



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

OBTENCIÓN DEL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN DE
ESPECIES DE *Quercus* (Fagaceae) HOSPEDERAS DE
ADULTOS DE *Macroductylus* (COLEOPTERA:
MELOLONTHIDAE)

Tesis

Que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
BLANCA XOCHITL MOCTEZUMA VEGA

DIRECTORA:
María Rosete Enríquez

CO-DIRECTOR:
Allen J. Coombes



Agradecimientos

A mi directora de Tesis Biol. María Rosete Enríquez por su tiempo y dedicación, por compartir su conocimiento científico conmigo y por siempre tener una sonrisa esperándome.

A mis compañeros de generación, por los buenos momentos, el conocimiento compartido y por sus críticas constructivas a lo largo de la carrera.

A la Dra. Maricela Rodríguez Acosta y al Dr. Allen J. Coombes, por las correcciones sobre el escrito, su amabilidad y por compartir su enorme conocimiento científico.

Al Dr. Angel Alonso Romero López por el tiempo dedicado y su aporte tan valioso al escrito.

Dedicatoria

A mis papás, Jesús Moctezuma Medina y Blanca Xochitl Vega Reyes, porque después de todos estos años de vida, este logro es únicamente suyo.

Índice general

Índice generalIII

Índice de tablasV

Índice de figurasVI

AbreviaturasVII

1.-Resumen1

2.-INTRODUCCIÓN2

3.- ANTECEDENTES3

3.1 Generalidades de la Taxonomía3

3.2 Proyecto Código de Barras de ADN para la identificación universal de especies4

3.3 Taxonomía morfológica de encinos6

3.4 Taxonomía morfológica de melolontidos 9

3.5 Código de barras de ADN como herramienta para la identificación de encinos10

3.6 Antecedentes directos11

4.- JUSTIFICACIÓN13

5.- HIPÓTESIS13

6.- OBJETIVO GENERAL14

6.1 Objetivos específicos14

7.- MATERIAL Y MÉTODOS14

7.1 Determinación y selección de especies de encino hospederas de adultos *Macrodactylus*14

7.2 Recolección de muestras foliares de encinos15

7.3 Purificación de ADN genómico15

7.4 Cuantificación y visualización de ADN genómico16

7.5 Amplificación de ADN por PCR punto final17

7.6 Obtención del código de barras de ADN18

8.- RESULTADOS18

8.1 Selección de especies de encinos23

8.2 Obtención del código de barras de ADN combinando genes de cloroplasto y nucleares23

8.2.1 Purificación de ADN genómico de hojas desecadas25

8.2.2 Amplificación de genes marcadores moleculares25

8.2.3 Obtención del código de barras de marcadores genéticos de cloroplasto y nuclear29

8.3 Identificación de especies de encinos mediante el uso de códigos de barras35

9.- Discusión38

9.1 Presencia de *Macrodactylus* sp en los encinos38

9.2 Identificación mediante códigos de barras de marcadores de cloroplasto y nuclear39

10.- Conclusiones46

11.- REFERENCIAS46

Índice de cuadros

1. Secuencias de los iniciadores17
2. Muestreo del *Quercetum* del Jardín Botánico de la BUAP20
3. Concentración y pureza de ADN genómico de tejido foliar de encinos24
4. Especies con amplificación positiva para marcadores de cloroplasto *matK* y *trnH-psbA* y nuclear ITS 29
5. Secuencias y electroferogramas utilizando el marcador *matK* para las cinco especies de *Quercus*. 30
6. Secuencias y electroferogramas utilizando el marcador *trnH-psbA* para *Quercus crassipes*, *Quercus grahamii* y *Quercus laeta*.32
7. Secuencia y electroferograma utilizando el marcador ITS para *Quercus grahamii* 34
8. Porcentajes de nucleótidos presentes en las secuencias de encinos hospederos de melolóntidos35
9. Números de acceso de las especies de encinos registradas y porcentajes de similitud en la base de datos NCBI con el marcador molecular *matK*..37
10. Secuencias del marcador *trnH-psbA* comparadas en la base de datos NCBI.37

11. Secuencia de ITS con *Quercus grahamii* comparada en la base de datos NCBI38

Índice de figuras

1. Procesamiento y funcionamiento del sistema por código de barras general6
2. Tricomas8
3. Hojas y frutos de *Quercus hintonii* Warburg9
4. Adultos de *Macrodochylus* sp. sobre una hoja de *Quercus laeta*19
5. Hojas nuevas de *Quercus germana*20
6. Representación de hojas de *Quercus* recién recolectadas23
7. Representación de hojas de *Quercus* después del proceso de eliminación de humedad24
8. Amplificación por PCR del marcador *matK* 25
9. Amplificación por PCR del marcador *trnH-psbA* 26
10. Amplificación por PCR del marcador *trnH-psbA* con temperatura de 55°C27
11. Amplificación por PCR del marcador ITS28
12. Amplificación por PCR del marcador ITS utilizando 46°C para el alineamiento28

13. Representación de hojas de a) *Quercus crassipes* y b) *Quercus shumardii*⁴¹
14. Representación de hojas de a) *Quercus liebmannii*, b) *Quercus germana* y c) *Quercus corrugata*⁴³

Abreviaturas

- ξ **µl**- microlitros
- ξ **ADN**- ácido desoxirribonucleico
- ξ **ARNr**- ácido desoxirribonucleico ribosomal
- ξ **ARNt**- ácido desoxirribonucleico de transferencia
- ξ **AT**- adenina-timina
- ξ **BLAST**- Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local
- ξ **BOLD**- Sistema de Datos del Código de Barras de la Vida
- ξ **CBOL**- El Consorcio para el Código de Barras de la Vida
- ξ **dNTPs**- mezcla de cuatro desoxirribonucleicos trifosfato
- ξ **GC**- guanina-citosina
- ξ **h**- horas
- ξ **ITS**- región interna espaciadora
- ξ **matK**- gen de cloroplasto que codifica para la proteína “maturase K”
- ξ **min**- minutos
- ξ **ml**- mililitros
- ξ **mm**- milímetros
- ξ **NCBI**- Centro Nacional de Información Biotecnológica
- ξ **ng**- nanogramos

- ξ **nm**- nanómetros
- ξ **pb**- pares de bases
- ξ ***trnH-psbA***- gen de cloroplasto no codificante
- ξ ***rbcL***- gen de cloroplasto que codifica para la proteína RUBISCO
- ξ **rpm**- revoluciones por minuto
- ξ **s**- segundos
- ξ **sp.**- especie
- ξ **TAE**- tris, ácido acético glacial y EDTA
- ξ **v**- volts

RESUMEN

La taxonomía tradicional se ha visto envuelta en una serie de limitaciones al tratar de discernir entre especies utilizando solo la morfología. Actualmente se utiliza la llamada "taxonomía integrativa" que abarca diversas técnicas de diferentes disciplinas como la biología molecular y la bioinformática, las cuales traen consigo nuevas propuestas de herramientas de identificación que complementan la información para la delimitación certera de especies. Esta información nos ayuda a entender varias relaciones ecológicas entre distintas especies y así plantear estrategias específicas en cuestiones por ejemplo de conservación. Una de estas propuestas es la identificación por medio de Código de Barras de ADN. Esta herramienta fue utilizada en el presente trabajo para la identificación de cinco especies de *Quercus* (encinos) que se detectaron como hospederos de adultos de *Macroductylus* (Coleoptera: Melolonthidae), los cuales son comúnmente conocidos por ser una plaga potencial para varias especies de plantas. Además, se obtuvo un primer reporte de la presencia de estos insectos en encinos blancos y rojos distribuidos en México. Utilizando los marcadores moleculares *matK*, *trnH-psbA* de cloroplasto y el marcador nuclear ITS, se determinó la identidad a nivel de género de muestras de hojas de cinco árboles, siendo la región intergénica *trnH-psbA* el marcador que demostró mayor poder de discriminación entre secuencias con un 93% de discriminación de identidad, en comparación con *matK* con un 96% e ITS con 99%. También, se registraron cinco secuencias parciales del gen *matK* en la base de datos internacional NCBI, registrando los números de acceso MK239963 al MK239967. De esta manera, el presente trabajo contribuye al consenso de uso de marcadores moleculares específicos para encinos distribuidos en México y denota un nuevo panorama del estudio de interacciones planta-insecto mediante la taxonomía integrativa.

2.- INTRODUCCIÓN

La taxonomía es una de las disciplinas más importantes dentro de la Biología, ya que tiene como labor la descripción, la identificación y el nombramiento de las especies. No obstante, la identificación frecuentemente se ha considerado solo como un servicio para crear un listado de la biodiversidad. Contrario a esta visión, es ampliamente aceptado que la importancia de la identificación radica en su aceptación como pionera en la búsqueda de todas las formas de vida. Por lo tanto, la ambición de la taxonomía es abrir las puertas a la investigación, ofreciendo información que se utiliza en todas las disciplinas dentro de la biología, ya que sin el trabajo de identificación no se podrían sustentar, comparar o analizar resultados que pretenden ordenar la enorme diversidad biológica sobre el planeta Tierra (Ciprandi-Pires y Marinoni, 2010; Wilson, 2004). Para identificar, el hombre se ha basado principalmente en una serie de características morfológicas que distinguen a cada grupo de organismos en el Árbol de la vida. Pero actualmente se utilizan también herramientas moleculares que permiten agilizar y adicionar información relacionada con las especies, formándose así la llamada taxonomía integrativa. Una vez que se ha logrado identificar y delimitar a las especies, se puede utilizar esta información para la creación de filogenias, las cuales ayudan a predecir importantes interacciones ecológicas entre especies y establecer estrategias de biología de la conservación (Hipp *et al*, 2013).

Una de las interacciones entre especies más común resulta ser la que presentan las plantas hospederas de insectos, siendo un ejemplo de relaciones mutualistas o parasitarias. Por lo tanto, es importante conocer a quienes participan en la interacción para dilucidar si es benéfica o perjudicial y si pone en riesgo la supervivencia de alguna de las especies involucradas. Debido a que las especies de encinos (*Quercus* L.) habitantes del territorio mexicano representan un gran porcentaje de diversidad de árboles, ya que se cuenta con alrededor de 500

especies de encinos a nivel mundial, de las cuales 109 son endémicas, es necesario estudiar sus interacciones con sus hospederos (Valencia-A, 2004). Al respecto, se ha reportado que los encinos son plantas hospederas de coleópteros adultos de Melolonthidae (Cherman y Morón, 2014), como los integrantes de *Phyllopha ravidia* Blanchard y *Macroductylus rufescens* Bates, quienes han sido hallados como depredadores de follaje. Además, estos insectos no sólo utilizan al encino como alimento sino también como sitio de interacción para la cópula (Aragón *et al*, 2001; Arce-Pérez y Morón, 2000), actividad de gran relevancia ya que involucra la supervivencia de estas especies de coleópteros. Sin embargo, en los estudios en donde se ha descrito la interacción entre encinos y estos insectos solamente se ha avanzado en la identificación de encinos hospederos a nivel de género, mientras que para los insectos se cuenta con la identidad del género y un primer registro preliminar a nivel de especie.

Por tal razón, en el presente trabajo se pretende obtener el código de barras de dos marcadores moleculares de cloroplasto y uno nuclear con el propósito de facilitar la identificación rápida y segura de especies de encinos distribuidas en México, cuyos individuos brindan refugio, alimento y sitio de apareamiento a adultos de *Macroductylus*, considerados como insectos de importancia ecológica y económica en territorio nacional.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de taxonomía

La taxonomía es una disciplina que se centra en la conceptualización del orden general de los seres vivos y tiene como objeto agrupar a los organismos dentro de las categorías jerárquicas que son: reino, phylum, clase, orden, familia, género y especie, conforme a las semejanzas o diferencias que muestran entre sí. Desde sus inicios en 1758, Carl Nilsson Linnaeus utilizó herramientas fiables como la anatomía, la fisiología y la nomenclatura para describir e identificar a las plantas

de acuerdo a sus características, incluyéndolas en grupos gracias al vocabulario descriptivo de los caracteres. Otra herramienta básica y necesaria para la clasificación son las colecciones científicas o herbarios, que cuentan con los especímenes bien preservados y ordenados para futuras comparaciones y para la creación de filogenias (Marzocca, 1985). Es grande el avance que se tiene hasta ahora utilizando la taxonomía tradicional; sin embargo, presenta ciertos problemas y limitaciones que comprometen la veracidad de la identificación. Por lo tanto, actualmente se utiliza la taxonomía integrativa, que incluye diversas disciplinas dentro de la biología para delimitar especies, utilizando la comparación entre estados de carácter ya descritos contra un sistema de múltiples caracteres (Will *et al*, 2005). Por tal razón, es probable que con el uso de la taxonomía integrativa se tengan nuevas interpretaciones que dan como resultado la creación de nuevos grupos (Ciprandi-Pires y Marinoni, 2010). Gracias a las técnicas morfológicas, genéticas, químicas, moleculares y de otros avances tecnológicos como son la secuenciación de ADN, los sistemas de información y otras herramientas informáticas se tienen grandes opciones para la recaudación de información, como de la reproducción, estructuras y funciones para la identificación y clasificación de las plantas, haciendo las relaciones filogenéticas más robustas y confiables.

Con esto la taxonomía integrativa está resurgiendo como una disciplina sólida y con la digitalización de varias iniciativas globales como el Proyecto Internacional de Código de Barras de la Vida (iBOL); su disponibilidad y acceso a la información para la investigación ha aumentado exponencialmente siendo una gran ventaja para estudiantes e investigadores (Padiál *et al*, 2010).

3.2 Proyecto código de barras de ADN para la identificación universal de las especies

El código de barras de ADN es una de las herramientas moleculares más usadas para la identificación de especies. En esta herramienta se realiza una

representación gráfica donde cada base nitrogenada es representada por una línea vertical de un solo color, dando un aspecto de código de barras. Por lo tanto, un código de barras de ADN se visualiza con líneas verticales de color verde para la adenina, rojo para la timina, amarillo guanina y azul para la citosina (Rosete-Enríquez, 2016).

En un código de barras de ADN se utilizan genes marcadores con propiedades deseables que están claramente definidas como: a) el gen debe ser casi idéntico en organismos de las mismas especies pero distinto entre individuos de diferentes especies; b) la secuencia completa o una sección del gen debe estar estandarizada (la misma sección debe ser usada en diferentes grupos taxonómicos), y por último, c) el gen marcador debe ser fuerte, es decir, con sitios conservados de unión a iniciadores que le permitan ser rápidamente amplificado y secuenciado (Telfer *et al*, 2015). El código de barras de ADN es un sistema creado por el investigador Paul Hebert de la Universidad de Guelph en Ontario, Canadá, en el 2003. Su iniciativa es utilizar secuencias de nucleótidos cortas de una parte estandarizada del genoma para procesarlas y obtener el código de barras único de cada especie, así como se utiliza en los productos de los supermercados. Dado que la taxonomía presenta problemas al describir especies utilizando solo caracteres morfológicos, la escasa presencia de taxónomos especializados y la falta de claves taxonómicas desarrolladas y precisas, el uso de esta herramienta permite la obtención del código de las especies, utilizando solamente una pequeña cantidad de tejido (Figura 1), ayudando así a ecólogos, conservacionistas y taxónomos a agilizar el proceso de identificación, incluso a identificar taxones divergentes que pueden representar nuevas especies (Hebert y Gregory, 2005).

El código de barras tiene cuatro componentes cruciales, los cuales son:

- Los especímenes: son los organismos que se encuentran almacenados tanto en herbarios, museos, colecciones de tejido congelado y otros depósitos de material biológico.

- Los laboratorios de análisis: donde se hace la extracción del ADN y procesamiento para la elaboración del código deseado.
- Las bases de datos: son las librerías electrónicas donde se sube la información para que los investigadores tengan acceso a ella. Bases de datos reconocidas que albergan contenido de código de barras son La Internacional Base de Batos de Secuencias de Nucleótidos (The International Nucleotide Sequence Database Collaborative), Banco de genes (GenBank) y La base de datos del Código de Barras de la Vida (Barcode of Life Database, BOLD).
- El análisis de datos: se refiere a la identificación de especies, que se obtiene de acuerdo al porcentaje de diferenciación que presentan las secuencias analizadas con respecto a las secuencias registradas en las bases de datos.

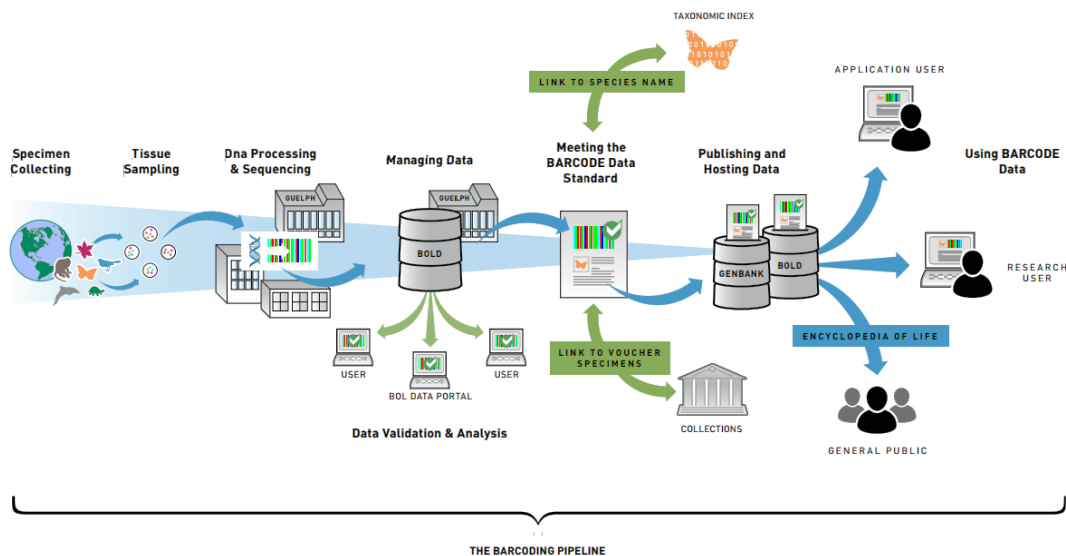


Figura 1. Procesamiento y funcionamiento general del sistema por código de barras. Empieza con la recolecta del material biológico a trabajar el cual será procesado extrayendo el ADN genómico para la amplificación de las secciones estandarizadas para la obtención del código. Después, la secuencia será subida a las plataformas y se analizará para evaluar su veracidad en la información presentada. Después de una serie de filtros bioinformáticos la información es subida a la base de datos junto con otras características del organismo trabajado pudiendo ser descargada y utilizada

por estudiantes e investigadores interesados en una especie en particular. (Recuperado de <http://www.barcodeoflife.org>)

3.3 Taxonomía morfológica de encinos

La taxonomía morfológica es la metodología tradicionalmente utilizada para la identificación de especies de encinos, con base a la descripción sistematizada y jerarquizada de características fenotípicas de regiones determinadas dentro de toda la estructura de los árboles, incluyendo los cambios morfológicos que estas regiones presentan ante diferentes condiciones ambientales (Valencia-Ávalos, 1991). De entre las regiones más utilizadas se encuentra el tallo o la corteza; esta última es muy variable entre las especies de encinos, ya que cuenta con diferentes fenotipos tanto en coloración como en textura (Zavala-Chávez, 1999). Por ejemplo, se ha detectado que en los encinos blancos se presentan diferencias en las cortezas con respecto a textura y coloración, siendo estas suaves, escamosas, grisáceas o castañas (Muller, 1951). También se considera que la corteza presenta diferencias en árboles de la misma especie dependiendo su edad o estado de desarrollo y que la textura afecta en el balance de calor, lo cual repercute en procesos fisiológicos y cambia el microclima para insectos y otros organismos que se hospeden en ellos, por lo que se considera como una adaptación evolutiva a ciertos ambientes (Derby y Gates, 1966).

Otro componente primordial en la identificación morfológica de encinos son las hojas, que son quizá las más utilizadas, ya que desde el tamaño, hasta la forma y en longevidad existe una gran cantidad de variabilidad entre especies y entre la misma especie. El tamaño y forma de las hojas varía desde grandes, delgadas y suaves hasta pequeñas, gruesas y tiesas (esclerófilas), dependiendo de la zona de residencia y de muestreo de los árboles. Al respecto, se conoce que las hojas esclerófilas se presentan en lugares donde hay bajos niveles de nutrientes y por lo tanto, repercute en la longevidad foliar (Zavala-Chávez, 1999). Entre otras características tomadas de la hoja, la presencia y cantidad de tricomas (Figura 2)

son utilizadas a menudo para discernir entre especies (Penas *et al*, 1994). La arquitectura foliar es de gran utilidad para la diferenciación morfológica entre especies, desde los patrones de venación hasta la forma, ya sean lanceoladas, elípticas y ovaladas, con margen dentado, liso o lobulado. Estas características son utilizadas por varios investigadores para discernir entre especies muy parecidas tales como *Quercus sartorii* Liebm. y *Quercus xalapensis* Bonpl. (Martínez-Cabrera *et al*, 2003). El fruto también es utilizado para la identificación; lo que se usa es principalmente la pared interna del pericarpio y el grosor de las escamas en la cúpula (Figura 3). También se ha demostrado que si la bellota presenta un tamaño grande, es posible que el árbol progenitor se encuentre en áreas geográficas extensas y septentrionales (Zavala-Chávez, 1999).

La diversidad de características y de claves taxonómicas morfológicas para la identificación de encinos es tan extensa que suele haber discrepancias entre autores para el registro de una especie, además de que los encinos tienen una alta tasa de hibridación, por lo que las nuevas herramientas taxonómicas favorecen la determinación entre especies (Ciprandi-Pires y Marinoni, 2010).

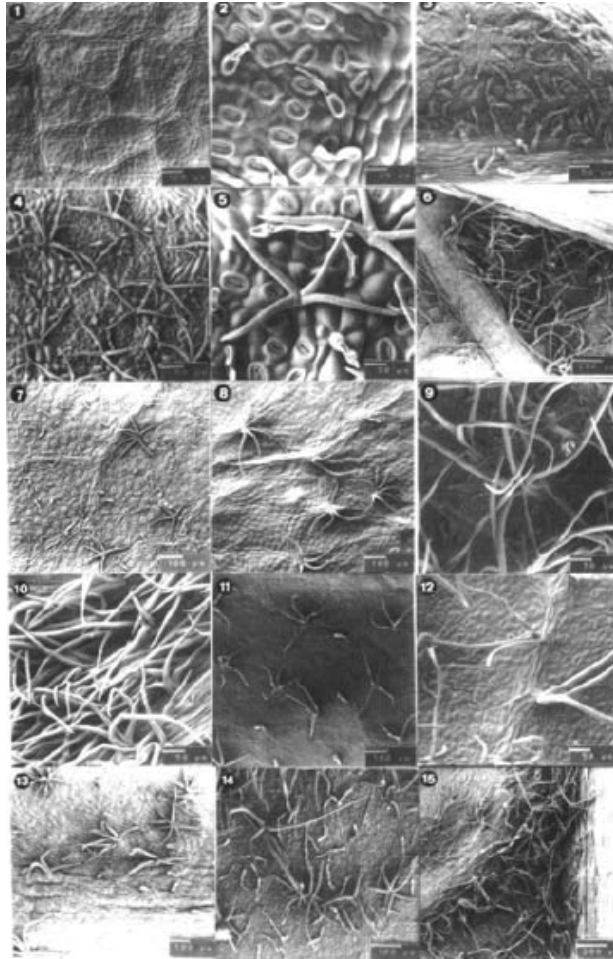


Figura 2. Tricomas. Se observan los diferentes tricomas de la superficie foliar de *Quercus robur* L.: 1) haz, 2) envés, 3) axila envés; *Quercus petraea* (Matt) Liebl: 4 y 5) envés 6) axila envés; *Quercus rosacea* Bechstein: 7) envés; *Quercus pyrenaica* Willd.: 8) haz, 9) envés, 10) axila envés; *Quercus humilis* Mill.: 11) haz, 12) envés y *Quercus subpyrenaica* Wild: 13) haz, 14) envés y 15) axila envés (Tomado de Penas *et al*, 1994).

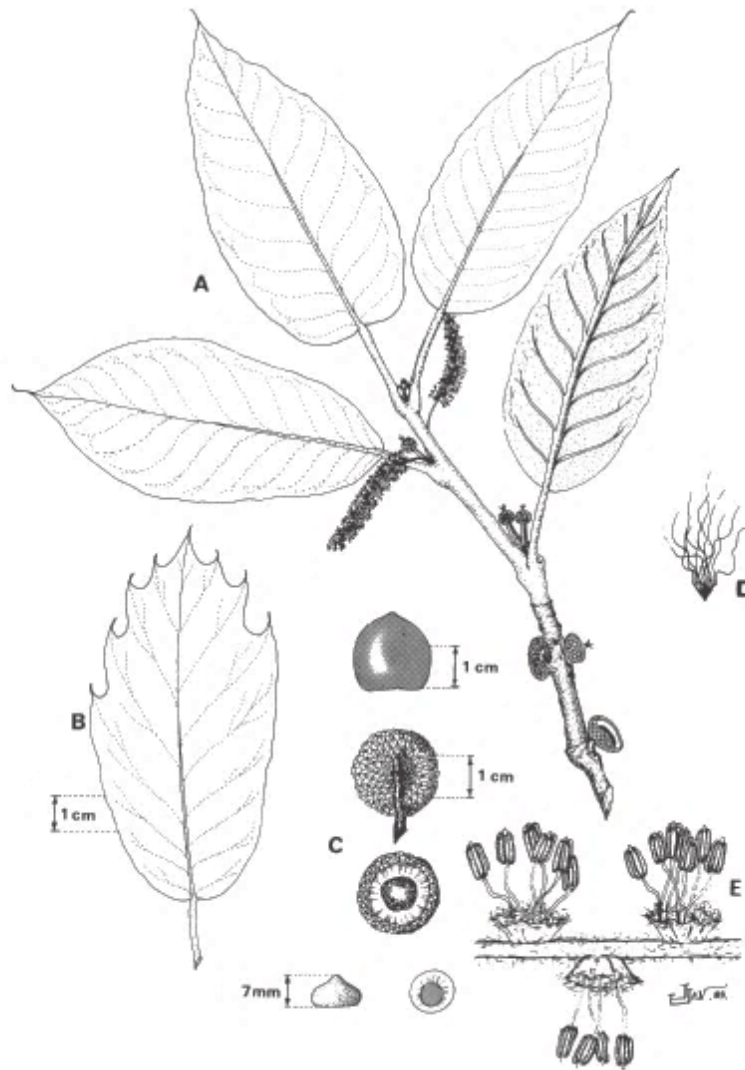


Figura 3. Hojas y frutos de *Quercus hintonii* Warburg. Se muestran A) una rama con hojas, flores y frutos de la especie *Q. hintonii*; B) Variación en una hoja; C) Tamaño y morfología del fruto; D) Presencia de pelos del envés de la hoja y E) Flores masculinas (Tomado de Aguilar-Enriquez y Romero-Rangel, 1995).

3.4 Taxonomía morfológica de melolontidos

La familia Melolonthidae, está conformada por especies de coleópteros, en su mayoría fitófagos y fitosaprófagos que se caracterizan por ser plagas, principalmente de cultivos tanto en su etapa larval como en tu etapa adulta (Arce-Pérez y Morón, 2000). Actualmente se consideran para México tres subfamilias las cuales son Melolonthinae, Dynastinae y Rutelinae. Los principales caracteres que presentan estas especies son cuerpos ovales con una gran

variedad de colores, desde negros opacos hasta verdes brillantes con texturas aterciopeladas o escamosas. Tienen una condición morfológica denominada Pleurosticti, que indica que los estigmas respiratorios de los últimos tres segmentos del cuerpo están descubiertos. Uno de los géneros más estudiados dentro de esta familia es el género *Macroductylus*, ya que la mayoría de sus especies son consideradas plagas agrícolas, en especial se ha estudiado a las especies *Macroductylus mexicanus* Burmeister y *Macroductylus nigripes* Bates quienes cuentan con una distribución geográfica en todo México. Sus caracteres morfológicos principales son cuerpos ovalados, cabeza negra, élitros rojizos y artejos antenales pardorrojizos (Arce-Pérez y Morón, 2000; Caselín-Castro *et al*, 2003).

3.5 Código de barras de ADN como herramienta para la identificación de encinos

Para la identificación ágil de especies de encinos, además de la taxonomía morfológica, se emplea el código de barras de ADN de secuencias conservadas y estandarizadas para comparar entre varias muestras (Simeone *et al*, 2013). Las unidades evolutivas significativas procedentes de esta comparación arrojan resultados tales como especies crípticas, morfoespecies o especies con plasticidad fenotípica (Lanteri, 2007). Para su uso en angiospermas se ha propuesto por el Consorcio de Código de Barras de la vida (CBOL) como secuencias marcadoras principales los genes *matK* y *rbcL*, ya que usándose ambos se complementa la alta resolución de *matK* con la alta universalidad de *rbcL* (Wattoo *et al*, 2016). El gen *matK* está compuesto por 1570 pares de bases y codifica para la proteína maturase K; está localizado dentro del intrón del gen *trnK* del genoma del cloroplasto y ya ha sido utilizado para varias reconstrucciones filogenéticas en diferentes niveles, desde orden hasta familia (Yu *et al*, 2011). El gen *rbcL* codifica para la proteína ribulosa bifosfato carboxilasa (RUBISCO), lo cual resulta ser ventajoso en cuanto a que es fácil de ser amplificado y se ha

utilizado en varias construcciones filogenéticas. También se han usado regiones espaciadoras internas como ITS y *trnH-psbA* presentes en el genoma nuclear y del cloroplasto, respectivamente, siendo ambos exitosos en la diferenciación de angiospermas (Piredda *et al*, 2010). Las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS-1 e ITS-2) son parte del ADNr nuclear; están involucradas en la maduración de ARNr nuclear, trayendo las subunidades grande y pequeña del ribosoma hacia el dominio de procesamiento. Son una propuesta nueva en cuanto a su utilización como marcador para códigos de barras de ADN y ya se han utilizado para comparaciones entre genes específicos en angiospermas y en identificación a niveles taxonómicos, como a nivel familia. Se ha demostrado que estas regiones son ricas en guanina y citosina y que se encuentran conservadas en un 40% para todas las angiospermas (Soltis *et al*, 1998). Su amplificación resulta fácil de hacer debido a su pequeño tamaño y se ha popularizado para tener una mayor certeza en cuanto a la construcción de filogenias, ya que hace más completa la información en vez de utilizar solamente genes de cloroplasto (Hershkovitz & Zimmer, 1996). Finalmente, *trnH-psbA* (espaciador intergénico conteniendo el tRNA de histidina) es una región del cloroplasto no codificante e intergénica que ha empezado a ser popularizada por el Consorcio de Código de Barras, quien ha propuesto este marcador como útil para la identificación de algunos grupos de plantas superando estas hasta el 70% de discriminación en 18 familias y 12 géneros, por lo que su uso en combinación con otros marcadores es recomendable en el uso de estudios con Códigos de Barras (Pang *et al*, 2012).

3.6 Antecedentes directos

- En diversos estudios se han amplificado los genes *matK* y *rbcL* para plantas como *Solanum nigrum* L y *Euphorbia helioscopia* L., teniendo buenos resultados en la amplificación de estos genes. Estos revelaron información

conservada del genoma, dando información sobre su identificación y discriminación (Wattoo *et al.*, 2016).

- De acuerdo a lo reportado por Piredda *et al.* (2011), el código de barras de ADN es utilizado como herramienta integrativa en la taxonomía; este equipo de investigadores realizó un estudio en el cual utilizaron los marcadores *trnH-psbA*, *rbcL*, *rpoc1* y *matK* para identificar árboles de una zona pequeña pero rica en especies. Se obtuvo el 73% de éxito en la discriminación total para el análisis florístico, aunque para encinos se reveló que el género *Quercus* es refractario; esto indica un 0% de éxito en la discriminación.
- En el estudio de Murphy y Potter (2017), se llevó a cabo un análisis filogenético tomando como muestra encinos del *arboretum* de la Universidad de California, Davis, utilizaron los genes *rbcL* e ITS, estableciendo que son genes que fortalecen las relaciones evolutivas actuales de las especies de *Quercus*.
- Se realizaron evaluaciones sobre la efectividad de los marcadores de cloroplasto (*trnH-psbA*, *matK-trnK*, *ycf3-trnS*, *matK* y *ycf1*) y nucleares como ITS y SAP al realizar estudios de código de barras de encinos, utilizando las especies *Quercus rubra* y *Castanea mollissima* Blume, teniendo como resultado siete códigos de barras obtenidos y aprobados con los marcadores utilizados. De estos los marcadores con mayor resolución de especies, fueron el ITS y *trnH-psbA*. Los resultados de código de barras tuvieron implicaciones importantes, viéndose desafiadas las asignaciones taxonómicas morfológicas (Yang *et al.*, 2017).
- También se encuentra reportado un estudio de campo en el cual describen datos preliminares sobre las especies de coleópteros Melolonthidae presentes en el estado de Puebla, identificándose la presencia de veintidós especies de los géneros *Phyllophaga*, *Macroductylus*, *Anomala*, *Cyclocephala*, *Strategus* y *Ligyris*, los cuales se encontraban en zonas

agrícolas, bosques tropicales caducifolios, matorrales xerófilos y bosques de encino (Aragón *et al.*, 2001).

4. JUSTIFICACIÓN

El género *Quercus* cuenta con alrededor de 500 especies de árboles y arbustos con gran relevancia tanto económica como ecológica. En primera instancia, los encinos son utilizados en la industria para la creación de muebles finos y de alimentos nutritivos, ya que las bellotas son una fuente de vitamina B, poca grasa y carbohidratos complejos (Bonfil, 1991). Además, desde el punto de vista ecológico, las variadas especies de *Quercus* proveen un hábitat a diferentes grupos de insectos, quienes a su vez ofrecen diversos servicios ecológicos o en algunos casos, hay especies consideradas como plagas (Arce-Pérez y Morón, 2000). El estudio de las interacciones planta-insecto favorece la comprensión del tipo de relaciones entre especies para mejorar el diseño de estrategias de manejo y conservación. Sin embargo, los estudios realizados se han basado solo en la identificación de los insectos a nivel de especie mientras que se desconoce la identidad de los encinos involucrados en esta relación, por lo que es importante distinguir qué especies de árboles son las hospederas para determinar la relevancia económica, biológica y ecológica de los involucrados. No obstante, para la identificación de especies de encinos, además de los caracteres morfológicos, es primordial tener disponibles diversas líneas de evidencias para poder delimitar las especies de encinos. Con el objetivo de estandarizar una herramienta

molecular que facilite la identificación de encinos hospederos de adultos de Melolonthidae, el presente trabajo pretende obtener los códigos de barras de ADN de tres marcadores moleculares, los cuales se espera ofrecerán una herramienta confiable para identificar especies de *Quercus* distribuidos en México.

5. HIPÓTESIS

Los códigos de barras de marcadores genéticos de cloroplasto y nucleares brindarán información sobre la descripción molecular que potencialmente contribuirá en la identificación por taxonomía integrativa de cinco especies de encinos de México, las cuales son consideradas hospederas de adultos de *Macroductylus*.

6. OBJETIVO GENERAL

Obtener el código de barras de ADN de tres marcadores genéticos para encinos residentes del Jardín Botánico Universitario, Puebla, hospederos de adultos de *Macroductylus*.

6.1 Objetivos específicos

- Seleccionar encinos de la colección viva del Jardín Botánico Universitario que sean considerados como hospederos de adultos de *Macroductylus*.
- Estandarizar los métodos de recolecta, preservación y procesamiento del tejido foliar de los encinos bajo estudio.
- Amplificar por PCR punto final los marcadores genéticos de cloroplasto *matK* y *trnH-psbA*, además del marcador genético nuclear ITS.
- Analizar por herramientas bioinformáticas los códigos de barras de los encinos bajo estudio.
- Obtener el código de barras de tres marcadores genéticos mediante secuenciación Sanger para ser analizados por herramientas bioinformáticas.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Determinación y selección de especies de encinos hospederos de adultos de *Macroductylus*

El estudio se realizó con árboles ubicados en la zona de *quercetum* del Jardín Botánico Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Para seleccionar las especies de encinos se tomó como criterio el que se les considerara como hospederos de adultos de *Macroductylus*. Se llevaron a cabo ocho recorridos diurnos entre las 11:00 y las 14:00 hrs en el *quercetum* del Jardín Botánico durante los meses de junio hasta agosto de 2017. Durante el recorrido se registró la presencia de coleópteros adultos de las dos especies de *Macroductylus* predominantes en la zona: *M. mexicanus* y *M. nigripes*. Se escogieron como encinos hospederos aquellos árboles que presentaron al menos 50 insectos de cualquiera de estas especies efectuando actividades de sexuales o alimentarias. En cada recorrido se registró el género y especie de cada encino positivo, además de un aproximado del número de insectos presentes. De todos los encinos registrados, se tomaron solamente las cinco especies que presentaron en promedio la mayor abundancia de insectos. Los “frailecillos” presentes en los árboles fueron identificados a nivel de género tomando en cuenta caracteres morfológicos externos y haciendo uso de claves dicotómicas propuestas previamente por Morón *et al.*, (1997), Arce-Pérez y Morón (2000) y Delvare *et al.*, (2002).

7.2 Recolección de muestras foliares de encinos

Una vez seleccionadas las cinco especies de encinos, se recolectaron muestras foliares de tres regiones del dosel de un árbol representativo de cada especie. Se tomaron solamente hojas que se encontraban sin ningún daño visible

ya sea causado por condiciones ambientales o por acciones mecánicas por insectos o microorganismos. Las muestras fueron almacenadas inmediatamente en bolsas de papel para su transporte al “Laboratorio de Macromoléculas” de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP. Las hojas se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada para eliminar cualquier residuo contaminante. Posteriormente, las hojas se secaron con papel absorbente y se pesaron en una balanza analítica. Para eliminar la humedad de las hojas se procedió a colocarlas en bolsas herméticas nuevas con sílice en gel en proporción 20:1 con respecto al tejido vegetal. Las bolsas se almacenaron en refrigeración a 4°C aproximadamente durante 15 días para asegurar la deshidratación del material foliar.

7.3 Purificación de ADN genómico

Una vez que las hojas estuvieron deshidratadas, se procedió a la purificación del ADN genómico de acuerdo a las instrucciones del protocolo del kit Wizard® Genomic ADN Purification (Promega, Wisconsin EE. UU). Brevemente, se realizó un troceado manual del material foliar, el cual fue depositado en microtubos estériles de 1.5 ml. Posteriormente las muestras fueron incubadas en nitrógeno líquido durante 12 h para congelar el tejido y pudiera ser pulverizado para su posterior procesamiento. Una vez concluido el tiempo de incubación a bajas temperaturas, se procedió a la trituración del material foliar usando micropistilos de teflón para obtener un fino polvo. Para la extracción del ADN genómico se utilizaron 40 mg del polvo de hojas, al cual se le adicionaron 600 µl de solución de lisis nuclear. Las muestras se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 3 s y posteriormente se procedió a una incubación por 15 min a 65°C.

A continuación, se agregaron 3 µl de solución de RNAsa y se mezclaron las muestras invirtiendo los microtubos de dos a cinco veces. Inmediatamente después las muestras se incubaron a 37°C por 15 min. Pasado ese tiempo, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 min. Más tarde, se

agregaron 200 μ l de solución de precipitación de proteínas y nuevamente se agitaron en un vórtex por 20 s. Las muestras se centrifugaron por 3 min a 13,000 rpm en una centrifuga refrigerada Hettich®. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 ml estéril el cual contenía 600 μ l de isopropanol. La muestra resultante se mezcló por inversión y se observaron fibras de ADN genómico. Para precipitar el ADN se realizó una centrifugación a 13,000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla de ADN se secó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, el ADN fue resuspendido en agua estéril y se disolvió mediante una incubación a 65°C durante 1 h. Las muestras de ADN se guardaron a -20°C hasta su uso posterior.

7.4 Cuantificación y visualización del ADN genómico

Para cuantificar la concentración de ADN genómico purificado, se realizó una lectura de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.). Además, para verificar la pureza del ADN se realizó una lectura a 280 nm y los datos obtenidos fueron utilizados para calcular una relación de las lecturas a 260nm/280nm, siendo 1.8 una relación perfecta de pureza para muestras de ADN (Cuadro 3). La integridad de las muestras cuantificadas fue determinada mediante la visualización de bandas de ADN en gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Las muestras de ADN se corrieron durante 1.5 horas a 60 v. Finalmente, en ADN fue observado en un transiluminador de luz UV.

7.5 Amplificación de ADN genómico por PCR punto final

Las amplificaciones se realizaron en condiciones estándar, conteniendo amortiguador 1X, 200 μ M de dNTPs, 1 μ M de cada iniciador sentido y antisentido, 1 mM de MgCl₂, 1.25 unidades de *Taq* polimerasa platinum y agua estéril a 25 μ l

de volumen final (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los iniciadores utilizados se muestran en la Cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores empleados para la amplificación del ADN genómico de las cinco especies de encinos estudiados.

Iniciador	Secuencia
<i>matK</i>	F:ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC R: CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
<i>trnH-psbA</i>	F: GTTATGCATGAACGTAATGCTC R: CGCGCATGGTGGATTACAATCC
ITS	F:TCCTCCGCTTATTGATATGC R:GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Las reacciones de amplificación para *matK* se llevaron a cabo en un termociclador Techne® 412 (Bibby Scientific, Staffordshire, UK) de acuerdo al siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min un ciclo; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 45°C por 45 s y 72°C por 1.5 min; extensión final a 72°C por 10 min un ciclo. Para el marcador *trnH-psbA* se llevaron las reacciones de amplificación en el mismo termociclador, utilizando el programa de ciclado: desnaturalización inicial a 5 min a 94°C un ciclo; 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C, 1 min a 72°C, extensión final de 7 min a 72°C un ciclo. Finalmente, para ITS se utilizó el mismo termociclador con el siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial 5 min a 94°C un ciclo; 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 46°C, 1 min a 72°C, extensión final un ciclo de 7 min a 72°C. Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X durante 1.5 h a 60 v. Posteriormente, se visualizó el gel en un transiluminador UV y se determinó el peso molecular de los amplicones mediante la comparación con la migración del marcador de peso molecular 100 pb.

7.6 Obtención del código de barras de ADN

Los amplicones de los tres marcadores moleculares fueron secuenciados con base en la metodología de Sanger, utilizando el servicio de MacroGen Inc.

(Geumcheon-gu, Seoul República de Corea). Las secuencias obtenidas se editaron en el programa Bioedit para eliminar los primeros y últimos nucleótidos de todas las secuencias y así eliminar información de baja calidad propias del inicio y final de la reacción de secuenciación. Posteriormente, se realizó el ensamble para obtener secuencias de nucleótidos verificadas por la complementariedad entre ambas direcciones sentido y antisentido. Los códigos de barras se utilizaron para la identificación mediante la comparación con secuencias homólogas, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La composición de bases y el porcentaje de GC de cada código de barras obtenido se realizó usando el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

8. RESULTADOS

8.1 Selección de especies de encinos

Para la selección de especies de *Quercus* del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla más visitados por insectos Melolóntidos se tomó en cuenta la presencia de más de 50 insectos por árbol que estuvieran en actividad de alimentación o de cópula, la distribución de los encinos en territorio mexicano y la clasificación en torno a la pertenencia a encinos rojos o blancos. Se seleccionaron cinco de treinta especies muestreadas durante los recorridos diurnos, en los meses de vuelo de los adultos de *Macrodactylus*. Las especies elegidas para este trabajo fueron *Quercus crassipes* Humb. Y Bonpl., *Quercus grahamii* Benth, *Quercus liebmannii* Oerst, *Quercus laeta* Liebm. y *Quercus germana* Schltdl. y Cham (Cuadro 2, Fig 5).

Mediante el uso de las claves dicotómicas mencionadas previamente, se identificó a los insectos a nivel de género, observándose las siguientes características: cuerpo alargado ahusado entre 8.5 y 12 mm de largo por 2.5 a 4.5 mm de ancho; cabeza ovalada con el clípeo trapezoidal truncado; los últimos artejos de los palpos labiales y maxilares son oblongos y sumamente punteados; antenas con nueve artejos; ojos ovalados prominentes y muy distantes del

pronoto, el cual es semi-hexagonal y convexo; élitros largos y anchos cubriendo cinco esternitos abdominales; meta-esternón amplio con pocas sedas cortas y aplanadas; abdomen con seis esternitos abdominales visibles; patas largas y delgadas, protibias ensanchadas en la parte media, mesotibias con dos largos espolones, quinto artejo con dos uñas largas recurvadas y bífidas en la punta; de coloración pardo oscuro o negro, con tonalidades rojizo amarillento, antenas amarillo-rojizas, pronoto y escuto negros, élitros negros o pardo oscuros, patas con tibia y tarso oscurecidos con tonalidades rojizas o totalmente negras (Figura 4).



Figura 4. Adultos de *Macrodactylus* sp. sobre una hoja de *Quercus laeta*. Además de mostrarse una posible cópula, se puede ver el daño a la hoja provocado por la alimentación de estos.



Figura 5. Hojas nuevas de *Quercus germana*. Fotografía de hojas de esta especie que presentan una coloración rojiza debido a que son brotes de hojas recientes, la textura del haz no es rugosa y también se evidencia el daño provocado por insectos *Macroductylus sp.*

Cuadro 2. Muestreo del *quercetum* del Jardín Botánico Universitario. Se muestra un listado de árboles revisados con la presencia de adultos de *Macroductylus*. Los que presentaron más de 50 insectos en actividad de cópula o alimentación se consideraron positivos a presencia. Menos de 50 insectos se consideraron como negativos para la elección de especies dentro de este estudio. Se muestra resaltado en gris las especies elegidas para este estudio).

Día de muestreo	Especie	Código	Promedio de insectos por árbol
07-jun-17	<i>Quercus lancifolia</i>	U20010049B	<50
	<i>Quercus laeta</i>	U20080206A	>50
	<i>Quercus castanea</i>	U200770441	>50
	<i>Quercus crassipes</i>	U2060021A	>50
	<i>Quercus sebifera</i>	U20040103A	<50
	<i>Quercus grahamii</i>	U20010023A	>50
	<i>Quercus conspersa</i>	U20070388A	>50
	<i>Quercus coccifera</i>	U20010090A	>50
	<i>Quercus germana</i>	U20070407J	>50
	<i>Quercus liebmannii</i>	U20000067F	>50
09-jun-17	<i>Quercus lancifolia</i>	U20010049B	<50
	<i>Quercus laeta</i>	U20080206A	>50
	<i>Quercus castanea</i>	U200770441	>50
	<i>Quercus conspersa</i>	U20070388A	>50
	<i>Quercus crassipes</i>	U2060021A	>50

	<i>Quercus sebifera</i>	U20040103A	<50
	<i>Quercus suber</i>	U20010077B	<50
	<i>Quercus coccifera</i>	U20010090A	>50
	<i>Quercus grahamii</i>	U20010023A	>50
	<i>Quercus liebmannii</i>	U20000067F	>50
15-jun-17	<i>Quercus greggii</i>	U20070308	<50
	<i>Quercus lancifolia</i>	U20010049B	<50
	<i>Quercus robur</i>	U20010079A	<50
	<i>Quercus laeta</i>	U20080206A	>50
	<i>Quercus invaginata</i>	U2007041D	<50
	<i>Quercus crassipes</i>	U20090021A	>50
	<i>Quercus castanea</i>	U200770441	>50
	<i>Quercus grahamii</i>	U20010023A	>50
	<i>Quercus mexicana</i>	U20040102E	<50
	<i>Quercus germana</i>	20070407J	>50
	<i>Quercus shumardii</i>	U20000073A	<50
22-jun-17	<i>Quercus laceyi</i>	U20010021B	<50
	<i>Quercus grahamii</i>	U20010023A	>50
	<i>Quercus germana</i>	20070407J	>50
	<i>Quercus coccifera</i>	U20010090A	>50
	<i>Quercus crassipes</i>	U20060021A	>50
	<i>Quercus conspersa</i>	U20070388A	>50
	<i>Quercus castanea</i>	U20070441A	>50
	<i>Quercus invaginata</i>	U2007414D	<50
	<i>Quercus laeta</i>	U20070337A	>50
	<i>Quercus faginea</i>	U20010085B	<50
30-jun-17	<i>Quercus shumardii</i>	U0073/D	<50
	<i>Quercus pinnativenulosa</i>	U20070374E	<50
	<i>Quercus laceyi</i>	U20010021B	<50
	<i>Quercus grahamii</i>	U20010023A	>50
	<i>Quercus germana</i>	U20070467J	>50
	<i>Quercus mexicana</i>	U20040102E	<50
	<i>Quercus berberidifolia</i>	U19990015A	<50
	<i>Quercus crassipes</i>	U200621A	>50
	<i>Quercus sebifera</i>	U20040103A	<50
	<i>Quercus grahamii</i>	U20000063D	>50
	<i>Quercus polymrpha</i>	U20070311B	<50
	<i>Quercus laeta</i>	U2008026A	>50
	<i>Quercus invaginata</i>	U20070414C	<50
	<i>Quercus faginea</i>	U20010085B	<50
	<i>Quercus faginea</i>	U20010085A	<50

	<i>Quercus laeta</i>	U20070337A	>50
	<i>Quercus germana</i>	U2004163A	>50
	<i>Quercus lancifolia</i>	U20010049B	<50
04-jul-17	<i>Quercus suber</i>	U20040011H	<50
	<i>Quercus germana</i>	U20040163B	>50
	<i>Quercus germana</i>	U20040163A	>50
	<i>Quercus invaginata</i>	U20070413F	<50
	<i>Quercus robur</i>	U20010079	<50
	<i>Quercus suber</i>	U2001049B	<50
	<i>Quercus lancifolia</i>	U20010049B	<50
	<i>Quercus laeta</i>	U80100165B	>50
	<i>Quercus laeta</i>	U20070234C	>50
	<i>Quercus invaginata</i>	U200700414A	<50
	<i>Quercus faginea</i>	U20010085B	<50
	<i>Quercus laeta</i>	U20070337A	<50
	<i>Quercus castanea</i>	U200070441A	>50
	<i>Quercus conspersa</i>	U200703888A	<50
	<i>Quercus crassipes</i>	U20060021A	>50
	<i>Quercus sebifera</i>	U2004103A	<50
	<i>Quercus grahamii</i>	U20000063D	<50
	<i>Quercus coccifera</i>	U20010090A	<50
	<i>Quercus grahamii</i>	U20010023A	>50
09-ago-17	<i>Quercus invaginata</i>	U20070413G	<50
	<i>Quercus suber</i>	U2001007A	<50
	<i>Quercus robur</i>	U20010079B	<50
	<i>Quercus laeta</i>	U20070234C	>50
	<i>Quercus sartorii</i>	U20070441A	<50
	<i>Quercus sartorii</i>	U20070441B	<50
	<i>Quercus cerris</i>	U20010029A	<50
	<i>Quercus coccifera</i>	U20010090A	<50
11-ago-17	<i>Quercus laeta</i>	U20070337A	>50
	<i>Quercus sartorii</i>	U20070441A	<50
	<i>Quercus acutifolia</i>	U20070441A	<50
	<i>Quercus crassipes</i>	U20060021A	<50
	<i>Quercus sebifera</i>	U20100102H	<50

8.2 Obtención del código de barras de ADN de genes de cloroplasto y nucleares

8.2.1 Purificación de ADN genómico de hojas desecadas

Una vez que se seleccionaron las especies de encinos hospederos de insectos melolóntidos se procedió al desecado del material foliar para purificar el ADN genómico de las cinco especies utilizadas en el presente trabajo. Primero, se determinó de manera visual el secado al 100% de las hojas mediante la acción de la sílice en gel durante dos semanas a 4°C (Fig. 6 y 7). Las hojas mostraron cambios de coloración y textura por la eliminación de agua, indicando que el método de secado de tejido foliar es adecuado para realizar la extracción de ADN genómico de buena calidad. Posteriormente, el ADN fue purificado con un Kit comercial obteniéndose una concentración apropiada para la amplificación por PCR punto final (Cuadro 3).

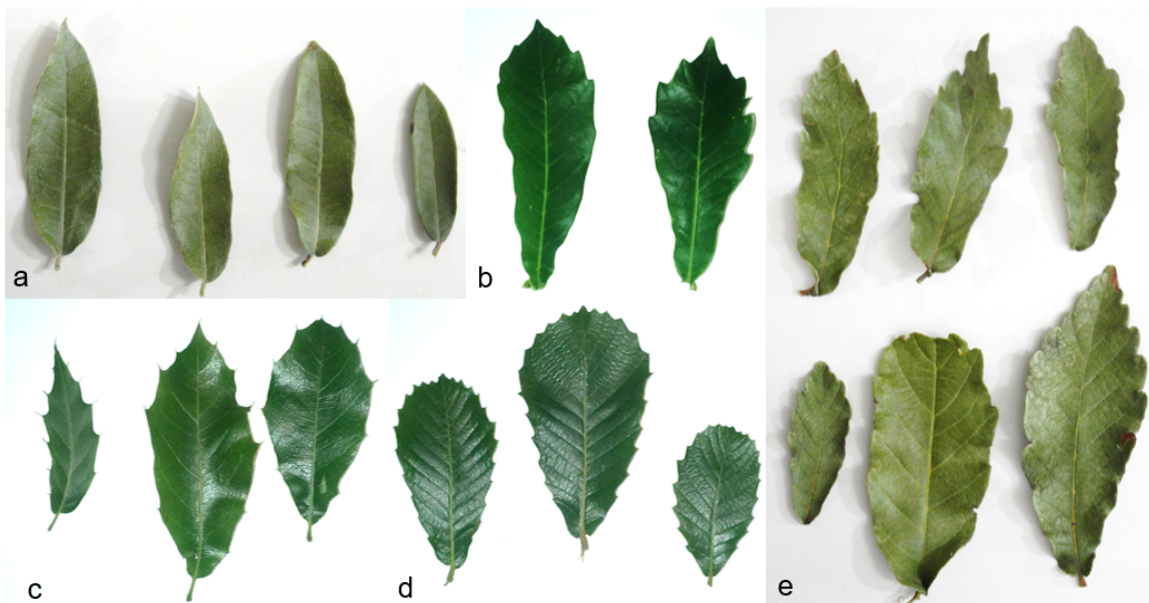


Figura 6. Representación de hojas de *Quercus* recién recolectadas. Se observa la morfología de las hojas de a) *Quercus crassipes*, b) *Quercus germana*, c) *Quercus grahamii*, d) *Quercus liebmannii* y e) *Quercus laeta* recién cortadas de los árboles y lavadas para el proceso de eliminación de humedad. Las hojas muestran un color verde intenso y son flexibles al tacto.

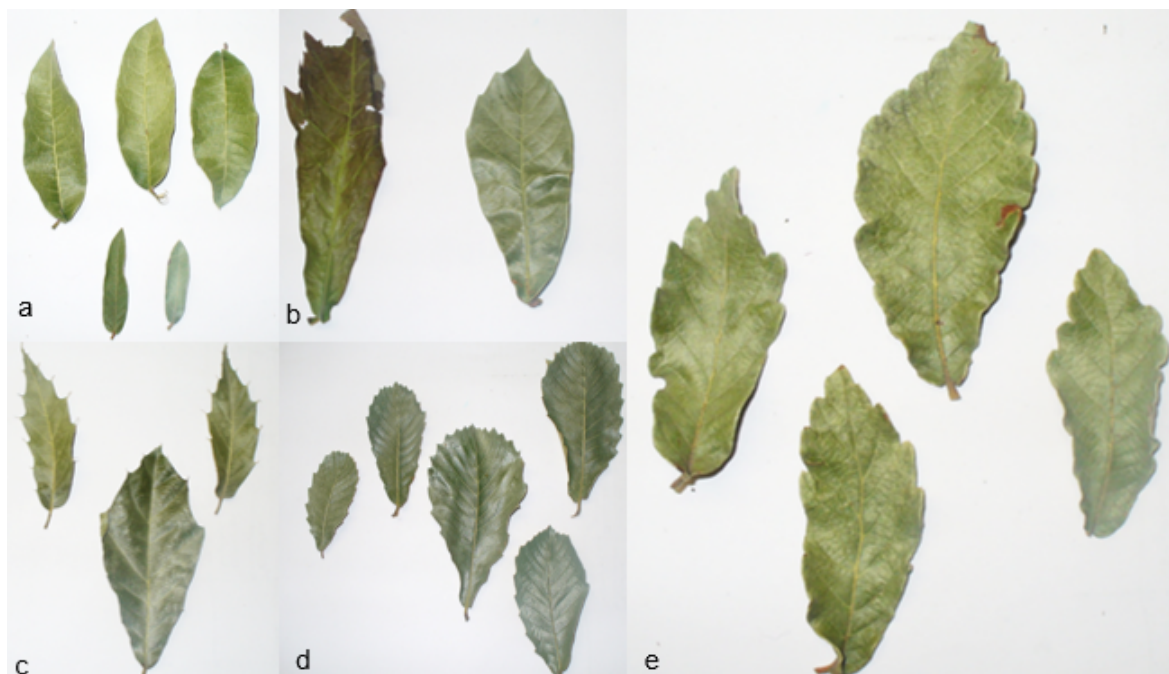


Figura 7. Representación de hojas de *Quercus* después del proceso de eliminación de humedad. Se observan las hojas de a) *Quercus crassipes*, b) *Quercus germana*, c) *Quercus grahamii*, d) *Quercus liebmannii* y e) *Quercus laeta*. Las hojas pasaron por el proceso de deshidratación con sílice gel, por lo que presentan un tono verde poco intenso y en algunas zonas presentan tonalidades cafés, al tacto son firmes.

Cuadro 3. Concentración y pureza de ADN genómico de tejido foliar de encinos. Se realizaron lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un Nanodrop ND-1000 Thermo Fisher Scientific® para determinar la concentración y la pureza de muestras, considerando la relación entre las lecturas a 260 nm y la relación entre las lecturas a 260/280 nm, respectivamente.

Especie	Concentración de ácidos nucleicos	Relación 260/280 nm
<i>Q. liebmannii</i> 1	124.6 ng/μl	1.53
<i>Q. liebmannii</i> 2	331.4 ng/μl	1.4
<i>Q. liebmannii</i> 3	698.9 ng/μl	1.46
<i>Q. grahamii</i> 1	239.5 ng/μl	0.99
<i>Q. grahamii</i> 2	567.5 ng/μl	0.91
<i>Q. grahamii</i> 3	64.5 ng/μl	1.64
<i>Q. crassipes</i> 1	107.9 ng/μl	1.28
<i>Q. crassipes</i> 2	77.7 ng/μl	1.62
<i>Q. crassipes</i> 3	40.7 ng/μl	1.6

<i>Q. germana</i> 1	672.3 ng/μl	1.48
<i>Q. germana</i> 2	426.8 ng/μl	1.43
<i>Q. germana</i> 3	258.7 ng/μl	1.49
<i>Q. laeta</i> 1	124.7 ng/μl	1.47

8.2.2 Amplificación de genes marcadores moleculares

Se realizó la amplificación de dos genes de cloroplasto y un gen nuclear mediante PCR punto final. Para el caso del marcador molecular de cloroplasto *matK* se realizó un gradiente de temperatura para estandarizar la temperatura óptima de alineación de los iniciadores. Las temperaturas utilizadas fueron 40.8, 44.5, 47.2 y 48.9°C obteniéndose en todas las temperaturas un producto de amplificación con el peso molecular esperado. La temperatura de 45°C fue seleccionada para amplificar las cinco muestras de los diferentes encinos analizados en este trabajo. Se obtuvo un único amplicón con el tamaño esperado de aproximadamente 700pb indicando la especificidad de la PCR para el gen *matK* de *Q. laeta*, *Q. grahamii*, *Q. germana*, *Q. liebmannii* y *Q. crassipes* (Fig. 8).

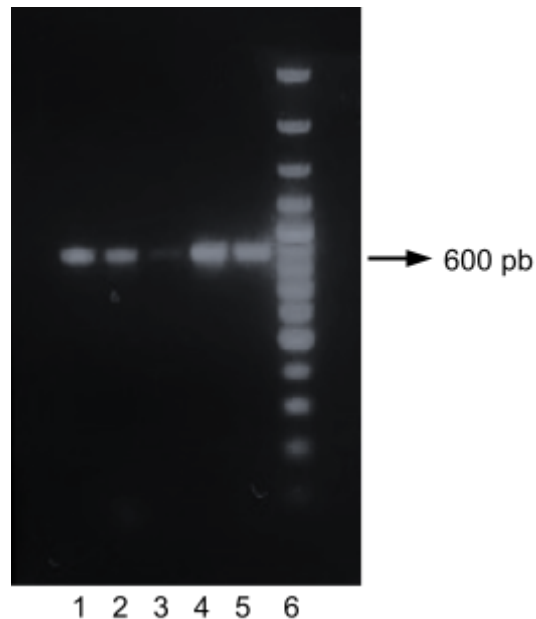


Figura 8. Amplificación por PCR del marcador *matK*. Electroforesis en gel agarosa al 1.5 % en TAE 1X corrida a 60 volts durante 1.5 horas. Carril 1) *Quercus laeta*, Carril 2) *Quercus grahamii*,

Carril 3) *Quercus germana*, Carril 4) *Quercus liebmannii* Carril 5) *Quercus crassipes* y Carril 6) Marcador de peso molecular 100 pb

Para el caso del segundo marcador de cloroplasto, *trnH-psbA*, se realizó directamente una amplificación de acuerdo a las condiciones publicadas por Yang *et al.* (2016). Se obtuvo un amplicón de 600 pb únicamente en *Q. grahamii* y *Q. crassipes*, aunque la eficiencia de amplificación fue óptima solo para *Q. grahamii*, debido a la intensidad de la banda obtenida (Fig. 9). Considerando la baja o nula amplificación en las muestras *Q. crassipes*, *Q. germana* y *Q. liebmannii* se realizaron nuevas amplificaciones probando con gradientes de temperatura para mejorar la amplificación en todas las especies. Las temperaturas utilizadas fueron 55.1, 56.1, 57.9, 59.9, 61.2, 62.5 y 64°C, con las cuales se obtuvieron bandas intensamente visibles. Sin embargo, se eligió como temperatura óptima 55°C. El resultado de esta nueva PCR fue la obtención de amplicones para *Q. crassipes*, *Q. grahamii* y *Q. laeta* (Fig. 10).

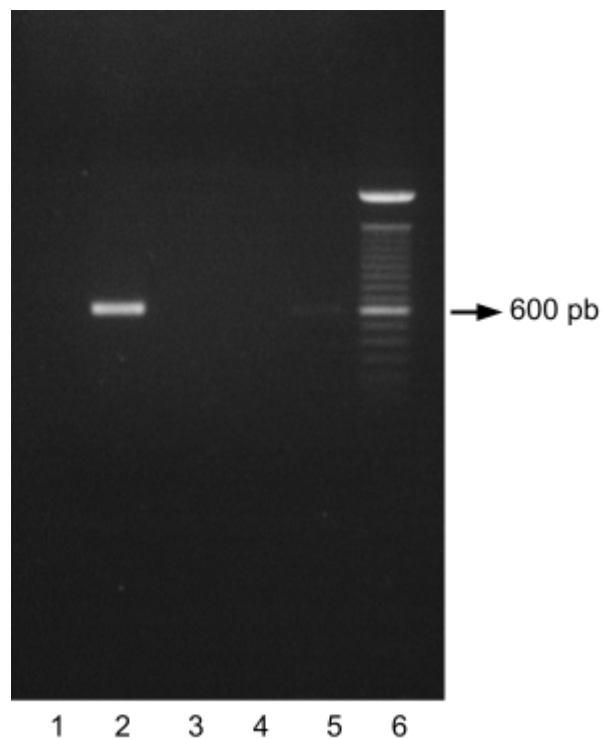


Figura 9. Amplificación por PCR del marcador *trnH-psbA*. Electroforesis en gel agarosa al 1.5 % en TAE 1X corrida a 60 volts durante 1.5 horas. Carril 1) *Quercus laeta*, Carril 2) *Quercus grahamii*, Carril 3) *Quercus germana*, Carril 4) *Quercus liebmannii* Carril 5) *Quercus crassipes* y Carril 6) Marcador de peso molecular 100 pb. Según las condiciones publicadas por Yang et al., 2016.

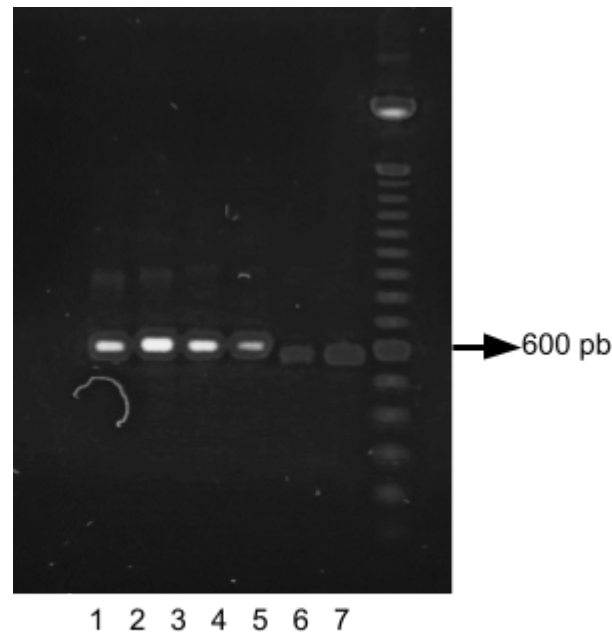


Figura 10. Amplificación por PCR del marcador *trnH-psbA* con temperatura de 55°C. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%, TAE 1X corrida a 60 voltz. Durante 1.5 horas. Carril 1 y 2) *Quercus grahamii*, Carriles 3 y 4) *Quercus crassipes*, Carriles 5 y 6) *Quercus laeta* 7) Marcador de peso molecular 100pb.

De manera similar para el marcador nuclear ITS, se utilizaron directamente las condiciones de PCR reportadas por Yang y colaboradores (2016). Para *Q. grahamii*, se amplificaron dos productos de PCR con aproximadamente 600 y 800 pb. Para *Q. germana* se obtuvo señal positiva de amplificación, mientras que para *Q. liebmannii* y *Q. crassipes* se amplificaron productos de 600 y 700 pb, respectivamente (Fig. 11). La variación el peso molecular puede deberse a que esta región interespaciadora presenta diferente longitud según la especie. Se

volvieron a realizar amplificaciones utilizando un gradiente de temperatura de alineación de iniciadores para la elección de una temperatura óptima para la PCR, probándose las temperaturas de 45.8, 47.2, 49.5, 52.2, 53.9, 55.7 y 57.6°C. Después de la electroforesis correspondiente, se detectó como temperatura óptima 46°C, con la cual se realizaron nuevas amplificaciones teniendo como resultado amplicones de *Q. grahamii* y *Q. crassipes* (Fig. 12).

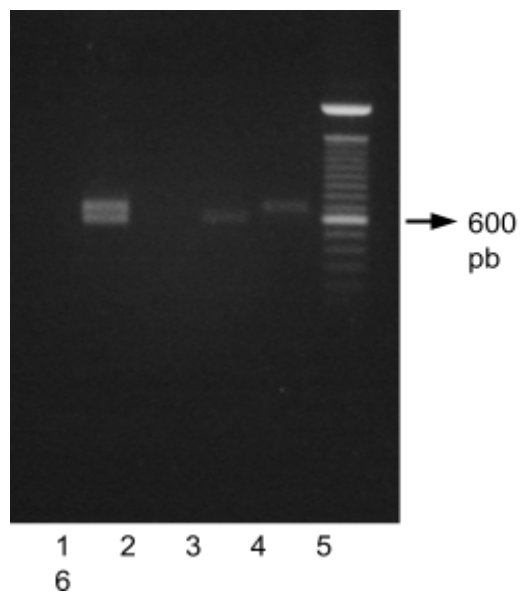


Figura 11. Amplificación por PCR del marcador ITS. Electroforesis en gel agarosa al 1.5 % en TAE 1X corrida a 60 volts durante 1.5 horas. Carril 1) *Quercus laeta*, Carril 2) *Quercus grahamii*, Carril 3) *Quercus germana*, Carril 4) *Quercus liebmannii* Carril 5) *Quercus crassipes* y Carril 6) Marcador de peso molecular 100 pb.

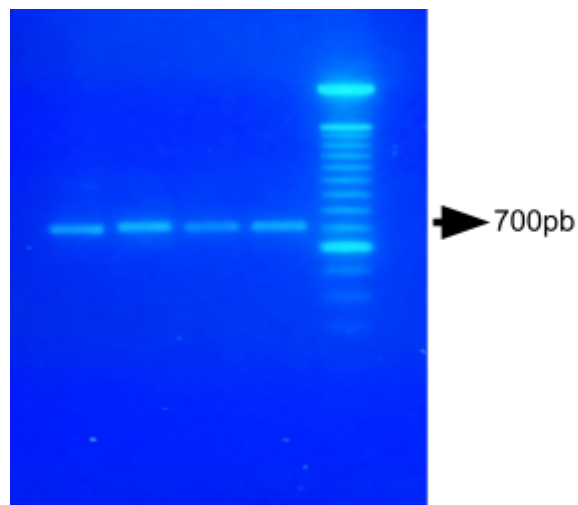


Figura 12. Amplificación por PCR del marcador ITS utilizando 46°C para el alineamiento. Electroforesis en gel agarosa al 1.5 % en TAE 1X corrida a 60 volts durante 1.5 horas. Carril 1 y 2) *Quercus grahamii*, Carril 3 y 4) *Quercus crassipes* y Carril 5) Marcador de peso molecular 100 pb.

8.2.3 Obtención del código de barras de marcadores genéticos de cloroplasto y nuclear

Después de probar diferentes temperaturas para la amplificación de genes marcadores de las cinco especies de *Quercus* mediante PCR (Cuadro 4), se procedió a la secuenciación de los amplicones positivos y del peso molecular esperado.

Especie	matK	ITS	trnH-psbA
<i>Quercus grahamii</i>	X	X	X
<i>Quercus germana</i>	X		
<i>Quercus liebmanii</i>	X		
<i>Quercus crassipes</i>	X	X	X
<i>Quercus laeta</i>	X		X

Cuadro 4. Especies con amplificación positiva para marcadores de cloroplasto *matK* y *trnH-psbA* y nuclear ITS. En el cuadro se observan las muestras de ADN de las especies de *Quercus* hospederos de melolóntidos con señal positiva en la amplificación por PCR punto final para su posterior secuenciación.

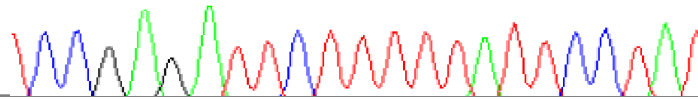
La secuenciación se realizó por el método de Sanger ,obteniéndose secuencias de nucleótidos en dirección sentido y antisentido de alta calidad para las cinco

especies, utilizando el marcador de cloroplasto *matK* (Cuadro 5), así como para las secuencias del marcador *trnH-psbA* de las especies *Q. grahamii*, *Q. crassipes* y *Q. laeta* (Cuadro 6). Sin embargo, para el marcador nuclear ITS solo se obtuvo la secuencia sentido de la especie *Q. grahamii* con la calidad adecuada (Cuadro 7).

Cuadro 5. Secuencias y electroferogramas utilizando el marcador *matK* para las cinco especies de *Quercus* bajo estudio.

Quercus crassipes

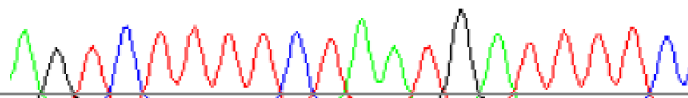
130 140
ICCGAGATTCTTTTATTCTA:



GATCTGGTTCAAACCCTTCGTTACCGGGTGAAAGATGCTTCTTATTTGCATTTATTGCGGTTCTTT
CTTCATGAGTATTCTAATTGTAACAGTCTTATTATTACAAATAAATCTATTTCCATTTTTTCAAAAAGTA
ATCCGAGATTCTTTTTATTCCCTATATAATTCTTATATATGTGAATACGAATCCATCTTCCTTTTTCTCC
GTAACCAACCTTCTCATTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAACGACTCTGTTTATATAG
AAAAATAGAACATTTTGCCGAAGTCTTTTCTAATGATTTCCGGTCATCCCATGCTTTCTCAAGGAT
CCTTTCATGCATTATGTTAGATATCAAGGAAAATCAATTCTGGCTTCCAAAGACACACCTCTTCTAA
TGAATAAATGGAAATCTTACCTTGTCAATTTATGGCAATGCATTTTGATGTATGGTCTCACGCGGC
AAGTATCCGTATAAACCAATTATCCAAGCATTCCCTCGATTTTTGAGTTACTTTTTCAAGTGTTTCA
CGAAATCCTGCAGTGGTGCGGAATCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTACTAAATAATGCTCCCAATA
AACTCGATACAATGGTTCCAATTATCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTGTAACGC
AGTAGGGCATCCAATTAGTAAGCTGACTCGGGCCGATTTATCGGATTTTGAGATTATCAATCGATT
TTGCATATATGCAGAAATCTTCTCATTATTACAGCGGATCCTCAAAAAAAAAAGAATATGTATCGAAT
AAAATATATACTTCGGCTTTCTT

Quercus grahamii

290 300
AGTCTTTTCTAATGATTTTC

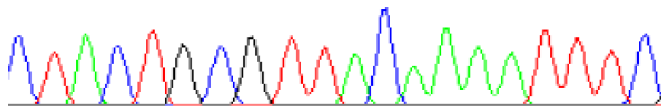


GCTTCTTATTTGCATTTATTGCGGTTCTTTCTTCATGAGTATTCTAATTGTAACAGTCTTATTATTAC
AAATAAATCTATTTCCATTTTTTCAAAAAGTAATCCGAGATTCTTTTTATTCCCTATATAATTCTTATATA
GGTGGGAGATGGACGGAATCCTATCTCCGATGTCTCCGTAGACAAACCTTCTTTTCATTTGACG
AATAATCATCTTATAGAGTCTTTTATGAACGACTCTGTTTATATAGAAAAATAGAACATTTTGCAGA
AGTCTTTTCTAAAGAATTTTCCGGTCATCCCATGCTTTCTCAAGGATCCTTTCATCCATTATGTTAG
ATATCAAGGAAAATCAATTCTGGCTTCCAAAGACACACCTCTTCTAATGAATAAATGGAAATCTTAC
CTTGCAATTTATGGCAATGTCATTTTGATGTATGGTCTCACGCGGCAAGTATCCGTATAAACCAA
TTATCCAAGCATTCCCTCGATTTTTTGAAGTTACTTTTTCAAGTGTTTCAAGTGTTCGACGAAATCCTGCAGTGGTG
CGGAATCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTACTAAATAATGCTCCCAATAAACTCGATACAATGGTTC
CAATTATTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTTGTAAACGCAGTAGGGCATCCAATTA

GTAAGCTGACTCGGGCCGATTTATCGGATTTTGAGATTATCAATCGATTTTGCATATATGCAGAAA
TCTTTCTCATTATTACAGCGGATCCTCAAAAAAAAAAGAATATGTATCGAATAAAATATATACTTCGGC
TTTCTTGTGTTAAACTTTGGCTCGTAAACACAAGAGAAGTGTACGGGGT

Quercus germana

170 180
C T A C T G C G T T A C A A A A T T T C

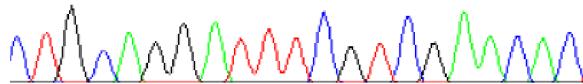


TTATTTGCATTTATTGCGGTTCTTTCTTCATGAGTATTCTAATTGTAACAGTCTTATTATTACAAATAA
ATCTATTTCCATTTTTTCAAAAAGTAATCCGAGATCTTTTTATTCCCTATATAATTCTTATATATGTGAA
TATGAATCCATCTTCCTTTTTCTCCGTAACCAATCTTCTCATTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCCT
TTTTGAACGACTCTGTTTCTATAGAAAAATAGAACATTTTGCCGAAGTCTTTGCTAATGATTTTCCG
GTCATCCCATGCTTTCTCAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGATATCAAGGAAAATCAATTCTGG
CTTCCAAAGACACACCTCTTCTAATGAATAAATGAAAATCTTACCTTGTCAATTTATGGCAATGTCA
TTTTGATGTATGGTCTCACGCGGCAAGTATCCGTATAACCAATTATCCAAGCATTCCCTCGATTTT
TTGAGTTACTTTTCAAGTGTTCCGACGAAATCCTGCAGTGGTGCGGAATCAAATGCTAGAAAATTCA
TTTCTACTAAATAATGCTCCCAATAAACTCGATACAATAGTTCCAATTATTCCCTATGATTGGATCATTG
GCTAAAGCGAAATTTTGTAAACGCAGTAGGGCATCCAATTAGTAAGCTGACTCGGGCTGATTTATCG
GATTTTGAGATTATCAATCGATTTTGCATATATGCAGAAATCTTCTCATTATTACAGCGGATCCTC
AAAAAAAAAGAATATGTATCGAATAAAATATATACTTTTCGGCTTTCTTGTGTTAAACTTT

Quercus laeta

AAACCCTTCGTTACCGGGTGAAGATGCTTCTTATTTGCATTTATTGCGGTTCTTTCTTCATGAGTATTCTAATTG
TAACAGTCTTATTATTACAAATAAATCTATTTCCATTTTTTCAAAAAGTAATCCGAGATCTTTTTATTCCCTATATAAT
TCTTATATATGTGAATATGAATCCATCTTCCTTTTTCTCCGTAACCAATCTTCTCATTACGATTAACATCTTCTGG
AGTCCTTTTTGAACGACTCTGTTTCTATAGAAAAATAGAACATTTTGCCGAAGTCTTTGCTAATGATTTTCCGGT
CATCCCATGCTTTCTCAAGGATCCTTTCATGCATTATGTTAGATATCAAGGAAAATCAATTCTGGCTTCCAAAGA
CACACCTCTTCTAATGAATAAATGAAAATCTTACCTTGTCAATTTATGGCAATGTCAATTTGATGTATGGTCTCAC

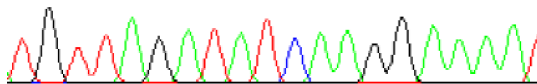
290 300
CTGCAGGATTTCTGTCGAAACAC



GCGGCAAGTATCCGTATAAACCAATTATCCAAGCATTCCCTCGATTTTTGAGTTACTTTTCAAGTGTTGACGA
AATCCTGCAGTGGTGCGGAATCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTACTAAATAATGCTCCCAATAAACTCGATACA
ATAGTTCCAATTATTCTATGATTGGATCATTGGCTAAAGCGAAATTTGTAACGCAGTAGGGCATCCAATTAGTA
AGCTGACTCGGGCTGATTTATCGGATTTTGAGATTATCAATCGATTTTGCATATATGCAGAAATCTTTCTCATTA
TTACAGCGGATCCTCAAAAAAAAAAGAATATGTATCGAATAA

Quercus liebmannii

340 350
TGTTAGATATCAAGGAAAA

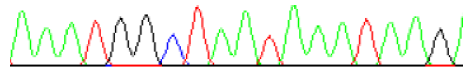


AAAGATGCTTCTTATTTGCATTATTGCGGTTCTTTCTTCATGAGTATTCTAATTGTAACAGT
CTTATTATTACAAATAAATCTATTTCCATTTTTCAAAAAGTAATCCGAGATTCTTTTTATTCCCT
ATATAATCTTATATATGTGAATATGAATCCATCTTCCTTTTTCTCCGTAACCAATCTTCTCAT
TTACGATTAACATCTTCTGGAGTCCTTTTTGAACGACTCTGTTTCTATAGAAAAATAGAACA
TTTTGCCGAAGTCTTTGCTAATGATTTTCCGGTCATCCCATGCTTTTCTCAAGGATCCTTTCA
TGCATTATGTTAGATATCAAGGAAAATCAATTCTGGCTTCCAAAGACACACCTCTTCTAATG
AATAAATGGAAATCTTACCTTGCAATTTATGGCAATGTCATTTTGATGTATGGTCTCACGC
GGCAAGTATCCGTATAAACCAATTATCCAAGCATTCCCTCGATTTTTGAGTTACTTTTCAA
GTGTTGACGAAATCCTGCAGTGGTGCGGAATCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTACTAAA
TAATGCTCCCAATAAACTCGATACAATAGTTCCAATTATTCTATGATTGGATCATTGGCTAA
AGCGAAATTTGTAACGCAGTAGGGCATCCAATTAGTAAGCTGACTCGGGCTGATTTATCG
GATTTTGAGATTATCAATCGATTTTGCATATATGCAGAAATCTTTCTCATTATTACAGCGGA
TCCTCAAAAAAAAAAGAATATGTATCGAATAAATA

Cuadro 6.- Secuencias y electroferogramas utilizando el marcador *trnH-psbA* para *Quercus crassipes*, *Quercus grahamii* y *Quercus laeta*.

Quercus crassipes

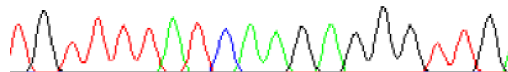
390 400
'AAATGGCTAATAAATAAG.



ACTTAGCTTCTGTCTGAAGCTCCATCTACAAATGGATAAGACTTAGGTATTAGTATATATG
 AGTTATTGAAAATAAATAAGAAAGGAGCAATAATCAACTTCTTGTTTTATCAAGAGGGT
 TGACATTGCTCCTTTCTATTATTAGCCATTTAATTATTATATAAATTGTAATTACTATTTAG
 TCGTCTTTTCTTTTACTTTTTACTTAATAGAATATAATATAATTTACTTAATAGAATATAAT
 ATAAGCTTTTTTTATTTAACTCAAGATACGAAAAAGGATTTGAGTATCCTATTTGACTT
 ATGTAGTAATTTTTATTTATATATGTTTTTATCGGTGAAGTTTTTATTATTATTTAAATA
 AAAAAGATAAAAACCTTCAATTTATTTTCTGCCGCTTGTCTTTTATCTTATAAGAAAGGGA
 AACAAAACAAGAGGAATGGTAGAAAATTGAAATTAATTGAAATTTTTGTAATTTATACTAC
 ATACAGGGGAGT

Quercus grahamii

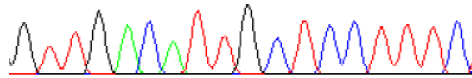
430 440
TGTTTTATCAAGAGGGTTG



ACTTAGCTTCTGTCTGAAGCTCCATCTACAAATGGATAAGACTTAGGTATTAGTATATATG
 AGTTATTGAAAATAAATAAGAAAGGAGCAATGTCAACCCTCTTGATAAAAACAAGAAGTT
 GATTATTGCTCCTTTCTATTATTAGCCATTTAATTATTATATAAATTGTAATTACTATTTAG
 TCGTCTTTTCTTTTACTTTTTACTTAATAGAATATAATATAATTTACTTAATAGAATATAAT
 ATAAGCTTTTTTTATTTAACTCAAGATACGAAAAAGGATTTGAGTATCCTATTTGACTT
 ATGTAGTAATTTTTATTTATATATGTTTTTATCGGTGAAGTTTTTATTATTATTTAAATA
 AAAAAGATAAAAACCTTCAATTTATTTTCTGCCGCTTGTCTTTTATCTTATAAGAAAGGGA
 AACAAAACAAGAGGAATGGTAGAAAATTGAAATTAATTGAAATTTTTGTAATTTATACTAC
 ATACAGGGGAGTGGGGGATAGGGGGCGGGATGTAGCCAAGTGGGATCAAGGGCAGT
 GGGATTGT

Quercus laeta

130 140
|GTTGACATTGCTCCTTTC



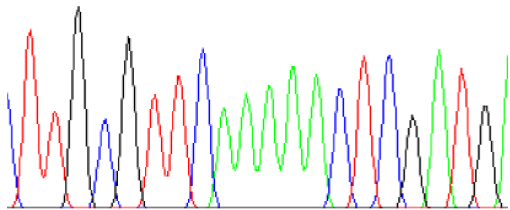
ACTTAGCTTCTGTCTGAAGCTCCATCTACAAATGGATAAGACTTAGGTATTAGTATATATG
AGTTATTGAAAATAAATAAGAAAGGAGCAATAATCAACTTCTTGTTTTATCAAGAGGGT
TGACATTGCTCCTTTCTTATTTATTAGCCCTTTAATTATTATATAATTGTAATTACTATTTA
GTCGTCTTTTCTTTTACTTTTTTACTTAATAGAATATAATATAAGCTTTTTTTTTATTTTATT
TAACTCAAGATACGAAAAGTAAAAGAGTATCCTATTTGATTTATGTAGTAATTTTTATT
TATATATGTTTTTATCGGTGAAGTTTTTATTTATTTTAAATAAAAAAGATAAAGCTTTC
AATTTATTTTCTGCCTCTTGTCTTTTATCTTATAAGAAAGGAAACAAAACAAGAGGAA
TGGTAGAAATTGAAATTTTTGTAATTTATACTACATACAGGGAGTGGGGGATAG

Cuadro 7.- Secuencia y electroferograma utilizando el marcador ITS para *Quercus grahamii*.

Quercus grahamii

ACTCGCTTTTGGGCTAACCGCGCGCGCAGGCACGCACGGGAGGCCAACTTCCGCCCG
CCCAAACCGGAGTTTGGGGGGCAACGATGCGTGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGG
CCGAATGGCTTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGATTGCGGGATTCTGCAAT
TCACACCAAGTATCGCATTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTG
CCGAGAGTCGTTTTGAATAATTCGTAAAGCGCCAACGCCGGGGGCACACCGTGTCCGGG
GCCTCCAACGTGGCTCTTGGTTTCGATTTCTTGGCGCGTTCCGCGCCGGGGT

290 300
CTTGC GTTCAAAA CT CGATG.



Los códigos de barras correspondientes de los marcadores de cloroplasto *matK* y *trnH-psbA* presentaron bajo porcentaje de GC correspondientes a 33% y 24%, respectivamente, mientras que el marcador nuclear ITS mostró un porcentaje de GC alto de 59% (Cuadro 8).

Especie	<i>matK</i>			<i>trnH-psbA</i>			ITS		
	pb	Composición de nucleótidos	% GC	pb	Composición de nucleótidos	% GC	pb	Composición de nucleótidos	% GC
<i>Q. crassipes</i>	832	A (29% 245) T (38% 302) G (14% 124) C (19% 161)	33%	499	A (41% 208) T (36% 175) G (10% 50) C (13% 66)	23%			
<i>Q. grahamii</i>	826	A (29% 247) T (38% 300) G (14% 121) C (19% 158)	33%	551	A (38% 214) T (36% 189) G (10% 56) C (16% 92)	26%	350	A (21% 75) T (20% 65) G (30% 107) C (29% 103)	59%
<i>Q. germana</i>	794	A (29% 237) T (39% 293) G (14% 116) C (18% 148)	32%						
<i>Q. laeta</i>	799	A (29% 238) T (38% 290) G (14% 119) C (19% 152)	33%	480	A (41% 200) T (35% 162) G (10% 49) C (14% 69)	24%			
<i>Q. liebmanii</i>	785	A (30% 239) T (38% 286) G (14% 114) C (18% 146)	32%						

Cuadro 8. Porcentajes de nucleótidos presentes en las secuencias de encinos. Se detalla la composición de nucleótidos que corresponde a cada especie de encino con su respectivo marcador molecular. Así también se reporta el porcentaje de guanina-citosina.

8.3. Identificación de especies de encinos mediante el uso de códigos de barras

Una vez obtenidas las secuencias de los tres marcadores moleculares se realizó una edición y ensamble de los genes *matK* y *trnH-psbA*, excepto para la secuencia sentido del marcador ITS. Posteriormente, la identidad de cada encino usando códigos de barras fue verificada por un índice de similitud con secuencias de referencia registradas en las bases de datos del NCBI. La similitud de las secuencias parciales del gen marcador *matK* reveló que las cinco especies de

encinos pertenecen al filo Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Fagales, familia Fagaceae y género *Quercus* contando con un 100% de identidad. Para las secuencias parciales del gen *trnH-psbA* se identificó para las especies *Q. crassipes*, *Q. grahamii* y *Q. laeta* la pertenencia al Filo Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Fagales, Familia Fagaceae y Género *Quercus* con un rango del 93 al 99% de identidad. (Cuadro 9 y 10). Para ITS se probó con la especie *Q. grahamii* el cual coincidió con un 99% de identidad tanto a las mismas familias y géneros que con los demás marcadores moleculares. Sin embargo, también coincide en un 99% con una angiosperma Magnoliophyta hospedera de un hongo. Aunado a esto, se realizó el registro de las secuencias de los cinco encinos junto con el marcador *matK* en la base de datos de NCBI, obteniendo los números de acceso correspondientes (Cuadro 11).

Cuadro 9. Números de acceso de las especies de encinos registradas y porcentajes de similitud en la base de datos NCBI con el marcador molecular *matK*. Se presentan los índices de similitud de las cinco especies de *Quercus* comparadas con las secuencias reportadas en la base de datos NCBI, se enlistan con las cinco especies más parecidas.

Especie y número de acceso	Especies similares	Número de acceso de especies similares	Porcentaje de Similitud	Familia	Aislado de
<i>Quercus crassipes</i> SCRM MK239963	<i>Quercus shumardii</i>	MF045023.1	100	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus rubra</i>	MF045022.1	100	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus palustris</i>	MF045018.1	100	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus emoryi</i>	MF045004.1	100	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus calophylla</i>	MF044999.1	100	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
<i>Quercus grahamii</i> SGRM MK239964	<i>Quercus shumardii</i>	MF045023.1	96	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus rubra</i>	MF045022.1	96	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus palustris</i>	MF045018.1	96	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus emoryi</i>	MF045004.1	96	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto

	<i>Quercus calophylla</i>	MF044999.1	96	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
Quercus germana SGEM MK239965	<i>Quercus corrugata</i>	MF045016.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus grisea</i>	MF045008.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus alba</i>	MF044995.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus macrocarpa</i>	MF045013.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus lobata</i>	MF045011-1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
Quercus laeta SLAM MK239966	<i>Quercus corrugata</i>	MF045016.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus grisea</i>	MF045008.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
Quercus liebmannii SLIM MK239967	<i>Quercus alba</i>	MF044995.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus macrocarpa</i>	MF045013.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus lobata</i>	MF045011.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
Quercus liebmannii SLIM MK239967	<i>Quercus corrugata</i>	MF045016.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus grisea</i>	MF045008.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus alba</i>	MF044995.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
	<i>Quercus macrocarpa</i>	MF045013.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto
Quercus liebmannii SLIM MK239967	<i>Quercus lobata</i>	MF045011.1	99	Fagaceae	Plastidio: cloroplasto

Cuadro 10. Secuencias del marcador *trnH-psbA* comparadas en la base de datos NCBI. Se presentan las cinco especies más similares a las secuencias de las especies de *Quercus* hospedadas de melolóntidos

Especie	Cobertura	Identidad	Máxima puntuación	Puntuación total
<i>Quercus crassipes</i>				
<i>Q. crassipes</i>	100%	98%	856	993
<i>Q. phillyreoides</i>	100%	95%	776	776
<i>Q. alba</i>	100%	94%	734	734
<i>Q. bicolor</i>	100%	93%	726	726
<i>Q. emoryi</i>	100%	93%	695	833
<i>Quercus grahamii</i>				

<i>Q. crassipes</i>	95%	99%	959	959
<i>Q. rubra</i>	100%	94%	813	813
<i>Q. sapotifolia</i>	98%	94%	806	806
<i>Q. velutina</i>	98%	94%	806	806
<i>Q. rubra</i>	98%	94%	802	802
<i>Quercus laeta</i>				
<i>Q. agrifolia</i>	100%	99%	869	869
<i>Q. geminata</i>	100%	99%	869	869
<i>Q. macrocarpa</i>	100%	99%	869	869
<i>Q. alba</i>	100%	99%	869	869
<i>Q. berberidifolia</i>	100%	99%	863	863

Cuadro 11.- Secuencia de ITS con *Quercus grahamii* comparada en la base de datos NCBI. Se presentan las cinco especies registradas en NCBI más similares a las secuencias de *Quercus grahamii* sentido.

Espece	Cobertura	Identidad	Máxima puntuación	Puntuación total
<i>Quercus grahamii</i>				
Angiosperm mycorrizal host	100%	99%	630	630
<i>Q. incana</i>	100%	99%	630	630
<i>Q. candicans</i>	100%	99%	628	628
<i>Q. coccinea</i>	100%	99%	625	625
<i>Q. arizonica</i>	100%	99%	625	625

9.- DISCUSIÓN

9.1.- Presencia de adultos de *Macroductylus* sp. en los encinos

El muestreo de estos insectos en la zona del quercetum del Jardín Botánico Universitario aporta nuevos registros acerca de la presencia de insectos del género *Macroductylus* sp. en varias especies arbóreas y arbustivas de *Quercus* con características morfológicas distintivas, además de reportar los horarios en los que los insectos se encuentran realizando actividades de cópula y alimentación. Esta información es relevante dado que estudios ecológicos y taxonómicos tales como los de Aragón *et al.* (2001) reportan que solo se han encontrado en México

adultos del género *Phyllophaga* alimentándose de encinos; sin embargo, ahora se tienen las identidades de los encinos preferidos y también de los Melolonthidae asociados, por lo que se pueden realizar estudios más profundos y precisos sobre la conservación y manejo de estas especies, pues se sabe que el género *Macroductylus* tiene por característica importante el ser una plaga, que afecta tanto en estado larval como en adulto.

Además, los árboles de *Q. germana* y *Q. grahamii* se encuentran considerados dentro de la Red List como especies vulnerables (Nixon *et al.*, 1998), mientras que *Q. liebmannii* se encuentra en la categoría de menor preocupación (Nixon *et al.*, 1998). Afortunadamente, *Q. laeta* y *Q. crassipes* no figuran en estas listas. Por lo tanto, aumenta la importancia de la identificación de los individuos que interactúan con estas especies de *Quercus*. También siendo de gran importancia la conservación de los encinos del Quercetum, pues son ejemplares vivos de la colección del Jardín Botánico, los cuales sirven de herramienta fundamental para taxónomos e investigadores. Aunado a esto, se confirma que los adultos de *Macroductylus* prefieren el follaje tierno para la alimentación tal y como lo mencionan Arce-Pérez y Morón (2000), pues las cinco especies de encinos identificadas como las preferidas por los insectos contaban con hojas delgadas y nuevas, que por lo tanto, presentaban una textura blanda y no rugosa tanto en el haz como en el envés, facilitando así la alimentación de los escarabajos.

9.2.- Identificación mediante códigos de barras de marcadores de cloroplasto y nuclear

En cuanto a la identidad de los encinos, se contó con la identificación morfológica previa gracias al Investigador Allen J. Coombes y de la Dra. Maricela Rodríguez Acosta del Jardín Botánico Universitario, quienes cuentan con el espécimen vivo y en herbario, de tal forma que los resultados obtenidos en las bases de datos debían guiar a las especies reconocidas por la BUAP. Al realizar la

búsqueda previa de las especies de *Quercus* seleccionadas en este trabajo, se localizaron en las bases de datos las secuencias de la especie *Q. crassipes*, registrada con los marcadores moleculares *trnH-psbA* y *matK*; y la especie *Q. laeta*, que se encuentra registrada con el marcador *matK*. Sin embargo las especies *Q. grahamii*, *Q. liebmannii* y *Q. germana* ni sus sinónimos se encuentran registradas con ningún marcador molecular.

El registro de *Q. crassipes* tanto para *matK* como para *trnH-psbA* corresponde al investigador M. C. Simeone en el 2014, se localiza en la base de datos NCBI, sin embargo, aún no se encuentra publicado el artículo de referencia. Al comparar nuestra secuencia de *matK* con la registrada en NCBI, no determina que sea la misma secuencia; esto es posiblemente porque es una secuencia parcial y son secciones distintas del gen *matK*. Las especies con mayor índice de similitud con nuestra secuencia son *Quercus shumardii*, *Quercus rubra*, *Quercus palustris*, *Quercus emoryi* y *Quercus candicans* (ahora *Quercus calophylla*) (Valencia *et al.*, 2018), las cuales pertenecen todas a la sección Lobatae o de encinos rojos, al igual que *Q. crassipes*. No obstante, *Q. crassipes* es una especie endémica de México, perteneciente a estados como Colima, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Puebla, Oaxaca y Morelos y las especies *Q. shumardii*, *Q. emoryi*, *Q. palustris* y *Q. rubra* son especies que se encuentran distribuidas a lo largo de Estados Unidos principalmente (Roskov *et al.*, 2018), con excepción de *Q. emoryi*, el cual se encuentra también en Durango y San Luis Potosí y finalmente *Q. candicans* sí cuenta con una amplia distribución en México, en estados como Puebla, Jalisco, Nayarit, Morelos y Sinaloa (Rutiaga *et al.*, 2000). Aunado a esto, la morfología foliar es distinta entre estas especies, ya que *Q. crassipes* presenta hojas lanceoladas que van desde los 2.5 cm de largo hasta los 14 cm (Arizaga *et al.*, 2009), mientras que por ejemplo *Q. shumardii*, que es la especie número uno en la lista de similitud, presenta hojas obovadas de entre 5 a 9 lóbulos con las puntas afiladas en forma de púas (Fig. 13).

Para el marcador *trnH-psbA*, la secuencia de *Q. crassipes* resulto tener un 98% de identidad con la secuencia registrada en la base de datos NCBI con 4 gaps. Por consiguiente, determina que el marcador molecular *trnH-psbA* tuvo para *Q. crassipes* mejor poder de discriminación que el marcador molecular *matK*; adicionalmente se ha estado reportando recientemente que *trnH-psbA* se está postulando como un marcador universal para encinos mejor que *matK* y *rbcl*, por su poder de discriminación utilizando BLAST (Yan *et al.*, 2018). Además, la segunda especie de la lista de similitud de nuestra secuencia corresponde a *Quercus phillyreoides*, quien cuenta con una secuencia parcial registrada del espaciador intergénico *trnH-psbA*; se trata de una especie que se distribuye únicamente en Japón, siendo estas condiciones ambientales diferentes en las que se desarrollan ambas especies (Liu *et al.*, 2013).



Figura 13.- Representación de hojas de a) *Quercus crassipes* y b) *Quercus shumardii*. Comparación entre morfología foliar (Fotografías recuperadas de www.naturalista.mx).

El registro de *Q. laeta* corresponde a una secuencia parcial del gen *matK* por los investigadores Paul Manos y Alice Stanford en 2001. Los iniciadores que ellos utilizaron difieren en las secuencias sentido y antisentido utilizadas en este trabajo, por lo que se entiende que se secuenció una sección del gen diferente a la del presente estudio. Por lo tanto, al comparar la secuencia registrada con la secuencia obtenida los encinos con un índice de similitud mayor a nuestra secuencia para *Q. laeta*, resultan ser *Quercus corrugata*, *Quercus grisea*, *Quercus alba*, *Quercus macrocarpa* y *Quercus lobata*. Todas estas especies son pertenecientes a la sección *Quercus* o de encinos blancos, los cuales se encuentran en Estados Unidos, principalmente al sur. No obstante, *Q. grisea* tiene una distribución más amplia que abarca desde Texas hasta el norte de México y *Q. corrugata* se localiza en México, Guatemala, El Salvador y Costa Rica (Roskov *et al.*, 2018), siendo esta la especie con zona geográfica más cercana, puesto que *Q. laeta* tiene una distribución extensa en territorio mexicano desde Sinaloa hasta Oaxaca (Pérez y Valencia-A, 2017).

Con el marcador *trnH-psbA* se repiten las especies *Q. alba* y *Q. macrocarpa*. En cuanto a *Q. lobata*, *Q. corrugata* y *Q. grisea*, no se encuentran registradas con este marcador molecular. La lista de especies similares registra con *trnH-psbA* a *Q. geminata*, *Q. berberidifolia* y *Q. agrifolia*, siendo los dos primeros encinos blancos al igual que *Q. laeta* y el último encino rojo. Con *Q. agrifolia* las secuencias comparten un 99% de identidad presentando únicamente 4 gaps, haciendo así difícil la diferenciación de especies por vía molecular entre un encino blanco y uno rojo; sin embargo, estas dos especies no comparten zonas geográficas, de tal forma que utilizando taxonomía integrativa se puede discernir entre una y otra apoyados de ecología, incluso de morfología, tal y como proponen Padial *et al.* (2010), describiendo la ventaja de la taxonomía integrativa al apoyarse de diversas disciplinas para la búsqueda de identidad de las especies. Pasando a *Q. germana* y *Q. liebmannii*, las cinco primeras comparaciones de las secuencias de ADN registradas en NCBI con el gen *matK*, dieron como resultado

los mismos cinco encinos dentro de la sección *Quercus* (encinos blancos) que con *Q. laeta*, todas con un 99% de identidad. Sin embargo, no comparten zonas geográficas ya que *Q. germana* se distribuye en estados mexicanos como Puebla, San Luis Potosí, Veracruz, Tamaulipas e Hidalgo (Pérez y Valencia-Ávalos, 2017) y *Q. liebmannii* también se distribuye en centro México, mientras que las demás especies mencionadas cuentan con una distribución norteamericana excepto por *Q. corrugata*. La diferencia de secuencias entre *Q. germana* y *Q. corrugata* es de 1 gap, y de *Q. liebmannii* y *Q. corrugata* es de 0 (cero), por lo que se evidencia de nuevo la falta de poder de diferenciación de especies del marcador *matK* para encinos, como lo mencionan Yang *et al.* (2017). La morfología foliar de estas tres especies es distinta ya que *Q. liebmannii* presenta hojas ovales a veces elípticas, estrechas y redondeadas y con algunos pelos estrellados a lo largo de la nervadura central, mientras que *Q. germana* tiene hojas lanceoladas con la base aguda y pelos estrellados cerca de la base. Finalmente, *Q. corrugata* tiene hojas con forma oblanceolada y con pubescencia estrellada dispersa entre otras características (Fig. 14).

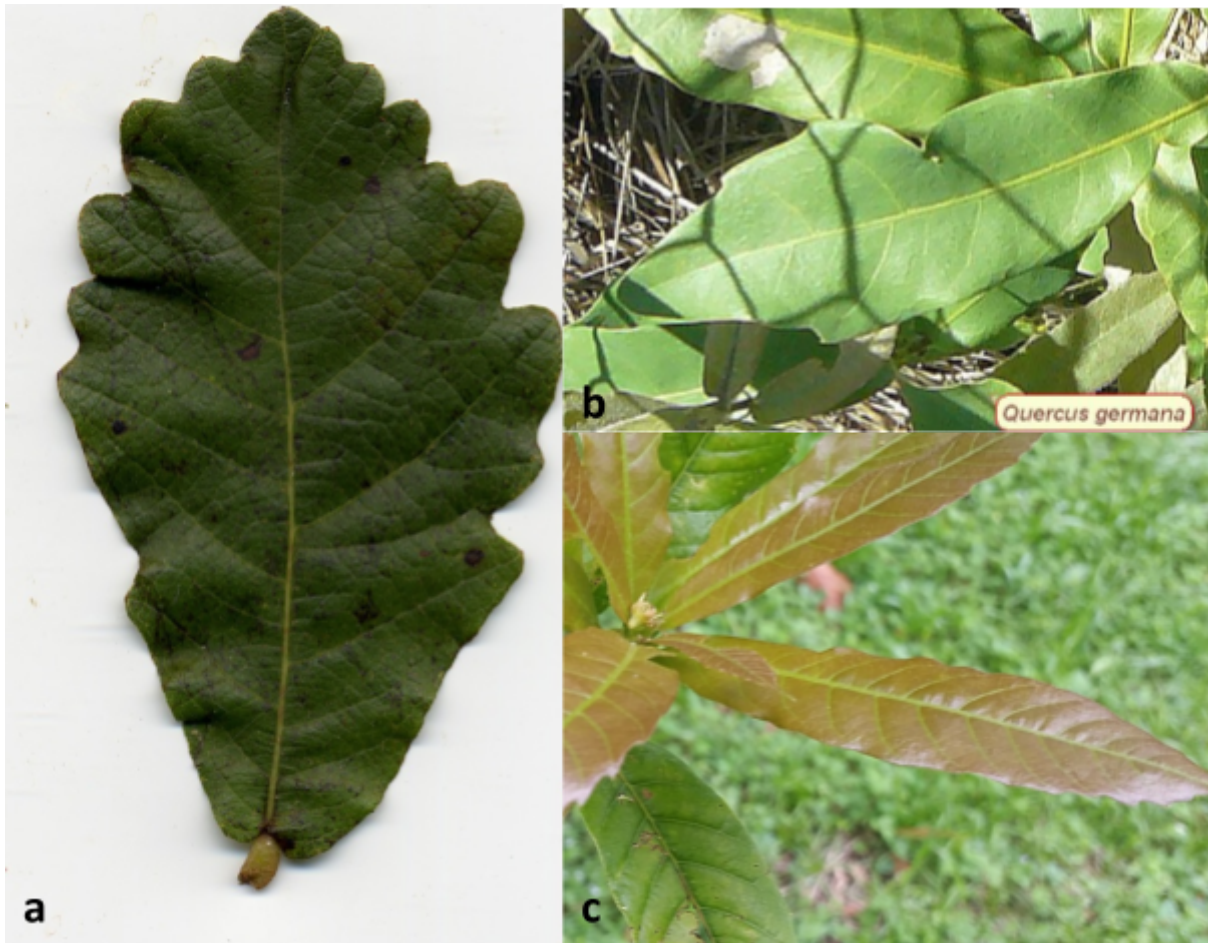


Figura 14.- Representación de hojas de a) *Quercus liebmannii*, b) *Quercus germana* y c) *Quercus corrugata*.

Finalmente *Q. grahamii* fue el único encino del que se obtuvieron amplicones para los tres marcadores moleculares *matK*, *trnH-psbA* e ITS. Con respecto a las especies con mayor índice de similitud utilizando *matK*, se tiene como resultado que cinco especies de *Quercus* de la sección Lobatae (encinos rojos), las cuales son *Quercus shumardii*, *Quercus rubra*, *Quercus palustris*, *Quercus emoryi* y *Quercus calophylla*, son las mismas especies que se reportan parecidas a *Q. crassipes* utilizando el marcador *matK*, por lo cual no tiene poder de discriminación, además de que la secuencia de *Q. grahamii* no se encuentra registrada en las bases de datos. Es importante señalar que todas esas especies, a excepción de *Q. candicans*, son endémicas de Estados Unidos, por lo tanto no

comparten nicho ecológico. *Q. shumardii* en comparación con *Q. grahamii* presenta 15 gaps (1%) en toda la secuencia.

Para el marcador molecular *trnH-psbA*, las especies con mayor similitud registradas en NCBI fueron *Q. crassipes*, *Quercus rubra*, *Quercus sapotifolia* y *Quercus velutina*; todas estas especies pertenecen a la sección *Lobatae* por lo que este marcador logro diferenciar de entre las secciones de encinos. *Q. grahamii* tiene una distribución en territorio mexicano central (Roskov *et al.*, 2018), al igual que *Q. crassipes* (Valencia-Ávalos, 2004); sin embargo, *Q. rubra* y *Q. velutina* son especies distribuidas en Estados Unidos. En cuanto a este marcador, indica que *Q. grahamii* y *Q. crassipes* tienen un 99% de similitud, aunque por vía molecular es difícil detectar diferencias entre estas especies; la que la diferencia de secuencias radica en solo 2 gaps. Sin embargo, su morfología foliar es muy distinta, ya que las hojas de *Q. grahamii* son elípticas o elípticas-lanceoladas de 5 a 16 cm de largo, con tricomas en la nervadura central mientras (Romero-Rangel, 2006) que las de *Q. crassipes* son lanceoladas más pequeñas de entre 2.5 a 14 cm (Arizaga *et al*, 2009).

Por último, el marcador ITS fue el más difícil de amplificar y para la secuenciación solo se pudo obtener la secuencia sentido de *Q. grahamii*. Sin embargo, el resultado coincide en 99% de similitud con *Q. incana*, *Q. calophylla*, *Q. coccinea* (sección *Lobatae*) y *Q. arizonica* (sección *Quercus*), agregando también como número uno en la lista de similitud a una angiosperma hospedera de un hongo. Sin embargo, las secuencias de los iniciadores utilizados para este marcador molecular no se encuentran disponibles ya que no se encuentra publicado el artículo.

Por lo tanto, de los tres marcadores moleculares, los que tuvieron menor poder de discriminación entre especies fueron *matK* e ITS, tal y como menciona Yan *et al.* (2018) y determinan que entre varios marcadores tales como *atpI-atpH*, *matK*, *trnH-psbA* e *ycf1*; el que mejor resolución tiene utilizando la herramienta de BLAST

es *trnH-psbA*, además del uso de combinatorias de marcadores moleculares. Además, determinan que ningún marcador de los antes mencionados provee una resolución alta en gaps lo que no ayuda a la diferenciación a nivel de especie. Esto también es mencionado por Yang *et al.* (2017), quienes utilizaron los marcadores de ADN de cloroplasto *trnH-psbA*, *matK* -*trnK*, *ycf3-trnS*, *matK* y *ycf1*, además de dos marcadores moleculares de ADN nuclear SAP e ITS; con ellos determinaron, al igual que nuestros resultados, que el marcador *trnH-psbA* que por sí mismo provee de buena resolución. No obstante, también postulan a ITS como un buen marcador nuclear para la diferenciación de especies, lo cual discrepa de los resultados obtenidos por nosotros. Es posible que esto se haya dado por la gran hibridación que tienen los encinos de las secciones *Quercus* y *Lobatae* en el continente americano, que es diferente a los encinos utilizados en los estudios de los investigadores Yang y Mengxiao (en Hipp *et al.*, 2013).

Las características que presentaron las secuencias obtenidas para los tres marcadores moleculares fueron analizadas también, resultando de estas un bajo contenido de GC tanto para el marcador *matK* como para *trnH-psbA* y alto contenido de GC para ITS. Esto concuerda con lo reportado por Castro *et al.* (2015). Con esta información determinamos que la dificultad que se tuvo para la amplificación del marcador ITS repercute en la cantidad de enlaces de triple hidrógeno tan elevada, lo cual no permitió una desnaturalización correcta de la cadena de ADN, impidiendo así una PCR exitosa, al contrario de los marcadores *matK* y *trnH-psbA* que al tener bajas cantidades de GC, este no afectó en la amplificación. El contenido de GC también indica las tasas de sustitución que tiene un gen a lo largo de la evolución. En este sentido, Saha *et al.* (2013) mencionan que el gen *matK* suele tener bajo contenido de GC, por lo que alto contenido en AT se relaciona con la tasa de evolución que tiene un gen; a más alto contenido de AT, más rápida es su tasa de evolución, siendo sugerido que es una ventaja selectiva de alguna proteína en particular, recordando que en este estudio *matK* es el único gen codificante de proteína.

10.- CONCLUSIONES

- ξ Se detectó la presencia de adultos de *Macroductylus* en cinco especies de encinos, en el momento en que llevan a cabo actividades alimentarias y sexuales.
- ξ Se estandarizó un método confiable para la preparación y procesamiento de tejido foliar de *Quercus* spp.
- ξ La amplificación del gen *matK* permitió la obtención de productos de 700 pb, del gen *trnH-psbA* con productos de 600 pb y del gen ITS con productos de 700 pb.
- ξ El análisis del código de barras de los tres marcadores moleculares permitió la identificación a nivel de género de los individuos de *Quercus* estudiados.
- ξ El gen *trnH-psbA* es el marcador molecular con mayor poder de discriminación, identificando a *Q. crassipes*.

11. REFERENCIAS

- Aguilar-Enriquez, M. de L. y Romero-Rangel, S. (1995). Estudio taxonómico de cuatro especies de encino (*Quercus*) descritas por Warburg. *Acta Botanica Mexicana*, 31, 63–71.
- Aragón, A., Morón, M.A., Tapia-Rojas, A. M. y Rojas-García, R. (2001). Fauna De Coleoptera Melolonthidae En El Rancho “La Joya”, Atlixco, Puebla, México. *Acta Zool. Mex*, 83, 143–164.
- Arce-Pérez, R., & Morón, M.A. (2000). Taxonomía y distribución de las

especies de *Macroductylus latreille* (Coleoptera:Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana*, 79, 123–239.

- Arizaga, S., Martínez-Cruz, J., Salcedo-Cabrales, M. & Bello-González M. A. (2009). Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. México.
- Bonfil, C. (1991). La Riqueza de los encinos. *Ciencias*, 29, 13–15.
- Castro, C., Hernández, A., Alvarado, L. & Flores, D. (2015). DNA Barcodes in Fig Cultivars (*Ficus carica* L.) Using ITS Regions of Ribosomal DNA, the *psbA-trnH* Spacer and the *matK* Coding Sequence. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 95-102.
- Ciprandi-Pires, A., & Marinoni, L. (2010). DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, 10(2), 349–346. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000200035>
- Delvare, G., Pierre, A. H., Michel, A. B. & Figueroa. (2002). Los Insectos de África y América tropical. Claves para la Identificación de las principales familias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira- Colombia. 259 p.
- Derby, R. W., & Gates, D. M. (1966). The Temperature of Tree Trunks-Calculated and Observed. *American Journal of Botany*, 53(536), 580–587. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2440008>
- Hebert, P. D. N., & Gregory, T. R. (2005). The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *SYSTEMATIC BIOLOGY Syst. Biol*, 54(545), 852–859. <https://doi.org/10.1080/10635150500354886>
- Hershkovitz, M. A., & Zimmer, E. A. (1996). Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. *Nucleic Acids Research*, 24(15), 2857–2867. <https://doi.org/10.1093/nar/24.15.2857>
- Hipp, A. L., Eaton, D. A., Cavender-Bares, J., Nipper, R., & Manos, P. S. (2013). Using phylogenomics to infer the evolutionary history of oaks. *International Oak Journal*, 24, 61–71.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Lanteri, A. A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Rev. Soc. Entomol. Argent*, 66(3–4), 15–25.
- Martínez-Cabrera, D., Terrazas, T., & Zavala-Chávez, F. (2003). Arquitectura foliar y anatomía de la corteza y la madera de *Quercus sartorii* y *Q. xalapensis* (Fagaceae). *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, (73), 63–72. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/577/57707305/>
- Liu, H. Z., Takeichi, Y., Kamiya, K & Harada, K. (2013) Phylogeography of *Quercus phillyraeoides* (Fagaceae) in Japan as revealed by chloroplast DNA variation. *J For Res.* 18: 361-370
- Muller, C. H. (1951). The oaks of Texas. *Contr. Texas research Foundation* 1.(3) 21-311
- Manos, P., & Stanford, A. (2001). The historical biogeography of Fagaceae: tracking the tertiary history of temperate and subtropical forests of the Northern hemisphere. *International Journal of Plant Sciences*, 162(S6), S77-S93. doi:10.1086/323280
- Marzocca, A. (1985). *Nociones básicas de Taxonomía Vegetal*. San José Costa Rica. IICA
- Morón, M. A., Ratcliffe, B. C & Deloya, C. (1997). Atlas de escarabajos de México. Coleoptera Lamellicarnia, Vol 1. Familia Melolonthidae. CONABIO y Sociedad Mexicana de Entomología. A. C. México . 280
- Murphy, T. M. & Potter, D. (2017). Genetic Distinctions Among Oaks in the University of California, Davis Arboretum contributions to oak phylogeny. *Internationals oaks journal.* 28, 59-72.
- Nixon, K. (1998). *Quercus liebmannii*. The IUCN Red List of Threatened Species 1998:.T34666A9882098. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1998.R.LTS.T34666A9882098.eN>

- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(16).
- Pang X., Liu, C., Shi L., Liu R., Liang D., Li H. & Chen, S. (2012). Utility of the trnH-psbA Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis. *PLOS*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>
- Penas, A., Llamas, F., Pérez-Morales, C., & Acedo, C. (1994). Aportaciones al conocimiento del genero *Quercus* en la cordillera cantabrica. I. tricomas foliares de las especies caducifolias. *Lagasalia*, 17(2), 311–324.
- Pérez-Mojica, E. y Valencia-A, S. (2017). Estudio preliminar del genero *Quercus* (Fagaceae) en Tamaulipas, México. *Acta Botánica Mexicana*, 120: 59-111. DOI: [http:// dx.doi.org/10.21829/abm120.2017.1264](http://dx.doi.org/10.21829/abm120.2017.1264)
- Piredda, R., Simeone, M. C., Attimonelli, M., Bellarosa, R. & Schirone, B. (2011). Prospects of barcoding the Italian wild dendroflora: oaks reveal severe limitations to tracking species identity. *Molecular Ecology Resources*. 11, 72-83
- Rosete, E. M. (2016). Código de barras de ADN para la identificación universal de especies. *Saberes y Ciencias*. <http://saberesyciencias.com.mx/2016/05/11/codigo-de-barras-de-adn-para-la-identificacion-universal-de-especies>
- Romero-Rangel S. (2006). Revision taxonomica del complejo Acutifoliae de *Quercus* (Fagaceae) con énfasis en su representacion en México. *Acta botanica Mexicana*. 76: 1-45
- Roskov ,Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk ,P.M., Bourgoin, T., DeWalt, R.E., Decock ,W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., & Penev L. (2018). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2018 Annual Checklist. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2018. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.

- Rutiaga-Quiñones, J.G., Windeisen E. y Strobel C. (2000). Composicion química del duramen de la madera de *Quercus candicans* Neé. *Madera y bosques*, 6 (2) 73-80
- Simeone, M. C., Piredda, R., Papini, A., Vessella, F., & Schirone, B. (2013). Application of plastid and nuclear markers to DNA barcoding of Euro-Mediterranean oaks (*Quercus*, Fagaceae): problems, prospects and phylogenetic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 172, 478–499.
- Saha J., Gupta K. & Gupta B. (2013) Phylogenetic analyses and evolutionary relationships of *Saraca asoca* with their allied taxa (Tribe-Detarieae) based on the chloroplast *matK* gene. *Society for Plant Biochemistry and Biotechnology*
- Soltis, D. E., Soltis, P. & Doyle, J. (1998). Molecular Systematics of plants II. Norwell, Massachusetts. Kluwer Academic Publishers
- Telfer, A. C., Young, M. R., Quinn, J., Perez, K., Sobel, C. N., Sones, J. E., & de Waard, J. R. (2015). Biodiversity inventories in high gear: DNA barcoding facilitates a rapid biotic survey of a temperate nature reserve. *Biodiversity Data Journal*, 3. <https://doi.org/10.3897/BDJ.3.e6313>
- Valencia-Ávalos, S. (1991). El Problema de la especie. *Ciencias*, 24, 13–22.
- Valencia-Ávalos, S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociaedad Botanica de México*. (75)
- Valencia-Ávalos, S., Coombes A., Villaseñor J. L. (2018). *Quercus candicans* (Fagaceae) is not a *Quercus bur roldana* (Asteraceae). *Phytotaxa* 333 (2); 251-258
- Wattoo, J. I., Saleem, M. Z., Shahzad, M. S., Arif, A., Hameed, A., & Saleem, M. A. (2016). DNA Barcoding: Amplification and sequence analysis of *rbcl* and *matK* genome regions in three divergent plant species. *International Quarterly Journal of Biological Sciences*, 4(1): 3–7.
- Wilson, E. O. (2004). Taxonomy as a fundamental discipline. *The Royal*

Society, 359(1444), 739. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1440>

- Will K. W., Mishler B.D., & Wheeler Q.D. (2005). The perils of DNA Barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol.* 54(5): 844-851.
- Yan M., Xiong Y., Deng M. & Song J. (2018). The application and limitation of universal chloroplast markers in discriminating East Asian Evergreen Oaks. *Fron. Plant. Sci.* 9:569 doi: 10.3389/fpls.2018.00569
- Yang, J., Di, X., Meng, X., Feng, L., Liu, Z., & Zhao, G. (2016). Phylogeography and evolution of two closely related oak species (*Quercus*) from north and northeast China. *Tree Genetics and Genomes*, 12(5). <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1044-5>
- Yang, J., Vázquez, L., Chen, X., Li, H., Zhang, H., Liu, Z., & Zhao, G. (2017). Development of chloroplast and nuclear DNA Markers for chinese oaks (*Quercus* subgenus *Quercus*) and assessment of their utility as DNA.
- Yu J., Xue J. H. & Zhou S. K. (2011). New universal *matK* primers for DN barcoding angiosperms, *Journal of Systematics and Evolution* 49 (3): 176-181
- Zavala-Chávez F. (1999). Variabilidad y riqueza de los encinos de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 5 (2): 113-121