

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE 3 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y
AMPLIFICACIÓN DEL ADN CONTENIDO EN EXSICADOS DE ORQUÍDEAS
CONSERVADAS EN COLECCIONES DE HERBARIO.**



LAURA CRISTINA MAZO MOLINA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA-BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá D.C.
2011

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE 3 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y
AMPLIFICACIÓN DEL ADN CONTENIDO EN EXSICADOS DE ORQUÍDEAS
CONSERVADAS EN COLECCIONES DE HERBARIO.**

LAURA CRISTINA MAZO MOLINA

DECANA ACADÉMICA
Ingrid Schuler García, Ph.D

DIRECTORA DE CARRERA
Andrea Patricia Forero Ruiz, Biol.

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE 3 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y
AMPLIFICACIÓN DEL ADN CONTENIDO EN EXSICADOS DE ORQUÍDEAS
CONSERVADAS EN COLECCIONES DE HERBARIO.**

LAURA CRISTINA MAZO MOLINA

DIRECTOR TRABAJO DE GRADO
ALBERTO GOMÉZ GUTIÉRREZ Ph.D

JURADO TRABAJO DE GRADO
PEDRO ORTIZ VALDIVIESO, S.J.

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios, por permitirme realizar, culminar esta etapa y alcanzar este logro.

Mi familia, mi papá Freddy Mazo, mi mamá Consuelo Molina y mi hermana Carolina Mazo, por siempre apoyarme y estar presentes incondicionalmente.

Al Doctor Alberto Gómez, Doctor Jaime Bernal, Pedro Ortiz-Valdivieso S.J, Sonia Quintanilla, Diana Sánchez y Marcela Díaz por sus enseñanzas, guías y consejos durante el desarrollo de este proyecto.

Laboratorio de ADN arcaico del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, por las instalaciones y el uso de sus equipos.

CorpoGen , investigación y Tecnología, por permitir el uso de sus equipos de laboratorio.

TABLA DE CONTENIDO

- 1. Resumen**
- 2. Introducción**
- 3. Planteamiento del problema y Justificación**
- 4. Marco Teórico**
- 5. Objetivos**
 - 5.1 Objetivo general**
 - 5.2 Objetivos específicos**
- 6. Metodología**
 - 6.1 Selección material vegetal**
 - 6.2 Pre-extracción ADN**
 - 6.3 Extracción ADN**
 - 6.3.1 Protocolo 1. Quintanilla *et al.*, (2010)**
 - 6.3.2 Protocolo 2. Cota *et al.*, (2006)**
 - 6.3.3 Protocolo 3. Jobes *et al.*, (1995)**
 - 6.4. Espectrofotometría**
 - 6.5 Amplificación (PCR) y secuenciación**
 - 6.6 Análisis estadístico**
- 7. Resultados**
- 8. Discusión**
- 9. Conclusiones**
- 10. Bibliografía citada**

EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE 3 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN CONTENIDO EN EXSICADOS DE ORQUÍDEAS CONSERVADAS EN COLECCIONES DE HERBARIO.

1. RESUMEN

Los tejidos vegetales provenientes de muestras de herbario contienen ADN antiguo que ha sufrido degradación *post mortem*, de tal forma que pequeñas cantidades de material genético, eventualmente degradado, pueden ser extraídas de dichas muestras. Se han propuesto protocolos para extraer ADN antiguo libre de químicos e impurezas a partir de muestras de herbario, pero estos se limitan a determinados grupos de plantas, no encontrándose reportado un protocolo específico para extraer ADN proveniente de exsiccados de orquídeas. Por lo tanto, este proyecto se realizó con el fin de comparar y determinar cuál de los 3 protocolos de extracción de ADN vegetal propuestos por Quintanilla *et al.* (2010), Cota *et al.* (2006) y Jobes *et al.* (1995) permite extraer ADN de buena calidad, susceptible a secuenciación y técnicas de PCR. Para el efecto, se utilizaron de 2 a 5 mg de tejidos provenientes de 7 exsiccados de orquídeas recolectadas entre los años 1948 y 2011, preservadas en el Herbario “Lorenzo Uribe Uribe, S. J.” de la Pontificia Universidad Javeriana- Bogotá (HPUJ). De los protocolos evaluados, el más efectivo fue Quintanilla *et al.* ya que con este se obtuvieron productos de PCR en 6 de las 7 muestras estudiadas, y las relaciones de pureza ADN/Proteína (260/280 y 260/230) fueron las más óptimas. El protocolo menos exitoso fue el de Jobes *et al.* con el cual no hubo amplificación de ninguna de las 7 muestras evaluadas. En conclusión, el reactivo empleado en la lisis de pared y membrana celular es muy importante, siendo el β -mercaptoetanol y CTAB utilizados en Quintanilla *et al.*, más efectivo que la Proteinasa K y SDS empleados en Jobes *et al.*; de igual forma, el acetato de amonio resulta ser más apropiado para precipitar ácidos nucleicos, que el acetato de sodio utilizado en Jobes *et al.* y Cota *et al.* Se propone el uso del protocolo establecido por Quintanilla *et al.*, para extraer ADN de calidad a partir de exsiccados de orquídeas conservadas en Herbario hasta por 40 años.

2. INTRODUCCIÓN

En primer lugar es necesario definir el término “ADN antiguo” (ADNa). La definición hace referencia al ADN extraído a partir de muestras de individuos que fueron capturados o encontrados como restos fósiles y actualmente se preservan en museos y herbarios.

Hasta la fecha hay muchos informes sobre la recuperación de ADN a partir de muestras fósiles tanto de plantas como de animales, dentro de los cuales se encuentra la extracción y análisis de ADN antiguo realizado a partir del fósil de guagga, con 140 años de antigüedad , también la secuenciación de ADN a partir de restos fósiles del mamut lanudo (*Mammuthus primigenius*) con 50.000 años, la extracción ADN de las hojas de la especie *Magnolia latahensis*, a partir de restos fósiles que datan de la época del mioceno e incluso la extracción de ADN con más de un millón de años, de fósiles de plantas hallados en el contenido intestinal (coprolitos) de restos de mamíferos y homínidos. Aunque el trabajar con ADN antiguo no siempre es fácil, su estudio se ha vuelto cada vez más popular, debido a que complementa y es muy útil en múltiples disciplinas como genética de poblaciones, arqueología, biología de la conservación, análisis forenses, taxonomía entre otros.

Cuando se trabaja con plantas frescas, las células vivas realizan proceso de reparación enzimática de tal forma que la cantidad de material genético presente es alto, de buena calidad, libre de químicos e impurezas, susceptible de amplificación por técnica de PCR y secuenciación. En contraste, después de la muerte de un organismo, la molécula de ADN se vuelve muy inestable y los compartimentos celulares que llevan a cabo la actividad enzimática, dejan de funcionar. Como consecuencia, el ADN es rápidamente degradado por enzimas y por ADN exógeno perteneciente a bacterias y hongos. Lo anterior da lugar a 4 problemas principales asociados con el estudio de ADNa (1) la poca concentración y mala calidad del ADNa extraído, (2) la existencia de inhibidores (fenoles, proteínas, carbohidratos) de la *Taq* DNA polimerasa en las muestras, (3) Contaminación con ADN moderno, compuestos orgánicos e inorgánicos (4) Amplificación de secuencias pequeñas (100-500 pb).

Debido a la anterior, en este estudio se propone comparar y evaluar 3 protocolos de extracción de ADN en 7 exsiccados del Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana (HPUJ), que corresponden a las especies de orquídeas *Prosthechea grammatoglossa*, *Epidendrum secundum* y *Oncidium ornithorhynchum*, colectadas entre los años 1948 y 2011, con el fin de

determinar cuál de los 3 protocolos, permite la extracción y amplificación de ADN proveniente de especímenes de herbario.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Lograr un muestreo completo de una especie vegetal algunas veces es complicado. Los altos costos de trabajar en lugares remotos, la dificultad en obtener los permisos para colecta (Decisión 391, Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos, 1996), la inaccesibilidad a determinados lugares, la incertidumbre de poder encontrar las especies de interés y la extinción de determinados taxones, hacen que coleccionar material fresco no sea posible la mayor parte del tiempo (Lehtonen & Christenhusz, 2010). Los estudios de ADN antiguo en plantas son de gran interés, ya que éstas como productores primarios representan la mayoría de la biomasa en la tierra, siendo abundantes los registros fósiles conservados en herbarios (Gugerli *et al.*, 2005). Las colecciones de herbario son una fuente de material vegetal usado en investigaciones morfológicas y recientemente en estudios moleculares, debido a el ADN que las muestras secas contienen y a partir del cual se pueden resolver problemas taxonómicos, evolutivos y de distribución de poblaciones (Lister *et al.*, 2008). Las condiciones de secado al horno, la inadecuada preservación y almacenamiento de muestras vegetales, la exposición a sustancias químicas (alcohol, desinfectantes, plaguicidas) a luz ultravioleta (Shapiro, 2008), los pH muy altos o bajos, la humedad (Capelli *et al.*, 2003) y el proceso natural de degradación del material genético, son factores que afectan negativamente la calidad del ADN presente en muestras de herbarios (Lambertini *et al.*, 2008).

Las Investigaciones relacionadas con extracción de material genético proveniente de especímenes de herbario comparten varios problemas, dentro de los cuales se encuentra la limitada cantidad de ADN endógeno disponible en las muestras (Rohland & Hofreiter, 2007), el cual generalmente está altamente degradado, dependiendo de las condiciones de secado y guardado de la colecciones.

Otro obstáculo en el uso de material de herbario (en particular en Colombia) es la antigüedad de las muestras, ya que en algunos especímenes, la fecha de colecta es a comienzos de los siglos XIX y XX. Debido a esto, muchos ejemplares son considerados como material histórico de gran valor, como es el caso del herbario de José Celestino Mutis conservado en el Real Jardín Botánico de Madrid, donde se encuentran las colectas realizadas en la Real

Expedición Botánica del Virreinato de Nueva Granada, por lo tanto pequeñas cantidades de material pueden ser removidas de dichas muestras sin causarles daño en su integridad global. Por ejemplo, el herbario de Wageningen (Holanda) habitualmente dispone de 50 mg de cada planta (equivalentes a 4cm² de área foliar) para estudios complementarios (Telle & Thines, 2008).

El estudio de ADN antiguo en plantas es usualmente limitado a muestras no mayores a 200 años (Andreasen *et al.*, 2009), ya que la longitud del fragmento que se amplifica se relaciona con el grado de degradación del ADN (Andreasen *et al.*, 2009), encontrándose muy fragmentado en muestras mayores a un millón de años de fósiles de plantas hallados en el contenido intestinal (coprolitos) de restos de mamíferos y homínidos (Gugerli *et al.*, 2005). Por esta razón, métodos de extracción que recuperen la mayor cantidad de ADN posible a partir de poca cantidad de tejido, son fundamentales (Rohland & Hofreiter, 2007).

Los protocolos de extracción en plantas frescas han sido estudiados desde hace aproximadamente 20 años, pero pocos procedimientos han sido publicados hasta el momento. Muchos investigadores usan protocolos que se conocen por el nombre técnico de: a- “CTAB” (Doyle & Doyle, 1987), b- DNeasy plant mini kit (Qiagen), c- AnaP (innuPREPPlant DNA Kit), d- EriP (Ancient DNA extraction), entre otros; A pesar que se han propuesto protocolos para extraer ADN antiguo libre de químicos e impurezas a partir de muestras de herbario, pero estos se limitan a determinados grupos de plantas (Cota *et al.*, 2006).

Es importante resaltar que Colombia es el segundo país que contiene la mayor diversidad de orquídeas del planeta, con aproximadamente 3940 especies registradas y otras tantas en proceso de determinación taxonómica (Comunicación personal, Pedro Ortiz Valdivieso, S.J y Asociación Bogotana de Orquideología). La explotación indiscriminada de los hábitats naturales de las orquídeas, la colecta de especies silvestres realizadas con fines de exportación por colectores comerciales, los cambios climáticos, la destrucción masiva de hábitats debido a la extracción maderera y a la agricultura migratoria, ha generado que muchas orquídeas actualmente se encuentren en peligro de extinción (Resolución 932, Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial, 2010), con el agravante que en algunos casos ya no se disponga de algunos taxones para realizar estudios bioquímicos o moleculares, debido a que se encuentran extintos y solo se tienen disponibles las muestras presentes en los herbarios.

Con base en las anteriores consideraciones, es necesario determinar cuál de los protocolos de extracción de ADN disponibles permitirá obtener ADN de buena calidad y, así mismo, a extraer una cantidad suficiente de éste a partir de muestras pequeñas con aplicación específica para las orquídeas recolectadas entre los años 1948 y 2011 que se encuentran preservadas en el Herbario “Lorenzo Uribe Uribe, S. J.” de la Pontificia Universidad Javeriana- Bogotá (HPUJ).

4. MARCO TEÓRICO

En plantas frescas, los tejidos meristemáticos son una fuente importante de células vivas y por lo tanto de material genético de alta calidad, libre de químicos e impurezas, susceptible de amplificación por técnica de PCR y secuenciación (Drabkova *et al.*, 2002).

En contraste, los tejidos vegetales provenientes de muestras de herbario, contienen restos de ADN antiguo que ha sufrido degradación *post mortem*, de tal forma que solamente pequeñas cantidades de material genético pueden ser extraídas de dichas muestras y el poco ADN disponible se encuentra eventualmente degradado (Gugerli *et al.*, 2005) con fragmentos no mayores a 500 pares de bases, (Audic, 2002) contaminado con precipitados como polifenoles, terpenoides, taninos, polisacáridos (Huang *et al.*, 2002) y ADN de microorganismos como hongos o bacterias (Deagle *et al.*, 2006).

Un amplio rango de técnicas han sido publicadas a la fecha, buscando aumentar la cantidad de ADN disponible y disminuir los inhibidores de la PCR. Dentro de éstas se encuentran los reconocidos métodos de CTAB (Doyle y Doyle 1987) con modificaciones realizadas por Ristanio & May (2004), Dickson (1987) y el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), aplicados tanto en muestras frescas como en muestras de herbario (Cota *et al.*, 2006).

Con base en el método CTAB, Wittzell (1999) aisló ADN a partir de especies de herbario de *Taraxacum sp. Wigg* (Asteraceae), al igual que Saltonstall (2002, 2003) a partir de especímenes de herbario de *Phragmites australis* (Poaceae). Así mismo, Riahi *et al.*, (2010), aplicaron el método CTAB modificado por Cota *et al.* (2006) a ejemplares pertenecientes a la subfamilia Papilionideae (Fabaceae), colectados entre 1950-2005, logrando obtener productos de PCR hasta de 700 pares de bases (pb). Igualmente Andreasen *et al.*, (2009) extrajeron

ADN de muestras de herbario de *Phaulopsis talbotii*, colectada por Lineo entre los años 1792 y 1796, obteniendo fragmentos amplificados hasta de 800 pb.

Por otra parte, en cuanto al protocolo DNeasy Plant Mini Kit, en un estudio de muestras de herbario de *Juncus* y *Luzula* de la familia Juncaceae (colectados entre 1927 y 1998), Drabkova *et al.* (2002) la ratificaron como una familia óptima para extraer ADN antiguo. De igual forma, Lehtonen & Christenhusz (2010) obtuvieron secuencias amplificadas de 430 pb a partir de especímenes de herbario del género *Lindsaea* (Lindsaeaceae) que tenían entre 4 y 172 años de preservación en las colecciones estudiadas; Por otra parte, recientes estudios en plantas no angiospermas, realizados por De Castro y Menale (2004) usando el protocolo por Ristanio *et al.* (2001), lograron aislar ADN antiguo a partir de muestras de la familia Pinaceae colectadas en 1811 (Lambertini *et al.* 2008); Asimismo, por medio del DNeasy Plant Mini Kit, Korpelainen (2008) extrajo ADN del helecho *Blechnum spicant* (colectado en 1999) y Jankowiak *et al.*, (2005) de briofitas. Walters *et al.*, reportaron fragmentos amplificados mayores a 500 pb a partir de muestras de herbario preservadas por más de 100 años. Además, Telle & Thines (2008) obtuvieron amplificación de 620 pb en muestras colectadas en el año 1878, especificando que los protocolos más eficientes, a partir de los cuales se extrajeron moléculas de ADN de las muestras más antiguas, fueron EriP (Ancient DNA extraction) y AnaP (InnuPREP Plant DNA Kit) en conjunto con las ADN polimerasas MangoTaq[®] y BIOTAQ[®] red. Sin embargo, pocas comparaciones entre los diferentes protocolos han sido realizadas hasta la fecha (Rohland & Hofreiter, 2007).

Actualmente en Colombia no hay estudios de ADN antiguo reportados en la bibliografía y, entre los realizados en otros países en orquídeas, en Italia un grupo de investigación de la Universidad Della Calabria (Cozzolino *et al.*, 2007), logró extraer ADN usando el método CTAB (Doyle & Doyle, 1987) en muestras de herbario de *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) colectadas entre 1832 y 1948.

La familia Orchidaceae es una de la más ampliamente distribuidas a nivel mundial, así como una de las más diversas, con más de 24.000 especies, la mayoría localizadas en el continente Americano (Leopardi, 2010). Dentro de esta familia encontramos el género *Prosthechea* (Higgins 1997), distribuido en Sur y Centro América, el cual se caracteriza por tener lóbulos laterales pocos desarrollados o ausentes, con 1-3 hojas terminales sésiles y callo poco desarrollado y delgado. *Prosthechea grammatoglossa* es una planta epífita con flores de color

crema amarillo-verdoso, perteneciente este género y anteriormente conocida alternativamente como *Encyclia grammatoglossa* (Withner & Harding, 2004). Asimismo, se encuentra el género *Epidendrum*, distribuido por América tropical. Dentro de este se ubica la especie *Epidendrum secundum*, caracterizada por ser una especie epífita o terrestre, de crecimiento monopodial, hojas dísticas, coriáceas o carnosas coriáceas, inflorescencia en racimo terminal con flores moradas o blancas, de menos de 1 cm de diámetro; labelo 3-lobulado y márgenes irregularmente dentado-laciniados (Leopardi, 2010). De igual forma, el género *Oncidium* distribuido por América tropical, desde México hasta Argentina, al cual pertenece la especie *Oncidium ornithorhynchum* caracterizada por ser una planta epífita de los páramos, de los 2600 a los 3340 m de altitud, inflorescencia erecta en forma piramidal, con 90-100 flores y sépalos espatulados. Esta especie de flores amarillas que es común en Colombia, Ecuador y Perú, y por mucho tiempo se conoció como *Oncidium pyramidale* Lindl., y no la especie mexicana de flores color lila, ahora llamada *Oncidium sotoanum*, corrigiendo un error causado por la indicación equivocada que se halla en la publicación de Kunth (Jiménez y Hagsater, 2010).

No hay comparaciones entre los diferentes protocolos de extracción de ADN antiguo específicos para muestras de herbario de orquídeas y son limitados los estudios y revisiones realizados con base en diversos aspectos de éstas, siendo los más comunes sobre fisiología, bioquímica, propagación, botánica, taxonomía, morfología y anatomía, y muy pocos en relación a estudios genéticos o moleculares (Sheehan, 1983).

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Comparar y evaluar 3 protocolos de extracción y amplificación de ADN a partir de exsiccados de orquídeas conservadas en el Herbario “Lorenzo Uribe Uribe, S. J.” de la Universidad Javeriana, recolectadas entre 1948 y 2011.

5.2 ESPECÍFICOS

- Determinar cuál de los 3 protocolos es el óptimo para obtener ADN de buena calidad a partir de exsiccados.

- Identificar el tiempo máximo de preservación en años de las muestras de orquídeas, que permita obtener ADN susceptible de amplificación por PCR.
- Determinar la cantidad de tejido óptima para obtener mayor cantidad de ADN de buena calidad.

6. METODOLOGÍA

6.1 Selección de material vegetal:

El ADN se extrajo a partir de 7 muestras secas (pétalos, hojas y tallo) pertenecientes a 3 especies de orquídeas, preservadas en el Herbario “Lorenzo Uribe Uribe, S. J.”, de la Pontificia Universidad Javeriana (HPUJ). De éstas, 3 especímenes son de *Epidendrum secundum* colectados en los años 1948, 1968 y 2011; 3 ejemplares de *Oncidium ornithorhynchum* colectados en los años 1968, 1975 y 2 especímenes de *Prosthechea grammatoglossa* colectados en los años 1949 y 2011. La razón por la cual se escogieron estas especies, fue porque son las muestras de orquídeas más antiguas colectadas y preservadas en el HPUJ. Se seleccionaron tres muestras por cada individuo recolectadas en diferentes fechas y se realizó una comparación retrospectiva de la calidad y cantidad de ADN obtenido con los diferentes protocolos evaluados. La información de los exsiccados se presenta a continuación:

***Epidendrum secundum* Jacq:** Diversos colores según las tierras o las variedades de las especies; Colectada en Villa blanca (Sasaima, Cundinamarca), a una altura de 1400 m, por Carlos Ortiz, S.J., el 17 de octubre de 1948; Determinada por Lorenzo Uribe U. HPUJ 005828



Figura 1. Inflorescencia en racimo terminal exsiccado de *Epidendrum secundum* (1948)



Figura 2. Vista general del *Epidendrum secundum* (1948)

***Epidendrum secundum* Jacq:** Flores de color lila; colectada en la vereda Vancouver (Santandercito, Cundinamarca), a 1900 m de altura, por Pedro Ortiz, S.J., el 3 de febrero de 1968. No. 4004



Figura 3. Inflorescencia en racimo terminal
De *Epidendrum secundum* (1968)



Figura 4. Vista general del exsicado
Epidendrum secundum (1968)

***Oncidium ornithorhynchum* H.B.K:** Epifita de flores amarillas con manchas pardas claras; colectada en la Hacienda la Esmeralda (Madrid, Cundinamarca), a 2650 m de altura, por Sergio Restrepo, S.J., el 30 de mayo de 1968.



Figura 5. Inflorescencia piramidal de
Oncidium ornithorhynchum (1968)



Figura 6. Vista general del exsicado
Oncidium ornithorhynchum (1968)

***Oncidium ornithorhynchum* H.B.K:** Flores amarillas con manchas marrones; Colectada en “La Rusia” (Duitama, Boyacá), a 2870 m de altura, por Pedro Ortiz, S.J., en junio de 1975. No. 4311



Figura 7. Inflorescencia piramidal de *Oncidium ornithorhynchum* (1975)



Figura 8. Hoja y raíz *Oncidium ornithorhynchum* (1975)

***Prosthechea grammatoglossa* (R.chib.F) W. E. Higgins:** Flores amarillas; Colectada en “La Rambla” (Santandercito, Cundinamarca), a 2000 m de altura, por Hernando Silva el 13 de enero de 1949.



Figura 9. Inflorescencia en racimo de *Prosthechea grammatoglossa*(1949)



Figura 10.Vista general del exsicado *Prosthechea grammatoglossa* (1949)

La extracción del ADN se realizó en el laboratorio de ADN arcaico del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, de acuerdo con las metodologías descritas en los siguientes 3 protocolos: Quintanilla *et al.* (2010), Cota *et al.* (2006) y Jobes *et al.* (1995).

Se trabajó con diferentes cantidades de tejido de cada una de las 8 muestras, 5 mg y 2 mg siendo esta última la menor cantidad a partir de la cual se ha logrado extraer ADN (Telle & Thines, 2008). Las muestras pesadas, correspondían a la homogenización de submuestras de diferentes tejidos de la planta (Pétalo, tallo, hojas), debido a la poca cantidad de material disponible. Todos los protocolos fueron evaluados teniendo en cuenta las instrucciones dadas por los autores.



Figura 11. 2 mg de *E. secundum*



Figura 12. 5 mg de *E. secundum*

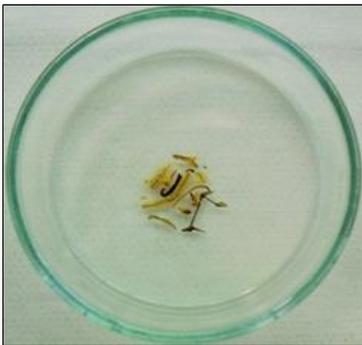


Figura 13. 2 mg de *O. ornithorhynchum*



Figura 14. 5 mg de *O. ornithorhynchum*



Figura 15. 2 mg de *P. grammatoglossa*



Figura 16. 5 mg de *P. grammatoglossa*



Figura 17. Tejido pulverizado

6.2 PRE-EXTRACCIÓN DEL ADN

1. Lavar las cajas de Petri con agua destilada, hipoclorito de sodio y etanol absoluto antes de su uso.
2. Pesar 2mg (Figura 11) y 5 mg (Figura 12) de tejido de cada una de las 7 muestras y ubicarlos en las cajas de Petri.
3. Cortar y pulverizar las muestras por medio de una cuchilla quirúrgica (Figura 17).
4. Repetir el procedimiento para cada una de las muestras.

6.3 EXTRACCIÓN DE ADN

6.3.1 Protocolo 1: Quintanilla *et al.*, (2010)

Soluciones:

- Buffer CTAB: 2x CATB (50 mL de tris-HCL pH8.0 140 mL de 5 M NaCl, 50 mL de 0,25 M EDTA pH 8.0 10 g de CTAB, 500mL de agua destilada).
- Buffer TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, pH 8.0.
- 2-mercaptoetanol.
- Cloroformo: alcohol isoamílico.
- Isopropanol.
- Acetato de amonio 7,5 M pH7.5
- Etanol al 70% y 99%.

Procedimiento de extracción de ADN

1. Ubicar el tejido macerado en un tubo eppendorf de 1.5 µl.
2. Agregar 498µl de buffer CTAB y 2,5µl de β-mercaptoetanol.
3. Vortex por 1 minuto.
4. Incubar durante 2 horas a 60°C (vortex cada 30 minutos).
5. Al finalizar las 2 horas, dar vortex final durante 20 segundos.
6. Centrifugar a 5000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.
7. Pasar el sobrenadante en otro tubo eppendorf y agregar 700µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Revolver fuertemente de forma manual.
8. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos.
9. Pasar el sobrenadante en otro tubo eppendorf y agregar 700µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Revolver fuertemente de forma manual.
10. Centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos.
11. Determinar la cantidad de µl de sobrenadante y agregar acetato de amonio (a 500µl de sobrenadante, se agrega 40µl de acetato de amonio) e isopropanol frio (a 500µl de sobrenadante se agrega 291µl de isopropanol).
12. Dejar por una noche a -20°C.
13. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos.
14. Descartar sobrenadante y agregar 1mL de etanol al 70%, revolver.
15. Centrifugar a 10.000 rpm durante 3 minutos.

16. Agregar 1mL de etanol al 70%, revolver.
17. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.
18. Agregar 1 mL de etanol absoluto (99%).
19. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.
20. Agregar 1 mL de etanol absoluto (99%).
21. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.
22. Descartar sobrenadante y dejar secar el pellet.
23. Resuspender pellet en 100µl de buffer TE.

6.3.2 Protocolo 2: Cota *et al.*, (2006) (Modificado)

Soluciones:

- Buffer CTAB: 2x CATB (50 mL de tris-HCL pH8, 140 mL de 5 M NaCl, 50 mL de 0,25 M EDTA pH 8, 10 g de CTAB, 500mL de agua destilada).
- Buffer TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 7.5, o8.0, 1mM EDTA, pH 8.0
- 2-mercaptoetanol.
- Cloroformo: alcohol isoamílico.
- Isopropanol.
- Acetato de sodio (NaOAc) 2,5 M
- Etanol al 70% y 99%.

Procedimiento de extracción de ADN

1. Ubicar el tejido macerado en un tubo eppendorf de 1.5 µl.
2. Agregar 750 µl de 2× CTAB buffer y 3.0 µl de 2-mercaptoethanol.
3. Incubar a 55-60°C durante 1 hora (vortex cada 15 minutos).
4. Agregar 700 µl de Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar fuertemente.
5. Centrifugar a 9.240 rcf durante 10 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
7. Agregar 0.33 vol de isopropanol frío e incubar a -20°C por una noche.
8. Centrifugar a 9.300 rcf durante 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
10. Resuspender pellet en 100 µl de Buffer TE.
11. Agregar 16,7 µl de 2.5 M NaOAc y 500 µl de etanol absoluto.
12. Incubar a -20°C por una noche.

13. Centrifugar a 9.300 rcf durante 5 minutos.
14. Descartar sobrenadante.
15. Lavar pellet con 1 mL de etanol al 70%.
16. Centrifugar a 9.300 rcf durante 4 minutos.
17. Descartar el sobrenadante y dejar secar pellet.
18. Resuspender pellet en 100 μ l de Buffer TE.

6.3.3 Protocolo 3: Jobes *et al.*, (1995) (Modificado)

Soluciones

- Buffer de extracción: 100 mM de acetato de sodio pH 4.8; 100 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM cloruro de sodio; 10 mM DTT (de la solución stock 1 M); 2 % (p/v) PVP pH 5.5; Agregar proteinasa K, 12.500 μ l/mL antes de usar).
- Buffer TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 7.5, or 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0
- 20 % (p/v) sodium dodecyl sulfate (SDS).
- 1 M dithiothreitol (DTT).
- Acetato de sodio (NaOAc) 2,5 M
- 5 M NaCl.
- Isopropanol.
- Etanol al 70%.

Procedimiento de extracción de ADN

1. Agregar 1mL de buffer de extracción precalentado, sin SDS al 1.5%.
2. Mezclar e incubar a 55°C por 1 hora.
3. Agregar 150 μ l de SDS al 1.5% (a temperatura ambiente) e incubar por a 55°C por 2 horas.
4. Centrifugar a 10.000 rcf durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar 0.33 vol de acetato de sodio 3M pH 5,4 e incubar a -20°C por 30 minutos.
6. Centrifugar a 10.000 rcf durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Agregar 0.6 vol de isopropanol. Mezclar manualmente e incubar a -20°C por 30 minutos.
8. Centrifugar a 10.000 rcf durante 10 minutos y cuidadosamente descartar el sobrenadante.
9. Disolver el pellet en 500 μ l de agua destilada desionizada.

10. Agregar 0.5 vol de 5 M cloruro de sodio y 2 vol de etanol frio al 95 % e incubar a -20°C por 30 minutos.
11. Centrifugar a 10.000 rcf durante 10 minutos.
12. Disolver el pellet en 500 µl agua destilada desionizada.
13. Agregar 2 µl de 10mg/ml RNasa mezclar bien e incubar a 37°C por 30 minutos.
14. Agregar 700 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclar muy bien.
15. Centrifugar a 10.000 rcf durante 10 minutos.
16. Agregar 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
17. Centrifugar a 10000 rcf durante 10 minutos.
18. Agregar 0.6 vol de isopropanol e incubar a -20°C durante toda la noche
19. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 minutos.
20. Agregar 1 mL de etanol al 70%.
21. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
22. Descartar sobrenadante y dejar secar el pellet.
23. Resuspender el pellet en 100 µl de buffer TE.

6.4 ESPECTOFOTOMETRIA

La calidad del ADN se determinó por medio de la relación 260/280 (absorbancia), usando NanoDrop® 2000.

6.5 AMPLIFICACIÓN (PCR) Y SECUENCIACIÓN

El primer a usar se determinó al realizar dos ensayos de PCR, el primero con el primer 19 forward otra con el primer 163 forward. Estos fueron evaluados solo en el ADN extraído con el protocolo propuesto por Cota *et al.* de la especie *Oncidium ornithorhynchum* del año 1968, la cual fue escogida al azar; Acto seguido, se corroboró la eficiencia de los primers al realizar una nested PCR.

Se amplificó la región de 640 pb correspondiente al gen *matK*. Se utilizaron los primers 19Forward (3'-CGTTCTGACCATATTGCACTATG-5') y 556Reverse (3'-GAAGAAACATCTTTGGATCCA-5'), empleados previamente con éxito por el grupo del Instituto de Genética Humana en la caracterización de diferentes géneros de orquídeas a partir de material fresco.

Las reacciones de PCR contenían 6µl Buffer de PCR (5x), 3 µl de cada primer (10mM), 0,9 µl de MgCl (2,5mM), 0,6 µl de DNTPs (200 µM), 0,3 µl de DNA *taq* polimerasa (1,25 unidades) (Fermentas) y 14,4 µl de Agua estéril, para completar un volumen de 30 µl por cada reacción. Los ciclos de PCR fueron los siguientes: 3 min a 95°C de denaturación inicial; 39 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 50,4°C, 48 s a 72°C; y una extensión final de 5 min a 72°C. Posterior a la amplificación, la concentración del ADN se determinó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%, Buffer TBE a 1x, 7µl de producto de PCR y se verificó su peso con un marcador molecular Hypperlader (Bioline) que abarca desde 50pb hasta 2Kb.

Posteriormente los productos de PCR correspondientes a las especies *Epidendrum secundum* (2011) (Cota *et al.* 2mg), *Oncidium ornithorhynchum* (1975) y (1986) *Epidendrum secundum* (1948) (2011), *Prostechea grammatoglossa* (2011) (Quintanilla *et al.* y 2mg) y el control positivo utilizado en las PCR correspondiente a *Epidendrum secundum* (2011), fueron enviados a secuenciación por medio de Macrogen Inc, a través de un convenio de servicios externos. Las secuencias se analizaron manualmente por medio de los programas Chromas lite y Bioedit. Posteriormente en conjunto con otras 5 secuencias reportadas en GenBank, correspondientes a las especies *Oncidium ornithorhynchum* (Número de acceso: H02192561, AF350645.1, AF239496.1); *Oncidium unguiculatum* (FJ563968.1) *Oncidium incurvum* (FJ565110.1) y *Peristeria elata* (AF239442.1), se realizó un filograma de distancias genéticas con el método de agrupamiento neighbor-joining.

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una estadística descriptiva, categorizando los resultados en diferentes índices. De tal forma, que en cuanto a la concentración de ADN los valores se encuentran menor 10 ng, entre 11ng -30 ng y entre 31-86 ng; en cuanto a las relaciones 260/280 y 260/230 los índices son menores a 1.8, entre 1.8 – 2.2 y mayores a 2.2.

7. RESULTADOS

Se realizó una estadística descriptiva, categorizando los resultados en diferentes índices. De tal forma, que en cuanto a la concentración de ADN valores menores a 10 ng (indican

extracción baja, protocolo ineficiente; cantidad de tejido insuficiente), valores entre 11ng -30 ng (extracción media protocolo medio eficiente) y 31-86 ng (extracción óptima, protocolo muy eficiente, cantidad de tejido suficiente); en cuanto a las relaciones 260/280 y 260/230 los índices son menores a 1.8 (indica mala calidad, contaminación con proteínas), entre 1.8 – 2.2 (Buena calidad, libre de impurezas) y cuando los datos son mayores a 2.2 (mala calidad, contaminado con ARN, polifenoles y polisacaridos).

No se observó amplificación con el primer 163F, a diferencia del primer 19 F con el cual a pesar de no obtener una banda muy definida se evidenció amplificación; Posteriormente al realizar la Nested PCR, se determinó que el primer 19F era el correcto para usar (Figura 18).

La amplificación correspondiente a las especies *Prosthechea grammatoglossa* (1949), *Oncidium ornithorhynchum* (1975), *Oncidium ornithorhynchum* (1968), *Epidendrum secundum* (1948), *Epidendrum secundum* (2011) y *Prosthechea grammatoglossa* (2011), extraídas con el protocolo Quintanilla *et al.* utilizando la cantidad correspondiente a 2 mg de tejido fue exitosa, demostrando que fue el protocolo más efectivo (Figura 19). De igual forma, las concentraciones de ADN son notoriamente más altas respecto a los otros dos métodos, se observa que con la cantidad de 2 mg las concentraciones de ADN son menores 30 ng, indicando que este protocolo con esa determinada cantidad de tejido, tuvo una eficiencia intermedia y baja en la extracción de las especies. Respecto a la relación 260/280 se observan datos que se ubican entre la categoría óptima de 1.8-2.2, que corresponde a buena calidad del ADN a diferencia de 3 especies cuyos valores son mayores 2.2, deduciendo contaminación por ARN. Adicional, la relación 260/230 también es variable, ya que 3 especies tiene datos menores a 1.8 (contaminación con proteínas) solo 2 especies se encuentran entre el rango óptimo y las 2 restantes presentan valores mayores a 2.2. En cuanto a la cantidad 5mg de tejido, nuevamente se evidenció una clara amplificación de las especies *Prosthechea grammatoglossa* (1949), *Oncidium ornithorhynchum* (1975), *Oncidium ornithorhynchum* (1968), *Epidendrum secundum* (1948), *Epidendrum secundum* (2011) y *Prosthechea grammatoglossa* (2011) (figura 20). Se evidenció que la mayoría de las especies, específicamente *Prosthechea grammatoglossa* (1949), *Oncidium ornithorhynchum* (1975), *Epidendrum secundum* (1968), *Prosthechea grammatoglossa* (2011), *Epidendrum secundum* (2011) presentan valores de concentración de ADN entre 31ng – 86ng, indicando que la cantidad de tejido fue suficiente para obtener alta cantidad de ADN. En cuanto la relación 260/280 se identificó que la mayoría de los valores se encuentran en el rango óptimo de 1.8-

2.2, en contraste 3 especies tiene datos menores a 1.8 indicando contaminación con proteínas (Tabla 1). Aunque no todas las especies se encontraron en las categorías óptimas, en comparación a los otros dos protocolos estudiados, Quintanilla *et al.* obtuvo los resultados más óptimos, por lo tanto se considera como el protocolo más eficiente.

Siguiendo con el protocolo Cota *et al.* con 2 mg de muestra, se evidenció únicamente amplificación de las especies con menor tiempo de preservación, *Prosthechea grammatoglossa* (2011) y *Epidendrum secundum* (2011) sin obtener banda en ninguna de las 5 especies restantes y con mayor tiempo de colecta (Figura 19). En general, los valores de las relaciones 260/280 y 260/230 son menores a 1,8 indicando ADN de mala calidad contaminado con proteínas. En cuanto a la concentración de ADN se observa que la mayoría de los valores son menores a 30 ng, indicando poca y media concentración de ADN. Continuando con este mismo protocolo, pero con una cantidad de 5mg, se reconoce que únicamente las especies *Oncidium ornithorhynchum* (1975) y *Prosthechea grammatoglossa* (2011) amplificaron pero las bandas en el gel son muy débiles (Figura 20). En general, se observó que en la relación 260/280 algunos datos están entre el rango óptimo 1.8- 2.2 indicando ADN de buena calidad, a diferencia de los valores correspondientes a la relación 230/260 donde todos son menores a 1.8 (ADN de mala calidad, contaminado con proteínas). En cuanto a la concentración de ADN, se observa que la cantidad de todas las especies a excepción de *Oncidium ornithorhynchum* (1975), es menor 10 ng, indicando baja concentración de ADN (Tabla 2). Con base en lo anterior, se puede decir que este protocolo es poco eficiente debido a la poca cantidad de ADN obtenido y al usar 2mg o 5mg se obtienen resultados parecidos.

Por ultimo, no se observó ninguna amplificación del ADN extraído de las 7 especies estudiadas utilizando el protocolo Jobes *et al.* tanto en 2 mg como 5 mg de tejido indicando ser el protocolo menos eficiente (Figuras 19 y 20, respectivamente). En general la concentración de ADN de las muestras es menor a 10ng, demostrando ser baja cantidad de ADN. De igual forma, las concentraciones de ADN son las más bajas respecto a los otros protocolos. En general, los valores de las relaciones 260/280 y 260/230 son muy bajos, la mayoría menores a 1.8 indicando mala calidad y contaminación con proteínas (Tabla 3).

Respecto a la secuenciación, se observa que las secuencias correspondientes a la especie *Epidendrum secundum* (2011) del protocolo Quintanilla *et al.* *Epidendrum secundum* (2011)

(C+, a partir de 450 mg de tejido) fueron las más legibles con picos más definidos que indican un nucleótido específico (Figuras 23 y 25), a diferencia de esta misma con más tiempo de colecta (1948) y *Epidendrum secundum* (2011) extraída con el protocolo Cota *et al.* cuyas secuencias eran de una muy baja calidad y poco legibles, especialmente la colectada en 1948 (Figuras 24 y 22). Las secuencias correspondientes a la especie *Oncidium ornithorhynchum* a pesar de no ser muy legibles son muy parecidas entre sí (Figuras 26 y 27) y también concuerdan con la secuencia anteriormente reportada por Quintanilla *et al.* en el año 2010 (Figura 28).

Cabe anotar, que las secuencias correspondientes a la especie *Oncidium ornithorhynchum* extraídas en este estudio y publicada anteriormente en Genbank, (H02192561, AF350645.1, AF239496.1) son genéticamente cercanas (Figura 21).

Tabla 1. Datos correspondientes a la concentración de ADN total y relaciones 260/280, 260/230 en muestras extraídas utilizando el protocolo Quintanilla *et al.* (2010).

Muestra	Cantidad (mg)	Concentración de ADN (ng/μl)	260/280	260/230
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (1949)	2	32,5	2,04	1,17
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1975)		28,7	1,98	1,8
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1968)		5,3	2,42	2,01
<i>Epidendrum secundum</i> (1968)		15,1	1,99	1,63
<i>Epidendrum secundum</i> (1948)		6,7	2,67	1,53
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (2011)		4,6	3,54	3,86
<i>Epidendrum secundum</i> (2011)		7,4	2,22	2,62
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (1949)	5	75,8	1,52	0,77
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1975)		85,6	1,66	0,72
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1968)		-2,9	1,51	-0,14
<i>Epidendrum secundum</i> (1968)		57,2	1,91	1,01
<i>Epidendrum secundum</i> (1948)		28	2,02	1,68
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (2011)		53,3	2,03	1,19
<i>Epidendrum secundum</i> (2011)		57	1,99	1,19

Tabla 2. Datos correspondientes a la concentración de ADN total y relaciones 260/280, 260/230 en muestras extraídas utilizando el protocolo Cota *et al.* (2006).

Muestra	Cantidad (mg)	Concentración de ADN (ng/μl)	260/280	260/230
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (1949)	2	2,7	1,03	0,3
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1975)		4,2	1,32	0,45
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1968)		14,9	1,43	0,38
<i>Epidendrum secundum</i> (1968)		18,7	1,33	0,71
<i>Epidendrum secundum</i> (1948)		11,5	1,17	0,46
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (2011)		0,6	0,81	0,13
<i>Epidendrum secundum</i> (2011)		13,7	0,99	0,51
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (1949)	5	0,8	1,83	0,41
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1975)		25,4	1,83	1,28
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1968)		-0,1	0,22	0,25
<i>Epidendrum secundum</i> (1968)		8	1,96	0,71
<i>Epidendrum secundum</i> (1948)		1,2	1,68	0,27
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (2011)		-1,2	0,9	1,06
<i>Epidendrum secundum</i> (2011)		-0,6	1,14	0,64

Tabla 3. Datos correspondientes a la concentración de ADN total y relaciones 260/280, 260/230 en muestras extraídas utilizando el protocolo Jobes *et al.* (1995).

Muestra	Cantidad (mg)	Concentración de ADN (ng/μl)	260/280	260/230
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (1949)	2	0,9	0,51	0,05
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1975)		-0,5	1,11	-1,24
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1968)		3,3	1,23	0,23
<i>Epidendrum secundum</i> (1968)		16,9	1,17	0,32
<i>Epidendrum secundum</i> (1948)		0,9	0,4	0,07
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (2011)		-1	0,85	0,91
<i>Epidendrum secundum</i> (2011)		-0,2	1,81	0,56
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (1949)	5	1,1	0,41	0,05
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1975)		6,2	0,78	0,1
<i>Oncidium ornithorhynchum</i> (1968)		5,4	0,85	0,12
<i>Epidendrum secundum</i> (1968)		0,8	0,66	0,05
<i>Epidendrum secundum</i> (1948)		-0,8	0,91	1,02
<i>Prosthechea grammatoglossa</i> (2011)		2	6,64	0,02
<i>Epidendrum secundum</i> (2011)		-0,4	0,56	-0,34

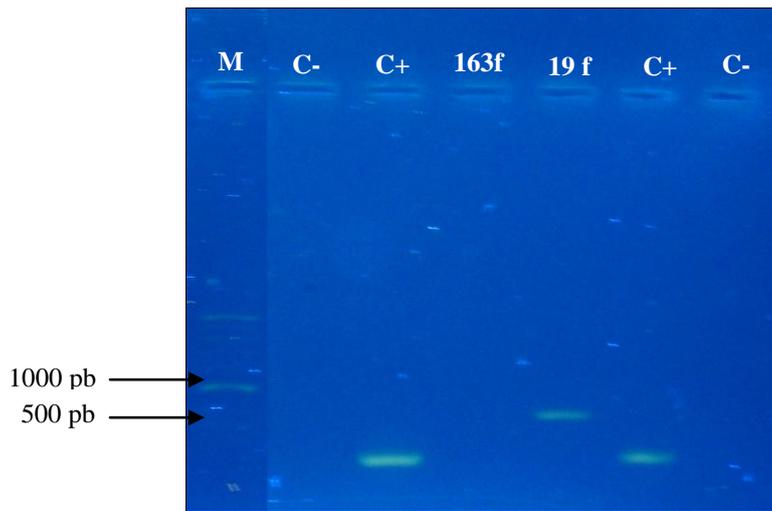


Figura 18. Productos de PCR utilizando los primers 19F y 156F, evaluados en el ADN extraído de la especie *Oncidium ornithorhynchum* (1968). M (marcador molecular); C- (control negativo) y C+ (control positivo)

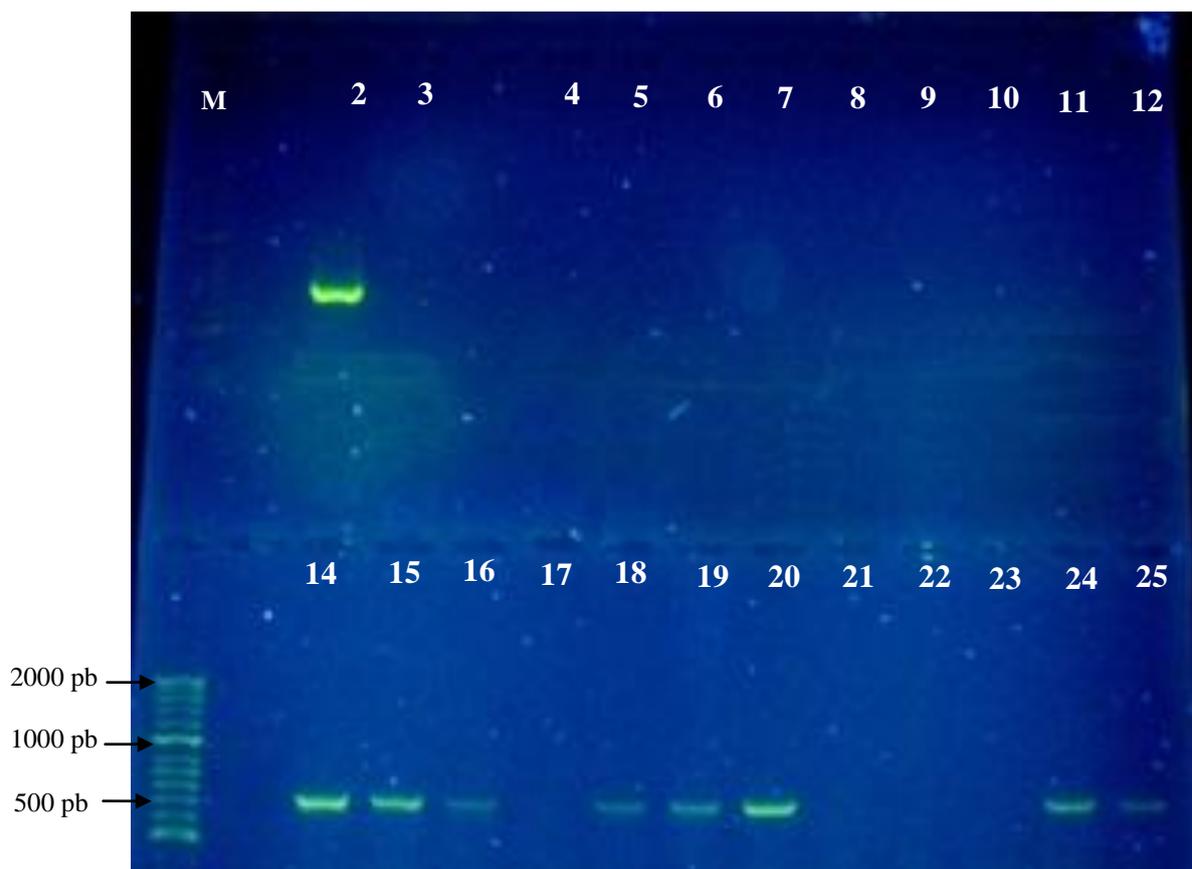


Figura 19. Productos de PCR de las muestras correspondientes a 2mg. Línea 2, C+ (control positivo); Línea 3, C- (Control negativo); Líneas 4-10, protocolo Jobes *et al.*; Líneas 14-20, protocolo Quintanilla *et al.*; Líneas 11,12,21-25: protocolo Cota-Sánchez *et al.*; Líneas 4, 11 y

14, *Prosthechea grammatoglossa* (1949); Líneas 5, 12 y 15, *Oncidium ornithorhynchum* (1975); Líneas 6, 16 y 21, *Oncidium ornithorhynchum* (1968); Líneas 7, 17 y 22, *Epidendrum secundum* (1968); Líneas 8, 18 y 23, *Epidendrum secundum* (1948); Líneas 9, 19 y 24, *Prosthechea grammatoglossa* (2011); Líneas 10, 20 y 25, *Epidendrum secundum* (2011). M (marcador molecular).

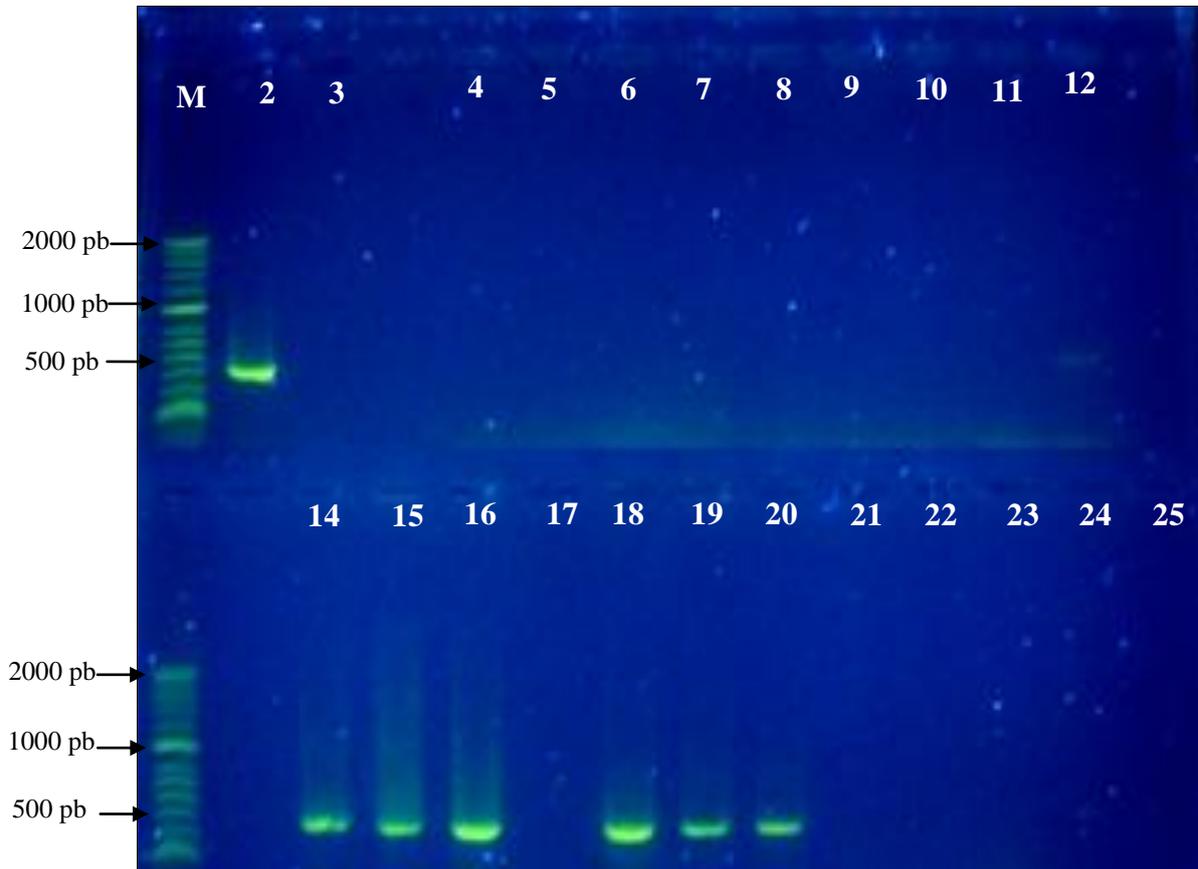


Figura 20. Productos de PCR de las muestras correspondientes a 5mg. Línea 2, C+ (control positivo); Línea 3, C- (control negativo); Líneas 4-10, protocolo Jobes *et al.*; Líneas 14-20, protocolo Quintanilla *et al.*; Líneas 11,12,21-25: protocolo Cota-Sánchez *et al.*; Líneas 4, 11 y 14, *Prosthechea grammatoglossa* (1949); Líneas 5, 12 y 15, *Oncidium ornithorhynchum* (1975); Líneas 6, 16 y 21, *Oncidium ornithorhynchum* (1968); Líneas 7, 17 y 22, *Epidendrum secundum* (1968); Líneas 8, 18 y 23, *Epidendrum secundum* (1948); Líneas 9, 19 y 24, *Prosthechea grammatoglossa* (2011); Líneas 10, 20 y 25, *Epidendrum secundum* (2011). M (marcador molecular).

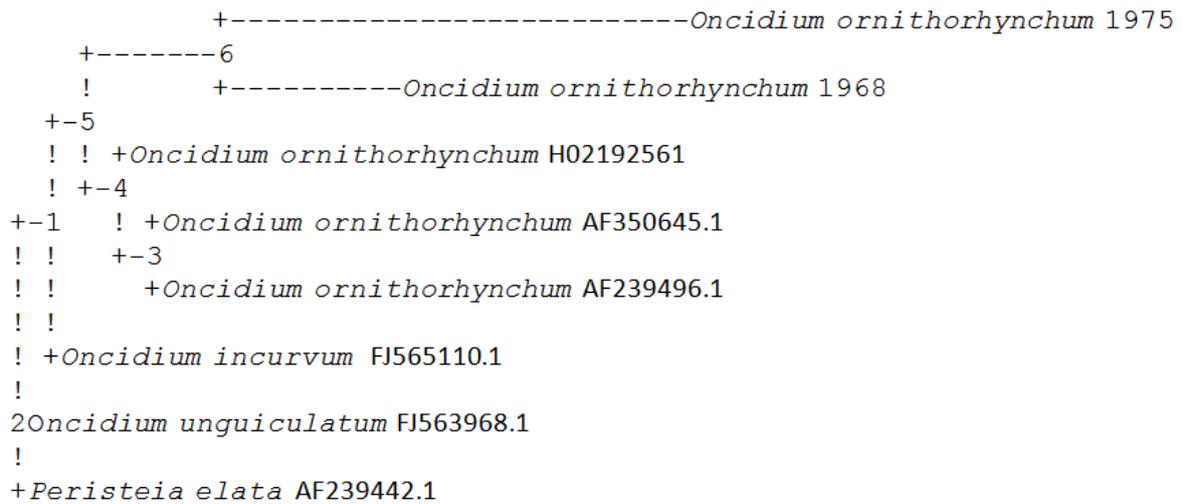


Figura 21. Filograma de distancias genéticas por agrupamiento Neighbor-joining, de 7 especies estudiadas, más 6 secuencias reportadas anteriormente correspondientes a *Oncidium ornithorhynchum* (H0219246.1, AF350645.1, AF239496.1), *Oncidium unguiculatum* (FJ563968.1), *Oncidium incurvum* (FJ565110.1) y *Peristeri elata* (AF239442.1). Q (Quintanilla *et al.* 2010) C (Cota *et al.* 2006).

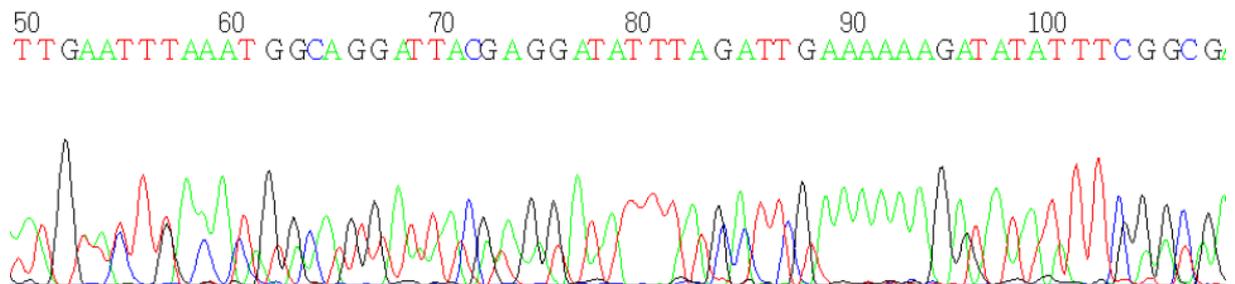


Figura 22. Parte de la secuenciación del gen *matK* de la especie *Epidendrum secundum* 2011 (Cota *et al.*).

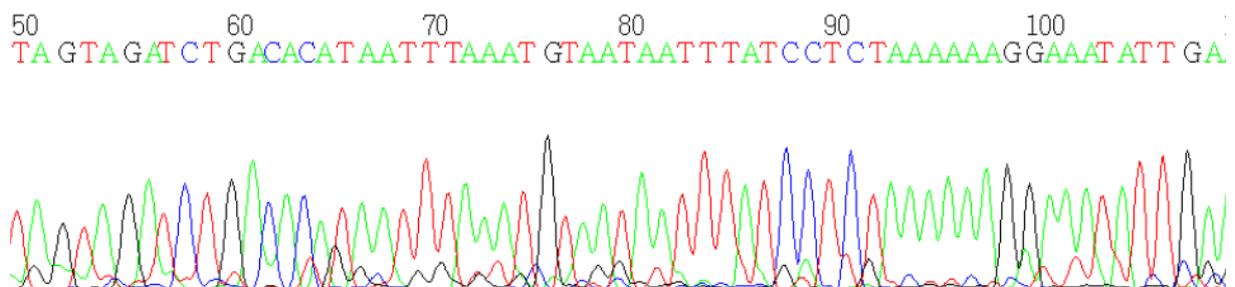


Figura 23 Parte de la secuenciación del gen *matK* de la especie *Epidendrum secundum* 2011 C+ (450 mg de tejido).

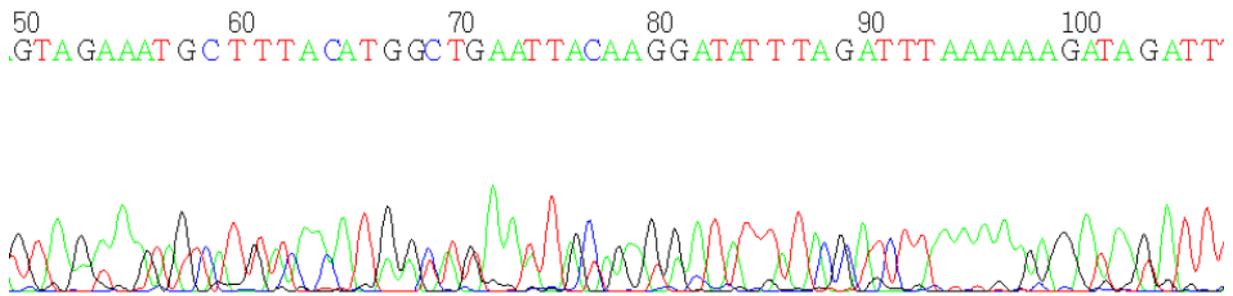


Figura 24. Parte de la secuenciación del gen *matK* de la especie *Epidendrum secundum* 1948 (Quintanilla *et al.*).

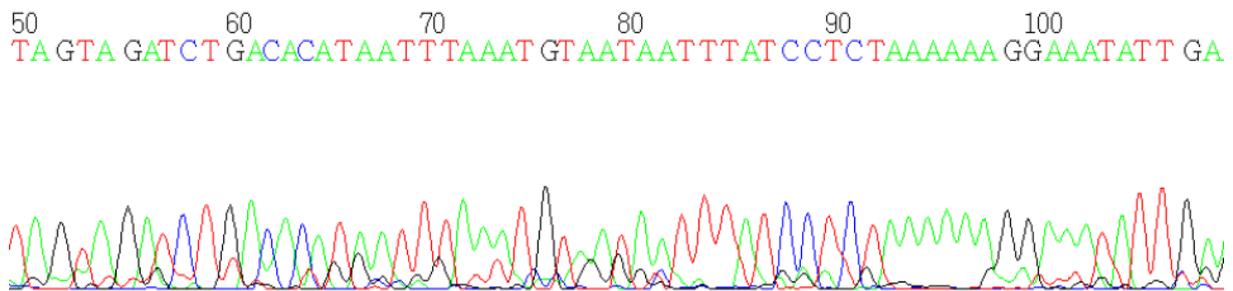


Figura 25. Parte de la secuenciación del gen *matK* de la especie *Epidendrum secundum* 2011 (Quintanilla *et al.*).

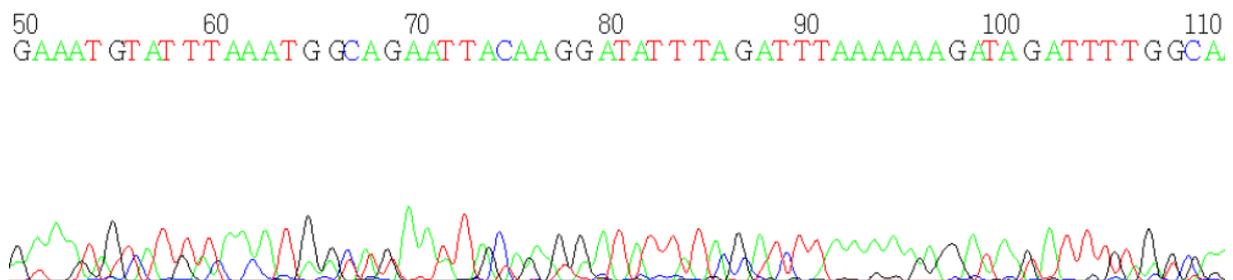


Figura 26. Parte de la secuenciación del gen *matK* de la especie *Oncidium ornithorhynchum* 1975 (Quintanilla *et al.*).

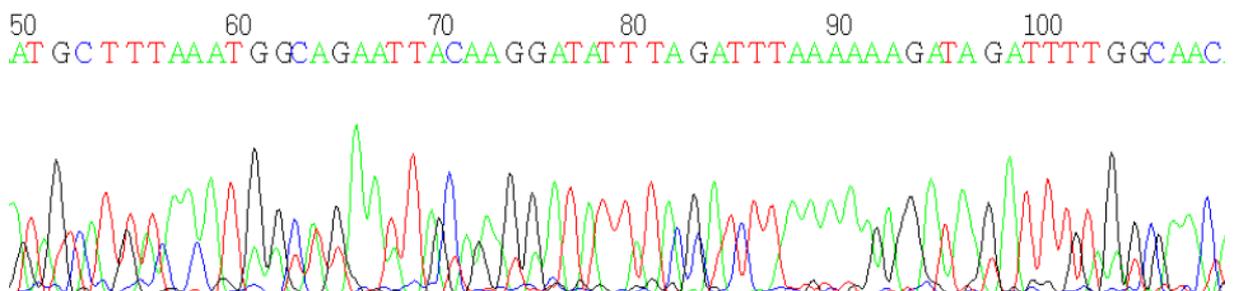


Figura 27. Parte de la secuenciación del gen *matK* de la especie *Oncidium ornithorhynchum* 1968 (Quintanilla *et al.*).

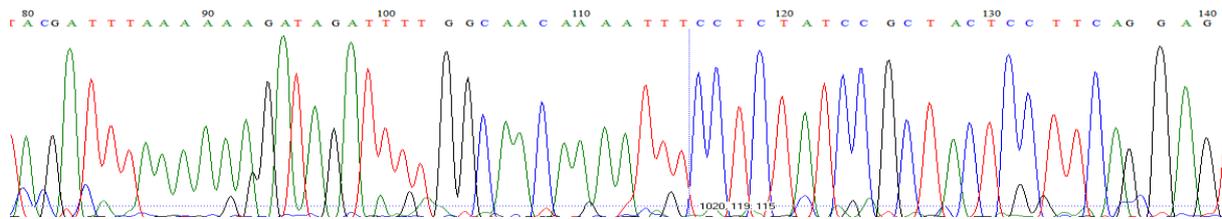


Figura 28. Parte de la secuenciación del gen *matK* de la especie *Oncidium ornithorhynchum*, reportada anteriormente por Quintanilla *et al.* (H02192561)

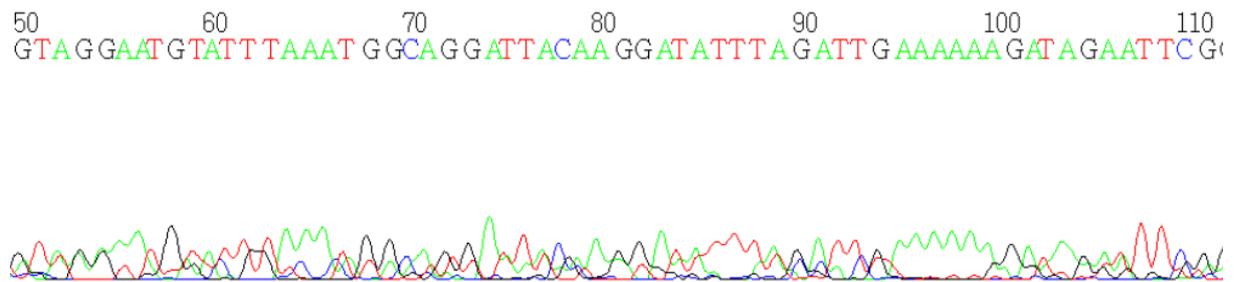


Figura 39. Parte de la secuenciación del gen *matK* de la especie *Prostachea grammatoglossa* 2011 (Quintanilla *et al.*).

8. DISCUSIÓN

A pesar del éxito obtenido en extracción de ADN a partir de fósiles animales, todavía se considera un reto importante el obtener ADN a partir de exsicados de herbario con un determinado tiempo de preservación (Thine y Telle, 2008). Factores como el secado al horno y las condiciones de almacenamiento a las que son sometidos estos especímenes, afecta negativamente la preservación del ADN, favoreciendo su degradación. Pero a medida que los exsicados de herbario son vistos como un recurso inestimable para el estudio de la genética, algunos estudios comparativos han profundizado en la extracción de ADN antiguo a partir de muestras de herbario (Thine y Telle, 2008), siendo los mayores objetivos el aumento de la concentración del ADN, la eliminación de los inhibidores de PCR y la disminución por posible contaminación con ADN foráneo (Yang *et al.*, 1997).

Antes de la extracción del ADN, pasos importantes deben ser tomados en cuenta. Estos involucran la lisis de membranas y paredes celulares con el fin de tener fácil acceso al ADN, por lo tanto entre más fino y pequeño este el tejido vegetal, mayor será la cantidad de ADN que se obtendrá. (Cattaneo, 2006). Diversos métodos para la pulverización del tejido han sido estudiados, dentro de estos encontramos el empleo de equipos, como Bio 101 FastPrep FP120

(Erickson *et al.*, 2005) o sustancias como nitrógeno líquido (Dravkova *et al.*, 2002), estos han demostrado ser muy buenas opciones para pulverizar el tejido, sin embargo no todos los laboratorios están dotados con estos equipos o reactivos, por lo tanto, en este estudio se realizó esta pulverización de una forma simple y manual, usando un caja de Petri y una cuchilla quirúrgica, con la cual, a pesar de requerir mucho tiempo y ser tediosa, se logró extraer y amplificar el ADN de las especies estudiadas.

Debido a la limitada cantidad de ácidos nucleicos preservados en los especímenes de herbario, es complicado obtener la mayor cantidad de moléculas en los primeros pasos de la extracción (Yang *et al.*, 1997). Además, la mayoría de células contienen grandes cantidades de compuestos que posiblemente interfieren con la calidad del ADN extraído, disminuyendo su solubilidad y el acceso de polimerasas o enzimas de restricción a dicho ADN. Los contaminantes principales son compuestos fenólicos, polisacáridos, carbohidratos, proteínas entre otros (Mittmann *et al.*, 2007).

Por esta razón, un buffer de lisis adecuado, es clave para la mayor obtención de moléculas de ADN (Yang *et al.*, 1997). El uso del protocolo de extracción CTAB fue diseñado como un método eficiente y económico para evitar contaminación con polisacáridos y minimizar el uso de otras sustancias como SDS (Cubero *et al.*, 1998). Este método, fue evaluado en los protocolos propuestos por Quintanilla *et al.*, (2010) y Cota *et al.*, (2006) en conjunto con el uso del reactivo B-mercaptoetanol (ME), el cual es un agente reductor que bloquea la acción de los fenoles, estos últimos corresponden a sustancias que son oxidadas después de la ruptura de la pared celular, que tienden a unirse y coprecipitarse con el ADN, de tal forma que se observa un pellet de color marrón y consistencia viscosa (Mittmann *et al.*, 2007). Murray y Thompson proponen que mayores concentraciones de ME (1%) son más eficientes al momento de reducir la oxidación. Estos dos protocolos en comparación al propuesto por Jobes *et al.* donde se utilizó otro tipo de buffer, dieron resultados más óptimos y mayor número de muestras amplificadas. Aunque entre el protocolo Quintanilla *et al.* y Cota *et al.* se utilizó la misma concentración de ME, se observa una marcada diferencia entre la eficiencia de los dos, siendo mucho mejor el protocolo Quintanilla *et al.*

En contraste, el Buffer evaluado en el protocolo propuesto por Jobes *et al.* está compuesto por Dodecilsulfato de sodio (SDS), Polivinilpirrolidona (PVP), Ditiotreititol (DTT) y proteinasa K (PK). El PVP y DTT son adicionados con el propósito de absorber poli fenoles, los cuales

tienden a coprecipitarse junto al ADN en presencia de etanol inhibiendo las reacciones enzimáticas siguientes (Mittmann *et al.*, 2007). El incremento de la concentración de sal ayuda a mantener los polisacáridos en solución durante la precipitación mientras que el PVP remueve los poli fenoles de la solución (Ivanova *et al.*, 2008). Una ventaja de usar estos reactivos en vez del ME es que este último es muy tóxico y perjudicial para el investigador, además de tener un olor muy fuerte, penetrante y desagradable (Mittmann *et al.*, 2007); A pesar de esto, se evidencia que el uso de B-mercaptoetanol en el buffer de lisis arrojó mejores resultados que el PVP y DTT, ya que con el protocolo de Jobs *et al.* no se obtuvo amplificación con ninguna cantidad (2mg y 5mg) en las 7 especies estudiadas (Figura 19 y 20). Otro reactivo usado en este buffer es la Proteinasa K, que incrementa la concentración del ADN obtenido a partir de muestras de hueso, siendo principalmente estudiada en la extracción de ADN de muestras animales (Ivanova *et al.*, 2008). La función de la PK es digerir las proteínas, mientras que el SDS es un detergente que se encarga de la lisis de membranas celulares (Cattaneo, 2006). Es importante remover el EDTA de la incubación inicial, ya que este inhibe la función de la PK. Además, es necesario denaturar la proteinasa K ya que esta inhibe la PCR (O'Rourke *et al.*, 1996).

En el protocolo propuesto por Jobs *et al.* no se señala ningún paso relacionado con la eliminación del EDTA antes de usar la PK ni la posterior inactivación de esta antes de hacer la PCR, posiblemente esto interfirió con la acción de la PK durante la incubación inicial al igual que el desempeño de la PCR al posiblemente verse inhibida por la PK, razón por la cual no se observó amplificación de las especies estudiadas (Cattaneo, 2006).

Ahora bien, durante la extracción de ADN es importante tener en cuenta pasos correspondientes a incubación y precipitación, siendo innecesario y poco eficiente el extender los tiempos ni aumentar las temperaturas con el fin de obtener mayor cantidad de ADN (Mittmann *et al.*, 2007). Sablog *et al.*, en el año 2009, observó que periodos de incubación con temperaturas mayores a 65°C (sin llegar a 80°C) resultaron en la pérdida de ADN (Sablok *et al.*, 2009). En el protocolo Jobs *et al.* y Cota *et al.* la temperatura de incubación varió entre 50°C-56°C y en Quintanilla *et al.* estuvo entre 60°C-65 °C; esto contrasta con lo observado por Sablok *et al.*, ya que con altas temperaturas se obtuvo mayor cantidad de ADN siendo muy evidente la diferencia de concentraciones de ADN obtenida por el protocolo Quintanilla *et al.* (Tabla 1) en comparación a los otros dos protocolos. Generalmente la incubación de ácidos nucleicos/sal/etanol que se realiza a bajas temperaturas (e.g -20°C) son citadas en

varios artículos. Sin embargo, según Mananiatis *et al.* lo anterior no es necesario, ya que los ácidos nucleicos con concentraciones menores a 20ng/mL precipitan a temperaturas de -4°C con un tiempo suficiente de 15-30 minutos (BietziseBio). En los protocolo Jobes *et al.* se realizaron 4 incubaciones, 3 de ellas a -20°C durante 30 minutos y la última a -20°C por una noche A diferencia de Cota *et al.* donde se realizaron 2 a -20°C por dos noches y por último Quintanilla *et al.* Donde únicamente se realizó 1 precipitación a -20°C por una noche. Lo anterior indica que al parecer entre menor número de incubaciones y precipitaciones, se obtiene ADN con mayor concentración.

Otro inconveniente en la extracción de ADN es la remoción de polisacáridos, debido a que estos al coprecipitarse con el ADN promueven a la formación de un pellet con consistencia pegajosa y gelatinosa; con el objetivo de solucionar esto, Cheng *et al.*, desarrolló un protocolo en el que el uso de dietil-eter y altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), parecen bloquear la acción de lo polisacáridos (Mittmann *et al.*, 2007). En el buffer de lisis de los 3 protocolos los que presentan la mayor concentración de NaCl corresponden a Quintanilla *et al.* y Cota *et al.* siendo el primero el que obtuvo mejores resultados, a diferencia de Jobes *et al.* con el cual no se obtuvo ningún producto amplificado de ninguna especie y cuya cantidad de NaCl fue de 500 mM. Chang *et al.*, en 1993, establece que aumentando la concentración de sal de 1.4 M a 2.0M en el buffer de lisis, afecta la solubilidad de los polisacáridos en etanol, permitiendo una óptima precipitación de los ácidos nucleicos (Mittmann *et al.*, 2007). Josquin *et al.*, en el año 2006, observó una mejora significativa en la relación 260/230 al incrementar la concentración de sales (NaCl) al 2.0 M en el Buffer de extracción indicando la reducción de contaminación del ADN con polisacáridos (Josquin *et al.*, 2006). Sin embargo en los protocolos Quintanilla *et al.* y Cota *et al.* a pesar de presentar la misma concentración de NaCl, muestran una marcada diferencia en los valores observados correspondientes a la calidad del ADN respecto a las relaciones 260/280 siendo evidentemente mucho más óptimas en Quintanilla *et al.* (Tabla 1) que en Cota *et al.* (Tabla 2) sugiriendo la presencia de contaminación con impurezas como proteínas y compuestos fenólicos al usar este último protocolo. Es importante resaltar, que las proteínas, ARN y compuesto fenólicos también absorben luz UV a 260 nm, por lo tanto es posible que valores estén sobrestimados (Ishi & Loynachan, 2004).

Continuando con la importancia de la sal, el Cloruro de Sodio no es la única que se utiliza en los procesos de extracción de ADN. Otras sales como el Acetato de Sodio y Acetato de

Amonio, son empleadas para precipitar el ADN. El Acetato de sodio, en solución se divide en Na^+ y $[\text{CH}_3\text{COO}]^-$ los iones de Na cargados positivamente neutralizan la carga negativa del PO_3^- de los ácidos nucleicos, de tal forma que el ADN se convierte en una molécula más soluble y precipite con más facilidad (BietziseBio). En el protocolo Jobes *et al.* y Cota *et al.* utilizó Acetato de Sodio, sin obtener buenos resultados. En Quintanilla *et al.* se utilizó el Acetato de Amonio, con el cual se observó un mejor desempeño debido a que hubo una mayor amplificación de las muestras con mayores concentraciones de ADN. Asimismo el etanol juega un papel importante en la precipitación del ADN, ya que este ayuda a la mayor afinidad entre los iones de Na^+ y PO_3^- favoreciendo a la precipitación del ADN (BietziseBio); el único protocolo que presentó una segunda precipitación con etanol, fue Jobes *et al.* sin dar buenos resultados, indicando que una segunda precipitación no es relevante. Por consiguiente, los lavados con etanol al 70% son muy importantes ya que con estos se elimina cualquier residuo de sal del ADN (BietziseBio). En cuanto a Cota *et al.* y Jobes *et al.* solo se realizó 1 lavado a diferencia de Quintanilla *et al.* donde se realizaron no solo 2 lavados con etanol al 70% si no también 2 lavados con etanol al 99%, indicando que el realizar más de un lavado con etanol favorece a un ADN con menor impurezas, como se observa en las relaciones 260/280 donde son notoriamente mejores en este último protocolo que los anteriores.

Es importante recalcar, que el proceso de degradación y deterioro es único en cada exsicado, los compuestos químicos propios de cada muestra de herbario, pueden tanto interferir como favorecer de forma diferente a ciertos pasos durante el proceso de extracción (Yang *et al.*, 1997). Posiblemente debido a lo anterior, en muestras que aunque pertenecen a la misma especie, obtienen concentraciones de ADN totalmente diferentes (Tabla 1, 2 y 3). Lo anterior también demuestra que no existe relación entre el año de colecta y la cantidad del ADN, debido a que especímenes con menor tiempo de colecta presentan menor concentración que aquéllos colectados hace más tiempo, esto posiblemente se debe nuevamente, a que a pesar de haber exsicados correspondientes a la misma especie colectados en el mismo año o con una mínima de diferencia entre el tiempo de colecta, al ser sometidos a diferentes condiciones de preservación y manipulación, hacen que el éxito de la extracción varíe en cada uno (Yang *et al.*, 1997).

Investigadores han reportado que en secuencias de ADN degradado, debido a efectos de oxidación, la *taq* polimerasa inserta una adenosina en el lugar donde hay un daño y “salta” a

otro secuencia “molde” continuando el proceso de amplificación, de tal forma que no se obtienen secuencias continuas, este proceso se denomina “jumping PCR” y crea productos de PCR recombinantes. La poca eficiencia de la PCR se puede revertir al realizar una nested PCR; la razón por la cual se cree esto no es muy conocida, pero Yang *et al.* en 1997, propone que la alta concentración de reactivos presentes en la segunda PCR permite que las secuencias blanco sobrantes sean la base para la producción de mayor cantidad de cadenas de ADN (Yang *et al.*, 1997), esto fue necesario realizar para determinar qué tipo de primer usar.

Así pues, el uso de primers diseñados inicialmente para amplificar ADN contemporáneo, no siempre son igual de eficientes cuando se utiliza en ADN antiguo, por lo tanto es recomendable rediseñar estos primers al momento de realizar análisis con ADN antiguo que usualmente se encuentra degradado (Hummel, 2008). Es por esto que en este estudio, a pesar de evidenciar amplificación usando los primers 19 forward y 556 reverse (Figura 18) los resultados no son los más óptimos y exitosos, debido a que a pesar que se obtuvo amplificación en la mayoría de las especies usando el protocolo establecido por Quintanilla *et al.* en los otros dos protocolos evaluados no fueron eficientes, obteniendo muy pocos productos amplificados, posiblemente con un rediseño de estos primers, se obtengan mejores resultados en el análisis de ADN antiguo.

Habitualmente la longitud de las secuencias obtenidas a partir de ADN antiguo corresponden a 200 pb, Sin embargo, fragmentos de mayor longitud se puede obtener como Telles y Thines en 2008, quienes lograron amplificar fragmentos de ADN de 650pb y 350pb aproximadamente, de especies colectadas entre 1906 y 1994 y concentraciones entre los 10 y 90 (ng/μl) como se evidencia en los resultados. Andreasen *et al.*, (2009) propone que la longitud del fragmento que se amplifica se relaciona con el grado de degradación del ADN, entre mayor tiempo de colecta, mayor fragmentación del ADN. Lo anterior no se observa en los resultados obtenidos ya que especies como *Epidendrum secundum* (1968) con una alta concentración de ADN no logro ser amplificada, a diferencia de esta misma especie colectada en el año 1948, la cual si amplifico (Figura 19 y 20).

Hanni *et al.* (1994), sugiere que la poca amplificación de las muestras se debe a la poca cantidad de tejido utilizado correspondientes a 2mg y 5 mg. En otros casos, se utilizan aproximadamente 100mg de tejido vegetal, Li *et al.* en su reciente estudio utilizó 30 mg de muestra, a pesar de que la cantidad de muestra se redujo a más de la mitad, sigue siendo una

cantidad considerable de tejido valioso, afectando especialmente la integridad de los exsiccados más pequeños (Andreasen *et al.*, 2009). Ristanio *et al* en 2001 reporto la amplificación exitosa del patógeno *Phytophthora infestans*, a partir de un exsicado con más de 150 años de antigüedad usando únicamente de 2-3mm de tejido seco. Por lo tanto, un objetivo importante de estudio, fue probar protocolo de extracción de ADN en pequeñas cantidades de tejido, optando por solo utilizar 2 y 5 mg de tejido seco, lo cual es 15 veces menor a la cantidad reportado por Li *et al.* Aunque en las especies extraídas con el protocolo Quintanilla *et al.* y 5mg de tejido se observa que tienen una mayor concentración que las obtenidas a partir de 2mg (Tabla 1) se evidencia que los productos amplificados de la primera cantidad se encuentran más degradado debido a que se ve una mancha a lo largo del corrido, indicando la ruptura del ADN (Figura 20) a diferencia de la corrida en gel correspondiente a 2 mg, donde se ven bandas más definidas y sin manchas. Por lo tanto, se evidencia que a partir de 2mg y 5mg de tejido vegetal es posible extraer ADN, pero entre más cantidad de material mayor posibilidad de obtener mayor concentración de ADN.

Por último, el método Neighbor-Joinig (NJ) (Vecino más cercano) es frecuentemente usado en estudios de “código de barras molecular” (DNA barcoding) y su objetivo es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen, ya que individuos de la misma especie, presentan menor variabilidad intra-específica a la existente entre diferentes especies. El resultado de este método consiste en generar un único filograma en el cual inicialmente se unen las secuencias que tengan menor distancia genética y luego se busca la siguiente secuencia que tenga la menor distancia genética con este. Esta distancia se calcula identificando el número de bases nitrogenadas que son diferentes en estas dos secuencias, entre menor diferencia, las secuencias son más parecidas (Peña, 2011).

De tal forma, que solamente al reflejar el grado de similitud de las secuencias, los individuos pertenecientes a una misma especie formarán grupos aislados debido a su alto nivel de semejanza (semejanza de sus secuencias). Debido a esto, se puede inferir que efectivamente los exsiccados clasificados con el nombre de *Oncidium ornithorhynchum* forman un grupo aislado, del cual también hacen parte las secuencias reportadas anteriormente en NCBI, indicando que estas secuencias efectivamente corresponden a la especie *Oncidium ornithorhynchum* (Figura 21).

Es importante aclarar que el método NJ no toma en cuenta la relación ancestro–descendientes. Por lo tanto, el árbol que se obtiene usando NJ no refleja relaciones evolutivas, en realidad es una representación del grado de similitud de las secuencias (Peña, 2011).

En conclusión se propone el protocolo Quintanilla *et al.* (2010) como el más eficiente al permitir extraer ADN de mayor concentración y calidad más óptima de 6 especies de las 7 evaluadas y con más de 63 años de colecta específicamente en exsiccados de Orquídeas. De igual forma, con el anterior protocolo se logró amplificar exitosamente 6 de las 7 especies estudiadas tanto con 2 mg de tejido como con 5 mg pero se propone usar mínimo 5 mg para obtener resultados más óptimos. Se recomienda una nueva secuenciación del ADN de las especies *Epidendrum secundum* y *Prostachea grammatoglossa* con el fin de corroborar las secuencias y reportarlas por primera vez en GenBank. También se recomienda realizar más estudios referentes a el análisis de estudio moleculares ribosomales y del cloroplasto con el fin de comparar las diferentes historias evolutivas de la especie *Epidendrum secundum*. Asimismo, se propone el uso de reactivos como PTB y BSA en los protocolos de extracción, que posiblemente pueden mejorar los resultados en la extracción y el éxito en la amplificación.

9. CONCLUSIONES

El protocolo que arroja ADN de mejor calidad y mayor cantidad fue el propuesto por Quintanilla *et al.* (2010).

Existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de tejido y la concentración ADN.

Se logró extraer, amplificar y secuenciar el ADN proveniente de exsiccados de orquídeas con más de 40 años de preservación.

El estudio del ADN antiguo es una herramienta importante para establecer una base molecular confiable, que permite realizar un estudio de Código de Barras molecular que ayudará a los herbarios a realizar una clasificación más segura y corregir posibles errores en la taxonomía de los exsiccados.

10. BIBLIOGRAFÍA

Colombia. Decisión 391. Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos. 02 de julio de 1996. Disponible en: http://www.perubiotec.org/PDFs/Decision_391_CAN_Acceso_RG.pdf. Consultado el 18 de abril del 2011.

Jobes D, Hurley D, Thien L. Plant isolation: a method to efficiently remove polyphenolids, polysaccharides, and RNA. *Taxon* 2010; 44(3): 379-386.

Lehtonen S, Christenhusz M. Historical herbarium specimens in plant molecular systematic – an example from the fern genus *Lindsaea* (Lindsaeaceae). Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences. *Springer Biologia* 2010; 65 (2): 204-208.

Gugerli F, Parducci L, Petit R. Ancient plant DNA: Review and prospects. *New phytologist* 2005; 166 (2): 409-418.

Lister D, Bower M, Howe C, Jones M. Extraction and amplification of nuclear DNA from herbarium specimens of emmer wheat: a method for assessing DNA preservation by maximum amplicon length recovery. *Taxon* 2008; 57 (1): 254-258.

Shapiro, B. Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA. *Trends in biotechnology* 2008; 26 (6):285-287.

Capelli C, Tschentscher F, Pascali V, Ancient protocols por the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Elsevier, Forensic Science International* 2003; 131: 59-64.

Lambertini C, Frydenberg J, Gustafsson G, Brix H. Herbarium specimens as a source of DNA for AFLP fingerprinting of *Phragmites* (Poaceae): possibilities and limitations. *Springer-VerlagSyst* 2008; 272: 223–231.

Quintanilla S, Ortiz P, Gomez A, Bernal J. Phylogenetic relationships among genera of the subtribe *Oncidiinae* (Epidendroideae: Orchidaceae) and a new genus: *Santanderella*. *Phytologia* 2011; 93 (3): 388-406.

Rohland N, Hofreiter H. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 2007; 42(3):343-352.

Telle S, Thines M. Amplification of *cox2* (,620 bp) from 2 mg of Up to 129 Years Old Herbarium Specimens, Comparing 19 Extraction Methods and 15 Polymerases. *PLoS ONE* 2008; 3(10): e3584

Andreasen K, Manktelow M. Successful DNA amplification of a more than 200 year old herbarium specimen: recovering genetic material from the Linnaean era. *Taxon* 2009; 58 (3): 959-962.

Cota H, Remarchuk k, Kumary U. Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* 2006; 24: 161–167.

Colombia. Resolución 932 De 2010. Ministro de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Disponible en: http://www.icbf.gov.co/transparencia/derechobienestar/resolucion/resolucion_minambientevd_t_0932_2010.html Consultado el 18 de abril del 2011

Drabkova L, Kirschner J. Comparison of Seven DNA Extraction and Amplification Protocols in Historical Herbarium Specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 2002; 20: 161-175.

Audic S. The use of protein characteristics to assess the retrievability of ancient DNA from ancient bones. *International journal of anthropology* 2002; 17 (1)17-26.

Huang Y, Shi S, Zhong Y, Tan F. A new method for preparation of template DNA for PCR from special plant materials. *Chinese Science Bulletin* 2002; 47(9): 725-727.

Deagle B, Eveson P, Jarman S. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces. *Bio med entral, Frontiers in zoology* 2006; 3 (11): 1-10.

Riahi M, Zarre S, Maassoumi A, Attar F, Osaloo S. An inexpensive and rapid method for extracting papilionoid genomic DNA from herbarium specimens. *Genet. Mol. Res.* 2010; **9**(3): 1334-1342.

Castro O, Menale B. PCR amplification of Michele Tenore's historical specimens and facility to utilize an alternative approach to resolve taxonomic problems. *Taxon* 2004; **53**(1): 147-151.

Ristanio B, Groves T, Parra R. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens. *Nature* 2001; **411**:695-697.

Cozzolino S, Cafasso D, Pellegrino G, Musacchio A, Widmer A. Genetic variation in time and space: The use of herbarium specimens to reconstruct patterns of genetic variation in the endangered orchid *Anacamptis palustris*. *ConservGnet* 2007; **8**: 629-639.

Leopardi C. Orquideoflórula de un sector de Serranía de la Cuchilla, municipio Caripe, estado Monagas, Venezuela. *Lankesteriana* 2010; **9** (3): 541-555.

Withner, C; Harding, P. 2004. *The Cattleyas and their relatives: the debatable Epidendrums*. Timber Press, Inc.

Jiménez R, Hagsater E. *Oncidium ornithorhynchum*, una especie mal interpretada y un nombre para una vieja especie: *Oncidium sotoanum* (Orchidaceae). *Lankesteriana* 2010; **9** (3): 411-422.

Sheehan T. Recent Advances in botany, propagation, and, physiology of orchids. *Horticultural Reviews* 1983.

Yang H, Golenberg E, Shishani J. Proboscidean DNA from museum and fossil specimens: an assessment of ancient DNA extraction and amplification techniques. *Biochemical Genetics* 1997; **35** (5): 165-178.

Cattaeno C. DNA extraction methods in forensic analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry* 2006.

Erickson D, Smith B, Clarke A, Sandweiss H, Turoos N. An asian origin for a 10.000 year old domesticated plant in the Americas. 2010; 102 (51): 18315-18320.

Mittmann F, Dienstbach S, Wagner G. Large scale extraction of high quality moss DNA. Russian journal of plant physiology 2007; 54 (4): 564-568.

Ivanova N, Fazekas a, Hebert P. Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plant. Plant Mol Bio Rep 2008; 26: 186-198.

Orourke H, Carlyle S, Parr R. Ancient DNA: methods, progress and perspectives. American Journal of Human Biology 1996; 8: 557-571.

Sablock G, Gahlot P, Gupta A, Pareek K, shekhawat S. Extraction of PCR-usable DNA from trees adapted to arid environment. Plant Omics Journal 2009; 2(3):1836-3644.

BiteSizeBio. <http://bitesizebio.com/?s=dna+extraction>. Consultado el 20 de octubre del 2011.

Josquin T, MacManus L, Spokevicius A, Bossinger G. A rapid method for tissue collection and high-throughput isolation of genomic DNA from mature trees. Plant molecular biology reporter 2006; 24:81-91

Ishi S, Loynachan T. Rapid and reliable DNA extraction techniques from trypan-blue-stained mycorrhizal roots: comparison of two methods. Mycorrhiza (2004) 14; 271-275.

Hummel S. Ancient DNA: recovery and analysis. Encyclopedia of life sciences 2008.

Parducci L, Suyama Y, Lascou K, Bennett D. Ancient DNA from pollen: a genetics record of population history in scots pine. Molecular Ecology 2005; 14: 2873-2882.

Peña C. Métodos de inferencia filogenética. Rev. Peru. Biol. 2011; 18(2): 265-267.

Asociación Bogotana de Orquideología.
http://www.orquideasbogotaabo.com/index.php?option=com_content&view=article&id=72&Itemid=30. Consultado el 14 de julio del 2011.