

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Efecto de la Herborización sobre la Extracción de ADN y su Amplificación en Fabaceas

Por:

HUGO OCTAVIO MÉNDEZ ROBLERO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Marzo de 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Efecto de la Herborización sobre la Extracción de ADN y su Amplificación en Fabaceas

Por:

HUGO OCTAVIO MÉNDEZ ROBLERO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



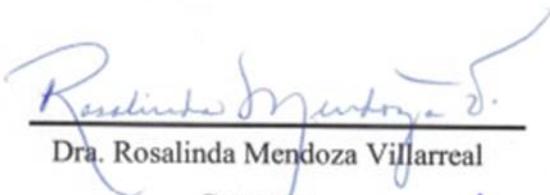
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Asesor Principal



Dra. Lihua Wei

Asesor Principal Externo



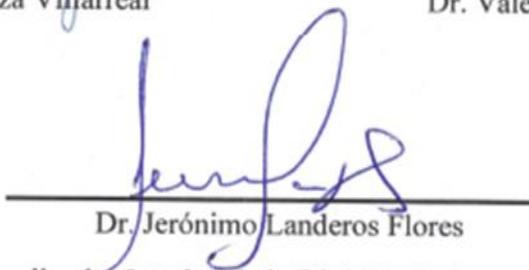
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Coasesor



Dr. Valentín Robledo Torres

Coasesor



Dr. Jerónimo Landeros Flores

Coordinador Interino de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Marzo de 2023

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 en 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.



Hugo Octavio Méndez Roblero

Autor Principal

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, doy gracias a **Dios** y a **Jesús** por haberme guiado en este proyecto, al **Espíritu Santo** por ser mi luz en los años que curse la Universidad, a la **Virgen María** por darme el don de la sabiduría y por ser el pilar que me dio fortalezas para alcanzar mis objetivos.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por permitirme ser parte de ella, en donde brindan un apoyo incondicional hacia los jóvenes estudiantes que vienen de diferentes partes de la república Mexicana, por ser la mejor casa de estudios, la cual me recibió con los brazos abiertos, donde me obsequiaron diversas oportunidades para emprender un mejor proyecto de vida y por ofrecer a docentes de calidad e instalaciones que permiten forjar profesionistas de mucho exitoso ¡BUTRES POR SIEMPRE!.

Al **Departamento de Botánica**; Laboratorio de Zoología, por ser pieza clave para realizar el experimento de investigación, el cual es un espacio de mucha confianza, donde puedes demostrar y adquirir conocimientos buenos, donde me desarrolle de forma teórica como práctica profesionalmente.

Al **Jardín Botánico**. A los encargados de dicha área dentro de la Universidad, reconociendo el trabajo, labor y desempeño para que las plantas estén en buenas condiciones, al **Ing., Froylan Meráz Saavedra** por ser un apoyo incondicional al momento de identificar y recolectar las muestras en campo las cuales se utilizaron en este estudio.

A mi **Asesor; Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez**, demostrando su gran profesionalismo y depositando su confianza hacia mí en este proyecto, impartíendome conocimientos que me ayudaron a ser una mejor persona dentro y fuera de un aula de clases, su inmenso apoyo incondicional, motivacional y económico me ayudaron a salir adelante, mi estimado amigo o “papá Miguel” como le decíamos, estoy eternamente agradecido con usted, los consejos, las llamadas de atención siempre fueron para bien, tuvimos demasiadas aventuras, paseos y anécdotas dentro y fuera del laboratorio, en donde nunca faltaron las risas, los chistes y la buena convivencia, sin embargo se ha convertido en mi mentor para poder concluir esta etapa de mi vida, talvez el proceso no fue nada fácil, pero con su apoyo y disposición todo se pudo,

son pocas las palabras pero son sinceras, un eterno respeto y gratitud mi gran amigo MIGUEL, mis más sinceros agradecimientos por su perseverancia, constancia y dedicación. ¡Muchas Gracias!

A la **Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes**, mostrando un cariño y paciencia hacia todos los jóvenes, guiándome en este proceso con buenos conocimientos, enseñándome técnicas nuevas, siempre tuvimos una buena convivencia, las risas nunca faltaron, mi estimada Dra. Se convirtió en una pieza fundamental en mi proyecto de investigación, más allá de lo académico le doy gracias por brindarme su amistad y confianza, convirtiéndose en mi amiga, los regaños, consejos e indicaciones nunca fueron de más, en verdad muchas gracias por todo lo brindado mi estimada amiga.

A mi familia. Los cuales siempre estuvieron al pendiente de mis papas mientras yo no estaba con ellos, cada uno de mis familiares fueron un pilar fundamental en mi vida diaria y estudiantil, mostrando su inmenso apoyo desde lejos, estoy eternamente agradecido que a pesar de las circunstancias que cada uno de ustedes vivía, me enseñaron cimientos de formación académica para ser una mejor persona, lo cual me servirá para ser un mejor profesionalista, sin más que decirle quiero recordarles que siempre seguiré siendo el “Huguito”, gracias por acompañarme en este proceso que no fue nada fácil, pero se convirtió en un logro más para toda la familia.

DEDICATORIA

A **mí** mismo; por ser una persona que siempre se exige más y nunca ver hacia atrás, sé que esto no lo podría lograr sin mi Fe hacia a DIOS.

A mi madre **Claribel Imelda Roblero López**; tienes muchas cicatrices en el alma, pero eso no impidió que nos mostrarás tu mejor sonrisa y nos criaras con todo tu amor. Te doy gracias por tu inmenso apoyo incondicional desde mí primer día de vida, por toda esa carga como mamá, por siempre sacar adelante a tus hijos, siempre nos inculcaste valentía ante las adversidades, sacabas lo mejor de tus esfuerzos cuando la vida nos golpeaba, una amiga en la cual desahogo mis problemas, tristezas y éxitos, los mejores consejos no los aprendí de un libro ni la información que en la red se puede encontrar, fuiste tu quien me enseñó a ser una buena persona, a no temer a los cambios y a dar todo de mí para mis sueños alcanzar, gracias por los regaños y consejos. ¡TE AMO MAMÁ!

A mi padre **Omar Méndez Gamboa**; sé que enfrentaste grandes desafíos y que la vida no siempre te sonrió pero admiro la fuerza que te motiva a seguir adelante y darme el mejor ejemplo de superación, ahora comprendo todos tus sacrificios, tus esfuerzos son impresionantes, tu carisma, anécdotas, historias, consejos y regaños siempre los llevare conmigo, me has enseñado a trabajar para ganarme el pan de cada día, eres un hombre responsable y de buenos sentimientos, mi mejor amigo y de quien siempre estaré orgulloso, sé que tu corazón de Padre dice que aún tienes mucho que hacer por nosotros, pero es tiempo de que seamos agradecidos y cuidemos de ti con todas las fuerzas de nuestro corazón. ¡Tú te lo mereces, Papá! ¡TE AMO, PAPÁ!

A mi hermano **Omar de Jesús Méndez Roblero**. Mi estimado hermano, somos como un árbol; crecemos con las ramas en diferente dirección, pero nuestras raíces son las mismas, te agradezco por todo el apoyo brindado, por las grandes anécdotas que pasamos, sin importar que habían días de problemas, pleitos, travesuras enfermedades y alegrías siempre fuiste mi compañero de aventuras, gracias por siempre cuidar de mi desde que era un niño, Dios te bendiga y proteja siempre.

A mi **Hermano Franklin Yosimar Méndez Roblero**. Sé que la vida no ha sido fácil para ti, sé que eres un hermano que siempre ve por toda la familia, dicen que los hermanos mayores nacen antes para poder cuidar de sus hermanitos, que suerte la mía de tener un hermano mayor tan bueno como tú, te agradezco por todo el apoyo que me has mostrado durante mi etapa en la universidad, sé que sin ti no hubiera culminado este proceso, los regaños y consejos nunca fueron de más, Dios te bendiga y proteja siempre.

A mis sobrinos **Valeria y Christopher** su hermosa llegada a este mundo cambio la vida de la familia, siempre nos llenan de felicidad, sacándonos una sonrisa en los momentos más difíciles.

A mi abuela materna **Tomasa López Hernández** por demostrar su perseverancia, siendo una mentora hacia sus nietos. ¡Te quiero mucho abuela!

A mis padrinos **Sonia Escobar y Pedro Núñez**; los caminos de la vida no son nada fácil, un ejemplo muy claro es el de ustedes, su constancia y perseverancia los llevo al lugar donde están, gracias por estar conmigo en los momentos más amargos y también es los más felices, siempre los he querido como mis segundos padres, esos consejos y regaños siempre los llevare conmigo y por supuesto siempre llevare ese amor que ustedes me tienen.

A mis padrinos **Yanderi y Liliana**; por siempre quererme como un hijo, mostrando cariño y amor, siempre han sido muy afectuosas, constantemente has estado muy apegada a la familia, siempre las voy a ver como la tía más querendona de todas, sin importar las circunstancias siempre estuvieron conmigo desde el día en el que nací, mis más sincera admiración y respeto hacia ustedes.

A mis tíos el **Ing. Héctor Fabián Cruz López** quien fue una inspiración para estudiar esta carrera, al cual aprecio demasiado, al **Sr. Floriberto y Sra. Guillermina López**, a quienes estimo de corazón, siempre estás en mis pensamientos, aunque no nos veamos constantemente, gracias por su tremendo cariño, apoyo y motivación que le dan a la familia.

A mis primos, **Carlos, Uneyver, Cristian** con los cuales pase los momentos más felices de la infancia, nunca faltaron los enojos y alegrías, como olvidar aquellas tardes en el campo con papa Omar o las tardes en el cafetal (Porvenir). A **Kevin** por todos aquellos juegos de infancia que pasamos juntos. A **Andrix** por ser un primo fantástico. A **Antonio** (Toñito) que es el primo más pequeño con el cual tengo una buena relación a pesar de los años que le llevo.

A mis primas **Fani, Lupita, Karen, Yaseli, Yulene y Aleley**, la vida las hizo mis primas, el amor las hizo mis amigas, pero el tiempo y las vivencias las volvieron mis hermanas. Su hermoso afecto de amor, siempre lo llevare conmigo, las quiero mucha a todas.

A **Daniela Martínez P.** por ser una persona a la cual quiero mucho, por todo ese apoyo y entusiasmo brindado, por creer en mi desde el primer día en que entre a la universidad, por esas anécdotas e historias vividas. Te agradezco de corazón todo el apoyo brindado hacia mi familia y a mí (♥). **¡Te quiero mucho!**

A mis padrinos **Bella luz Cruz y Cruz Escobar**, por todo el apoyo que me han dado, por siempre estar con mi familia en las buenas y malas. Por ser mis segundos abuelos.

A la C.P. **Liliana Eugenia Rivera Reyes** su apoyo durante mi estancia en saltillo es de admirarse, sin conocerme me extendió la mano, ganándose la dicha de decirle mamá, siempre me vio como un hijo, sus consejos nunca fueron en vano, estoy profundamente agradecido por ese apoyo mutuo que usted me obsequio, Dios la bendiga siempre mamá Liliana.

Al Ing. **Emmanuel D. Ibarra Rivera**, por ser un amigo muy especial y luego convertirse en un hermano, por todas esas anécdotas que pasamos en familia.

Al Ing. **Javier Vieyra Bejarano**, por brindarme su amistad y compartirme conocimientos nuevos, por todo el apoyo durante mi etapa de prácticas profesionales, por la disponibilidad de atenderme sin importar la hora que fuera, mis más sin seros respetos hacia usted.

Al **Lic. Christian Oviedo De La Torre**, por abrirme las puertas de su hogar, por su valiosa amistad, por todo el apoyo brindado y por ser un buen amigo.

A mis amigos; **Edgar Miguel**, por ese apoyo incondicional, por vernos como hermanos, por todas las vivencias juntos dentro y fuera de un aula de clases. A **Alberto Bravo** por ser una amistad muy valiosa, por todas esas anécdotas y vivencias que pasamos. A **Mario Rodríguez** por ser mi primer amigo en Saltillo, por su eterna amistad y por el apoyo durante toda nuestra formación como profesionistas. A **Dolores Lerma y Griselda Ducoing**, por brindarme su amistad cuando más lo necesite, siempre recordare aquellos trabajos en equipo o aquellas prácticas en campo, en donde nunca faltaron las risas y los juegos, las estimo mucho amigas. A **Sofía Ibarra**; por tenernos mucha confianza, por ser una amistad verdadera y sincera, llena de muchas alegrías, en donde pasamos muchos momentos felices. A **Mariel Herrera**; por su amistad incondicional, por los consejos, por aquellas aventuras vividas dentro y fuera del laboratorio, te aprecio mucho querida. A **Isabel Huertas**; por su eterna amistad desde el primer día de clases y por llevarnos bien. Gracias a todos ustedes que se convirtieron en parte de mi familia, donde con cada uno pase miles de aventuras, siempre me apoyaron en todo momento sin importar las circunstancias que ustedes pasaban, por todos aquellos momentos de diversión que se presentaron durante nuestro recorrido juntos, todo eso se quedara marcado siempre en mi Vida. **Gracias por todo mejores amigos.**

A mis compañeros del laboratorio; **Francisco H², Diego Parra, Ulises Cacho, Araceli Rivera, Anel Lara, Valeriano C², Johana Vergara, Jairo Durán, Luz Ramos, Gary Rodríguez, Saul Cruz, Bryan Rivera, Ángel Castro, Silvana García, Jazmín Solano.** Por todo el apoyo brindado, por las risas, el recibimiento, los conocimientos compartidos y por esas palabras de aliento que siempre fueron de mucha ayuda.

A **todos**; las personas presentes que me apoyaron, que estuvieron conmigo y que tuve la fortuna de conocer, pero me sería difícil agradecer, este logro también lo comparto con ustedes.

Para un ángel; Mi eterno Tío Firmian Yobani Cruz López (†).

ÍNDICE DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO	I
AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS	X
RESUMEN.....	XI
1 INTRODUCCIÓN	1
2 JUSTIFICACIÓN	3
3 OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo General.....	3
3.2 Objetivos Específicos	3
4 HIPÓTESIS.....	3
5 REVISION DE LITERATURA.....	4
5.1 Familia Fabaceae	4
5.2 Subfamilias de Fabaceae	5
5.2.1 Subfamilia Mimosoideae.....	5
5.2.2 Subfamilia Caesalpinioideae	6
5.2.3 Subfamilia Papilionoideae.....	7
5.3 Géneros de la familia <i>Fabacea</i>	7
5.3.1 Género <i>Acacia</i>	7
5.3.2 Genero <i>Cercis</i>	9
5.3.3 Género <i>Leucaena</i>	10
5.3.4 Género <i>Parkinsonia</i>	11
5.3.5 Género <i>Prosopis</i>	11
5.3.6 Género <i>Dalea</i>	12
5.3.7 Género <i>Mimosa</i>	13
5.4 Proceso de herborización.....	14
5.5 Efecto del proceso de herborización.....	15
5.6 Importancia de las muestras de herbario	16
5.7 Extracción de ADN muestras vegetales frescas y de herbario	16

5.8	Parámetros importantes en la calidad de ADN.....	17
5.9	Métodos más utilizados en extracción de ADN de muestras vegetales.	18
5.9.1	Método de CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio).....	18
5.9.2	Método de tratamiento con horno de micro-ondas.....	18
5.9.3	Método con fenol - micro-ondas	19
	Paquete comercial "Nuclcon. Phytopure for Plant DNA" (Amersham Life Science)..	19
5.9.4	Paquete de extracción de ADN "Plant DNAzol"	19
5.10	Códigos de barras de ADN.....	19
5.11	Marcadores utilizados como códigos de barras de ADN	21
5.11.1	ITS2 (segundo espaciador transcrito interno – núcleo).....	21
5.11.2	matK (maturasa K – cloroplasto).....	22
5.11.3	rbcL (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa – cloroplasto).	22
6	MATERIALES Y METODOS	23
6.1	Colecta de material biológico	23
6.2	Extracción de ADN genómico.....	26
6.3	Electroforesis en gel de agarosa	26
6.4	Amplificación por medio de PCR	26
6.5	Cuantificación de ADN	27
6.6	Índices A260/A280 y A260/A230.....	28
6.7	Análisis estadístico	28
7	RESULTADOS.....	29
7.1	Colecta de material biológico.....	29
7.2	Extracción de ADN genómico.....	30
7.3	Amplificación por medio de PCR	30
7.4	Rendimiento de ADN y proteínas	32
7.5	Índices A260/A280 y A260/A230.....	33
8	DISCUSIÓN	35
8.1	Materiales colectados.	35
8.2	Extracción de ADN	35
8.3	Amplificación por medio de PCR	36
8.4	Rendimiento de ADN y proteínas	37
8.5	Calidad del ADN	39
9	CONCLUSIÓN.....	42

10 LITERATURA CITADA	43
----------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mimosa aculeaticarpa</i> (Mimosoidea), (Rosenberg, 2013).....	6
Figura 2. <i>Cercis canadiensis</i> integrante (Caesalpinioideae), (Rosenberg, 2013)	6
Figura 3. <i>Dalea bicolor</i> integrante (Papilionoideae), (CONABIO, 2021).....	7
Figura 4. Distribución natural del género <i>Acacia</i> en el mundo (Rutishauser, 2016).....	8
Figura 5. Especímenes colectados,.....	29
Figura 6. ADN genómico extraído de seis tratamientos diferentes,	30
Figura 7. Amplicones obtenidos en seis tratamientos diferentes	31
Figura 8. Rendimiento de ADN en seis tratamientos de extracción de ADN.....	32
Figura 9. Cuantificación de proteínas, en seis tratamientos de extracción de ADN.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores indicativos de calidad en muestras de ADN.	18
Tabla 2. Especies y ubicación geográfica de muestras colectadas.....	23
Tabla 3. Especies muestreadas del herbario ANSM.	24
Tabla 4. Descripción de tratamientos.	25
Tabla 5. Mezcla para la reacción de PCR.	27
Tabla 6. Cebadores y programa de PCR para la amplificación de ADN.	27
Tabla 7. Porcentajes de amplificación en cinco tratamientos y muestras de herbario.	32
Tabla 8. Análisis de varianza.	32
Tabla 9. Índice 260/280 en cada uno de los tratamientos.	34
Tabla 10. Índice de absorción a 260/230 en cada uno de los tratamientos.	34

RESUMEN

La familia Fabaceae, pertenece al orden Fabales, es de gran importancia, representan una gran oportunidad económica esto se debe, a que son forrajeras maderables, medicinales y en algunos casos sirven como fuente de alimentos. Las Fabaceas se caracterizan por presentar un fruto llamado legumbre, mismo que la mayoría de las veces al madurar se parte en dos líneas haciendo una sutura. Se distribuyen en diferentes puntos del planeta, excepto en regiones polares y en desiertos con temperaturas extremas. Las especies conservadas en herbarios son una fuente importante de material vegetal, permitiendo recaudar información genética del ADN que contiene cada especie, a través de los herbarios es posible determinar conceptos y problemas taxonómicos, tanto evolutivos como el de distribución de poblaciones. El ADN extraído de muestras de plantas de herbario a menudo resulta no apto para estudios moleculares, por lo que es necesario identificar problemáticas en el proceso de extracción de ADN, se propone analizar especies de la familia Fabaceae procesadas con diferentes tratamientos de herborización para identificar problemáticas en el proceso de extracción.

Se colectaron muestras de especies de la familia Fabaceas, las cuales se sometieron a seis tratamientos diferentes de herborización (TF, T15, TT, TQ, TQT, Y TH), se determinó el rendimiento de ADN y proteínas, se determinó la calidad por medio de los índices 260/280 y 260/230 y se amplificó por PCR. La extracción de ADN genómico de muestras de fabáceas en proceso de herborización, mediante el método de CTAB modificado, resultó ser exitoso en todos los tratamientos se pudo obtener ADN genómicos verificables por electroforesis y cuantificable por espectrofotometría. Los resultados muestran que el tratamiento químico reduce el rendimiento de ADN y de proteínas y que el tiempo de conservación de la muestra no presenta mayores efectos sobre el ADN. En el índice 260/280 todas las muestras son aceptables, en el índice 260/230 ninguna fue aceptable, sin embargo, en las muestras de todos los tratamientos pudo realizarse la amplificación. Estos resultados son relevantes para poder entender el efecto de la herborización y el estado de conservación de las muestras que nos permiten entender la biodiversidad de estas especies.

1 INTRODUCCIÓN

La extracción de ADN se puede hacer de cualquier organismo vivo en el planeta tierra, con un costo accesible y con mucho menor esfuerzo de trabajo dentro del laboratorio, a través de los distintos mecanismos de extracción, se obtienen concentraciones muy altas de ADN, con mucha pureza, en un tiempo adecuado (Osorio Cadavid *et al.*, 2009). Existe una gran variedad de métodos para realizar la extracción de ADN y que han sido descritas por diversos autores (Cadavid Sánchez *et al.*, 2013). La utilización de las distintas técnicas de extracción de ADN, son requeridas en diversas materias dedicadas al estudio de la ciencia, para el análisis y descripción del genoma, (Dellaporta *et al.*, 1983). Previamente se ha propuesto un protocolo distinto para la extracción de ADN, el cual consiste en la ruptura de la pared celular, todo esto se lleva a cabo mediante el fraccionamiento mecánico con perlas de vidrio, seguido por una purificación, realizando una mezcla de fenol-cloroformo (Hoffman & Winston, 1987). Presentaron un protocolo de extracción de ADN con características únicas, al de los demás autores, este se basa en la ruptura celular, utilizando la técnica de lisis con una enzima llamada Zimolasa, y la liberación del ADN no ocupa la utilización de fenol-cloroformo. Este nuevo método de extracción de ADN ha sido muy útil y suficientemente aceptado por la eliminación del fenol. La utilización del protocolo de extracción de ADN con fenol-cloroformo, se ha utilizado con mayor frecuencia para la obtención de ADN genómico, de distintas especies de animales y plantas. Este protocolo tiene una variedad de excelentes resultados para muestras de distintos hábitats, también se menciona que es un método demasiado tardado, con un grado muy complejo, con alta dificultad y contaminante (Hoffman & Winston, 1987). La extracción de ADN utilizando el protocolo con sales normales (NaCl) es una nueva alternativa muy útil de trabajar, de menor dificultad, es un protocolo fácil de utilizar, factible y rápida, mediante la cual es posible la obtención de ADN de buena calidad en diversas cantidades, suficientes para el estudio de plantas y animales (Gao *et al.*, 2010). De esta manera se puede obtener la estimación de la diversidad genética, para los distintos estudios que se hacen en las prácticas de manejo y conservación de especies, al igual se puede aplicar para las especies que están en peligro de extinción (Gao *et al.*, 2010). Además, se menciona que la factibilidad de los diferentes estudios es frecuentemente reducida por el impedimento de aislación de ADN, con cantidades de ADN

de buena proporción, una calidad estándar y muy competente, desde la obtención de diminutas muestras de tejidos (Aranishi, 2006).

Las Fabaceas son una familia de gran interés para los científicos y botánicos, es la segunda familia más grande compuesta por plantas medicinales, se tiene un estimado de 490 especies reconocidas de este género (Gao *et al.*, 2010). Se mencionan que también existen especies que son dañinas y que contienen un grado alto de toxicidad, la especie que más se caracteriza es *Acacia rigidula*, que contiene niveles tóxicos de alcaloides (Salinas, 2012). Esta especie de planta ha sido de interés en el laboratorio, utilizado en muchos tratamientos, al igual las especies del género *Cercis* que contienen alcaloides de pirrolizidina, los cuales son tóxicos para mamíferos y aves (Barneby *et al.*, 1989).

2 JUSTIFICACIÓN

El ADN extraído de muestras de plantas de herbario a menudo resulta no apto para estudios moleculares, por lo que es necesario identificar problemáticas en el proceso de extracción de ADN, se propone analizar especies de la familia Fabaceae procesadas con diferentes tratamientos de herborización para identificar problemáticas en el proceso de extracción.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar el efecto de los pasos de la herborización en muestras de fabáceas sobre el rendimiento y la calidad del ADN extraído.

3.2 Objetivos Específicos

Cuantificar el rendimiento del ADN extraído de plantas sometidas a diferentes pasos de herborización.

Determinar la calidad del ADN extraído de plantas sometidas a los pasos de herborización.

Determinar el efecto de los tratamientos en la capacidad de amplificación del ADN.

4 HIPÓTESIS

La aplicación de diferentes tratamientos de herborización afecta el rendimiento y la calidad del ADN extraído en especies de la familia Fabaceae.

5 REVISION DE LITERATURA

5.1 Familia Fabaceae

La familia Fabaceae, pertenece al orden Fabales, se distribuye en diferentes puntos del planeta, excepto en regiones polares y en desiertos con temperaturas extremas. Las fabaceas se dispersan de acuerdo con fenómenos geográficos y climáticos, creciendo desde el nivel del mar hasta sobre los 4800 m (Gunn, 1981). Se han descrito aproximadamente 20.000 especies y 750 géneros (Camargo-Ricalde, 2000). En México la familia Fabacea, es una de las más grandes y diversas, existen alrededor de 1800 especies siendo Oaxaca el estado con una mayor diversidad de especies. Comúnmente dichas plantas son dominantes en sus hábitats, por lo general, la mayor diversificación de especies se da en ambientes tropicales, esto se debe a una buena proporción de lluvia en todo el año (Ciotir *et al.*, 2019). La mayor diversificación de especies se da en ambientes tropicales, esto se debe a una buena proporción de lluvia en todo el año (Ciotir *et al.*, 2019).

Las Fabaceas se caracterizan por presentar un fruto llamado legumbre, mismo que la mayoría de las veces al madurar se parte en dos líneas haciendo una sutura (Camargo-Ricalde, 2000). Son herbáceas, algunas trepadoras, otras arbóreas y arbustivas; se caracteriza por ser anuales o perennes, tienen hojas con distintas formas, entre ellas están las simples o compuestas o trifoliadas, en otras especies pinnadas o digitadas en otras veces la encontramos en zarcillos, transformadas en espinas o ausentes, y constantemente presentan estípulas (Camargo-Ricalde, 2000).

Presentan una floración hermafrodita, son llamativas siendo muy vistosas, están estrechamente adaptadas a la variedad de polinización por diferentes insectos. La corola contiene 5 pétalos libres; 1 de ellos es muy desarrollado, se le conoce como estandarte o vexilo, contiene 2 laterales también se le denomina alas, las 2 inferiores por lo general están soldados formando la quilla o carena, esta variedad de corola se le conoce como papilionácea, porque contiene una característica amariposada. El cáliz tiene 5 sépalos que no están muy bien soldados, en algunas veces bilabiado, contiene 10 estambres libres o unidos por los filamentos en uno (monadelfos) o dos haces (diadelfos: 9 + 1). El Gineceo súpero

tiene 1 carpelo con una gran cantidad de óvulos, tiene flores solitarias o agrupadas en racimos (erectos o péndulos) o glomérulos (Talavera & Castroviejo, 1999).

5.2 Subfamilias de Fabaceae

La familia Fabaceae se subdivide en tres diferentes subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinioideae y Papilionoideae (Llamas García & Acedo, 2016).

5.2.1 Subfamilia Mimosoideae

Incluye unos 80 géneros y 3270 especies están en zonas tropicales, boscosas y algunas en zonas áridas o semiáridas (Cavada *et al.*, 2020). Presentan diferentes hábitos de crecimiento como árboles, arbustos o hierbas. Por lo regular son perennes o anuales, algunas se caracterizan por ser trepadoras leñosas (lianas) o herbáceas, tienen un tallo voluble o con zarcillos. Las hojas son bipinnadas, excepcionalmente pinnada o alternas, tiene flores en grupos, abreviadas en cabezuelas o capítulos y éstos, en otros casos se encuentra que están agrupadas secundariamente en racimos, el perianto contiene sépalos reducidos, de 5; pétalos 4-5, general, están unidos en la base y están formando una copa hipógina. Estambres: infinitos, con filamentos muy extensos, con anteras diminutas, se menciona que en esta subfamilia los estambres exertos hacen que la flor se ha más llamativa y vistosa se tiene un gineceo, regularmente es unicarpelar, súpero, linear, unilocular, con óvulos en hilera de placentación marginal. El fruto naturalmente es seco y dehiscente por ambas suturas, en ocasiones con indehiscente o con dehiscencia transversal la mayoría de las semillas son ranuradas, con un embrión largo (Figura 1) (Bajpai *et al.*, 2014).



Figura 1. *Mimosa aculeaticarpa* (Mimosoidea), (Rosenberg, 2013).

5.2.2 Subfamilia Caesalpinioideae

Constituida por aproximadamente 135 géneros y 2500 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales (Castellanos & Lewis, 2012). La mayor abundancia en México se encuentra en zonas cálidas (Palacios-Chávez *et al.*, 1996). Especies con crecimiento arbóreo, arbustivo o herbáceo perennes o anuales, con hojas bipinnadas, pinnadas, bifolioladas, las flores se caracterizan por ser zigomorfas, generalmente en racimos, simples, axilares o terminales, el fruto naturalmente es seco y dehiscente por las 4 ambas suturas, algunos casos son indehiscente o con dehiscencia transversal, las semillas contienen funículo elongado, y a veces con arilo (Figura 2) (Palacios-Chávez *et al.*, 1996).



Figura 2. *Cercis canadensis* integrante (Caesalpinioideae), (Rosenberg, 2013)

5.2.3 Subfamilia Papilionoideae

Subfamilia establecida como monofilética, compuesta por 482 géneros y 12.000 especies, representa a la familia Fabacea con el grupo de genero más grande, las especies se encuentran en zonas tropicales y húmedas (Hastings, 1990). Las especies en su mayoría son árboles, se han encontrado una variedad de arbustos y muy pocas son herbáceas, son perennes o anuales, también se tiene un conteo de especies trepadoras leñosas (lianas), se caracteriza por tener hojas pinnadas, trifolioladas, palmatipinnada, las flores son zigomorfas, por lo particular están en racimos, tiene un fruto seco y dehiscente por ambas suturas, en ocasiones folicular o indehiscente y las semillas contienen un corto funículo (Figura 3) (Hastings, 1990).



Figura 3. *Dalea bicolor* integrante (Papilionoideae), (CONABIO, 2021).

5.3 Géneros de la familia *Fabacea*

5.3.1 Género *Acacia*

Acacia es de los géneros más estudiados, esto se debe a que la gran diversidad de especies (Maslin, 2011).

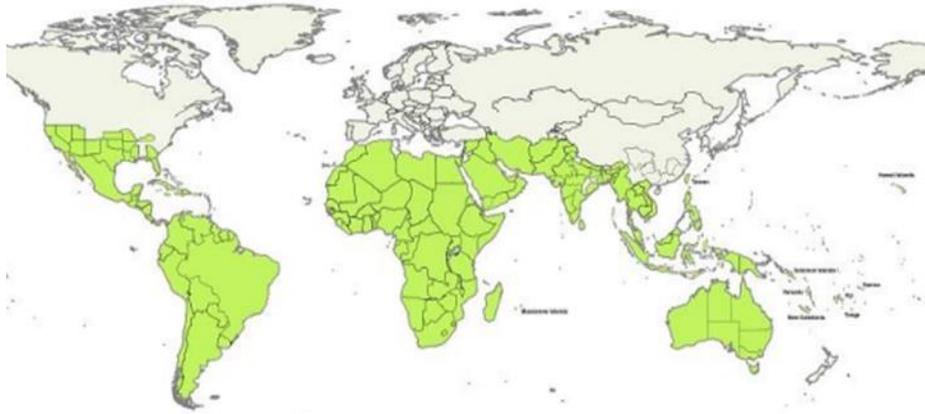


Figura 4. Distribución natural del género *Acacia* en el mundo (Rutishauser, 2016).

El género *Acacia* está representado en todo el planeta con más de 1350 especies de plantas, al igual tiene muchas endémicas en los distintos continentes, África tiene (150), América (185), Asia (95) y Australia (1000) como se muestra en la Figura 4 (Brockwell *et al.*, 2005). Se menciona que hay diversos subgéneros ya clasificados, entre ellos destacan: *Leucaena*, *Acacia (Vachellia)*, *Senegalia*, *Mimosa*, *Calandria*, *Cercis* y *Leucaena*. Los subgéneros de *Vachellia* y *Senegalia* se presentan con una distribución muy amplia en el continente africano y americano (Kyalangalilwa *et al.*, 2013).

El género *Acacia* la encontramos en todo el continente americano, con más de 55 especies, se considera un grupo monofilético, con muchas variaciones de hábitat, también tienen una fisiología, morfología y composiciones químicas diferentes (Arce, 2000). Mantiene una distribución amplia en los trópicos secos y subhúmedos (Barros Asenjo, 2007). Como parte de selvas y bosques tropicales de zonas caducifolias es de acuerdo con las categorías de vegetaciones (Rzedowski *et al.*, 2005). El género *acacia* han estado evolucionando en los bosques caducifolios de las tierras que están bajas en el oeste de Gondwana (Arce, 2000)

Las acacias proporcionan diversos productos y servicios, los cuales pueden ser maderables o no maderables, ambientales, gomas, papel, leña carbón y son fijadoras de nitrógeno (Barros Asenjo, 2007).

- *Acacia farnesiana* es arbustiva y en ocasiones se le confunde con un árbol de menor tamaño, también contiene espinas, lo encontramos en el norte del país de México en las zonas áridas y semiáridas (Clarke *et al.*, 1989).
- *Acacia constricta* suele no tener hojas en todo el invierno y en primavera, pero reproduce hojas y flores en respuesta a las lluvias de verano (Cox *et al.*, 1993). La inflorescencia que esta variedad de planta presenta son de color amarillo, de forma esférica, de unos 10 mm de diámetro y están compuestas de unos 20 a 50 floretes. La inflorescencia se mezcla con hojas a lo largo de las ramas, lo encontramos en el desierto chihuahuense (Cox *et al.*, 1993).
- *Acacia rigidula* también es arbustiva la encontramos dentro de áreas rocosas en el oeste y suroeste de Texas y región norte de México (Clement *et al.*, 1998).
- *Acacia roemeriana* se trata de un arbusto grande que tiene amplia distribución en el noreste de México, que crece en variedades de sitios (Barros Asenjo, 2007).

5.3.2 Genero *Cercis*

El género *Cercis* considera 11 especies nativas en América del Norte, Asia y Europa, se tiene mención que en su mayoría todos son arbustos grandes y muy pocos son arboles de una altura pequeña de menos de 10 m de altura, el género *Cercis* es miembro de la subfamilia caesalpinioideae de leguminosas (Leguminosae sub. Caesalpinaceae) el cual produce flores papilionáceas parecidas a guisantes, más comunes en las Fabaceas, tiene dos especies las cuales son de suma importancia, una de ellas es *C. canadensis* (redbud oriental) y *C. siliquastrum* (árbol de Judas), ambas especies son parecidas en apariencia, *C. canadensis* es producido como un cultivo de viveros en los Estados Unidos, donde es nativo, y *C. siliquastrum*, es comercialmente muy importante en la distribución natural del continente Europeo, es así que el género *Cercis* es cultivado como un árbol de paisaje de ornato y para establecimientos en forma de cortavientos o hábitats de vida silvestre (Wunderlin *et al.*, 1987).

- *Cercis canadienses* son pequeños árboles de vida corta que año tras año pierden sus hojas, los encontramos en todo el este de los Estados Unidos, son árboles sorprendentemente conspicuos, porque florecen antes de la primera, la madera es demasiada pesada y dura, tiene un grano cerrado, pero debido a que los árboles son demasiado pequeños con forma irregular, no tiene ningún valor comercial como fuente de madera, se utilizan de ornato y están extensamente plantados en varios lados (Geneve & Weston, 1988).

5.3.3 Género *Leucaena*

En los países latinoamericanos las especies del género *Leucaena* de la subfamilia Mimosoideae son las que utilizan para diversas variedades de alimentación de rumiantes en las áreas de pastoreo-ramoneo, se menciona que estas especies son ricas en proteínas, al igual contiene sistemas de corte y acarreo, esto se debe fundamentalmente a las rápidas adaptaciones de distintas condiciones del contrastante con el clima y suelo, también tiene una sobresaliente composición nutricional, y presenta una muy buena persistencia al pastoreo (García *et al.*, 2009).

El género *Leucaena*, es originario de México, esta especie no ha sido extraída y explotada en toda su capacidad (García *et al.*, 2009). Se ha demostrado que las especies del género *Leucaena* contienen un elevado porcentaje de proteína natural, siendo la mayor parte es digestible, el género *Leucaena* tiene una amplia distribución en los diferentes trópicos y subtropicos, haciendo énfasis en México, tienen múltiples usos como la protección y la cobertura de nuevas áreas en suelos dañados y erosionados de poca fertilidad (García *et al.*, 2009), también se pueden obtener gomas para uso farmacéutico (Anderson, 1984), en algunos casos para elaborar concentrados proteicos (Telek, 1982). De los muchos estudios que se le han hecho al género *Leucaena*, muestran que son una buena ruta de pigmentos naturales (Hughes, 1998).

- *Leucaena greggi*: se caracteriza por ser de dos formas, la primera es que es arbusto y la segunda es que de ser arbusto pasa hacer un árbol, esta especie tiene una alta extensión territorial en las zonas tropicales, subtropicales de México, y muy poca en zonas

boscosas, es nativa de América tropical, y también del sur de México, la podemos encontrar desde Nicaragua, Guatemala, Honduras y El Salvador (Aganga & Tshwenyane, 2003).

5.3.4 Género *Parkinsonia*

Este es un género de plantas no muy comunes, esta descrita dentro de la subfamilia Caesalpinioideae agrupan más de una decena de especies, se dice que son originarias de zonas desérticas del continente africano y americano (Sharma *et al.*, 2018). Se caracterizan por ser arbustivos o árboles espinosos, las hojas son bipinnadas tienen un raquis de las 2-4 pinnas planos y largos, tiene estípulas espinescentes y foliolos chicos en grandes cantidades, en algunas plantas son alterno u opuestos, se hace mención que las flores todas son hermafroditas, contienen 5 sépalos, todos desiguales, y 5 pétalos amarillentos o blanquecinos, contiene 10 estambres los cuales son libres, con los filamentos vellosos en las bases, como fruto tenemos una torulosa, coriácea, con muchas semillas de forma oblongas con un endospermo, de hilo pequeño (Sesa Carranza, 2020).

- *Parkinsonia aculeata* es un árbol blando de corteza verde, tiene un tronco muy bien desarrollado, las ramas están armadas con espinas de 0.4 a 3 cm de largo; pecíolos 1 a 3 mm de largo; tiene folíolos en 10 a 40 pares o más, corto-peciolados, de 2 a 8 mm de largo, caducos, raquis persistente funcionando como tejidos fotosintéticos; racimos con varias flores amarillas (5); vainas de 3 a 18 cm de largo, están estrechamente constreñidas entre las semillas, se caracteriza por ser ovoides de 4 a 5 mm de diámetro y 8 a 10 mm de largo, verdosas oscuras, manchadas con flecos café u otras en púrpura, florece en gran cantidades en abril y muy poco entre verano y otoño (Mautino & Garralla, 2021).

5.3.5 Género *Prosopis*

Este género de la subfamilia Mimosoideae, tiene descritas alrededor 40 a 44 especies de fabaceas, algunas están en formas de árboles y otras en arbustos llenos de espinas, se localizan en de zonas tropicales y templadas del continente americano, africano y el sudoeste de Asia, suelen crecer en suelos áridos, las plantas de este género son resistentes a sequías

que tardan mucho tiempo, se dice que han desarrollado un sistema radicular profundo, las distintas maderas son duras, como fruto tienen una legumbre la cual tiene alta concentración de azúcar, La mayoría de los *Prosopis* son persistentes a la salinidad y alcalinidad, la distribución natural del género *Prosopis* incluyen las zonas áridas y semiáridas de América, África y Asia (Carevic *et al.*, 2012).

- *Prosopis glandulosa* se encuentra en diferentes estados como los son los estados de San Luis Potosí, Coahuila y Nuevo León entre otros, destaca por la diversa producción forestal, por otro lado, con una baja importancia los encontramos en los estados Aguascalientes, Chihuahua, y Sinaloa (Rzedowski, 1988). Es considerado una planta invasiva que abarca demasiado territorio, que es capaz de reducir el hábitat de otras especies que son nativas de la región, e incluso logra cambios ecológicos (Rzedowski, 1988). No obstante, hoy en día se utiliza como planta para la reforestación por la alta adaptación a condiciones extremas como los son la salinidad, sequías y temperaturas de 48°C (Rodríguez Anda *et al.*, 2015). *Prosopis glandulosa* es poseedor de una variedad de usos: los frutos son empleados como forraje para el alimento del hombre y animales, la madera sirve como combustible (carbón); con la resina que se obtiene del tronco se pueden fabricar pegamentos y barnices; las flores juegan un papel de mucho interés en la producción de miel (Mora-Donjuán *et al.*, 2014). En el área de la construcción, la madera es utilizada en la creación de viviendas rurales, pilotes y muchos artículos para el hogar, como lo son herramientas y juguetes (Carrillo-Parra *et al.*, 2011).

5.3.6 Género *Dalea*

El género *Dalea* perteneciente a la subfamilia Papilionoideae, tiene especies que son localmente predominantes en diferentes biomas secos de Latinoamérica, se menciona que aporta un valor ecológico muy importante en cuanto hablamos sobre la conservación, también las especies de *Dalea* no suelen comportarse como malezas o como invasoras, crecen primordialmente en ambientes que son secos en todo el continente americano y la mayor diversificación ha ocurrido en México, seguido del centro y sur de la región Andina, llegando hasta el norte de Argentina y Chile (RIOS, 2020). En zonas de México y Colombia, las especies de *Dalea* se distribuyeron en una variedad de zonas secas de valles interandinos,

bosques secos, zonas tropicales de la región Caribe, las especies de *Dalea* son distinguibles por tener un hábito herbáceo o arbustivo y los tallos, hojas y flores con glándulas punctiformes color amarillo o marrón, también decretan aceites aromáticos, las hojas son imparipinnadas en ocasiones trifolioladas, tiene estípulas herbáceas y subglandulares, el raquis tiene generalmente un par de glándulas adaxiales y abaxiales en el punto de inserción de los peciólulos o de los folíolos sésiles (Rios, 2020). En raras ocasiones existen especies que presentan cristales en la epidermis foliar (Medina & Sousa, 2007). Las inflorescencias por lo general son espigas o racimos, los estambres contienen glándulas terminales (González, 2019).

- *Dalea Bicolor* es una especie que contiene un aroma muy fuerte, se selecciona como alimento para el ganado, se conoce que la fauna silvestre, también está relacionada tanto en su valor nutrimental como compuestos del aceite esencial (Medina & Sousa, 2007).

Al igual existe interés en los aceites esenciales y en compuestos específicos de las plantas, ya que se utiliza para su uso comercial en diversas áreas productivas, esta característica hace resaltar el un uso potencial adicional de *Dalea bicolor* (Vásquez-Montes *et al.*, 2020).

5.3.7 Género *Mimosa*

El género *Mimosa* se distinguen por ser una de las seis familias de angiospermas más extensas que hay hoy en día, están junto con las familias Compositae, Orchidaceae, Gramineae, Cactaceae y Rubiaceae (Montaño-Arias *et al.*, 2013a). Corresponde a la subfamilia *Mimosoideae*, la Tribu *Mimoseae* es considerada como el grupo con más antigüedad que existente en la actualidad, por otra parte, que las Acacieae y las Ingeae han estado presentando un mayor grado de especialización y evoluciones mucho más recientes (Montaño-Arias *et al.*, 2013a).

Este género es muy distintivo ya que posee árboles, arbustos y hierbas, se describen como perennes o anuales, algunas son trepadoras leñosas (lianas) o herbáceas, son de un tallo muy voluble, las hojas son bipinnadas, las flores están agrupadas, en ocasiones abreviadas en cabezuelas o capítulos, por otro lado, algunas están en racimos, el perianto consiste en que

lo sépalos son reducidos, 5; de 4-5 pétalos, literalmente juntos a la base que está formando una copa hipógina (Escobar-Domínguez *et al.*, 2018).

El género *Mimosa* consiste en más de 400 especies más de 90% son americanas mientras que el resto están en África, Asia y Australia (Grether *et al.*, 1996).

La taxonomía del género *Mimosa* en México dista mucho de estar terminada, no se han descrito todas las especies, existen discusiones en especies que tienen una similitud con otros géneros de Fabácea entre ello se menciona las sinonimias taxonómicas las nomenclaturales, y los cambios de estatus (Kyalangalilwa *et al.*, 2013).

Se menciona que el porcentaje de especies endémicas del género *Mimosa* en México refleja las gamas ambientales que existen, como un determinado producto de las historias geológicas, climática y biológicas (Montaño-Arias *et al.*, 2013. *Mimosa aculeartcarpa* es una especie arbustiva dominante en los matorrales xerófilos de las regiones áridas y semiáridas, al igual se puede utilizar como una especie de restauraciones en los sitios dañados por las deforestaciones (Kyalangalilwa *et al.*, 2013).

5.4 Proceso de herborización

El término herbario se refiere a una colección de especies vegetales almacenadas y clasificadas en condiciones adecuadas, las muestras son previamente identificadas y con ello se mantiene un orden y un registro permanente para la biodiversidad (Moreno, 2007). La información debe estar disponible para consultar las especies que contienen los herbarios son imprescindibles para la realizar diversos estudios de florísticos, ecológicos, fitogeográficos y sistemáticos (Moreno, 2007).

Para realizar la herborización de una planta es importante que al momento de hacer la colecta las muestras se encuentren en buen estado, procurando que no tenga daños, si la planta es arbustiva o pequeña es preferible coleccionar la planta completa que contenga todos los órganos y si es un árbol se debe cortar ramas con flores y frutos, del mismo individuo (Sánchez-González *et al.*, 2007). El corte de ramas debe ser de 40 x 25 cm incluyendo hojas, flores y/o frutos (no coleccionar ejemplares de más de 42 cm). Si las ramas estériles muestran diferencias

con aquellas floríferas, también deben ser recolectadas, si las flores son unisexuales, asegurarse de recolectar material de ambos sexos, además, se debe identificar si la planta es dioica, diclino-monoica o polígama, en el caso de que se tenga diferentes hojas en una misma planta (heterofilia), se tienen que coleccionar ramas con cada tipo, registrar porte, altura aproximada, diámetro de tronco, color de la corteza, forma de la copa, si es perenne o caducifolio, etc., registrar el color de flores y órganos vegetativos, las distintas variaciones morfológicas entre individuos de una población (si existieran) y toda característica que no podrá ser apreciada en el material posteriormente disecado, las porciones u órganos duros pueden ser recolectados en bolsas para su posterior acondicionamiento antes del secado (Sánchez-González *et al.*, 2007). Es importante tomar las coordenadas del área donde se realizó la colecta, cuidadosamente se envuelven las especies al papel periódico para poder guárdalas en la prensa botánica con su respectiva etiqueta, cabe mencionar que el secado de la planta es tardado (Giberti, 1998).

5.5 Efecto del proceso de herborización

En cuanto la herborización se ha documentado que existen problemas para la obtención de ADN amplificable (Staats *et al.*, 2013). Los principales problemas que perjudican la extracción de ADN de los especímenes son los años transcurridos del periodo de colecta hasta los años guardados en el herbario, cabe mencionar que las condiciones de secado, como la preservación y almacenamiento de las muestras, hacen que el del ADN se degrade de una forma rápida ya que contiene enzimas como lipasas, proteasas, amilasas y nucleasas de los lisosomas (Särkinen *et al.*, 2012). Los tratamientos químicos utilizados en la preservación de los especímenes como es el uso de paradiclorobenceno y fenol hacen que las concentraciones de ADN no sean muy altas, se han detectados metabolitos secundarios en plantas herborizadas lo cual es un problema severo, en mayor cantidad encontramos los polifenoles, azúcares y otros inhibidores de la PCR que como consecuencia se obtiene errores en las secuencias de ADN (Deguilloux *et al.*, 2002). Al igual el pH, humedad, hongos, insectos y bacterias, tiene un impacto en la degradación de macromoléculas (Dabney *et al.*, 2013).

5.6 Importancia de las muestras de herbario

Las especies conservadas en herbarios son una fuente importante de material vegetal, permitiendo recaudar información genética del ADN que contiene cada especie, a través de los herbarios es posible determinar conceptos y problemas taxonómicos, tanto evolutivos como el de distribución de poblaciones (Schindel & Cook, 2018).

El objetivo principal que tiene un herbario es la recolección y preservación de distintas familias de especies vegetales (Sánchez-González *et al.*, 2007). Es útil mencionar que el valor de un herbario son las colecciones de especies, la conservación de ejemplares, el uso que se le da a cada una de ellas, la lectura de las relaciones taxonómicas que contribuyen a tener un alto entendimiento hacia dónde va la botánica (Heberling & Isaac, 2017). Nos lleva a tener un desarrollo de bases científicas, las cuales aportan conocimiento sobre la diversidad florística mundial, se encuentra a disposición de científicos, botánicos y personal autorizado, es relevante saber que la preservación de plantas es para realizar investigaciones que se harán en el futuro (James *et al.*, 2018a).

5.7 Extracción de ADN muestras vegetales frescas y de herbario

Para la extracción de ADN, existen diferentes métodos de extracción los cuales combinan técnicas físicas y químicas, uno de los métodos que ha probado tener una mayor eficacia es el método de Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Doyle, 1909). El ADN se obtiene a partir de material biológico, las extracciones consisten en la separación y purificación del ADN con el fin de poder estudiarlo, analizarlo o manipularlo (Golczer & Arrivillaga, 2008).

La extracción de ADN en plantas es técnicamente complicada esto debido a la alta cantidad de polisacáridos, compuestos polifenólicos y otros metabolitos secundarios que en algunas especies vegetales se acumulan, durante la maduración o en respuesta a estímulos ambientales (Huambo Ore, 2020).

5.8 Parámetros importantes en la calidad de ADN

Para iniciar un análisis molecular es necesario considerar la eficacia del protocolo de extracción de ADN genómico, esto debido a que la calidad del ADN influye directamente en procesos subsecuentes como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Schindel & Cook, 2018).

La concentración y pureza de las muestras de ADN se visualiza mediante la técnica de espectrofotometría, esto es determinado por la capacidad de absorbancia de un compuesto que se presenta en una solución con una longitud de onda determinada (Schindel & Cook, 2018). La calidad del ADN puede calcularse examinando la relación de dos diferentes valores de la absorbancia (abs), por un lado, la abs 260 nm es especialmente para el ADN, mientras que la absorbancia 280nm, mide predominante a las proteínas presentes en solución. La relación de los valores de absorbancia que va de 260/280 nm que es aproximadamente de 1,7 a 1,8, pronostica un ADN muy limpio con una alta pureza, si tenemos valores más bajos estos nos indican que podemos tener una contaminación significativa de proteínas (Bustamante *et al.*, 2011).

Sin embargo la relación 260/280 no constantemente presenta una alta pureza del ADN, en ciertas muestras son complicadas de evaluar a 280 nm, esto se debe a la interferencia que los enlaces peptídicos que se absorben a 228 nm acostumbran a ser un indicador más firme a la presencia de proteínas en la muestra, es por eso que se suelen hacer lecturas de absorbancia medidas tanto a 230 nm como a 280 nm las cuales otorgan una valoración más contundentemente precisa de los péptidos que suelen estar directos en las muestras de ácido nucleico (Bustamante *et al.*, 2011).

Se tiene conocimiento de cierta relación de valores de absorbancia que va de 260/230 la cual debe ser mayor a 1.5, esto se debe a que los ácidos nucleicos tienen una diminuta absorbancia a 230,260 y 280 nm, por otro lado, las sales tampón nos ayudan a colaborar importantemente a las lecturas de absorbancia, en especial por debajo de 260 nm, es por eso, que es imprescindible poner en blanco el espectrofotómetro en el mismo tampón en el que se disuelva la muestra de ADN (Tabla 1) (McMillan *et al.*, 2008).

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

Técnica de análisis	Análisis	Parámetros	Criterios de validez
Espectrofotometría	A260/A280	Pureza	$\geq 1.8 - 2.1$ pureza optima
			$\geq 1.6 - 1.7$ 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

5.9 Métodos más utilizados en extracción de ADN de muestras vegetales.

5.9.1 Método de CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio).

El método de extracción con CTAB es el propuesto por (Gardes & Bruns, 1993). Es uno de los métodos que más se utiliza hoy en día, ha sido probado con diferentes especies de plantas y hongos obteniendo buenas extracciones, realizando un precalentado de CTAB, origina la separación de las membranas celulares, produciendo la ruptura celular. Este método hace que la extracción sea más fácil, se obtiene un ADN con alta pureza y limpio, quitando compuestos secundarios o polisacáridos que hagan un daño en la amplificación (Escalante *et al.*, 1997).

5.9.2 Método de tratamiento con horno de micro-ondas

Este método consiste en irradiación de microondas es una forma inusual de extraer ADN, es de gran relevancia cuando se tiene pequeñas cantidades de tejido para la extracción, se tiene

resultados satisfactorios con esporas vegetales, estas suelen actuar por exposición del ADN normalmente protegido por la estructura celular (Gloria, 2003).

5.9.3 Método con fenol - micro-ondas

Paquete comercial "Nuclcon. Phytopure for Plant DNA" (Amersham Life Science).

La nota técnica de este paquete de extracción de ADN fue optimizada para la extracción de ADN de plantas y hongos, asegurando alto rendimiento y pureza (con muestras frescas), además de ser muy corto el tiempo de preparación. El paquete no necesita de la aplicación de fenol o CTAB. La célula es lisada con un reactivo que contiene potasio y SOS (Lauril sulfato de sodio) (no se precisan las concentraciones), formando un complejo con las proteínas y polisacáridos contenidos en la muestra (Gloria, 2003).

5.9.4 Paquete de extracción de ADN "Plant DNAzol" (Gibco, Life Technologies)

"Plant DNAzol" es un reactivo formulado específicamente para el aislamiento de ADN genómico de plantas, el procedimiento se basa en el uso de una solución de lisis que contiene el detergente Guanidinio, mismo que hidroliza al ARN permitiendo la precipitación selectiva del ADN. Durante este procedimiento la muestra del hongo se pulveriza con nitrógeno líquido y el ADN genómico se extrae del homogenado con la solución de "Plant DNAzol". Después de la extracción los residuos del hongo se eliminan por centrifugación y el ADN se precipita con etanol. Se realiza un lavado del precipitado resultante y se disuelve. El procedimiento completo se efectúa en 60 minutos y el ADN resultante se puede utilizar en transferencias de tipo Southern, en hibridación dot-blot, PCR, clonación molecular, etc. (Kress *et al.*, 2005).

5.10 Códigos de barras de ADN

Históricamente las características morfológicas de las plantas han sido fundamentales para la identificación de ejemplares de Fabáceas, en algunas zonas del mundo existen iniciativas para poder codificar con código de barras de ADN la biodiversidad del mundo y poder agregar esta serie de datos a disposición de cualquier persona con interés en el tema (Baldi,

2021). Los códigos de barras de ADN es una técnica que facilita la identificación de especies animales o vegetales, se basa en el uso de una región de ADN, corta y estandarizada del genoma (Braukmann *et al.*, 2019). Las secuencias son utilizadas para descubrir, caracterizar molecularmente, distinguir especies y lo más importante para asignar individuos que a un no están identificados a especies (Kress *et al.*, 2005).

Los códigos de barras de ADN muestran diferencias que pueden presentarse como un método para la identificación de especies (Collins & Cruickshank, 2013). El constante manejo de códigos de barras de ADN puede ayudar a superar algunas limitaciones de los caracteres morfológicos de las especies, además de incrementar la identificación de especies de manera rápida (Barber & Boyce, 2006). Las secuencias generadas a partir de los códigos de barras de ADN se han empleado en un amplio campo de aplicaciones, uno de ellos es en ecología en donde es posible la elaboración de árboles filogenéticos con especies provenientes de ecosistemas abundantes en especies (Barber & Boyce, 2006).

Existen diferentes características que los códigos de barras de ADN deben poseer como: la universalidad, es decir, que en múltiples taxones sea posible el uso de cebadores estandarizados permitan la amplificación del ADN y que éste a su vez sea técnicamente fácil de secuenciar (Collins & Cruickshank, 2013). Por otro lado, los códigos de barras deben tener variabilidades para las identificaciones a nivel especie, cabe mencionar que estos tienen que ser fácilmente alienables a una secuencia de ADN con otra (James *et al.*, 2018b). Los códigos de barras deben contener pocas cantidades de inserciones/deleciones, ya que estas pueden perjudicar la comparación e interpretación de secuencias (Paz *et al.*, 2011).

El sistema de código de barras de ADN para los animales esta generalmente basado en la secuencia del citocromo *c* oxidasa 1 mitocondrial (*cox1*), esto demuestra un éxito en la identificación de especies, por otro lado, el gen *cox1* es descartado para ser utilizado en códigos de barras de ADN en los ejemplares de plantas, existen detalles y problemas hacia la planta, uno de ellos es la baja tasa de sustitución de nucleótidos del genoma mitocondrial que son observadas en los genes plásticos o nucleares (Newmaster *et al.*, 2006). Además, la pequeña tasa de sustitución de nucleótidos de *cox1*, hace más interesante la tarea de encontrar

un locus que sea universal y que tenga como característica una divergencia de secuencia alta a nivel de especie en plantas (Newmaster *et al.*, 2006).

5.11 Marcadores utilizados como códigos de barras de ADN

A continuación, se describen y se especifican los siguientes marcadores moleculares que pueden servir como códigos de barras de ADN en plantas:

5.11.1 ITS2 (segundo espaciador transcrito interno – núcleo).

Se caracteriza por tener una alta divergencia intraespecífica ya que es poseedor de un locus con el 94% de amplificación y una tasa de discriminación del 93%. Este marcador está ubicado entre dos genes ribosomales 5.8S y 28S, también se destaca por tener una probable función en la regularización de la transcripción de subunidades ribosómicas que se encuentran activas, este espaciador se caracteriza por proporcionar los elementos estructurales irremplazables para el correcto procesamiento del pre-rRNA (Techen *et al.*, 2014). Esto se debe a ciertas características de un valor alto que están incluidas en la disponibilidad de regiones conservadas para poder diseñar cebadores universales, la simpleza de su amplificación y la variabilidad suficiente para poder distinguir inclusive especies que están rigurosamente relacionadas, ITS2 es propuesto como código de barras estándar para obtener la autenticación de plantas medicinales (Techen *et al.*, 2014).

La región ITS2 se ha descifrado que forma parte del espaciador que esta transcrito interno y es utilizable para muchos botánicos como un marcador taxonómico molecular (Techen *et al.*, 2014). Se dice que esta región cuenta con ciertas ventajas que ya están definidas esto se basa por la corta longitud (412 pb) que se tiene. Por lo regular la región ITS2 ha hecho notar una alta variación de secuencia significativa que se encuentra en un nivel de especie o inferior, lo que esta se ha posicionado como uno de los marcadores más utilizados e importantes para ciertos científicos al igual en el caso de la sistemática molecular y la evolución, al obtener de una manera factible la información estructural de ITS2 nos permite realizar el análisis a un nivel taxonómico elevado, suele proporcionar información especial para la precisión y robustez en las construcciones de algunos árboles filogenéticos (Hadi *et*

al., 2014). Cabe mencionar que ITS2 es considerado uno de los mejores códigos de barras de ADN, es muy influyente gracias a las características únicas que presenta, entre las características se mencionan la alta disponibilidad de regiones conservadas para poder diseñar cebadores universales, al igual la facilidad de realizar amplificaciones y variabilidades, lo importante es que es suficiente para distinguir inclusive especies que están estrechamente relacionadas, se menciona que ITS2 se ha ratificado como un marcador poderoso de códigos de barras que ha obtenido identificaciones de 6600 muestras de plantas pertenecientes a 4800 especies de 753 géneros diferentes y ha demostrado que la tasa de identificación es valiosa y exitosa (Gao *et al.*, 2010).

5.11.2 matK (maturasa K – cloroplasto).

Este es un locus que tiene un gran valor se caracteriza por ser un marcador altamente complejo durante la amplificación y alineación, el gen del cloroplasto está altamente conservado en la sistemática vegetal que está implicada en el corte y empalme de intrones del Grupo II, se menciona que cuenta con una tasa de evolución muy alta, tiene una longitud estándar y una alta divergencia, por otro lado, se menciona que tiene una tasa baja de transición/ transversión (Lopes, 2012). Su tamaño va desde los 500 hasta los 900 pb y este se ubica dentro del intrón de trnK (Lopes, 2012).

5.11.3 rbcL (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa – cloroplasto).

Este marcador se caracteriza por su facilidad de amplificación, alineación y secuenciación, en ciertos grupos de plantas ha logrado una discriminación del 85 %, (Techen *et al.*, 2014). Entre los genes de plastidos, rbcL es la secuencia de genes mejor caracterizada, por ello, algunos grupos de investigación han probado su eficiencia. Este gen codifica la subunidad grande de la rubilosa 1-5 bifosfato carboxilasa / oxigenasa (RUBISCO), se sabe que esta es una enzima critica implicada en la fotosíntesis, es importante saber que fue el primer gen que se secuencio a partir de las plantas (Rubinoff *et al.*, 2006).

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Colecta de material biológico

La colecta de muestras biológicas se realizó en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, se colectaron ramas con hojas sanas y con base en la morfología que presentan las especies de la familia Fabacea, se realizó la identificación taxonómica siguiendo las claves morfológicas propuestas en el libro de leguminosas de Coahuila (Tabla 2) (Villarreal Quintanilla, 2004).

De igual manera se colectaron muestras del Herbario Antonio Narro, Saltillo, México (ANSM). Las muestras tienen diferentes fechas de colectas, la más longeva es del año 1982 y la más actual del año 2017 (Tabla 3).

Tabla 2. Especies y ubicación geográfica de muestras colectadas.

Especie	Latitud	Longitud
<i>Acacia farnesiana</i>	25°21'20''	101°01'56''
<i>Acacia constricta</i>	25°21'21''	101°01'58''
<i>Acacia rigidula</i>	25°21'29''	101°02'10''
<i>Acacia roemeriana</i>	25°21'29''	101°02'10''
<i>Calandria eryophylla</i>	25°20'25''	101°02'15''
<i>Leucaena greggii</i>	25°20'25''	101°02'15''
<i>Parkinsonia aculeata</i>	25°20'01''	101°01'32''
<i>Prosopis glandulosa</i>	25°21'29''	101°02'09''
<i>Dalea bicolor</i>	25°21'19''	101°01'58''
<i>Mimosa aculeaticarpa</i>	25°21'29''	101°02'09''

Tabla 3. Especies muestreadas del herbario ANSM.

Especie	Lugar de colecta (estado)	ID	Año
<i>Acacia farnesiana</i>	San Luis Potosí, México	99456	2017
<i>Acacia constricta</i>	Coahuila, México	25599	1994
<i>Acacia rigidula</i>	Coahuila, México	63691	1995
<i>Acacia roemeriana</i>	Coahuila, México	21923	1983
<i>Calandria eryophylla</i>	Coahuila, México	9221	2007
<i>Leucaena greggii</i>	Coahuila, México	28009	1985
<i>Parkinsonia aculeata</i>	Coahuila, México	99463	2017
<i>Prosopis glandulosa</i>	Coahuila, México	94230	2014
<i>Dalea bicolor</i>	Coahuila, México	92107	2010
<i>Mimosa aculeaticarpa</i>	Zacatecas, México	49850	1991

Las muestras colectadas fueron sometidas a los diferentes tratamientos, los cuales simulan las diferentes etapas del proceso de herborización. La descripción de tratamientos se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción de tratamientos.

Tratamientos	Descripción
Tratamiento Fresco (TF)	A un gramo de tejido vegetal fresco se le realizó directamente la extracción de ADN.
Tratamiento de 15 días (T15)	Se colectaron ramas con hojas de cada especie, las cuales se herborizaron durante un periodo de 15 días, posteriormente se tomó un gramo de tejido y se realizó la extracción de ADN.
Tratamiento de Temperatura (TT)	Las muestras previamente herborizadas en el T15 fueron sometidas a una temperatura de -5 °C durante 15 días. Al finalizar dicho periodo de TT se tomó un gramo de muestra para la extracción de ADN.
Tratamiento Químico (TQ)	Las muestras después de ser herborizadas por el TT fueron sometidas a un tratamiento con paradiclorobenceno (C ₆ H ₄ C ₁₂) sólido y fenol (C ₆ H ₂ O) líquido, los cuales son compuestos volátiles que actúan en estado gaseoso durante dos horas, al finalizar dicho periodo se tomó un gramo de muestra para la extracción de ADN.
Tratamiento Químico + Temperatura (TQT)	Las muestras sometidas a TQ, posteriormente fueron sometidas al tratamiento TQT por 15 días, donde las muestras se colocan en un congelador a -5 °C, se aplica paradiclorobenceno (C ₆ H ₄ C ₁₂) y fenol (C ₆ H ₂ O) por 15 días. Al finalizar dicho periodo se tomó un gramo de muestra para la extracción de ADN.
Tratamiento de Herbario (TH)	Se realizó la extracción de 10 muestras herborizadas de Fabaceas. Se tomó un gramo de muestra de cada especie proveniente del herbario ANSM y se realizó la extracción de ADN.

6.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el método de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) modificado, previamente descrito (Sharma *et al.* 2003). Se molió un gr de tejido vegetal en un mortero junto con 500 μ L de CTAB hasta obtener una mezcla fina y homogénea. Después se añadieron 200 μ L de CTAB y la mezcla fue transferida a un microtubo de 1.7 ml, posteriormente se incubó durante 30 min a 50 °C (Incumix ThermoMixer, Select Bioproducts, México) con agitación de 50 revoluciones por minuto (rpm).

Posteriormente, se agregaron 0.6 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión durante 10 min y la mezcla se centrifugo 10 min a 15000 rpm en una microcentrífuga (Spectrafuge 16M, Labnet International, USA). En seguida, con mucho cuidado se transfirieron 300 μ L de la fase acuosa a un microtubo de 1.7 ml nuevo, después se agregaron 2 volúmenes de alcohol absoluto para precipitar el ADN. Se volvió a centrifugar (5 min a 15000 rpm) para sedimentar el ADN, se realizaron dos lavados con etanol al 70 % (400 y 300 μ L), la mezcla se centrifugó 5 min a 15000 rpm. En seguida se decantó el alcohol y la pastilla obtenida se dejó secar toda la noche y posteriormente se rehidrato la pastilla con 70 μ L de agua ultrapura libre de nucleasas.

6.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para verificar la integridad del ADN genómico extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa (0.8 %) a 75 V, durante 1:45 h, en el cual se cargaron todas las muestras de ADN (3 μ L) más 1.5 μ L de buffer de carga (4.5 μ L) (5x Green GoTaq Buffer + Diamond Nuclei Acid Dye, Promega™). La documentación del gel se hizo en el Sistema Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA). El ADN genómico fue conservado a -20 °C para posteriores análisis.

6.4 Amplificación por medio de PCR

La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del fragmento ITS2, se realizó con el estuche comercial GoTaq Green Master Mix, 2X™ (Promega, USA),

siguiendo las especificaciones del fabricante (Tabla 5). El programa de PCR establecido se detalla en la Tabla 6. Para verificar la amplificación por PCR nuevamente se realizó una electroforesis, en gel de agarosa.

Tabla 5. Mezcla para la reacción de PCR.

Componentes	Volumen	Concentración final
GoTaq Green Master Mix,2X	10µL	1X
Cebador directo	2 µL	0.1 – 1 µM
Cebador reverso	2 µL	0.1 – 1 µM
Molde de ADN	1 µL	<250 ng
Agua libre de Nucleasas	5 µL	N. A

Tabla 6. Cebadores y programa de PCR para la amplificación de ADN.

Fragmento	Cebadores (5´ - 3´)	Programa de PCR	Referencia
ITS2	ITS-2F:	95°C, 4min; 35x	Chen <i>et al.</i> , 2010
	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	(94°C, 45 s: 56°C, 1	
	ITS-2R:	min: 72°C, 1	
	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	min):72°C, 10 min.	

6.5 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN y proteínas se realizó a través de un equipo NanoDrop (NANODROP 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) utilizando el software NANODROP 2000/2000c v.1.0. Para realizar la lectura utiliza un compuesto de referencia (blanco), el equipo genera un espectro y lo almacena en una memoria. Se toma una muestra de 1 uL, con una onda que va de 220 nm a 750 nm, funciona a través de un software (ND-100 V3 3.0) dando lectura a través de una computadora, proporcionando los resultados y agregándolos en una tabla en Excel.

6.6 Índices A260/A280 y A260/A230

El índice de absorbancias A260/A280 de cada una de las muestras se determinaron dividiendo la absorbancia A260 nm entre el valor de absorbancia A280 nm para evaluar la pureza de las muestras. El índice de absorbancias A260/A230 de cada una de las muestras se determinaron dividiendo la absorbancia A260 nm entre el valor de absorbancia A230 nm.

6.7 Análisis estadístico

La media de los rendimientos de ADN y de proteínas de cada uno de los tratamientos fue analizada por medio de análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0.05, se realizaron graficas comparativas de las medias de los resultados +/- error estándar utilizando el software R-studio (Proc Plot Mean).

7 RESULTADOS

7.1 Colecta de material biológico

En el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavidez” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro se identificaron y colectaron 10 especies del género Fabácea (Figura 5), siete de ellas pertenecientes a la subfamilia Mimosoideae, dos de la subfamilia Caesalpinioideae y una de la subfamilia Papilionoideae. Estas mismas especies fueron colectadas del Herbario Antonio Narro Saltillo México; las cuales tuvieron una edad variable de conservación en herbario, La más antigua es de año 1983 y la más reciente del año 2017 (Tabla 3).

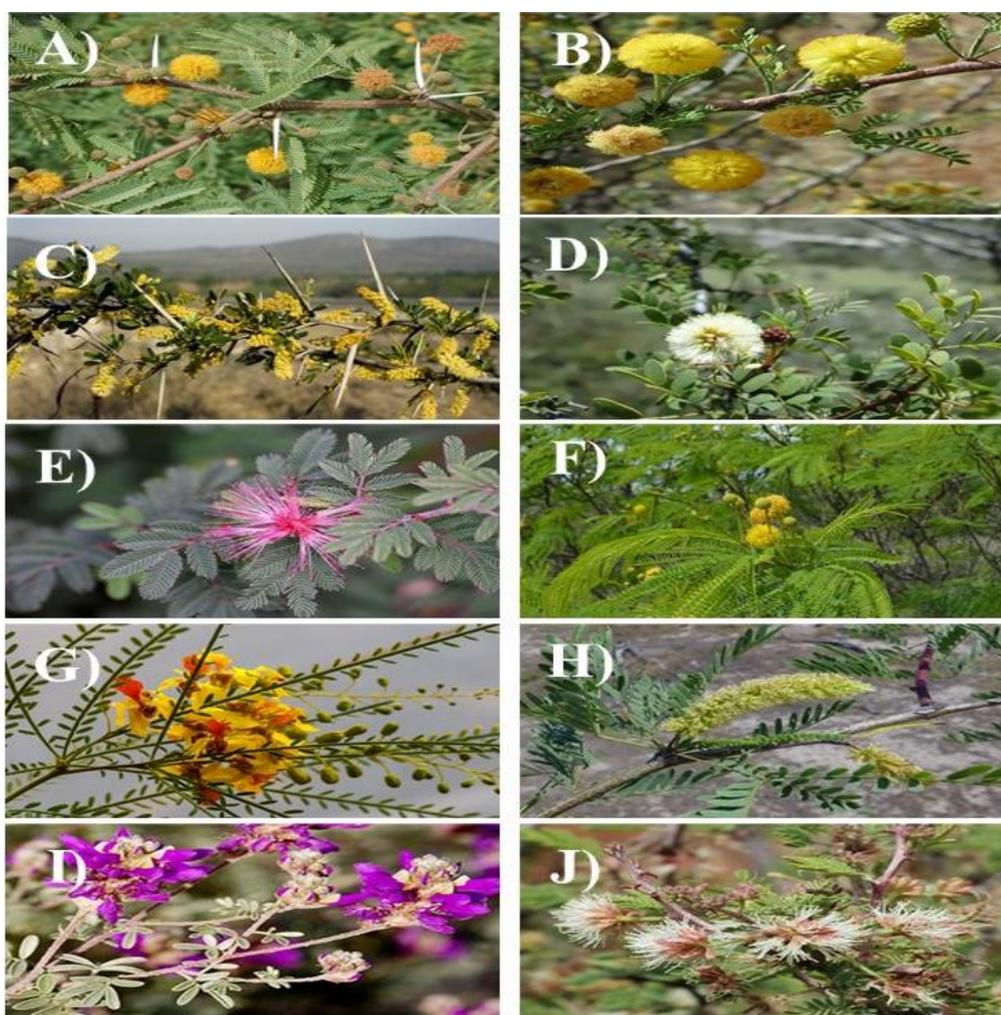


Figura 5. Especímenes colectados, A) *Acacia farnesiana*, B) *Acacia constricta*, C) *Acacia rigidula*, D) *Acacia roemeriana*, E) *Calandria eryophylla*, F) *Leucaena greggii*, G) *Parkinsonia aculeata*, H) *Prosopis glandulosa*, I) *Dalea bicolor*, J) *Mimosa aculeaticarpa*

7.2 Extracción de ADN genómico

Con el método de extracción de genómico utilizado en este trabajo para muestras conservadas con distintos tratamientos, se logró una extracción de ADN, las cuales todas presentaron algún grado de barrido, muy notorio en la B) T15, C) TT, D) TQ y F) TH, pero ausentes en la E) TQT, en la A) TF se logra apreciar una buena cantidad de genómico sin barrido notorio (Figura 6).

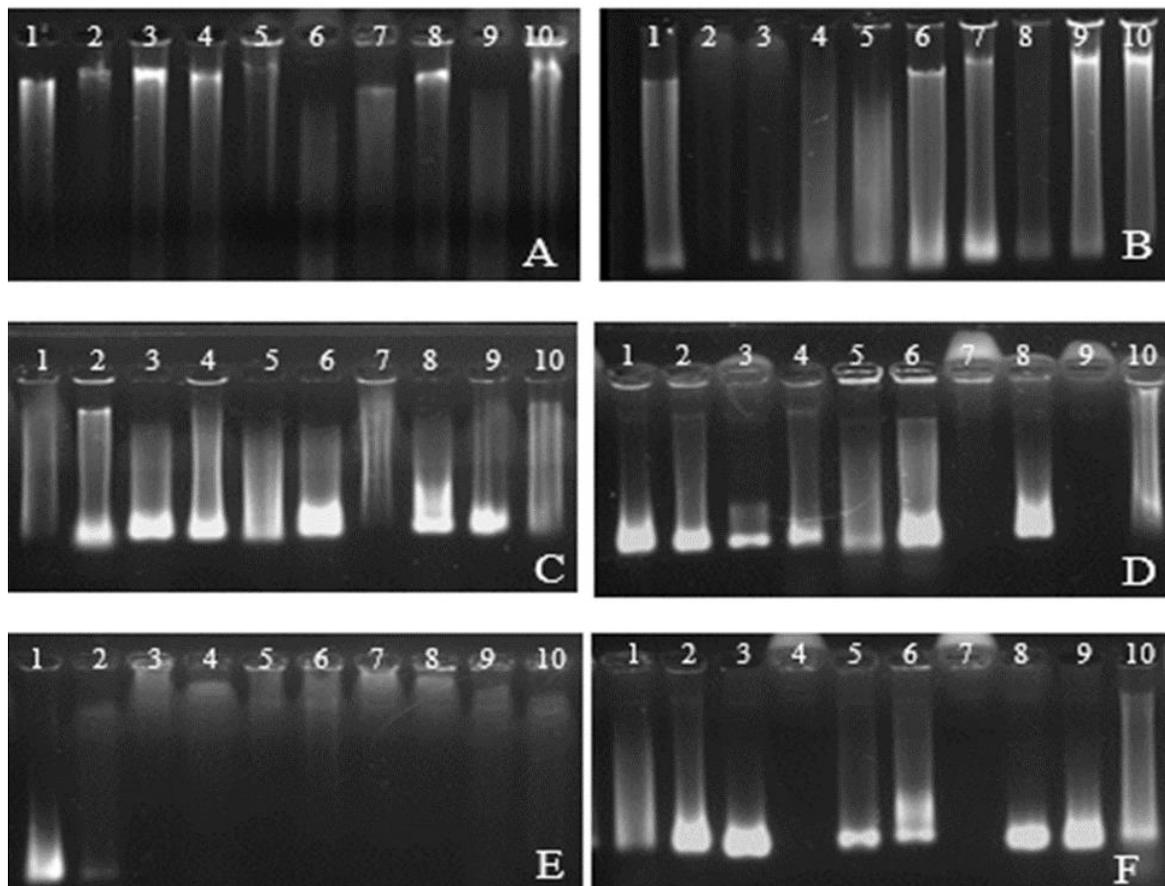


Figura 6. ADN genómico extraído de seis tratamientos diferentes, A)TF, B)T15, C)TT, D) TQ, E)TQT, F) TH. 1) *Acacia farnesiana*, 2) *Acacia constricta*, 3) *Acacia rigidula*, 4) *Acacia roemeriana*, 5) *Calandria eryophylla*, 6) *Leucaena greggii*, 7) *Parkinsonia aculeata*, 8) *Prosopis glandulosa*, 9) *Dalea bicolor*, 10) *Mimosa aculeaticarpa*.

7.3 Amplificación por medio de PCR

La amplificación por PCR se realizó de ADN extraído. Los amplicones obtenidos corresponden al peso molecular (200 a 300 pb) reportado para la región ITS2 (Figura 7), además se obtuvieron diferentes porcentajes de amplificación en cada tratamiento, el porcentaje más alto de amplificación se obtuvo en las muestras del TH obteniendo e 100% de amplificación, y el más bajo en TQ con el 20% (Tabla 7.) No se observó ni una especie que en todos los tratamientos no amplificara, por lo cual las diferencias no son atribuibles a las especies y en todas se presentó una banda bien definida.

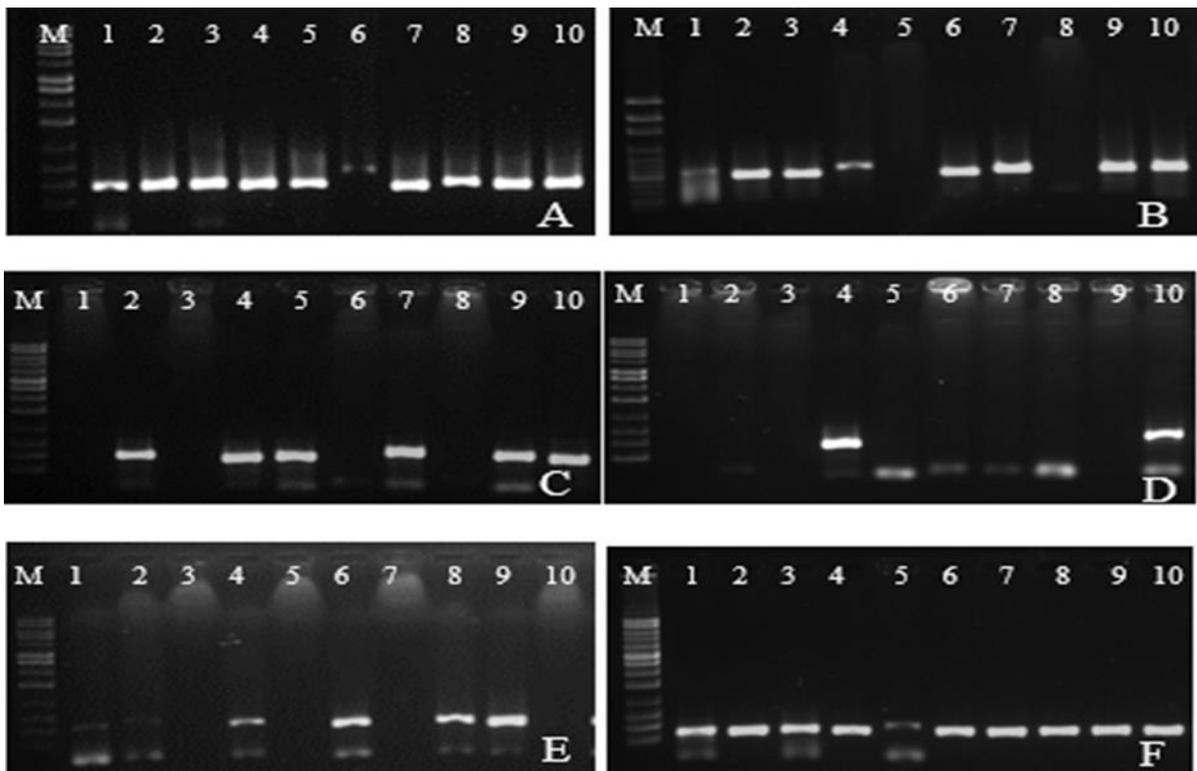


Figura 7. Amplicones obtenidos en seis tratamientos diferentes, A) TF, B) T15, C) TT, D) TQ, E) TQT, F) TH. M) Marcador molecular 1) *Acacia farnesiana*, 2) *Acacia constricta*, 3) *Acacia rigidula*, 4) *Acacia roemeriana*, 5) *Calandria eryophylla*, 6) *Leucaena greggii*, 7) *Parkinsonia aculeata*, 8) *Prosopis glandulosa*, 9) *Dalea bicolor*, 10) *Mimosa aculeaticarpa*.

Tabla 7. Porcentajes de amplificación en cinco tratamientos y muestras de herbario.

Tratamiento	TF	T15	TT	TQ	TQT	TH
Amplificación (%)	95	80	60	20	60	100

7.4 Rendimiento de ADN y proteínas

Tabla 8. Análisis de varianza (significancia de 0.059, del rendimiento de ADN (ng/ μ L) y proteínas (mg/ml) en cada tratamiento.

	Grados de libertad	Valor P(p<0.05)	Calificación
ADN	5	1.46E-04	**
PROTEÍNAS	5	5.60E-04	**

El rendimiento de ADN de los tratamientos TF, T15 Y TT, mostraron los mayores rendimientos de ADN, los cuales van de un rango 250 a 400 ng/ μ L de ADN y los menores rendimientos se obtuvieron en las muestras del TQ, TQT Y TH, en un rango de entre 100 y 170 ng/ μ L de ADN (Figura 8).

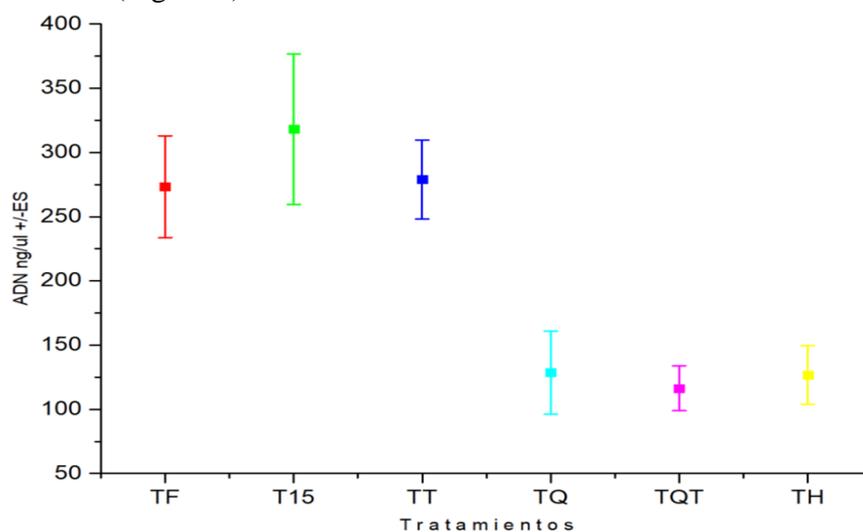


Figura 8. Rendimiento de ADN en seis tratamientos de extracción de ADN.

En el análisis de comparación de medias ($p > 0.05$) de la cuantificación de proteínas, la gráfica es muy similar a la cuantificación de ADN. Hay diferentes concentraciones de proteínas en los distintos tratamientos (Figura 9), siendo el tratamiento T15 donde se obtuvo la mayor concentración de proteínas. La menor concentración de proteínas se obtuvo en el tratamiento TQT y TH (Figura 9). Los tratamientos TF, T15 y TT son estadísticamente iguales, y a su vez superiores a los tratamientos TQ, TQT y TH. En términos generales la concentración de proteínas varió en un rango de 4.3 a 1.2 mg/ml.

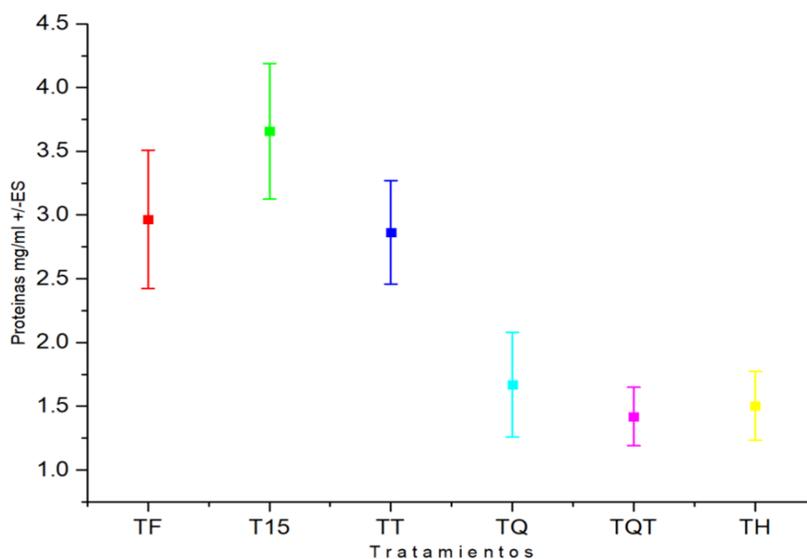


Figura 9. Cuantificación de proteínas, en seis tratamientos de extracción de ADN.

7.5 Índices A260/A280 y A260/A230

El valor del índice 260/280 varió de 1.495 a 1.858 (Tabla 9), el mayor valor en este índice se obtuvo en el TF (1.858) y el menor se obtuvo en el tratamiento TQT con un índice 260/280 de 1.495. Es destacable que los tratamientos TF, T15 y TT obtuvieron valores notoriamente mayores en este índice, comparados con los tratamientos TQ, TQY y TH.

Tabla 9. Índice 260/280 en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	TF	T15	TT	TQ	TQT	TH
Índice	1.858	1.798	1.734	1.555	1.495	1.504
260/280						
Calificación	Optima	Aceptable	Aceptable	No Aceptable	No aceptable	No Aceptable

El valor del índice 260/230 varió de 0.731 a 1.227 (Tabla 10), el mayor valor en este índice se obtuvo en el TF Y T15 (1.227) y el menor se obtuvo en el tratamiento TQT con un índice 260/230 de 0.731. Es destacable que los tratamientos TF, T15 y TT obtuvieron valores notoriamente mayores en este índice, comparados con los tratamientos TQ, TQY y TH que fueron inferiores.

Tabla 10. Índice de absorción a 260/230 en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	TF	T15	TT	TQ	TQT	TH
Índice	1.227	1.227	1.078	0.772	0.731	0.763
260/230						
Calificación	No Aceptable	No Aceptable	No Aceptable	No Aceptable	No Aceptable	No Aceptable

8 DISCUSIÓN

8.1 Materiales colectados.

En total se colectaron 10 muestras frescas en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavidez” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro del género Fabacea. Estas mismas 10 especies fueron colectadas del Herbario Antonio Narro Saltillo México; las cuales se sitúan en una edad variable de conservación en el herbario, la más antigua es del año 1983 y la más reciente del año 2017. Esta familia tiene una amplia distribución en el desierto (Camargo-Ricalde, 2000). El Herbario Antonio Narro Saltillo México cuenta con especies de esta familia, las cuales son de mucha importancia ecológica y económica, actualmente se tienen muy pocos estudios. Este trabajo es necesario porque la familia Fabacea contienen metabolitos y polifenoles que impiden la extracción de ADN (Traffano Schiffo *et al.*, 2019). ya que algunas de ellas producen ceras y resinas.

8.2 Extracción de ADN

En el presente estudio se utilizó el método CTAB para realizar extracciones de ADN en plantas. Es conveniente mencionar que dicho protocolo ha sido modificado para disminuir la presencia de metabolitos secundarios, polifenoles, polisacáridos y sales en el ADN obtenido (Peterson *et al.*, 1997), para obtener ADN de buena calidad. Se han descrito varios protocolos para extraer ADN de plantas que contienen altas cantidades de polifenoles y polisacáridos uno de ellos es la purificación con cloruro de cesio, (Murray & Thompson, 1980), uso de proteinasa, nitrógeno líquido, junto al uso de estuches comerciales (Tanaka & Ito, 2020).

En la extracción de ADN que se realizaron, no se presentaron complicaciones, ya que el ARN presento degradación espontanea durante la extracción sin la necesidad de aplicar rnasa. En todas las muestras hubo ADN cuantificable, desde la muestra más joven del año 2017, hasta la más añeja que es del año 1983, existiendo un periodo de diferencia de más de 30 años, se han reportado estudios similares en la extracción de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con el protocolo modificado de CTAB (Doyle & Doyle, 1987), donde

mencionan que no requiere un tratamiento con rnsa; esto se debe a que el ARN parece degradarse en el periodo de extracción. En otros términos, reduce significativamente el tiempo de manipulación de muestras y el desperdicio de materiales de laboratorio, especialmente cuando es necesario procesar cientos de muestras (Aljanabi *et al.*, 1999). Al igual, en reportes previos, se realizaron extracciones a través del kit de extracción de ADN genómico de plantas (GeNei) el cual demostró resultados prometedores para las especies de manglares y marismas, las cuales contienen la presencia de polisacáridos pegajosos en el sedimento y la banda cortada en el gel de agarosa (Sahu *et al.*, 2012).

Existen reportes previos que están enfocados en estudios de genomas en los cuales han encontrado altas purezas de ADN (Rohland & Hofreiter, 2007). Posteriormente un estudio demuestra la evaluación de tres protocolos de extracción de ADN, de trece especies vegetales de Trébol (*Trifolium amabile*), los protocolos evaluados fueron: P1 (kit de extracción de ADN PureLink), P2 (kit de extracción de ADN más lisador celular, 1 ciclo, 110 segundos), P3 (kit de extracción de ADN más lisador celular, 4 ciclos, 60 segundos) (Huambo Ore, 2020). Existe un estudio de extracción en el hongo de miel (*Armillaria mellea*) el cual se llevó a cabo con el kit comercial “PowerSoil™ DNA Isolation” (MOBIO Laboratories, Inc.) donde se obtuvo un ADN de gran calidad (Crespo *et al.*, 2008), las cuales están libres de contaminantes. De estas investigaciones se han dedicado a establecer una variedad de protocolos de extracción de ADN, las cuales puedan mejorar la calidad y pureza (Rohland & Hofreiter, 2007). Es distinguible mencionar que entre la pureza del ADN extraído y el éxito de la PCR existe relación, pues en ocasiones se presentan inconvenientes en particular en las plantas esto se debe a la amplia porción de sustancias químicas primarias y secundarias que están presentes en las células y que actúan en detrimento del éxito de la PCR (Särkinen *et al.*, 2012).

8.3 Amplificación por medio de PCR

En este trabajo se logró la extracción de ADN con calidad suficiente para amplificar por PCR. En estudios previos se ha mencionado que es relevante contar con alta cantidad de ADN de buena calidad, para obtener una buena amplificación (Cadavid Sánchez *et al.*, 2013).

En la amplificación de las 10 muestras en seis tratamientos diferentes, fue una demostración que la mayor porción de proteínas que se encuentran en los especímenes disminuye el porcentaje de la PCR. El TT y TQT presento una efectividad del 60%, mientras que el TQ un 20%. La mayor cantidad de concentración de proteínas une en total a todos los elementos que son necesitados en el desarrollo de la herborización de ejemplares siendo un problema óptimo para las amplificaciones de estas muestras como lo menciona Särkinen *et al.*, (2012). Obteniendo un 100% de amplificación con ITS2 en el TH, el TF con 95%, en el T15 un 80% en el TT Y TQT un 60%. 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.

Existen resultados con bastantes similitudes, los cuales han sido reportados en extracciones, posterior digestión por endonucleasas empleadas para el análisis de PCR utilizando una cierta cantidad de pétalos de flores de la planta (*Gasteria croucheri*), el arbusto (*Erythrina humeana*) y un árbol (*Calpurnia aurea*) (Ibrahim, 2011).

8.4 Rendimiento de ADN y proteínas

Se ha mencionado que el método CTAB, sin hacerle ningún cambio arroja un resultado de ADN de 255,23 μg por gramo de material foliar (Puchooa & Khoyratty, 2004). El rendimiento de ADN obtenido en este trabajo oscila entre entre 100 y 170 $\text{ng}/\mu\text{L}$, en todas las muestras de los tratamientos de herborización, se obtuvo ADN cuantificable, incorporando las muestras de herbario, el procedimiento establecido para la extracción resulto en genómicos con la calidad suficiente para realizar los análisis siguientes. Se han mostrado resultados similares en la realización de estudios que incluyen muestras frescas de *Solanum* subgénero *Leptostemonum*, las cuales por su parte son provenientes del campo o muestras secas como las que están disponibles en los herbarios o procesadas para conservación, utilizando el método (Collins *et al.*, 1987) con base en solución tampón de lisis obteniendo un 78% de éxito y el método de (Collins *et al.*, 1987) modificado un 89 % de éxito. En Los geles de verificación de las extracciones mostraron productos de ADN de buena calidad y sin degradación, en general, para una misma muestra no se observó diferencias entre los protocolos, sin embargo, para una muestra procesada con el método de

(Collins *et al.*, 1987), modificado, se obtuvo una banda más fuerte cuando se maceró con nitrógeno líquido que cuando éste no se usó, lo cual indica, que este procedimiento adicional podría mejorar los resultados como se observó al realizar lo mismo en un mayor número de muestras. Finalmente, se sugiere con base en los resultados que el método de (Collins *et al.*, 1987), permite obtener productos deseables en la extracción de ADN, con buena cantidad a un menor costo y sin riesgos para la salud (Cadavid Sánchez *et al.*, 2013).

Hoy en día se denota que el éxito de iniciativas mundiales como la del código genético de barras para la identificación de especies vegetales, depende del ADN con el cual se empieza el proceso de identificación molecular para el material vegetal, en particular si se considera que algunos compuestos polifenólicos, azúcares de cadenas largas y otros metabolitos secundarios pueden causar daños en el proceso de extracción y amplificación de las regiones de interés en algunas plantas (Cadavid Sánchez *et al.*, 2013).

En este estudio los tratamientos TF, T15 Y TT, mostraron los mayores rendimientos de ADN, los cuales van de un rango 250 a 400 ng/μL de ADN y los menores rendimientos se obtuvieron en las muestras del TQ, TQT Y TH, en un rango de entre 100 y 170 ng/μL de ADN utilizando el marcador ITS2. Existen estudios donde se trabajó con el marcador RAPD y marcador TRAP (Hu & Vick, 2003). La especie estudiada fue *Saccharum officinarum*, los valores medios de rendimiento del DNA extraído fueron de (0.68 mg/g), estos resultados superan a los reportados por otros autores, quienes extrajeron ADN de caña de azúcar, con el uso de los marcadores de polimorfismo de amplificación de la región diana independiente (TRAP) y de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con rendimientos de DNA inferiores a los 0.30 mg/g de tejido foliar (Devarumath *et al.*, 2013).

En este estudio se obtuvieron diferentes concentraciones de proteínas en los distintos tratamientos, siendo el tratamiento T15 donde se obtuvo la mayor concentración de proteínas. La menor concentración de proteínas se obtuvo en el tratamiento TQT y TH. Los tratamientos TF, T15 y TT son estadísticamente iguales, y a su vez superiores a los tratamientos TQ, TQT y TH. En términos generales la concentración de proteínas varió en un rango de 4.3 a 1.2 mg/ml. En estudios previos la cuantificación de proteínas en *Solanum quitoense* por el método de Bradford según obtuvieron una cuantificación exitosa. Los

valores encontrados en los diferentes tratamientos fueron los siguientes para KM fueron; 1,41 mg/mL APG para PG, 37,8 mg/mL para PE y 0,0865 mg/mL, lo que proporciona los cimientos para poder estudiar el comportamiento de proteína durante el proceso de la maduración de los frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam) (Rodríguez Nieto & Restrepo Sánchez, 2011), leyendo la absorbancia 450 y 590.

8.5 Calidad del ADN

El índice 260/280 hace referencia a la división que resulta de la absorbancia del ADN, que es medida a 260 nm, sobre la cantidad de proteína que mide a 280 nm. Este índice se mantiene disponible continuamente para realizar una evaluación de la pureza de ADN que fue extraído. El índice 260/280 es un factor fundamental que se debe tener en cuenta a la hora de ver si un método de extracción es exitoso y da una idea de la cantidad y la integridad de las muestras (Pineda *et al.*, 2021). Si el índice 260/280 está entre 1.8 a 2 es una calidad óptima, un valor de 1.6 a 1.8 es calidad aceptable, un valor menor de 1.6 indica contaminación con fenoles y proteínas, un valor mayor a 2.1 indica contaminación con ARN, tales valores permiten evaluar la pureza de una muestra de ADN (Pineda *et al.*, 2021). Bajo esta consideración, se obtuvo ADN con una pureza óptima para el TF, obteniendo un promedio de 1.8, sin el uso de nitrógeno líquido; para el T15 y TT la calidad obtenida fue aceptable según el índice 260/280 ubicándose dentro del rango 1.7 de pureza, para el TQ, TQT Y TH mostraron un caso contrario ubicándose por debajo de 1.6, esto indica que se tiene una contaminación por sales o proteínas. Para obtener mejores valores de calidad se deben considerar las características de cada una de las muestras para poder realizar la implementación de modificaciones para realizar la eliminación de contaminantes y sustancias orgánicas de diferentes protocolos de extracción (Bag *et al.*, 2016; Miao *et al.*, 2014). Un trabajo similar realizado para verificar la calidad del ADN en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), muestra que la pureza del ADN se determinó a partir del índice 260/280, que promedió entre 1,76 y 1,96 en todas las muestras. Sin embargo, en estudios previos, esta calidad de ADN fue suficiente para realizar análisis de repeticiones de secuencia simple (SSR) (Aljanabi *et al.*, 1999).

En un estudio previo (Sahu *et al.*, 2012), la extracción de ADN para plantas con altos niveles de metabolitos secundarios y polisacáridos sin usar nitrógeno líquido y fenol, el índice 260/280 obtuvo valores de 1,78 a 1,84, comparado con nuestro estudio que va de 1.495 a 1.858, en ambos estudios, la amplificación por PCR fue posible.

En el caso del índice 260/280 es, conveniente mencionar que nos sirve para estimar la pureza del ADN y la presencia de ARN, el valor ~ 1.8 en esta variable, comúnmente se considera aceptable y puro para el ADN (Miao *et al.*, 2014). La proporción de ~ 2.0 se acepta al igual se le conoce como "pura" para el ARN (Miao *et al.*, 2014). En un estudio previo de *Passiflora ligularis* (Solano-Flórez *et al.*, 2009), se obtuvieron concentraciones muy bajas de ADN en el tratamiento de campo y tratamiento de herbario, esto demuestra que se tiene contaminantes como son las sales, polifenoles, polisacáridos y proteínas (Solano-Flórez *et al.*, 2009). Lo cual en este estudio mostro un caso contrario para todas las muestras, logrando tener concentraciones de ADN en los 6 tratamientos, TF, T15, TT, TQ, TQT Y TH.

El índice 260/230 sirve para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos, sin embargo, siendo una medida secundaria, en este índice se utilizan valores más altos que los de 260/280 para el ácido nucleico "puro" (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016). Los índices 260/230 se deben de mantener en el rango de 2.0-2.2 para considerarse óptimos. Cuando se obtiene un índice 260/230 demasiado bajo, esto hace referencia a que se tiene la presencia de contaminantes que se absorben a 230 nm como son las sales, carbohidratos, polifenoles y polisacáridos (Castillo Reyes & Peralta Parrado, 2019). En general, se considera que el ADN es puro cuando el índice 260/230 se sitúa en torno 1.8-2.2, por lo cual un índice menor de 1.8 se relaciona con presencia de contaminantes en la muestra (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016). Cuanto menor sea el valor de este índice, la presencia de contaminantes en la muestra será mayor (Bag *et al.*, 2016). Una ratio < 1.5 estaría indicando una impureza relevante en la muestra que podría comprometer su funcionalidad (Bag *et al.*, 2016). No obstante, índice resulta mucho más variable que el índice 260/280 dependiendo de factores como la concentración de ADN o de la composición del tapón de resuspensión de la muestra. En este estudio, para el TF Y T15, se obtuvo un índice 260/230 cercano a 1.2, el TT tiene 1.078, en el caso del TQ tiene 0.772, el TQT está en 0.731 y TH tiene 0.763, esto demuestra que todas las muestras de los 6 tratamientos no se ubican en los rangos de calidad aceptable y óptima, implicando la

presencia de contaminación según los estándares; puede contener sales, hidratos de carbono y fenoles.

Se menciona que la contaminación por polisacáridos se evalúa calculando el índice 260/230 (Wilson Sánchez, 2016). Sin embargo, esta relación es más variable que el índice 260/280 esto se depende a las concentraciones de ADN. Según los valores del índice 260/280 en los tratamientos de TQ, TQT, TH se puede deducir contaminación con sales, fenoles, e hidratos de carbono, no obstante, en este estudio, según el índice 260/230, las muestras de ADN extraído no cumplen con parámetro de calidad aceptable, mucho óptima, por otro lado, si se hace énfasis en el índice 260/280, estas se encuentran debajo del rango de pureza aceptable, pudiendo ver la media por debajo de 1.4. En diversas investigaciones previas (Puchooa & Khoyratty, 2004). Las lecturas espectrofotométricas demostraron mucha contaminación con polisacáridos, sales y compuestos fenólicos, que arrojaron un índice 260/230 de 0,782 y un índice 260/280 de 1,750. (Puchooa & Khoyratty, 2004).

Sin embargo, es destacable que a pesar de los índices 260/230 bajos obtenidos, las muestras de ADN obtenidas en todos los tratamientos, tuvieron la calidad suficiente para realizar amplificación por PCR, resultados similares fueron reportados por (Vinuesa, 2022). Donde se obtuvo una concentración medida con el equipo NanoDrop™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) de 427,9 ng/μl, con un índice 260/280 de 1,91 y un cociente 260/230 de 2,15. Si el cociente fuese menor, podría indicar la presencia de contaminantes de tipo aromáticos como fenoles o proteínas, que tienen aminoácidos de estas características y, por tanto, una fuerte absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Como segunda medida se utiliza el índice 260/230 que indica que el DNA es de pureza óptima si tiene un valor entre 2,0-2,2. Un índice 260/230 menor de 1,8 podría indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm como carbohidratos o sales caotrópicas Cuantificaron con NanoDrop™ 3000 la concentración del vector PB-Cuo y obtuvieron un resultado de 435,3 ng/μl con el índice 260/280 de 1,92 y 260/230 de 2,38, que consideramos adecuados (Vinuesa, 2022). Un estudio *Xylaria sp.* (Sandoval-Pineda *et al.*, 2017), se determinó la pureza del ARN en cada muestra por medio del índice 260/230 y el rendimiento fue calculado como la cantidad de ARN obtenido (ng) sobre el peso de micelio utilizado para la extracción (μg), (Sandoval-Pineda *et al.*, 2017).

9 CONCLUSIÓN

La extracción de ADN genómico de muestras de fabáceas en proceso de herborización, mediante el método de CTAB modificado, resulto ser exitoso pues en todos los tratamientos se pudo obtener ADN genómicos verificable por electroforesis y cuantificable por espectrofotometría.

El tratamiento químico de las muestras analizadas implica una disminución significativa en los rendimientos de ADN obtenido y la presencia de proteínas. El tiempo de conservación de la muestra en herbario no demostró afectar en mayor medida el rendimiento de ADN y proteínas obtenido.

El tratamiento químico afecta de manera negativa al índice 260/280 llevando a obtener valores no aceptables de este índice. Aunque en este estudio ninguna muestra obtuvo un índice 260/230 aceptable, todas las muestras fueron amplificables por medio de PCR, lo cual revela que el índice 260/230 tiene una limitada capacidad para determinar la pureza de una muestra de ADN.

10 LITERATURA CITADA

- Aganga, A. A., & Tshwenyane, S. (2003). Lucerne, Lablab and Leucaena leucocephala forages: production and utilization for livestock production.
- Aljanabi, S. M., Forget, L., & Dookun, A. (1999). An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide-and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17(3), 281–282.
- Aranishi, F. (2006). Single fish egg DNA extraction for PCR amplification. *Conservation Genetics*, 7(1), 153–156.
- Arce, M. L. R. (2000). El género acacia (Leguminosae, Mimosoideae) en el estado de Oaxaca, México. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 58(2), 251–302.
- 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.
- Bajpai, O., Srivastava, A. K., Kushwaha, A. K., & Chaudhary, L. B. (2014). Taxonomy of a monotypic genus *Indopiptadenia* (Leguminosae-Mimosoideae). *Phytotaxa*, 164(2), 61–78.
- Baldi, M. E. (2021). *Evaluación de la utilidad del código de barras genético (barcode) para la identificación de las especies de la flora del Gran Chaco*.
- Barber, P., & Boyce, S. L. (2006). Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1597), 2053–2061.
- Barneby, R. C., Cronquist, A., & Garden, N. Y. B. (1989). *Intermountain flora: vascular plants of the Intermountain West, USA. 3, B. Fabales*. Hafner.
- Barros Asenjo, S. (2007). El género *Acacia*, especies multipropósito= *The genus Acacia, multipurpose species*.

- BCMF-VIGS, B. (2009). Final Report from the Vegetation Inventory Working Group on Proposed New Inventory. *MCFNS Peer-to-Peer Blog*, 101.
- Braukmann, T. W. A., Ivanova, N. v, Prosser, S. W. J., Elbrecht, V., Steinke, D., Ratnasingham, S., de Waard, J. R., Sones, J. E., Zakharov, E. v, & Hebert, P. D. N. (2019). Metabarcoding a diverse arthropod mock community. *Molecular Ecology Resources*, 19(3), 711–727.
- Brennan, M., & Harris, P. J. (2011). Distribution of fucosylated xyloglucans among the walls of different cell types in monocotyledons determined by immunofluorescence microscopy. *Molecular Plant*, 4(1), 144–156.
- Brockwell, J., Searle, S. D., Jeavons, A. C., & Waayers, M. (2005). *Nitrogen fixation in acacias: an untapped resource for sustainable plantations, farm forestry and land reclamation*.
- Bustamante, J. A., Astudillo, M., Pazos, A. J., & Bravo, L. E. (2011). Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 83–98.
- Cadavid Sánchez, I. C., Rosero García, D. A., & Uribe Soto, S. I. (2013). Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 186–192.
- Camargo-Ricalde, S. L. (2000). Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) en México. *Revista de Biología Tropical*, 48(4), 939–954.
- Carevic, F., Carevic, A., & Delatorre, J. (2012). Historia natural del género *Prosopis* en la Región de Tarapacá. *Idesia (Arica)*, 30(3), 113–117.
- Carrillo-Parra, A., Hapla, F., Mai, C., & Garza-Ocañas, F. (2011). Durabilidad de la madera de *Prosopis laevigata* y efecto de sus extractos en hongos que degradan la madera. *Madera y Bosques*, 17(1), 7–21.

- Castellanos, C., & Lewis, G. P. (2012). Leguminosas colombianas de la subfamilia Caesalpinioideae presentes en el herbario del Real Jardín Botánico de Kew, Reino Unido. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 36(139), 141–192.
- Castillo Reyes, J. C., & Peralta Parrado, J. C. (2019). *Evaluación del ADN extraído de hojas y ramas de especímenes de herbario: estudio de caso en especímenes de Psychotria y Palicourea depositados en el herbario forestal UDBC.*
- Cavada, B. S., Osterne, V. J. S., Oliveira, M. V., Pinto-Junior, V. R., Silva, M. T. L., Bari, A. U., Lima, L. D., Lossio, C. F., & Nascimento, K. S. (2020). Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 159–165.
- Ciotir, C., Applequist, W., Crews, T. E., Cristea, N., DeHaan, L. R., Frawley, E., Herron, S., Magill, R., Miller, J., & Roskov, Y. (2019). Building a botanical foundation for perennial agriculture: Global inventory of wild, perennial herbaceous Fabaceae species. *Plants, People, Planet*, 1(4), 375–386.
- Clarke, H. D., Seigler, D. S., & Ebinger, J. E. (1989). *Acacia farnesiana* (Fabaceae: Mimosoideae) and related species from Mexico, the southwestern US, and the Caribbean. *Systematic Botany*, 549–564.
- Clement, B. A., Goff, C. M., & Forbes, T. D. A. (1998). Toxic amines and alkaloids from *Acacia rigidula*. *Phytochemistry*, 49(5), 1377–1380.
- Collins, F. H., Mendez, M. A., Rasmussen, M. O., Mehaffey, P. C., Besansky, N. J., & Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(1), 37–41.
- Collins, R. A., & Cruickshank, R. H. (2013). The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 969–975.
- Cox, J. R., Alba-Avila, A. de, Rice, R. W., & Cox, J. N. (1993). Biological and physical factors influencing *Acacia constricta* and *Prosopis velutina* establishment in the

- Sonoran Desert. *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*, 46(1), 43–48.
- Crespo, P. E., Casal, O. A., Osés, M. J. S., & Vázquez, J. P. M. (2008). Detección de "Armillaria" mediante técnicas moleculares a partir de muestras de suelo de diferentes especies forestales en Galicia. *Cuadernos de La Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 26, 155–160.
- Dabney, J., Meyer, M., & Pääbo, S. (2013). Ancient DNA damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), a012567.
- de México, A. C. C. (2021). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)*.
- Deguilloux, M., Pemonge, M., & Petit, R. (2002). Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1495), 1039–1046.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19–21.
- Devarumath, R. M., Kalwade, S. B., Bundock, P., Elliott, F. G., & Henry, R. (2013). Independent target region amplification polymorphism and single-nucleotide polymorphism marker utility in genetic evaluation of sugarcane genotypes. *Plant Breeding*, 132(6), 736–747.
- Doyle, A. C. (1909). *The crime of the Congo*. Рипол Классик.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*.
- Escalante, M., Montilla, M., Nicholls, R. S., del Portillo, P., & Puerta, C. J. (1997). Extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante tratamiento con bromuro de hexadecil-trimetil-amonio. *Biomédica*, 17(2), 120–125.
- Escobar-Domínguez, A. A., Romero-Nápoles, J., Equihua-Martínez, A., Carrillo-Sánchez, J. L., & Ramírez-Alarcón, S. (2018). Brúquidos (Coleoptera: Bruchidae)

- asociados a semillas de especies del género *Mimosa* L.(Leguminosae: Mimosoideae). *Acta Zoológica Mexicana*, 34.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., Pang, X., Xu, H., & Chen, S. (2010). Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 116–121.
- García, D. E., Wencomo, H. B., Medina, M. G., Moratinos, P., & Cova, L. J. (2009). Caracterización de la calidad nutritiva de 53 accesiones del género *Leucaena* en condiciones tropicales. *Pastos y Forrajes*, 32(1), 1.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118.
- Geneve, R. L., & Weston, L. A. (1988). Growth reduction of eastern redbud. *Cercis Canadensis*.
- Giberti, G. C. (1998). Herborización y herbarios como referencia en estudios técnico-científicos. Herbarios de la Argentina. *Dominguezia*, 14(1), 19–39.
- Gloria, R. C. (2003). *Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN del género gymnopilus*.
- Golczer, G., & Arrivillaga, J. (2008). Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: Lutzomyia). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(2), 199–200.
- González, F. (2019). Nueva especie de *Dalea* (Leguminosae: Papilionoideae) de matorrales interandinos secos del sur de Colombia y clave para identificación de las especies del género en el país. *Caldasia*, 41(1), 215–223.
- Grether, R., Camargo-Ricalde, S. L., & Martínez-Bernal, A. (1996). Especies del género *Mimosa* (Leguminosae) presentes en México. *Botanical Sciences*, 58, 149–152.
- Gunn, C. R. (1981). Seed topography in the Fabaceae. *Seed Science and Technology (Netherlands)*.

- Hadi, S. I. I. A., Brunale, P. P. M., Santana, H., & Brasil, B. S. A. F. (2014). Identificação molecular de microalgas utilizando marcador ITS-2. *Pesquisa e Inovação Da*, 70770, 105.
- Hastings, R. B. (1990). Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, Papilionoideae, part one. *Economic Botany*, 336–348.
- Heberling, J. M., & Isaac, B. L. (2017). Herbarium specimens as exaptations: New uses for old collections. *American Journal of Botany*, 104(7), 963–965.
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformiaion of Escherichia coli. *Gene*, 57(2–3), 267–272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
- Hughes, C. (1998). *Monograph of Leucaena (Leguminosae-Mimosoideae)*.
- Huambo Ore, F. A. (2020). *Evaluación de tres protocolos de extracción de ADN total en especies vegetales de la comunidad vegetal tipo Tolar del fundo Qena, distrito Callalli-Arequipa*.
- Hu, J., & Vick, B. A. (2003). Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping.
- 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. (2018a). Herbarium data: Global biodiversity and societal botanical needs for novel research. *Applications in Plant Sciences*, 6(2), e1024.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005b). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369–8374.
- Kyalangalilwa, B., Boatwright, J. S., Daru, B. H., Maurin, O., & van der Bank, M. (2013). Phylogenetic position and revised classification of *Acacia* s1 (Fabaceae):

- Mimosoideae) in Africa, including new combinations in *Vachellia* and *Senegalia*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 172(4), 500–523.
- Llamas García, F., & Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *AmbioCiencias*.
- Lopes, S. M. M. de B. (2012). *Botânica molecular forense: o DNA na identificação de espécies vegetais*.
- Lopez-Lopez, A., Rogel-Hernandez, M. A., Barois, I., Ceballos, A. I. O., Martínez, J., Ormeno-Orrillo, E., & Martínez-Romero, E. (2012). *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt_9), 2264–2271.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Avila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270.
- Maslin, B. (2011). Understanding *Acacia saligna*. *WATTLE We Eat for Dinner*, 16, 18.
- Mautino, L. R., & Garralla, S. S. (2021). primeros registros palinológicos para sudamérica afines a *pontederia* l., *gleditsia* l. y *parkinsonia* l. en la formación palo pintado, mioceno de salta, argentina. *Publicación Electrónica de La Asociación Paleontológica Argentina*, 21(1), 1–17.
- 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.
- Medina, R., & Sousa, M. (2007). Una Especie Nueva de Dalea (Fabaceae: Amorphaeae) Arbórea del Estado de Oaxaca, México. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 17(3), 369–371.
- Montaño-Arias, S. A., Camargo-Ricalde, S. L., & Pérez-Olvera, C. de la P. (2013a). Ecoanatomía de los elementos de vaso de la madera de cinco especies del género *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae). *Botanical Sciences*, 91(1), 1–10.
- Montaño-Arias, S. A., Camargo-Ricalde, S. L., & Pérez-Olvera, C. de la P. (2013b). Ecoanatomía de los elementos de vaso de la madera de cinco especies del género *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae). *Botanical Sciences*, 91(1), 1–10.
- Mora-Donjuán, C. A., Rubio-Camacho, E. A., Alanís-Rodríguez, E., Jiménez-Pérez, J., González-Tagle, M. A., Mata-Balderas, J. M., & Mora-Olivo, A. (2014). Composición y diversidad vegetal de un área de matorral desértico micrófilo con historial pecuario en el noreste de México. *Polibotánica*, 38, 53–66.
- Moreno, E. J. (2007). El herbario como recurso para el aprendizaje de la botánica. *Acta Botánica Venezuelica*, 30(2), 415–427.
- Murray, M. G., & Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4326.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., & Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Botany*, 84(3), 335–341.
- Osorio Cadavid, E., Ramírez, M., López, W. A., & Mambuscay, L. A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 125–131.
- Palacios-Chávez, R., de la Luz Arreguín-Sánchez, M., & Quiroz-García, D. L. (1996). Morfología de los granos de polen de la subfamilia Caesalpinioideae (Leguminosae) del Valle de México. *Polibotánica*, 1, 16–21.

- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161–176.
- 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.
- 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.
- Regasini, L. O., Magela Vieira-Júnior, G., Fernandes, D. C., da SILVA BOLZANI, V., Cavalheiro, A. J., & Siqueira Silva, D. H. (2009). Identification of triterpenes and sterols from *Pterogyne nitens* (fabaceae-caesalpinioideae) using high-resolution gas chromatography. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(3), 218–221.
- Rios, G. C. (2020). El género *dalea fabaceae: amorpheae* en el estado de morelos.
- Rodríguez Anda, R., Ramírez Arango, A. M., Palacios Juárez, H., Fuentes Talavera, F. J., Silva Guzmán, J. A., & Saucedo Corona, A. R. (2015). Características anatómicas, físico-mecánicas y de maquinado de la madera de mezquite (*Prosopis velutina* Wooton). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 156–173.
- Rodríguez Nieto, J., & Restrepo Sánchez, L. P. (2011). Extracción de enzimas pécticas del epicarpio de lulo (*Solanum quitoense* lam) involucradas en el proceso de ablandamiento. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 193–204.
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756–1762.
- Rosenberg, A. (2013). Why I am a naturalist. In *Philosophical Methodology: The Armchair or the Laboratory?* (pp. 32–35). Routledge.

- Rubinoff, D., Cameron, S., & Will, K. (2006). A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *Journal of Heredity*, 97(6), 581–594.
- Rutishauser, R. (2016). Acacia (wattle) and Cananga (ylang-ylang): from spiral to whorled and irregular (chaotic) phyllotactic patterns—a pictorial report. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 85(4).
- Rzedowski, J. (1988). Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*, 3, 7–19.
- Rzedowski, J., Lemos, R. M., & de Rzedowski, G. C. (2005). Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botanica Mexicana*, 70, 85–111.
- Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Sala, F., Bricolo, A., Faccioli, F., Lanteri, P., & Gerosa, M. (2007). Surgery for intramedullary spinal cord tumors: the role of intraoperative (neurophysiological) monitoring. *European Spine Journal*, 16, 130–139.
- Salinas, P. J. (2012). Plantas tóxicas comunes en el estado Mérida, Venezuela. Segunda parte. Adoxaceae, Asteraceae, Caesalpiniaceae, Chenopodiaceae, Combretaceae, Cruciferae, Cycadaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Moraceae, Myrtaceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Rosaceae, Sapindaceae. *MedULA*, 21(1), 26–47.
- Sánchez-González, A., González, L. M., & Contreras-Ramos, A. (2007). Técnicas de recolección de plantas y herborización. *La Sistemática, Base Del Conocimiento de La Biodiversidad. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo. Pachuca, México*, 123–133.

- Sandoval-Pineda, J. F., Ochoa-Corona, F. M., & Torres-Rojas, E. (2017). Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*(1), 42–54.
- 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*.
- Schindel, D. E., & Cook, J. A. (2018). The next generation of natural history collections. *PLoS Biology*, *16*(7), e2006125.
- Sesa Carranza, O. A. (2020). cerco vivo de parkinsonia aculeata para mitigar la presencia de residuos livianos en el perímetro del botadero a cielo abierto del distrito de motupe.
- Sharma, S., Sharma, S., & Vig, A. P. (2018). Antigenotoxic potential of plant leaf extracts of *Parkinsonia aculeata* L. using *Allium cepa* assay. *Plant Physiology and Biochemistry*, *130*, 314–323.
- Solano-Flórez, G., Márquez-Cardona, M. del P., & Schuler, I. (2009). Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares. *Universitas Scientiarum*, *14*(1), 16–22.
- Staats, M., Erkens, R. H. J., van de Vossenberg, B., Wieringa, J. J., Kraaijeveld, K., Stielow, B., Geml, J., Richardson, J. E., & Bakker, F. T. (2013). Genomic treasure troves: complete genome sequencing of herbarium and insect museum specimens. *PloS One*, *8*(7), e69189.
- Tanaka, S., & Ito, M. (2020). DNA barcoding for identification of agarwood source species using trn L-trn F and mat K DNA sequences. *Journal of Natural Medicines*, *74*, 42–50.
- Talavera, S., & Castroviejo, S. (1999). Flora Iberica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares: Vol. VII (I) *Leguminosae (partim)* (Vol. 1). Editorial CSIC-CSIC Press.

- Techen, N., Parveen, I., Pan, Z., & Khan, I. A. (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*, 25, 103–110.
- Telek, L. (1982). Preparation of leaf protein concentrates from *Leucaena leucocephala*. *Leucaena Research Reports*.
- Traffano Schiffo, M. V., Avanza, M. V., & Santagapita, P. R. (2019). *Extracción de polifenoles de los subproductos del Caupí asistida por ultrasonido de alta intensidad*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Vásquez-Montes, S., Villarreal-Guerrero, F., Amaya-Olivas, N. I., & Hernández-Ochoa, L. R. (2020). Producción y composición química del aceite esencial de *Dalea bicolor* en diferentes regiones de Chihuahua, México. *Botanical Sciences*, 98(4), 486–498.
- Villarreal Quintanilla, J. Á. (2004). Estrada, AE y A. Martínez M. 2004. Los géneros de leguminosas del norte de México. Sida, Botanical Miscellany, No. 25. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Universidad Autónoma de Nuevo León y Botanical Research Institute of Texas. Fort Worth, Texas. *Acta Botánica Mexicana*, 67, 117.
- Vinuesa, E. P. (2022). Desarrollo de un sistema genético inducible de expresión de la quinasa SGK1 (Doctoral dissertation, Universidad de La Laguna).
- Wilson Sánchez, D. (2016). Los genes DESIGUAL modulan la simetría bilateral en las hojas de *Arabidopsis*.
- Wunderlin, R., Larsen, K., & Larsen, S. S. (1987). *Reorganization of the Cercideae (Fabaceae: caesalpinioideae)*. Munksgaard.