

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Caracterización Molecular de Especies de Acacias Utilizando
el Fragmento *rbcL* como Marcador

Por:

EDGAR MIGUEL RAMÍREZ MEDINA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Mayo, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Caracterización Molecular de Especies de Acacias Utilizando
el Fragmento *rbcL* como Marcador

Por:

EDGAR MIGUEL RAMÍREZ MEDINA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



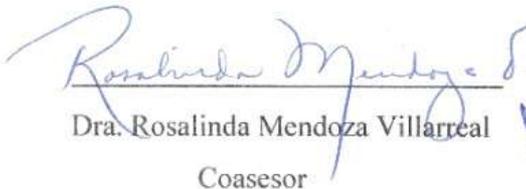
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Asesor Principal



Dra. Lihua Wei

Asesor Principal Externo



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Coasesor



Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes

Coasesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel

Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México.

Mayo, 2025

Derechos de Autor y Declaración de no Plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal de Derecho del 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 texto 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, 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 del 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.

Pasante



Edgar Miguel Ramírez Medina

Agradecimientos

A mi asesor Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez por tener la paciencia y el don de enseñar, por el apoyo que me brindo y por esas palabras de aliento, por ayudarme a madurar y ver la vida de una manera más objetiva, por todas las buenas experiencias, infinitamente agradecido por su amistad y por todo.

A mi asesora Dra. Flor C. Pacheco Reyes por guiarme paso a paso en este proyecto y tener esa dedicación y don de transmitir sus conocimientos, por esas palabras de motivación.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por darme la oportunidad de seguir estudiando y por todos los conocimientos y experiencias que me brindo, por las instalaciones y servicios que me presto, por todo lo vivido y aprendido “**ALMA TERRA MATER**”.

Al laboratorio de MGWG (Grupo de trabajo de genética molecular) por brindarme ese espacio para poder realizar mi experimento, por los insumos que se utilizaron para lograr el objetivo del experimento. Por ese lugar donde fui muy feliz durante mi estancia en el mismo. El lugar que me mostro la forma de ver la ciencia de otra manera, el laboratorio que me hizo crecer como científico.

A mis padres por regalarme la vida, por ese apoyo que siempre está presente, por esas palabras de aliento y motivación, por ser las personas que me hicieron llegar hasta este punto, por seguir guiándome por el camino correcto y que siempre están ahí para regañarme y felicitarme.

A mi Esposa e Hijo por ser lo más importante en mi vida, por darme la fuerza para seguir adelante, por darme la oportunidad de superarme académicamente, por ser el motivo para ser mejor pareja y padre cada día y por la confianza que depositaron en mí.

A mis amigos por la grata compañía y por las experiencias que vivimos, por los desvelos, risas y corajes.

A mis profesores, los cuales transmitieron sus conocimientos y experiencias, por esa motivación constante y por ese tiempo que me dedicaron

A mi gran amigo Misael Vázquez C. por ser siempre esa persona que me forzó a dar el máximo, recordándome que siempre me he aferrado a mis objetivos y que nunca me he rendido, aunque las cosas fueran difíciles, por el apoyo moral y emocional que me ayudo a enfrentar esta etapa de mi vida.

A mi gran amigo Gustavo Ávila Ramos por todo el apoyo que me brindó y lo sigue haciendo, por esa motivación y palabras certeras, por todas las experiencias vividas, por ser esa persona que siempre está en las buenas y las malas y por su gran amistad.

Dedicatoria

A mis padres **Miguel Ramírez G.** y **Laura Media H.** ya que gracias a sus enseñanzas me hicieron un hombre de bien, mostrándome el valor de la familia y de la vida, por esos regaños tan severos que en algún momento llegue a odiar. Ahora que soy padre entiendo todos los sacrificios y esfuerzos que se hacen por los hijos. Gracias por mostrarme que, aunque los problemas sean difíciles siempre habrá una manera de salir adelante.

A mi padre por ser un gran ejemplo a seguir, por siempre estar presente en mi vida dándome su apoyo y conocimientos, por ser ese hombre que a pesar de no tener nada ha logrado un imperio.

A mi madre que siempre con su fe logra iluminarme y guiarme por el buen camino. Por esas noches de desvelo, por estar ahí cuando me sentía mal, por cuidarme, por escucharme, gracias por todo.

A mi esposa **Azucena Padrón A.** por ese apoyo que siempre está presente, por todo lo que me brindó y lo sigue haciendo. Por esos consejos, por los regaños, por las peleas, por todos esos buenos y malos días que vivimos juntos. Por estar conmigo en cada decisión de mi vida, por darme ese empuje, por el gran amor que me has dado, **Mi amor**, estoy infinitamente agradecido por ese ser tan maravilloso que está a mi lado.

A mi hijo **E. Leonel Ramírez M.** agradezco todos esos momentos que me acompañaste con mis proyectos, por develarte junto a mí, por aprender conmigo, por ser el mejor alumno que he tenido, por escucharme y por todo ese cariño que me das, por esos abrazos tan espontáneos que nunca pensé querer tanto, te agradezco por darme el motivo de no abandonar este proyecto, por insistirme en titularme.

Te pido una disculpa por no estar ahí en tu primer día de clases, por no estar en esa etapa tan maravillosa que fue tu niñez, por la falta que te hice en esos momentos donde necesitabas un abrazo y por las cosas que tuviste que aprender por tu cuenta.

A mis hermanos **Stephanie y Luis Ramírez M.** por mostrarme la unión y amor que existe entre nosotros, por esas platicas, por esas experiencias y aventuras que pasamos, por los enojos y risas y por el apoyo que siempre está presente.

A **mis amigos**, Maria D. Lerma S., Griselda Hernández D., Hugo Méndez M., Jhonathan González H. (negro), Alberto Sánchez B., Anel Hernández L., Mariel Herrera, Valeriano Carrillo C., Bryan Rivera H.

A **mí** por siempre superarme, por no rendirme, por esos días en los que no podía levantarme, por esos días que pasé hambre y carencias, por esos momentos que pensé que no podía seguir. Por ser una persona que se aferra a cumplir sus metas y objetivos, por buscar siempre la perfección, por eso y muchas cosas más.

ÍNDICES GENERAL DE CONTENIDO

CONTENIDO	
1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo General.....	6
2.2. Objetivos Específicos	6
3. HIPÓTESIS	6
4. REVISIÓN DE LITERATURA	7
4.2. Morfología.....	8
4.2.1. Subfamilia Faboideae (Papilionoideae)	8
4.2.2. Subfamilia Caesalpinoideae.....	8
4.2.3. Subfamilia Mimosoidea.....	9
4.3. Género <i>Acacia</i>	9
4.4. Distribución mundial de <i>Acacia</i>	10
4.5. Distribución en México	11
4.6. Importancia ecológica y económica	12
4.7. Código de barras de ADN.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1. Colecta de muestras en campo de material vegetal.....	17
5.2. Extracción de ADN genómico.	17
5.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa	18
5.4. Electroforesis en gel de agarosa	18
5.5. Secuenciación	19
5.6. Edición de electroferogramas.....	19
5.7. Creación de bibliotecas con secuencias consulta y de referencia.....	19
5.8. Alineamiento de secuencias.....	20
5.9. Evaluación de la calidad de las secuencias.....	20
6. RESULTADOS	21
6.1. Colecta en campo.....	21
6.2. Extracción de ADN genómico y amplificación por PCR.....	23

6.3.	Edición de secuencias.....	24
6.4.	Corte de extremos	25
6.5.	Análisis en BLAST	26
6.6.	Alineamiento de las secuencias.....	27
6.7.	Evaluación de la calidad de la secuencia	28
6.8.	Evaluación de dendrograma.....	30
7.	Discusión	36
8.	Conclusión.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución del género <i>Acacia</i> en el mundo (World Wide wattle, 2024).	11
Figura 2.	Distribución geográfica del género <i>Acacia</i> en México (SNIB, CONABIO).....	12
Figura 3.	Gel de electroforesis con muestras de ADN genómico de especies del ANSM. ...	23
Figura 4.	Productos de PCR generadas con cebadores <i>rbcL</i>	24
Figura 5.	Electroferograma de <i>A. rigidula</i> ; marcador <i>rbcL</i>	24
Figura 6.	Electroferograma de <i>A. neovernicosa</i> ; marcador <i>rbcL</i>	25
Figura 7.	Electroferograma de <i>Acacia rigidula</i> ; extremo 5´.....	25
Figura 8.	Electroferograma de <i>Acacia rigidula</i> ; extremo 3´.....	26
Figura 9.	Secuencias de consulta alineadas.....	27
Figura 10.	Corte de extremos de las secuencias alineadas.	28
Figura 11.	Sitios conservados (SC)	28
Figura 12.	Sitios variables (SV).....	29
Figura 13.	Sitios informativos (SI).....	29
Figura 14.	Dendrograma de especies trabajadas.....	31
Figura 15.	Dendrograma con características morfológicas	32

Figura 16. Ilustración del clado A.	33
Figura 17. Ilustraciones del clado B	34
Figura 18. Especie no agrupada	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica.	7
Tabla 2. Cebador rbcL y programa de PCR utilizado para la amplificación (Kress <i>et al.</i> , 2009).	18
Tabla 3. Mezcla de componentes para la PCR.	18
Tabla 4. Especies provenientes del Herbario ANSM.	21
Tabla 5. Especies colectadas en el jardín botánico "Gustavo Aguirre Benavidez".	22
Tabla 6. Análisis BLAST para secuencias del género <i>Acacia</i>	26

RESUMEN

Las acacias son de gran relevancia en México y en diferentes partes del mundo debido a su estatus valor ornamental, ecológico y económico. Sin embargo, la identificación tradicional de plantas no permiten una identificación rápida, por lo que, en este sentido la aplicación de técnicas molecular como los “Códigos de Barras de ADN” son de gran utilidad. En este trabajo de investigación se utilizó esta técnica molecular aplicando una región del gen *rbcL* como marcador para analizar su capacidad de identificación y discriminación en 13 especies del género *Acacia* L. Para ello se llevó a cabo la colecta de tejido vegetal y se realizó la extracción de ADN seguido de la amplificación por PCR de todas las muestras vegetales colectadas. Después de la secuenciación, se analizaron los electroferogramas y secuencias obtenidas, esto con la ayuda de distintos programas bioinformáticos SnapGene Viewer y MEGA X, se crearon archivos en formato FASTA que contenían el alineamiento. Posteriormente se evaluó el poder discriminatorio de *rbcL* mediante el análisis BLAST para cada secuencia de consulta generada. Por último, el dendograma fue generado con el método estadístico de unión de vecinos (neighbor-joining) en el dendograma se contenía 13 secuencias de consulta las cuales se agruparon dos clados monofiléticos bien definidos, sin embargo, los clados no lograron agruparse de acuerdo con la caracterización morfológica entre las especies analizadas. de subgéneros propuesta en literatura. En conclusión, los marcadores *rbcL* permiten la amplificación y secuenciación de muestras de acacias, sin embargo, es necesario continuar con investigaciones que revelen una mayor capacidad discriminatoria relacionada con el marcador *rbcL* en dichas especies.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Acacia* se encuentra en la subfamilia Mimosoidea (Fabaceae) su diversidad abarca alrededor de 60 géneros y 3100. Estas especies abarcan dicotiledóneas tales como los frijoles, habas o chicharos por mencionar algunos. Una característica de esta familia es el fruto en forma de una vaina alargada que puede contener de 1 a 15 semillas. Su distribución es muy amplia en los trópicos y subtrópicos del mundo, siendo menos amplia en las zonas templadas del mundo (Arce, 2001).

De todas las especies que se encuentran en el planeta pocas pueden identificarse con base a los métodos tradicionales de identificación de plantas esto continúa siendo un gran desafío de gran importancia para los taxónomos especialistas (Hebert *et al.*, 2004).

La implementación de la herramienta molecular denominada código de barras de ADN se ha presentado como herramienta de identificación taxonómica de especies y como un mecanismo para descubrir especies crípticas. Además, los códigos de barras pueden revelar una divergencia genética muy alta dentro de una misma especie putativa dando como sugerencia a la existencia de especies crípticas (Paz *et al.*, 2011). Esta tecnología ha tenido un impacto positivo en la clasificación e identificación de la gran biodiversidad (Gregory, 2005). Los códigos de barras tienen una amplia función y se pueden utilizar para una amplia gama de propósitos, como respaldar la propiedad o los derechos de propiedad intelectual (Stewart, 2005); revelar especies crípticas (Hebert *et al.*, 2004); en medicina forense para poder vincular muestras biológicas a escenas de crimen (Mildenhall, 2006); apoyo en la inocuidad de los alimentos y la autenticidad del etiquetado al confirmar la identidad o la pureza (Huxley-Jones *et al.*, 2012); y en estudios de genómica ecológica y ambiental (Valentini *et al.*, 2009).

Un gran número de especies de Acacias no cuentan con un código de barras de ADN el cual permita una identificación con caracteres moleculares, lo cual facilitaría ampliamente su identificación y la realización de análisis filogenéticos.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente especies de *Acacia* distribuidas en el sureste del estado de Coahuila.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar la efectividad del fragmento *rbcL* para discriminar entre especies del género *Acacia*.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar las secuencias de los fragmentos *rbcL* en 15 especies de acacias sin reportes previos.
- Búsqueda y descarga de secuencias *rbcL* del género acacia en NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
- Cálculo de distancias genéticas y construcción del dendrograma a partir de la unión de vecinos cercanos de las secuencias *rbcL*.

3. HIPÓTESIS

El uso del marcador *rbcL* permite la discriminación entre especies del género *Acacia*, y proporciona la información genética que permite la construcción de un dendrograma filogenético.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Generalidades Familia Fabaceae

Villarreal (2006) en su libro de “Introducción a la Botánica Forestal” describe a la familia Fabaceae de la siguiente manera: “La familia consta de árboles, arbustos o hierbas con hojas alternas, compuestas (simples por reducción) con o sin estípulas; las flores son bisexuales, pentámeras, actinomorfas o zigomórfas en racimos, cabezuelas o espigas; el cáliz se compone de cinco sépalos soldados, corola de cinco pétalos libres, iguales o distintos; tiene ocho, nueve, diez o más estambres libres, monoadelfos o diadelfos; un pistilo supero, de un carpelo y un lóculo, su fruto es una legumbre que puede ser dehiscente o indehiscente.”

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Acacia*.

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Fabales
FAMILIA	Fabaceae
SUBFAMILIA	Mimosoidea
GENERO	<i>Acacia</i> <i>Acaciella</i> <i>Vachellia</i> <i>Senegalia</i>

Es la tercera familia más grande del planeta, consta de 20,000 especies y 750 géneros (Lewis *et al.*, 2013). Sousa y Delgado en 1993 reportaron que México alberga aproximadamente 1800 especies, siendo el segundo grupo con mayor diversidad en el país; al mismo tiempo es la segunda (después de *Poaceae* o *gramíneas*) en importancia económica y agrícola (Wojciechowski *et al.*, 2004).

La familia también es conocida como legumbres o leguminosas, las cuales son semillas secas (subfamilia Papilionáceas), tienen bajo contenido de lípidos y una gran cantidad de

proteínas y fibra dietética. La importancia de la familia radica en su capacidad de adaptación a suelos y climas favorables, por su potencial para la rotación de cultivos y la capacidad de fijar nitrógeno al suelo. Sin embargo, el ser humano utiliza únicamente alrededor de 150 especies de leguminosas (Fao, 1991).

4.2. Morfología

4.2.1. Subfamilia Faboideae (Papilionoideae)

Compuesta principalmente por especies herbáceas, pueden ser trepadoras o arbustivas. Con hojas alternas, predominando las compuestas (pinnadas, palmadas o trifolioladas) ocasionalmente simples. Sus flores comúnmente están agrupadas en racimos, espigas o cabezuelas, siendo bisexuales; el cáliz gamosépalo está compuesto por cinco sépalos, a veces bilabiado; su corona es dialipétala conteniendo cinco pétalos, siendo el superior el estandarte, los laterales las alas y los dos inferiores e internos forman la quilla la cual rodea tanto al gineceo como al androceo; el androceo tiene diez estambres de los cuales nueve están connados y el décimo está parcial o totalmente separado del grupo; el gineceo está formado por un solo carpelo, acompañado de varios óvulos totalmente campilótrofos.

Entre las especies más representativas se encuentran la lenteja (*Lens esculenta*), habas (*Vicia faba*), chícharo (*Pisum sativum*), alfalfa (*Medicago sativa*), cacahuete (*Arachis hypogea*) y garbanzo (*Cicer arietinum*).

4.2.2. Subfamilia Caesalpinoideae

Integrada por árboles y arbustos con hojas compuestas de una a dos, colores con racimos o panículas, corola ligeramente cigomorfa formada por un estandarte, dos alas y dos quillas. Las especies más representativas son el tamarindo (*Tamarindus indica*), palo verde (*Parkinsonia aculiata*), duraznillo (*Cercis canadensis*), framboyán (*Delonix regia*) y pata de vaca (*Bahinia lunaroides*). Carentes de espinas en los tallos con flores muy llamativas y abundantes, pueden ser amarillas, blancas, moradas o combinadas.

4.2.3. Subfamilia Mimosoidea

Compuesta por 40 géneros y 200 especies (aproximadamente) las cuales son árboles, arbustos o bejucos leñosos y algunas herbáceas (Villarreal, 2006). Rico Arce (2001) menciona que esta subfamilia tiene una diversidad de alrededor de 60 géneros y 3100 especies, describiéndolas de la siguiente manera:

“Hojas alternas pinnadas o bipinnadas, con dos o numerosos folíolos; estípulas presentes, a veces modificadas en espinas. Inflorescencias paniculares, racemosas, simples, en cabezuelas o espigas. Flores generalmente perfectas, algunas veces solo estaminadas o con ovarios muy reducidos. Fruto en legumbre comúnmente seca, dehiscente, tardíamente dehiscente o indehiscente; iniciándose la dehiscencia basalmente, en la parte media o apicalmente, en una o ambas suturas; legumbre a ves modificada en lomento; exocarpo liso, verrucado, ligero o densamente armado; mesocarpo de ausente a muy desarrollado y entonces fibroso o esponjoso; endocarpo liso o formando septos de color ocre o rojos brillante; semillas desde 1-35 por legumbre con folículo generalmente largo (hasta 5 cm de largo), algunas veces modificado en un arillo; testa presente, coriácea, papirácea generalmente con pleurograma; embrión recto, generalmente paralelo al eje de la semilla, algunas veces ligeramente deflexo; endospermo poco o muy abundante; plúmula desde rudimentaria a muy desarrollada, glabra o pubescente. Plántulas generalmente de germinación epígea, menos frecuente hipógea”.

Su distribución abarca los trópicos y subtropicos del mundo, con menor presencia en zonas templadas. Las especies destacan por su madera, frutos y semillas comestibles, además de la producción de gomas. Los géneros representativos son el huizache (*Acacia farneciana*), guajillo (*Acacia berlandiery*) mezquite (*Prosopis glandulosa*), huaje (*Leucaena glauca*) gatuño (*Mimosa biunsifera*), parota (*Enterolobium cyclocarpum*).

4.3. Género *Acacia*

El género es considerado como el segundo mayor en diversidad de la familia Fabaceae, cuenta con unas 1,400 especies distribuidas alrededor del mundo en climas tropicales y calurosos (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2010).

Estas especies proporcionan múltiples servicios, ecológicos, económicos, forrajeros y alimenticios, de los cuales se derivan la obtención de madera, pulpa, leña, productos químicos, combustibles y la protección de los suelos (Barros, 2007). *Acacia farnesiana* y *Acacia centralis* son especiales por la gran cantidad de servicios que ofrecen, dado el alto valor de su madera y pulpa (Skerman, *et al.*, 1991). Nava y Anaya (2003) argumentan que del huizache se obtienen aceites esenciales y aromas utilizados en la industria.

4.4. Distribución mundial de *Acacia*.

El género evolucionó en los bosques tropicales de tierras bajas del oeste de Gondwana (Beadle 1981). Algunos autores mencionan que las acacias se han extendido sobre las rutas de dispersión dentro de África (Ross, 1981) y Australia (Beadle, 1981) a consecuencia de la ruptura de Gondwana en continentes separados.

Beadle (1981) propuso que algunas especies llegaron a Australia antes de la separación y que las especies posteriores evolucionaron y se dispersaron hacia el sur desde el norte tropical del mismo. Sin embargo, Tindale y Roux (1974) argumentan que la región este del continente fue el centro de origen del género *Acacia*, ya que la proliferación de este género es notoria, además cerca del 80% son endémicas (486 especies aproximadamente), ahora se desarrollan en la zona suroeste de Australia occidental (Hopper y Maslin 1978 citados, por FAO, 1983). La figura 1 muestra la distribución mundial de la especie, actualmente la mayor diversidad se localiza en dicho continente con aproximadamente 1,010 especies, en segundo lugar América con 185 especies, África cuenta con 150 especies y Asia cuenta con 60 especies, mientras que en Europa se han introducido para cultivo (Khelladi *et al.*, 2010; World Wide Wattle, 2024).

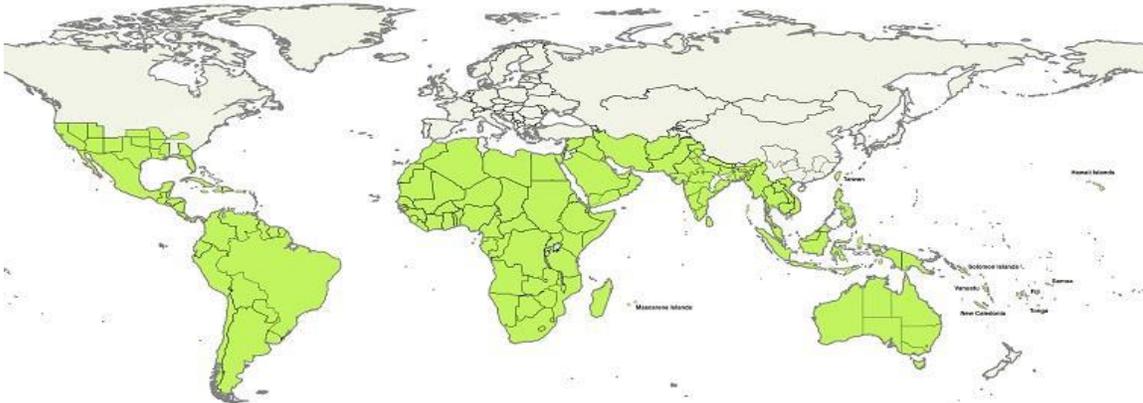


Figura 1. Distribución del género *Acacia* en el mundo (World Wide wattle, 2024).

4.5. Distribución en México

Siendo México un país megadiverso el género *Acacia* está representado con aproximadamente 85 especies de las cuales 30 son endémicas (Rico, 2001). En los estados fronterizos del norte del país se distribuyen 35 especies, 23 en Coahuila (Carranza y Villarreal, 1997; Estrada y Martínez, 2004) y 12 en Nuevo León (Estrada y Marroquín, 1991). La mayoría se localiza en áreas de planicie de climas áridos, formando parte importante de los matorrales en el norte de México (Estrada y Martínez, 2004). Rico Arce (2001) menciona que en Oaxaca se han recolectado 35 especies, de las cuales, cuatro son endémicas.

La figura 2 muestra la distribución de acacias en México, resalta una mayor presencia y diversidad de especies en Oaxaca, Guerrero, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Tamaulipas, Jalisco y Michoacán.

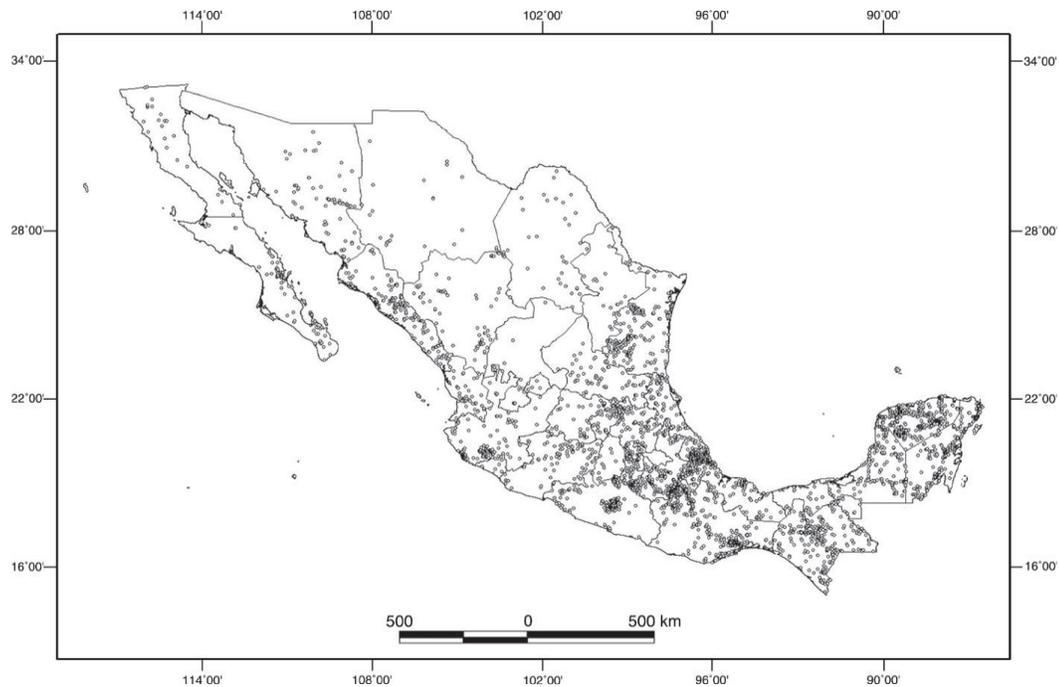


Figura 2. Distribución geográfica del género *Acacia* en México (SNIB, CONABIO).

4.6. Importancia ecológica y económica

La conservación de suelos es un punto importante para este género, ya que las raíces son profundas y ayudan a prevenir la erosión y degradación del suelo. Tiene la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en el suelo enriqueciéndolo y ayudando a otras especies. La hojarasca es de vital importancia ya que esta cumple con la función de crear una capa protectora, ayudando con la fertilidad y proporcionando un ciclo de regeneración al suelo. (Reforestación.org, Junio 2024). Otra característica importante es la relación simbiótica con diferentes insectos al brindar refugio y alimento a su vez los insectos ayudan con la dispersión de semillas de este género y brindan protección contra algunos herbívoros, este sistema genera un equilibrio ecológico para el ecosistema (Duno, 2019).

Las acacias proveen de múltiples servicios los cuales pueden ser maderables y no maderables, la mayoría de las especies son maderables, de ellas se obtiene madera acerrada, pulpa, papel, tableros, entre otros. Una gran cantidad de especies también producen gomas, productos químicos, alimentos humanos, forraje, leña, carbón, postes y materiales para construcción de cercos, también funcionan como cortinas rompe vientos, mejoramiento de

suelos, fijación de nitrógeno, entre otros (Barros, 2007).

Además, estas plantas poseen potencial como fuente de biomasa para energía, dada sus características de crecimiento, principalmente la plasticidad ecológica lo que hace posible el cultivo de las mismas en sitios marginados por las especies forestales tradicionales, esto debido a la degradación de suelos o limitaciones hídricas (INFOR, 2010). Son especies altamente adaptables a condiciones secas con potencial uso en la agroforestería, medicina, alimento, sombra, refugio para caza, forraje para el ganado, planificación ornamental, producción de taninos, etc. (Ross, 1981; Wickens *et al.*, 1995; Midgley y Turnbull 2003).

4.7. Código de barras de ADN

El código de barras de ADN es una secuencia corta de genes las cuales son tomadas de una parte del genoma y es utilizado para hacer una identificación rápida de especies (Kress *et al.*, 2015). Paz *et al.*, (2011) mencionan que este sistema se basa en una región estandarizada de ADN que sirve como una etiqueta (marcador) para la identificación rápida de especies, facilitando la conservación, conocimiento y uso sustentable de la diversidad.

Esta tecnología fue aplicada en el año 2003 por el Dr. Paul Hebert y colaboradores, en la universidad de Guelph, Canadá. Este sistema permitió crear una base confiable, rápida y con bajo costo para la identificación de muestras biológicas, dando acceso a una herramienta complementaria para la identificación de nuevas especies (Ramos *et al.*, 2012). Hollingsworth *et al.*, (2015) menciona que hay tres principios importantes en la tecnología de código de barras de ADN, los cuales son: estandarización, universalidad y escalabilidad. El código de barras debe distinguir entre regiones específicas, variaciones intraespecíficas e interespecíficas. De aquí se genera el concepto de brecha de código de barras o “Barcoding gap” esto es la diferencia entre estas discriminaciones específicas, es decir, entre mayor sea la diferencia entre estas, la discriminación específica será más acertada (Meyer y Paulay, 2005).

Esta metodología inicialmente fue propuesta para la identificación de animales a partir de un fragmento del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa subunidad 1 (*COI*) con aproximadamente 648 pares de bases (pb). *COI* representa una alta tasa de sustitución, representando una variación muy alta de su secuencia entre especies del mismo género

(Hebert *et al.*, 2003). Diversos estudios han demostrado que, en grupos de aves, peces, mamíferos, lepidópteros y otros insectos, el fragmento *COI* tiene variaciones interespecíficas muy amplias, dando como resultado buena identificación molecular y de caracteres morfológicos de especies (Hebert *et al.*, 2003).

El gen *COI* es apropiado para la mayoría de animales, pero existen dificultades al aplicarlo en la identificación de especies de algunos grupos taxonómicos como los cnidarios y esponjas, esto debido a que la distancia genética es demasiado pequeña para permitir la identificación confiable a nivel de especie (Huang *et al.*, 2008).

4.8. Utilidad de los Códigos de Barras de ADN

La genética molecular se ha convertido en una herramienta muy valiosa en la identificación de especies e individuos. Una ventaja de trabajar con esta disciplina, es obtener información a partir de un pequeño fragmento del organismo, la rapidez y precisión del código de barras de ADN lo convierte en una poderosa herramienta de identificación de especies. El propósito de un sistema de identificación más eficaz es facilitar la conservación, conocimiento y uso sustentable de la biodiversidad. Con frecuencia el código de barras puede revelar una divergencia genética muy alta dentro de una misma especie putativa, sugiriendo la existencia de especies crípticas (Paz *et al.*, 2011).

Además, gracias a esta tecnología se pueden vincular muestras biológicas a escenas de crimen en la medicina forense (Mildenhall, 2006); apoyo en la alimentación enfocado en la inocuidad y autenticidad de etiquetados identificando la pureza y procedencia (Huxley Jones *et al.*, 2012). Por su parte, Valentini *et al.*, (2009) mencionan su uso en la ecología, genómica y ambiental.

El código de barras de ADN continúa aplicándose para la identificación de muestras desconocidas junto con la adopción de tecnologías NGS (secuencias de nueva generación) o en aplicaciones metagenéticas (Kress y Erickson, 2008), los usos se están expandiendo a responder preguntas biológicas aplicadas y básicas, por ello, ecologistas, biólogos evolucionistas y conservacionistas han adoptado a los códigos de barras de ADN como una herramienta en sus respectivos campos (Joly *et al.*, 2014).

4.9. Marcadores utilizados en plantas

El uso de citocromo C subunidad 1 oxidasa (*COI*) en plantas no proporcionó resultados favorables por lo que se propuso el uso de marcadores del cloroplasto como madurasa K (*matK*) y ribulosa -1, 5- bifosfato carboxilasa/oxidasa (*rbcL*) los cuales se enfocan en el genoma nuclear de plastidos (González y Crawford 2011). Estas regiones son marcadores de <800 pb aproximadamente y han sido utilizados ampliamente en estudios de filogenia, teniendo una amplia representación en las bases de datos. Para el caso de las angiospermas no hay diferenciación de especies cercanas a consecuencia de esto se propusieron otros marcadores como la región transgénica *psbA-tmH*, el intrón *trnL* y la región nuclear *ITS* para estos casos (Yao *et al.*, 2010).

4.9.1. *matK* (madurasa K)

matK es un gen codificante del cloroplasto de las angiospermas, el cual tiene aproximadamente 1570 pb de longitud. Su región codificante generalmente se encuentra dentro del intrón del gen *trnK*, a excepción de algunos helechos (Neuhaus y Link, 1987). Este gen permite reconstrucciones filogenéticas a niveles taxonómicos altos como orden o familia incluso a nivel de género y especie, esto por su alta tasa evolutiva (Wolfe, 1991; Lahaye *et al.*, 2008). Este marcador tiene una longitud adecuada y divergencia interespecífica, pero tiene una tasa de transición/transversión baja (Sarma y Sathishkumar, 2008). Además, tiene un éxito del 90 % para amplificar el ADN de las angiospermas utilizando un par de cebadores, a diferencia de las gimnospermas que solo tiene un 83 % de éxito en su amplificación, con un mínimo de éxito para plantas criptógamas con un 10 % de éxito en la amplificación del ADN, aun con diversos pares de cebadores. (Li *et al.*, 2011; CBOL, 2009).

4.9.2. *rbcL* (ribulosa -1, 5- bifosfato carboxilasa/oxidasa)

El gen *rbcL* proviene de la RuBisCo, comprende una región de 599 pares de bases en la región 5' del gen que codifica a la RuBisCo, la cual se ubica entre las bases 1-599 en la secuencia del gen en *Arabidopsis thaliana* (Mondal *et al.*, 2013). La RuBisCo es una de las

enzimas más abundantes del mundo esta es la responsable de catalizar el CO₂ y la asimilación al carbono orgánico esto a través del ciclo de Calvin, esta se encuentra en la mayoría de las proteobacterias, cianobacterias, algas y plantas superiores (Chase *et al.*, 1993). El gen *rbcL* tiene una gran importancia ya que participa en el proceso de la fotosíntesis y fijación del carbono de la atmosfera esto para generar azucres, siendo un proceso bioquímico de gran importancia para las cadenas tróficas. Este último autor menciona que “todas las plantas terrestres tienen este gen” siendo que es el más fácil de trabajar técnicamente, es uno de los más conocidos, sin embargo, no es el mejor para discriminar. *rbcL* tiene una gran facilidad para amplificar, secuenciar y alinear en la mayoría de plantas. Una desventaja es su bajo poder discriminatorio, tiene gran importancia por tratarse de una región de referencia la cual es muy utilizada en estudios filogenéticos, por ende, esto permite reconstruir relaciones entre especímenes a nivel familia y género (Kress y Erickson 2007).

El CBOL en 2009 recomendó el uso de dos marcadores que consiste en porciones de dos regiones de codificación de plastidos, esto para realizar un código de barras central, esto al emplear *matK+rbcL*, esto puede tener mayor éxito al complementar con marcadores adicionales. La discusión de utilizar dos marcadores de código de barras se basó en la recuperación directa de la región *rbcL* y el poder discriminativo de *matK*, siendo que este una de las secciones de codificación de evolución más rápida del genoma en plástidos (Hilu y Liang, 1997). Además, *matK* es el análogo vegetal más cercano a *COI* en código de barras de animales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Colecta de muestras en campo de material vegetal

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 a la morfología que presentan las especies de la familia Fabaceae se realizó la identificación taxonómica siguiendo las claves morfológicas propuestas en el libro de leguminosas de Coahuila (Villarreal, 2004). De igual manera se colectaron muestras del Herbario Antonio Narro, Saltillo, México (ANSM).

5.2. Extracción de ADN genómico.

El procesamiento de muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Zoología del Departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), la extracción de ADN se realizó siguiendo el método modificado de CTAB (Sharma *et al.*, 2003) el cual se describe a continuación:

Las muestras se molieron hasta obtener un polvo fino en un mortero previamente esterilizado, el polvo obtenido se transfirió a un microtubo de 1.5 mL que contenía 700 μ L de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (previamente precalentado a 60 °C en una incubadora con Agitación 14093560 Select BioProducts); la mezcla se incubó durante 30 minutos a 60 °C. En seguida se agregaron 0.6 volumen de 24:1 de cloroformo: alcohol isoamilico y se mezcló por inversión durante 15 minutos, luego, los tubos se centrifugaron a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min (Spectrafuge 16M, Gray, 120 volts; Labnet), posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 mL, se tomaron 300 μ L a los cuales se agregaron 2 volúmenes de alcohol con el objetivo de precipitar el ADN y nuevamente la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min para sedimentar el ADN, la pastilla obtenida se lavó agregando 400 μ L de etanol al 70% y se centrifugo a 13,000 rpm durante 5 min, el segundo lavado consistió en agregar 300 μ L de etanol al 70% y centrifugar nuevamente. Los tubos se colocaron de manera invertida para secar a temperatura ambiente

durante una hora. Finalmente, las muestras se rehidrataron con 80 μL agua libre de nucleasas y se incubaron a 60 $^{\circ}\text{C}$ con 40 rpm por 30 min, por último, las refrigeraron a -20 $^{\circ}\text{C}$.

5.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó utilizando la mezcla comercial GoTaq Green Master Mix, 2XTM (Promega, USA), según las especificaciones del fabricante (tabla 2). Se llevó a cabo la amplificación del código de barras usando el cebador *rbcL* (Kress *et al.*, 2009). En la tabla 1 se muestra el programa del cebador utilizado. La tabla 2 muestra las cantidades utilizadas para realizar la PCR.

Tabla 2. Cebadores y programa de PCR utilizado para la amplificación (Kress *et al.*, 2009).

Fragmento	Cebadores (5'-3')	Descripción		
<i>rbcL</i>	F→	Proceso	$^{\circ}\text{C}$	Tiempo
	TGTCACCACAAACAG	Desnaturalización	94	5 min
	AGACTAAAGC	inicial		
	R→	Desnaturalización	94	30 seg
	GTAAAATCAAGTCCA	Alineamiento	50	40 seg
	CCRCG	Extensión	70	40 seg

Nota: número de ciclos 35.

Tabla 3. Mezcla de componentes para la PCR.

Componentes	Conversión	Volumen final
Agua	5 uL x 15	75 μL
Cebador directo	2 uL x 15	30 μL
Cebador reverso	2 uL x 15	30 μL
GoTaq Green Master Mix	10 uL x 15	150 μL
ADN	1 uL	1 μL

5.4. Electroforesis en gel de agarosa

La concentración y cantidad del ADN extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 75 voltios durante 1:45 h, utilizando marcador de peso molecular (DNA

Ladders/*MatK*ers – 100 bp, 1 kb and Ready-to-use Axygen®). La carga de muestras consistió en una mezcla de 5 µL de ADN genómico de las especies colectadas más 3 µL de buffer de carga molecular (5x colorless GoTaq® Green Master Mix). La visualización del gel se realizó mediante el Sistema de Documentación Gel Axygen (Axygen, Mod: Axygen Gel Document Documentation, Made USA).

5.5. Secuenciación

Se enviaron 50 µL de producto de PCR de cada muestra al servicio de secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del CINVESTAV, Irapuato, México.

5.6. Edición de electroferogramas

Una vez obtenidos los electroferogramas generados mediante la secuenciación de ADN, se procedió a visualizarlos a través del programa Unipro UGENE. Se determinó la calidad de las secuencias generadas en esta investigación (secuencias consulta). Después se realizó la eliminación de bases ambiguas cortando los extremos de la secuencia.

5.7. Creación de bibliotecas con secuencias consulta y de referencia

Una vez obtenidas las secuencias de consulta editadas se creó con estas un archivo en formato FASTA. Un total de 15 secuencias correspondientes a cinco especies de acacias formaron la biblioteca de datos generados en el laboratorio.

Para la obtención de secuencias de referencia se utilizó la plataforma de bioinformática NCBI (National Center Biotechnology Information) (NCBI, 2024), ambas plataformas proporcionan un análisis y almacenamiento de datos a través de la identificación de especies basada en el ADN. Se descargaron 10 secuencias para el marcador *rbcL* en formato FASTA. Estas secuencias sirvieron como guía para el alineamiento de las secuencias consulta.

5.8. Alineamiento de secuencias

Se realizó un alineamiento múltiple para la alineación y ajuste de las secuencias con la ayuda de la herramienta bioinformática ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) en el programa MEGA XI (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), utilizando la opción "Align by ClustalW".

5.9. Evaluación de la calidad de las secuencias.

Con el fin de determinar y evaluar la calidad de las secuencias consulta generadas, se realizó un análisis de la calidad de secuencias utilizando el software MEGA XI en dónde se evaluaron tres parámetros: sitios de conservación (C), Sitios variables (V), Sitios informativos o Indels (Pi) (Thompson *et al.*, 1994).

5.9.1.1. Análisis BLAST

BLASTn es un programa que, dada una consulta de ADN devuelve las secuencias de ADN más similares de la base de datos que especifique el usuario (BlastN, 2019). Las secuencias del marcador *rbcL* se concatenaron como una base de datos de consulta y mediante la herramienta de BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se realizó un BLAST considerando aciertos máximos de 98 a 100% con una especie.

5.9.1.2. Construcción de Dendrogramas

Con base en las secuencias alienadas, el método de unión del vecino más cercano se realizó en MEGA XI (Stecher *et al.*, 2020). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2 parámetros de Kimura (K2P) (Kimura, 1980); todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). El análisis basado en la construcción de árboles proporciona un método conveniente y visualizado que permite evaluar el desempeño discriminatorio mediante el cálculo de la proporción de grupos monofiléticos.

6. RESULTADOS

6.1. Colecta en campo

El material vegetal analizado tuvo dos orígenes, por un lado, la tabla 4 describe la información de las especies provenientes del herbario ANSM (Herbario Antonio Narro, Saltillo, México).

En el Jardín Botánico Gustavo Aguirre Benavidez (25°21'21.2"N 101°01'59.2"O) ubicado en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro se colectaron las siguientes especies *A. rigidula*, *A. farnesiana*, *A. cassifolia*, *A. gladulifera*, *A. constricta*, *A. berlandieri*, *A. schaneri* (cada especie con tres repeticiones) (Tabla 5).

Tabla 4. Especies provenientes del Herbario ANSM.

Especie	Identificador	Año	Lugar de colecta
<i>Acacia romeriana</i>	96834	2015	Coahuila
<i>Acacia villosa</i>	66120	1997	Coahuila
<i>Acacia parviflora</i>	65488	1994	Tamaulipas
<i>Acacia mammifera</i>	93803	2001	Oaxaca
<i>Acacia neovernicosa</i>	91964	2012	Chihuahua
<i>Acacia coulteri</i>	81965	2002	Nuevo León
<i>Acacia angustissima</i>	80252	2002	Nuevo León
<i>Acacia greggii</i>	99414	2017	Coahuila

Tabla 5. Especies colectadas en el jardín botánico "Gustavo Aguirre Benavidez".

		
<p><i>Acacia schaffneri</i></p>	<p><i>Acacia berlandieri</i></p>	<p><i>Acacia constricta</i></p>
		
<p><i>Acacia rigidula</i></p>	<p><i>Acacia farnesiana</i></p>	<p><i>Acacia crassifolia</i></p>
		
<p><i>Acacia glandulifera</i></p>		

6.2. Extracción de ADN genómico y amplificación por PCR.

La extracción de ADN genómico fue exitosa en las quince acacias colectadas.

La figura 3 muestra bandas de ADN de alto peso molecular obtenidas durante la extracción en especies del herbario ANSM, en orden de enumeración ascendente los carriles pertenecen a *A. reomeriana*, *A. villosa*, *A. parviflora*, *A. mammifera*, *A. neovernicosa*, *A. coulteri*, *A. angustissima* y *A. greggii*.

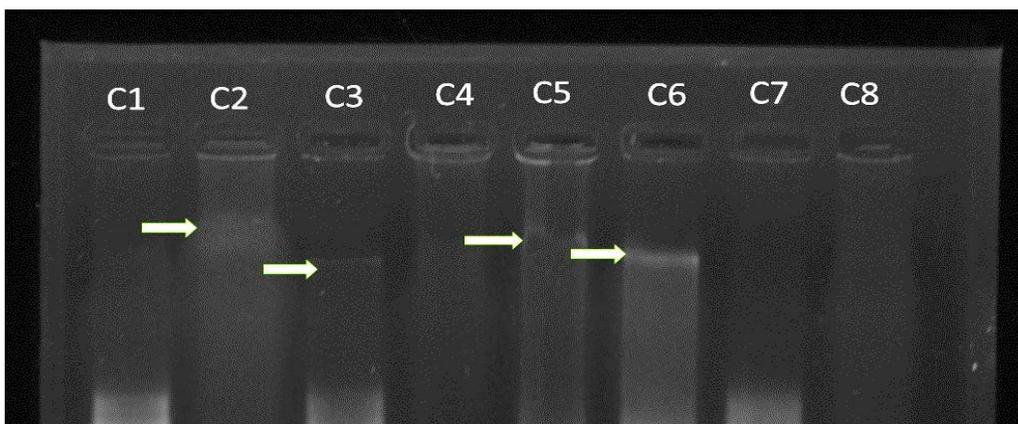


Figura 3. Gel de electroforesis con muestras de ADN genómico de especies del ANSM.

Por otra parte, la figura 6 muestra el resultado de la amplificación por PCR utilizando cebadores *rbcL*, con los cuales se generaron altos porcentajes de amplificación (100%).

El peso molecular de los amplicones o productos de PCR osciló entre los 400 a 500 pb de bases, lo cual coincide con el tamaño reportado para el marcador.

Los productos de PCR que mostraron una segunda banda inespecífica fueron purificados con el fin de obtener bandas específicas de ADN. La figura 4 muestra el acomodo de las especies de la siguiente manera, de izquierda a derecha las bandas generadas pertenecen a las especies a) *A. rigidula*, b) *A. farnesina*, c) *A. crassifolia*, d) *A. galindulifera*, e) *A. constricta*, f) *A. berlandieri*, g) *A. reomeriana*, h) *A. schaffneri*, i) *A. villosa*, j) *A. parviflora*, k) *A. mammifera*, l) *A. neovernicosa*, m) *A. coulteri*, n) *A. angustissima* y ñ) *A. greggii*, el primer carril pertenece al marcador molecular.

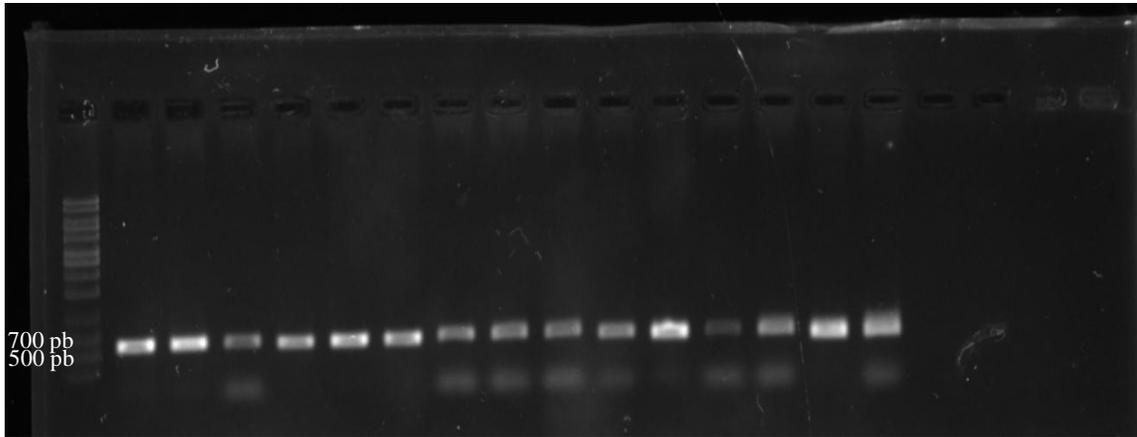


Figura 4. Productos de PCR generadas con cebadores *rbcL*.

6.3. Edición de secuencias

Para la edición de secuencias en primer lugar se revisaron de manera individual los electroferogramas obtenidos, con el objetivo de verificar su calidad, lo cual consistió en identificar que cada base nucleotídica estuviera bien representada por un pico cromatográfico (verde/adenina, rojo/timina, negro/guanina y azul/citosina).

De esta manera se identificó que el porcentaje de recuperabilidad de secuencias de buena calidad (Figura 5), fue de un 86.66 %, con un mínimo de secuencias de mala calidad (13.33 %) (Figura 6), estas dos últimas secuencias no fueron incluidas en análisis posteriores. Dando como resultado el uso de un total de 13 secuencias.

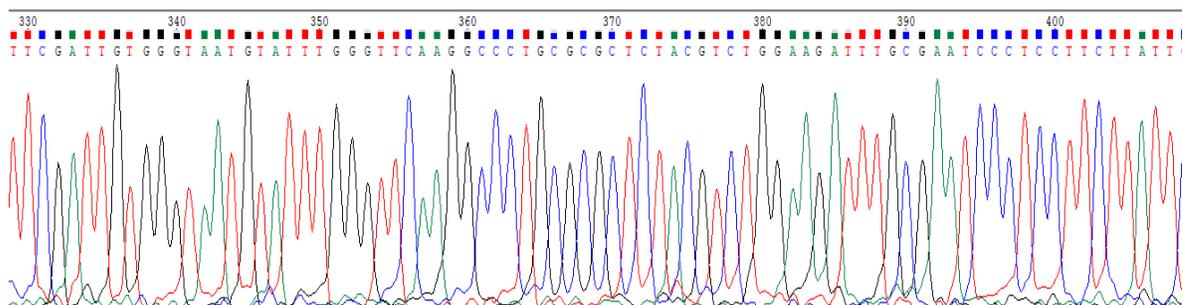


Figura 5. Electroferograma de *A. rigidula*; marcador *rbcL*.

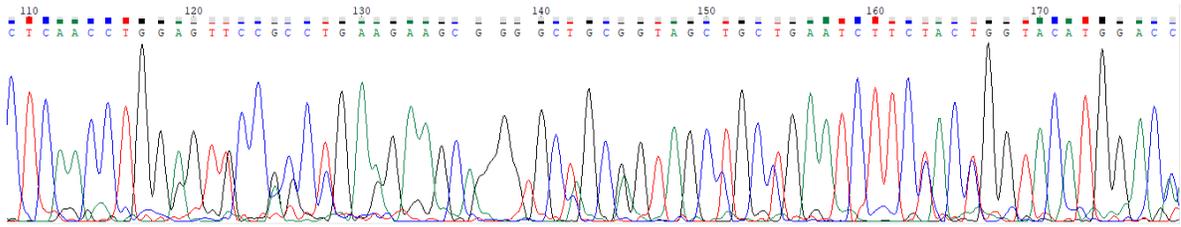


Figura 6. Electroferograma de *A. neovernicosa*; marcador *rbcL*.

6.4. Corte de extremos

La eliminación de bases de los extremos es una forma de mejorar la calidad de las regiones utilizables de cada una de las secuencias. Para ello se realizó un corte en ambos extremos (5' y 3') en donde la secuencia regularmente resulta ser de mala calidad, esto es, que los picos cromatográficos no representan a una base nucleotídica bien definida (Figura 7).

Al finalizar el corte de extremos de todas las secuencias, la longitud de estas fue de 515 nucleótidos, lo cual continua dentro del rango de longitud reportado para marcadores *rbcL*.

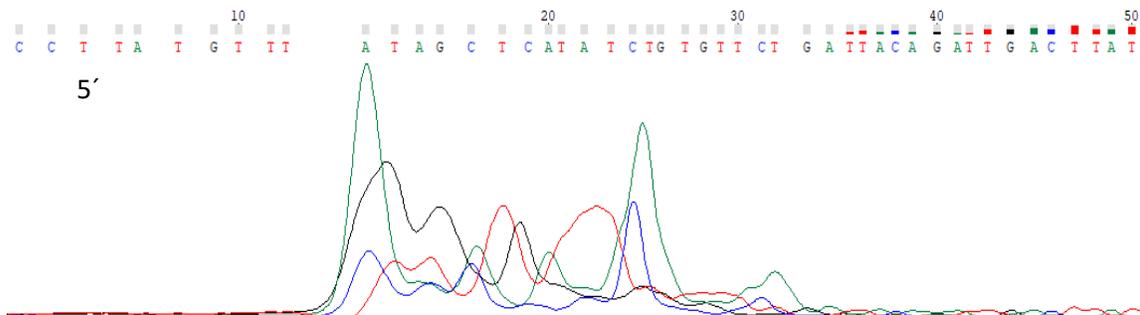


Figura 7. Electroferograma de *Acacia rigidula*; extremo 5'.

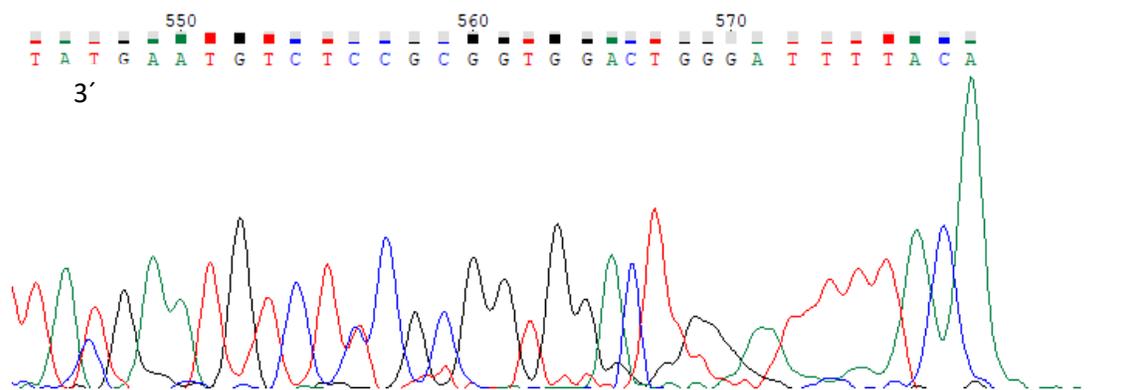


Figura 8. Electroferograma de *Acacia rigidula*; extremo 3'.

6.5. Análisis en BLAST

Se analizaron de manera individual las secuencias de consulta generadas en este estudio. El cual mostró altos porcentajes de identificación a nivel de género en 13 muestras, sin embargo, la identificación a nivel de especie resultó ambigua. Los porcentajes obtenidos para cada secuencia a nivel de género se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Análisis BLAST para secuencias del género *Acacia*.

Nombre	Identificación		
	Especie	Género %	Ambiguo %
<i>Acacia rigidula</i>	0	100	0
<i>Acacia farnesiana</i>	0	100	0
<i>Acacia crassifolia</i>	0	100	0
<i>Acacia glandulifera</i>	0	99.23	0
<i>Acacia constricta</i>	0	100	0
<i>Acacia berlandieri</i>	0	99.62	0
<i>Acacia roemeriana</i>	0	99.44	0
<i>Acacia schaffneri</i>	0	99.62	0
<i>Acacia villosa</i>	0	99.81	0
<i>Acacia mammifera</i>	0	100	0
<i>Acacia couteri</i>	0	100	0
<i>Acacia angustissima</i>	0	100	0
<i>Acacia greggiie</i>	0	99.81	0

6.6. Alineamiento de las secuencias

El alineamiento múltiple tiene la función que, dado un conjunto de secuencias, nos permite compararlas conforme a la homología de las bases.

La figura 9 A) muestra las secuencias no alineadas y posteriormente en la figura 9 B) se observa una región del alineamiento generado de las secuencias de consulta permitiendo visualizar aquellas zonas homólogas entre ambos grupos de datos, además, se visualiza la presencia de probables sitios polimórficos. Después del alineamiento nuevamente se realizó un corte de los extremos con la finalidad de eliminar los espacios que podrían presentar deleciones o inserciones en la secuencia (Figura 10).

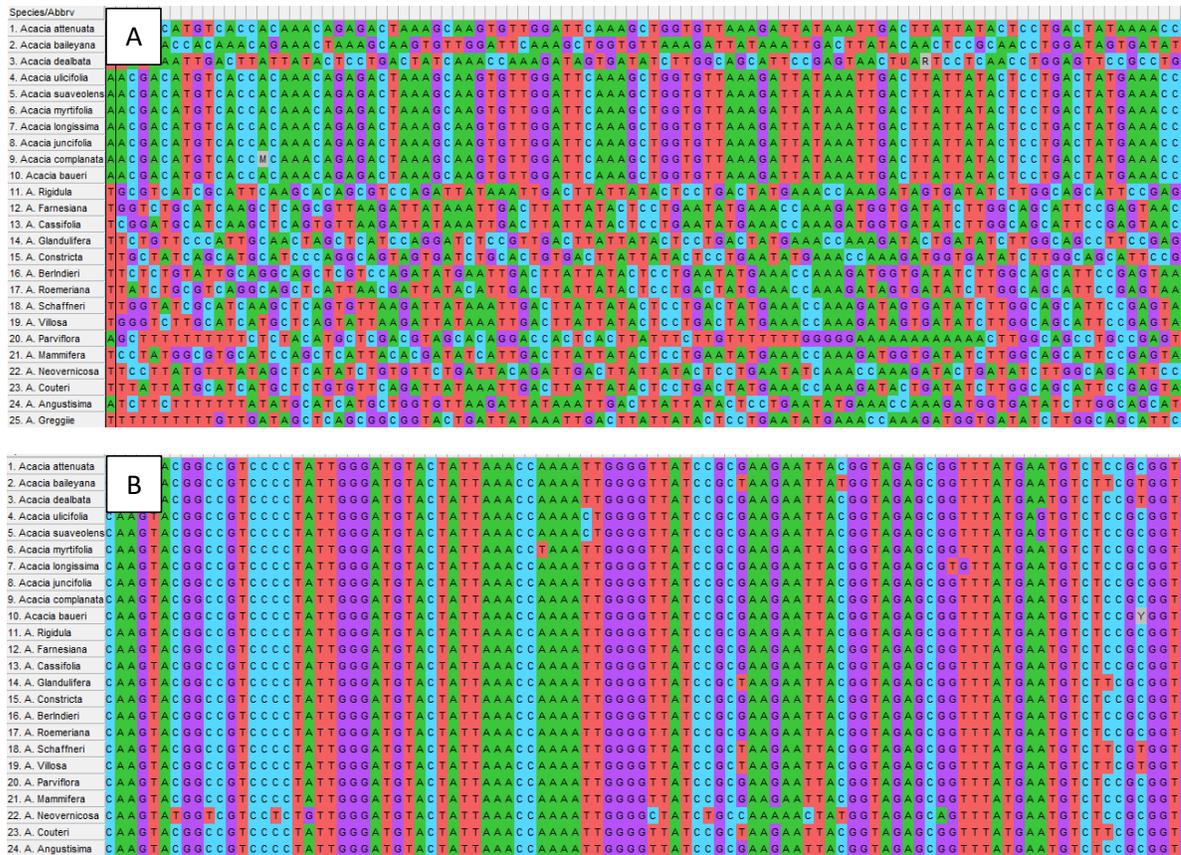


Figura 9. Secuencias de consulta alineadas.

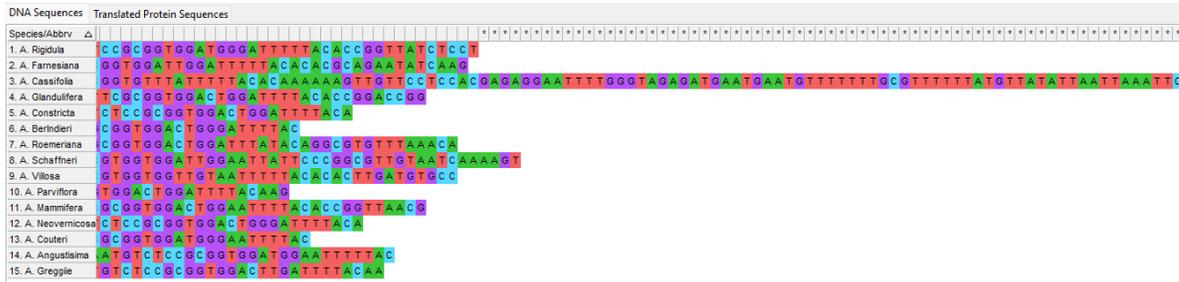


Figura 10. Corte de extremos de las secuencias alineadas.

6.7. Evaluación de la calidad de la secuencia

El archivo FASTA que contenía el alineamiento final fue utilizado para los análisis de evaluación de calidad de secuencias y para la construcción del dendograma.

Los parámetros a evaluar en la calidad de secuencias se describen a continuación:

Para secuencias generadas con el marcador *rbcl* aplicadas en especies de *Acacia* se obtuvo una longitud de secuencias en un rango de 515 a 590, se observaron 18 sitios variables, 496 sitios conservados y 13 sitios informativos (Figuras 11, 12 y 13 respectivamente). El porcentaje de G+C fue del 44 %.

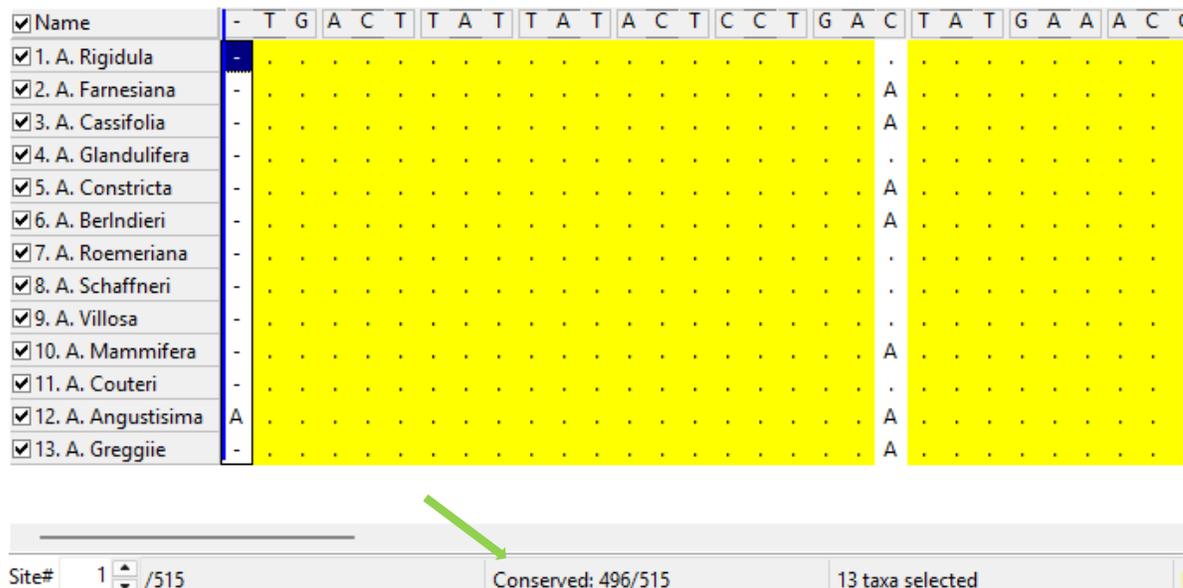


Figura 11. Sitios conservados (SC)

<input checked="" type="checkbox"/> Name	-	T	G	A	C	T	T	A	T	T	A	T	A	C	T	C	C	T	G	A	C	T	A	T	G	A	A	A	C	
<input checked="" type="checkbox"/> 1. A. Rigidula	-
<input checked="" type="checkbox"/> 2. A. Farnesiana	-
<input checked="" type="checkbox"/> 3. A. Cassifolia	-
<input checked="" type="checkbox"/> 4. A. Glandulifera	-
<input checked="" type="checkbox"/> 5. A. Constricta	-
<input checked="" type="checkbox"/> 6. A. BerIndieri	-
<input checked="" type="checkbox"/> 7. A. Roemeriana	-
<input checked="" type="checkbox"/> 8. A. Schaffneri	-
<input checked="" type="checkbox"/> 9. A. Villosa	-
<input checked="" type="checkbox"/> 10. A. Mammifera	-
<input checked="" type="checkbox"/> 11. A. Couteri	-
<input checked="" type="checkbox"/> 12. A. Angustisima	A
<input checked="" type="checkbox"/> 13. A. Greggii	-

Site# 1 /515 Variable: 18/515 13 taxa selected

Figura 12. Sitios variables (SV)

<input checked="" type="checkbox"/> 1. A. Rigidula
<input checked="" type="checkbox"/> 2. A. Farnesiana
<input checked="" type="checkbox"/> 3. A. Cassifolia
<input checked="" type="checkbox"/> 4. A. Glandulifera
<input checked="" type="checkbox"/> 5. A. Constricta
<input checked="" type="checkbox"/> 6. A. BerIndieri
<input checked="" type="checkbox"/> 7. A. Roemeriana
<input checked="" type="checkbox"/> 8. A. Schaffneri
<input checked="" type="checkbox"/> 9. A. Villosa
<input checked="" type="checkbox"/> 10. A. Mammifera
<input checked="" type="checkbox"/> 11. A. Couteri
<input checked="" type="checkbox"/> 12. A. Angustisima
<input checked="" type="checkbox"/> 13. A. Greggii

Site# 1 /515 Parsim-info: 13/515 13 taxa selected

Figura 13. Sitios informativos (SI)

6.8. Evaluación de dendrograma

El dendrograma mostró dos clados monofiléticos principales. Es sabido que entre mayor cercanía tengan las especies en el árbol estarán mayormente emparentadas. Taxonómicamente el parentesco y cercanía entre grupos de plantas se evalúa de acuerdo con sus características morfológicas en especies de acacias esto corresponde a formas de hojas, tipo de inflorescencia, acomodo de espinas o forma del fruto.

En la figura 14 se muestran estas características en su inflorescencia, por consiguiente, hace relevancia en la diferencia tanto de color, tamaño y forma. Por otro lado, la figura 15 muestra la diferencia en las hojas, aunque estas siempre serán bipinnadas difieren en el tamaño y número de las mismas, también si cuentan con estípulas o no, estas pueden ser pequeñas, prolongadas, huecas o curvas.

De acuerdo con el dendrograma generado se observaron dos clados: “clado A” *A. rigidula*, *A. schaffneri*, *A. villosa*, *A. glandulifera* y *A. couleri*; “clado B”: *A. berlandieri*, *A. greggii*, *A. angustissima*, *A. mammifera*, *A. constricta*, *A. mammifera*, *A. constricta*, *A. crassifolia* y *A. farnesiana*.

La topología del árbol revela agrupaciones jerárquicas, indicando qué especies están más estrechamente relacionadas entre sí según los datos utilizados para construir el dendrograma. Un clado que agrupa a *A. berlandieri* y *A. greggii* como las especies hermanas más cercanas. Este clado a su vez está más estrechamente relacionado con *A. angustissima* y *A. mammifera*, que también forman un clado hermano. Finalmente, estas cuatro especies se agrupan con *A. constricta* y *A. crassifolia*.

Otro clado principal en la parte inferior que incluye a *A. farnesiana*, *A. rigidula*, *A. schaffneri*, *A. villosa*, *A. glandulifera*, *A. couleri* y *A. roemeriana*. Dentro de este, se observa una relación cercana entre *A. glandulifera*, *A. couleri* y *A. roemeriana*. *A. rigidula* y *A. schaffneri* también forman un grupo hermano, que a su vez está relacionado con *A. villosa*.

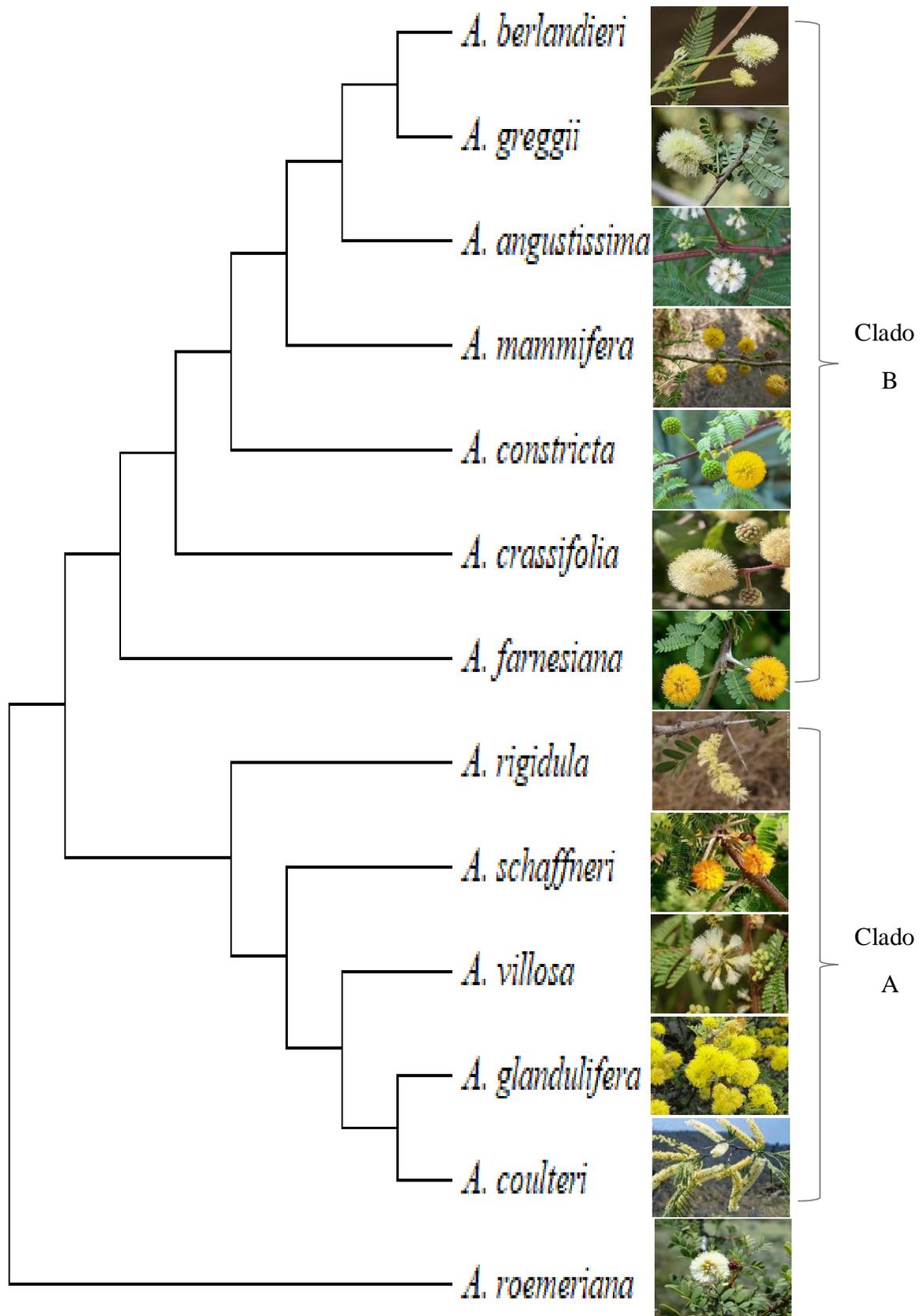


Figura 14. Dendrograma de especies trabajadas.

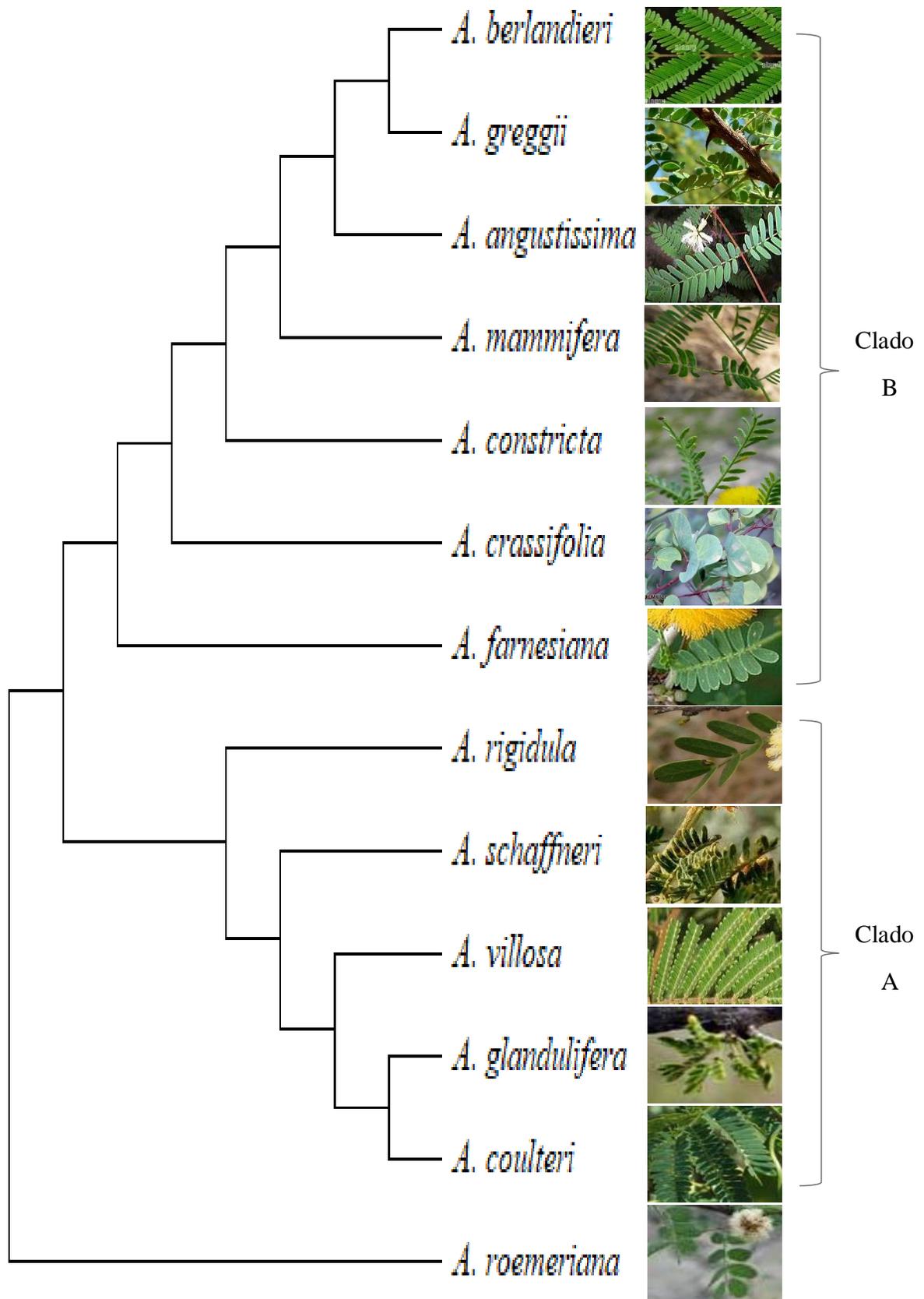


Figura 15. Dendrograma con características morfológicas

De la misma manera, se describen las especies de este clado de la siguiente forma haciendo una relación general de las mismas en la figura 16.

Crecimiento arbustivo o arbóreo.

Tipo de hojas bipinnadas con folíolos pequeños.

Tipo de espinas estipulares presentes de hasta 6 cm.

Tipo de flores en forma globosa y espigas cilíndricas color amarillo o blanco crema.

Tipo de fruto una vaina, ligeramente curvo, aplanado y pubescente de hasta 10 cm de largo.

El caso específico de *A. glandulifera* recibe su nombre por las glándulas que presenta en su fruto.

Clado A



Acacia villosa



Acacia schaffneri



Acacia glandulifera



Acacia couteri

Figura 16. Ilustración del clado A.

A continuación, se describen las especies de este clado en la figura 17 de la siguiente manera haciendo una relación general de las mismas.

Crecimiento arbustivo o arbóreo.

Tipo de hoja bipinnada.

Tipo de flor globosa, color amarillo o blanco crema, muy perfumadas.

Tipo de fruto vaina color marrón rojizas, semiduras, subcilíndricas, terminadas en una punta aguda, aplanadas dehiscentes enrolladas o torcidas.

Espinas estipulares presentes, pequeñas a menudo recurvadas y agudas.

Clado B



Acacia farnesiana



Acacia angustissima



Acacia greggii



Acacia berlandieri

Figura 17. Ilustraciones del clado B

Para el caso de la especie no agrupada (figura 18), se hace una breve descripción de la especie.

Arbusto pequeño generalmente muy espinoso.

Tipo de hojas bipinnadas con folíolos pequeños generalmente de color verde claro.

Tipo de flores pequeñas, agrupadas en cabezuelas globosas de color amarillo o blanco crema.

Tipo de fruto vainas planas siendo rectas o ligeramente curvadas, las semillas son de forma ovalada.

Tipo de espinas en pares siendo estípulas modificadas.

Acacia roemeriana es un arbusto que forma parte de la vegetación de chaparral.

No agrupada



Acacia roemeriana

Figura 18. Especie no agrupada

7. DISCUSIÓN

7.1.Extracción

Los especímenes colectados en fresco y otros en condiciones de herbario se sometieron a un método de extracción de ADN utilizando CTAB (Bromuro de cetil-trimetil amonio) (Sharma *et al.*, 2003), esto permitió obtener suficiente cantidad y calidad del mismo en el 100% de muestras colectadas, además el ADN obtenido permitió la óptima amplificación por PCR.

El principio de utilizar CTAB consiste en producir la degradación de las membranas celulares, dando origen a la ruptura celular. Existen diferentes métodos de extracción de ADN como DNeasy Plant Kit, Extracción Wizzard, CTAB, etc., los cuales pueden proporcionar ADN aplicable a estudios de PCR (Cankar *et al.*, 2006). La diferencia entre métodos es la eficiencia de la eliminación de impurezas (residuos) que no sean ADN, esto, debido a que algunos reactivos utilizados para la extracción en estas técnicas pueden provocar fallas en los resultados de la PCR.

El método de extracción con CTAB tiene mayor efectividad que Wizard y DNeasy Plan Mini Kit (Demeke *et al.*, 2009). El ADN que se extrae por el método de CTAB tiene proporciones de Abs 260/280 y Abs 260/230 menores, esto indica una mayor pureza del ADN.

Torres *et al.*, (2005) reportaron dos métodos de extracción de ADN una de ellas una fue con CTAB, el otro método incluye el uso de SDS en el regulador de extracción, ambos permitieron obtener cantidades suficientes de ADN para estudios moleculares. Los autores mencionan que hay diferencias significativas ($p=0.20$) entre protocolos con relación a la pureza, el factor influyente podría ser la temperatura en la etapa de lisis celular.

El método CTAB originalmente fue desarrollado para obtener ADN de plantas, sin embargo, Barragán-Valencia (2009) realizaron cambios con la finalidad de que el método pudiera usarse en insectos.

Sin embargo, dicha metodología muchas veces es modificada de acuerdo al tipo de material vegetal utilizado, por ejemplo, Tiwari *et al.*, (2012) modificaron la misma técnica agregando mayor concentración de NaCl, ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) y mercaptoetanol, estos autores reportaron que estas modificaciones mejoraron la actividad de extracción y

purificación de CTAB. La descripción de la mejora de este método resultó en que el NaCl y el mercaptoetanol mejoraron la extracción de ADN y la degradación de proteínas, al mismo tiempo la concentración de EDTA protegió el ADN.

También mencionan que es importante realizar la purificación de ácidos nucleicos ya que se remueven proteínas, residuos orgánicos y sales, los cuales pueden interferir en la reacción de la PCR. Otra ventaja del uso de CTAB es su reducido costo económico comparado con el uso de Kits de extracción.

7.2. Amplificación por PCR y secuenciación

Los cebadores *rbcL* son utilizados en plantas superiores (angiospermas, gimnospermas, helechos y licófitos) para realizar estudios de filogenia, taxonomía molecular y de códigos de barra de ADN. Este es un gen presente en los cloroplastos. En las etapas de amplificación y secuenciación estos cebadores presentan una alta tasa de éxito en la PCR, generando secuencias de buena calidad. En este trabajo se utilizaron marcadores *rbcL*, su aplicación demostró una vez más su eficiencia al tener un 100% en la amplificación por PCR y un 86.6 % de efectividad de secuenciación.

rbcL cumple con la mayoría de los atributos para funcionar como un locus de código de barras, (Newmaster, Fazekas, y Ragupathy, 2006). Por su parte, Dong *et al.*, 2014 mencionan que los genes de *rbcL* de las especies de cianobacterias tienen un alto contenido de GC, mientras que las especies de proteobacterias presentan principalmente un mayor contenido de GC.

Otros autores mencionan altos porcentajes de amplificación en especies de *Orchidaceae*, obteniendo un 90 % de amplificación (Kress y Erickson, 2007).

Por otra parte, Schori y Showalter (2011) en una comparación de plantas medicinales, mencionan que *rbcL* es un buen marcador molecular en código de barras ya que todas las especies que analizaron amplificaron al 100 %.

Por su parte Abdel-Hamid *et al.*, (2021) en su estudio de comparación de 24 taxones del género *Acacia* las cuales fueron recolectadas en diferentes regiones de Arabia Saudita, dando como resultado un 100 % en la amplificación con los cebadores *rbcL*, mostrando el rango de pares de bases que fue de 545 a 599 pb.

Así mismo Bentos y Sosa (2020) en 29 especies de referencia (tejido fresco) y 9 especies de interés comercial industrial, utilizaron cebadores *rbcL* obtuvieron secuencias de buena calidad en 83 % de las muestras de referencia para el caso de las muestras comerciales industrializadas solo el 50 % de las secuencias obtenidas fueron de calidad aceptable, el promedio de longitud de secuencias fue de 575 pb.

Wei *et al.*, (2024) repotaron 49 muestras de *Cactaceas* con el cebador *rbcL* con una alta tasa de amplificación de 97.95 % con una longitud de 587 pb, también generaron secuencias de buena calidad del 81.25 % aplicando cebadores *rbcL*.

7.3. BLAST

El análisis de las secuencias por BLAST en este trabajo dio como resultado el emparejamiento de 13 ejemplares todos a nivel de género con un porcentaje de identificación del 99.23 % como mínimo y un máximo del 100 %, se esperó que dichos ejemplares se pudieran emparejar a nivel de especie, ninguno de los ellos tuvo éxito.

Pacheco-Reyes (2021) hace mención que el análisis BLAST proporcionó una identificación de 98.1 % con marcadores *rbcL* en *Quercus*. Para el caso de encinos chinos de un grupo taxonómico específico, BLAST mostro la identificación más alta en comparación con otros métodos de identificación a nivel de género y especie (Caballin *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2016).

Kumar *et al.*, (2018) utilizaron el análisis BLAST para comparar la secuencia del gen *rbcL* de *Acacia pseudoeburnea* con otras secuencias en la base de datos GenBank del NCBI. Los resultados revelaron una alta similitud genética entre *A. pseudoeburnea* y otras especies del mismo género, alcanzando una identidad del 100 % con *Acacia nilotica* subsp. *indica*. Esto sugiere una estrecha relación genética entre estas especies a nivel de nucleótidos del gen *rbcL*. Además, se observaron similitudes significativas con otras especies como *Acacia exuvialis*, *Acacia karroo* y *Acacia tortilis*, con porcentajes de identidad entre el 99 y el 100%. Hussain *et al.*, (2023) compararon 12 especies de árboles de moras del género *Morus*, en su alineación en BLAST presentan un 91.6 % de identidad en las secuencias, dando como respuesta a que los marcadores *rbcL* y *matK* permiten distinguir eficientemente entre especies, esto autores mencionan que dicha investigación podrá ser útil para la identificación

de otras especies de este género. Además, *rbcL* mostró una mayor tasa de conservación y éxito en la amplificación.

Yong *et al.*, (2024) trabajaron con 15 especies de bambú (género *Schizostachyu*), las tasas de secuenciación resultaron ser del 100 % a nivel de género, por otro lado, a nivel de especie la tasa de éxito alcanzó el 60 %. Por otro lado, Wei *et al.*, (2024) al trabajar con cactáceas en sus secuencias de consulta reportan que los marcadores *rbcL* tuvieron una tasa de identidad a nivel de género con 71.43 % y para especie 14.29 %, realizaron la comparación tanto de *matK* y *rbcL* presentando tasas de identidad ambigua similares (14.29% y 16.67 %, respectivamente).

Por su parte, Ruíz (2019) realizó el alineamiento de 5 especies de diatomeas mediante BLAST, dando un alto porcentaje de identidad para el gen *rbcL*, dando porcentajes mínimos de 93.74 % y máximos de 100 % para estas especies.

Mientras que Trinugroho *et al.*, (2023) obtuvieron 100 secuencias de arroz de diversas especies, mencionan que estas mismas secuencias son similares a las secuencias de referencia, puesto que presentaron un porcentaje de identidad que van de un 98 % y 100 %. De las mismas secuencias seleccionaron 45 de diferentes especies, ya que muchas de provenían de la misma especie.

7.4. Dendrograma

El dendrograma es fundamental en el análisis de agrupamiento de especies, ya que busca identificar grupos de elementos similares dentro de un conjunto de datos (Everitt *et al.*, 2011). La estructura de un árbol comienza con los elementos individuales como “hojas” y las ramas se fusionan hacia arriba a medida que los elementos se vuelven más similares, finalmente, todos los elementos se unen en una sola “raíz” (Sneath and Sokal, 1973).

El dendrograma presentado en este estudio ofrece una hipótesis sobre las relaciones evolutivas entre las especies de *Acacia* analizadas. La agrupación de ciertas especies sugiere que comparten un ancestro común más reciente y, por lo tanto, probablemente comparten más características genéticas y fenotípicas en comparación con especies ubicadas en ramas más distantes del árbol (Felsenstein, 2004).

La clara separación en dos clados principales indica una divergencia evolutiva temprana entre estos grupos de especies. Las relaciones dentro de cada clado sugieren patrones de diversificación más recientes. Por ejemplo, la estrecha relación entre *A. berlandieri* y *A. greggii* podría implicar similitudes en su ecología, distribución geográfica o características morfológicas heredadas de un ancestro común (Brooks y McLennan, 1991). De manera similar, la agrupación de *A. glandulifera*, *A. coulteri* y *A. roemeriana* sugiere una historia evolutiva compartida.

Es importante tener en cuenta que la topología de este dendrograma se basa en un conjunto específico de datos y un método de análisis filogenético particular (Hillis *et al.*, 1996). Diferentes conjuntos de datos, por ejemplo, análisis de diferentes genes o caracteres morfológicos o el uso de diferentes algoritmos de construcción de árboles podrían resultar en una topología ligeramente diferente (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Por lo tanto, este dendrograma representa una hipótesis que puede ser refinada o modificada con la adición de nueva evidencia.

La ausencia de información sobre los caracteres utilizados para construir el árbol (moleculares, morfológicos, etc.) limita la profundidad de la interpretación. Sin embargo, el dendrograma en sí proporciona una valiosa representación visual de las relaciones filogenéticas inferidas y puede servir como base para investigaciones posteriores sobre la evolución, biogeografía y clasificación de *Acacia*, tal como lo mencionan otros autores (Wiley y Lieberman, 2011).

8. CONCLUSIÓN

El método de extracción utilizado en esta investigación fue exitoso al obtener ADN de buena calidad en el 100% de especies analizadas. La amplificación con cebadores *rbcL* aplicados en *Acacias* funcionó en el 100% de muestras, esto se obtuvo aplicando distintas diluciones de ADN. Mientras que los porcentajes de secuenciación de buena calidad fue alto (86.6 %)

La herramienta BLAST permitió hacer una comparación entre secuencias de consulta y secuencias de referencia, esto arrojó altos porcentajes de identificación a nivel de género en todas las especies analizadas.

El alineamiento se llevó a cabo de manera exitosa y con ello se pudieron obtener datos de calidad de secuencias, además de realizar el dendrograma en donde se observó la cercanía de las especies en los dos clados resultantes (vecinos cercanos), lo cual sugiere patrones claros de diversificación y similitudes en su ecología. Estos rasgos genéticos podrían estar influenciados por la distribución geográfica, lo que a su vez se refleja en sus características morfológicas, sin olvidar la historia evolutiva del género.

Es necesario continuar con estudios moleculares que permitan discernir de una mejor manera entre especies de acacias, además de la aplicación de distintos tipos de marcadores de código de barras de ADN que permitan una mejor identificación y discriminación entre especies.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Hamid, A. M., Elenazy, H. H., and Abdel-Hameed, U. K. (2021). DNA barcoding of some taxa of genus *Acacia* and their phylogenetic relationship. *All Life*, 14(1), 588-598.
- Arce, M. D. L. R. (2001). El género *Acacia* (leguminosae, Mimosoideae) en el Estado de Oaxaca, México. *In Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 58(2), 251-275.
- Barragán-Valencia, G., N. Almaraz-Abarca, R. Álvarez-Zagoya, E. A. Delgado-Alvarado, J. F. Pérez-Domínguez. (2009). DNA Isolation from *Diabrotica virgifera zea* Krysan and Smith y *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) by a CTAB simplified procedure. *Southwestern Entomologist* 34: 289-294.
- Barros A, S. (2007). El género *Acacia*, especies multipropósito. Instituto Forestal, Chile. 29p. <http://biblioteca.infor.cl/DataFiles/26485.pdf>.
- Bentos, F. y Sosa, F. (2020). Aplicación del código de barras de ADN (DNA barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. *Innotec*, (20), 117-138.
- Beadle, N. C. W. (1981). *The Vegetation of Australia.*, (Cambridge University Press: London, UK).
- Bouchenak-Khelladi, Y., Maurin, O., Hurter, J., and Van der Bank, M. (2010). The evolutionary history and biogeography of Mimosoideae (Leguminosae): an emphasis on African acacias. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 495-508.
- Brooks, D. R., and McLennan, D. A. (1991). *Phylogeny, ecology, and behavior: A research program in comparative biology.* University of Chicago Press.
- Caballin, M., Kesanakurti, P., and Wakamiya, I. (2016). DNA barcoding of closely related *Quercus* species (Fagaceae) from Japan using multiple chloroplast markers. *PLoS ONE*, 11(11), e0166124.
- Cankar, K., Ravnikar, M., & Dreo, T. (2006). Optimization of DNA extraction from diverse plant genera using a modified CTAB protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24(4), 281-286.
- CBOL Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12794–12797.
- CBOL Plant Working Group 1, Hollingsworth, P., Forrest, L., Spouge, J., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... and Little, D. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.
- Chase, M., Soltis, D., Olmstead, R., Morgan, D., Les, D., Mishler, B., and Albert, V. (1993). Phylogenetics of seed plants: a nucleotide sequence analysis of the plastidial gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 528-580.

- Consortium for the Barcode of Life (CBOL) Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797. 1
- Demeke, T., Jenkins, G. R., and Jones, H. D. (2009). Comparison of three plant DNA extraction methods for DNA barcoding and phylogenetic studies in *Bambusa* (Bambusoideae). *Molecular Ecology Resources*, 9(6), 1720-1723.
- Dong, W., Cheng, T., Li, C., Xu, C., Long, P., Chen, C., and Zhou, S. (2014). Discriminating plants using the DNA barcode *rbcL* b: an appraisal based on a large data set. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 336-343.
- Duno, R., y Ix, W. (2019). Perdimos un amigo, pero ganamos cuatro: las acacias de la península de Yucatán, México. *Desde El Herbario CICY*, 11, 7–13, 2019.
- Estrada, E. y Marroquín, J. (1991). Leguminosas en el centro-sur de Nuevo León. Facultad de Ciencias Forestales. UANL. Rep. Cient, (10).
- Estrada, E. y Martínez, E., Martínez M., (2004). Los géneros de leguminosas del norte de México. *Botanical Research Institute of Texas*. U.S.A. 12 p.
- Everitt, B., Landau, S., Leese, M. y Stahl, D. (2011). Cluster Analysis (quinta edición). Chichester: John Wiley and Sons, Ltd.
- FAO. 1983. Manual sobre semillas de acacia de zonas secas. Australia. <http://www.fao.org/DOCREP/006/Q2190S/Q2190S00.HTM>. Consultado: Agosto, 2024
- FAO. 1991. Leguminosas forrajeras tropicales. *Roma*. 548-550. pp.
- Felsenstein, J. (2004). Inferring phylogenies Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. xx+. pp.
- González, F., and Crawford, D. J. (2011). DNA barcoding in Asteraceae. In V. Savolainen, M. F. Fay, and A. W. Steadman (Eds.), *Molecular methods in plant taxonomy* (pp. 237-253). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Gregory, T. R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434: 1067.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., y De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., and DeWaard, J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

- Hebert, P., Penton, E., Burns, J., Janzen, D., and Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.
- Hebert, P., Stoeckle, M., Zemplak, T., and Francis, C. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, 2(10), e312.
- Hillis, D., Moritz, C., and Mable, B. (1996). Molecular systematics (2nd ed.). *Sinauer Associates*.
- Hilu K, Liang H (1997) The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* 84: 830–839.
- Hilu K, Liang H. (1997). The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* 84: 830–839.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., and Little, D. P. (2015). The power of plant DNA barcodes reveals the hidden world of medicinal plants. *Biological Conservation*, 182, 227-235.
- Huang, D., Meier, R., Todd, P., and Chou, L. (2008). Conservation genetics of scleractinian corals in Singapore. *Biological Conservation*, 141(2), 449-456.
- Huelsenbeck, J., and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Hussain, S., Asghar, R., Ajaib, M., Ali, I., and Faheem, M. (2023). DNA barcode for phylogenetic analysis of genus *Morus* species from Azad Jammu and Kashmir. *Pakistan Journal of Botany*, 55(6), 2211-2220.
- Huxley-Jones, Elizabeth, Shaw, J. L., Fletcher, C., Parnell, J., and Watts, P. C. (2012). Use of DNA barcoding to reveal species composition of convenience seafood. *Conservation Biology*, 26(2), 367-371.
- Instituto Forestal (Chile). (2011). Memoria INFOR 2010. Chile: INFOR. <https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/20856>
- Joly S., Soolanayakanahally R., Argyrou M., Baird R., Emberg, W., González, M., ... and Taberlet, P. (2014). DNA barcoding of Canada's boreal flora. *PloS one*, 9(7), e102286.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Kress, W., and Erickson, D. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS one*, 2(6), e508.

- Kress, W., and Erickson, D. (2008). DNA barcodes reveal patterns of differential species richness in the floras of three neotropical countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(Supplement 1), 11439-11444.
- Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O., and Bermingham, E. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18621–18626.
- Kress, W., Garcia-Robledo, C., Uriarte, M., and Erickson, D. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, ¹ 30(12), 800-808.
- Kumar, D. A., Anup, C., Santan, B., Ajay, T., and Mishra, R. J. (2018). DNA Extraction and molecular characterization of *Acacia pseudoeburnea*—an endemic species. *Res. Journal Biotechnol.*, 13, 8.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547.
- Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., ... and Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923-2928.
- Lewis G., B. Schrire, and B. Mackinder Lock, M. (2005). Legumes of the World (Vol. 577). (Eds.). Kew: *Royal Botanic Gardens*.
- Li D., Liu J., Chen Z., Luo Y., Chen S., Zhou L., ... and Yang, J. (2011). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*, 86(3), 589-606.
- Meyer C. and Paulay G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422.
- Mildenhall DC (2006) Hypericum pollen determines the presence of burglars at the scene of a crime: an example of forensic palynology. *Forensic Sci Int* 163(3): 231-235.
- Mondal M., Das S., Roy S., and Mandal, N. (2013). DNA barcoding: an efficient tool for plant species identification and biodiversity assessment. *3 Biotech*, 3(1), 1-11.
- Nava R, V; A. L. Anaya L. (2003). Leguminosas: Características químicas y su importancia en las interacciones con otros organismos. Universidad Autónoma Metropolitana. 8-11pp. Folleto.
- Neuhaus H., and Link G. (1987). The chloroplast *tRNA* Lys (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. *Current Genetics*, 11, 251-257.

- Newmaster S., Fazekas A., and Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Botany*, 84(3), 335-341.
- Pacheco-Reyes FC, Wei L, Pérez-Rodríguez MA. (2021). Análisis filogenético de especies de *Quercus* L. utilizando tres códigos de barras de ADN. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8(2): e2831.
- Paz A., Gonzalez M., and Crawford A. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta biológica colombiana*, 16(3), 161-176.
- Ramos, C., Martínez, L., Escobar, P., Pliego, P., Olivera, M., and Pérez, N. (2012). Códigos de barras de adn: Una nueva herramienta para la sistemática. *Kuxulkab'*, 18(35).
- Rey Bentos, F., y Capdevielle Sosa, F. (2020). Aplicación del código de barras de ADN (DNA Barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. *INNOTEC*, (20), 117-138.
- Ross, J. (1981). An analysis of the African *Acacia* species: their distribution, possible origins and relationships. *Bothalia*, 13(3-4), 1 389-413.
- Ruíz, F. M., Romero, O. E., Pérez, M. F., & Garcés, E. (2019). Evaluation of the *rbcL* marker for metabarcoding of marine diatoms and inference of population structure of selected genera. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2977
- Sarma, V., and Sathishkumar, K. (2008). Universal primers for amplification of *matK* gene in plants. *Bioinformatics*, 2(10), 403-405.
- Schori, M., and Showalter, A. M. (2011). DNA barcoding as a means for identifying medicinal plants of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 1-4.
- Sharma R, Mahla HR, Mohapatra T, Bhargava SC, Sharma MM (2003) Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 43-50.
- Shearer, T. L., Coffroth, M. A., Knowlton, N., and Marko, J. A. (2002). Allopatric speciation in Caribbean corals. *Evolution*, 56(5), 921-934.
- Skerman, P., Turnbull, J., and Boland, D. (1991). Acacias for Southeast Asia. *Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*.
- Sneath, PHA y RR Sokal (1973) – Taxonomía numérica: principios y práctica de la clasificación numérica. *WH Freeman and Company*, San Francisco. 573 págs.
- Stecher, G., Tamura, K., & Kumar, S. (2020). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1237–1239.
- Tiwari, K., Jadhav, S., and Gupta, S. (2012). Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from some Medicinal Plants. *Research Journal of Medicinal Plants*, 6(1), 65-73

- Thompson, J., Higgins, D., and Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Tindale, M. D., y Roux, D. G. (1974). A revision of the genus *Acacia* in eastern Australia. *Contributions from the New South Wales National Herbarium*, 3(3), 135-267.
- Torres, A., Castro, M., Millán, T., and Cobos, G. (2005). Comparison of different DNA extraction methods for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 23(4), 301-307.
- Torres, R., Bañuelos, R., Reyes, J., Paez, L., Delgado, E., Medina, J., ... y Chaidez Ayala, A. (2013). Comparación de dos métodos de extracción de ADN de *Boopeton nubilum* para estudios de variabilidad genética. *Rev. Vidsupra* 5: 85–89.
- Trinugroho, W., et al. (2023). Genetic diversity analysis of rice (*Oryza sativa* L.) germplasm based on SSR markers in Yogyakarta, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(11), 6084-6092.
- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M. A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J. E. and Taberlet, P. (2009). New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology Resources* 9, 51–60.
- Villarreal Quintanilla, J. Á. (2001). *Listados florísticos de MéxicoXXIII. Flora de Coahuila* (No. C/581.97214).
- Villarreal-Quintanilla, J. A. (2004). *Flora vascular de Coahuila, México: Listados florísticos de Mesoamérica*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Villarreal-Quintanilla, J. (2006). *Introducción a la Botánica Forestal*. México: Ed. Trillas ISBN: 978-968-24-7609-9. p. 151.
- Wei, L., Pacheco-Reyes, F. C., Villarreal-Quintanilla, J. Á., Robledo-Torres, Valentín., Encina-Domínguez, J. A., Lara-Ramírez, E. E., And Pérez-Rodríguez, M. Á. (2024). Effectiveness Of DNA Barcodes (*rbcL*, *matK*, *ITS2*) in Identifying Genera And Species In *Cactaceae*. *Pak. J. Bot*, 56(5), 1911-1928.
- Wiley, E., and Lieberman, B. S. (2011). *Phylogenetic systematics: A theory of biological relationships* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M., and Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American journal of botany*, 91(11), 1846-1862.

- Wolfe, K. H. (1991). Protein-coding genes in chloroplast DNA: compilation of nucleotide sequences, data base entries, and rates of molecular evolution. In *The photosynthetic apparatus: molecular biology and operation* (pp. 467-482). Academic Press.
- WorldWideWattle: Galería de información
<http://www.worldwidewattle.com/infogallery/species/> (2024).
- Yang, J., Li, D. Z., Little, D. P., & Gao, L. M. (2016). Chloroplast phylogenomics and species delimitation in *Quercus sect. Cerris* (Fagaceae) in the Mediterranean and Southwest Asia. *BMC Plant Biology*, 16(1), 213.
- Yao, H., Song, J., Chen, S., Luo, K., Pang, X., Xu, H., Xiao, P., Chen, L., & Liu, C. (2010). DNA barcoding for identifying *Cinnamomum* species. *PloS one*, 5(11), e13335.
- Yong, W. T. L., Mustafa, A. A., Derise, M. R., and Rodrigues, K. F. (2024). DNA barcoding using chloroplast *matK* and *rbcL* regions for the identification of bamboo species in Sabah. *Advances in Bamboo Science*, 7, 100073.