

**EVALUACIÓN Y ADAPTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN
Y AMPLIFICACIÓN DE ADN EN ORQUÍDEAS CONSERVADAS EN
HERBARIOS EN UN EXSICADO DE *Oncidium ornithorhynchum*
CON MÁS DE 200 AÑOS**



MARÍA TERESA RODRÍGUEZ GARCÍA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C.

2015

EVALUACIÓN Y ADAPTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN
Y AMPLIFICACIÓN DE ADN EN ORQUÍDEAS CONSERVADAS EN
HERBARIOS EN UN EXSICADO DE *Oncidium ornithorhynchum*
CON MÁS DE 200 AÑOS

MARÍA TERESA RODRÍGUEZ GARCÍA



Andrea Forero

DIRECTORA DE CARRERA
Andrea Patricia Forero Ruíz

EVALUACIÓN Y ADAPTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN
Y AMPLIFICACIÓN DE ADN EN ORQUÍDEAS CONSERVADAS EN
HERBARIOS EN UN EXSICADO DE *Oncidium ornithorhynchum*
CON MÁS DE 200 AÑOS

MARÍA TERESA RODRÍGUEZ GARCÍA



DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

Alberto Gómez Gutiérrez, PhD



JURADO TRABAJO DE GRADO

Jorge Hernán Jácome Reyes, PhD

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

Le agradezco a Dios y a mi ángel por estar siempre a mi lado, dándome fuerzas para nunca desfallecer y mostrarme que nada es imposible.

A mis padres Pedro y María Teresa por sus consejos, confianza, amor y apoyo incondicional en cada paso de mi vida.

A mi director Alberto Gómez Gutiérrez por su orientación, paciencia, críticas constructivas y buena disposición en todo momento.

A Sonia Quintanilla, Paola Ayala y Carlos Uribe por sus invaluable aportes.

Al Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París y al Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana, porque sin su cooperación este estudio no hubiera sido posible.

A la memoria del Padre Pedro Ortiz Valdivieso, S. J., quien propuso originalmente al Instituto de Genética Humana la presente línea de trabajo en taxonomía molecular de orquídeas.

Al laboratorio arcaico del Instituto de Genética de la Pontificia Universidad Javeriana por permitirme el uso de sus instalaciones.

A la Universidad de Los Andes por los servicios de secuenciación.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Justificación y planteamiento del problema	9
4. Marco teórico	11
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general	13
5.2. Objetivos específicos	13
6. Metodología	
6.1. Selección del material vegetal	13
6.2. Pre-extracción de ADN	19
6.3. Extracción de ADN	19
6.3.1. Protocolo modificado a partir de Mazo (2011)	19
6.4. Calidad de ADN	21
6.5. Amplificación y secuenciación	22
6.6. Análisis de secuencias	23
7. Resultados	23
8. Discusión	48
9. Conclusión	49
11. Recomendaciones	49
12. Bibliografía	50

EVALUACIÓN Y ADAPTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN EN ORQUÍDEAS CONSERVADAS EN HERBARIOS EN UN EXSICADO DE *Oncidium ornithorhynchum* CON MÁS DE 200 AÑOS

1. RESUMEN

Las plantas preservadas en herbarios son una fuente importante de material vegetal, ya que permiten, en principio, acceder a información genética por el ADN que contienen, a partir del cual es posible resolver conceptos y problemas taxonómicos, evolutivos y de distribución de poblaciones. Sin embargo, se dispone de muy pocas referencias metodológicas para la adecuada extracción, amplificación y posterior secuenciación del material genético en plantas preservadas muchos años en estado seco. El presente estudio se realizó con el fin de evaluar y adaptar el protocolo de extracción de ADN propuesto por Mazo (2011), para determinar si este permitía extraer ADN de buena calidad y cantidad a partir de un exsicado de *Oncidium ornithorhynchum* colectado hace más de 200 años, siendo este ADN susceptible de amplificación por técnicas de PCR para una posterior secuenciación de fragmentos del gen *matK* con el propósito de ayudar a esclarecer su prioridad taxonómica. Se utilizaron 5 mg de tejidos provenientes de 4 exsicados de orquídeas de *O. ornithorhynchum*, 3 de ellos preservados en el Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana, colectados entre los años 1968 y 2003, y uno de ellos preservado en el Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París, colectado entre 1801 y 1802.

Se cuantificaron y midieron las relaciones de pureza ADN/proteína (260/280 y 260/230) de los extraídos, se obtuvieron los productos correspondientes después de su amplificación por PCR, los cuales fueron secuenciados exitosamente.

En conclusión, se adaptó con buen suceso el protocolo, logrando extraer ADN de buena calidad del exsicado de más de 200 años, así como los correspondientes productos de amplificación y secuencias genéticas. A partir de estos resultados, se propone un nuevo protocolo de extracción y amplificación para exsicados de hasta 2 siglos de antigüedad, y complementar el uso de claves taxonómicas fenotípicas con nuevos marcadores polimórficos genotípicos (plastídicos y nucleares) para una clasificación más precisa de géneros y especies.

2. INTRODUCCIÓN

Cuando se estudia el ADN antiguo (ADNa), se recuperan y analizan secuencias de ADN provenientes de restos antiguos o de especímenes conservados en museos y herbarios. En el año 1984 se aisló por primera vez ADN conservado en museo, proveniente de la piel del extinto mamífero *Equus quagga*, el cual estuvo preservado en el museo por más de 140 años en solución salina, demostrando que estaba más emparentado con las cebras que con los caballos, siendo lo más importante de este estudio, el haber podido recuperar ADN de una especie que ya estaba extinta (Higuchi *et al.*, 1984).

Cuando las plantas están vivas, se encuentra dentro de las células el ADN muy bien protegido y, en caso de ocurrir algún daño, mecanismos enzimáticos lo reparan. Pero cuando estas mueren, su ADN empieza a degradarse y los compartimentos que antes secuestraban enzimas catabólicas se rompen y el ADN se degrada de forma más rápida, debido a enzimas como las lipasas, proteasas, amilasas y nucleasas de los lisosomas. También, el ataque de hongos, insectos y bacterias, influye en la degradación de macromoléculas (Lindahl 1993 & Pääbo *et al.*, 2004).

Si los tejidos sufren una desecación abrupta después de la muerte, o una exposición a temperaturas muy bajas o a altas concentraciones de sales, las nucleasas se destruyen antes de que los ácidos nucleicos se reduzcan a mononucleótidos y, así, el ADN puede evitar ser degradado; pero estas circunstancias ocurren muy rara vez (Smith *et al.*, 2001 & Poinar *et al.*, 2003).

Condiciones como una inadecuada preservación y almacenamiento de muestras vegetales, la contaminación con precipitados como polifenoles, taninos, polisacáridos, ADN de microorganismos como hongos o bacterias (Deagle *et al.*, 2006), la exposición a sustancias químicas como plaguicidas, desinfectantes, alcohol (Huang *et al.*, 2002), la luz ultravioleta (Shapiro, 2008), los pH muy altos o bajos, la humedad (Capelli *et al.*, 2003) y procesos naturales de degradación del material genético, son factores que afectan negativamente la calidad del ADN presente en muestras de herbarios (Lambertini *et al.*, 2008).

En este estudio se evaluó y adaptó el protocolo de extracción de ADN de Mazo (2011), en 4 exsiccados de orquídeas de la especie *Oncidium ornithorhynchum*, 3 de ellos preservados en el

Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, colectados en los años 1968, 1989 y 2003, y uno de ellos preservado en el Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París, colectado entre 1801 y 1802, con el fin de realizar la extracción y amplificación de ADN de buena calidad para secuenciar fragmentos del gen *matK* a partir del exsicado que cuenta con más de 200 años y que tiene un particular interés histórico en razón a su controvertida prioridad taxonómica.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas que se encuentran preservadas en los herbarios son una fuente importante de material vegetal, ya que permiten acceder a información genética por el ADN que contienen y del cual se pueden resolver problemas taxonómicos, evolutivos y de distribución de poblaciones; pero estas pueden sufrir procesos naturales de degradación del ADN, como también contaminación por una inadecuada preservación y almacenamiento, ocasionando del mismo modo una degradación del material genético (Lister *et al.*, 2008).

Cuando el ADN es antiguo (ADNa), existen problemas como la baja cantidad y calidad de ADNa extraído, encontrándose este en pobres condiciones, eventualmente dañado y fragmentado, así como la probable existencia de inhibidores de la Taq polimerasa y la contaminación cruzada con ADN moderno (Hofreiter *et al.*, 2001; Kaestle & Horsburgh 2002; O'Rourke *et al.*, 2000; Sykes 1991); a pesar de esto, es aún posible estudiar ADNa por medio de métodos moleculares basados en PCR.

Por otro lado, uno de los propósitos de estudiar el ADN contenido en exsicados que han perdido varias de sus características fenotípicas, es el de revisar la denominación taxonómica que el botánico o colector inicial registró para cada planta, especialmente en casos que hayan dado lugar a controversias como la citada en el artículo reciente de Mazo *et al.*, titulado “Consideraciones sobre la historia de la prioridad taxonómica de *Oncidium ornithorhynchum*” (Mazo *et al.*, 2014).

Oncidium ornithorhynchum Kunth, es una especie de orquídea que pertenece al género *Oncidium* Swartz (subtribu Oncidiinae). Son plantas epífitas características de los páramos, ubicadas entre 2.000 y 3.330 metros de altitud. Florecen en enero y se reconocen por la inflorescencia erecta, en forma piramidal, con 90-100 flores, con sépalos espatulados, la columna reflexa con las alas

erectas, angostamente cuneadas y con el ápice bilobado (Jiménez & Hágsater 2010; Pridgeon *et al.*, 2009).

En el trabajo previo de Mazo *et al.*, (2014) se reporta cómo la historia de la prioridad taxonómica de la orquídea *O. ornithorhynchum* aún está por aclararse, si son consideradas las diferentes descripciones y publicaciones de esta especie que fueron propuestas en los siglos XVIII y XIX por botánicos tales como José Celestino Mutis, John Lindley, Alexander von Humboldt, Aimé Bonpland y Carl S. Kunth, entre otros. Para resolver las inconsistencias existentes en los reportes taxonómicos de esta especie, y basándose en la aclaración realizada por Jiménez y Hágsater en 2010 sobre la identidad del ejemplar tipo conservado en París, Mazo *et al.*, ordenaron las fuentes primarias relacionadas con su descripción y nomenclatura botánica.

En dicha aclaración, Rolando Jiménez y Eric Hágsater mencionan que Miguel Ángel Soto, en el año 1990, observó que el ejemplar tipo de *O. ornithorhynchum* encontrado en el Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París, no concordaba con la especie de flores violetas que se encontraba distribuida en México. Posteriormente, en el año 1997, el botánico mexicano Adolfo Espejo, estuvo en el museo de París, en donde obtuvo una fotografía del ejemplar tipo de *O. ornithorhynchum*, y que gracias a esta imagen Rolando Jiménez, en el año 2008, confirmó, al examinar los ejemplares tipo de *Oncidium*, que no concordaba con la especie que se distribuye en México y Centroamérica.

Debido a esta confusión en la descripción de esta especie, Jiménez y Hágsater postularon en el 2010 que debe haber un error en la indicación de la localidad del *O. ornithorhynchum* Kunth que fue colectado por Humboldt y Bonpland como si fuera de México. El ejemplar tipo que se conserva en París, muestra que este espécimen no es lo que se ha considerado como “*Oncidium ornithorhynchum* de México y Centroamérica” (y no de Suramérica), sino que corresponde a lo que se ha llamado *Oncidium pyramidale* Lindl de Colombia, Ecuador y Perú, siendo este *O. pyramidale* sinónimo hoy de *O. ornithorhynchum*. Por otra parte, la especie mexicana con flores violetas, se conoce ahora como *Oncidium sotoanum* R.Jiménez & Hágsater.

Por lo tanto, uno de los propósitos de este estudio era el de obtener ADN del exsicado conservado en el Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París, colectado por Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland entre 1801 y 1802, adaptando el protocolo propuesto por Mazo (2011), el cual sirvió para extraer ADN de buena calidad de exsicados de hasta 60 años. Al

obtener la secuencia de ADN de este exsicado, se estaría dando un gran paso para aclarar la prioridad taxonómica de *O. ornithorhynchum*, debido a las inconsistencias que se pueden deducir de los reportes taxonómicos citados.

Queda entonces por resolver la siguiente pregunta de base: "¿es posible obtener secuencias genéticas a partir de un exsicado de más de 200 años de antigüedad ajustando el protocolo de Mazo (2011)?".

4. MARCO TEÓRICO

Las colecciones de especímenes preservados en herbarios son una fuente importante de información de la biodiversidad, los cuales son usados tanto en investigaciones morfológicas como en estudios de evolución molecular, ya que permiten acceder a información genética por el ADN que contienen, a partir del cual es posible resolver problemas evolutivos, taxonómicos y de distribución de poblaciones que han permanecido un tiempo considerable sin resolver (Lister *et al.*, 2008; Mullis & Faloona 1987).

Por más que un espécimen se encuentre bien preservado, las moléculas que lo componen sufren cambios dramáticos, debido a que son muy sensibles a daño oxidativo e hidrolítico; cualquier cambio estructural hace que ocurra una desestabilización, llevando a que las hebras de ADN se desintegren, y por esto las moléculas de ADN se degradan después de su muerte rápidamente, siendo la autólisis el primer proceso responsable de este hecho (Pääbo & Wilson 1991; Woodward *et al.*, 1994). Los daños oxidativos e hidrolíticos, conllevan cambios en bases nitrogenadas, como desaminación y despurinización (Hoss *et al.*, 1996). La cantidad de citosina y timina en ADN antiguo es muy baja comparada con ADN contemporáneo, mientras que el contenido de guanina y adenina son normales, ya que las pirimidinas son más sensibles a la oxidación que las purinas (Pääbo 1989).

También, la tasa de deshidratación que presenta el espécimen preservado es un factor importante, ya que afecta el tamaño del ADN amplificable, esto debido a que la deshidratación está relacionada con las nucleasas endógenas. Por esto, se pueden amplificar productos de más de 1000 pb en especímenes que son preparados rápidamente, mientras que los que se preparan

lentamente sufren de deshidratación, por lo que no se amplifican fragmentos mayores de 400 pb (Hoss & Pääbo 1993).

Generalmente el ADN recuperado de especímenes antiguos está en pobres condiciones, dañado y dispuesto en pequeños fragmentos no mayores de 200 nucleótidos (Pääbo *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque factores químicos y físicos degradan el ADN de restos orgánicos antiguos, es aún probable estudiar el ADN por medio de métodos moleculares basados en PCR. Tres de los problemas más significativos al estudiar ADN son los ya nombrados anteriormente: (1) la pobre calidad y cantidad de ADN extraído, (2) la existencia de inhibidores de la Taq polimerasa en muestras antiguas y (3) el riesgo de contaminación cruzada de muestras antiguas con ADN moderno (Hofreiter *et al.*, 2001; Kaestle & Horsburgh 2002; O'Rourke *et al.*, 2000; Sykes 1991). Por lo tanto, para evitar la contaminación cruzada de las muestras durante los pasos de extracción y amplificación, los implementos deben ser tratados con hipoclorito de sodio y sometidos a irradiación UV usando cabina de flujo laminar (Nasab *et al.*, 2010).

Cuando la planta es fresca, los tejidos meristemáticos proporcionan una gran cantidad de células vivas y por consiguiente de material genético de alta calidad, los cuales están libres de químicos e impurezas, susceptibles de amplificación por técnica de PCR y secuenciación (Drábková & Kirschner 2002). Los tejidos con meristemas axilares, intercalares, de las raíces y el cambium vascular; como lo son las flores, nuevas raíces y los tallos en formación, son los más apropiados para extraer ADN debido a su gran cantidad de células (Taiz & Zeiger 2006).

Por otra parte, las orquídeas son una familia de plantas monocotiledóneas conocida científicamente como Orchidaceae, las cuales se encuentran en todos los pisos térmicos y han colonizado diferentes nichos por lo que es considerada una de las más exitosas entre las angiospermas. Esta familia contiene entre 17.000 y 35.000 especies distribuidas por todo el mundo (Giraldo & Betancur 2011). Colombia posee cerca del 15%, y hasta el 2007 se contaba con 4.010 especies, agrupadas en 260 géneros concentrados en la región Andina (87,2%), Pacífica y Amazónica (10,6%) y las regiones del Caribe y la Orinoquía presentaban los valores más bajos en términos de riqueza y abundancia (5% y 4% respectivamente) (Sarmiento 2007).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar y adaptar un protocolo de extracción y amplificación de ADN a partir de tres exsiccados de orquídeas de hasta 47 años de antigüedad (Mazo 2011), en la secuenciación de fragmentos del gen *matK* a partir de un exsicado de *Oncidium ornithorhynchum* colectado hace más de 200 años.

5.2. Objetivos específicos

- Identificar con cuál de los cuatro exsiccados se obtiene mayor cantidad de ADN según el protocolo ajustado.
- Determinar si el protocolo adaptado es exitoso para la extracción, amplificación y secuenciación de ADN del exsicado con más de 200 años de antigüedad.
- Ayudar a esclarecer la prioridad taxonómica del ejemplar tipo de *Oncidium ornithorhynchum* conservado en el Herbario de París, si se obtiene ADN susceptible de amplificación por técnica PCR.

6. METODOLOGÍA

6.1. Selección del material vegetal

Para realizar la extracción de ADN se utilizaron cuatro muestras secas pertenecientes a la especie de orquídea *Oncidium ornithorhynchum*, colectadas entre 1801-1802 y 2003, tres de las cuales están preservadas en el Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana, y la cuarta en el Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París (MNHN). Un fragmento de este último exsicado fue concedido en el 2013 por los curadores de la colección de París al profesor Alberto Gómez Gutiérrez del Instituto de Genética Humana en la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Se escogieron estos exsiccados con estas fechas las cuales están en retroceso, para reproducir el protocolo de Mazo (2011), y corroborar que se podía obtener ADN de buena calidad, y así realizar la extracción, amplificación y secuenciación de las cuatro muestras de herbario. Este

protocolo fue modificado y se derivaron dos procedimientos de este en función del número de lavados con etanol y conservación del ADN obtenido en buffer TE o en agua estéril.

La información de cada exsicado se detalla a continuación:

1. Planta colectada por Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland en su viaje a la Nueva Granada entre 1801 y 1802, y se encuentra preservada en el Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París (MNHN).



Figura 1. Vista general del exsicado de *Oncidium ornithorhynchum*.

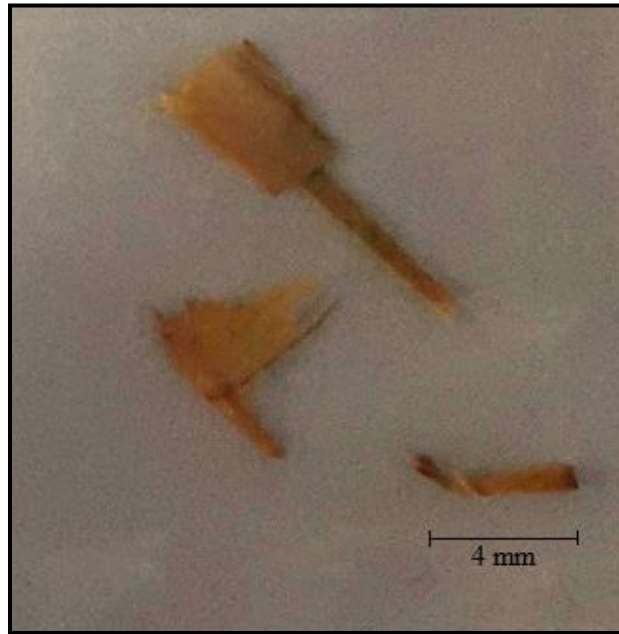


Figura 2. Vista de una parte de los fragmentos concedidos.

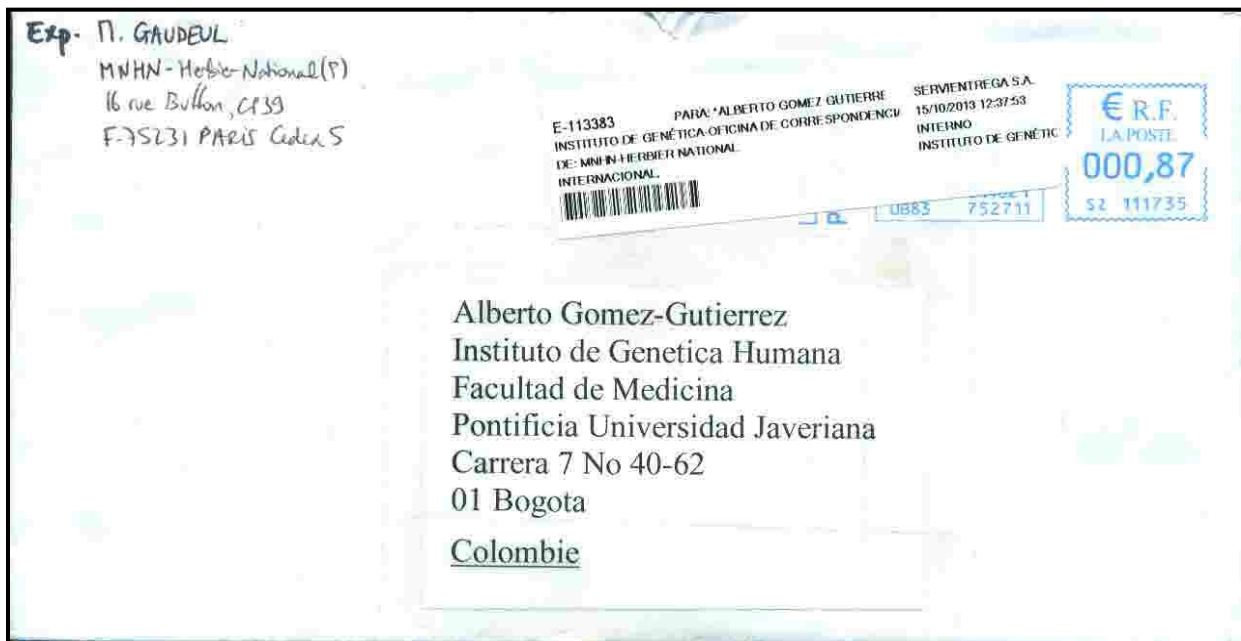


Figura 3. Sobre de la carta del Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París al Profesor Alberto Gómez.



Muséum national d'Histoire naturelle



Paris, 12 September 2013

Dear Alberto Gomez-Gutierrez,

Please find enclosed the leaf sample of *Oncidium ornithorhynchum* that was recently removed from a specimen collected by Humboldt & Bonpland and housed at the Paris Herbarium (P), as requested (colhelper request n°19311). The image of the specimen can be accessed at the following address:

<http://dsipho.mnhn.fr/sonnera2/LAPI/scanR/R20110119/P00669657.jpg>

Please remember to acknowledge the use of this material in the resulting publications (as "Herbarium of the Muséum national d'Histoire naturelle (P), Paris, France").

I hope that your work using these samples will be successful.

Best regards,

Dr. Myriam Gaudeul

Curator of the silica-dried leaf collection & Responsible for destructive sampling

MNHN – Herbar National P

16 rue Buffon

CP39

F-75005 Paris

Figura 4. Carta del Herbario del Museo Nacional de Historia Natural de París al Profesor Alberto Gómez indicando que dentro de esta se encuentra el fragmento de hoja del *Oncidium ornithorhynchum*.

2. Planta epífita, flores amarillas con manchas pardas claras; colectada en la Hacienda 'La Esmeralda', Madrid (Cundinamarca), a 2.650 m, por Sergio Restrepo el 30 de mayo de **1968**. No 110.



Figura 5. Vista general del exsicado del año 1968.



Figura 6. Inflorescencia del exsicado del año 1968.

3. Pétalos y sépalos amarillos. Labelo con callos, columna corta, dos polinios cerosos, labelo no fusionado a la columna, ovario ínfero, inflorescencia lateral basal. Base pegajosa de los polinios aplanados lateralmente, sépalos herbáceos petaloides, flor completamente abierta, labelo completamente abierto, labelo con 3 lóbulos, dos laterales y uno distal, labelo con tres lóbulos dos laterales y uno distal. Pseudobulbo bastante hinchado, duro, verde brillante. Colectada en el municipio de Fómeque (Cundinamarca), flora del Parque Nacional Chingaza, a 3200 m, por Sandra Constantino Chuaire en el año **1989**. No 018.

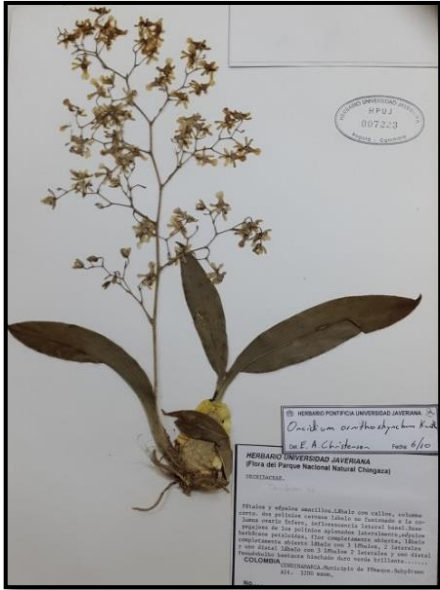


Figura 7. Vista general del exsicado del año 1989.



Figura 8. Inflorescencia en racimo del exsicado del año 1989.

4. Planta epífita, pseudobulbo redondeado con dos hojas articuladas, inflorescencia en racimo con más de diez flores amarillas con marrón hacia la base del labelo. Colectada en el Parque Nacional Natural Chingaza, zona de monte redondo (E 1038068 / N 1003595), a 3150 m, por Mauricio Díaz Granados el 23 de Octubre del 2003. No 3154.

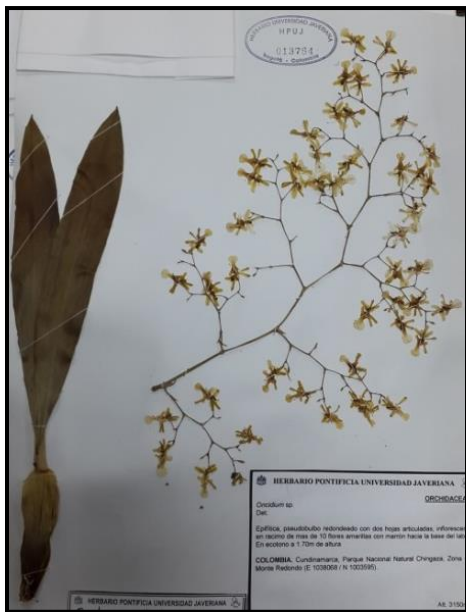


Figura 9. Vista general del exsicado del año 2003.



Figura 10. Inflorescencia en racimo del exsicado del año 2003.

El procedimiento de extracción del ADN se realizó en el laboratorio de ADN arcaico del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana.

Se trabajó con 5 mg de muestra, puesto que esta fue la cantidad sugerida en el artículo de Mazo (2011). Se utilizaron distintos órganos para cada exsiccado, de acuerdo a lo concedido por los dos herbarios, en donde se buscó minimizar los daños a los ejemplares. Por esta razón se utilizaron fragmentos de fácil remoción.

6.2. Pre-extracción del material vegetal

Se esterilizaron cajas de Petri en un autoclave, se lavaron con hipoclorito de sodio y posteriormente se expusieron a luz UV durante 30 minutos antes de su uso. Luego se pesó el tejido de la muestra (5 mg) y se ubicó en una de las cajas de Petri. Por último, se cortó en pedazos muy pequeños el tejido por medio de una cuchilla quirúrgica esterilizada. Este tejido fue agregado a un tubo eppendorf de 1,5 µL. Se repitió el procedimiento para cada una de las muestras.

6.3. Extracción de ADN

6.3.1. Protocolo MODIFICADO a partir de Mazo (2011)

Soluciones:

- Buffer CTAB 2X: (50 mL de tris-HCL pH 8.0; 140 mL de 5 M NaCl; 50 mL de 0,25 M EDTA pH 8.0; 10 g de CTAB; 500 mL de agua destilada)
- β-mercaptoetanol
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
- Acetato de amonio 7,5 M pH 7.5
- Isopropanol
- Etanol al 70% y 99%
- Buffer TE: (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA pH 8.0)

A continuación se detallan los dos procedimientos resultantes al modificar el protocolo de extracción y amplificación de Mazo (2011).

Procedimiento de extracción 1 de ADN

Al tejido ubicado previamente en un tubo eppendorf de 1,5 µL se le adicionaron 498 µL de buffer CTAB 2X y 2,5 µL de β-mercaptoetanol y se mezcló realizando vortex por 1 minuto. Luego la muestra fue incubada durante 24 horas a 60 °C y al finalizar se mezcló nuevamente con vortex durante 30 segundos. Seguido, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se pasó el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se le adicionaron 700 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló fuertemente por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se pasó nuevamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se le adicionaron 700 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló fuertemente por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se determinó la cantidad de µL de sobrenadante, luego según su cantidad y en otro tubo eppendorf, se precipitó la muestra con acetato de amonio e isopropanol frío (a 500 µL de sobrenadante se adicionan 40 µL de acetato de amonio y a 500 µL de sobrenadante se adicionan 291 µL de isopropanol). Esta mezcla se dejó por una noche a -20 °C y posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego el pellet se lavó con 1000 µL de etanol al 70% y se mezcló por inversión, este se centrifugó a 10.000 rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante nuevamente y se adicionaron 1000 µL de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se adicionaron 1000 µL de etanol absoluto (99%), se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante y se adicionaron 1000 µL de etanol absoluto (99%) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet, y este se resuspendió en 100 µL de buffer TE y se almacenó a -20 °C. Este procedimiento se realizó para cada muestra.

Procedimiento de extracción 2 de ADN (utilizando columnas de purificación Sephadex)

Al tejido ubicado previamente en un tubo eppendorf de 1,5 μL se le adicionaron 498 μL de buffer CTAB 2X y 2,5 μL de β -mercaptoetanol y se mezcló realizando vortex por 1 minuto. Luego la muestra fue incubada durante 24 horas a 60 °C y al finalizar se mezcló nuevamente con vortex durante 30 segundos. Seguido, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se pasó el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se le adicionaron 700 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló fuertemente por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se pasó nuevamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se le adicionaron 700 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló fuertemente por inversión y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se determinó la cantidad de μL de sobrenadante, luego según su cantidad y en otro tubo eppendorf, se precipitó la muestra con acetato de amonio e isopropanol frío (a 500 μL de sobrenadante se adicionan 40 μL de acetato de amonio y a 500 μL de sobrenadante se adicionan 291 μL de isopropanol). Luego, en un nuevo tubo eppendorf se ingresó una columna de purificación de Sephadex y se vertió la mezcla contenida en el tubo anterior, este se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto (si al terminar el procedimiento se observa seca la parte de arriba de la membrana de la columna se debe iniciar de nuevo), y se adicionaron 500 μL de agua estéril y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto. Se retiró la columna con cuidado de no voltearla y se descartó el contenido del tubo dejándolo secar. Finalmente, se ingresó nuevamente la columna al tubo pero al revés (para que lo que haya quedado encima de la membrana ingrese al tubo), luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 minutos, se descartó la columna y se almacenó a -20 °C. Este procedimiento se realizó para cada muestra.

6.4. Calidad de ADN

La calidad del ADN se evaluó usando 3 criterios: (1) la pureza del ADN; (2) la amplificación exitosa de los productos de la PCR y (3) la legibilidad de los picos en los electroferogramas.

La pureza del ADN se determinó en base a las lecturas de absorbancia a 260/ 280 nm y 260/230 nm en el espectrofotómetro NanoDrop[®] 2000, en donde las relaciones debían estar entre 1,8 y 2,2 para ser considerado ADN puro. Los valores menores de 1,8 indicaban contaminación con

proteínas y los valores mayores a 2,2, contaminación de polifenoles, polisacáridos y ARN. Por otro lado, la cantidad de ADN (ng/ μ L) también fue medida por medio del espectrofotómetro.

En cuanto al segundo criterio, era necesario obtener bandas visibles y brillantes en el gel de agarosa, teniendo en cuenta los pesos del marcador de peso molecular y así confirmar que el fragmento que se amplificó tuviera el tamaño esperado.

Respecto al tercer criterio, era necesario obtener picos legibles en los electroferogramas, en donde cada uno indicara un nucleótido específico, con una altura suficiente y sin la presencia de picos dobles.

6.5. Amplificación y secuenciación

Primero, se amplificaron regiones de 140 pares de bases (pb) correspondientes al gen *matK*, utilizando unos nuevos primers diseñados. Uno de ellos fue el 390 *Forward* (CGATCTATTCATTCAATATTTTC) y el 556 *Reverse* (GAAGAAACATCTTTGATCCA).

También, se amplificó una región de 371 pares del gen *matK*, con los primers 163 *Forward* (AGTTTAGTACTTGTGAAACG) y 556 *Reverse* (GAAGAAACATCTTTGATCCA), los cuales han sido empleados con éxito por el grupo del Instituto de Genética Humana en la caracterización de diferentes géneros de orquídeas a partir de material fresco.

Antes de cada PCR se desinfectó exhaustivamente el área de trabajo y materiales a usar. Primero con etanol absoluto, luego con isopropanol al 70% y finalmente con alcohol al 70%. Después se expusieron los materiales a luz UV por 35 minutos.

Las condiciones de PCR usadas se describen en la Tabla 4. Seguido a la amplificación, se determinó el tamaño de los fragmentos de ADN por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual contenía buffer TBE y 3 μ L de GelRed, a 120 voltios durante 40 minutos. Se sembraron 6 μ L de producto de PCR y se verificó su peso con un marcador de peso molecular de Bioline que abarca desde 100 hasta 1013 pb.

Se incluyeron 3 controles negativos por cada PCR con todos los reactivos de la Tabla 4, pero con agua en lugar de ADN para descartar cualquier contaminación y 1 control positivo, el cual correspondía al ADN de una especie de orquídea extraído previamente a este estudio.

Los productos de PCR fueron llevados personalmente a secuenciar en la Universidad de los Andes, a través de un convenio de servicios externos.

6.6. Análisis de las secuencias

Las secuencias se compararon con los genomas de referencia de *Macradenia brassavolae* (HQ219250.1); *Macroclinium xiphophorum* (HQ219252.1); *Maxillaria aciantha* (DQ209876.1); *Notylia incurva* (HQ219253.1); *Notyliopsis beatricis* (HQ219254.1); *Oliveriana ortizii* (HQ219262.1); *Oncidium cultratum* (HQ219257.1); *Oncidium fuscatum* (HQ219259.1); *Oncidium ornithorhynchum* (HQ219256.1); *Otoglossum globuliferum* (HQ219258.1); *Santanderella amado-rinconiana* (HQ219251.1); *Teligopon nervosus* (HQ219263.1); *Trichocentrum carthagenense* (HQ219264.1); *Trichocentrum lanceanum* (HQ219255.1); *Trichocentrum pulchrum* (HQ219261.1) reportados en GenBank.

Las secuencias se analizaron con estos genomas puesto que todos pertenecían a la subtribu Oncidiinae y habían sido los reportados anteriormente por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, y se buscaba observar si se presentaban clados o agrupamientos monofiléticos.

Se utilizó el programa Chromas Lite[®] para editar las secuencias y obtener los electroferogramas. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas por medio del programa MEGA[®] en el que se construyeron árboles de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML), para así poder cumplir con el tercer objetivo específico.

7. RESULTADOS

La extracción se realizó por órganos separados, así: del exsicado del año 2003 se encontraba sólo flor; del exsicado del año 1989, flor y raíz; del exsicado del año 1968, también flor y raíz; del

exsicado del año 1801-1802, sólo fragmentos de hoja. La cuantificación mostró mayor cantidad de ADN en las flores que en raíz y hoja (Tabla 1).

Respecto a la relación 260/280, la mayoría de valores se ubicaron muy cerca del rango óptimo (1,8) pero no dentro de este (Tabla 1), de lo cual se podría deducir que el ADN obtenido es de calidad media y que su contaminación es baja, excepto la raíz de la muestra del año 1968 que superó los 2,2, lo cual indicaría que hay contaminación con polifenoles, polisacáridos o ARN.

En cuanto al extraído del año 2003 con el procedimiento de extracción 2 y a la hoja de 1801-1802 con el procedimiento de extracción 1, se encontraron dentro del rango óptimo, mientras que en la relación 260/230, la mayoría de los valores son menores a 2,0, indicando contaminación con proteínas, excepto en la hoja de 1801-1802 con un valor de 2,01 (Tablas 1 y 2).

Estas extracciones presentaron una concentración de ADN entre 2,8 y 59,2 ng/ μ L (Tabla 1) y en todos los casos se evidenciaron amplificaciones, lo que indica que un tejido de 5 mg, proveniente de un exsicado conservado en condiciones normales de herbario, es suficiente para lograr una buena cantidad y calidad de ADN de hasta una antigüedad de 200 años. Sin embargo, si se observa la cantidad de ADN de los extraídos en la Tabla 1, hay notorias diferencias entre estos; aun así se reflejaron las amplificaciones con bandas brillantes de entre 100 y 400 pb en los geles de agarosa correspondientes.

Por otro lado, en algunas PCRs realizadas se observó que el control negativo también mostraba un producto de amplificación en el gel, lo que reflejaba una contaminación de los implementos o reactivos utilizados en la PCR, o que existía contaminación cruzada al sembrar en los pozos del gel de agarosa, por lo cual se realizaron cambios tanto en la esterilización del sitio de trabajo, como en la siembra de los pozos, sembrando pozo de por medio con el producto amplificado, llenando el del medio con agua destilada; finalmente se encontró que se estaba dando una contaminación cruzada con los extraídos, puesto que las puntas que se estaban utilizando en la micropipeta carecían de filtro y al cambiarlas por puntas con filtro, los controles negativos no amplificaron más.

Se observó que para los especímenes del Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana (2003, 1989 y 1968), la cantidad del ADN extraído fue independiente a la fecha de la cual fueron

colectados, puesto que se observó mayor cantidad de ADN en el espécimen (flor) del año 1968, colectado hace aproximadamente 47 años con 59,2 ng/μL, que en el espécimen (flor) del año 2003, el cual sólo cuenta con alrededor de 12 años de haber sido colectado, presentando una concentración de 15,7 ng/μL (Tabla 1), utilizando el procedimiento de extracción 1.

Por otro lado, se realizó una prueba con la enzima MangoTaq DNA polimerasa para ver si era posible diluirla en agua y obtener los mismos resultados de la Taq sin diluir, esto debido a que se estaba agotando la solución stock de esta enzima. Se diluyeron 5 μL de la Taq en 20 μL de agua estéril y se realizaron dos PCR, en la que una contenía la Taq sin diluir y la otra la Taq diluida, siendo las demás condiciones las mismas y utilizando 2 μL de ADN de otras especies de orquídeas, extraído previamente a este estudio y que no corresponde ninguna a *O. ornithorhynchum*, dando como resultado bandas brillantes en la que la Taq no fue diluida, mientras que las bandas obtenidas en la que la Taq fue diluida salieron muy tenues y otras no se evidenciaron (Figura 11). En esta prueba solo se pretendía observar las amplificaciones y no se procedió a secuenciar.

En cuanto a la secuenciación de los fragmentos de 140 pb y 371 pb, se puede observar en los electroferogramas (Figuras 26-30), que los picos de todas las secuencias son legibles, en donde cada uno indica un nucleótido en específico con una altura suficiente. Posteriormente, la identidad de las secuencias se determinó por medio de la función de BLAST en NCBI, con el parámetro Mega Blast, observando las especies con mayor porcentaje de similitud. En el caso de la secuencia de la orquídea que cuenta con más de 200 años se observaron 4 especies del mismo género, *Oncidium*, que tenían 99% de similitud: *Oncidium heterodactylum* (FJ565021.1), *Oncidium heteranthum* (FJ565020.1), *Oncidium cultratum* (FJ565016.1) y *Oncidium retusum* (FJ564788.1).

Las figuras 26 y 27 corresponden a una parte de las secuencias de los exsiccados de los años 2003 y 1989 respectivamente, utilizando los extraídos obtenidos por medio del procedimiento de extracción 2, mientras que las figuras 28, 29 y 30, por medio del protocolo de extracción 1, mostrando en ambas los picos legibles con suficiente altura, lo cual indica que son secuencias de muy buena calidad.

Finalmente, las secuencias fueron analizadas por el programa MEGA[®], en el que se construyeron los árboles filogenéticos Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML).

Como se puede ver en la figura 16, tres de las cuatro secuencias de los exsicados con productos de 140 pb (2003, 1968 y 1801-1802), se encuentran agrupadas con la secuencia ya registrada en GenBank de *Oncidium ornithorhynchum*, mientras que para el producto del año 1989, esta se encuentra como outgroup junto a *Maxillaria aciantha*.

En la figura 17, se observa el árbol construido de MP, en donde se vuelven a agrupar las secuencias de los años 2003 y 1968 con la de *O. ornithorhynchum*, junto a las especies *Notylia incurva* y *Trichocentrum pulchrum*. Mientras que las secuencias de los años 1989 y 1801-1802, se reúnen en otro clado independiente.

En los árboles de MP y ML, los valores de bootstrap entre 70 y 90 indican un buen soporte del clado, mientras que los valores superiores a 90 indican un clado fuertemente soportado.

En la figura 18 se observa el árbol creado por ML. En este, nuevamente las secuencias de los exsicados de los años 1968 y 2003 están agrupadas con la secuencia ya registrada en GenBank de *O. ornithorhynchum*, con un valor de bootstrap de 93, mientras que *Trichocentrum pulchrum* presenta un valor de bootstrap de 0 (el cual muestra que no hay ningún tipo de soporte de filogenia). *Noylia incurva* presenta un valor de 81, y las secuencias de los exsicados de 1989 y 1801-1802 aparecen agrupadas nuevamente en una posición independiente.

En la figura 19 se observa el árbol NJ con el *contig* creado con las secuencias de 140 y 371 pb del exsicado de más de 200 años. En este árbol, este exsicado es agrupado junto a la especie *Oncidium cultratum*, formando un mismo clado. En cuanto al árbol de MP (Figura 20) creado con este mismo *contig*, se puede ver que forma nuevamente un clado con la misma especie nombrada, presentando un valor de 99 después de 1000 réplicas de bootstrap, tal y como se observa en la figura 21 en el árbol de ML, siendo respaldado en este caso por un valor de 100 para el clado que incluye el exsicado de más de 200 años y el *O. cultratum*,

Tabla 1. Datos de la concentración total de ADN y relaciones 260/280, 260/230 de las muestras extraídas con el procedimiento de extracción 1.

Muestra	Año	Concentración de ADN (ng/μL)	260/280	260/230
Flor	2003	15,7	1,60	0,61
Flor	1989	13,3	1,55	0,67
Raíz	1989	2,8	1,69	1,19
Flor	1968	59,2	1,74	1,16
Raíz	1968	6,3	2,37	1,86
Hoja	1801 - 1802	5,5	2,06	2,01

Tabla 2. Datos de la concentración total de ADN y relaciones 260/280, 260/230 de las muestras extraídas con el procedimiento de extracción 2.

Muestra	Año	Concentración de ADN (ng/μL)	260/280	260/230
Flor	2003	29,1	1,83	0,38
Flor	1989	57,3	1,74	0,48

Tabla 3. Comparación de procedimientos de extracción 1 y 2.

Muestra	Año	Concentración de ADN (ng/μL) Procedimiento 1	Concentración de ADN (ng/μL) Procedimiento 2
Flor	2003	15,7	29,1
Flor	1989	13,3	57,3

Tabla 4. Perfil térmico y condiciones de PCR.

Tamaño gen <i>matK</i>	Perfil térmico	Condiciones de PCR
140 pb	95°C por 3 min; (95°C por 30 s, 50,4°C por 30 s, 72°C por 48 s) x 39 ciclos; 72°C por 5 min	Volumen final de 30 µL: 6 µL Buffer (5x), 3 µL de cada primer (5 mM), 1 µL MgCl (50 mM), 0,6 µL DNTPs (10 mM), 0,3 µL MangoTaq DNA polimerasa Bioline, 3 µL de ADN, 13,2 µL agua estéril
371 pb	95°C por 3 min; (95°C por 40 s, 50,3°C por 40 s, 72°C por 58 s) x 40 ciclos; 72°C por 5 min	Volumen final de 30 µL: 4,5 µL Buffer (5x), 1 µL de cada primer (5 mM), 3 µL MgCl (50 mM), 1 µL DNTPs (10 mM), 0,7 µL MangoTaq DNA polimerasa Bioline, 3 µL de ADN, 15,8 µL agua estéril

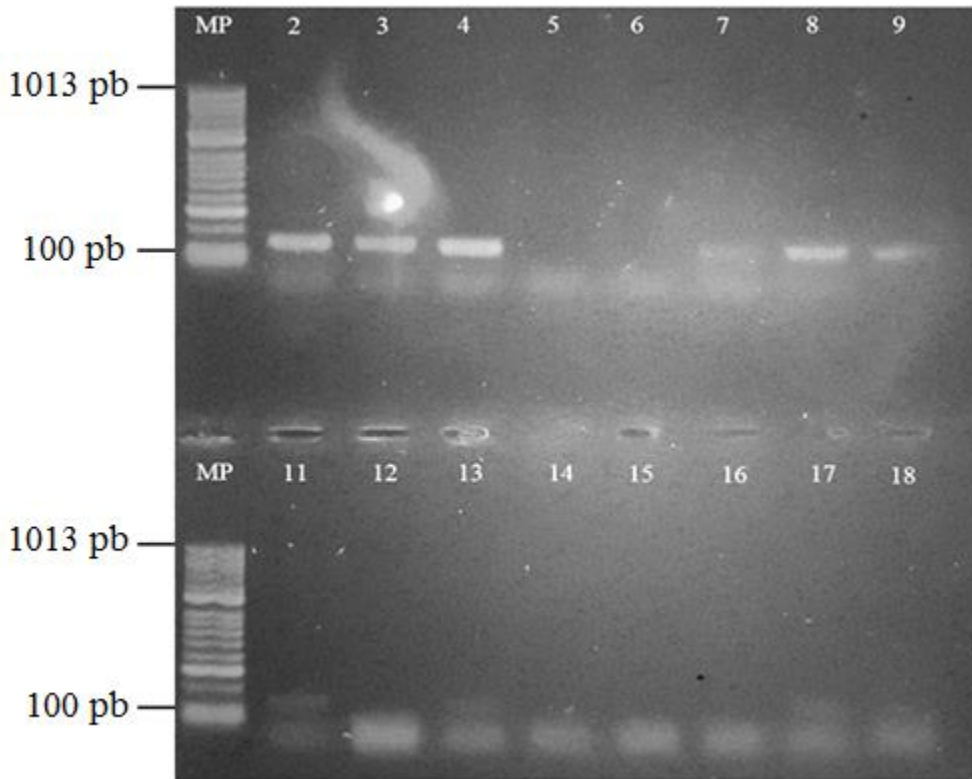


Figura 11. Productos de PCR en gel de agarosa. Arriba con la Taq sin diluir y abajo con la Taq diluida. Arriba: MP (marcador de peso molecular); 2, 3, 4, 7, 8 (extraídos), 5, 6 (control negativo), 9 (control positivo); abajo: 11, 12, 13, 16, 17 (extraídos), 18 (control positivo), 14, 15 (control negativo).

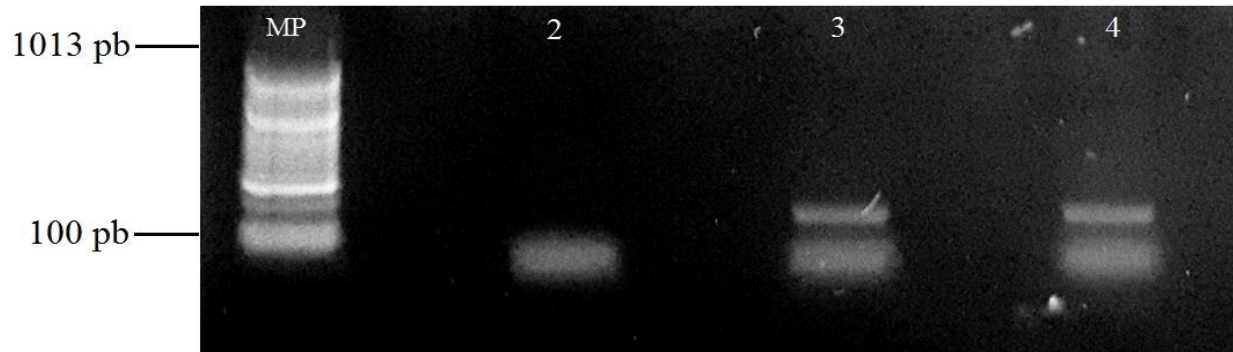


Figura 12. Productos de PCR en gel de agarosa, utilizando los primers 556R y 390F. **MP** (marcador de peso molecular); **2** (control negativo); **3** (año 2003); **4** (año 1989).

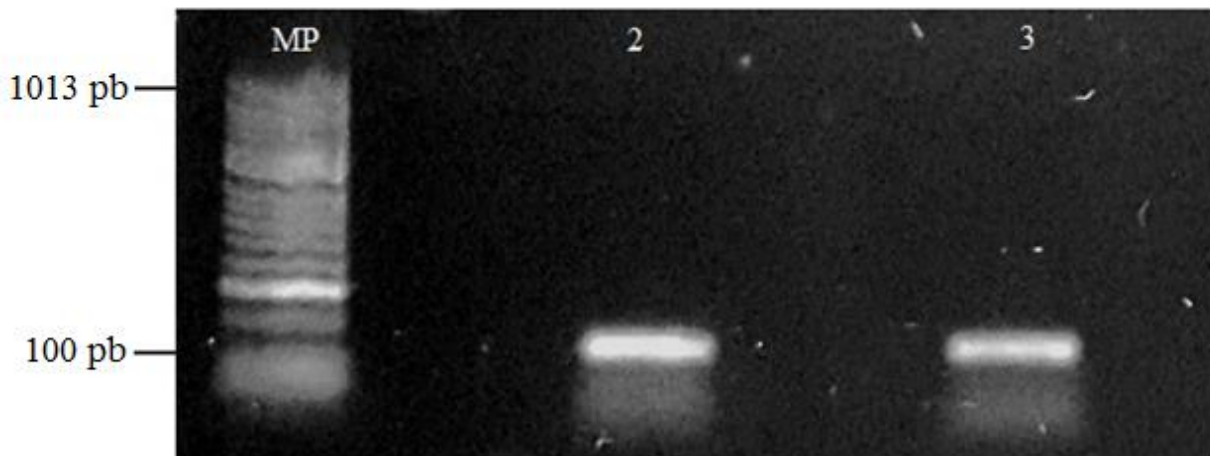


Figura 13. Productos de PCR en gel de agarosa, utilizando los primers 556R y 390F. **MP** (marcador de peso molecular); **2** (año 1968); **3** (control positivo).

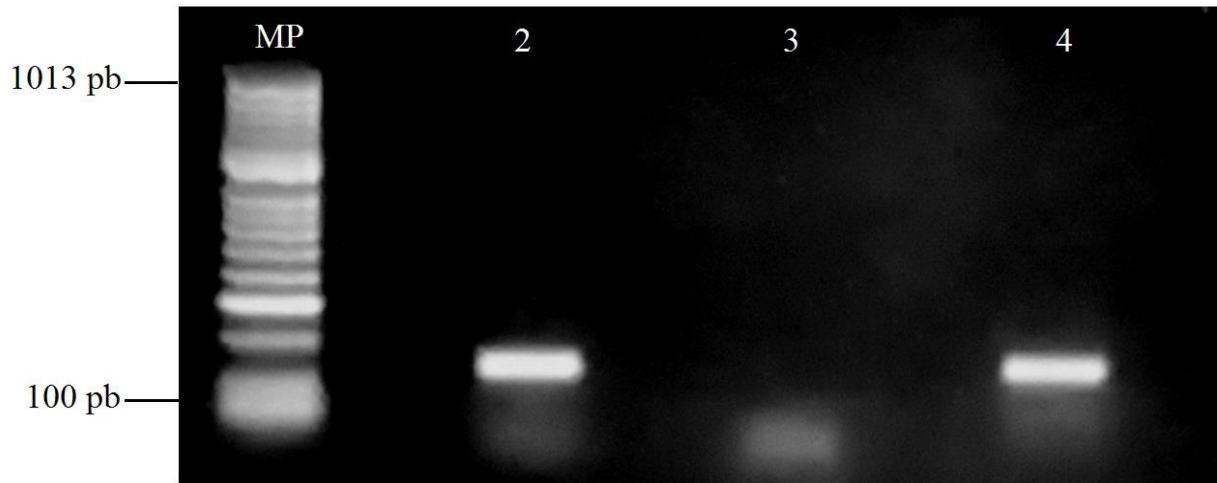


Figura 14. Productos de PCR en gel de agarosa, utilizando los primers 556R y 390F. **MP** (marcador de peso molecular); **2** (año 1801-1802); **3** (control negativo); **4** (control positivo).

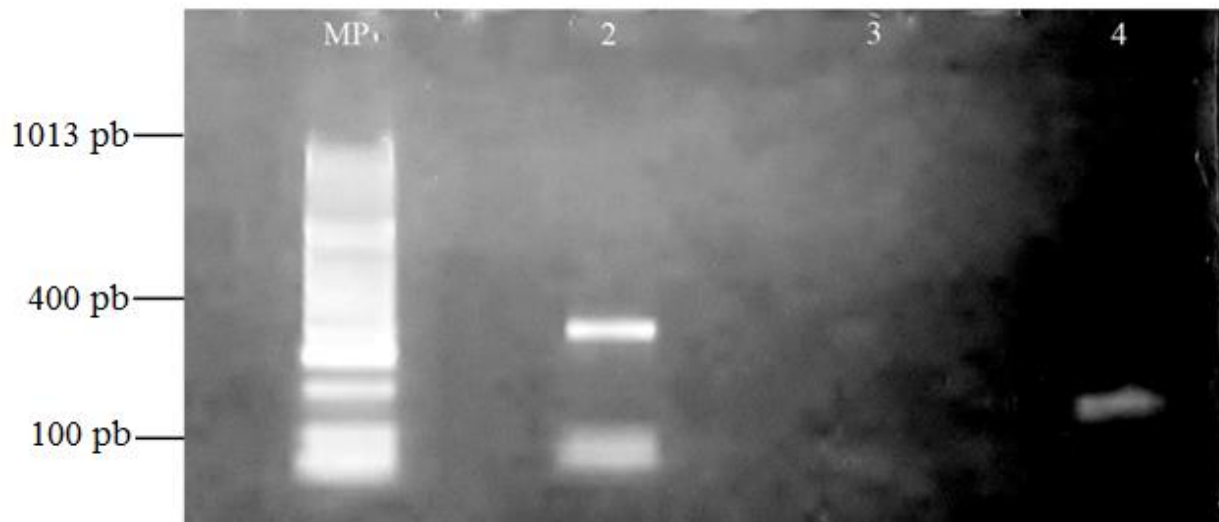


Figura 15. Productos de PCR en gel de agarosa, utilizando los primers 556R, 390F y 163F. **MP** (marcador de peso molecular); **2** (año 1801-1802 con 556R y 163F); **3** (control negativo); **4** (año 2003 con 556R y 390F).

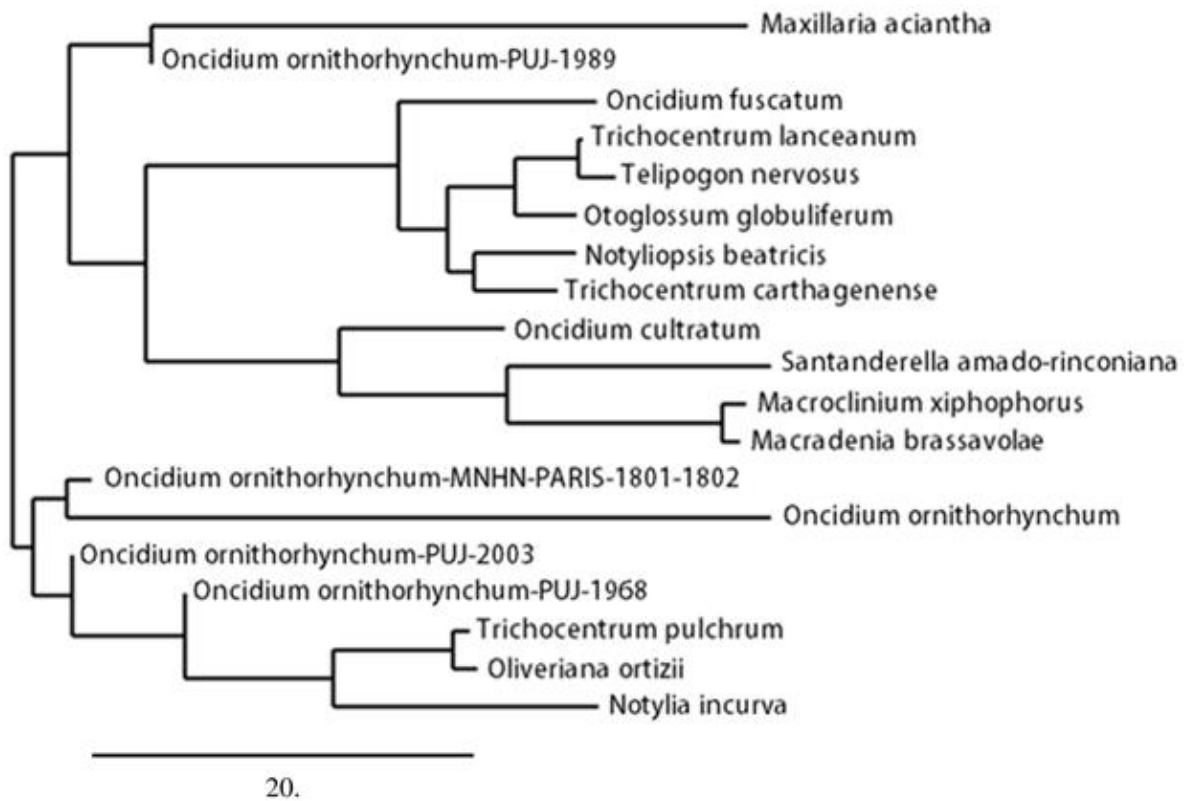


Figura 16. Árbol de distancias por Neighbor-Joining con las secuencias de 140 pb de los 4 exsiccados, más 15 secuencias de orquídeas reportadas en GenBank.

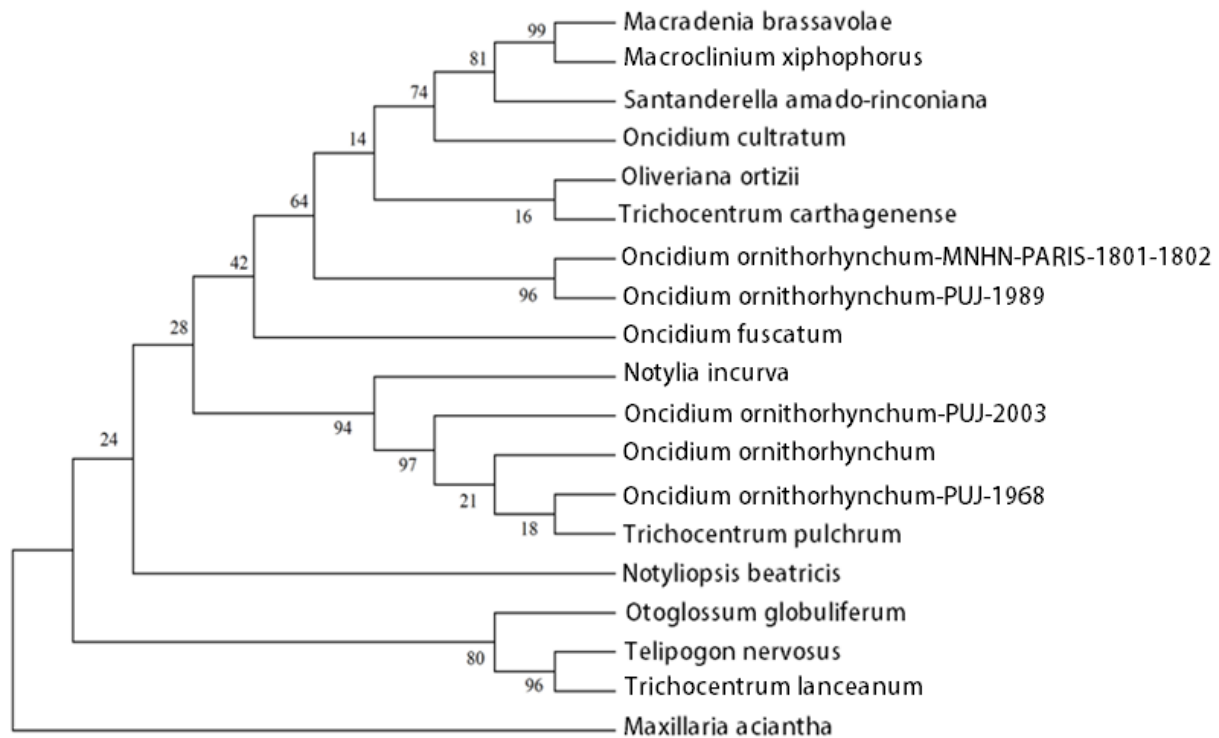


Figura 17. Árbol de máxima parsimonia con las secuencias de 140 pb de los 4 exicados, más 15 secuencias de orquídeas reportadas en GenBank. Los números corresponden a un consenso de las veces en que cada nodo del árbol se presentó después 1000 réplicas de bootstrap.

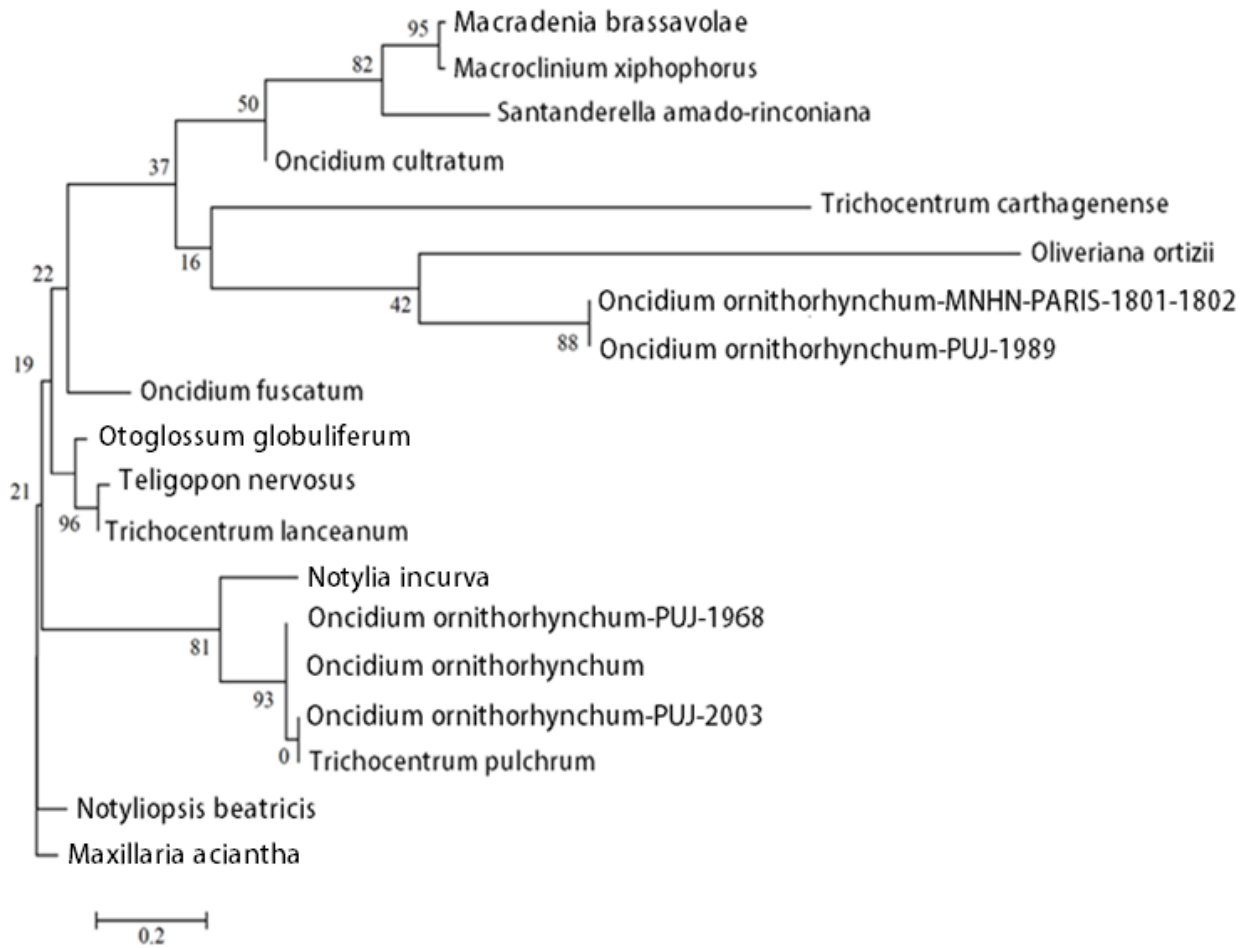


Figura 18 Árbol de máxima verosimilitud o likelihood con las secuencias de 140 pb de los 4 exsiccados, más 15 secuencias de orquídeas reportadas en GenBank. Los números corresponden a un consenso de las veces en que cada nodo del árbol se presentó después 1000 réplicas de bootstrap.

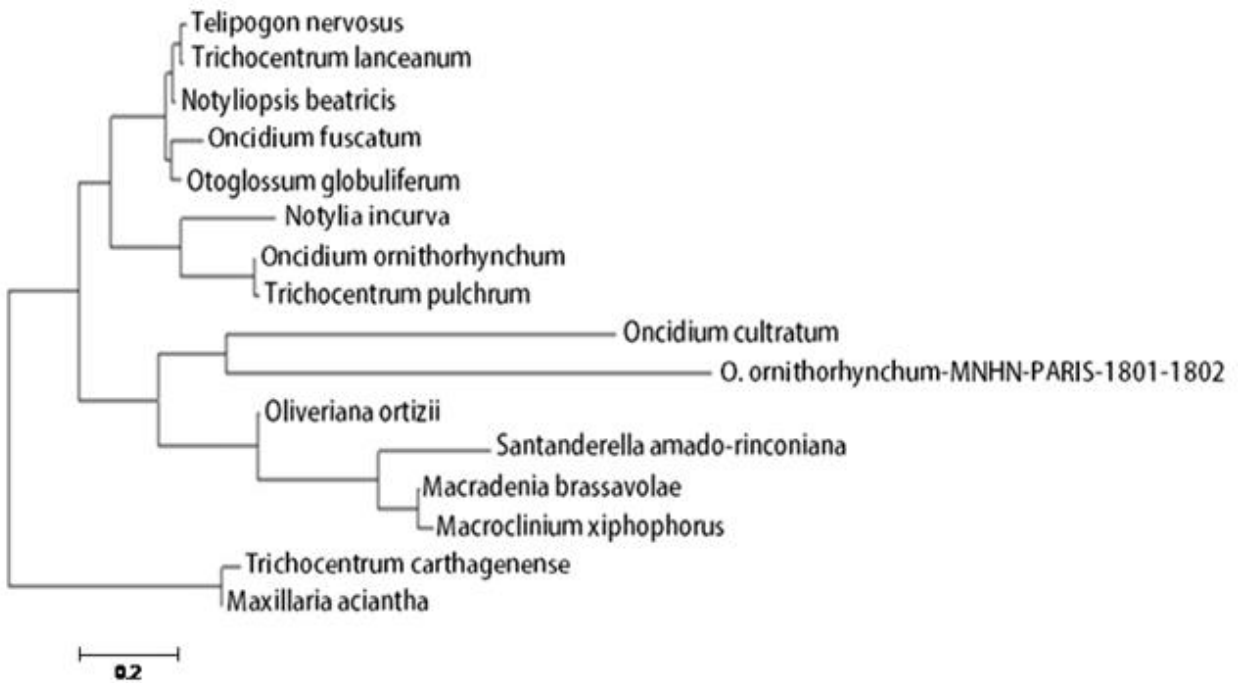


Figura 19. Árbol de distancias por Neighbor-Joining con el *contig* de 371 pb del exsiccado del herbario de París, más 15 secuencias de orquídeas reportadas en GenBank.

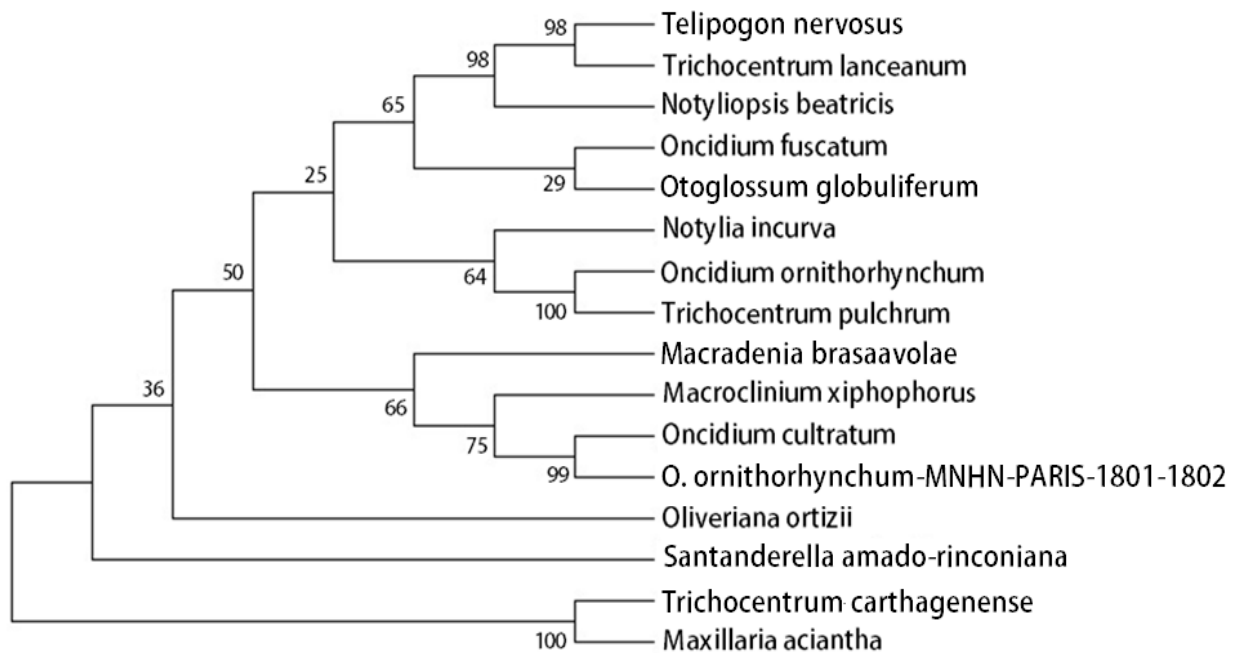


Figura 20. Árbol de máxima parsimonia con el *contig* de 371 pb del exsicado del herbario de París, más 15 secuencias de orquídeas reportadas en GenBank. Los números corresponden a un consenso de las veces en que cada nodo del árbol se presentó después 1000 réplicas de bootstrap.

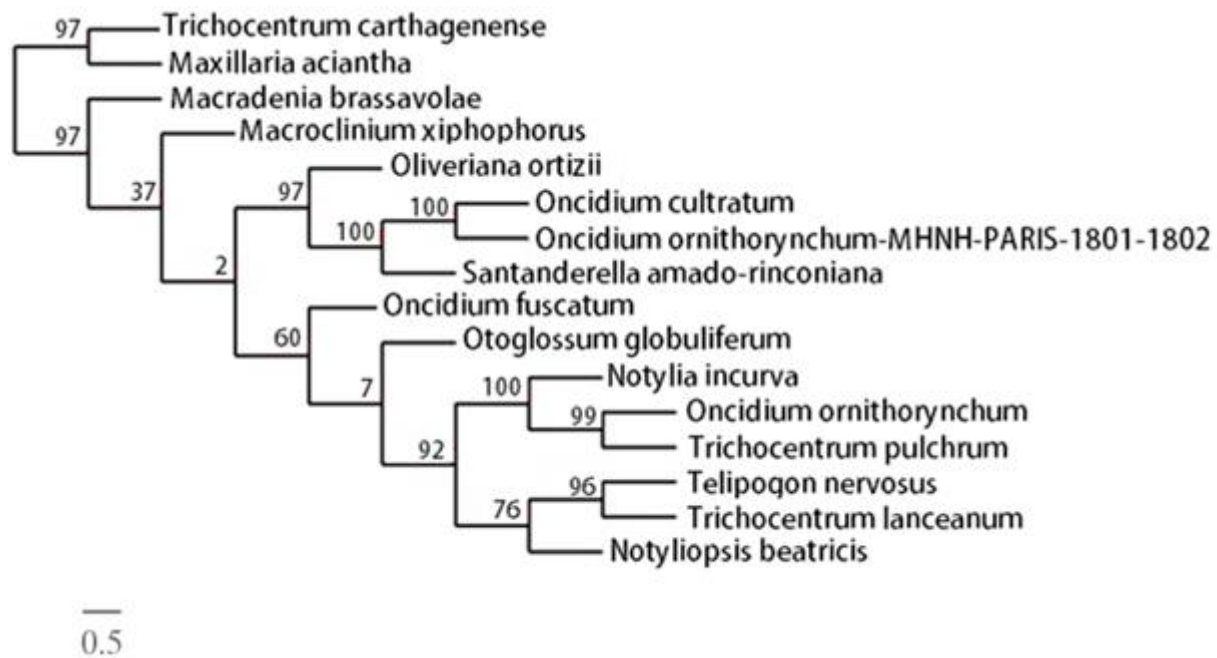


Figura 21 Árbol de máxima verosimilitud o likelihood con el *contig* de 371 pb del exsiccado del herbario de París, más 15 secuencias de orquídeas reportadas en GenBank. Los números corresponden a un consenso de las veces en que cada nodo del árbol se presentó después 1000 réplicas de bootstrap.

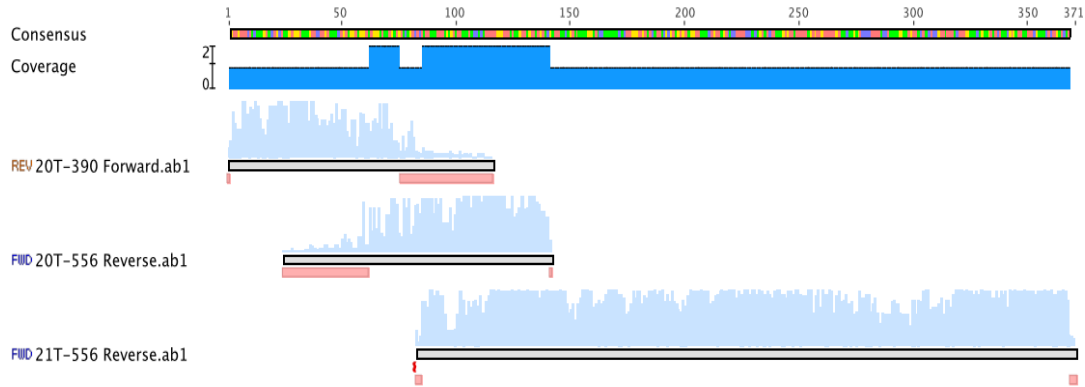


Figura 25. Contig de las secuencias obtenidas con 140 y 371 pb del exsicado del año 1801-1802.

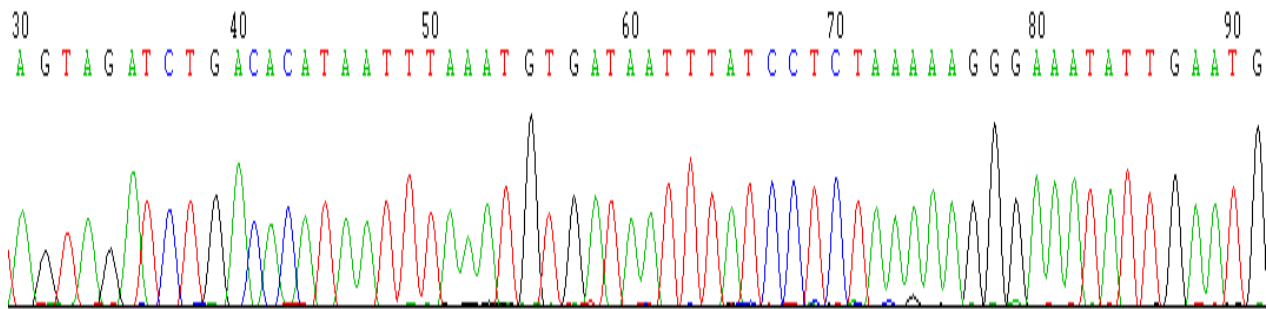


Figura 26. Parte de la secuencia de 140 pb del gen *matK* del exsicado del año 2003.

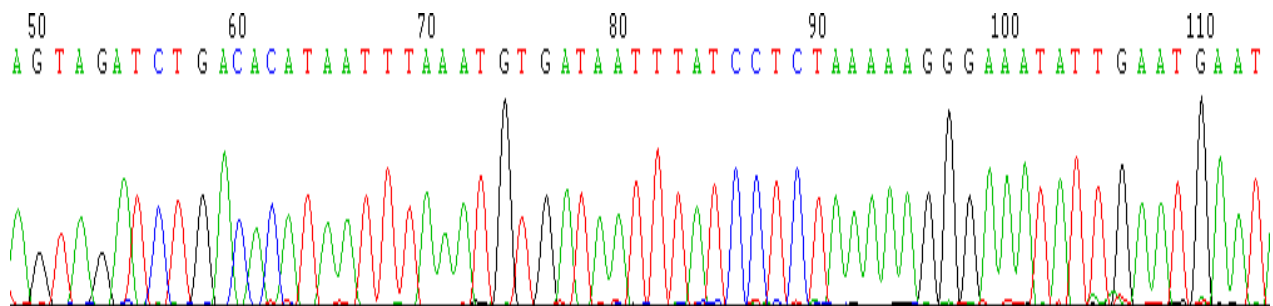


Figura 27. Parte de la secuencia de 140 pb del gen *matK* del exsicado del año 1989.

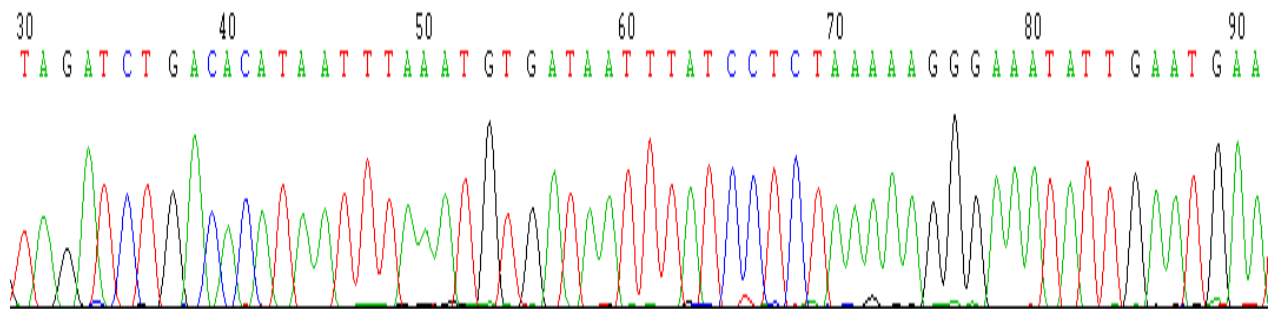


Figura 28. Parte de la secuencia de 140 pb del gen *matK* del exsicado del año **1968**.

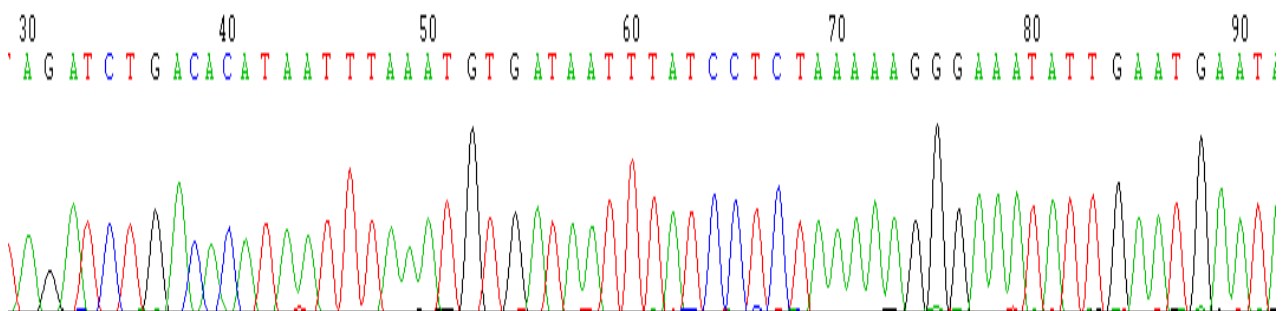


Figura 29. Parte de la secuencia de 140 pb del gen *matK* del exsicado del año **1801-1802**.

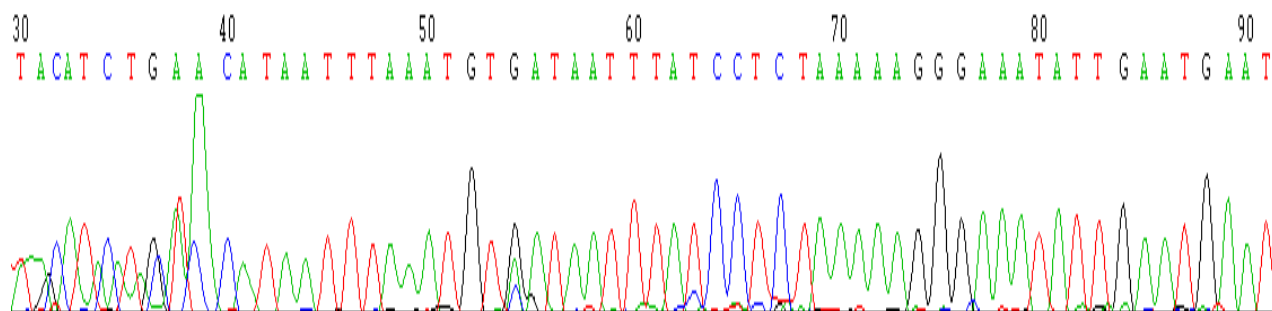


Figura 30. Parte de la secuencia de 371 pb del gen *matK* del exsicado del año **1801-1802**.

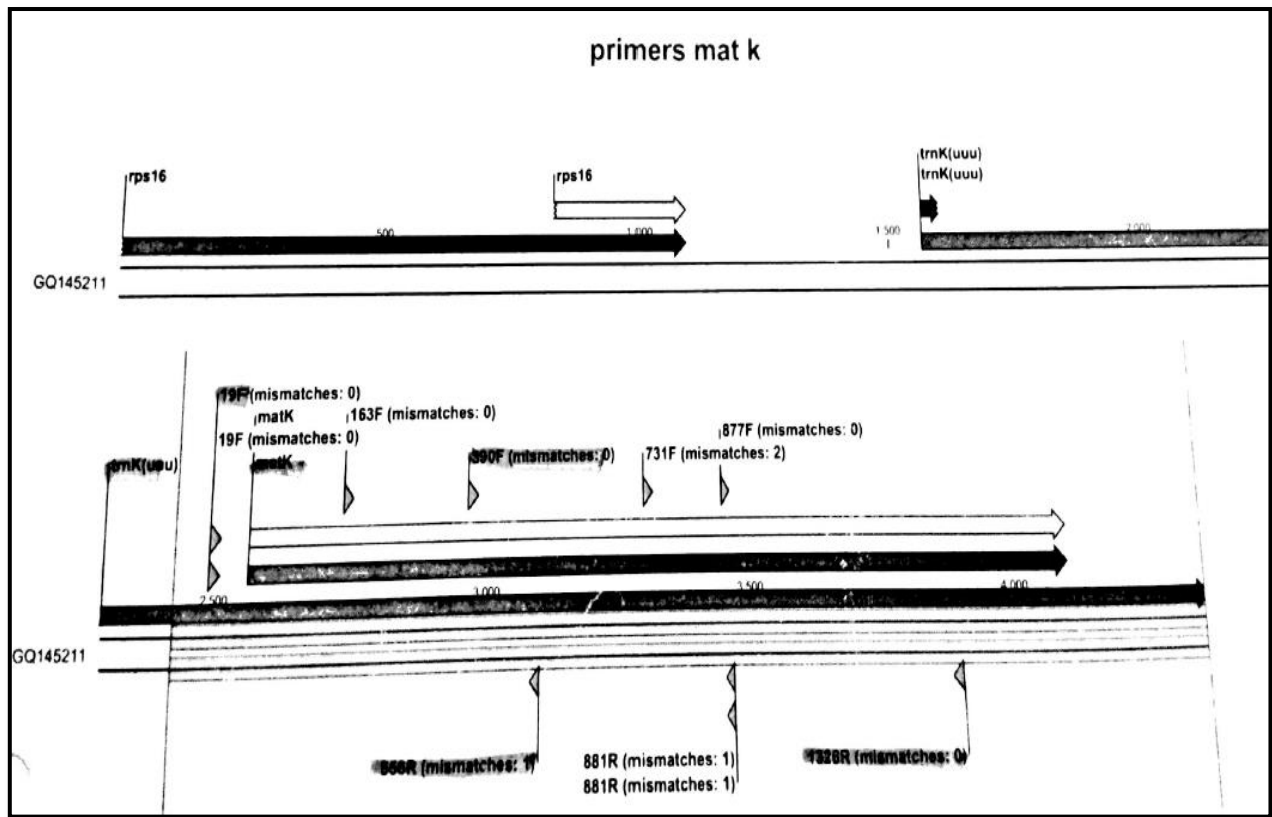


Figura 31. Primers diseñados para amplificar el gen *matK*.

8. DISCUSIÓN

Los estudios realizados con ADN antiguo (ADNa) normalmente presentan inconvenientes debido a su eventual degradación y presencia de inhibidores, lo que se ve reflejado en una PCR que no es eficiente, obstaculizando las investigaciones relacionadas con estudios evolutivos y forenses (Yang *et al.*, 1997).

La PCR es una técnica muy sensible, así que las impurezas que se encuentran en los extraídos de ADN la inhiben, por lo que se considera necesario purificar la muestra aunque este paso suplementario conlleve mayor pérdida del ADN del que se partió (Hagelberg *et al.*, 1989; Kurosaki *et al.*, 1993). Esto ha llevado a que exista una gran desconfianza sobre la autenticidad de los resultados con ADNa (Gilbert *et al.*, 2003), puesto que aunque estos se sometan a rigurosos protocolos, se pueden seguir dando contaminaciones en los productos de amplificación que se evidencian en electroferogramas con picos dobles e ilegibles. Estas contaminaciones se identifican también normalmente cuando se repiten las amplificaciones y sus productos resultan diferentes (Pääbo 1989). En este estudio, se evidenció la ausencia de contaminación puesto que: 1) los controles negativos no presentaron amplificaciones, 2) los resultados al repetir las amplificaciones eran los mismos y 3) los electroferogramas presentaban picos legibles y ausencia de picos dobles.

Las limitadas cantidades de ADN endógeno que sobrevive a la degradación *post mortem* y los daños que se presentan en este en especímenes antiguos, hacen que la eficiencia para aislar ADNa y su adecuada amplificación por PCR se conviertan en factores críticos para su posterior análisis (Yang *et al.*, 1997). Continuamente estos daños son subestimados, pero estos pueden provocar que técnicas como la PCR sean imposibles de realizarse, o provocar secuencias erróneas, lo cual conlleva a una incorrecta interpretación de los resultados obtenidos (Pääbo 1989).

Teniendo en cuenta las limitaciones expuestas, en este estudio se realizaron 3 controles negativos por cada PCR efectuada, para así tener mayor seguridad de que ninguno de los componentes de la reacción se convirtiera en factor de contaminación. En las primeras amplificaciones los controles

negativos fueron positivos, lo cual indicaba que existía contaminación, sin saber de dónde provenía esta. Era posible que durante el proceso de preparación de la reacción para la PCR, por un error de manejo, existiera contaminación cruzada entre las muestras que se trabajaron, o fuera consecuencia de un error de pipeteo al sembrar el producto de la reacción en el gel de agarosa. También era posible que hubiera una mala esterilización del área y materiales de trabajo, existiendo ADN procedente de alguna muestra produciendo la contaminación. Finalmente, se pudo comprobar que existía contaminación cruzada entre las muestras puesto que las puntas de las micropipetas no tenían el filtro que previene que los contaminantes ingresen dentro de la pipeta dando resultados incorrectos en las muestras subsiguientes. En consecuencia, al utilizar puntas con filtros el problema de la amplificación de los controles negativos cesó.

Si bien los controles negativos son muy importantes, estos no siempre sirven para detectar moléculas que puedan ser contaminantes en la PCR, puesto que existe también el ‘efecto carrier’ de moléculas que se encuentren en el laboratorio, que, por ejemplo, impregnen los tubos de plástico y que puedan no aparecer en los controles negativos pero puedan transportar moléculas que estén disponibles para la amplificación (Handt *et al.*, 1994).

Al realizar la prueba de si era posible diluir la Taq polimerasa en agua estéril y aun así obtener los mismos resultados de una polimerasa no diluida, se obtuvieron resultados significativos por cuanto esta prueba no fue exitosa, y no se encontró en la literatura que otros investigadores lo hayan realizado hasta el momento, ya que siempre es utilizada la solución stock. De esta manera, se podría deducir, para la presente prueba, que la muestra amplificada resultaba muy diluida, ya que además se le adicionó agua estéril para completar un volumen de 30 μ L. La mayoría de bandas no se visualizaron, y las que pudieron verse eran muy tenues, mientras que las bandas correspondientes a las muestras donde la polimerasa no fue diluida se observaron brillantes, excepto en los controles negativos. En conclusión, no se recomienda realizar este procedimiento, y no es manera de evitar amplificaciones inespecíficas.

Como se dijo anteriormente, la PCR es una técnica muy sensible, por lo que, en presencia de concentraciones adecuadas de Taq polimerasa, con muy poca cantidad de ADN que esté contaminando una muestra, esta se amplificará. Esto se debe a que en cada ciclo se duplica la

cantidad de ADN correspondiente al fragmento a amplificar, así que aunque exista muy poco ADN se obtendrá la cantidad suficiente para que esta sea visualizada (Pérez, Universidad Politécnica de Valencia). De igual forma, la existencia de amplicones previos en el ambiente del laboratorio donde se hace la PCR puede producir contaminaciones inespecíficas que deben ser evitadas limitando el acceso al área pre-PCR de material que haya estado en contacto con el área de post-PCR.

La preservación del ADN depende del tipo de material biológico en cuestión y, en el caso de los exsiccados, de qué tan rápido fue secado, lo cual es más importante e influye más que la edad del espécimen (Savolainen *et al.*, 1995; Drábková & Kirschner 2002; Jankowaik *et al.*, 2005). Químicos desinfectantes, plaguicidas (Metsger & Byers 1999), o secar el espécimen en un horno microondas (Hall 1981; Bacci *et al.*, 1983, Hill 1983), son algunos de los factores que afectan negativamente la calidad del ADN de especímenes de herbarios, conduciendo a una mayor degradación de este. También, la calidad del ADN, más allá de los factores ya mencionados, depende del estado de desarrollo de la planta a la hora del secado, siendo, eventualmente, la antigüedad del espécimen lo menos importante (Rogers & Bendich 1985).

En el estudio realizado por Särkinen *et al.*, (2012), se evidenció cómo la preparación de una planta afecta la calidad de su ADN. Normalmente, los especímenes preservados en herbarios son secados con alcohol o con aire caliente artificial, mientras que aproximadamente antes del año 1880, estos eran secados al aire, sin ningún tipo de calor o alcohol. En este estudio encontraron que los especímenes que fueron secados utilizando alcohol, presentaban ADN altamente fragmentado y poca cantidad de este, que en comparación a los especímenes que fueron secados con aire, lo que también se evidenció con PCR fallidas (Särkinen *et al.*, 2012).

Así se puede entender por qué, en el presente trabajo, el ADN extraído del exsiccado del año 1968 mostró mayor concentración de ADN que el de las otras plantas más recientes, probablemente por el hecho de cómo este fue preservado. El herbario de la Pontificia Universidad Javeriana no guarda el registro de cómo fueron secados estos exsiccados, y si algún tipo de alcohol o químico fue adicionado, por lo que se puede deducir que la planta del año 1968 pudo no tener adicionada alguna sustancia que aumentara la degradación de su ADN, pudiendo haber sido secada “a la

antigua”, es decir al aire y sin calor artificial, dando como resultado una mayor cantidad de ADN en su cuantificación (Tabla 1).

Los reactivos utilizados en la extracción deben ser los más adecuados para que se logre obtener la mayor cantidad y calidad de ADN posible. Por lo tanto, en este estudio se utilizó un protocolo de extracción empleado previamente con éxito, el cual contiene Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que es un detergente contenido en el tampón de extracción, el cual provoca lisis de las membranas capturando lípidos y proteínas, llevando a que se libere el ADN, y también contiene el β -mercaptoetanol, que es un agente reductor que remueve taninos y polifenoles (Somma, Joint Research Center – European Comission).

En el procedimiento de extracción 1, se realizaron cuatro lavados, dos de estos con etanol al 70% y los restantes con etanol absoluto (99%). Aunque con los lavados hay pérdida inminente de ADN, estos no deben ser omitidos puesto que de otra forma el extraído quedará con impurezas que se convierten en inhibidores de la PCR. El etanol utilizado para eliminar efectivamente las impurezas también afecta la cantidad de ADN obtenido: por esto, en Miller *et al.*, (1999) se evaluaron distintos métodos de purificación de ADN, entre estos, columnas Sephadex, como las utilizadas en el procedimiento de extracción 2 del presente estudio. Miller encontró a dichas columnas como el método más efectivo para remover sustancias inhibitoras de la PCR y disminuir la pérdida de ADN. Lo anterior se puede corroborar en el presente trabajo (Tabla 3), en donde se compara la cantidad del ADN extraído de los exsicados de los años 2003 y 1989 utilizando los dos procedimientos de extracción.

Para la extracción de estas 2 muestras (2003 y 1989), se utilizó la misma cantidad de tejido (5 mg), observándose una evidente pérdida de ADN en el procedimiento 1. En el extraído del año 2003 se puede ver casi el doble de ADN por medio de las columnas de purificación, mientras que para el extraído del año 1989 se observa casi 4 veces más de ADN.

Por otro lado, el tipo de polimerasa es muy importante en el rendimiento de la PCR. Telle & Thines (2008), probaron 15 polimerasas, en donde la MangoTaq que fue la utilizada en el

presente estudio obtuvo el mejor desempeño y fue la única que logró amplificar una región de 620 pb de una muestra de 102 años.

Telle & Thines (2008), y Lehtonen & Christenhusz (2010), obtuvieron secuencias de entre 430 y 620 pb en especímenes de herbarios de hasta 172 años, mientras que en Andreassen *et al.*, (2009), lograron obtener secuencias de 800 pb de un exsicado que también cuenta con más de 200 años, y en Ames & Spooner (2008), obtuvieron secuencias de 440 pb de un fragmento de papa del siglo XVII.

Con estos antecedentes y para empezar, conociendo el riesgo de fragmentación del ADN, se utilizaron nuevos primers diseñados previamente a este estudio (Figura 31), los cuales amplificaban una región de 140 pares de bases del gen *matK* (390F, 556R). Estos fueron utilizados para amplificar el ADN extraído de los cuatro especímenes provenientes de herbarios. En todos se evidenciaron amplificaciones con bandas visibles y brillantes, y secuencias claras con picos unitarios claramente legibles en los electroferogramas.

Se utilizaron también primers que amplificaban una región de 371 pares de bases del gen *matK* (163F, 556R), para el extraído del espécimen de más de 200 años, el cual amplificó correctamente, evidenciándose una banda brillante (Figura 15) y su secuencia también contaba con picos legibles para cada nucleótido, indicando que el ADN de este espécimen no estaba tan fragmentado como se esperaba por tener más de 200 años.

Se construyó un *contig* con las secuencias *forward* y *reverse* de 140 pb, junto a la secuencia *reverse* de 371 pb, debido a que los extremos de las secuencias generalmente no presentan picos legibles, siendo necesario recortar estos fragmentos. Gracias al *contig* se pudo obtener una secuencia legible de 371 pb y así conseguir una lectura más precisa.

En cuanto a las secuencias obtenidas, estas fueron primero analizadas en BLAST, con el parámetro Mega Blast, en donde se observaron los porcentajes de similitud que tenían con otras especies. Posteriormente, fueron analizadas por el programa MEGA[®] y se construyeron árboles de Neighbor-Joining, máxima parsimonia y máxima verosimilitud.

Aunque las secuencias obtenidas de 140 pb eran de buena calidad y con picos legibles, esta es una región muy corta del gen *matK*, el cual cuenta con alrededor de 1450 pb de longitud (Hollingsworth *et al.*, 2009), por lo que muchas especies presentaban alta identidad en esta misma región, alrededor de 100 especies. Este hecho se pudo observar al realizar un análisis de estas secuencias en BLAST, puesto que presentaban “hits”, o identidad, con gran cantidad de especies de orquídeas. Mientras que con la secuencia de 371 pb obtenida del exsicado que cuenta con más de 200 años, la cual resulta en una longitud mayor al doble de la primera secuencia amplificada, se logró disminuir la cantidad de especies que muestran secuencias comunes en esta región. Con la ayuda de los programas mencionados, se editaron las secuencias de 140 pb y 371 pb del exsicado de más de 200 años, para poder sobrelaparlas y así crear fragmentos más largos (*contig*) que son de mayor utilidad en las inferencias filogenéticas (Figura 25).

Para editarlas y comparar varias especies, fue necesario recortar la mayor parte del gen *matK*, el cual pasó de tener una longitud de 1450 pb a una secuencia comparable de alrededor de 450-500 pb. Habiendo realizado esto, era más fácil alinear las secuencias de 371 pb del exsicado de más de 200 años, evitando que el programa utilizado tomara los eventuales vacíos en las diferentes especies como *gaps*, los cuales serían interpretados como pérdidas evolutivas.

Por otro lado, se utilizaron tres métodos de análisis filogenéticos: Neighbor-Joining (NJ), Maxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML). El primer método fue el de Neighbor-Joining (NJ), el cual consiste en identificar organismos de especies desconocidas (Hebert *et al.*, 2003). En este método se unen las secuencias que tengan una menor distancia genética (Saitou & Nei 1987), y son consideradas agrupaciones de miembros muy similares pero que no puede ser considerados clados ni grupos monofiléticos (Peña 2011).

El método NJ es usado en el “código de barras” (DNA barcode o DNA barcoding), el cual consiste en el análisis de una secuencia de ADN que permite la identificación de las especies de organismos conocidas y el descubrimiento de desconocidas (Hebert *et al.*, 2003). El código de barras ha sido más fácil de aplicar en animales que en plantas, debido a que el gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (*COI*) utilizado como código de barras (Min & Hickey 2007; Marín *et al.*, 2009; Hoyos *et al.*, 2012) tiene limitaciones debido a su baja variación genética en

plantas (Chase *et al.*, 2007). En consecuencia, se han propuesto genes alternativos para lograr códigos de barras en plantas, incluyendo el gen *matK* de cloroplastos (Li *et al.*, 2015).

En el segundo método utilizado para las cuatro secuencias que cuentan con 140 pb, fue el de máxima parsimonia (MP), en el que se construyen árboles filogenéticos que muestran el menor número de cambios evolutivos y en donde los caracteres tienen la misma influencia en su estructuración (Peña 2011).

El tercer método usado fue el de máxima verosimilitud o likelihood (ML), el cual calcula cada árbol posible que pueda ser derivado de los datos según el modelo de evolución que fue seleccionado. Además, calcula la longitud de las ramas de cada árbol (Huelsenbeck & Rannala 1997).

Las secuencias de 140 pb del exsicado del año 1989 tenían una pobre calidad, puesto que únicamente se contaba con la secuencia *reverse*, así que solo se tenía una pequeña parte de la información que proporcionaron las anteriores secuencias. Esto podría explicar por qué, en los árboles anteriores, esta no se agrupó con las demás de su especie, no porque no sea un *Oncidium ornithorhynchum*, sino porque la información proporcionada no es suficiente para ser agrupada en el mismo clado. En consecuencia, es necesario extraer, amplificar y secuenciar nuevamente fragmentos de este exsicado y realizar un nuevo análisis filogenético para corroborar su identidad, puesto que este exsicado no fue incluido en el trabajo de Mazo (2011).

En cuanto a los árboles de NJ, MP y ML con el *contig* creado con las secuencias de 140 y 371 pb del exsicado de más de 200 años, tanto en MP como en ML, se encuentra agrupado junto a la especie *Oncidium cultratum*, formando un mismo clado, presentando valores de 99 y 100 después de 1000 réplicas de bootstrap, siendo por lo tanto un fuerte soporte filogenético de parentesco. Por medio de estos valores, se puede excluir el que la especie del exsicado de París, que cuenta con más de 200 años, corresponda a un *Oncidium ornithorhynchum*.

Pese a que las secuencias de ADN obtenidas con marcadores moleculares son la principal fuente de datos para hacer una reconstrucción filogenética, se han llevado a cabo varios estudios en los que se considera que las clasificaciones taxonómicas no deben basarse únicamente en la similitud entre nucleótidos, sino también en la información brindada por los caracteres morfológicos y

anatómicos del fenotipo (Margulis & Guerrero 1991; Jenner 2004; Wiens 2004; Clement & Weiblen 2009). De esta manera, al incluir este tipo de caracteres se incrementa el soporte de los clados (Koehler *et al.*, 2002; Wortley & Scotland 2006).

En Orchidaceae se han realizado análisis cladísticos en donde son combinadas las secuencias de ADN y caracteres morfológicos, demostrando que la combinación de secuencias de ADN y morfología, incrementan la resolución de los cladogramas (Sosa 2007; Cervantes 2009).

Si bien a partir de los resultados moleculares arrojados por el presente estudio se podría deducir que el exsicado que cuenta con más de 200 años no es un *Oncidium ornithorhynchum* sino un *Oncidium cultratum*, es necesario obtener la información morfológica y anatómica de estas plantas, analizándolas también por medio de claves taxonómicas. Por lo que se puede ver a grandes rasgos, se trata efectivamente de especies muy parecidas, pero es necesario realizar un análisis fenotípico con las claves taxonómicas botánicas y asociar sus resultados a los datos obtenidos de las secuencias genéticas para así poder obtener un resultado más confiable y definitivo.

En cuanto al análisis molecular del genotipo de esta especie tipo conservada en el herbario de París, es necesario utilizar un mayor número de regiones del genoma, ya que en este estudio preliminar solo se trabajó una región muy corta del gen *matK*, y como se puede observar en las figuras 16 a la 21, mientras se analizó la secuencia de 140 pb, este exsicado no se agrupó con *Oncidium ornithorhynchum* ni con *Oncidium cultratum*, pero cuando se analizaron con el *contig* el cual contaba con 371 pb, este fue agrupado con la última especie nombrada en los árboles de MP y ML con valores de 99 después de 1000 réplicas de bootstrap, lo que indica un buen soporte del clado.

Para poder obtener resultados concluyentes del punto de vista filogenético y sistemático, es necesario secuenciar todo el gen *matK-trnK*, e incluir adicionalmente las regiones plastídicas y nucleares más utilizadas para hacer este tipo de inferencias, como *ITS*: el cual es un poderoso marcador filogenético a nivel de especie que muestra altos niveles de divergencia interespecífica (Alvarez & Wendel 2003); *TrnH-psbA*: es el marcador plastídico más utilizado actualmente en el código de barras, este presenta regiones codificantes altamente conservadas (Shaw *et al.*, 2005); *rpoB*, *rpoC1*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *ycf5* y *trnL*: estas regiones del cloroplasto son valiosas para

análisis filogenéticos y en el código de barras a niveles taxonómicos altos, y las combinaciones *rbcL + trnH-psbA* (Kress & Erickson 2007), *rpoC1 + rpoB + matK* o *rpoC1 + matK + trnH-psbA* (Chase *et al.*, 2007) y *matK + atpF-atpH + psbK-psbI* o *matK + atpF-atpH + trnH-psbA* (Pennisi, 2007), las cuales presentan mayor discriminación de especies.

En conclusión, la adaptación del protocolo de Mazo (2011), permitió extraer ADN de buena calidad y cantidad en el exsicado de más de 200 años, corroborándose esta con la buena calidad de los electroferogramas. Sin embargo, el procedimiento de extracción 2 fue el más exitoso puesto a que se logró disminuir los pasos metodológicos necesarios y se logró obtener mayor cantidad de ADN que con el procedimiento 1.

Se recomienda analizar las especies *Oncidium ornithorhynchum* y *Oncidium cultratum* por medio de claves taxonómicas fenotípicas y así obtener su información morfológica y anatómica complementarias, además de secuenciar todo el gen *matK-trnK* para el exsicado de más de 200 años, junto a más regiones de su ADN en núcleo y cloroplasto, para así lograr un resultado concluyente sobre la controvertida especie de un exsicado que cuenta con más de 200 años.

Por el momento, y gracias al presente trabajo, se excluiría el que *Oncidium ornithorhynchum* sea la especie que corresponde al exsicado de más de 200 años, después de analizar las secuencias por medio de métodos filogenéticos que incluyeron árboles de Neighbor-Joining (NJ), de Máxima Parsimonia (MP) y de Máxima Verosimilitud (ML), estos últimos con bootstraps de 1000 réplicas.

9. CONCLUSIONES

Se adaptó con éxito el protocolo de extracción propuesto en Mazo (2011), en donde se logró extraer ADN de buena calidad y cantidad para cuatro exsicados de diferente antigüedad conservados en un rango de tiempo mayor a 210 años, y luego amplificarlo y secuenciarlo exitosamente. En el exsicado del año 1968, preservado por cerca de 47 años, se obtuvo una mayor cantidad y calidad de ADN que en los exsicados más recientes (1989 y 2003), concluyéndose que existe mejor relación entre el tipo de preservación del exsicado y la cantidad de ADN de este, que con el tiempo que lleva preservado. El uso de las columnas Sephadex,

mejoró notablemente la cantidad de ADN obtenido en las extracciones. Finalmente, gracias a la obtención de secuencias de entre 140 y 371 pb para el exsicado que cuenta con más 210 años de conservación, se está dando un gran paso para que en futuros estudios de este exsicado, se puedan realizar análisis filogenéticos y sistemáticos, para lo cual se sugiere secuenciar todo el gen *matK-trnK*, y complementarlo con otras regiones de ADN plastídico y nuclear, así como con la ayuda de las claves fenotípicas, para que se pueda esclarecer definitivamente la identidad y la prioridad taxonómica de este ejemplar tipo del Museo Nacional de Historia Natural de París, colectado por Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland en los territorios del virreinato de la Nueva Granada al despuntar el siglo XIX.

11. RECOMENDACIONES

Para evitar una mayor degradación del ADN, se recomienda al herbario de la PUJ tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- 1- No adicionar químicos como alcoholes para el secado de los ejemplares, ni exponerlos a fuentes de calor artificial, sino en lo posible, secarlos naturalmente sin calor artificial ni químicos.
- 2- Crear un banco de extraídos de ADN de todas las especies de plantas preservadas en el herbario, con el fin de garantizar futuros estudios genéticos y evolutivos.
- 3- Entretanto, disponer en cada nuevo exsicado de un sobre adicional con un fragmento de la planta para utilización exclusiva en extracción de ADN.
- 4- Para este fin, utilizar preferiblemente órganos con mayor tejido meristemático, como las flores, nuevas raíces y tallos en formación.

12. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez I, Wendel J (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**: 417–434.

Ames M, Spooner D (2008). DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *Amer. J. Bot.* **95**: 252–257.

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

Bacci M, Checcucci G, Palandri M (1983). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**:11-15.

Capelli C, Tschentscher F, Pascali V (2003) Ancient protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. Elsevier, *Forensic Sci. Int.* **131**: 59-64.

Cervantes L (2009). Estudio de la anatomía foliar de la subtribu Ponerinae (Orchidaceae, Epidendroideae) en un contexto filogenético. Tesis de maestría. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

Chase M, Cowan R, Hollingsworth P, van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jørgensen T, Cameron K, Carine M (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* **56**: 295–299.

Clement W, Weiblen G (2009). Morphological evolution in the Mulberry family (Moraceae). *Syst. Bot.* **34**:530-552.

Cota H, Remarchuk K, Kumary U (2006). Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue. *Pl. Molec. Biol. Reporter* **24**: 161–167.

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

Drábková L, Kirschner J (2002). Comparison of Seven DNA Extraction and Amplification Protocols in Historical Herbarium Specimens of Juncaceae. *Plant Molec. Biol. Report.* **20**: 161-175.

Gilbert M, Hansen J, Willerslev E, Barnes I, Rudbeck L (2003). Characterization of genetic miscoding lesions caused by post-mortem damage. *Am. J. Hum. Genet* **72**: 48–61.

Giraldo G, Betancur J (2011). *Guía de campo de las orquídeas de Santa María (Boyacá, Colombia)*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C., Colombia.

Hall D (1981). Microwave: a method to control herbarium insects. *Taxon* **30**:818-819.

Hagelberg E, Skyes B, Hedged R (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature* **342**:485-487.

Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, Bauer K, Stone A, Hedges R, Schaffner W, Utermann G, Sykes B, Pääbo S (1994). Molecular genetics analysis of the Tyrolean Iceman. *Science* **264**:1775-1778.

Hebert P, Cywinska A, Ball L, deWaard R (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond* **270**: 313–321.

Higuchi R, Bowman B, Freiburger M, Ryder O, Wilson A (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* **312** (5991): 282-284.

Hill S (1983). Microwave and herbarium specimens: potencial dangers. *Taxon* **32**:614-615.

Hofreiter M, Serre D, Poinar H. N, Kuch M, Pääbo S (2001). Ancient DNA. *Nature Rev. Genet.* **2**: 353-359.

Hollingsworth P, Forrest L, Spouge J, Hajibabaei M, Ratnasingham S, Van Der Bank M, Chase M, Cowan R, Erickson D, Fazekas A (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 12794–12797.

Hoss M, Dilling A, Currant A, Pääbo S (1996). Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Myiodon darwini*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:181-186.

Hoss M, Pääbo S (1993). DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based extraction method. *Nucleic Acids Res.* **21**:3913-3914.

Hoyos R, Uribe S, Vélez I (2012). Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) mediante “Código de Barras”. *Rev. Col. Entomol.* **38**: 134–140.

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

Huelsenbeck J, Rannala B (1997). Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science* **276**: 227-232.

Jankowiak K, Buczkowska K, Szweykowska-Kulinska Z (2005). Successful extraction of DNA from 100-year-old herbarium specimens of the liverwort *Bazzania trilobata*. *Taxon* **54**:335-336.

Jenner R (2004). Accepting partnership by submission? Morphological phylogenetics in a molecular millennium. *Syst. Biol.* **53**:333-342.

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

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

Kaestle F. A, Horsburgh K (2002). A. Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications, and Ethics. *Am. J. Phys. Anthropol.* **35**: 92-130.

Kress J, Erickson L (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.

Koehler S, Williams H, Whitten W, Amaral M (2002). Phylogeny of the Bifrenaria (Orchidaceae) complex based on morphology and sequence data from nuclear rDNA internal transcribed spacers (ITS) and chloroplast trnL-trnF region. *Int. J. Plant Sci.* **163**:1055- 1066.

Kurosaki K, Matsushita T, Ueda S (1993). Individual DNA identification from ancient human remains. *Am. J. Hum. Genet.* **53**:638-643.

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

Lehtonen S, Christenhusz M (2010). Historical herbarium specimens in plant molecular systematics – an example from the fern genus Lindsaea (Lindsaeaceae). *Biologia*, Section botany, **65** (2): 204-208.

Li X, Yang Y, Henry R, Rossetto M, Wang Y, Chen S. Plant DNA barcoding: from gene to genome (2015). *Biol. Rev.* **90**, pp. 157–166. 157. doi: 10.1111/brv.12104

Lindahl T (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362** (6422): 709-15.

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

Margulis L, Guerrero R (1991). “Kingdoms in turmoil”. *New Scientist* **132**:46-50.

Marín M, López A, Freitas A, Uribe S (2009). Caracterización molecular de Euptychiina (Lepidoptera: Satyrinae) del norte de la Cordillera Central de los Andes. *Rev. Col. Entomol.* **35**: 235–244.

Mazo L, Gómez-Gutiérrez A, Quintanilla S, Bernal J, Ortiz-Valdivieso P (2014). Consideraciones sobre la historia de la prioridad taxonómica de *Oncidium ornithorhynchum*. *Lankesteriana* **13** (3): 337-351.

Mazo L (2011). Evaluación y comparación de 3 protocolos de extracción y amplificación del ADN contenido en exsiccados de orquídeas conservadas en colecciones de herbario. Tesis de pregrado. Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana.

Miller D, Bryant J, Madsen E, Ghiorse W (1999). Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Appl. Environ. Microbiol* **65**: 114715-4724.

Min X.J.I, Hickey A (2007). Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Molec. Ecol. Notes* **7**: 365–373.

Metsger D, Byers S (1999). *Managing the modern herbarium, an interdisciplinary approach*. Society of the preservation of natural history collections. Washington DC, 384p.

Mullis K, Faloona F (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.

Nasab M, Mardi M, Talae H, Nashli F, Pirseyedi, Hejabri A, Mowla S (2010). Molecular Analysis of Ancient DNA Extracted from 3250-3450 Year-old Plant Seeds Excavated from Tepe Sagz Abad in Iran. *J. Agr. Sci. Tech.* **12**: 459- 470.

O'Rourke D, Hayes G, Carlyle S (2000). Ancient DNA Studies in Physical Anthropology. *Ann. Rev. Anthropol.* **29**: 217-242.

Pääbo S, Wilson A (1991). Miocene DNA sequences – A dream come true?. *Curr. Biol* **1**:45-46.

Pääbo S (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Genetics* **86**:1939-1943.

Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M (2004). Genetic Analyses from Ancient DNA. *Ann. Rev. Genet.* **38**: 645-79.

Pérez A (2015). <http://goo.gl/abYyFc>. *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Universidad Politécnica de Valencia. Consultado el 22 de marzo de 2015.

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

Pennisi, E. (2007). Wanted: a barcode for plants. *Science* **318**, 190–191.

Poinar H, Kuch M, McDonald G, Martin P, Paabo S (2003). Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr. Biol.* **13**:1150-1152.

Pridgeon M, Cribb P, Chase M (2009). *Genera Orchidacearum*, Vol. 5. Oxford University Press, Oxford New York.

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

Rogers S, Bendich A (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue. *Plant Molec. Biol.* **5**:69-76.

Saitou N, Nei M (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. and Evol.* **4**: 406-425.

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

Sarmiento J (2007). La familia Orchidaceae en Colombia. *Actual. Biol.* (Suppl. 1): 84.

Shaw J, Lickey, E, Beck J, Farmer S, Liu W, Miller J, Siripun K, Winder C, Schilling E, Small R (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* **92**: 142–166.

Särkinen T, Staats M, Richardson J, Cowan R, Bakker F (2012). How to Open the Treasure Chest? Optimizing DNA Extraction from Herbarium Specimens. *PLoS ONE* **7**(8): e43808. doi:10.1371/journal.pone.0043808.

Savolainen V, Cuénoud P, Spichiger R, Martinez M, Crèvecoeur M, Manen J (1995). The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics: evaluation and improvement. *Plant Syst. Evol.* **197**:87-98.

Smith C, Chamberlain A, Riley M, Cooper A, Stringer C, Collins M (2001). Neanderthal DNA: Not just old but old and cold?. *Nature* **410**:771-772.

Somma M (2015). <http://bit.ly/1FnzAKT>. *Extraction and Purification of DNA*. Consultado el 12 de mayo de 2015.

Sosa V (2007). A molecular and morphological phylogenetic study of subtribe Bletiinae (Epidendreae, Orchidaceae). *Syst. Bot.* **32**:34-42

Sykes B (1991). Ancient DNA: The Past Comes Alive. *Nature* **352** (6334): 381-382.

Taiz L, Zeiger E (2006). *Plant physiology*. Third edition. Sinauer Associates, Sunderland. Pp 659.

Telle S, Thines M (2008). Amplification of *cox2* (approximately 620 bp) from 2 mg of Up to 129 Years Old Herbarium Specimens, Comparing 19 Extraction Methods and 15 Polymerases. *PLoS ONE* **3**(10): e3584. doi:10.1371/journal.pone.0003584

Wiens J (2004). The role of morphological data in phylogeny reconstruction *Syst. Biol.* **53**:653-661.

Woodward S, Weyand N, Bunne M (1994). DNA sequence from cretaceous period bone fragments. *Science* **226**:1229-1232.

Wortley A, Scotland R (2006). The effect of combining molecular and morphological data in published phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* **55**:677-685.

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