para extracción obtuvieron bajas concentraciones de ADN inicial degradado siendo estas de 500 pg (Zeng *et al.*, 2018). Demostrando lo anterior la viabilidad práctica de la recuperación del genoma de los organelos y el ADNr con impactos mínimos en las muestras herborizadas. Con estos hallazgos basados en los otros estudios realizados confirman que la obtención de genoma se puede realizar con

una limitada destrucción de la muestra (Bakker *et al.*, 2016) lo que nos permite un acceso relativamente fácil a un alta número de copias de ADN en muestras de herbario conservados que como sabemos abarcan una amplia cobertura filogenética.

La bioinformática tiene en gran parte como centro de operaciones y análisis, al alineamiento de secuencias, tanto para la búsqueda de patrones entre secuencias de aminoácidos y nucleótidos, como para la búsqueda de relaciones filogenéticas entre organismos. El alineamiento de secuencias permite aclarar que tan parecidas son dos o más secuencias ya conocidas y que tanto puede llegarse a parecer una secuencia totalmente desconocida (Attwood & Parry-Smith, 2002).

Para el género *Quercus*, las relaciones filogenéticas basadas en la morfología son algo complicadas, en gran parte debido a la pronunciada variación vegetativa (Barreneche *et al.*, 1998), que contrasta marcadamente con un conjunto aparentemente constante y estabilizado de caracteres florales. Sin embargo, sin esa clasificación basada en la morfología sería prácticamente imposible discernir entre especies, incluso con la utilización de herramientas moleculares. El dendrograma obtenido en este trabajo diferencia claramente las secciones *Quercus* y Lobatae, ambas dentro del subgénero *Quercus*, cada una con 3 especies que las representan y con al menos una secuencia ya registrada en el CBOL que rectificara este dato, estas especies de referencia fueron elegidas basándose en las características morfológicas reportadas; para la sección *Quercus*, son árboles o arbustos de corteza usualmente rugosa, escamosa, gris o blanca. Hojas con margen entero, dentado o lobado, dientes mucronados. Flores estaminadas con cáliz de 2–6 lóbulos, anteras apiculadas. Flores pistiladas con cáliz adnado al ovario y estilo alargado. Fruto anual, cúpula con escamas con base engrosada y nuez glabra a tomentulosa (Villarreal *et al.*, 2008), bajo esta descripción caen tres especies analizadas que son, *Q. greggii*, *Q. polymorpha* y *Q. muehlenbergii*.

Por otro lado, la sección Lobatae es descrita como árboles o arbustos de corteza lisa a fisurada, café a negruzca, cuenta con hojas con margen entero, dentado o lobado, dientes y lóbulos usualmente terminados en aristas. Flores estaminadas con cáliz de 2–6 lóbulos, anteras usualmente retusas. Flores pistiladas con cáliz libre del ovario y estilo linear a espatulado. Fruto bianual, raramente anual, cúpula con escamas con base plana, algunas veces engrosada y nuez tomentosa (Villarreal *et al.*, 2008). Bajo estas características *Q.*

hipoxantha, *Q. rubra* y *Q. Castanea* fueron separadas en esta sección, esta última corresponde a una muestra de herbario.

6. CONCLUSIONES

Dada la importancia económica de los encinos para su aprovechamiento, ya sea en biomasa, fibra, productos de madera y alimentos; además de que constituyen importantes recursos forestales y son los principales impulsores de la biodiversidad terrestre en sus ecosistemas, es importante continuar y expandir los trabajos de códigos de barras de ADN en encinos mexicanos, ya que según datos del BOLDSYSTEMS solamente un 5% de los mismos cuentan con al menos un código de barras; la extracción de ADN mediante el método de CTAB modificado fue exitosa en todos los tratamientos de conservación y herborización, de igual manera los cebadores demostraron una alta tasa de amplificación para cada régimen, aunque fueron notorias las diferencias entre la concentración y calidad de ADN extraído en cada caso, los amplicones obtenidos fueron aptos para ser secuenciados obteniendo una recuperabilidad de secuencias del 75%.

En cuanto a la cuantificación de ADN extraído, la concentración de ADN varía de acuerdo a los diferentes tratamientos, así mismo la concentración de proteínas varía de acuerdo a los diferentes tratamientos, existe una interacción entre la cantidad de ADN y la cantidad de proteínas extraídas en cada tratamiento. El ADN presentó una calidad por debajo de la aceptable según los índices de A260/280 Y A260/230, siendo la excepción el tratamiento uno que se situó en los rangos de calidad optima de ADN, sin embargo, estos indicativos no impidieron la amplificación y posterior secuenciación de los especímenes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Attwood, T. K., & Parry-Smith, D. J. (2002). *Introduction to bioinformatics*.
- Avalos, S. V. (2010). Notes on the Genus *Quercus* in Mexico. In *International Oak Journal No* (Vol. 21).
- Bag, S., Saha, B., Mehta, O., Anbumani, D., Kumar, N., Dayal, M., Pant, A., Kumar, P., Saxena, S., & Allin, K. H. (2016). An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. *Scientific Reports*, 6(1), 1–9.
- Bakker, F. T., Lei, D., Yu, J., Mohammadin, S., Wei, Z., van de Kerke, S., Gravendeel, B., Nieuwenhuis, M., Staats, M., & Alquezar-Planas, D. E. (2016). Herbarium genomics: plastome sequence assembly from a range of herbarium specimens using an Iterative Organelle Genome Assembly pipeline. *Biological Journal of the Linnean Society*, 117(1), 33–43.
- Barreneche, T., Bodénès, C., Lexer, C., Trontin, J.-F., Fluch, S., Streiff, R., Plomion, C., Roussel, G., Steinkellner, H., & Burg, K. (1998). A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(7), 1090–1103.
- Barreneche, T., Casasoli, M., Russell, K., Akkac, A., Meddour, H., Plomion, C., Villani, F., & Kremer, A. (2004). Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, 108(3), 558–566. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1462-2>
- Bieker, V. C., & Martin, M. D. (2018). Implications and future prospects for evolutionary analyses of DNA in historical herbarium collections. *Botany Letters*, 165(3–4), 409–418.
- Bortolus, A. (2008). Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 37(2), 114–118.
- Casasoli, M., Derory, J., Morera-Dutrey, C., Brendel, O., Porth, I., Guehl, J. M., Villani, F., & Kremer, A. (2006). Comparison of quantitative trait loci for adaptive traits between oak and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map. *Genetics*, 172(1), 533–546. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.048439>
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K. M., & Carine, M. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2), 295–299.

- Chase, M. W., & Fay, M. F. (2009). Barcoding of plants and fungi. *Science*, 325(5941), 682–683.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., & Pang, X. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS One*, 5(1), e8613.
- Chiou, S.-J., Yen, J.-H., Fang, C.-L., Chen, H.-L., & Lin, T.-Y. (2007). Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. *Planta Medica*, 73(13), 1421–1426.
- Couch, J. A., & Fritz, P. J. (1990). Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8(1), 8–12.
- Cruz-Cárdenas, G., Villaseñor, J. L., López-Mata, L., & Ortiz, E. (2012). Potencial distribution of humid mountain forest in México Autor para la correspondencia: gcruz@colpos.mx. In *Botanical Sciences* (Vol. 90, Issue 3).
- Dasmahapatra, K. K., & Mallet, J. (2006). Taxonomy: DNA barcodes: Recent successes and future prospects. In *Heredity* (Vol. 97, Issue 4, pp. 254–255). <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800858>
- de Vere, N., Rich, T. C. G., Ford, C. R., Trinder, S. A., Long, C., Moore, C. W., Satterthwaite, D., Davies, H., Allainguillaume, J., & Ronca, S. (2012). DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *PloS One*, 7(6), e37945.
- Denk, T., & Grimm, G. W. (2010). The oaks of western Eurasia: Traditional classifications and evidence from two nuclear markers. *Taxon*, 59(2), 351–366. <https://doi.org/10.1002/tax.592002>
- Dormontt, E. E., van Dijk, K.-J., Bell, K. L., Biffin, E., Breed, M. F., Byrne, M., Caddy-Retalic, S., Encinas-Viso, F., Nevill, P. G., & Shapcott, A. (2018). Advancing DNA barcoding and metabarcoding applications for plants requires systematic analysis of herbarium collections—an Australian perspective. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 134.
- Escobar, D., Jojoa, L. M., Díaz Sánchez, S. R., Rudas, E., Albarracín, R., Gómez, J., López, C. R., Saavedra, J., & Ortiz, R. (2015). *Georreferenciación de localidades: Una guía de referencia para colecciones biológicas*.
- Funk, V. A., Gostel, M., Devine, A., Kelloff, C. L., Wurdack, K., Tuccinardi, C., Radosavljevic, A., Peters, M., & Coddington, J. (2017). Guidelines for collecting vouchers and tissues intended for genomic work (Smithsonian Institution): Botany Best Practices. *Biodiversity Data Journal*, 5.

- Funk, V. A., Hoch, P. C., Prather, L. A., & Wagner, W. L. (2005). The importance of vouchers. *Taxon*, 54(1), 127–129.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., Pang, X., Xu, H., & Chen, S. (2010a). Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 116–121.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., Pang, X., Xu, H., & Chen, S. (2010b). Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.026>
- Gaudeul, M., & Rouhan, G. (2013). A plea for modern botanical collections to include DNA-friendly material. *Trends in Plant Science*, 18(4), 184–185.
- Gervais, G. Y. F., & Bruneau, A. (2002). Phylogenetic analysis of a polyphyletic African genus of Caesalpinioideae (Leguminosae): *Monopetalanthus* Harms. *Plant Systematics and Evolution*, 235(1), 19–34.
- González-Espinosa, M., Meave, J. A., Ramírez-Marcial, N., Toledo-Aceves, T., Lorea-Hernández, F. G., & Ibarra-Manríquez, G. (2012). *Los bosques de niebla de México: conservación y restauración de su componente arbóreo*. <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=706>
- Govaerts, R., & Frodin, D. G. (1998). *World checklist and bibliography of Fagales*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., & Erickson, D. L. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797.
- Han, J., Zhu, Y., Chen, X., Liao, B., Yao, H., Song, J., Chen, S., & Meng, F. (2013a). The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS. *BioMed Research International*, 2013.
- Han, J., Zhu, Y., Chen, X., Liao, B., Yao, H., Song, J., Chen, S., & Meng, F. (2013b). The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/741476>
- Han, J., Zhu, Y., Chen, X., Liao, B., Yao, H., Song, J., Chen, S., & Meng, F. (2013c). The short ITS2 sequence serves as an efficient taxonomic sequence tag in comparison with the full-length ITS. *BioMed Research International*, 2013.

- Hart, M. L., Forrest, L. L., Nicholls, J. A., & Kidner, C. A. (2016). Retrieval of hundreds of nuclear loci from herbarium specimens. *Taxon*, *65*(5), 1081–1092.
- Heberling, J. M., & Isaac, B. L. (2017). Herbarium specimens as exaptations: New uses for old collections. *American Journal of Botany*, *104*(7), 963–965.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313–321.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., & Sticher, O. (1998). *Medicinal plants in México: healers' consensus and cultural importance*.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011a). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, *6*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011b). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*, *6*(5), e19254.
- Howard, D. J., Preszler, R. W., Williams, J., Fenchel, S., & Boecklen, W. J. (1997). How discrete are oak species? insights from a hybrid zone between *Quercus* *or/sea* and *Quercus* *oambelii*. In *Evolution* (Vol. 51, Issue 3).
- Ibrahim, R. I. H. (2011). A modified CTAB protocol for DNA extraction from young flower petals of some medicinal plant species. *Geneconserve*, *10*(40), 165–182.
- James, S. A., Soltis, P. S., Belbin, L., Chapman, A. D., Nelson, G., Paul, D. L., & Collins, M. (2018). Herbarium data: Global biodiversity and societal botanical needs for novel research. *Applications in Plant Sciences*, *6*(2), e1024.
- Jobes, D. v, Hurley, D. L., & Thien, L. B. (1995). Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon*, *44*(3), 379–386.
- Jørgensen, A., Stothard, J. R., Madsen, H., Nalugwa, A., Nyakaana, S., & Rollinson, D. (2013). The ITS2 of the genus *Bulinus*: Novel secondary structure among freshwater snails and potential new taxonomic markers. *Acta Tropica*, *128*(2), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.05.009>
- June, V. V., & Muller, C. H. (1952). *Ecological Control of Hybridization in Quercus: A Factor in the Mechanism of Evolution* Author(s): Cornelius H. Muller Reviewed work(s): Source: *Evolution International journal of organic evolution published by the*

society for the study of evolution ecological control of hybridization in Quercus: a factor in the mechanism of evolution 1, 2 (Vol. 6, Issue 2).

- Keller, A., Förster, F., Müller, T., Dandekar, T., Schultz, J., & Wolf, M. (2010). Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. *Biology Direct*, 5(1), 1–12.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120.
- Kremer, A., Abbott, A. G., Carlson, J. E., Manos, P. S., Plomion, C., Sisco, P., Staton, M. E., Ueno, S., & Vendramin, G. G. (2012). Genomics of Fagaceae. In *Tree Genetics and Genomes* (Vol. 8, Issue 3, pp. 583–610). <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0498-3>
- Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O., & Bermingham, E. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18621–18626.
- Kubisiak, T. L., Hebard, F. v, Nelson, C. D., Zhang, J., Bernatzky, R., Huang, H., Anagnostakis, S. L., & Doudrick, R. L. (1997). *Molecular Mapping of Resistance to Blight in an Interspecific Cross in the Genus Castanea* (Vol. 87, Issue 7).
- Kubitzki, K. (1993). Fagaceae. In *Flowering Plants· Dicotyledons* (pp. 301–309). Springer.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547.
- Lexer, C., Gloszl, · J, Steinkellner, · H, Trontin, J.-F., Favre, J.-M., Fluch, S., Burg, · K, Barreneche, T., Bodenes, · C, Lexer, · C, Streiff, · R, Plomion, · C, Roussel, · G, Burg, K., Glo¨sslglo¨ssl, · J, & Kremer, · A. (1998). A-2444 Seibersdorf. In *Austria Theor Appl Genet* (Vol. 97). Springer-Verlag.
- Logan, W. B. (2005). *Oak: the frame of civilization*. WW Norton & Company.
- Lombardo, L., Nisi, M., Vanzetti, L., & Helguera, M. (2012). *Uso de marcadores moleculares en el programa de mejoramiento de trigo del INTA*.
- Manos, P. S., & Stanford, A. M. (2001). The historical biogeography of Fagaceae: Tracking the tertiary history of temperate and subtropical forests of the Northern Hemisphere. *International Journal of Plant Sciences*, 162(6 SUPPL.). <https://doi.org/10.1086/323280>

- McMillan, N. D., Smith, S. R. P., Bertho, A. C., Morrin, D., O'Neill, M., Tiernan, K., Hammond, J., Barnett, N., Pringuet, P., & O'Mongain, E. (2008). Quantitative drop spectroscopy using the drop analyser: theoretical and experimental approach for microvolume applications of non-turbid solutions. *Measurement Science and Technology*, *19*(5), 055601.
- Miao, T., Gao, S., Jiang, S., Kan, G., Liu, P., Wu, X., An, Y., & Yao, S. (2014). A method suitable for DNA extraction from humus-rich soil. *Biotechnology Letters*, *36*(11), 2223–2228.
- Min, X. J., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcodes provide a quick preview of mitochondrial genome composition. *PLOS One*, *2*(3), e325.
- Moritz, C., & Cicero, C. (2004). DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS Biology*, *2*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>
- O'Neill, M., McPartlin, J., Arthure, K., Riedel, S., & McMillan, N. D. (2011). Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *Journal of Physics: Conference Series*, *307*(1), 012047.
- Pearson, R. L., Weiss, J. F., & Kelmers, A. D. (1971). Improved separation of transfer RNA's on polychlorotrifluoroethylene-supported reversed-phase chromatography columns. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, *228*(3), 770–774.
- Peterson, D. G., Boehm, K. S., & Stack, S. M. (1997). Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), a plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, *15*(2), 148–153.
- Petit, R. J., Carlson, J., Curtu, A. L., Loustau, M.-L., Plomion, C., González-Rodríguez, A., Sork, V., & Ducousso, A. (2013). Fagaceae trees as models to integrate ecology, evolution and genomics. *New Phytologist*, *197*(2), 369–371.
- Pineda, N. F., Marin-Suarez, J., Forero-Ulloa, F. E., & Gómez-Palacio, A. (2021). Extracción de ADN bacteriano a partir de cuerpos de agua de uso agrícola. *Ciencia y Agricultura*, *18*(1), 36–45.
- Puchooa, D., & Khoyratty, S.-U. S. S. (2004). Genomic DNA extraction from *Victoria amazonica*. *Plant Molecular Biology Reporter*, *22*(2), 195a.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, *7*(3), 355–364.
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, *2*(7), 1756–1762.

- Ross, H. A., Murugan, S., & Sibon Li, W. L. (2008). Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology*, 57(2), 216–230.
- Rubinoff, D. (2006). Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. In *Conservation Biology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 1026–1033). <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00372.x>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Särkinen, T., Staats, M., Richardson, J. E., Cowan, R. S., & Bakker, F. T. (2012). *How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens.*
- Scalfi, M., Troglio, M., Piovani, P., Leonardi, S., Magnaschi, G., Vendramin, G. G., & Menozzi, P. (2004). Erratum: A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.) (Theoretical and Applied Genetics (2003) DOI:10.1007/S00122-003-1461-3). In *Theoretical and Applied Genetics* (Vol. 108, Issue 5, p. 967). <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1583-7>
- Selvaraj, D., Sarma, R. K., & Sathishkumar, R. (2008). Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation*, 3(1), 24.
- Sharma, R., Jacob John, S., Damgaard, D. M., & McAllister, T. A. (2003). Extraction of PCR-quality plant and microbial DNA from total rumen contents. *Biotechniques*, 34(1), 92–97.
- Sharma, R., Mahla, H. R., Mohapatra, T., Bhargava, S. C., & Sharma, M. M. (2003). Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(1), 43–50. <https://doi.org/10.1007/BF02773395>
- Shepherd, L. D. (2017). A non-destructive DNA sampling technique for herbarium specimens. *PloS One*, 12(8), e0183555.
- Stecher, G., Tamura, K., & Kumar, S. (2020). Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1237–1239.
- Valencia, S., & Delgado, A. (2003). Los tricomas foliares en la caracterización de un grupo de. *Anales Del Instituto de Biología*, 74(1), 5–15.
- Valencia-A, S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Botanical Sciences*, 75, 33–53.
- Vázquez, L. (2006). Red oak species (*Quercus* section lobatae). In *Contributions to Botany* (Vol. 22, Issue 2). <http://www.jstor.org/stable/41969083><http://www.jstor.org/stable/41969083?seq=1&ci>

d=pdf-

reference#references_tab_contents<http://about.jstor.org/terms><http://www.jstor.org>

- Villarreal, J. A., Encina, J. A., & Carranza, M. A. (2008). Los encinos (*Quercus*: fagaceae) de Coahuila, México. In *J. Bot. Res. Inst. Texas* (Vol. 2, Issue 2).
- Wheeler, N., & Sederoff, R. (2009). Role of genomics in the potential restoration of the American chestnut. *Tree Genetics & Genomes*, 5(1), 181–187.
- Whittemore, A. T., & Schaal, B. A. (1991). Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6), 2540–2544.
- Wilson, K., Hofmann, A., Walker, J. M., & Clokie, S. (2018). *Wilson and Walker's principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge University Press.
- Wojciechowski, M. F. (2003). Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. *Advances in Legume Systematics, Part, 10*, 5–35.
- Zeng, C.-X., Hollingsworth, P. M., Yang, J., He, Z.-S., Zhang, Z.-R., Li, D.-Z., & Yang, J.-B. (2018). Genome skimming herbarium specimens for DNA barcoding and phylogenomics. *Plant Methods*, 14(1), 1–14.