



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería en
Tecnología de la Madera
Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera

**Genotificación de especies leñosas mediante códigos de ADN: una
alternativa para la clasificación e identificación.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA**

Presenta

I.Q. Ivonne Edith Murillo Sánchez

Director de tesis

Dr. Pablo López Albarrán

Codirector

Dr. Crisanto Velázquez Becerra

Diciembre, 2019

Morelia, Michoacán

Contenido

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	8
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. OBJETIVOS	12
5.1 Objetivo general	12
5. Objetivos particulares	12
5. HIPÓTESIS	12
6. METODOLOGÍA	12
7. RESULTADOS	30
7.1 Discusión	51
7.2 Conclusiones	56
9. ANEXOS	57
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMEN

La FAO y distintas organizaciones no gubernamentales han tomado acciones ante la producción ilegal e insostenible de maderas, formulando políticas sobre la adquisición pública para evitar la degradación de los bosques en distintos países. Existe una creciente necesidad de que se habiliten y desarrollen más herramientas que ayuden a la caracterización de maderas y apoyar sectores económicos que aprovechan los recursos forestales, ya que las técnicas protocolarias (TP) establecidas, tienen ciertas limitaciones sobre todo en casos de especies arbóreas que poseen características anatómicas, botánicas, físicas, químicas iguales o bien cuando el material maderable en cuestión es insuficiente (estando en troza, tabla o rollo) para lograr el análisis de diferenciación específica. Dos consideraciones para la identificación son: la rastreabilidad y certificación de los productos forestales altamente comerciales del bosque al mercado, ya que permiten una regulación adecuada para establecer capacidades de legalidad de manera confiable. El presente proyecto de investigación propone el uso de herramientas de identificación molecular (HIM) mediante marcadores genéticos.

Con el uso de las HIM se logró evaluar un protocolo simple de extracción de ADN (previamente reportado) en madera en pie, tabla y rollo (usando como control tejido de hoja) de árboles aleatorios, se establecieron condiciones de replicación genética mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 8 oligonucleótidos con resultados de tamaños de los 100 a los 1200 pares de bases y consultando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) se consultaron los genes de los árboles estudiados logrando hasta un 98% de identificación. Se pretende este sea un estudio precursor que ayude a formular más patrones de identificación mediante HIM para crear huellas de ADN en maderas para que se puedan aplicar mediante códigos genéticos.

Palabras clave: Madera, oligonucleótidos, secuenciación, PCR, método, identificación.

ABSTRACT

FAO and various non-governmental organizations have taken action in the face of illegal and unsustainable timber production, formulating policies on public procurement to prevent forest degradation in different countries. There is a growing need for more tools to be enabled and developed to help characterize wood and support economic sectors that take advantage of forest resources, since the established protocol techniques (TP) have certain limitations, especially in cases of tree species that they have the same anatomical, botanical, physical, chemical characteristics or when the timber material in question is insufficient (being in a log, board or roll) to achieve the specific differentiation analysis. Two considerations for identification are: the traceability and certification of highly commercial forest products from the forest to the market, since they allow adequate regulation to establish legal capacity in a reliable manner. This research project proposes the use of molecular identification tools (HIM) through genetic markers.

With the use of HIMs, a simple protocol for the extraction of DNA (previously reported) in standing, plank and roll wood (using leaf tissue) from random trees was achieved, genetic replication conditions were established by chain reaction of the polymerase (PCR) using 8 oligonucleotides with results of sizes from 100 to 1200 base pairs and consulting the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), the genes of the trees studied were consulted achieving up to 98% identification. This is intended as a precursor study that helps to formulate more identification patterns through HIM to create DNA fingerprints in woods so that they can be applied through genetic codes.

Keywords: Wood, primers, sequencing, PCR, method, identification.

1. INTRODUCCIÓN

La madera es un material con células que presentan una gran variedad tanto en forma como en tamaño. Es su naturaleza heterogénea que la ha hecho un material único, renovable y distinguible para diversos usos (Sanjuán, 1997). En México, más de 2,300 grupos comunitarios gestionan sus bosques para la extracción de madera, lo que genera considerables ingresos para las comunidades y los hogares (FAO-silvicultura comunitaria de México, 2017). Así mismo, se ha incrementado considerablemente la importación y exportación de madera en los últimos seis años (cerca del 50% en volumen y 70% en valor) de los países sudamericanos principalmente Brasil, Bolivia, Chile, Colombia y Perú, así como de los EUA y Canadá. (OCDE/CAF/CEPAL, 2018). Se estima que la remoción anual de madera es del orden de los 56 millones de m³ por año (incluyendo madera rural e industrial) y que se utilizan más de 1,500 productos forestales no maderables. Para el sector comercial forestal, es de vital importancia poder identificar a la madera desde un tronco que sale del mercado hasta el bosque del que proviene para evitar la tala ilegal y garantizar su originalidad. Actualmente, existen métodos o técnicas protocolarias (TP) que permiten el reconocimiento de maderas los cuales son **a) anatómico-botánico**, se basa principalmente en la descripción de los caracteres organolépticos macro y microscópicos (elementos componentes de forma, tamaño, posición, distribución, etc., morfología celular, así como color, sabor, olor, brillo, veteado, grano, textura, etc.), **b) químico-molecular**, se fundamenta en el análisis de la cantidad y tipo de sustancias químicas o bioquímicas contenidas en las maderas y **c) Físico-mecánico**, se basa en la correlación que tienen las maderas de acuerdo en sus propiedades anisotrópicas, densidad, resistencia al esfuerzo mecánico entre otros.

La FAO resalta el caso mexicano, junto con el de Guatemala, en donde las empresas forestales comunitarias obtuvieron de octubre de 2006 a septiembre de 2007, ingresos de 4,75 millones de dólares generados por las ventas de madera certificada, creando 10 mil empleos directos con el manejo forestal sostenible en más de 420 mil hectáreas de tierras situadas dentro de la Reserva de la Biosfera Maya. Sin embargo, en la actualidad estudios de la Forest

Resources Assessment (FRA) a través de la Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, señalan que, el porcentaje de deforestación en México es ilegal siendo este aproximadamente del 39% anual, es decir que de 155,000 hectáreas (ha) forestales por año taladas, alrededor de 60,000 ha son de origen clandestino. En 2017, es lanzada una convocatoria a Nivel Nacional como una asistencia ante la situación de vulnerabilidad de especies arbóreas altamente traficadas y de uso comercial, la cual busca generar estrategias que generen sellos de origen para maderas mediante marcadores genéticos (códigos de ADN) rastreables en las células leñosas provenientes de especies arbóreas en alguna categoría de riesgo, según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEGOB-CONACYT, 2017) y que faciliten su identificación, rastreabilidad, origen y situación de vulnerabilidad para favorecer el aprovechamiento de las especies arbóreas dentro de una economía sustentable y con legalidad. Estos planes innovadores de caracterización de la madera en México, podrían apoyar a los sectores económicos que aprovechan los recursos forestales maderables y las contribuciones que podrían aportar son a) información bio-sistemática útil para ayudar a construir o modificar clasificaciones e identidades, b) métodos muy eficaces para señalar la probabilidad de existencia de relaciones filogenéticas entre ciertos grupos, en especial en los que sus antecesores son comunes y se refieren a series evolutivas y c) La identificación de células leñosas de maderas altamente traficadas y que estén en alguna categoría de riesgo.

En otros países como Europa, se habilitó una iniciativa que promueve la utilización de madera obtenida de manera legal, es la relativa a la aplicación de las leyes, gobernanza y comercio forestales (FLEGT-UE-FAO, s.f.). La Unión Europea (UE) sometió un proceso de diálogo con países productores y consumidores de madera para abordar el problema de las talas ilegales. Se propuso un sistema voluntario de concesión de licencias con el que los países que se adhieran y atestiguarán la legalidad de la madera exportada a la Unión Europea (FLEGT, 2003). También, en los Estados Unidos de América (que ha prohibido el tráfico ilegal de flora y fauna silvestres desde 1900) para incluir la madera o el papel, y prohibir así, el comercio de productos madereros obtenidos ilegalmente (WRI-USDA, 2017). Otros países, como Australia, Canadá, Alemania, etc., también han promulgado leyes similares en

las que se prohíbe tanto la importación como la transformación de la madera extraída de forma ilegal y sus productos derivados.

El uso de herramientas que ayuden en la identificación de especies arbóreas nos sirve para garantizar la autenticidad de los productos forestales para cual sea su fin. Los datos sistemáticos de una especie son necesarios para hacer una trazabilidad que certifique las distintas maderas, ya sea comerciales o con algún propósito en específico, en ese sentido, en este proyecto se planteó seguir un protocolo de identificación de maderas mediante herramientas moleculares a las cuales llamamos HIM (Herramientas de Identificación Molecular). La generación de modelos secuenciales de ADN para maderas, pueden resultar útiles para reconocer a nuevos miembros de una familia que no pudieran ser detectados con otros métodos. A través del genoma son conocidas las estructuras similares entre familias de una especie y, son constantes entre los miembros de la misma familia. Por lo tanto, el propósito de esta investigación de tesis se basó en el uso de las HIM donde se describe una solución como alternativa por medio de métodos moleculares para obtener “huellas de ADN”, en escenarios donde se requiera. Se realizó la extracción en tejido xilemático de árboles en pie (vivos) como en tabla y rollo (utilizando en algunos casos tejido de hoja como control). de 6 especies aleatorias: *Pinus* sp., *Pinus pseudostrobus* variedad Lindl, *Pinus devoniana*, *Liquidambar styraciflua* L., *Cupressus sempervirens*, *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand. Se diseñó un prototipo de código de barras que contiene datos con información taxonómica, botánica y genética provenientes del ADN de la madera.

2. ANTECEDENTES

En la actualidad se han reconocido necesidades ante la identificación selectiva de la madera, y a continuación, describiremos algunos antecedentes que han sido analizados como ejemplos de las metodologías de identificación de la madera. Vemos el caso de estudio de Wiemann y Hubbard (2012), en la figura 1 y tabla 1, donde muestran dos distintas especies de Dalbergia de mayor impacto económico y de comercialización en Belice: *D. stevensonii* y *D. tucurensis* cuya apariencia general y anatomía de la madera son similares. Ellos mencionan que *D. stevensonii* está protegido de la cosecha comercial, mientras que *D. tucurensis* no; y proponen, sea la densidad el factor decisivo para la separación y diferenciación entre una y otra Dalbergia para lograr su comercialización. Sin embargo, afirman que: “se necesitan de métodos confiables para separar las dos especies tan importantes.”

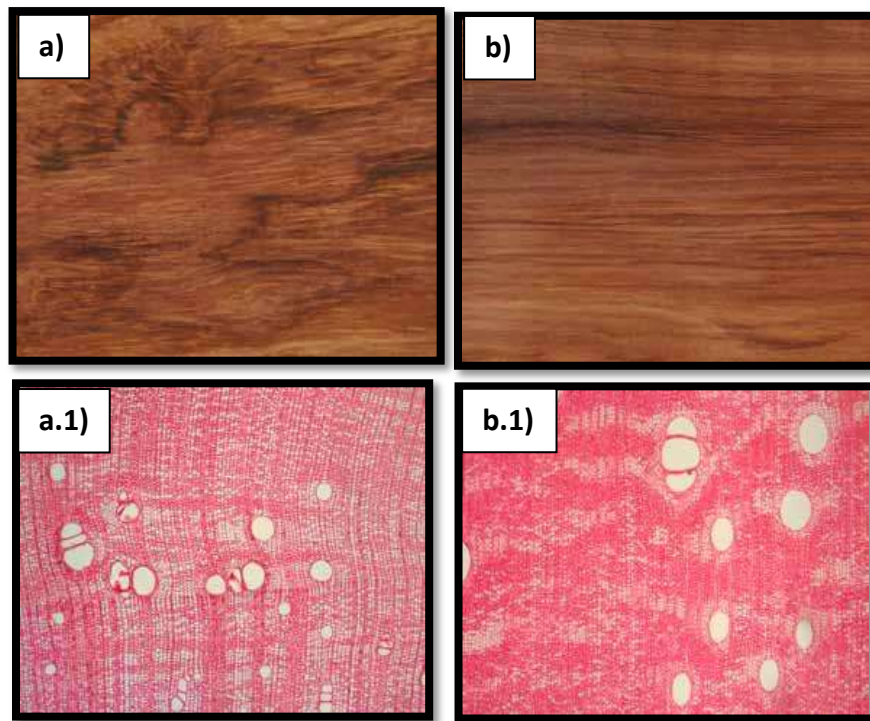


Figura 1. Fotografías de *D. stevensonii* y *D. tucurensis* a) vista macroscópica de madera de *D. stevensonii* y b) vista macroscópica de madera de *D. tucurensis*, a.1) Vista de poros en corte transversal de *D. stevensonii* y b.1) vista de poros en corte transversal de *D. tucurensis*.

Tabla 1. Descripción de caracteres anatómicos para *D. stevensonii* y *D. tucurensis*

Característica	<i>Dalbergia stevensonii</i>	<i>Dalbergia tucurensis</i>
Color de duramen	Medio a negro rosado-café con rayas negras	Amarillo-café más a café con o sin rayas negras
Olor en duramen seco	Negativo	Negativo
Densidad (g/cm ³)	0.93-1.17	0.65-0.82
Diámetro interno del vaso (mm)	8 a 10	8 a 10
Diámetro vaso (mm)	±220	± 270
Diámetro máximo de vaso	350	450
Frecuencia de vaso (por mm ²)	3 a 6	3 a 6
Parénquima dominante	Parénquima vasicéntrico aliforme y confluyente	Parénquima vasicéntrico aliforme y confluyente
Flouencia de duramen	Negativo	Negativo
Color de extracción de etanol	Iluminación amarilla a rosa-café claro	Iluminación amarilla a café claro

En el estudio de Wiemann y Hubbard (2012), se observa que la densidad es el parámetro que más se distingue para hacer una diferenciación de ambas especies ya que se encuentra en rangos de 0.93-1.17 (gr/cm³) para *D. stevensonii* y 0.65-0.82 (gr/cm³) para *D. tucurensis*, sin embargo, este parámetro también podría ser controversial cuando los contenidos de humedad cambien ya que puede alterar el peso y directamente proporcional a la densidad, haciendo que el interpretador confunda las maderas cuando se haga una medición con contenidos de humedad altos. Es este y otros casos de identificación de maderas mediante métodos anatómicos cuando son especies de mismas familias, se es evidente la dificultad de la separación y distinción entre especies, haciendo necesaria habilitar más herramientas de soporte confiable para lograr un parámetro de identificación certero.

Una identificación rápida y confiable se hace necesaria para los inventarios de maderas acorde a la biodiversidad de las especies arbóreas, para la cual se somete la presente propuesta de investigación. Los recientes avances en biología molecular y bioquímica a través de extracciones de ADN, han fomentado el desarrollo de instrumentos de identificación de plantas (Schuster, 2007). En la actualidad es necesario implementar y desarrollar métodos de identificación confiable para organismos vivos, basados en la

secuenciación de macromoléculas (proteínas o ácidos desoxirribonucleicos (ADN)). Por medio de estos métodos rápidos es posible obtener lo que podríamos llamar “huellas dactilares o de ADN”, que esto equivaldría a una descripción genética completa de las especies. En el año de 1991, es publicado un protocolo para aislar ADN en plantas por el profesor Doyle, y, este procedimiento se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de grupos de plantas e incluso algunos animales. El método se usa para aislar el ADN genómico total: nuclear, cloroplástico y mitocondrial (Doyle, 1991) y ha ayudado para los análisis de extracción de ADN en diversos estudios aplicados en ciertas áreas de interés. En 1995, es aplicada la tecnología molecular en tejido de hoja de árbol de un cultivo arbóreo tropical de importancia económica en Costa Rica: *Theobroma cacao*, donde se utilizaron marcadores genéticos y evaluaron 120 árboles. Este estudio confirmó la originalidad genética de solo 55 árboles de los 120 y permitió iniciar la construcción de un mapa genético para el cacao (Phillips, 1995). Estudios de Hebert y colaboradores afirman que “*estamos convencidos de que la única posibilidad para una capacidad de identificación sostenible radica en la construcción de sistemas que emplean secuencias de taxones de ADN como códigos de barras*” (Hebert, 2003). La Organización Internacional de las Maderas Tropicales sobre enfoques escalonados de la certificación, funcionarios comerciales, administradores forestales y grupos conservacionistas en el 2005, subrayaron la necesidad de una verificación externa de "terceros" para la identidad de las especies y la cosecha legal de maderas (Simula, 2005). En ese mismo año, se aplicaron técnicas forenses humanas a la extracción de ADN genómico de muestras de tejido leñoso procesado para lograr la identificación una especie de madera tropical en categoría de riesgo (Asif, 2005). De hecho, a partir de las premisas de la filogenética molecular para es posible para el montaje del árbol de la vida para la biodiversidad (Savolainen, 2005). En 2006, Newmaster señala el manejo de códigos de barras mediante ADN para la biodiversidad y concluye que se requerirán una cantidad mucho mayor de datos de la secuencia a las plantas de código de barras (Newmaster, 2006). Rachayanti en 2009, publica cuáles son los factores que influyen la extracción y aislamiento de ADN de maderas y cita la necesidad de habilitar una base de datos global de ADN como referencia de especímenes, la cual proporcionaría evidencia molecular archivada para identificar y facilitar la identificación “*in situ*” ya que no se requiere conocimiento botánico

(Rachmayanti, 2009). Borges y colaboradores en el mismo año, aseguran que “los métodos prácticos para la extracción de ADN a ser estudiados, deben asegurar la calidad y cantidad de ADN extraído para garantizar que el material genético sea confiable (Aline Borges y Mariana Silva Rosa, 2009). En el 2014, se realizó el primer estudio que intentó montar una biblioteca de códigos de barras de referencia para los árboles los bosques perennes de la India. (Nithaniyal, 2014). Los componentes genéticos moleculares pueden tener un efecto importante en la determinación de las necesidades de identificación maderable para distintos fines. Más estudios implementado marcadores genéticos con aplicaciones mediante códigos genéticos ayudarían para el control de inventarios de algunas especies en la biodiversidad, así como para calcular el impacto de la evaluación de la conservación, el seguimiento de comercio ilegal, la autenticación de especies sobre todo las altamente comerciales en el sector forestal.

3. JUSTIFICACIÓN

Las especies animales y vegetales en peligro de extinción, amenazadas y protegidas se encuentran descritas en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Dentro de las vegetales, se encuentran especies arbóreas. La tala inmoderada de especies en peligro ha originado que cada vez más sectores intervengan en la toma de decisiones para remediar este acontecimiento. La propuesta de solución es resolver una de las necesidades con mayor prioridad en el sector forestal: la caracterización e identificación de la madera en rollo y en tabla que se aprovecha comercialmente en la economía de los productos maderables, como la industria de mueble, la construcción, entre otras.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar taxonómica y molecularmente las especies arbóreas de cuatro especies de coníferas y dos especies de latifoliadas para implementar un sistema de codificación mediante ADN.

4.2 Objetivos particulares

1. Obtener y caracterizar botánicamente muestras de madera de las especies *P. pseudostrobus* L., *P. sp.*, *P. Devoniana*, *Cupressus sempervirens sp.*, *Liquidambar styraciflua* L. y *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand.
2. Evaluar una metodología de extracción genómica de ADN vegetal para definir un protocolo aplicable a células leñosas.

5. HIPÓTESIS.

La identificación taxonómica de especies arbóreas (madera) es posible mediante herramientas moleculares (extracción, amplificación y secuenciación de ADN).

6. METODOLOGÍA

A continuación, en el diagrama 1, se describen los pasos de la metodología general que consta de 6 procesos principales:

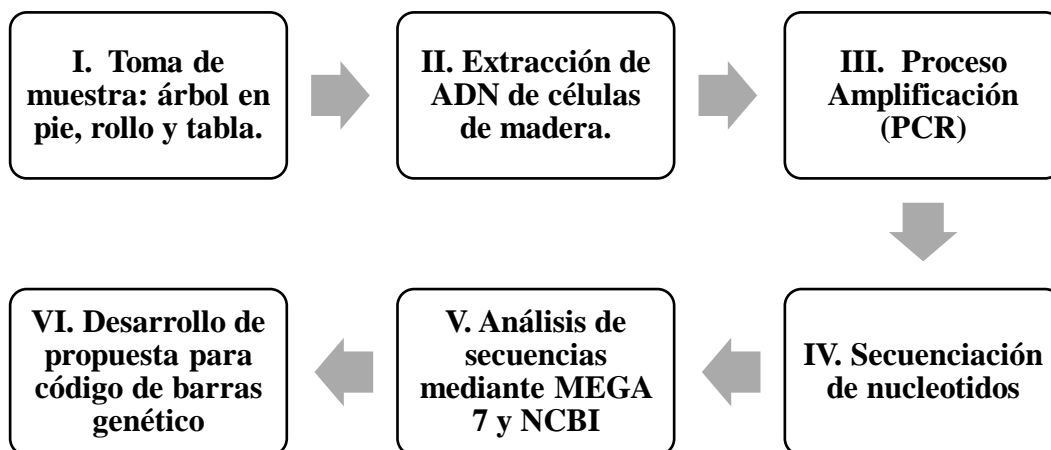


Diagrama 1. Flujo de proceso de la metodología propuesta.

6.1. Toma de muestra de árbol, rollo y tabla.

6.1.1 Localización de Sitio de muestreo.

Se eligieron tres sitios de muestreo de los especímenes arbóreos, pertenecientes al estado de Michoacán, México (fig. 2). El primer sitio fue la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CU), seleccionando 5 especies arbóreas aleatorias: *Pinus pseudostrobus* variedad Lindl, *Pinus* sp., *Liquidambar styraciflua* L., *Cupressus sempervirens*, *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand. La localización geográfica del sitio es 19° 41' 29" N, 101° 12' 25" O. El segundo sitio fue la plantación forestal comercial (PFC) de la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro (CINSP) con coordenadas sexagesimales 19° 41' 29" N, 101° 12' 25" O ± 2m, donde se seleccionaron 15 árboles en pie de *P. pseudostrobus* L. con las siguientes características: edades de 15 años, tres clases diamétricas comerciales (I, II y III). El tercer sitio de muestreo fue en un Aserradero Comercial (AC) situado en la Comunidad de “Pueblo Viejo” en Ciudad Hidalgo (CPVCH) con coordenadas N: 19° 27' 49" O: 102° 10' 51" ± 2m.



Figura 2. Mapa de México, Michoacán. (recuperado de <http://aprebollo.blogspot.com/2014/01/morelia-michoacan-morelia-de-1545-1828.html>).

Para los sitios 1 y 2 se procedió a marcar los árboles seleccionados con cuadros de 25 cm² (5 X 5 cm) aproximadamente, en el fuste al Diámetro a la Altura del Pecho (DAP) y se removió preferentemente la corteza. Haciendo perforaciones al DAP, se obtuvieron de 1 a 3 muestras de cada árbol, con un taladro inalámbrico Black & Decker Bdcdd120c 20v máx. litio con punta bmetal 1-3/8” No. 18093 Truper. Cada muestra en promedio tuvo dimensiones de diámetro de 2.5 cm por 1.5 cm de espesor y peso de 5 gramos (fig. 3). Un total de 50 muestras de estos árboles (5 de CU y 45 de PFC) en pie se colocaron por separado en bolsas herméticas, etiquetaron como muestras “CUap1” y “PFCap2” y se depositaron en recipiente con hielo para transportarse al laboratorio y mantenerse a -20°C.

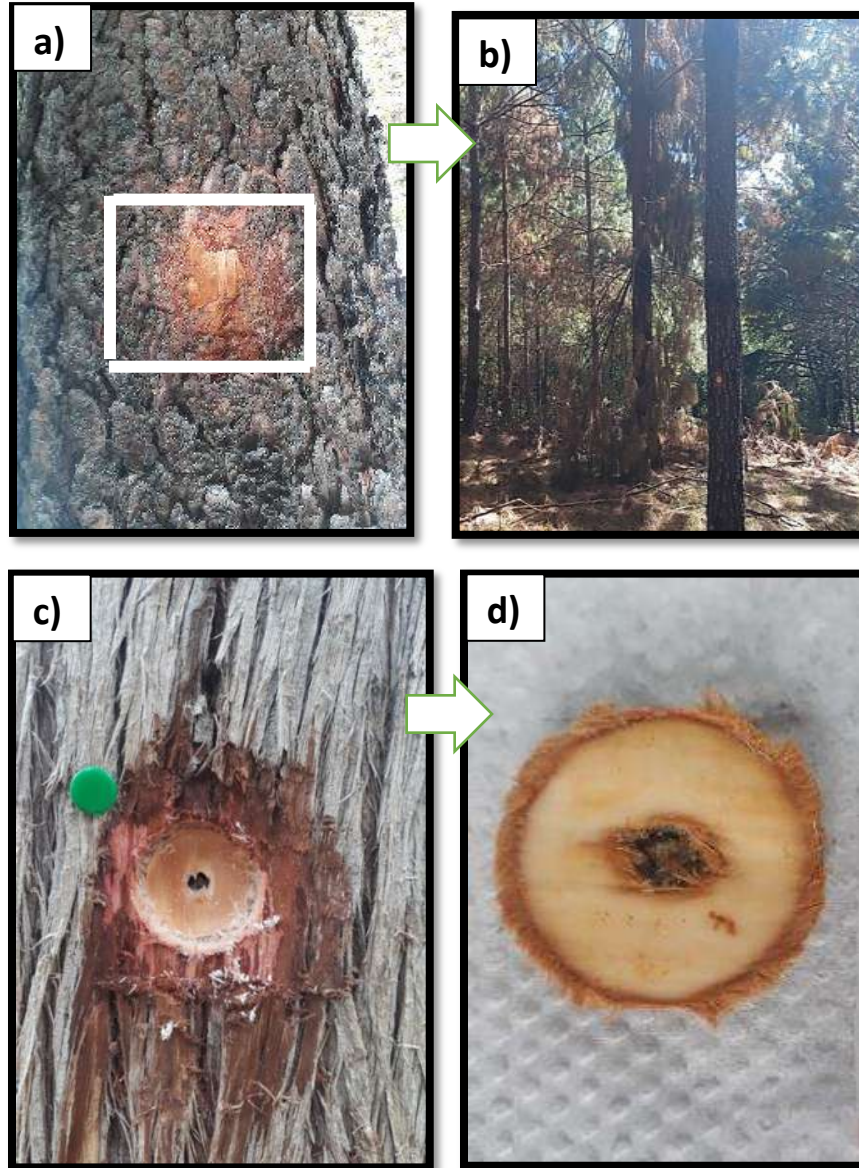


Figura 3. Pasos para la extracción de muestra: a) marco de zona de muestreo al DAP, b) perforación con taladro para extracción de muestra, c) tejido xilemático en árbol y d) madera.

En la figura 4 a) y b) se observa la misma muestra de *P. pseudostrobus* L., teniendo como diferencia la remoción de la corteza. Estas muestras fueron tomadas de árbol en pie. Ambas son vistas con lupa estereoscópica en a1) y b1) con aumento de 3.0 X.

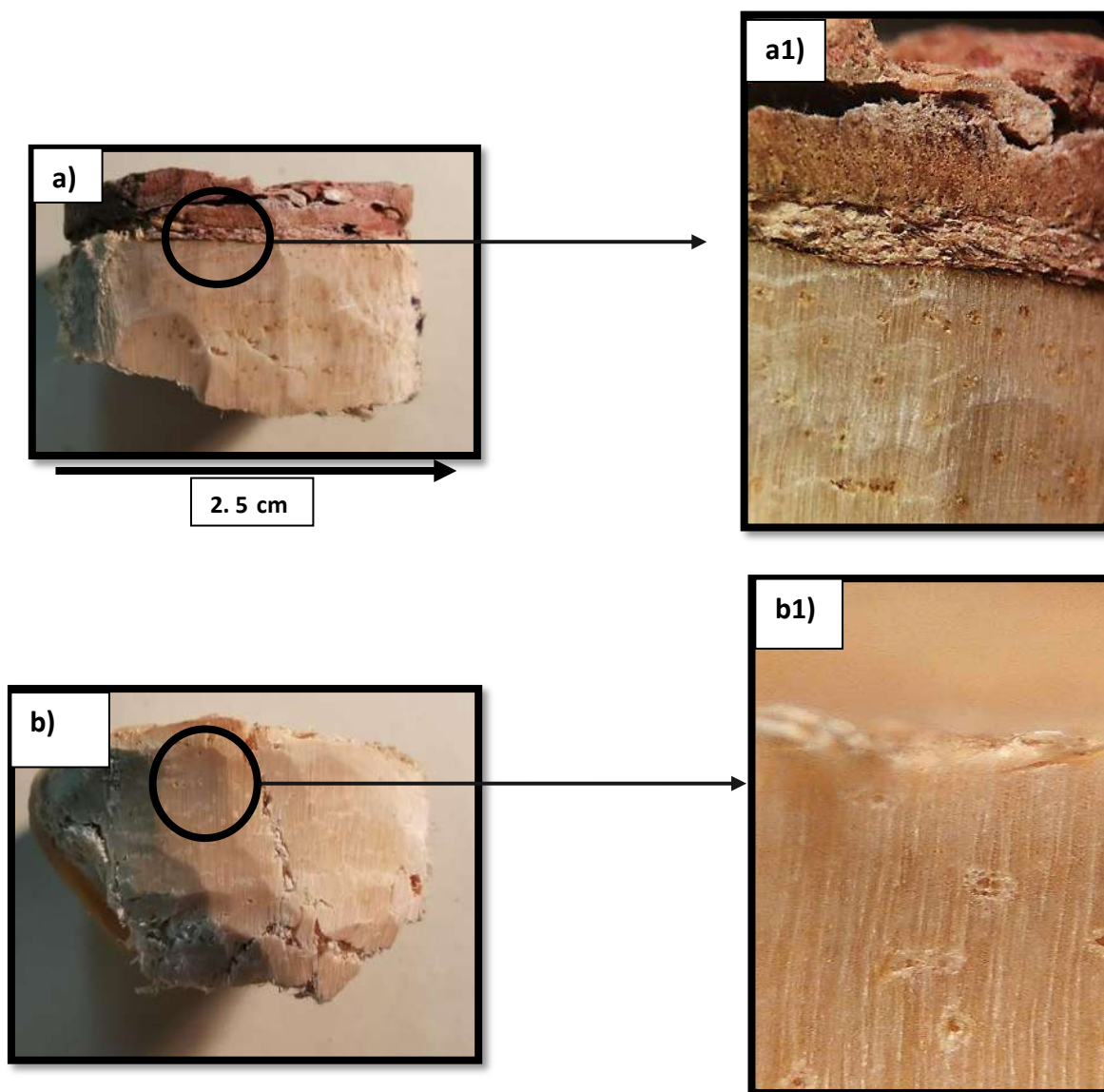


Figura 4. Arriba a) muestra de *P. pseudostrobus* L., con corteza, a1) amplificación en lupa estereoscópica 3.0X de *P. pseudostrobus* L., y abajo b) muestra de *P. pseudostrobus* L., sin corteza, b1) amplificación en lupa estereoscópica 3.0 X de *P. pseudostrobus* L.

Para el tercer sitio se seleccionaron 14 piezas de árboles talados *P. pseudostrobus*, *P. devoniana*, *Cedro sp.*, de los cuales, 6 fueron de rollo (Ro) y 8 de tabla (Tab.), véase figura 5, con las siguientes características: 8 y 2 semanas de tala (rollo y tabla respectivamente), proceso de secado y humedad del 7%. Las muestras de rollo (Ro) fueron extraídas aleatoriamente de la parte externa, media y central de la pieza en corte transversal (albura y duramen), con un hacha estilo europea 1-1/4 Lb de madera 14' Truper 14954, obteniendo 3 trozos de cada rollo en forma de astillas, con aproximadamente de 5 cm de largo y 8 g de peso; en total 18 piezas de rollo, se colocaron en bolsas herméticas, por separado y se etiquetaron como “ACro2”. Para las muestras de tabla (Tab), estas fueron cortadas como probetas rectangulares de 20 cm por 10 cm obteniendo 8 en total, se colocaron en bolsas herméticas y se etiquetaron como “ACTab3”. El total de las muestras ACro3 y ACTab3, se mantuvieron en un recipiente con hielo para transportarse al laboratorio donde se almacenaron a -20°C.

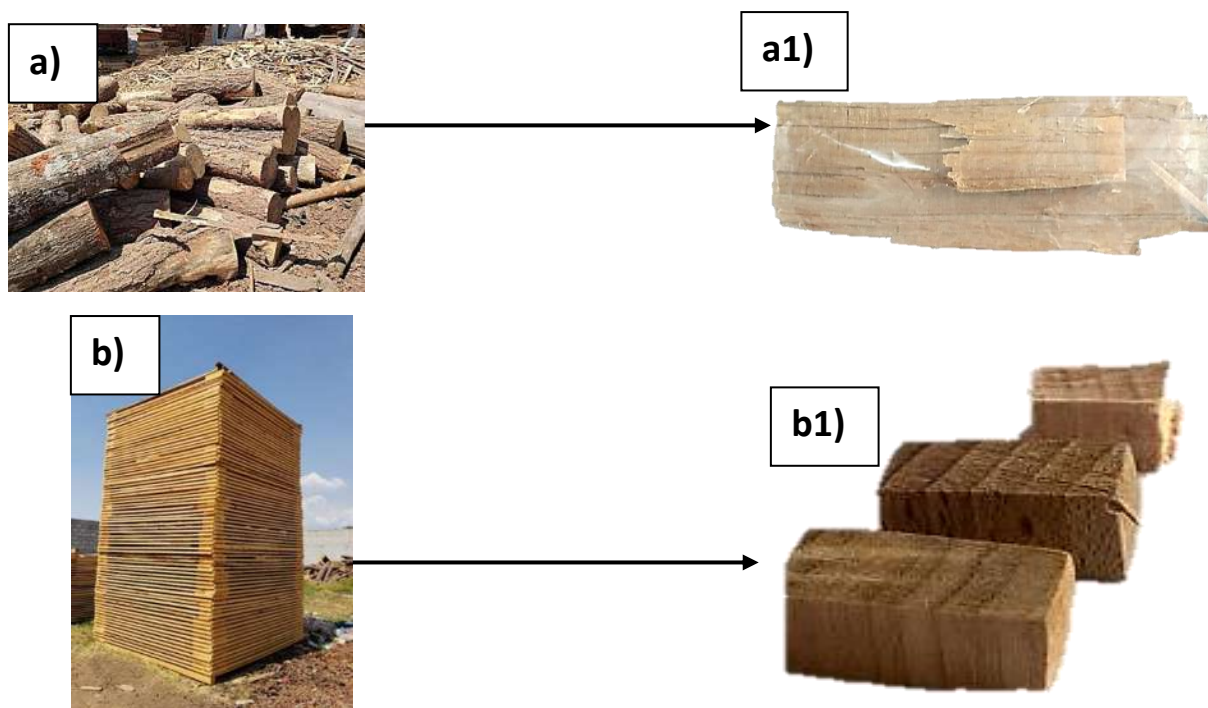


Figura 5. Toma de muestra de árbol talado. a) Rollo de madera y a1) muestra de astilla del rollo, b) Estiba de madera y b1) probetas de madera cortadas

6.2 Identificación de especie.

Para este caso se dividieron las muestras en dos casos: identificación con y sin muestra botánica, ya que no todas las muestras contenían caracteres botánicos, sin embargo.

CASO 1. Identificación con muestra botánica.

En la tabla 2, se presentan los nombres con los órdenes taxonómicos para el caso de las muestras “CUap1” las cuales fueron identificadas y colectadas en conjunto la Ing. Teresa García Moreno, especialista en anatomía y botánica de la Facultad en Tecnología de la Madera.

Tabla 2. Nombres y ordenes taxonómicos de las muestras “CUap1” evaluadas.

Nombre científico	Nombre común	Orden	Familia	Género	Variedad
<i>Pinus</i> sp.	Pino	Pinales	Pinácea	<i>Pinus</i>	<i>sp.</i>
<i>Pinus pseudostrabus</i> L.	Pino	Pinales	Pinácea	<i>Pinus</i>	<i>Lindl</i>
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cedro	Pinales	Cupresácea	<i>Cupressus</i>	<i>sp.</i>
<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	Liquidambar	Saxifragales	Altingiácea	<i>Liquidambar</i>	<i>sp.</i>
<i>Pseudobombax ellipticum</i> (Kunth) Dugand	Ceibo barrigón	Malvales	Bombacoideae	<i>Pseudobombax</i>	<i>sp.</i>

A cada una de estas muestras colectadas de la tabla 2, se les realizó montaje botánico en el Herbario “EBUM” de la facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMNSH) mediante los siguientes pasos de preparación: 1. Prensado botánico, cada muestra botánica (rama con hoja flor o fruto) se acomodaron por separado en una prensa botánica de 30 X 45 cm de madera con 5 rejillas largas y 5 rejillas cortas, se colocaron intersecciones de periódico y papel corrugado entre cada muestra y se amarró la prensa con cuerda de algodón. 2. Secado de las muestras, la prensa se colocó durante 15 días en una cámara de secado (estufa de secado básica) con 2 focos de 60 watts, y, por último, 3. Montaje Botánico, una vez secas las muestras, se realizaron los montajes en papel caple de 28 X 41 cm y papel “camisa” de 41 X 28 cm y se etiquetaron de acuerdo a cada espécimen.

6.3 Extracción de ADN de células de madera.

6.3.1 Preparación de tejido maderable para análisis genómico.

Cada una de las muestras “CUap1”, “PFCap2”, “ACro3” y “ACTab3” se sometieron a dos etapas para la preparación del tejido. En la primera etapa, se limpiaron por separado con agua destilada y cortaron astillas de aproximadamente 5 mm hasta lograr pesadas de 0.1 g. En la segunda etapa, a cada muestra pesada, se le realizó maceración en mortero con pistilo (estériles) con 30 ml de nitrógeno, con el fin de reducir las astillas, logrando tamaño de partícula en promedio de 100 micras (harina de madera), fueron almacenadas en viales tipo tubo marca eppendorf® de 1.5 ml modelo 3810X y etiquetadas, ver figura 6.

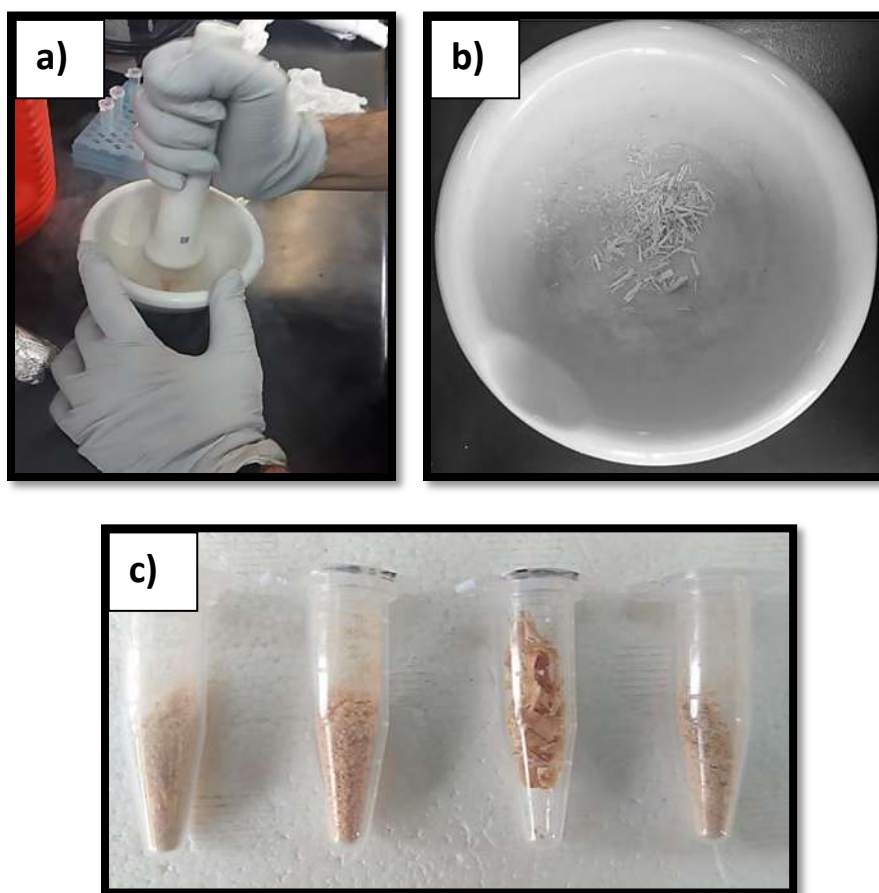


Figura 6. Proceso de maceración de madera, a) tamizado de madera con nitrógeno líquido, b) astillas tamizadas y c) viales eppendorf con muestras de madera.

6.3.2 Protocolo de extracción genómico.

6.3.2.1 Aislamiento total de ADN genómico arbóreo.

El protocolo de extracción de J. Doyle 1991 fue aplicado para el aislamiento total de ADN de las muestras arbóreas de este trabajo de tesis. Cabe mencionar que dicho protocolo fue ajustado.

Materiales y reactivos.

- 100 ml de Buffer CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio).
- 100 ml de TRIS-HCl (hidroximetilaminometano- ácido clorhídrico).
- 40 ml de EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético).
- 280 ml de NaCl (Cloruro de Sodio).
- Buffer TE (TRIS + EDTA).
 - TRIS 10 μ M
 - EDTA 1 μ M
- 100 ml Acetato de amonio.
- 70 ml Alcohol etanol 95%
- Cloroformo- alcohol isoamílico.
- Alcohol isopropílico.
- Mercaptoetanol.
- PVP 40 ADN (polivinilpirrolidona).
- Goma agarosa para electroforesis en solución TAE.
- 100 ml de Solución TAE (TRIS + ACETATO + EDTA)
- Tejido leñoso y hojas para cada caso.
- Rnasa.
- RedGel (bromuro de etidio).
- Green Taq (GoTag Green).
- H₂O libre de nucleasas.
- Oligonucleótidos Forward and Reverse.

Equipos y materiales

- UV trans-iluminator
- Mixer vórtex.
- Electrofotómetro NanoDrop™ 2000/c de Thermo Fisher scientific,
- Viales eppendorf de 1.5 µl y 0.5 µl para PCR y ADN.
- Termoincubador BIORAD.
- Micropipetas de 1000, 500 y 200 µl
- Centrifuga de 15000 RPM
- Cristalería como vasos de precipitados y frascos.

. PROTOCOLO.

- ✓ Adicionar al tejido macerado 500 µl de Buffer CTAB, Mercaptoetanol y de PVP (vórtex por 3 segundos).
- ✓ Incubar las muestras a 55°C por 1 hora en termoincubador.
- ✓ Adicionar 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico, vórtex por 3 segundos.
- ✓ Centrifugar (hasta observar fases).
- ✓ Extraer la fase acuosa (cuantificarla) y pasarla a un tubo nuevo.
- ✓ Adicionar 0.08 vol. de la fase cuantificada de acetato de amonio frío (sumar nuevamente el volumen).
- ✓ Adicionar 0.54 vol. de isopropanol frío, vórtex 2 a 3 segundos, mezclar bien y dejar reposar 1 hora a -20 °C.
- ✓ Centrifugar a máxima velocidad por 3 min (hasta ver formada la pastilla).
- ✓ Lavar la pastilla con 700 µl de etanol frío al 95% y mezcla bien (Se recomienda lavar 2 veces).
- ✓ Secar la pastilla a 37°C (incubadora).
- ✓ Re-suspender con 50 µl de buffer TE (Se obtiene mejores resultados con agua desionizada estéril) durante una hora a 55°C y llevar a refrigeración.
- ✓ Mantener en el vial a -20°C para conservar la muestra.

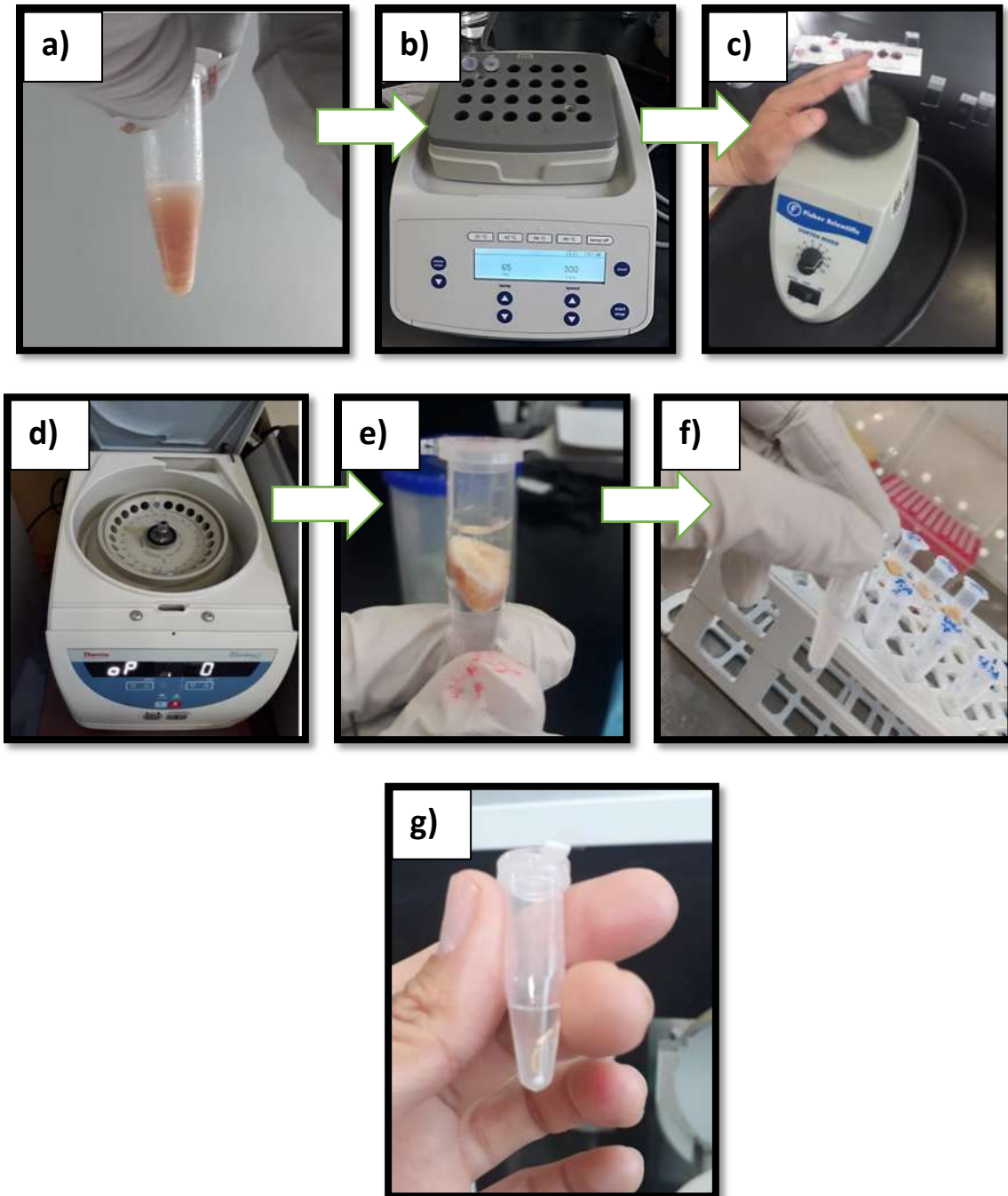


Figura 7. Secuencia de pasos del protocolo de extracción genómico. a) Vial eppendorf con tejido xilemático y buffer CTAB, b) Termoincubador con muestras, c) vórtex de muestras, d) centrifuga con muestra, e) división de tres fases: arriba sobre nadante con material genético, en el centro restos de fibras proteínas y grasas, abajo restos de reactivos no reaccionados, f) Vial eppendorf con lavado y g) precipitación de ADN a través de pastilla en el fondo.

6.3.2.2 Electroforesis.

- ✓ Se preparó 30 ml del gel agarosa al 1% en solución TAE o TEB. Se colocó en cámara el gel sólido y se vertió buffer TAE o TBE a tope.
- ✓ En papel encerado se colocaron 1-2 μl de Redgel [®], 1 μl de ADN de cada muestra y pipeteó el volumen total en los carriles de la cámara (gel solidificado), véase figura 12. Previo a este procedimiento se puede cuantificar la pureza y el ADN (ng/ μl) en el NanoDrop.

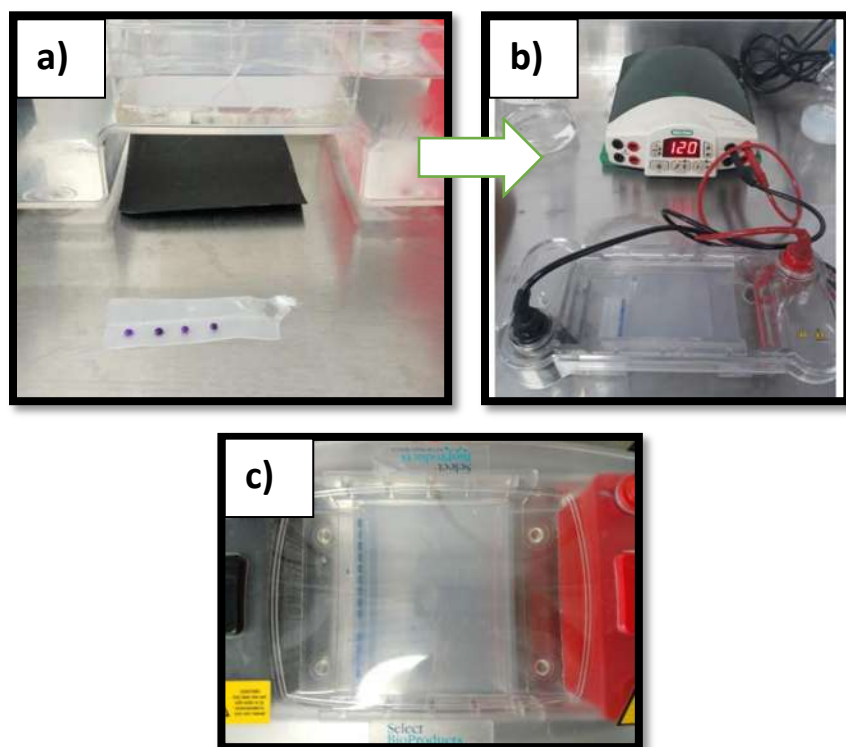


Figura 8. Secuencia de pasos PCR a) microlitros de muestra de ADN en papel cera, b) cámara de electroforesis con gel de agarosa y muestras en carriles y c) gel de agarosa en cámara con desplazamiento de muestras.

6.4. Proceso de amplificación mediante reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

6.4.1 Reactivos y oligonucleótidos.

- 12 µl Green Gotaq® (Taq Polimerasa).
- 1 µl de oligonucleótido Reverse (R).
- 1 µl de oligonucleótido Forwards (F).
- 1 µl de ADN
- 10 µl H₂O libre de nucleasas.

Tabla 3. Lista de nombres y secuencias de oligonucleótidos utilizados.

Par	Nombre del oligonucleótido	Bases	Secuencia
1	ccmp2-R (5' to trnS)	19	GATCCCGGACGTAATCCTG
	ccmp2-F (5' to trnS)	21	ATCGTACCGAGGGGTTCTGAAT
2	ccmp3-R (trnG intron)	20	CAGACCAAAAGCTGACATAG
	ccmp3-F (trnG intron)	20	GTTTCATTCGGCTCCTTTAT
3	ccmp10-R (rpl2-rps19 intergenic)	22	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA
	ccmp10-F (rpl2-rps19 intergenic)	19	TTCGTCGDCGTAGTAAATA
4	PS2-R (SPAC 11.6)	20	CTTACAGGACTGATGTTCA
	PS2 - F (SPAC 11.6)	19	TTACAGCGGTTGGTAAATG
5	PS3- R (SPAC 11.8)	21	AGGGAGATCAATAGATCATGG
	PS3-F (SPAC 11.8)	20	CAGCCAAGACATCAAAAATG
6	trnF-R (trnL (UAA))	20	GGTTC AAGTCCCTCTATCCC
	trnF-F (trnL (UAA))	20	ATTTGAACTGGTGACACGAG
7	trnL-R (trnL (UAA) intron)	20	CGAAATCGGTAGACGCTACG
	trnL-F (trnL (UAA) intron)	20	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
8	trnLF-R (trnL (UAA))	20	CGAAATCGGTAGACGCTACG
	trnLF-F (trnL (UAA))	20	ATTTGAACTGGTGACACGAG

- ✓ Se prepararon volúmenes totales de 25 µl para cada muestra de los cuales (fig. 9) en viales PCR de 250 µl y se evaluaron los 8 pares de oligonucleótidos para las reacciones (tabla 3) para las muestras “CUap1”, el mismo procedimiento se realizó para las muestras “PFCap2”, “ACro3” y “ACtab3”. pero solo utilizando los oligonucleótidos 6, 7 y 8 únicamente:

6.4.2 Condiciones de temperaturas y tiempos para PCR.

- ✓ Una vez preparados los volúmenes de cada reacción, estas se sometieron a 35 ciclos bajo las condiciones de temperatura la tabla 4:

Tabla 4. Condiciones de temperatura y tiempo para PCR. Td= temperatura de desnaturalización (°C), Ti = temperatura de incubación de oligonucleótidos (°C) y Te = temperatura de elongación. 35 ciclos con dos pasos inicial y final de 94/4 min y 72/10 min y ciclo infinito “hold” de 4 °C.

Td	Ti	Te
97/ 1 min	(48-52 °C)	72/ 2 min

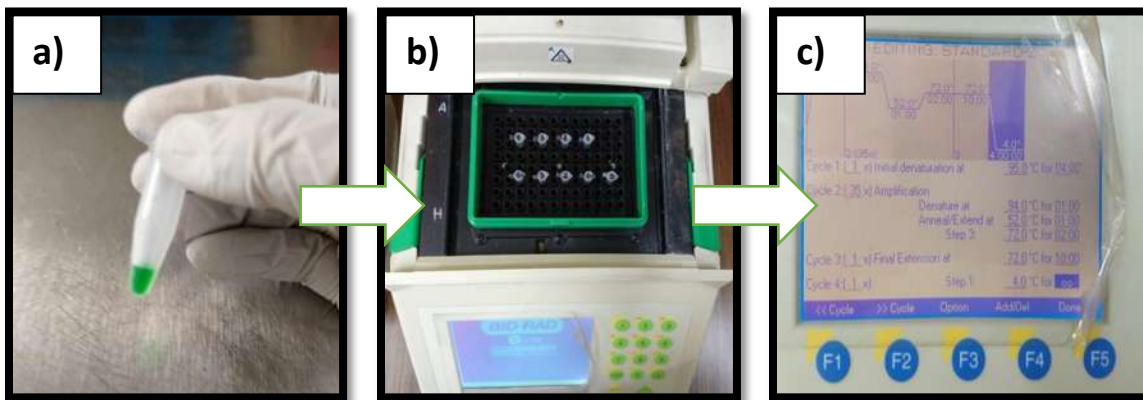


Figura 9. Preparación de muestras para PCR, a) vial eppendorf con volumen total de 25 μ l (Taq-polimerasa, oligonucleótidos y ADN), b) viales con muestra en Bio Rad y c) condiciones programadas en Bio Rad.

6.5 Secuenciación de los amplificadores de PCR.

Este apartado se realizó mediante un laboratorio tercero, solicitando los servicios de secuenciación en los laboratorios de Macrogen Korea y se establecieron los siguientes procesos:

- 1) El Kit de secuenciación fue BigDye® Terminator v3.1 (aplicado a bio-sistemas).
- 2) El tipo de secuenciador fue: ABI 3730xl Analizador DNA (tipo capilar de 96 pozos)
- 3) La máquina de PCR: DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cyclor (BIO-RAD)
- 4) Protocolo de secuenciación:

Las reacciones de secuenciación del ADN fueron procesadas en un termociclador con baño termal (BIO-RAD) usando el ABI BigDye ® terminal v3.1 con el kit para ciclos de secuencias (aplicado a biosistemas) corriendo los protocolos sugeridos por el laboratorio Macrogen Korea. Se realizó una secuencia de paso individual para cada plantilla usando los oligonucleótidos establecidos en la tabla 3. Los fragmentos fluorescentes de los marcadores fueron purificados para la uni-incorporación en el BigDye XTerminator® con el kit de purificación (aplicado a biosíntesis). Las muestras fueron inyectadas en electroforesis en el analizador ABI 3730xl DNA. Se obtuvieron 3 tipos de archivos para correr en fastq y los electroferogramas de cada una de las secuencias.

V. Análisis de secuencias mediante Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA v.7) y National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Los archivos Fastq y los electroferogramas se analizaron mediante el programa Mega v.7 para establecer los sitios de identificación a través de los marcadores genéticos que se evaluaron y ayudarán a desarrollar sitios de localización genética en los árboles estudiados mediante patrones de polimorfismos propios de cada especie.

6.7. Desarrollo de propuesta de Código Único Federal de Registro Arbóreo (C.U.F.R.A)

El código C.U.F.R.A se pretende sea un código que contenga la información taxonómica, genética y de registro para la identificación de especies arbóreas de un sitio dado (llámese especies estudiadas en este proyecto o bien ser flexible para otras más de interés), este código a su vez tendrá una serie de caracteres que se codificarán de acuerdo a la recopilación de cada especie arbórea, haciéndola única y exclusiva para cada registro de acuerdo a las características. A continuación, se propone la conformación del mismo.

6.7.1 Propuesta de caracteres para C.U.F.R.A

Una vez realizado el seguimiento y verificación forense mediante la extracción de ADN, el código contendrá los siguientes caracteres:

1. Está basado en la sistemática taxonómica de identificación para especies por jerarquías de acuerdo al diagrama 2:

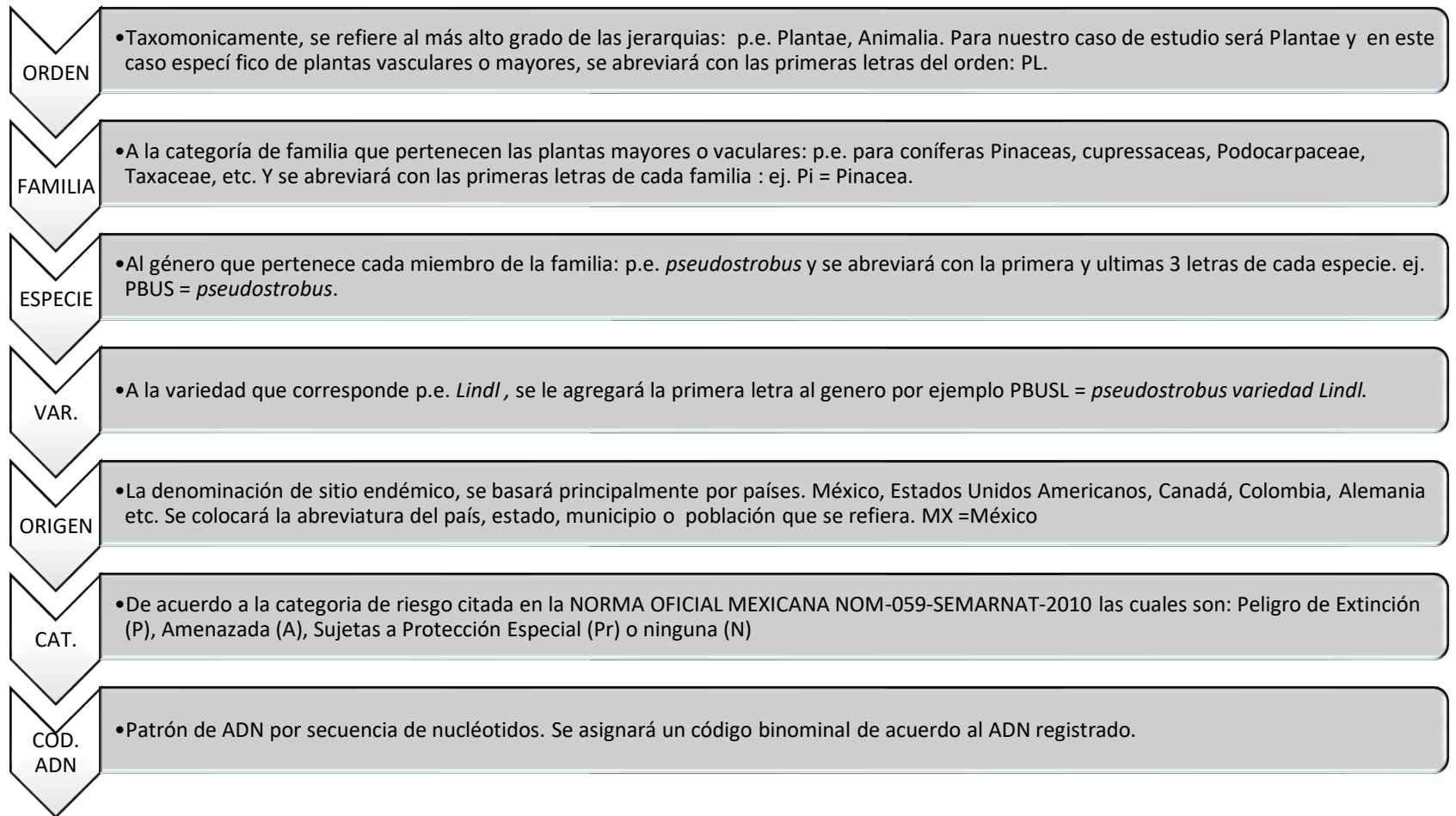
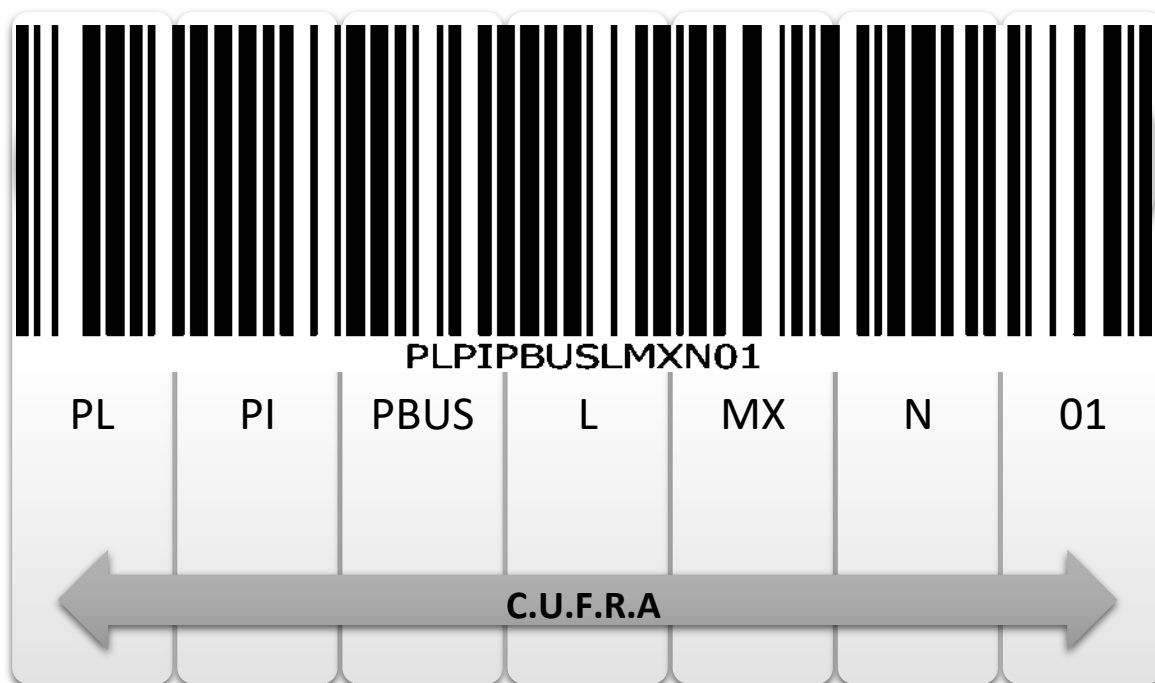


Diagrama 2. Caracteres para código C.U.F.R.A. Donde se establece el Orden, la familia, la especie, la variedad (Var.), el origen, la categoría (Cat.) y la codificación mediante ADN (Cod. ADN).

A manera de ejemplo se observa el código C.U.F.R.A 0 con la construcción de código de barras C.U.F.R.A y se realizó un sistema de barras básico de la siguiente manera:



Código C.U.F.R.A 0. Código C.U.F.R.A para *P. pseudostrobus* L. PL= Plantae. PI = Pinus, PBUS = pseudostrobus, L = Lindl, MX = México, N = categoría de riesgo, 01 = codificación ADN.

El programa que se usó para el diseño del código fue **Barcode Studio** 15.14.0.23754 Hans- Wagner-Strasse- 6- 4400-Steyr Austria-Europe, (c) de TEC-IT Datenverarbeitung GmbH, 2002-2019, licencia: ID demo:

EACCB22043564C5937303530303332363235364A, licencia temporal:
TEMP:081907 EACCB22043564C5937303530303332363235364A.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de muestras de madera de las especies arbóreas

A continuación, en la tabla 5, se presentan los datos taxonómicos del total de las especies evaluadas de *Pinus* sp., *P. pseudostrobus* L., *P. devoniana*, *Cedro* sp., *Cupressus sempervirens*, *Liquidambar styraciflua* L. y *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand.

Tabla 5. Total, de muestras evaluadas con órdenes taxonómicos.

Nombre científico	Nombre común	Orden	Familia	Género	Variedad
<i>Pinus</i> sp.	Pino	Pinales	Pinácea	<i>Pinus</i>	<i>sp.</i>
<i>P. pseudostrobus</i> L.	Pino	Pinales	Pinácea	<i>Pinus</i>	<i>Lindl</i>
<i>P. devoniana</i>	Pino	Pinales	Pinácea	<i>Pinus</i>	<i>sp.</i>
<i>Cedro</i> sp.	Cedro	pinales	Cupresácea	<i>Cupressus</i>	<i>sp.</i>
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cedro	Pinales	Cupresácea	<i>Cupressus</i>	<i>sp.</i>
<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	Liquidambar	Saxifragales	Altingiácea	<i>Liquidambar</i>	<i>sp.</i>
<i>Pseudobombax ellipticum</i> (Kunth) Dugand	Ceibo barrigón	Malvales	Bombacoideae	<i>Pseudobombax</i>	<i>sp.</i>

7.1.1 Características de las muestras “CUap1”, “PFCap2”, “ACro3” y “ACTab3”.

Para garantizar la reproducibilidad de la extracción genómica se decidió elegir dos géneros de la tabla 5: *pinus* y *cupressus*. Además, fueron extraídas las muestras de sitios en condiciones reales de campo para evaluar otras variables que pueden afectar el aislamiento genómico. En las tablas 6-8 se presentan los detalles y características físicas de dichas muestras elegidas.

Tabla 6. Características de muestras “CUap1”. Árbol en pie (madera y hoja).

AV = Años de vida, Ht = altura total (m), TMP = tamaño de muestra promedio (cm) y PMP = peso de muestra promedio (g).

Tejido	Nombre científico	Etiqueta “CUap1”	AV	Ht	TMP	PMP
madera	<i>Pinus</i> sp.	1	5	2	2.5	5
	<i>P. pseudostrobus</i> L.	2	18	13		
	<i>Cupressus sempervirens</i>	3	25	14		
	<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	4	8	4		
	<i>Pseudobombax ellipticum (Kunth) Dugand</i>	5	8	3		
hoja	<i>Pinus</i> sp.	1	5	2		
	<i>P. pseudostrobus</i> L.	2	18	13		
	<i>Cupressus sempervirens</i>	3	25	14		
	<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	4	8	4		
	<i>Pseudobombax ellipticum (Kunth) Dugand</i>	5	8	3		

Tabla 7. Características de la madera de las muestras “PFCap2”, individuos 1-15, El diámetro del árbol se midió con la corteza, a la altura del pecho (DAP), 1.3 m (FAO) y clases diamétricas (CD) de I (DAP 20-25 cm), II (DAP25-30 cm) y III (DAP 30-35 cm). *El DAP se obtuvo con la división de la circunferencia obtenida entre π . Ht = altura total (m), AV = años de vida, W = peso (g), TM = tamaño de muestra.

Especie	Etiqueta “PFCap2”	AV	Ht	DAP*	CD	TM	W
<i>P. pseudostrabus</i>	1	15	13.5	26.4	II	2.5	5
	2		12.5	20.2	I		
	3		14.5	23.7	I		
	4		11	24.8	I		
	5		11.5	24.2	I		
	6		12.5	21.6	I		
	7		13.5	26.9	II		
	8		12	25.5	II		
	9		16.2	30.9	II		
	10		13	25.6	II		
	11		14.5	26.4	III		
	12		15.5	31.1	III		
	13		15	30.2	III		
	14		15.5	32.8	III		
	15		16.7	33.7	III		

Tabla 8. Características de madera de las muestras ACRo3 y ACTab3, piezas seleccionadas de madera talada para rollo y tabla. AV = años de vida, NMT = número de muestras tomadas, ATM = área de toma de muestra, C = circunferencia de la troza (cm) y TT = tiempo talado (semanas).

Etiqueta	Especie	No. Pieza	AV	H	NMT	ATM	C	TT	
ACRo3	<i>P. devoniana</i>	1	15	7	3	Duramen y albura	69	2	
		2					69		
		3					74		
	<i>P. pseudostrobus</i>	4					141	8	
		5							140
		6							145
ACTab3	<i>P. devoniana</i>	1	15	6	1	Albura	NA	4	
		2							
		3							
		4							
	<i>P. pseudostrobus</i>	5							
		6							
		7							
		8							

7.2 Caracterización de las muestras con bases de datos botánicas.

Los resultados de las caracterizaciones botánicas se describieron para las muestras “CUap1”, así como una breve descripción de cada árbol estudiado. Para este apartado, solo se tomó como ejemplo el *P. pseudostrobus* L. y las demás descripciones se encuentran en anexos. Los ejemplares fueron identificados por el Dr. David S. Gernandt y están disponibles en la bóveda del Herbario MEXU (UNAM) con los siguientes folios: Murillo et al., 001 *Pinus pseudostrobus* Lindl (folio 1507264) Murillo et al., *Pinus sp.*, 002 (folio 1507262), 003 *Cupressus aff. Sempervirens* L., (folio 1507263), Murillo et al., *Liquidambar styraciflua* L. (folio 1507260), Murillo et al., 005 *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand (folio 1507261). En anexos se muestra la carta de identificación emitida por el departamento de identificación del herbario.

Orden taxonómico.

***Pinus pseudostrobus* variedad Lindl**

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Pinácea

Género: *Pinus*

Especie: *Pinus pseudostrobus* Lindl

Nombre científico: *Pinus pseudostrobus*

País: México.

Estado: Michoacán.

Municipio:

Morelia.



Figura 10. Morfología botánica de *P. pseudostrobus* variedad L., a) árbol completo, b) acículas y fruto (cono), c) corteza.

Descripción de la especie

Su sinonimia es pino, este árbol presenta forma muy fina de aproximadamente 13 m de alto y con copa redondeada; corteza grisácea, gruesa y fisurada; ramillas delgadas con bases de las brácteas no decurrentes. Su madera, que, aunque no se caracterizó anatómicamente, regularmente es con anillos de crecimiento diferenciados, con canales resiníferos fisiológicos, de células epiteliales delgadas, con un diámetro medio de 80 a 100 μm . Traqueidas de sección poligonal, en número de 700 por mm^2 y un diámetro medio de 20 a 25 μm . Parénquima longitudinal ausente o escaso. Traqueidas longitudinales con engrosamientos helicoidales no en todas las traqueidas, presentes tanto en la madera de primavera como en la de otoño. Radios leñosos uniseriados y pluriseriados debido a la presencia de canales resiníferos fisiológicos transversales, de 1 a 15 células de altura los uniseriados. Su número por mm^2 se encuentra en torno a los 25. Las punteaduras areoladas de las paredes radiales de las traqueidas longitudinales son redondeadas de abertura circular y se disponen en filas uniseriadas y biseriadas, siendo su diámetro medio de 18 a 20 μm . Las hojas en fascículos de 5, delgadas, laxas y ligeramente colgantes, las vainas persistentes. Conos pequeños a medianos (15-18 cm de longitud), escamas delgadas, flexibles a rígidas. Se distribuyen en Colima, Distrito federal, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Tlaxcala y Veracruz. El *P. pseudostrobus* L., es un árbol procedente de El Salvador, Guatemala, Honduras y México.

Muestra botánica.

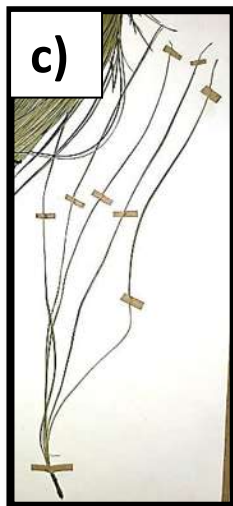
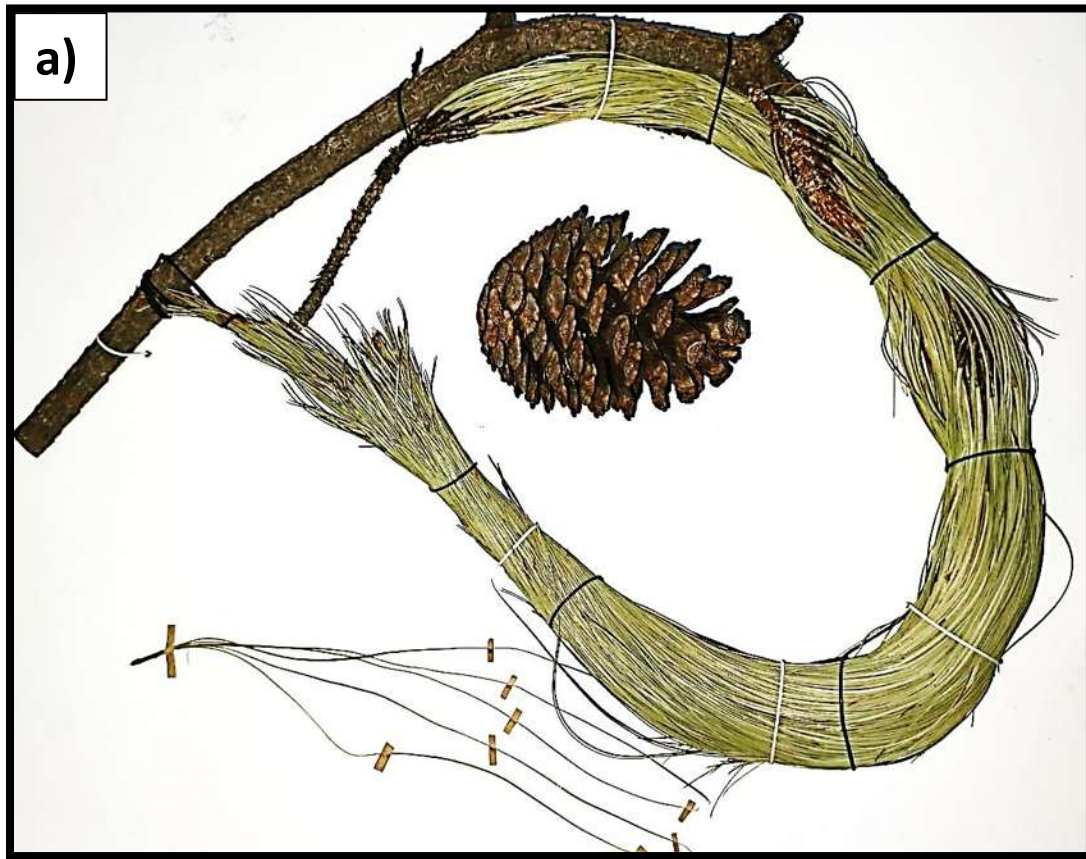


Figura 10a. Muestra botánica de *P. pseudostrobus* L., a) muestra botánica completa, b) como característico, y c) número y distribución de acículas.

7.3 Evaluación de extracción genómica de ADN en células de madera.

7.3.1 Extracción de ADN.

Las tablas 9-11 se muestran los promedios de extracción y radios de pureza para cada muestra en cuestión. Un radio de pureza está evaluando en el factor 260/280 en una longitud de onda ultravioleta de 260 Nm, donde valores arriba de 1.5 son aceptables para las evaluaciones en extracciones de ADN ya que se descarta la posibilidad de sustancias contaminantes como compuestos aromáticos o trazas de ARN.

En la tabla 9 se presentan el promedio de extracciones obtenidas de los tejidos de madera y hoja de acuerdo a la especie de las muestras “CUap1”. Se observa que hay una mayor disposición de extracción en tejido de hoja que en tejido de madera a excepción de la muestra de *Liquidambar styraciflua* L. También se tuvieron resultados desde los 23.6 nm/□l hasta los 56.6 nm/□l para madera, y que la mayor cantidad de extracción fue de hoja de la especie *P. pseudostrobus* L. con 269.8 nm/□□l y menor cantidad de extracción para *Liquidambar styraciflua* L. con 24.5 nm/□□l. Todas estas extracciones cumplieron por arriba del mínimo de radio de pureza 260/280.

Tabla 9. Cuantificación de ácidos nucleicos para muestras “CUap1”. M= madera, H = hoja.

Nombre de especie, Etiqueta “CUap1”	Extracción promedio de ácidos nucleicos (nm/μl)		
	Hoja	Madera	Radio 260/280 H-M
<i>P. Pseudostrobus</i> L.	269.8	56.6	1.60 - 1.80
<i>Pinus</i> . sp.	69.1	47.8	1.90 - 1.92
<i>Cupressus sempervirens</i> sp.	140.3	23.6	1.76 - 1.62
<i>Liquidambar styraciflua</i> L.	24.5	54.0	1.60 - 1.60
<i>Pseudobombax ellipticum</i> (Kunth) Dugand.	108.8	34.5	1.83 - 1.60

A continuación, en la tabla 10, se muestran los resultados de las extracciones genómicas de las especies maderables de tejido de 15 árboles en pie. Se obtuvo un promedio de 6.2 nm/□l para radio promedio de 1.86.

Tabla 10. Cuantificación de ácidos nucleicos para muestras “PFCap2”.

Nombre de especie, Etiqueta “PFCap2”	Individuo	Extracción ácidos nucleicos (nm/□l)	Radio 260/280
<i>P. Pseudostrobus</i> L.	1	3.0	1.96
	2	5.0	2.01
	3	13.7	1.86
	4	7.0	1.84
	5	5.0	1.83
	6	6.8	1.86
	7	8.3	1.83
	8	2.2	1.81
	9	4.7	1.85
	10	4.7	1.83
	11	5.7	1.88
	12	3.1	1.87
	13	8.7	1.86
	14	7.6	1.86
	15	1.9	1.86

Para las muestras “ACRo3” y “ACTab3”, se presenta la tabla 11, estos son los resultados de las muestras tomadas de un aserradero, las cuales estaban bajo condiciones de humedades del 6-7% aproximadamente y tiempos de tala de 2 meses aproximadamente. La máxima extracción de ADN en rollo para *Cedro* sp. con 9.3 nm/□l y con un radio de 1.5, para tabla se logró una máxima de 12.1 nm/□l con un radio de 1.65. Sin embargo, para el caso de las muestras con más de 2 meses de tala se notaron complicaciones para la extracción del ADN ya que se puede concluir que el material genético estaba degradado dando radios de pureza por debajo del 1.5 lo que pudiera ser contaminación o compuestos fenólicos y aromáticos presentes.

Tabla 11. Cuantificación de ácidos nucleicos para muestras ACRo3 y ACTab3.

Etiqueta	Nombre de la Especie	No. Individuo	Extracción ADN (nm/□l)	Radio 260/280
ACRo2	<i>P. devoniana</i>	1	3.7	1.78
		2	3.9	2.00
		3	4.2	2.03
	<i>P. pseudostrobus</i>	4	2.6	1.63
		5	5.4	1.64
		6	3.6	1.75
	<i>Cedro sp.</i>	1	9.3	1.50
		2	3.8	1.23
		3	4.2	1.25
ACTab2	<i>P. devoniana</i>	1	11.3	1.60
		2	6.3	1.63
		3	2.9	1.61
		4	3.9	1.40
	<i>P. Pseudostrobus</i>	5	12.1	1.65
		6	6.6	1.66
		7	4	1.64
		8	6.5	1.62

7.4 Resultados de la eficiencia de los oligonucleótidos en el proceso PCR.

En la tabla 12, se describen las abreviaturas que se colocaron para la identificación de los oligonucleótidos, así como sus respectivas secuencias y nombre. Para la validación de la eficiencia de los 8 pares de oligonucleótidos se hicieron las reacciones de PCR con las muestras “CUap1” de hoja y madera y se logró establecer si éstos eran capaces de amplificar regiones en todas las muestras.

Tabla 12. Control para la visualización de amplicones con oligonucleótidos. Amplicones SI o NO en muestras de tejido de hoja y madera.

Abreviaturas	Nombre largo	Secuencia bases nitrogenadas	Amplicón
ccmp2	ccmp2-R (5' to trnS)	GATCCCGGACGTAATCCTG	SI
	ccmp2-F (5' to trnS)	ATCGTACCGAGGGGTTCTGAAT	
ccmp3	ccmp3-R (trnG intron)	CAGACCAAAAGCTGACATAG	SI
	ccmp3-F (trnG intron)	GTTTCATTTCGGCTCCTTTAT	
ccmp10	ccmp10-R (rpl2-rps19 intergenic)	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA	SI
	ccmp10-F (rpl2-rps19 intergenic)	TTCGTCGDCGTAGTAAATA	
PS2	PS2-R (SPAC 11.6)	CTTCACAGGACTGATGTTCA	NO
	PS2 - F (SPAC 11.6)	TTACAGCGGTTGGTAAATG	
PS3	PS3- R (SPAC 11.8)	AGGGAGATCAATAGATCATGG	NO
	PS3-F (SPAC 11.8)	CAGCCAAGACATCAAAAATG	
trnF	trnF-R (trnL (UAA))	GGTTC AAGTCCCTCTATCCC	SI
	trnF-F (trnL (UAA))	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
trnL	trnL-R (trnL (UAA) intron)	CGAAATCGGTAGACGCTACG	SI
	trnL-F (trnL (UAA) intron)	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	
trnLF	trnLF-R (trnL (UAA))	CGAAATCGGTAGACGCTACG	SI
	trnLF-F (trnL (UAA))	ATTTGAACTGGTGACACGAG	

En la figura 11 se observan dos geles de agarosa donde están contenidas las muestras “CUap1”- hoja y “CUap1”- madera, en los carriles 1 a 5 se observan las reacciones de PCR de las especies 1. *P. pseudostrobilus* L., 2. *P. sp.*, 3. *Liquidambar styraciflua* L., 4. *Cupressus sempervirens* sp. y 5. *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand. En cuanto al gel a) correspondiente a tejido de hoja se muestra que existen inespecificidades que se pueden solucionar con gradientes de temperaturas para volver más definidas las zonas de amplificación. En cuanto al gel b) correspondiente a madera se logran amplicones específicos, lo que nos sugiere que los oligonucleótidos se cebaron correctamente con las

condiciones de temperatura y tiempo. Vemos también la similitud en el patrón del amplicón que existe entre ambos tejidos de las especies. Las flechas en color amarillo nos muestran el tamaño que se puede leer a través de un marcador de peso (carril 0) el cual cae en las bandas correspondiente a los 1000 y 1500 pares de bases para ambos geles.

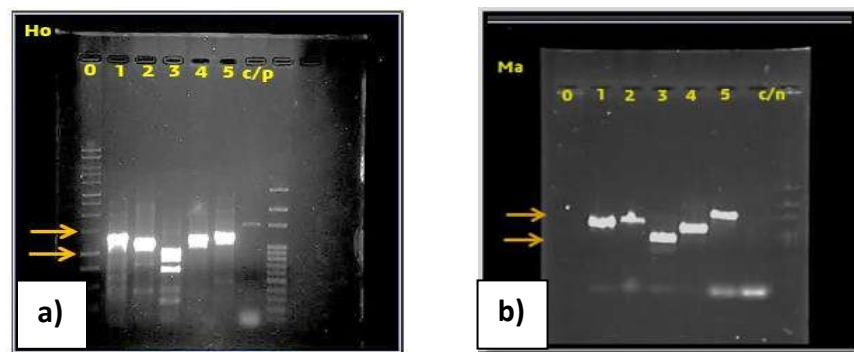


Figura 11. Electroforesis de muestra “CUap1”, a) Ho. tejido de hoja y b) Ma. tejido leñoso, numerales 1-5 carriles con muestras (1-5) y marcador (0), c/n control negativo, c/p control positivo.

En la figura 12, se observan los amplicones iluminados en el gel de agarosa al 1% de las 15 muestras de *P. pseudostrobus* L. (muestras “PFCap2”) revelando el comportamiento del tamaño amplificado, donde también está dentro del rango del marcador de peso de los 1000 a los 1500 pares de bases (aproximadamente de 1.2 kb) con el oligonucleótido trnLF. Es importante destacar que en los carriles 2,7 y 9 no se observa amplicón, esto pudiera ser por la baja cantidad de ADN que contenía la muestra o simplemente se degradó en el proceso de PCR. Se observa así mismo la similitud de comportamiento de las bandas para esta especie.

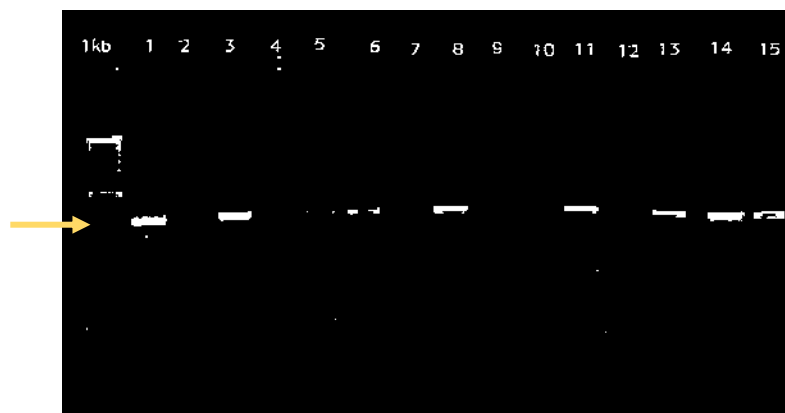


Figura 12. Electroforesis “PFCap2”, carriles 1-15 muestras de *P. pseudostrobus* L.

Para el caso de las figuras 13 y 14 se presenta el oligonucleótido trnL y se observan los gels de agarosa al 1%. en la figura 13 en los carriles 1-3 se muestran los amplicones de las muestras correspondientes a *P. devoniana* y en los carriles de 4-6 se divisan las muestras correspondientes a *P. pseudostrobus* teniendo una eficiencia del 83%. Para la figura 32 se observan las muestras “ACTab1” en los carriles 1-3 corresponden a *P. devoniana*, de 4-6 a *P. pseudostrobus* y 7-8 a *cedro* sp. Vemos el tamaño del amplicón se encuentra referido en el marcador de peso de 1 kb, y, para este oligonucleótido se logran amplicones del orden de los 600 pb, lo que se puede apreciar que la bandas de la muestra caen también en las secciones de 600 y los 800 pb.

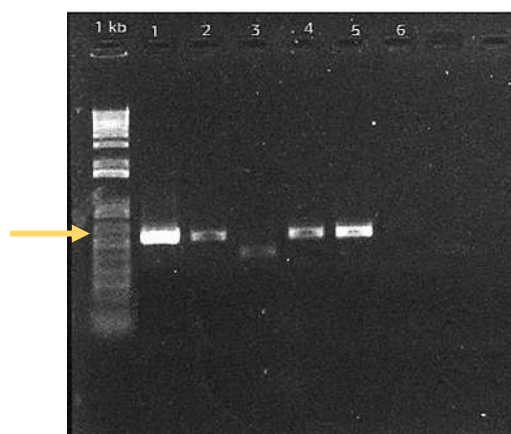


Figura 13. Gel agarosa al 1% corrida electroforesis “ACRo3”, carriles 1-6 muestras. La flecha indica el tamaño esperado

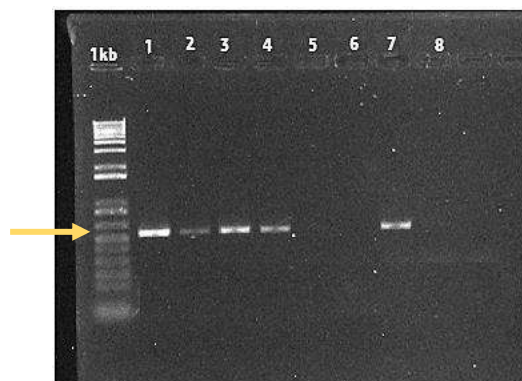


Figura 14. Gel agarosa al 1% corrida electroforesis “ACRo3”, carriles 1-8 muestras. La flecha indica el tamaño esperado

En la tabla 13 se muestran los resultados de los productos PCR de las reacciones “CUap1” madera-hoja, PFCap2, ACRo3, ACTab3, así como sus radios de pureza y la columna comparativa reportada en la bibliografía.

Tabla 13. Producto PCR de las muestras “CUap1” madera-hoja, “PFCap2”, “ACRo3”, “ACTab3”. * Dato de referencia tomado de Rachmayanti, 2009. Pb = pares de bases nitrogenadas

Etiqueta	Especie	No. individuo	Producto PCR (nm/μl)	Radio 260/280	oligonucleotido utilizado	Amplicon (Promedio) pb	Amplicon (Reportado*) pb
CUap1 Madera	<i>P. Pseudostrobus L.</i>	1	846.00	2.04	TrnLF	1100	1100
	<i>P. sp.</i>	2	818.00	2.03		989	1100
	<i>Cupressus sempervirens</i>	3	853.20	2.06		1100	1100
	<i>Liquidambar styraciflua .</i>	4	846.00	1.96		1019	1100
	<i>Pseudobombax ellipticum (Kunth) Dugand.</i>	5	931.00	1.96		1091	1100
CUap1 Hoja	<i>P. Pseudostrobus L.</i>	1	873.50	2.03		1100	1100
	<i>P. sp.</i>	2	900.10	2.03		1100	1100
	<i>Cupressus sempervirens</i>	3	798.30	2.05		1100	1100
	<i>Liquidambar styraciflua .</i>	4	879.80	2.02		1012	1100
	<i>Pseudobombax ellipticum (Kunth) Dugand.</i>	5	866.80	2.06		1077	1100
PFCap2	<i>P. Pseudostrobus L.</i>	1	846.00	2.05	TrnLF	1274	1100
		2	818.00	2.05		1120	1100
		3	853.20	2.05		1160	1100
		4	846.00	2.05		1252	1100
		5	931.00	2.03		1395	1100
		6	873.50	2.04		1171	1100
		7	900.10	2.03		1212	1100
		8	798.30	2.06		1161	1100
		9	879.80	1.96		1123	1100
		10	866.80	1.96		1260	1100
		11	875.00	2.03		1162	1100
		12	866.00	2.03		1116	1100
		13	867.20	2.05		1183	1100
		14	829.20	2.02		1157	1100
		15	831.00	2.06		1148	1100
ACRo3	<i>P. devoniana</i>	1	796.7	2.07	TrnL	531	600
		2	874.5	2.06		537	600
		3	819.6	2.07		534	600
	<i>P. pseudostrobus</i>	4	844.4	2.07		534	600
		5	822.3	2.08		538	600
		6	937.6	2.05		525	600
	<i>Cedro</i>	1	873.6	2.05		534	600
		2	844.5	2.06		537	600
		3	798.3	2.08		125	600
ACTab3	<i>P. devoniana</i>	1	805.8	2.06		122	600
		2	795.6	2.08		533	600
		3	846.7	2.06		546	600
		4	800.3	2.07		537	600
	<i>P. pseudostrobus</i>	5	851.1	2.06		535	600
		6	816.2	2.06		130	600
		7	828.2	2.07	541	600	
		8	860.3	2.05	568	600	

En la tabla 13 nos es proporcionada una serie de resultados resumidos de las longitudes de los oligonucleótidos que fueron evaluados, cabe mencionar que de los 8 pares evaluados se destacaron y seleccionados solo los oligonucleótidos trnLF, trnL y trnF ya que lograron amplicones en todas las muestras y tamaños esperados de acuerdo a lo reportado. Así mismo, vemos los resultados de los tamaños de fragmentos para las muestras. Para el caso de “CUap1”, el promedio del tamaño que dio el oligonucleótido trnLF es de 1068.8 pb, para las muestras “PFCap2” con el mismo oligonucleótido es de 1192.93 pb, para las muestras “ACro3” el promedio es de 533.75 pb utilizando el y para “ACtab3” es de 543.33 pb usando el oligonucleótido trnL para ambos casos. El radio de pureza 260/280 promedio para todas las muestras es de 2.04. Así mismo estos resultados nos dieron un escenario de homogeneidad para las muestras usando estos oligonucleótidos para lograr secuencias definidas y diferenciables para cada especie estudiada.

7.5 Secuencias

7.5.1 Electroferograma de secuenciación.

Se obtuvieron 182 electroferogramas del laboratorio MacroGen Korea y fueron seleccionados 4 como ejemplo. Estos electroferogramas nos muestran como resultado las curvas de espectros de las bases nitrogenadas: A, T, C, G y el código genético que caracteriza a las distintas especies. En las figuras 15 y 16 se observan los espectros correspondientes a los oligonucleótidos trnLF para hoja y madera de *P. pseudostrobus L.*, los picos espectrales se observan bien definidos para las bases nitrogenadas, lo que asegura una secuenciación confiable y sin impurezas que pudieran no ser propias de las muestras evaluadas. En las figuras 17 y 18 se observan así mismo, los espectros correspondientes a las bases nitrogenadas secuenciadas para el oligonucleótido trnL para la especie *Cupressus sempervirens*, también para hoja y madera y notamos el mismo desempeño de los picos con definiciones marcadas para las bases nitrogenadas que son características de esta especie.

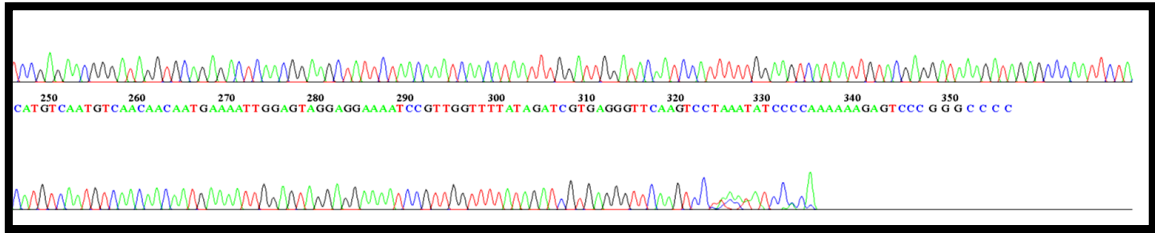


Figura 15. Electroferograma de secuenciación correspondiente a la especie *P. pseudostrobus* L. para el tejido de hoja con oligonucleótido TrnLF.

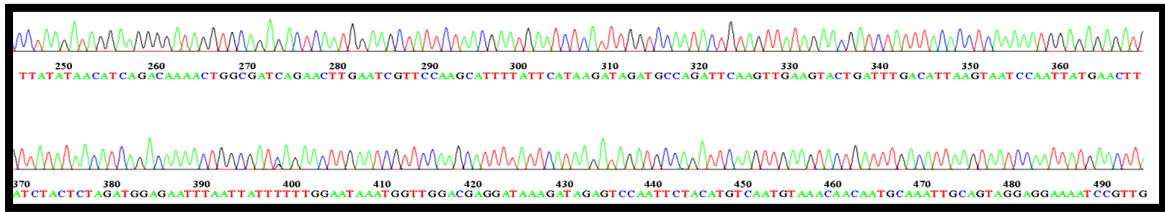


Figura 16. Electroferograma de secuenciación correspondiente a la especie *P. pseudostrobus* L. para el tejido de madera con oligonucleótido TrnLF:

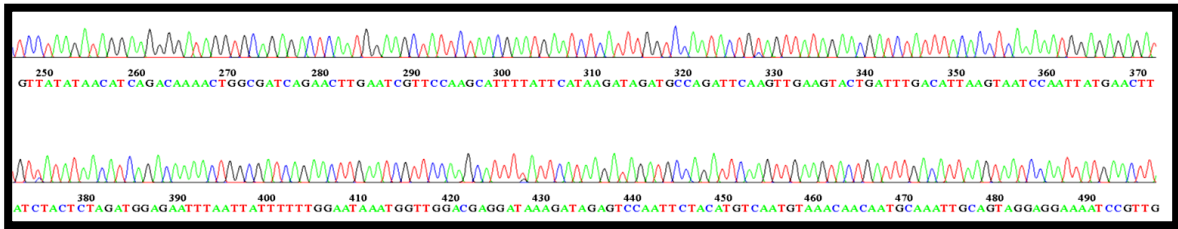


Figura 17. Electroferograma de secuenciación correspondiente a la especie *Cupressus sempervirens* para el tejido de hoja con oligonucleótido TrnL

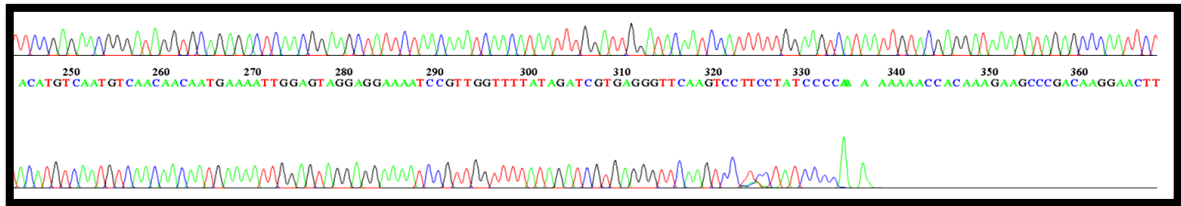


Figura 18. Electroferograma de secuenciación correspondiente a la especie *Cupressus sempervirens* para el tejido de madera con oligonucleótido TrnL.

11.2 Identificación de muestras arbóreas en el NCBI.

En la tabla 14 se muestran los resultados de la búsqueda en la base de datos del NCBI para las muestras “CUap1”, las cuales se colocaron los 8 oligonucleótidos evaluados. Se observa los tejidos de hoja y madera y la identidad que tiene cada uno al realizar un BLAST en la base de datos internacional. Vemos, por ejemplo, para el caso de *P. pseudostrobus* L. con el oligonucleótido trnLF da una identidad del 98% encontrando el gen “*Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* isolate OAXA02 chloroplast, partial genoma” para ambos tejidos. Mismo caso de identidad se ve con la especie *Cupressus sempervirens* al encontrar el gen “*Cupressus sempervirens* plastid, complete genoma” también con un 98% de identidad en contraste a este gen; y así sucesivamente para los casos de *Liquidambar styraciflua* L., *Pseudobombax ellipticum* y *p. sp.*, encontrando hasta un 98% de identidad para las especies estudiadas. Vemos también el mismo desempeño para los oligonucleótidos trnL y trnF donde se encuentran genes que dan identidades y distinciones a las muestras. Para los casos de los oligonucleótidos ccmp2, ccmp3 y ccmp10 no se encontró como tal un registro en la base de datos para lo cual se registraron las secuencias y están disponibles en la plataforma con los siguientes folios de sumisión SUB5939771, SUB5939843, SUB5939693, SUB5939811, SUB5939833, SUB5928892 y SUB4705168. Con el nombre de bio-Proyecto: “Identification Of Wooden Species Through Genetic Markers”. Las cuales fueron aceptadas y están en la plataforma para su revisión. Para el caso de la tabla 15 vemos los resultados de “PFCap2”, “ACTab3” y “ACRo3, donde también se obtienen identidades de un 94% a un 100% en contraste a la búsqueda de la base datos, las muestras también presentan distinciones e identificaciones para las especies evaluadas, por ejemplo, se encontró para *P. pseudostrobus* el gen de “*Pinus pseudostrobus* var. *apulcensis* isolate OAXA02 chloroplast, partial genoma” con un 99.16% de identidad, para *P. Devoniana* se encontró el gen “*Pinus devoniana* isolate DEVO02 chloroplast, partial genome” hasta con un 100% de identificación. Lo mismo ocurre con las muestras evaluadas a excepción de *Cedro* sp., el cual se sospecha que por el radio bajo de pureza pudo estar contaminado y no lograr la identificación específica. En conclusión, para las especies evaluadas de las diferentes muestras tenemos en promedio identidades de 97.55% y se logró la identificación y diferenciación de las especies con los ya genes reportados.

Tabla 14. Muestras “CUap1”, identificación genética de las especies, tejido de hoja y madera.

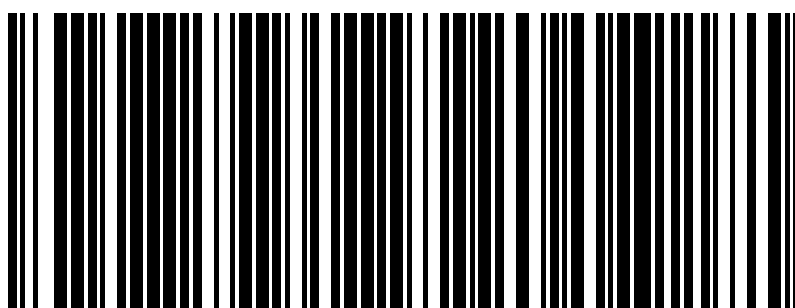
Descripción del producto obtenido		Dato encontrados en el NCBI		
tejido	oligonucleótido	búsqueda NCBI	Identidad con esa especie (%)	
Madera <i>P. sp.</i>	trnLF	Pinus strobiformis isolate STRF17 chloroplast	99	
Hoja <i>P. s.</i>		Pinus strobiformis isolate STRF17 chloroplast	99	
Madera <i>P. pseudostrobus L.</i>		Pinus pseudostrobus var. apulcensis isolate O	98	
hoja <i>P. pseudostrobus L.</i>		Pinus pseudostrobus var. apulcensis isolate O	98	
Madera <i>Cupressus sempervirens</i>		Cupressus sempervirens plastid, complete gen	99	
hoja <i>Cupressus sempervirens</i>		Cupressus sempervirens plastid, complete gen	98	
madera <i>Liquidambar styraciflua L.</i>		Liquidambar macrophylla voucher Ickert-Bor	98	
hoja <i>Liquidambar styraciflua L.</i>		Liquidambar macrophylla voucher Ickert-Bor	98	
madera <i>Pseudobombax ellipticum</i>		Pseudobombax ellipticum tRNA-Leu (trnL) g	98	
Hoja <i>Pseudobombax ellipticum</i>		Pseudobombax ellipticum tRNA-Leu (trnL) g	97	
Madera <i>P. sp.</i>		trnL	Pinus sibirica chloroplast, complete genome	100
Hoja <i>P. sp.</i>			Pinus sibirica chloroplast, complete genome	100
Madera <i>P. pseudostrobus L.</i>			Pinus pseudostrobus var. apulcensis isolate O	99
hoja <i>P. pseudostrobus L.</i>			Pinus pseudostrobus var. apulcensis isolate O	99
hoja <i>Cupressus sempervirens</i>	Cupressus sempervirens plastid, complete gen		99	
madera <i>Cupressus sempervirens</i>	Cupressus sempervirens plastid, complete gen		99	
madera <i>Liquidambar styraciflua L.</i>	Liquidambar macrophylla voucher Ickert-Bor		99	
hoja <i>Liquidambar styraciflua L.</i>	Liquidambar macrophylla voucher Ickert-Bor		99	
madera <i>Pseudobombax ellipticum</i>	Bombax ceiba chloroplast, complete genome		94	
hoja <i>Pseudobombax ellipticum</i>	Pseudobombax grandiflorum tRNA-Leu (trnL)		99	
Madera <i>P. sp.</i>	trnF		Pinus ayacahuite chloroplast, partial genome	99
Hoja <i>P. sp.</i>			Pinus ayacahuite chloroplast, partial genome	99
hoja <i>P. pseudostrobus L.</i>			Pinus pseudostrobus var. apulcensis isolate O	95
Madera <i>P. pseudostrobus L.</i>			Pinus pseudostrobus var. apulcensis isolate O	95
hoja <i>Cupressus sempervirens</i>		Cupressus sempervirens plastid, complete gen	99	
madera <i>Cupressus sempervirens</i>		Cupressus sempervirens plastid, complete gen	98	
madera <i>Liquidambar styraciflua L.</i>		Liquidambar macrophylla voucher Ickert-Bor	99	
hoja <i>Liquidambar styraciflua L.</i>		Liquidambar macrophylla voucher Ickert-Bor	99	
hoja <i>Pseudobombax ellipticum</i>		Pseudobombax grandiflorum tRNA-Leu (trnL)	98	
madera <i>Pseudobombax ellipticum</i>		Pseudobombax grandiflorum tRNA-Leu (trnL)	98	
hoja <i>P. sp.</i>		ccmp10	-	-
Madera <i>P. sp.</i>			Cupressus atlantica voucher RBGE-19980814	85
hoja <i>P. pseudostrobus L.</i>			Pinus pseudostrobus var. apulcensis isolate O	82
Madera <i>P. pseudostrobus L.</i>			Pinus pseudostrobus isolate PSEU03 chloropl	82
madera <i>liquidambar macrophylla</i>	-		-	
hoja <i>Cupressus sempervirens</i>	-		-	
madera <i>Cupressus sempervirens</i>	-		-	
madera <i>Liquidambar styraciflua L.</i>	-		-	
hoja <i>Liquidambar styraciflua L.</i>	-		-	
hoja <i>Pseudobombax ellipticum</i>	-		-	
madera <i>Pseudobombax ellipticum</i>	-		-	
hoja <i>P. sp.</i>	ccmp2		-	-
madera <i>P. sp.</i>			-	-
hoja <i>P. pseudostrobus L.</i>			-	-
Madera <i>P. pseudostrobus L.</i>		-	-	
hoja <i>Cupressus sempervirens</i>		-	-	
madera <i>Cupressus sempervirens</i>		-	-	
hoja <i>Liquidambar styraciflua L.</i>		-	-	
madera <i>Liquidambar styraciflua L.</i>		-	-	
madera <i>Pseudobombax ellipticum</i>		-	-	
hoja <i>Pseudobombax ellipticum</i>		-	-	
Madera <i>P. sp.</i>		ccmp3	-	-
hoja <i>P. sp.</i>			-	-
Madera <i>P. pseudostrobus L.</i>			-	-
hoja <i>P. pseudostrobus L.</i>			-	-
madera <i>Cupressus sempervirens</i>	-		-	
hoja <i>Cupressus sempervirens</i>	-		-	
hoja <i>Liquidambar styraciflua L.</i>	-		-	
madera <i>Liquidambar styraciflua L.</i>	-		-	
hoja <i>Pseudobombax ellipticum</i>	-		-	
madera <i>Pseudobombax ellipticum</i>	-		-	

Tabla 15. Muestras “PFCap2”, “ACTab3” y “ACRo3” identificaciones genéticas.

Muestras			Dato encontrados en el NCBI	Identidad con esa especie (%)
etiqueta	tejido	oligonucleotido		
PFCap2	<i>P. pseudostrobus</i>	trnLF	<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	99.16
	<i>P. pseudostrobus</i>		-	-
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	98.62
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	95.94
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	98.83
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	99.36
	<i>P. pseudostrobus</i>		-	-
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	95.7
	<i>P. pseudostrobus</i>		-	-
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	99.47
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus isolate PSEU03</u>	93.21
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	98.83
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	96.52
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	98.01
	<i>P. pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	98.84
ACTab3	<i>P. Devoniana</i>	trnL	<u>Pinus devoniana isolate DEVO02 ch</u>	100
	<i>P. Devoniana</i>		<u>Pinus devoniana isolate DEVO02 ch</u>	99.41
	<i>P. Pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	94.47
	<i>P. Devoniana</i>		<u>Pinus devoniana isolate DEVO02 ch</u>	98.16
	<i>P. Pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	100
	<i>P. Pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	100
	<i>P. Devoniana</i>		<u>Pinus devoniana isolate DEVO02 ch</u>	99.75
	<i>P. Devoniana</i>		<u>Pinus devoniana isolate DEVO02 ch</u>	99.75
ACRo3	<i>P. Devoniana</i>	trnL	-	-
	<i>P. Devoniana</i>		-	-
	<i>P. Devoniana</i>		<u>Pinus devoniana isolate DEVO02 ch</u>	99.75
	<i>P. Pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	98.72
	<i>P. Pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	100
	<i>P. Pseudostrobus</i>		<u>Pinus pseudostrobus var. apulcensis</u>	99.26
	<i>Cedro sp.</i>		<u>Quercus suber isolate Bellif10</u>	-
	<i>Cedro sp.</i>		<u>tRNA-Leu (trnL) gene partial</u>	-
	<i>Cedro sp.</i>		<u>Pinus arizonica var. cooperi isolate C</u>	99.5
		-	-	

12. Código C.U.F.R.A.

Como parte final, a continuación, se presentan los códigos de barras C.U.F.R.A propuestos y desarrollados para la identificación taxonómica. Contienen los caracteres taxonómicos de cada una de las especies evaluadas. Se presentan dos códigos como representativos (los demás se pueden revisar en ANEXOS). Estos códigos se desarrollaron para ser escaneados y leídos a través de un rayo de lectura para códigos de barras convencional; es decir, el contraste de las distintas líneas se puede leer a través de una aplicación (ej. Barcode Scanner). Y se podría tener una base de datos donde se registren las secuencias para lograr identidades a través de análisis moleculares.



PLPIPBUSLMXN01

Código C.U.F.R.A 1. Pl. = Plantae, PI = pinus, PBUS = pseudostrobus, L = Lindl, MX = México, N = no en riesgo, 01 = codificación ADN.



PLPIAITEAITEMXN02

Código C.U.F.R.A 2. Pl. = Plantae, PI = pinus, PS = *Pinus* sp. A = Ayacahuite, MX = México, N = no en riesgo, 01 = codificación ADN.

7.1 Discusión

En la identificación de especies maderables ha existido la necesidad de habilitar nuevas herramientas de investigación que puedan ayudar a estimar, clasificar y esclarecer las brechas abiertas que existen ante productos forestales. En 2014, se habían aprobado políticas sobre la adquisición pública de madera (en particular, criterios relativos a la legalidad o sostenibilidad) en 21 países europeos y seis países fuera de Europa. Si bien estas políticas difieren en cuanto a su diseño y nivel de aplicación, todas ellas impulsan la demanda de madera legal, sostenible verificada y contribuyen al cumplimiento de los compromisos y las convenciones internacionales al repercutir positivamente en la gestión forestal (Brack, 2014). Una iniciativa que promueve la utilización de madera obtenida de manera legal, es la relativa a la aplicación de las leyes, gobernanza y comercio forestales (FLEGT-UE-FAO, s.f.). La Unión Europea (UE) inició un proceso a largo plazo, de diálogo con países productores y consumidores de madera para ampliar la colaboración internacional destinada a abordar el problema de las talas ilegales. Se propuso un sistema voluntario de concesión de licencias con el que los países que se adhieran y atestiguarán la legalidad de la madera exportada a la Unión Europea (FLEGT, 2003). Las metodologías clásicas para la identificación de maderas para cualquier fin (principalmente el comercial) en México y en gran parte del mundo, sirven de sustento para la validación de los individuos arbóreos, sin embargo, se ha observado que no son suficientes en algunos casos, ya que no se puede contar al 100% con los datos morfológicos, botánicos, físicos o con cantidades de muestra necesarias de la (s) especie (s) maderable (s) en cuestión. En el presente trabajo logró cerrar brechas que existen ante esta situación, obteniendo resultados con cantidades menores a un gramo de muestra sin necesidad del corte total de un árbol (por ejemplo), logrando evaluar un protocolo de identificación en el laboratorio de especies maderables mediante extracciones de ADN, a través de una metodología ya reportada. También, en esta investigación se logró, no solo las revelaciones de evidencia genómica de ciertas especies evaluadas, sino también mostramos, que las conformaciones del ADN xilemático dan una serie de codificaciones

que pueden establecer genotificación (secuencias únicas de nucleótidos) mediante el genotipo de una variante en el ADN específico de los organismos biológicos analizados.

Diversas investigaciones han logrado extraer y amplificar sitios del genoma de especies maderables, sin embargo, no todas evidencian secuenciación de cadenas de ADN de especies y dentro de dichos estudios se resalta la necesidad de que cada vez más se necesita la implementación de prototipos de códigos de barras que incluyan información de taxones de ADN en sus bases de datos (Hebert, 2003). Actualmente la identificación sistemática de mediante la mancuerna ADN-Código de barras, ha mostrado una mejora en la caracterización de especímenes arbóreos del 42% respecto a los métodos taxonómicos tradicionales, incluyendo una disminución relevante en los tiempos invertidos para su análisis (Thomson, 2014).

Con los resultados ya descritos en este trabajo de tesis, se evidencia la confirmación y similitud del ADN en dos distintos tipos de tejidos: hoja y madera para un mismo árbol, lo que nos dice que el mismo ADN que se encuentra en un individuo arbóreo, deberá ser el mismo en cualquiera de sus conformaciones botánicas. También se observó la eficiencia en la extracción en algunos productos de madera como lo son rollo y tabla en especies de los géneros de coníferas, y, se observó la disponibilidad que existe en cada una de ellas, así como también fueron evaluados los factores que afectaron su aislamiento: tipo de muestra, lugar de muestreo, edad del árbol, humedad, tiempo de tala, composición química de la célula xilemática, etc. Rachmayanti en 2009, publicó que estos son los mismos factores que son decisivos para certificar la extracción y el aislamiento confiable en las muestras maderables. Observamos que el factor que impacta directamente proporcional a la calidad y cantidad de ADN extraído es el tiempo de tala, ya que el material genético se va degradando conforme va incrementando el periodo de tala. En este caso de estudio se evidenció que entre mayor es el tiempo de tala de las muestras, disminuye el aislamiento, y lo confirma Higuchi en 1997, donde indica que la química celular de la madera puede cambiar con el tiempo debido a procesos metabólicos, pero la anatomía celular permanece razonablemente constante, aun así, cuando el árbol deja de tener sus nutrientes a través del agua y minerales de la tierra, las funciones de

crecimiento celular dejan de promoverse como fuerza impulsora en el desarrollo, y por lo tanto la célula muere, ya que sus organelos dejan de nutrirse, todo este proceso esto puede ser variable para coníferas y latifoliadas y entre especies. Otro factor importante es la disponibilidad de material genético acuerdo al tipo de tejido analizado: madera u hoja, los resultados de esta tesis demuestran un aislamiento de mayor cantidad en tejido de hoja que en xilemático (4 de 5 muestras); dato que se confirma con Esau en 1985, quien menciona que el aislamiento de ADN se incrementa cuando existe más disponibilidad de células en el individuo en estudio y que aunque las células parenquimáticas (células que se presume es la extracción del ADN) se encuentran disponibles tanto en hoja como en madera, la constitución de la membrana del parénquima de la hoja es distinto a la membrana del parénquima de la madera, de entrada la conformación de la pared de la madera consta de una lámina media (LM) y de 3 paredes celulares S1, S2 y S3, y su composición es variada y distinta entre cada una de ellas, siendo estas lignina, celulosa, hemicelulosas, péptidos, proteínas, grasas, etc.; esto hace que se dificulte el aislamiento en la madera a comparación de la hoja y que en algunos casos el proceso de lisis podría no ser completado en una sola extracción para las células xilématicas, requiriendo entonces varias extracciones para lograr índices de pureza y cantidades suficientes para los siguientes procesos de replicación mediante PCR. Sin embargo, con todo y esta heterogeneidad de las células de la madera, el protocolo fue evaluado y confirmado para lograr el aislamiento genómico de tejido xilemático de las especies arbóreas que se sometieron en este proyecto de investigación. En cuanto el proceso de replicación para la codificación mediante PCR, se logró abrir un camino rastreable mediante 8 marcadores genéticos, con procesos de herramientas de identificación molecular en tejido xilemático. Estos marcadores presentaron un gran potencial para la determinación y distinción de las especies estudiadas, lo cual se confirma con los resultados de esta investigación, en dicho proceso se validaron las diferentes condiciones de temperatura y tiempo para los 8 pares de oligonucleótidos. 5 muestras de árboles en pie y hoja estas fueron seleccionados como control para la validación de los 8 pares totales de la extracción de ADN tanto de hoja como madera: trnF, trnL, trnLF, ccmp2, ccmp3 y ccmp10, descartando PS2 y PS3 ya que no hubo

amplicones, sin embargo, no se descartan del todo ya que se podrían utilizar con nuevas condiciones de temperatura y tiempo (a través de un gradiente de temperatura) o diferentes muestras arbóreas en PCR, ya que están catalogados como marcadores genéticos citados en la bibliografía utilizados en *Piceas* (Pinaceae) y *Pinus sylvestris* L., por Soranzo, et. al. (1998) y Besnard et. al., (2003).

Los radios de pureza 260/280 fueron en rango de los 1.5 - 2.0 y en los casos donde la madera presentaba mayor tiempo de tala y humedad del 6% se obtuvieron por debajo de los índices deseables (debajo de 1.5). Los amplicones fueron de tamaño esperados y oscilaban en rangos de los 100 a los 1200 pb según la bibliografía (Rachmayanti, 2009), lo que confirma la reproducibilidad del método. Todos estos resultados están descritos y resumidos en la tabla 13. Una vez confirmados los amplicones se validaron los fragmentos en el laboratorio de Macrogen Korea, para la corrida de las secuencias nitrogenadas. Dieron como resultado 182 electroferogramas donde muestran los picos de identidad de las curvas de espectros de las bases nitrogenadas: A, T, C, G, éstos presentan definiciones de amplitud de espectro de acuerdo al esperado para las bases nitrogenadas y así mismo funcionan como patrones de identificación y distinción únicos de cada célula por individuo caracterizados, lo cual es la médula de este trabajo de tesis. Estos picos surgieron como respuesta a la composición genómica y los sitios de identidad que los oligonucleótidos segmentan para crear marcadores genéticos en cada especie. Estas lecturas ayudaron en la identificación de las muestras analizadas de este estudio y todo se logró mediante la extracción de ADN. Es importante esta revelación ya que, es la validación de genes que caracterizan a las células arbóreas, encontrando patrones de similitud en hoja y sobre todo en madera los cuales se proponen como alternativas para la identificación arbórea es a través de la codificación de genética. La base de datos biotecnológica NCBI fue consultada con los distintos archivos en “fastq” y “notes” de las secuencias de las bases nitrogenadas que resultaron en este estudio. Se realizaron también los análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool por sus siglas en inglés) y con estos análisis se observó que los genes correspondían a sitios satelitales del genoma encontrados en cloroplastos de árboles con similitudes que oscilan de 82 a 100%; esto nos da un resultado muy prometedor ya que la base de datos es alimentada a nivel

internacional y se pueden contrastar los genes de distintos árboles ya reportados para identificarlos. Sin embargo, se observó que para las ciertas identidades se pueden encontrar la baja compatibilidad ya que hace falta más investigación para la caracterización de células de madera, debido a que la bibliografía también cita que las células parenquimáticas carecen de cloroplastos y en su lugar tienen protoplastos que contienen información genética rastreable y que puede que aún no estén reportados en la base internacional. Toda esta información se abre para ser manejada y aplicada como parte de una metodología que sirva y funcione como herramienta para la identificación de la madera, así mismo, se hizo la propuesta de generar un código de barras que ayude a la trazabilidad de las especies arbóreas atendiendo una de las necesidades que actualmente en nuestro país se requieren: más investigaciones genéticas aplicadas en el campo de las ciencias y tecnología de la madera. El código C.U.F.R.A, genera esa información genética que pueda ayudar a los sectores que aprovechan y comercializan productos madereros.

7.2 Conclusiones

- 7.1.1 Se identificaron molecularmente las muestras de *P. pseudostrobus* L., *P. sp.*, *P. Devoniana*, *Cupressus sempervirens* sp., *Liquidambar styraciflua* L. y *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand.
- 7.1.2 Se replicó la metodología para dos géneros de coníferas en condiciones críticas de muestreo, obteniendo caracteres de nucleótidos de todas las especies que pueden ser rastreables en una base de datos internacional (NCBI), que la convierte en un sistema de utilidad para ser cotejada sin necesidad de la morfología botánica de la muestra.
- 7.1.3 La metodología utilizada para la extracción genómica de material xilemático, se pudo evaluar y aplicar para todas las especies arbóreas de este caso de estudio, haciéndola una herramienta que pueda ayudar en la identificación de las especies arbóreas.
- 7.1.4 Con los códigos genéticos se logra tener polimorfismos de los nucleótidos que nos ayudan a generar huellas únicas de rastreo y que pueden ser aplicados en más investigaciones. Que puedan servir como una técnica precursora en futuras investigaciones, facilitando su rastreabilidad, descripción taxonómica y botánica mediante su conformación genómica.

9. ANEXOS

Pinus sp.

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Pinácea

Género: *Pinus*

Especie: *Pinus*

Nombre científico: *Pinus* sp.

País: México

Estado: Michoacán,

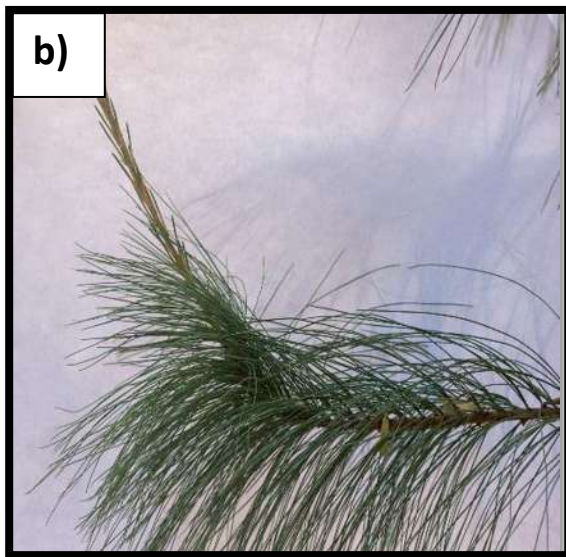
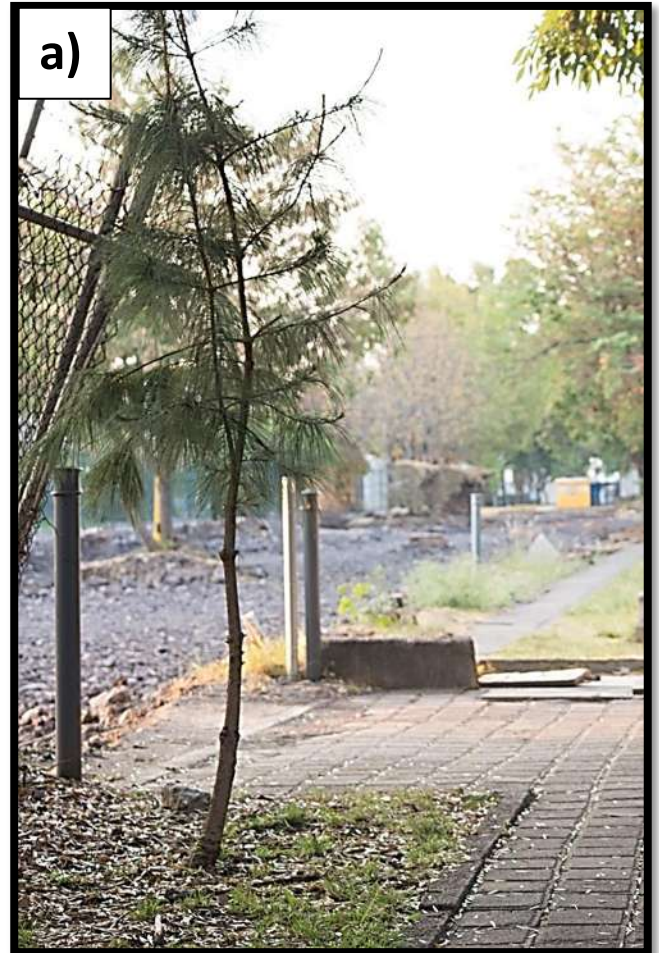


Figura 19. Morfología botánica de *Pinus* sp. a) árbol completo, b) rama y acículas.

Descripción de la especie

Su sinonimia es pino, su forma es un pino alcanza los 3 metros de altura con ramas extendidas en el mismo plano alrededor del tronco. Árbol relativamente joven de aproximadamente 3 años, siempre verde. La misma planta carece de flores o fruto. La corteza es áspera y grisácea, con partes de color rojizo, no presenta divisiones debido a la edad. Su madera, aunque no se caracterizó anatómicamente, por lo general en *pinus* es blanca, de textura fina y uniforme, y se usa en aserrío. Este árbol despiden un aroma exquisito, superior e intensidad al de otros pinos. Su madera cuenta con anillos de crecimiento bien definidos y con células epiteliales definidas, canales resiníferos fisiológicos. Las traqueidas son con secciones poligonales. Ramas jóvenes y hojas, son como agujas triangulares de 10 a 13 cm de largo, están agrupadas en racimos de 5 acículas, sujetas en su arranque por una pequeña vaina que más tarde se cae. Son delgadas, verde oscuro de bordes serrados con denticillos. Vainas caedizas. No presenta Frutos. Ecología y distribución. Es nativo de las montañas del sudeste de México y oriente de América Central, Sierra Madre del Sur y del Este del Eje Volcánico Transversal. Está confinado a altitudes de 2000 a 3500 msnm. Se encuentra en los estados de Jalisco, Querétaro, Michoacán, Hidalgo, Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Veracruz, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Alguno de los usos de *pinus* son la resina se usa para producir trementina y brea y como ayuda en trastornos respiratorios; también para la elaboración de papel, construcciones y artesanías.

Muestra botánica



Figura 19a. Muestra botánica de *Pinus* sp.

Cupressus sempervirens

Reino. Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Cupresáceas

Género: Cupressus

Especie: Cupressus

Nombre científico: *Cupressus sempervirens*

Estado: Michoacán

País: México

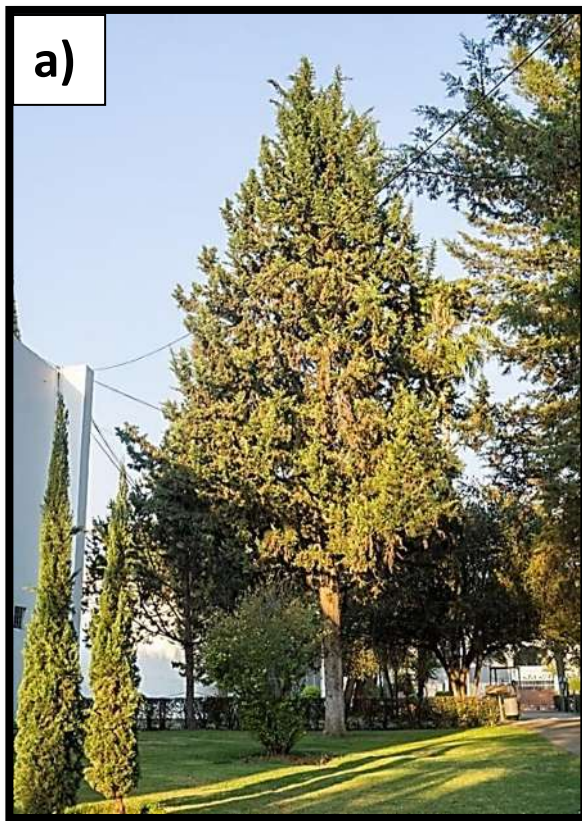


Figura 20. Morfología botánica de *Cupressus sempervirens* a) árbol completo, b) hojas, fruto, rama. c) corteza

Descripción de la especie

Su Sinonimia. Cedro, el tamaño del árbol alcanza los 16 metros de altura, con fuste de 90 cm de diámetro, con ramas horizontales y extendidas, que forman una copa cónica. Su corteza es de estructura fibrosa, de unos 4 mm de espesor. La corteza de las ramas y de las ramillas primarias es escamosa y se desprende en placas delgadas, dejando la superficie lisa, de color rojizo violáceo. Su madera que, aunque no se caracterizó, es ligera de color paja pálido, durable en la humedad y de hilo recto y se parte fácilmente; la del duramen es de color rojo oscuro, parecido al cedro rojo. Con anillos de crecimiento poco o nada diferenciados, sin canales resiníferos fisiológicos. Traqueidas de sección poligonal, parénquima longitudinal presente, en distribución dispersa. Parénquima longitudinal con resina en su interior y con paredes transversales lisas a ligeramente noduladas. Radios leñosos uniseriados y en ocasiones parcialmente biseriados. Su número por mm² se encuentra en torno a los 115. Ramas jóvenes algo cenicientas algo opacas y lisas, con leve tinte violáceo. Las ramillas secundarias son rojizo oscuro violáceas y están vestidas de hojas que generalmente caen a los 4 años quedando la superficie de color glauco oscuro. Sus hojas de las últimas ramillas son opuestas, desiguales, ovadas o anchamente ovadas y atenuadas, apretadamente imbricadas, con el ápice redondeado u obtuso, rara vez algo agudo en algunas ramillas, dorso deprimido, sin glándula o con glándula pequeña oval, situada hacia la parte media y solamente visible en algunas hijas bien desarrolladas. Presentaba inflorescencias masculinas oblongo obtusos, amarillentas de unos 3 mm con 12 escamas ovado acuminadas, ligeramente erosas en el margen. Al madurar con sacos de polen. También presentaba frutos en forma de conos son globulosos u ovales, a veces casi oblongo sobre las ramillas secundarias y frecuentemente en las primarias, en grupos de 20. Constan de 8 escamas, leñosas y muy gruesas, con la superficie rugosa o cenicienta y la interior intensamente rojiza, los umbos son fuertes y allanados, dirigidos hacia el ápice de las escamas y algo encorvados. Las semillas son numerosas, irregulares, oblongo aplanadas o vagamente triángulas o con una cara convexa y otra aplanada, con ala angosta. Miden de 5 a 7 mm de largo por unos 4 de ancho. Ecología y distribución. Árbol procedente de América del Norte extendiéndose desde el estado de Texas hasta el sur de Arizona, sur de California y Norte de México.

Muestra botánica

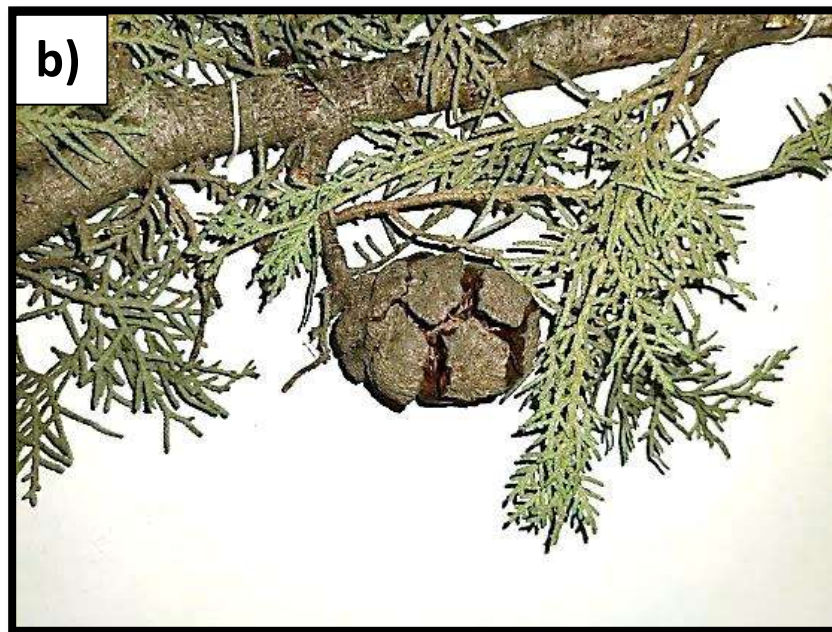


Figura 20a. Muestra botánica de *Cupressus sempervirens* a) árbol completo, b) hojas, fruto, rama.
c) corteza

Liquidambar styraciflua L.

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Saxifragales

Familia: Hamamelidácea/ Altingiaceae

Género: Bombacoideae

Especie: *Liquidambar macrophylla*

Nombre científico: *Liquidambar macrophylla* Oerst.

País: México

Estado: Michoacán

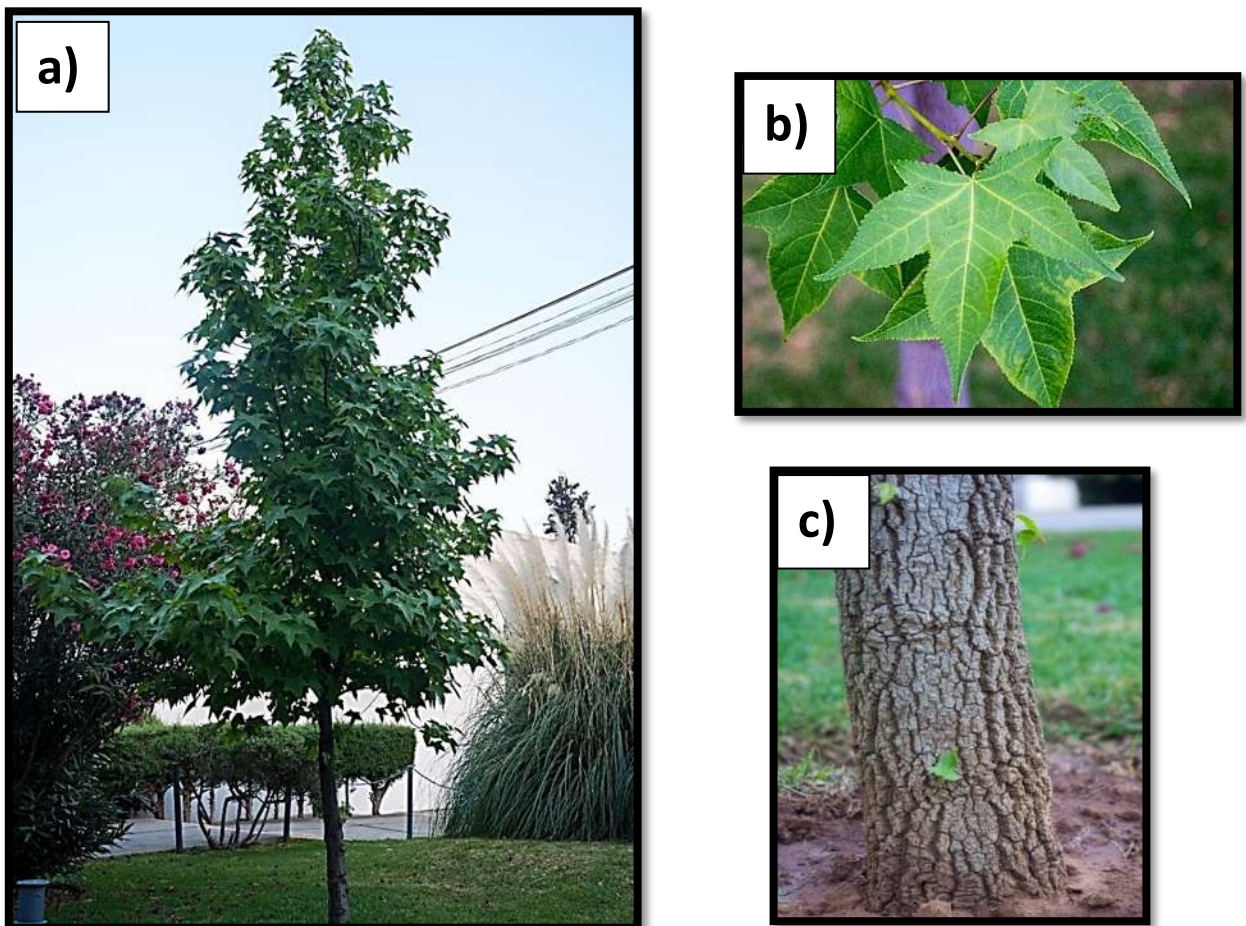


Figura 21. Muestra botánica de *Liquidambar styraciflua L.* a) árbol completo, b) hojas, fruto, rama.
c) corteza

Descripción de la especie

Su Sinonimia. *L. styraciflua* L. var. Mexicana oerst. Nombres comunes. Ocozote (del nahuatl ocozotl, xochiocotzicuáhuítl, norte de Puebla y Veracruz, norte de Oaxaca.) Liquidambar (en varias partes de la vertiente del Golfo); bálsamo (Sierra Madre del Sur, Oaxaca); yagabizigui (zapoteco, Oaxaca); molá (Chinanteco, Oax.); icob (huasteco, S.L.P.); copalillo, quirámbaro, somerio (S.L.P. Hgo); copalme (Ver.) estoraque (Oax., Chis.), iengau-o, ingamo (cuicateco, Oax.); xochicatscuahuitl (Ver.); suchete (Hgo.); toshcui (zoque, Chis.); Ko'ma (totonaco, Pue.); Ko'ma'lisho, slu'to'nko' (totonaco, norte de Pue.) so te (tzeltal, Chis.). Su forma es un árbol de aproximadamente 6 metros de alto y DAP de 30 cm, con el tronco recto, ramas ascendentes, delgadas y copa alargada o piramidal. Su corteza externa angostamente fisurada, suberificada, moreno-grisácea. Interna de color crema amarillento que cambia a pardo, ligeramente amarga, fibrosa. Grosor total de la corteza de 5 a 10 mm. Su madera es albura de color crema amarillento muy claro, con abundantes rayos muy finos. Presenta ramas jóvenes con cicatrices de hojas caídas, moreno rojizas a pardo grisáceas, glabras, en ocasiones con lenticelas grandes y protuberantes. Hojas de yemas de hasta 1.5 cm, cubiertas por escamas agudas u obtusas, morenas y brillantes, glabras, dispuestas en espiral, simples; láminas más anchas que largas verde oscuro y opacas en la haz y verde pálido en el envés, que cambian a rojizas y prominentes en el envés, con un manojito de pelos en el punto de su inicio en la base; las hojas tienen un agradable olor a trementina cuando se estrujan. No presentaba flores, aunque, florece de enero a marzo. Se encontró frutos en forma de agregados en cabezuelas de 2.5 a 4 cm de diámetro, en pedúnculos de 5 a 6.5 cm de largo, glabros, morenos a negro brillantes. Ecología y distribución. Se encuentra en la vertiente del Golfo a lo largo de la Sierra Madre Oriental, desde el sur de Nuevo León y Tamaulipas, hasta el norte de Chiapas, y en la vertiente del Pacífico en la Sierra Madre del Sur en Oaxaca. Y en la Sierra del Soconusco en Chiapas, y probablemente en algunas partes más protegidas y húmedas de la Sierra Madre del Sur en Guerrero. Usos. Con su madera se hacen tablas para construcciones rurales. No tiene uso industrial.

Muestra botánica

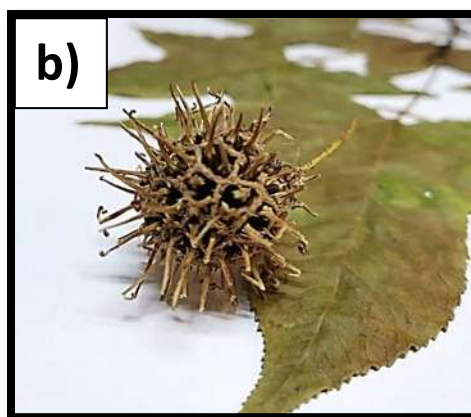


Figura 21a. Muestra botánica de *Liquidambar styraciflua* L., a) hoja y fruto secas, b)fruto seco.

Pseudobombax Ellipticum

Reino: Plantae

División: tracheophyta

Orden: Malvales

Familia: Bombacácea

Género: *Pseudobombax*

Especie: *Pseudobombax ellipticum*

Nombre científico: *Pseudobombax ellipticum* (Kunth)

Dugand

País: México

Estado: Michoacán

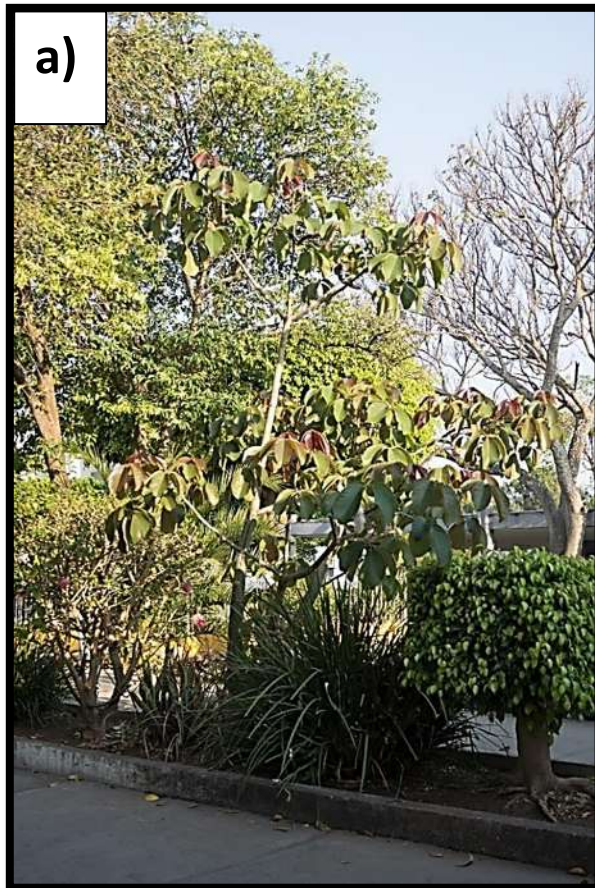


Figura 22. Morfología botánica *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand a) árbol completo, b) hojas, fruto, rama, c) corteza, d) fruto.

Descripción de la especie

Su sinonimia. *Bombax balanoides* Ulber. (Notizb oyage of H. M. S. Herald 83; 1853), ceibo verde, ceibo barrigón, barrigón, ceiba de rayas, ceibo macho, Barrigon Wood, striped ceibo Wood. Forma. Árbol grande, caducifolio, de altura aproximadamente 6 metros, 50 cm de D.A.P. Tiene fuste recto y cilíndrico, sin agujijones y ensanchado en la base, copa ancha y ramas horizontales y colgantes. La corteza externa es grisácea y está surcada por bandas verticales de color verdoso. La corteza interna es fibrosa, laminada, cremosa o rosada, pero oxidada a pardo. Las estipulas son largas y deciduas. La savia es mucilaginoso. Su madera. No hay diferencia entre albura y duramen. La madera verde es pardo rojizo y la seca es pardo rojizo claro. El grano es recto, la textura gruesa y el lustre ausente. La madera no tiene olor ni sabor característicos. Los anillos de crecimiento están demarcados por bandas finas. Las hojas son palmado compuestas, alternas, distribuidas en espiral, con 5-7 folíolos, obovados, acuminados, con margen entero base decurrente, sésiles o con pecíolos muy cortos y acanalados axialmente. No presentaba flores. La inflorescencia es cimosa, con 2-5 flores o flores solitarias, hermafroditas, actinomorfas, grandes, vistosas, con aroma agradable y suave. Si presentaba frutos es una cápsula semileñosa, fusiforme, dehiscente que abre por 5 valvas. Contiene muchas semillas pequeñas dispersas en la masa de tricomas (fibras) grisáceas y lanosos. Ecología y distribución. La especie se encuentra en el Pacífico norte, central y sur, así como en la zona norte y caribe, entre los 0-300 m.s.n.m. Usos. Tiene propiedades muy limitadas. Es fácil de aserrar, pero es difícil obtener superficies lisas al cepillar, porque se produce grano mechudo, en las superficies radial y tangencial. La madera seca es buena para tornear. El contenido de resinas dificulta su utilización en chapas. Es muy susceptible al ataque de hongos de la pudrición blanca y parda, así como a las termitas de la madera seca. No puede permanecer en el piso del bosque porque es susceptible a la mancha azul. Aun así, puede funcionar como aislante o material de relleno, empaque, cajas y fósforos, chapas, canoas y otros artículos que deban flotar. La corteza proporciona fibras utilizables en cordelería.

Muestra botánica



Figura 22a. Muestra botánica *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand, a) hoja y fruto seco, b) fruto, algodoncillo, semillas.

CARTA DE AUTENCIDAD DE ESPECIES A TRAVÉS DE LAS MUESTRAS BOTÁNICAS-UMSNH-FITECMA-EBUM-UNAM.



Universidad Nacional
Autónoma de México



HERBARIO NACIONAL DE MÉXICO

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Ciudad de México, a 31 de julio de 2019.

Ivonne Edith Murillo Sánchez
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
PRESENTE

Hago de su conocimiento las identificaciones o ratificaciones taxonómicas, realizadas en el Herbario Nacional de México, para la solicitud hecha por Ud. El 20 de julio 2019. Así mismo le estoy proporcionando el número de folio de cada muestra en nuestro acervo.

Murillo et al., 001: *Pinus pseudostrubus* Lindl., det. David S. Gernandt, 2019 (folio 1507264).

Murillo et al., 002: *Pinus sp.*, det. David S. Gernandt, 2019 (folio 1507262).

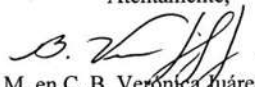
Murillo et al., 003: *Cupressus aff. sempervirens* L., det. David S. Gernandt, 2019 (folio 1507263).

Murillo et al., 004: *Liquidambar styraciflua* L. (folio 1507260).

Murillo et al., 005: *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand (folio 1507261).

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

Atentamente,


M. en C. B. Verónica Juárez Jaimes
Programa de determinación.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sanjuán Dueñas R. (1997) Obtención de pulpas y propiedades de las fibras para papel. Universidad de Guadalajara, México. 293 p.
2. FAO, (2017)-silvicultura comunitaria de México, Disponible en: <http://www.fao.org/mexico/noticias/detail-events/es/c/1144371/>.
3. OCDE/CAF/CEPAL (2018), Perspectivas económicas de América Latina 2018: Repensando las instituciones para el desarrollo, Éditions OCDE, París. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1787/leo-2018-es>
4. FAO (2018), El estado de los bosques en el Mundo (Las vías forestales hacia el desarrollo sostenible, Roma, Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. p.p 131.
5. FAO, (2018) Caracterización del sector forestal, disponible en <http://www.fao.org/3/j2215s/j2215s06.htm>.
6. Programa FAO-UE FLEGT disponible en <http://www.fao.org/europeanunion/eu-projects/programa-para-la-aplicacion-de-las-leyes-gobernanza-y-comercio-forestales-programa-ue-fao-flegt/es/>.
7. FLEGT, (2017), Benin: Government agency blazes trail for traceability, disponible en: <http://www.fao.org/in-action/eu-fao-flegt-programme/from-the-field/stories-details/en/c/469640/>.
8. FLEGT, (2003) Aplicación De Las Leyes, Gobernanza Y Comercio Forestales, Propuesta De Plan De Acción, Brúcelas 21.5.2003 COM 251.
9. Consejo Civil Mexicano para la Silvicultura Sostenible. (2014). New evidence that Mexico's community forests protect the environment, reduce poverty, and promote social peace. CCMSS, Ciudad de México.
10. CONACYT-SEGOB (2017). Fondo Sectorial CONACYT - SEGOB - CNS Para La Seguridad Pública, Convocatoria 2017-3, “Desarrollo Tecnológico E Innovación”, NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SEMARNAT-2010.
11. Brack, D. (2014). Promoting Legal and Sustainable Timber: Using Public Procurement Policy. Research Paper. Energy Environment and Resources, the Royal Institute of International Affairs. Chatham House, Londres.

12. WRI-USDA (2017). Forest legality initiative. Lacey Act Primer And Updates USDA (Disponible en <http://www.forestlegality.org/policy/us-lacey-act>).
13. CONAFOR, (2005), Fichas técnicas sobre características tecnológicas y usos de maderas comercializadas en México, México, 2005. 132 p.
14. García Moreno, T. (2010), Anatomía de la madera, Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, UMSNH, Morelia, Michoacán, 80 p.
15. Takayoshi Higuchi, (1997) Bioquímica y biología molecular de la formación de la madera.
16. Ávila, Calderón L.E. A (2012), Fundamentos de Química de la Madera, Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, UMSNH, Morelia, Michoacán, México, ISBN 978-607-424-368-0 113 p.
17. Ortega E. F (2011), Diversidad arbórea maderable, quimera inalcanzable, Instituto de Ecología, A. C., Universidad Autónoma de México (UNAM), Ciencias 101.
18. Schuster, S. C. (2007). Next-generation sequencing transforms today's. NATURE METHODS, 16-18.
19. Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(1512), 313-321.
20. Ken A. Thomson y Steven G. Newmaster. (2014). Herramientas taxonómicas moleculares proporcionan estimaciones más precisas de la riqueza de especies a menor costo que las prácticas taxonómicas tradicionales basados en morfología en un estudio de la vegetación. Biodiversidad conservación y desarrollo, 14.
21. Vignote P. S. (2006), Tecnología de la Madera, Mundi-Prensa, Madrid, Barcelona, México, 3ª edición, 685 p.p.
22. Weber, F. (1936) Das Wort Protoplasma, protoplasma DOI 26:109-112.
23. Studnicka, F.K (1937) Notch einiges über das Wort Protoplasma. Protoplasma DOI 27:619-625.
24. Esaú, K (1985), Anatomía Vegetal, Omega S.A Plató, 26, Barcelona, 3ª edición, p. 779

25. Tsoumis, G. 1991. Science and technology of wood. Structure, properties, utilization. Van Nostrand Reinhold. New York. 494 p.p.
26. Danial, D. (2007), Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de las plantas, Departamento de mejoramiento genético, Universidad de Wageningen Holanda, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP, Ecuador, PREDUZA-WU, 199 p.p disponible en <https://www.researchgate.net/publication/317841900>
27. Macarulla, J. M. (2007). Bioquímica. Barcelona: Reverté.
28. Malajovich, M. A. (2010). Extracción de ADN. Biotecnología: enseñanza y divulgación, 5.
29. David T. Parkin y J H Wetton. (1991). DNA fingerprinting. Molecular Techniques in Taxonomy, 2.
30. M. Solignac y M. Pélandakis. (1991). Ribosomal RNA phylogenies. Molecular Techniques in Taxonomy, 2.
31. Paul DN Hebert y Alina Cywinska, (2003), Identificación Biológica a través de códigos de barras de ADN, The Royal Society, 9 p.
32. Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. Molecular Techniques in taxonomy, 2.
33. Aline Borges y Mariana Silva Rosa. (2009). Métodos de CTAB para la extracción de la batata de microsatélites para el análisis de ADN. Sci. Agric, 6.
34. Wilberth Phillips- Mora y Helga Rodríguez. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. Con ejemplos de investigación de cacao (*Theobroma cacao*). Turrialba: Centro Agronómico tropical de investigación y enseñanza.
35. M.J Asif y Charles H. Cannon. (2005). DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*). International Society for plant Molecular Biology, 2.
36. Juan C. Castro Gomez y Marianela Cobos Ruiz. (2012). Aislamiento de ADN Genómico de *Myrciaria dubia* (HBK) "Camu Camu" apropiado para análisis moleculares. Ciencia Amazónica, 10.

37. Stallin Nithaniyal y Steven G. Newmaster. (2014). DNA Barcode authentication of wood samples of threatened and commercial timber trees within the tropical Dry evergreen forest of India. PLOS ONE, 11.
38. SG Newmaster y AJ Fazekas. (2006). Los códigos de barras de ADN en plantas terrestres: Evaluación de RBCL en un enfoque de múltiples genes en niveles. National Research Council Canadá, 7.
39. M. Megan Reynolds y Claire G. Williams. (2004). La extracción de ADN a partir de madera de pinus sumergido. NRC Canadá, 4.
40. White, E. et al, (2000), Microsatellite markers for individual tree genotyping: application in forest crime prosecutions, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Chem Technol Biotechnology 75:923±926, Pacific Forestry Centre, Canadian Forest Service, 506 West Burnside Road, Victoria, British Columbia, Canada V8Z 1M5. 923:926.
41. Ken A. Thomson y Steven G. Newmaster (2014), Herramientas taxonómicas moleculares proporcionan estimaciones más precisas de la riqueza de especies a menor costo que las prácticas taxonómicas tradicionales basados en morfología en un estudio de la vegetación, Biodiversidad conservación y desarrollo, 14 p.p.
42. Rachmayanti, Y. (2008). DNA from processed and unprocessed wood: Factors influencing. Forensic Science International: Genetics, 185-192.
43. Vicente Savolainen y Robyn S. Cowan. (2005). Hacia escribir la enciclopedia de la vida: una introducción a los códigos de barras ADN. Philosophical Transactions of The Royal Society, 7.
44. N. Soranzo, J. Provan, W. Powell, (1998) Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L., Mol. Ecol. 7 1260–1261.
45. G. Besnard, V. Achere, P. Faivre Rampant, M. Favre, S. Jeandroz, (2003) A set of crossspecies amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in *Picea* (Pinaceae), Mol. Ecol. Notes 3 380–383.

Literatura consultada para la identificación Botánica de las especies arbóreas

46. Maximino Martínez (1953) Las pináceas mexicanas, Secretaria de Agricultura y Ganadería, Subsecretaría de Recursos Forestales y de Caza, México pp. 362. Cupressus.
47. Maximino Martínez, Los Pinos Mexicanos, (1948) Segunda edición Ediciones Botas pp. 271. Pinus.
48. José Sarukhan et al (2005) Árboles tropicales de México, Manual para la identificación de especies, Texto científico Universitario, 3ª edición, Terence D. Pennington ISBN: 970-32-1643-9. 524 p.
49. Luis Leur (2011), Árboles de México, Editorial Trilla ISBN: 978-17-0738-3, 368 p.
50. García E. et al (2002), Anatomía e identificación de maderas de coníferas a nivel especie, Coedición Fundación conde del Valle, Primera Edición ISBN 84-86-793-89-0, 421 p.
51. Kiado A. (1972), Xylotomy of the living Conifers, Pál Greguss, Budapest, 329 p.
52. Flores E. et al (2011), Árboles del trópico húmedo, importancia socioeconómica, Tecnológica de Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 1ª edición, ISBN: 9977-66-138-3, 919 p.
53. Catálogo de la colección del Herbario EBUM de la facultad de Biología de la UMSNH, edificio L planta baja.
54. Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Pseudobombax ellipticum* (Kunth) Dugand, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:152496>.
55. Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite*, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1244356>

56. Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Liquidambar macrophylla* Oerst., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:482007>.
57. Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Cupressus arizónica* Greene, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1005391>.