



RECOLECCIÓN
DE TEJIDOS
BIOLÓGICOS

para análisis genéticos

EDITORES

Mailyn A. Gonzalez
Henry Arenas-Castro

Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos / editado por Mailyn A. Gonzalez y Henry Arenas-Castro; -- Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2017.

33 p.: il., col.; 19.5 x 27 cm.

Incluye ilustraciones a color, bibliografía e índice.

ISBN obra impresa: 978-958-5418-17-2

ISBN obra digital: 978-958-5418-18-9

1. Tejidos biológicos
 2. Tejidos animales -- preservación
 3. Tejidos vegetales -- preservación
 4. Genética
 5. Análisis genéticos
 6. Tejidos -- muestreo
 7. Colecciones biológicas
- I. Gonzalez, Mailyn A. (Ed) II. Arenas-Castro, Henry (Ed)
III. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

CDD: 571.538 Ed. 23

Número de contribución: 561

Registro en el catálogo Humboldt: 15000

CEP – Biblioteca Francisco Matís,
Instituto Alexander von Humboldt -- Nohora Alvarado

CON EL APOYO DE:



COLCIENCIAS



Documento preparado por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt en el marco del proyecto Colombia BIO

EDICIÓN

Mailyn A. Gonzalez y Henry Arenas-Castro

REVISIÓN CIENTÍFICA

Alexis Acosta, Julián Aguirre-Santoro, Eduar Bejarano, Adriana Bermúdez Tobón, Alexander Borisenko, Gustavo Sebastián Cabanne, María del Rosario Castañeda, María Ignacia Castillo, Andia Chaves-Fonnegra, Margarita M. Correa, José A. Cuesta, Juan Jacobo de la Cuesta Zuluaga, Nicola S. Flanagan, Adriana Gaytán Caballero, Andrés Mauricio Gómez Palacio, Carlos E. Guarnizo, Juan Pablo Hurtado, Valentina Islas Villanueva, Virginia León Regagnon, Alejandro Loaiza, Juan Pablo López, Santiago Madriñán, Javier A. Maldonado, Yery Marambio-Alfaro, César Marín, Roberto Márquez, Viviana Márquez, Guido Fabián Medina Rangel, Ángela María Mendoza, María Eugenia Morales, Esteban Payán, Enrique Peña-Salamanca, Carlos Prada, Valeria Ramírez, Hernando Ramírez Gil, Martha Patricia Ramírez P., Mauricio Rivera-Correa, Gerardo Robledo, María Ximena Rodríguez Bocanegra, Abel Senties Granados, José Julián Tavera, Danny Zurc

ILUSTRACIÓN, DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

César Gutiérrez

CORRECCIÓN DE ESTILO

Ana María Rueda García

IMPRESIÓN

Espacio Creativo Impresores S. A. S.

ISBN obra impresa: 978-958-5418-17-2

ISBN obra digital: 978-958-5418-18-9

CITACIÓN SUGERIDA

Gonzalez M. A., Arenas-Castro H. (Eds). 2017. Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia. 33 pp.

Uribe S., Clavijo-G A. 2017. Insectos. pp 19. En: Gonzalez M. A., Arenas-Castro H. (Eds). Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia. 33 pp.

Palabras clave: tejidos biológicos, colecciones biológicas, análisis genéticos

Primera edición, 2017

1000 ejemplares

Impreso en Bogotá, D. C., Colombia

Esta publicación fue editada por la Editorial Alexander von Humboldt

AUTORES	01	17	ZOOPLANCTON Y MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS Manuel Elías-Gutiérrez
RESUMEN EJECUTIVO	03	18	CRUSTÁCEOS Y MOLUSCOS Néstor E. Ardila
PRESENTACIÓN Brigitte Baptiste	04	19	INSECTOS Sandra Uribe y Alejandra Clavijo-G
INTRODUCCIÓN Henry Arenas-Castro y Maily A. Gonzalez	05	20	PECES CARTILAGINOSOS Y MAMÍFEROS ACUÁTICOS Susana Caballero
RECOMENDACIONES GENERALES Enrique Arbeláez-Cortés	06	21	PECES ÓSEOS Rocío Acuña Posada y María Doris Escobar L
MUESTRAS AMBIENTALES Johan Pansu	09	23	ANFIBIOS Andrew J. Crawford y Andrea Paz
PLANTAS Maily A. Gonzalez y Lorena Quintero	11	25	REPTILES Mario Vargas-Ramírez
MACROALGAS Lizette I. Quan-Young	12	27	AVES Paulo C. Pulgarín-R
HONGOS Natalia Vargas Estupiñán, Juan Chiriví-Salomón, Aída M. Vasco-Palacios, Pedro Jiménez y Silvia Restrepo	13	29	MAMÍFEROS Manuel Ruiz-García
CORALES Y ESPONJAS Luisa Fernanda Dueñas, Dairo Escobar y Juan Armando Sánchez	15	31	REFERENCIAS

ROCÍO ACUÑA POSADA
Conservación Internacional
Bogotá, D. C., Colombia

ENRIQUE ARBELÁEZ-CORTÉS
Universidad Industrial de Santander
Bucaramanga, Colombia

NÉSTOR E. ARDILA
ECOMAR
Bogotá, D. C., Colombia

HENRY ARENAS-CASTRO
Instituto de Investigación de Recursos Biológicos
Alexander von Humboldt
Bogotá, D. C., Colombia

SUSANA CABALLERO
Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

JUAN CHIRIVÍ-SALOMÓN
Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

ALEJANDRA CLAVIJO-G
Universidad Nacional de Colombia
Medellín, Colombia

ANDREW J. CRAWFORD
Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

LUISA FERNANDA DUEÑAS
Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

MANUEL ELÍAS-GUTIÉRREZ
El Colegio de la Frontera Sur
Chetumal, México

DAIRO ESCOBAR
SiB Colombia
Bogotá, D. C., Colombia

MARÍA DORIS ESCOBAR L
Universidade Federal do Amazonas
Manaos, Brasil

MAILYN A. GONZALEZ
Instituto de Investigación de Recursos Biológicos
Alexander von Humboldt
Bogotá, D. C., Colombia

AUTORES

PEDRO JIMÉNEZ

Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

JOHAN PANSU

Princeton University
Princeton, Estados Unidos de América

ANDREA PAZ

City University of New York
Nueva York, Estados Unidos de América

PAULO C. PULGARÍN-R

Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

LIZETTE I. QUAN-YOUNG

Universidad CES
Medellín, Colombia

LORENA QUINTERO

Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas
SINCHI
Bogotá, D. C., Colombia

SILVIA RESTREPO

Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

MANUEL RUIZ-GARCÍA

Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D. C., Colombia

JUAN ARMANDO SÁNCHEZ

Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

SANDRA URIBE

Universidad Nacional de Colombia
Medellín, Colombia

NATALIA VARGAS ESTUPIÑÁN

Universidad de los Andes
Bogotá, D. C., Colombia

MARIO VARGAS-RAMÍREZ

Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D. C., Colombia

AÍDA M. VASCO-PALACIOS

Tecnológico de Antioquia – Institución Universitaria
Fundación Biodiversa Colombia
Medellín, Colombia

RESUMEN EJECUTIVO

La información genética es una fuente de conocimiento fundamental para la gestión integral de la biodiversidad. Sin embargo, la baja disponibilidad de tejidos biológicos bien recolectados y preservados limita la integración de esta información en la toma de decisiones ambientales en países megadiversos, como Colombia. Aquí se presentan infográficamente las mejores prácticas de recolección de tejidos para una gran variedad de grupos biológicos, ofreciendo alternativas de muestreo que son prácticas bajo diferentes contextos. Cada capítulo es de la autoría de investigadores con experiencia en la recolección de tejidos en sus grupos de estudio y fue revisado científicamente por al menos dos evaluadores externos.

Esta publicación ofrece la instrucción necesaria para recolectar muestras ambientales y de tejidos de plantas, macroalgas, hongos, corales, esponjas, zooplancton, macroinvertebrados acuáticos, crustáceos, moluscos, insectos, peces cartilaginosos, mamíferos acuáticos, peces óseos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos terrestres siguiendo buenas prácticas de marcado, recolección y preservación. En la mayoría de estos grupos se presentan alternativas de muestreo no invasivo a partir de especímenes vivos y muestreo a partir de especímenes recién recolectados o depositados en colecciones biológicas, sin comprometer su integridad.

Este trabajo hace parte de los alcances del programa Colombia BIO y constituye una síntesis de procedimientos útiles en campo y colecciones biológicas que busca incrementar la cantidad y calidad de las colecciones de tejidos y así fomentar la generación de información genética.

EXECUTIVE SUMMARY

Genetic information is a pivotal source of knowledge for the integrated management of biodiversity. However, the limited availability of well-collected and preserved biological tissues prevents its integration in decisions of environmental policy in megadiverse countries such as Colombia. This publication presents through infographics the best practices for collecting tissues from a great variety of biological groups, offering alternative sampling methods that are practical in several situations. Each chapter is developed by researchers with experience in tissue sampling methods for their study groups and was scientifically revised by at least two external reviewers.

This publication supplies necessary instruction for collecting environmental samples and tissue samples from plants, seaweed, fungi, corals, sponges, zooplankton, aquatic macroinvertebrates, crustaceans, mollusks, insects, cartilaginous fishes, aquatic mammals, bony fishes, amphibians, reptiles, birds, and terrestrial mammals using good labeling, collection, and preservation practices. In most cases non-invasive sampling methods for living specimens, as well as for freshly collected and biological collection specimens, are available.

This work is a product of the Colombia BIO program. It represents a synthesis of useful methods for fieldwork and biological collections that seek to increase the quantity and quality of tissue collections and thus encourage the generation of genetic information.

La toma de decisiones para un desarrollo sostenible e integral requiere la incorporación de información biológica en todos sus niveles de expresión: ecosistemas y sus funciones, especies, poblaciones y comunidades organizadas, diversidad genética. En este sentido, la información biológica de escala molecular es clave para dilucidar el comportamiento espacial y temporal de toda la biodiversidad. Por ejemplo, el estudio de la conectividad genética de las poblaciones permite definir unidades de manejo y la caracterización de sus adaptaciones locales conduce a la evaluación de su vulnerabilidad ante el cambio global. Sin duda, la biología molecular ha producido una revolución del conocimiento biológico, esclareciendo las bases del origen de la vida y su diversificación. Así, ahora sabemos que un nemátodo de tan solo 1 mm de longitud es comparable con el ser humano en el número de genes codificantes, que las mitocondrias y cloroplastos fueron en un momento de la evolución bacterias ingeridas que resultaron en la conformación de organismos más complejos y que la flora única de los páramos es producto de una radiación evolutiva del Pleistoceno.

Es asombroso reconocer que el tamaño del organismo no importa cuando se busca hacer uso de la información genética; así, formas de vida microscópicas se vuelven tangibles, cuantificables y comparables en los ejercicios de caracterización genética a partir de muestras ambientales. Las células perdidas al paso de un jaguar o un oso de anteojos también pueden detectarse en estas muestras, al igual que sus dietas. Por eso, esta publicación no solo ofrece técnicas para recolectar tejidos biológicos, también presenta técnicas para preservar muestras ambientales de suelos, heces y aguas con el fin de explorar y monitorear la diversidad de ecosistemas.

Como base de los fascinantes estudios en genética se reconoce el valor de las colecciones de tejidos biológicos, las cuales se pretenden fortalecer con esta publicación. Estos repositorios del patrimonio natural resguardan descubrimientos que, de la mano del constante crecimiento de las técnicas de secuenciación, serán claves para avanzar en el conocimiento de la vida y como fuente de nuestra bioeconomía. En la actualidad son fuente de estudios filogenéticos, filogeográficos y poblacionales, al igual que parte integral del descubrimiento y descripción de nuevas especies. El paso siguiente es establecer una red de colecciones de tejidos fortalecida que propulse la generación de conocimiento de la diversidad genética de nuestro país.

Esta publicación recoge el conocimiento científico y empírico de expertos en diversos grupos biológicos –que transfieren al lector una síntesis de las mejores prácticas para explorar la biodiversidad preservando el potencial de la información genética–, la cual no dudo que se convertirá en un referente en las aulas de biología. Profesionales experimentados y estudiantes encontrarán útiles estas instrucciones para recolectar tejidos en campo y en colecciones biológicas, no sin insistir en el compromiso ético que todos tenemos como exploradores y guardianes de la biodiversidad.

Felicito a los 68 investigadores que contribuyeron con esta iniciativa, con la confianza de que a futuro las colecciones de tejidos deberán salvaguardar no solo el patrimonio genético sino el potencial reproductivo de las células y convertirse en nuevas fuentes de estudio para la conservación efectiva de la biodiversidad.

BRIGITTE BAPTISTE

Directora general, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos
Alexander von Humboldt



Las colecciones de tejidos son depósitos de muestras biológicas que salvaguardan la diversidad genética tomadas de especímenes capturados en campo o depositados en colecciones biológicas. A partir de muestras de músculo, sangre, pelos, heces, hojas, entre otras, es posible extraer ADN y ARN para realizar procedimientos de biología molecular que permitan responder preguntas relevantes en campos tan diversos como biología evolutiva, ecología, conservación, epidemiología, toxicología, agricultura y bioprospección.



Esta publicación ofrece instrucción para muestrear tejidos de buena calidad de diferentes grupos biológicos bajo diversas condiciones como resultado de las investigaciones realizadas por los autores.

Estos métodos fueron evaluados por pares académicos y representan alternativas de muestreo cuya implementación contribuirá a aumentar el inventario de la diversidad genética de las zonas neotropicales.

A partir de una colección de tejidos es posible:

- Cuantificar cambios en los patrones de biodiversidad en el espacio y el tiempo.
- Determinar la estructura y variación genética de poblaciones naturales.
- Inferir las relaciones evolutivas entre especies, géneros y familias.
- Reconstruir la historia biogeográfica de grupos naturales.
- Establecer el código de barras genético de especies.
- Evaluar el efecto de alteraciones del paisaje sobre la biodiversidad.
- Estimar parámetros epidemiológicos de agentes infecciosos.
- Identificar la arquitectura genética de rasgos funcionales.

COLECCIONES DE TEJIDOS REGISTRADAS EN COLOMBIA

Santa Marta

- Museo de Historia Natural Marina de Colombia - INVEMAR

Bucaramanga

- Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander

Medellín

- Museo de Ciencias Naturales de La Salle

Quibdó

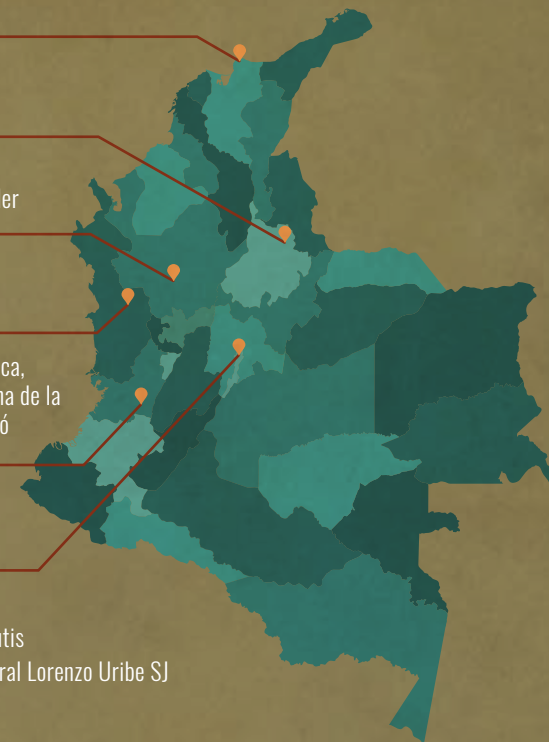
- Colección Teriológica y Ornitológica, Grupo de Fauna Silvestre Chocoana de la Universidad Tecnológica del Chocó

Palmira

- Colección de Tejidos del Instituto Humboldt

Bogotá

- Museo de Historia Natural ANDES
- Jardín Botánico José Celestino Mutis
- Museo Javeriano de Historia Natural Lorenzo Uribe SJ



Antes de depositar una muestra en una colección de tejidos asegúrese de cumplir con los siguientes requisitos:

- Incluir toda la información asociada al espécimen del que se tomó la muestra.
- Contar con muestras de buena calidad siguiendo buenas prácticas de recolección de tejidos.
- Contar con permiso de recolección siguiendo la normatividad legal vigente.
- Asociar la muestra a un ejemplar de museo o voucher digital.



MARCADO

1. Etiquetas de papel pergamino
2. Marcador indeleble
3. Pirograbador o aguja enmangada
4. Lápiz

RECOLECCIÓN

5. Mechero y encendedor
6. Detergente
7. Tijeras de disección
8. Pinzas finas
9. Cuchillas y bisturí de disección
10. Toallas de papel
11. Guantes
12. Hisopos

13. Antibióticos
14. Anestésicos
15. Jeringas y agujas hipodérmicas
16. Papel para almacenar sangre
17. Algodón
18. Palas de jardinería
19. Pipetas
20. Sacabocado
21. Cuchillo
22. Glicerol
23. Medios y caldos de cultivo
24. Cajas de Petri
25. Papel filtro y parafinado
26. Martillo y cincel
27. Mallas

PRESERVACIÓN

28. Buffer de preservación
29. Gel de sílice con indicador de humedad por coloración
30. Tubos (1,5 mL, 15 mL, 50 mL, vacutainers)
31. Sobres de papel poroso
32. Bolsas plásticas con cierre hermético
33. Nevera de icopor o tanque de nitrógeno líquido
34. Agua destilada



MARCADO

Marcar cada muestra con el número de recolección de campo o del catálogo de colección. Este código debe ser el mismo que se consigne en la etiqueta del espécimen, libreta de campo, catálogos de colecciones y bases de datos.

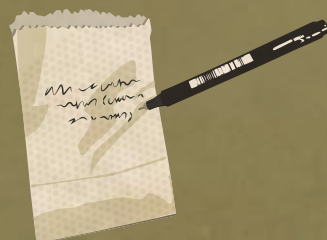
Registrar en la libreta de campo, como mínimo, los siguientes datos de los especímenes muestreados:

Fecha · Localidad geográfica detallada · Coordenadas geográficas y datum · Número de campo · Información taxonómica · Tipo de tejido · Método de conservación · Datos del colector · Colección biológica donde se depositará el espécimen · Detalles relevantes según el grupo taxonómico

Ejemplo:

- 25-01-2017
- Colombia, departamento Antioquia, municipio Amalfi, vereda Las Ánimas
- 6,9091667, -75,0766667, WGS84
- FJT1816
- *Lipagus weberi*
- Músculo cardíaco
- Alcohol 96 %
- Fátima Jiménez Tenorio
- Colección ornitológica IAVH
- Patas color gris

Marcar los tubos en la zona de etiquetado con un pirograbador, punta de tijera o aguja enmangada. Repetir la marca sobre la parte transparente y luego marcarla nuevamente con un marcador indeleble sobre las líneas talladas. En el caso de muestras recolectadas en sobres, marcarlas con un lápiz o marcador indeleble.



RECOLECCIÓN

- Recolectar los especímenes muestreados y depositarlos en una colección biológica registrada. Si no es posible, documentarlos fotográficamente y publicar las imágenes en un repositorio público.
- Evitar afectar partes del espécimen que tengan valor para su identificación taxonómica.
- Esterilizar con fuego, hipoclorito de sodio (2 %) y detergente todos los instrumentos de recolección cada vez que se procese una muestra.
- Recolectar muestras de tejido fresco. Evitar tejidos en descomposición o contaminados con microorganismos o parásitos.
- Evitar poner en contacto las muestras con sustancias de fijación como formol.
- Tomar suficiente tejido (> 0,2 g), si es posible dos muestras, y fragmentarlo en varios pedazos dentro del mismo tubo.
- Si no cuenta con experiencia, absténgase de realizar los procedimientos aquí descritos para muestrear especímenes vivos o de museo sin el acompañamiento de un experto.
- Actúe éticamente al manipular especímenes vivos minimizando su sufrimiento durante el muestreo.
- Evite procesar especímenes de museo cuya manipulación comprometa su integridad.
- Usar guantes. Cambiarlos entre cada punto de recolección de muestras ambientales.





PRESERVACIÓN

Las técnicas de preservación pretenden evitar el daño de las muestras por actividad enzimática y su contaminación y degradación por microorganismos. El procedimiento ideal es congelar las muestras inmediatamente, pero otros métodos de preservación aquí descritos también son efectivos a corto plazo.

Usar un buffer de preservación apropiado para el tipo de muestra y grupo taxonómico. Los hisopos con muestras pueden conservarse refrigerados en un tubo en seco.

TIPOS DE BUFFER

ETANOL
96%

Tipo de muestra: muestras ambientales, macroalgas y animales

Composición: 0,25 M EDTA pH 7,5; 20 % DMSO, NaCl saturado.

Tipo de muestra: animales.

EDTA
DMSO

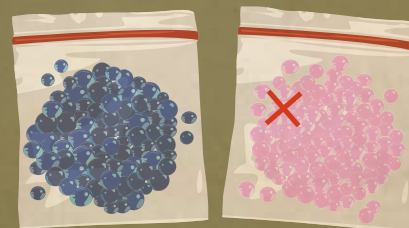
CTAB

Composición: 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2 % CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).
Tipo de muestra: hongos.

Composición: 0,744 % EDTA; 0,735 % sal dihidratada trisódica de citrato de sodio; 70 % sulfato de amonio; pH 5,2 ajustado con H₂SO₄.
Tipo de muestra: animales.

PRESERVACIÓN
DE ÁCIDOS
NUCLEÍCOS

- Usar únicamente material nuevo o esterilizado para almacenar muestras de tejidos.
- Llenar los tubos con buffer de preservación casi hasta el tope de su capacidad y tapar muy bien, cerciorándose de no causar derrames que borren la marca.
- En caso de usar alcohol, cambiarlo en un plazo de 6 a 12 h, evitando borrar la marca. Las muestras de algunos grupos como corales, esponjas y crustáceos pueden requerir más de un cambio.
- Salvaguardar las muestras en condiciones óptimas y verificar su estado durante toda la salida de campo.
- Refrigerar las muestras preservadas en buffer lo más pronto posible por debajo de -20 °C. A largo plazo, preservar los tejidos congelados entre -80 °C y -190 °C.
- Evitar ciclos de congelación y descongelación de las muestras.
- Depositar los tejidos almacenados en sobres de papel dentro de una bolsa plástica con gel de sílice. Doblar bien el borde del sobre de papel o coserlo con un gancho. Los tejidos nunca deben estar en contacto directo con el gel de sílice. Almacenar las muestras en un lugar fresco y seco.
- Usar 10 veces más volumen de gel de sílice que de muestra. Verificar periódicamente que el gel de sílice permanezca seco y reemplazarlo cuando indique que está húmedo.



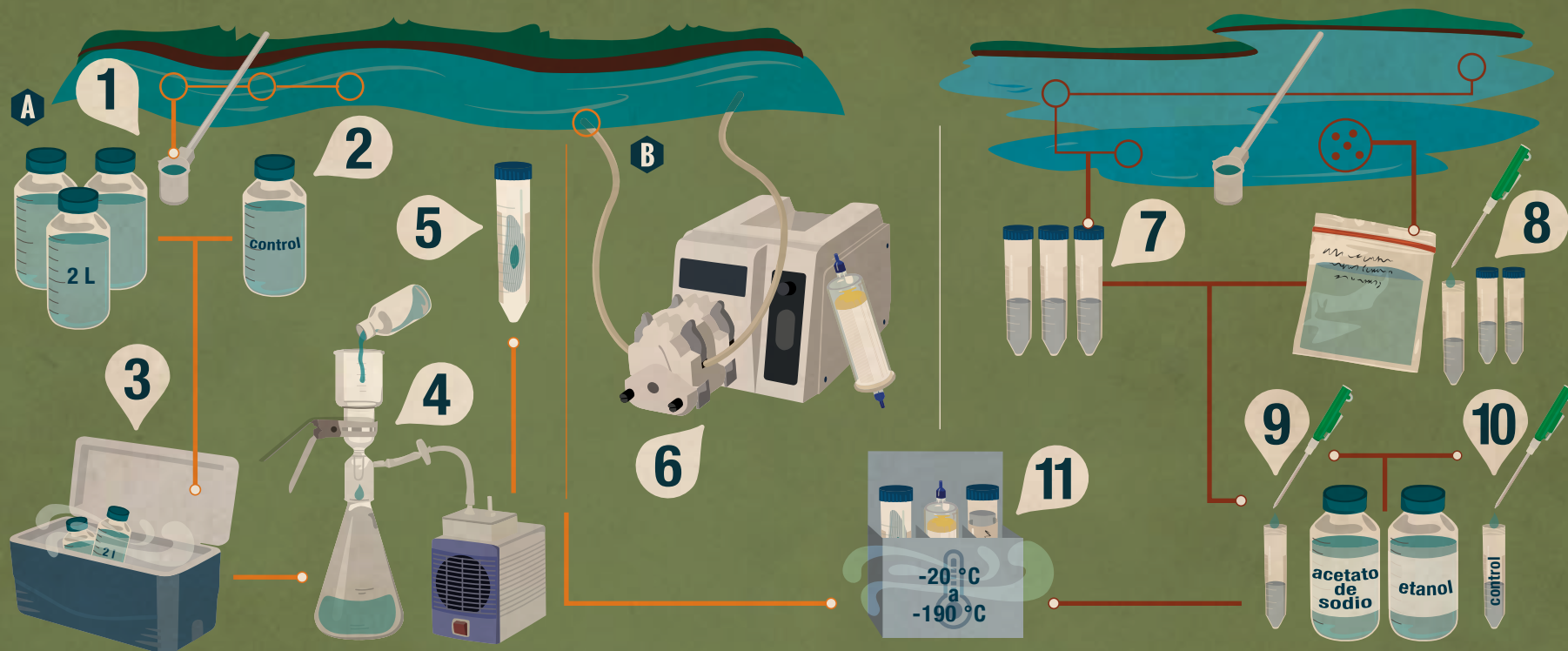


SUELO

1. Retirar la capa de hojarasca y recolectar los primeros 10 cm de suelo con una pala. La hojarasca se puede recolectar independientemente.
2. Depositar la muestra en una bolsa plástica. Las muestras se pueden recolectar por separado o mezclar en una bolsa según el diseño del muestreo.
3. Agitar las muestras hasta homogenizarlas.
4. Transportar las muestras refrigeradas hasta el lugar de procesamiento.
5. Tomar varias submuestras y conservarlas en un sobre de papel dentro de una bolsa plástica con gel de sílice.

EXCREMENTOS

6. Depositar cada muestra de excremento en una bolsa plástica. Si la muestra es muy grande, tomar solo la parte superior evitando tocar el suelo o vegetación.
7. Homogenizar las muestras.
8. Transportar las muestras refrigeradas hasta el lugar de procesamiento.
9. Depositar las muestras en:
 - A. un sobre de papel y conservarlas dentro de una bolsa plástica con gel de sílice.
 - B. un tubo de 50 ml cubiertas con etanol absoluto y almacenarlas refrigeradas entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$.



ECOSISTEMAS LÓTICOS

Método A

1. Tomar al menos tres muestras de agua en botellas de 2 L.
2. Preparar una muestra control con 2 L de agua libre de ADN.
3. Transportar las muestras refrigeradas hasta el lugar de procesamiento.
4. Filtrar al vacío las muestras de agua con filtros de fibra de vidrio de 1,5 μm lo más pronto posible.
5. Depositar los filtros que contienen la muestra en tubos de 50 mL.

Método B

6. Conectar un tubo estéril y una cápsula de filtración a una bomba peristáltica y filtrar hasta 100 L de agua por cada muestra. Tomar mínimo tres muestras por sitio.

ECOSISTEMAS LÉNTICOS

7. **Muestras independientes:** tomar al menos tres muestras de 15 mL de diferentes puntos con un cucharón y depositarlas en tubos de 50 mL.
8. **Muestras compuestas:** mezclar múltiples muestras de más de 15 mL de diferentes puntos en una bolsa plástica y tomar al menos tres submuestras en tubos de 50 mL.
9. Adicionar, inmediatamente, 1,5 mL de acetato de sodio 3M y 33 mL de etanol al 96 % a cada muestra.
10. Realizar una muestra control con 15 mL de agua libre de ADN, 1,5 mL de acetato de sodio 3M y 33 mL de etanol al 96 %.
11. Almacenar las muestras, filtros y cápsulas refrigeradas entre -20 °C y -190 °C.



TEJIDOS FOLIARES

1. Antes de alcoholizar, cortar un par de hojas o folíolos jóvenes que no presenten daños mecánicos o causados por insectos, hongos o exposición al sol. En epífitas o especímenes con hojas muy suculentas o sin hojas, tomar muestras de flores.
2. Rasgar 10 cm² de lámina foliar en trozos pequeños sin incluir nervaduras. Raspar previamente las hojas que tengan muchos tricomas. Rasgar en trozos muy pequeños las hojas suculentas.

TRONCO LEÑOSO

3. Retirar una porción de la corteza e introducir en el tronco un sacabocado de 1 cm con un martillo hasta alcanzar el corazón de la madera.
4. Retirar la lámina de cambium –tejido húmedo y usualmente colorado– con una navaja.

5. Introducir el tejido en un sobre poroso o bolsas de papel libre de ácido y depositarlo dentro de una bolsa plástica resellable o un tubo con tapa de rosca que contenga 10 veces más gel de sílice que muestra.
6. Verificar constantemente que el gel de sílice permanezca seco y sin hongos.
7. Almacenar las muestras en un lugar seco y oscuro a temperatura ambiente o refrigeradas entre -20 °C y -190 °C.

ESPÉCIMEN DE HERBARIO

8. Tomar el material foliar desprendido de los sobres que contienen algunas fichas de herbario. Si no lo hay, cortar 1 cm² de material foliar evitando dañar el ápice y la base de la hoja.



TOMA DE MUESTRAS

- 1. Clonales:** tomar fragmentos que incluyan porciones erectas y postradas en algas que midan más de 2 cm con una navaja. En algas de menor tamaño o filamentosas, tomar varios filamentos que incluyan estructuras de fijación.
- 2. No clonales:** tomar todo el talo, procurando recolectar estructuras de fijación como rizomas, rizoides o hapterios. En lo posible, incluir estructuras reproductivas.
3. Transportar la muestra al sitio de procesamiento en una bolsa con agua de mar.
4. Lavar la muestra con agua destilada y secar con papel toalla.
5. Depositar la muestra en una bolsa plástica con gel de sílice.

PRESERVACIÓN DE TEJIDOS

6. Transferir la muestra a un tubo con etanol al 96 %.
7. Para conservar:
 - A. ADN:** almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - B. Células, estructuras reproductivas y tejidos vegetativos:** almacenar a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por lo menos 1,5 h y luego transferir a un tanque con nitrógeno líquido.
 - C. Voucher:** herborizar el tejido o almacenarlo en formol al 4 % en agua de mar. Agregar unas gotas de glicerina para conservar la coloración y depositarlo en un lugar seco y fresco.



LEVADURAS

1. Tomar una colonia previamente aislada y purificada en PDA y suspenderla en 10 mL de PDB o cualquier medio nutritivo.
2. Cultivar en agitación hasta que el cultivo esté turbio. La turbidez recomendada es la ajustada al patrón 2,0 de McFarland.
3. Agregar glicerol hasta una concentración final de 20 % o DMS hasta alcanzar 10 %, luego alicuotar en viales de vidrio.
4. Liofilizar y almacenar a temperatura ambiente o refrigerado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

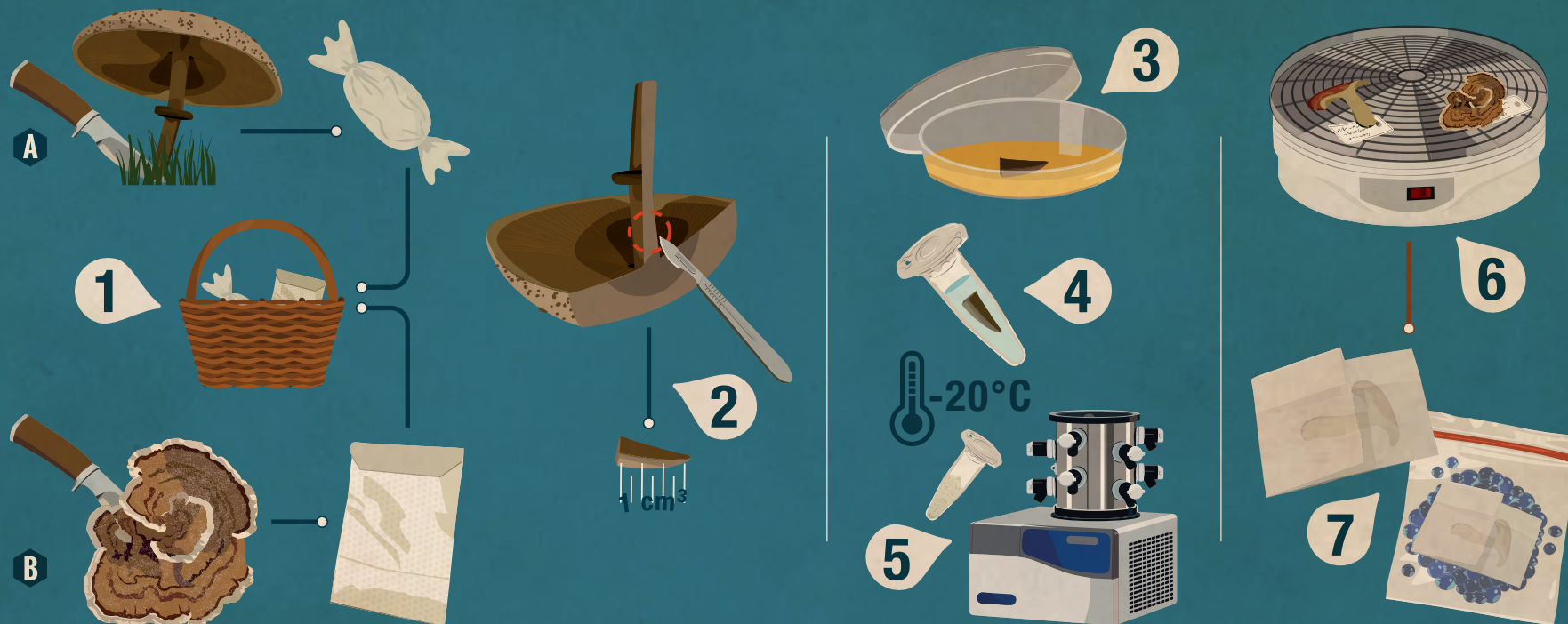
FILAMENTOSOS

5. Tomar una muestra de una colonia pura con un asa recta estéril y sembrarla por punción en medio PDA cubierto con un papel filtro.
6. Incubar la caja en condiciones ambientales similares a las del sitio de aislamiento hasta obtener crecimiento abundante sobre el papel filtro.

7. Retirar el papel filtro y deshidratarlo a temperatura ambiente en una caja de Petri.
8. Recortar el papel filtro en fragmentos pequeños y almacenarlos en crioviales de plástico a temperatura ambiente o refrigerados $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ACUÁTICOS

9. Cortar un fragmento de micelio cultivado en cebos con agua destilada.
10. Transferir la muestra a una caja de Petri con agua destilada, adicionar tres cebos esterilizados e incubar a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una semana o hasta observar crecimiento. Utilizar el mismo tipo de cebo del que se aisló.
11. Transferir los cebos con crecimiento fúngico a tubos de vidrio con agua destilada y almacenar en oscuridad a temperatura ambiente. Realizar pases periódicos a nuevos cebos si se prolonga su almacenamiento.



TOMA DE MUESTRAS

1. Recolectar los cuerpos fructíferos completos del sustrato con una navaja o cuchillo y trasladarlos al laboratorio o lugar de manipulación en una canasta envueltos en:

A. Cuerpo fructífero carnoso: papel parafinado.

B. Cuerpo fructífero duro o leñoso: sobres de papel.

2. Cortar un fragmento de 1 cm³ del contexto, parte interna del píleo o estípite del cuerpo fructífero.

CONSERVACIÓN DE TEJIDO

3. **Cultivo axénico:** sembrar la muestra en una caja de Petri con agar malta o PDA suplementado con cloranfenicol e incubar a temperatura ambiente.

4. **En líquido:** depositar la muestra en un tubo y almacenar cubierta con buffer CTAB a -20 °C.
5. **Liofilización:** liofilizar la muestra en tubos de 50 mL y almacenar a temperatura ambiente o refrigerada a -20 °C.

PRESERVACIÓN DE VOUCHER

6. Secar el cuerpo fructífero en un deshidratador a menos de 50 °C en gel de sílice o exponiéndolo al sol. Si el espécimen es muy grande, cortarlo longitudinalmente por la mitad antes de deshidratarlo.
7. Almacenar el voucher en un sobre de papel seda dentro de una bolsa plástica con gel de sílice. Verificar constantemente que el gel de sílice permanezca seco.



BUCEO SCUBA

1. Depositar la muestra en una bolsa resellable con agua de mar y mantenerla a la sombra.

PESCA DE BOTE

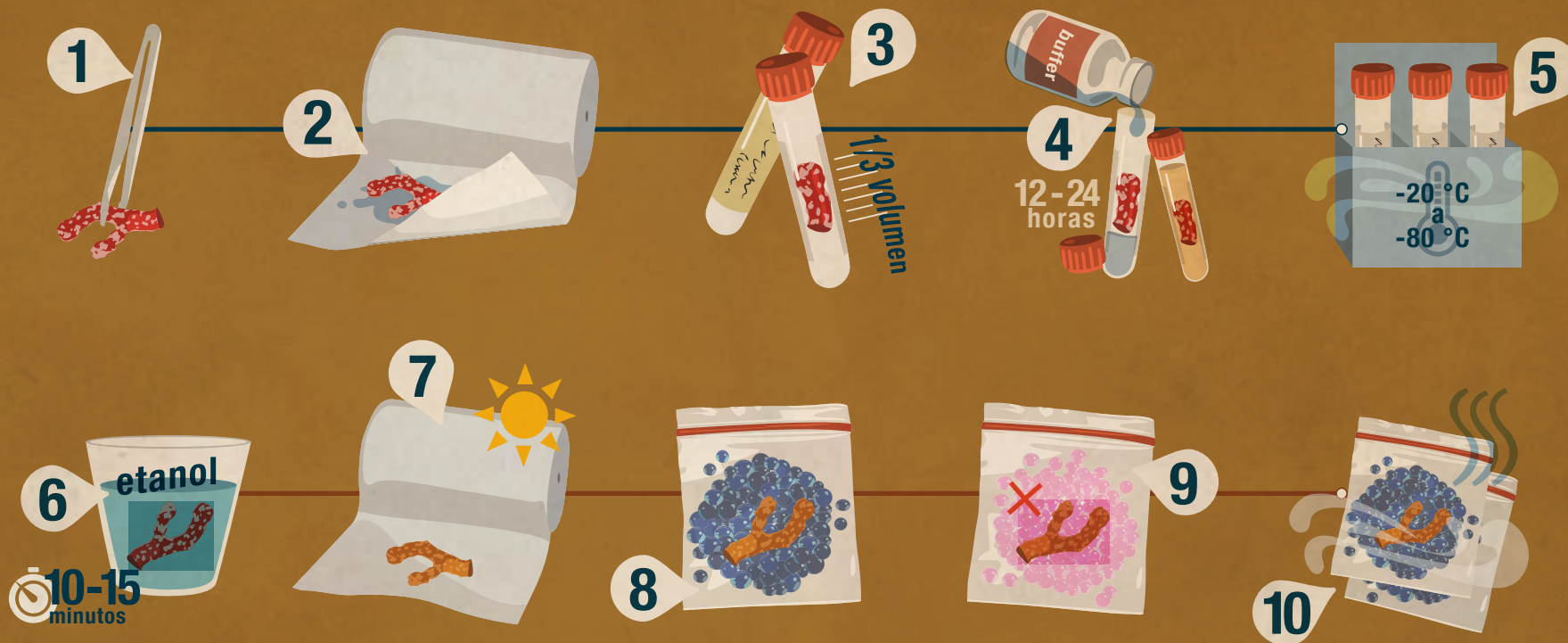
2. En superficie, depositar inmediatamente las muestras en:
 - A. Una nevera con hielo, hielo seco o un contenedor con nitrógeno líquido.
 - B. Un balde con agua de mar, a la sombra y en un lugar fresco. Cambiar el agua periódicamente (2-3 h) hasta que se puedan procesar las muestras. Cambiar con mayor frecuencia si se enturbia.

ESPÉCIMEN DE MUSEO

3. Insertar el tejido en un tubo y cubrirlo completamente con el mismo buffer de la muestra original o mantenerlo en seco según el tipo de preservación.

TOMA DE MUESTRAS

4. **Colonias:** tomar un fragmento de tejido interno de 2-3 cm³:
 - A. **Ramificadas:** con tijeras de jardinería o cortafrío.
 - B. **Masivas:** con descorazonador o martillo y cincel.
 - C. **Carnosas:** con escalpelo o cuchillo de buceo.
5. **No clonales:** tomar todo el individuo, en el caso de medusas pequeñas e individuos de un único pólipo. En medusas grandes es posible tomar algunos tentáculos o la campana.

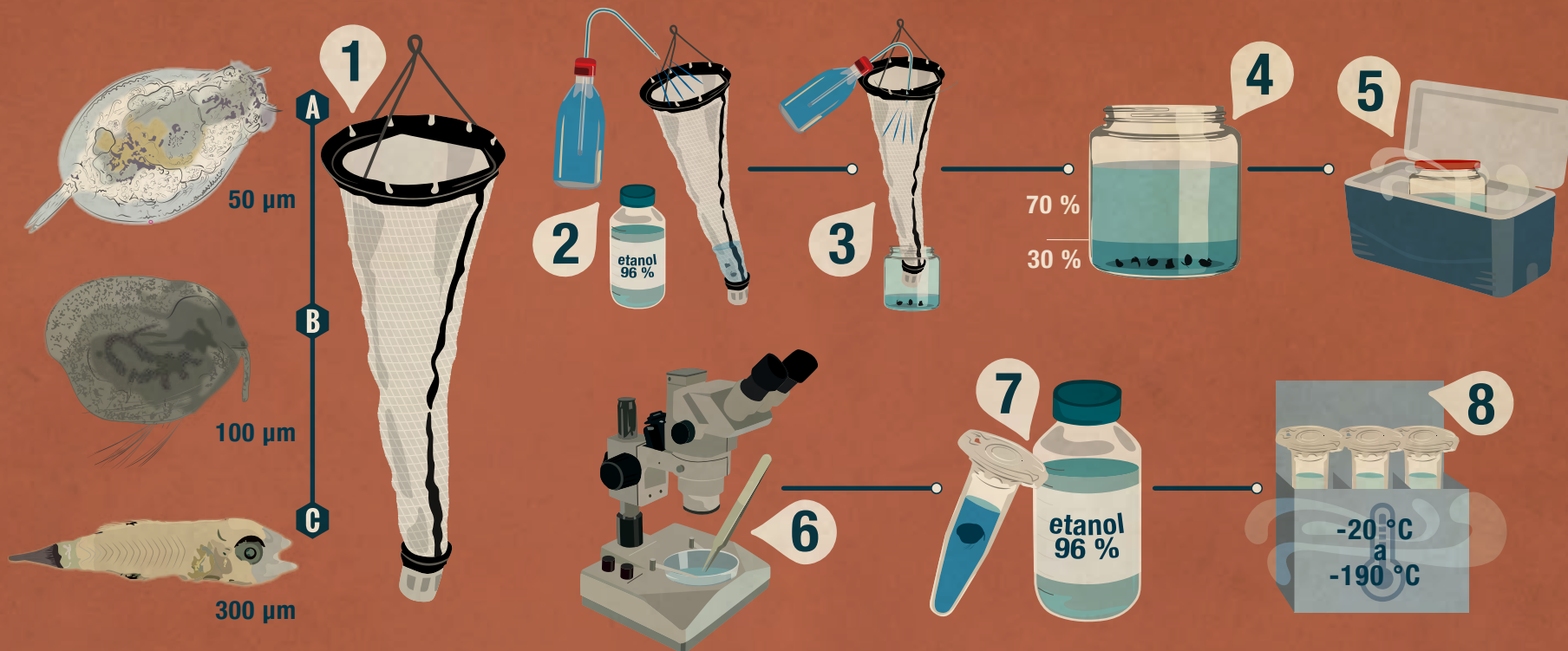


PRESERVACIÓN DE TEJIDOS

1. Extraer de la bolsa o recipiente el tejido a preservar con una pinza no aserrada.
2. Secar el exceso de humedad o mucosidad con un paño absorbente limpio.
3. Insertar un fragmento de máximo 1/3 del volumen del tubo y 2 cm de grosor para asegurar que el buffer penetre el tejido.
4. Adicionar el buffer de preservación hasta cubrir el tejido y cambiarlo de 12 a 24 h después. Si el buffer sigue extrayendo pigmentos de la muestra, hacer un cambio adicional.
5. Almacenar las muestras refrigeradas entre -20 °C y -80 °C.

PRESERVACIÓN DEL VOUCHER

6. Sumergir el tejido en etanol al 96 % de 10 a 15 minutos.
7. Secar el tejido a temperatura ambiente bajo el sol hasta que cambie de color.
8. Insertar el tejido en una bolsa resellable y agregar gel de sílice.
9. Cambiar periódicamente el gel de sílice hasta que no haya humedad.
10. Almacenar las bolsas en un lugar seco y fresco.



RECOLECCIÓN Y PRESERVACIÓN

1. Filtrar el agua de los sitios de muestreo con una malla de:

A. Rotíferos: 50 µm.

B. Microcrustáceos y otros grupos (< 2 mm): 100 µm.

C. Ictioplancton, crustáceos mayores y algunos insectos (> 2 mm): 300 µm.

2. Adicionar a la malla etanol al 96 % con una piseta hasta retirar todo el agua.

3. Vaciar en un frasco la muestra que quedó en la malla utilizando la misma piseta con etanol.

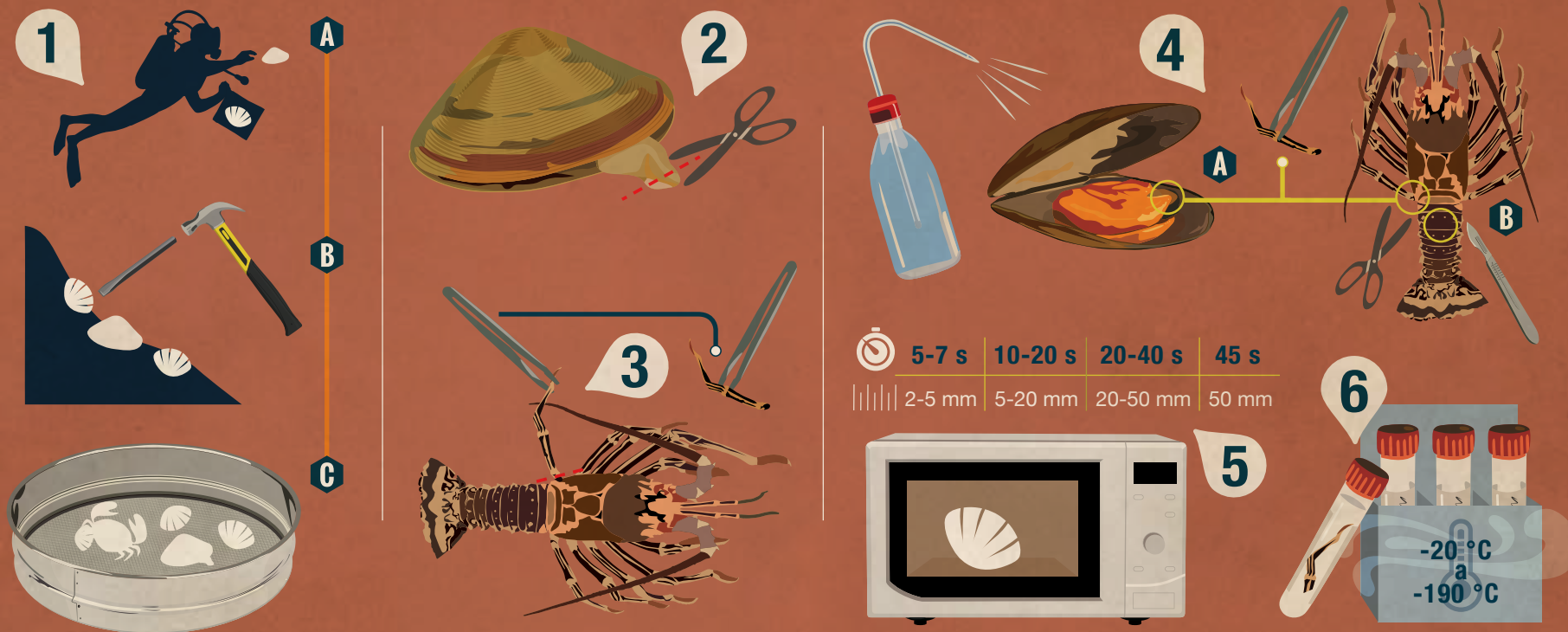
4. Adicionar etanol al 96 % al frasco hasta ajustar 70 % etanol y 30 % muestra.

5. Depositar la muestra en una nevera con hielo en campo lo más pronto posible y en el laboratorio almacenarla refrigerada entre -20 °C y -190 °C.

6. Separar la muestra con un microscopio esteroscópico.

7. Depositar cada espécimen en un tubo de microcentrifuga y cubrir con etanol al 96 %. En el caso de rotíferos, se pueden depositar hasta cinco especímenes idénticos en el mismo tubo.

8. Almacenar las muestras refrigeradas entre -20 °C y -190 °C.



RECOLECCIÓN

- Tomar el espécimen:
 - Directamente en la superficie de playas y manglares o mediante buceo en arrecifes y sitios profundos.
 - Desprendiéndolo con cincel en litoral rocoso.
 - Pasando los sedimentos obtenidos, mediante dragado o arrastre, por un tamiz de 0,3–1,0 mm.

ESPÉCIMEN VIVO

- Moluscos:** cortar un fragmento del pie del molusco con tijeras o bisturí sin comprometer su viabilidad.
- Crustáceos:** doblar una extremidad en la base de la coxa con pinzas para que se autoampute.

ESPÉCIMEN DE MUSEO

- Lavar el espécimen con agua destilada en abundancia y extraer:
 - Moluscos:** una porción del pie o masa bucal. Algunos bivalvos y gasterópodos hay que extraerlos de la concha o abrirles las valvas.
 - Crustáceos:** una extremidad o porción de tejido muscular del abdomen sin tocar el sistema digestivo. Para camarones y langosta, extraer el tejido del abdomen a la altura de la segunda pleura.
- Si es difícil acceder al tejido, calentar el material en un microondas:
 - 5-7 s si mide 2-5 mm. 10-20 s si mide 5-20 mm.
 - 20-40 s si mide 20-50 mm. 45 s o más si mide más de 50 mm.
- Remover los fragmentos de exoesqueleto y almacenar el tejido en un tubo con buffer refrigerado entre -20 °C y -190 °C.



ESPÉCIMEN VIVO

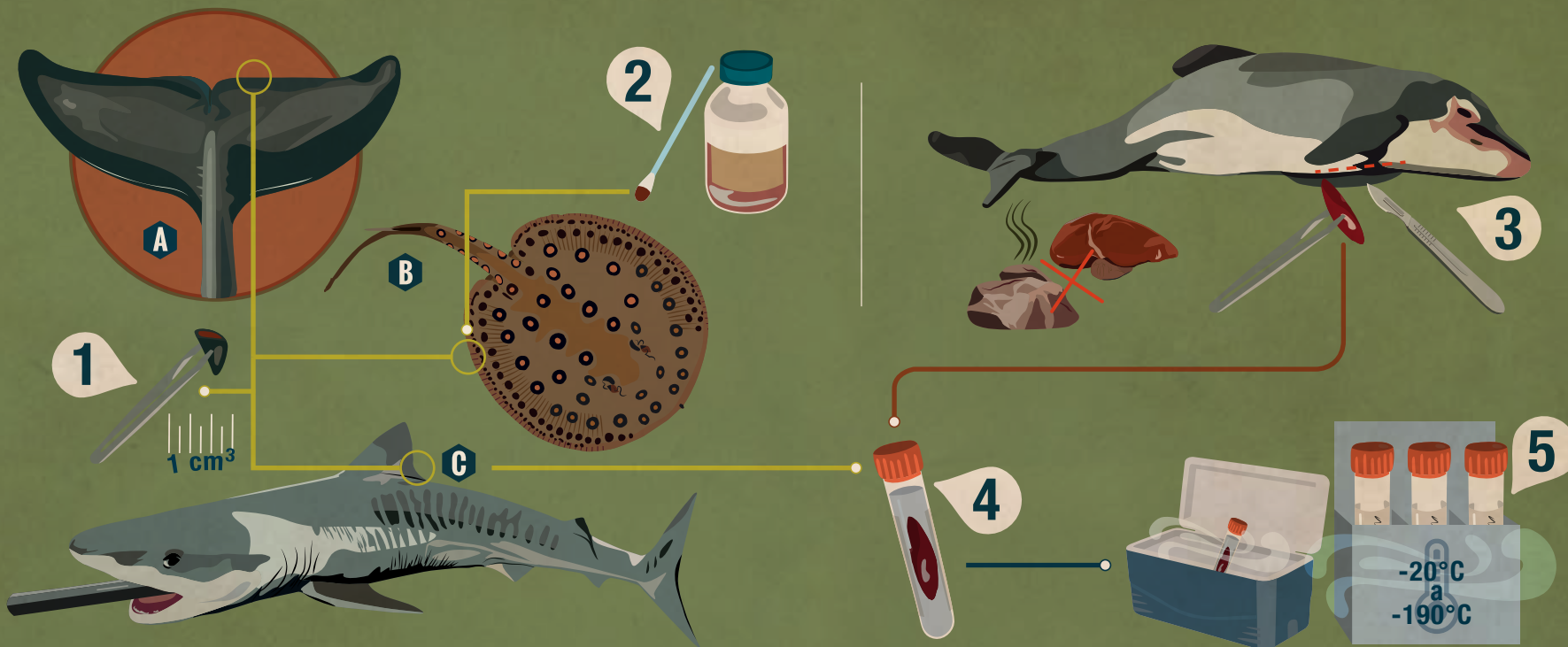
1. Capturar individuos adultos mediante búsqueda activa o empleando atrayentes.
2. Tomar una porción o pata completa con pinzas de punta fina y liberar al individuo lo más pronto posible. Usar este método solo con especies de gran tamaño, con taxonomía bien conocida e identificados por un experto en campo.

ESPÉCIMEN MUERTO

3. Sacrificar los especímenes mediante las técnicas establecidas para cada grupo taxonómico, como compresión del tórax o depósito directo en etanol o isopropanol absoluto, y transportarlos refrigerados al laboratorio para su determinación taxonómica.

ESPÉCIMEN DE MUSEO

4. Colocar los especímenes conservados en etanol o isopropanol sobre papel absorbente.
5. Usando estereomicroscopio, tomar:
 - A. **Especímenes grandes:** una o dos patas con pinzas de punta fina. Retirar la pata completa desde la coxa para obtener la mayor cantidad de músculo.
 - B. **Especímenes pequeños y larvas:** segmentos torácicos y abdominales con pinzas de punta fina y tijeras de disección.
 - C. **Especímenes fuertemente esclerotizados:** pequeñas secciones del tórax con pinzas de punta fina y bisturí.
6. Depositar las muestras de tejido en un tubo en seco o con etanol al 96 %.
7. Almacenar las muestras refrigeradas entre -20 °C y -190 °C.

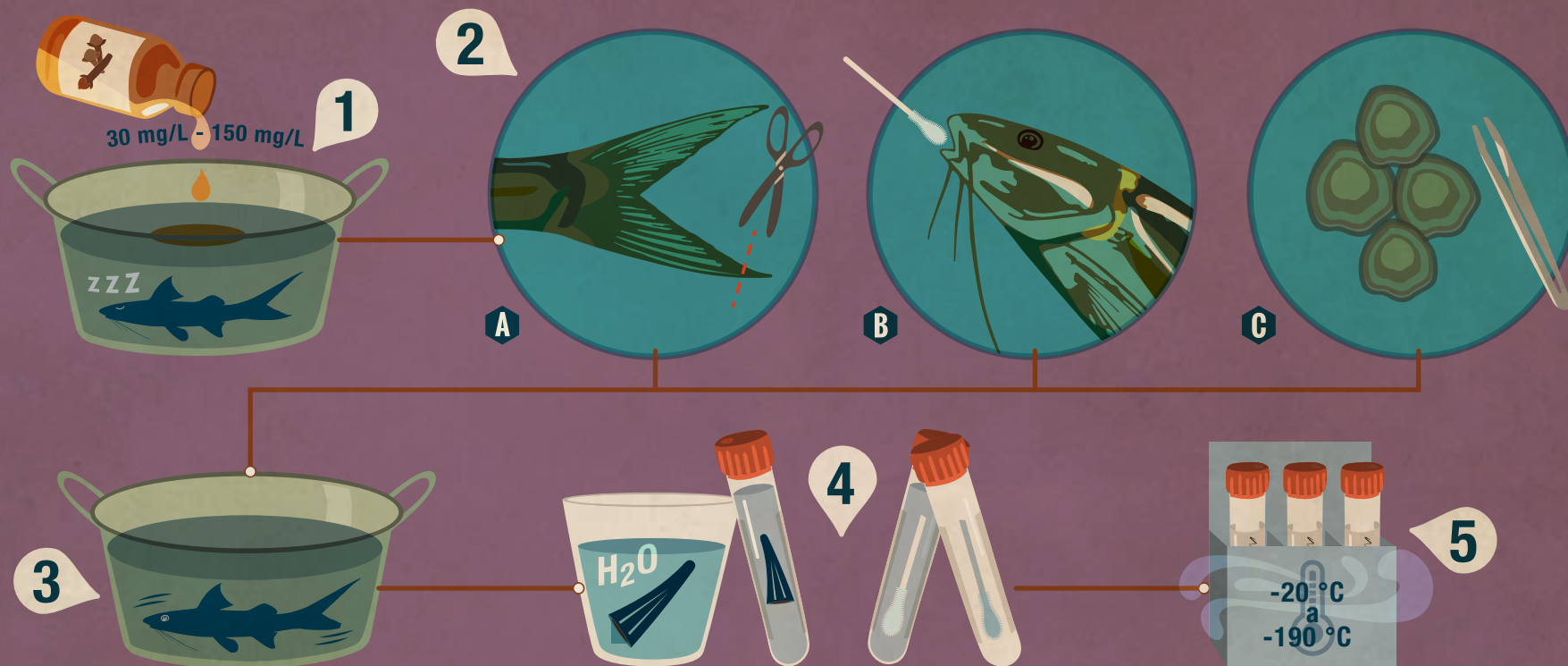


ESPÉCIMEN VIVO

1. Cortar un fragmento de 1 cm³ de piel con un poco de grasa de:
 - A. Mamíferos acuáticos:** el margen de la aleta caudal o la base de la aleta dorsal.
 - B. Rayas:** el borde del disco o la punta de la cola.
 - C. Tiburones:** la base de la aleta dorsal o el margen de la aleta caudal.
2. Aplicar solución antiséptica de yodo en la zona de corte para evitar infecciones.

ESPÉCIMEN MUERTO

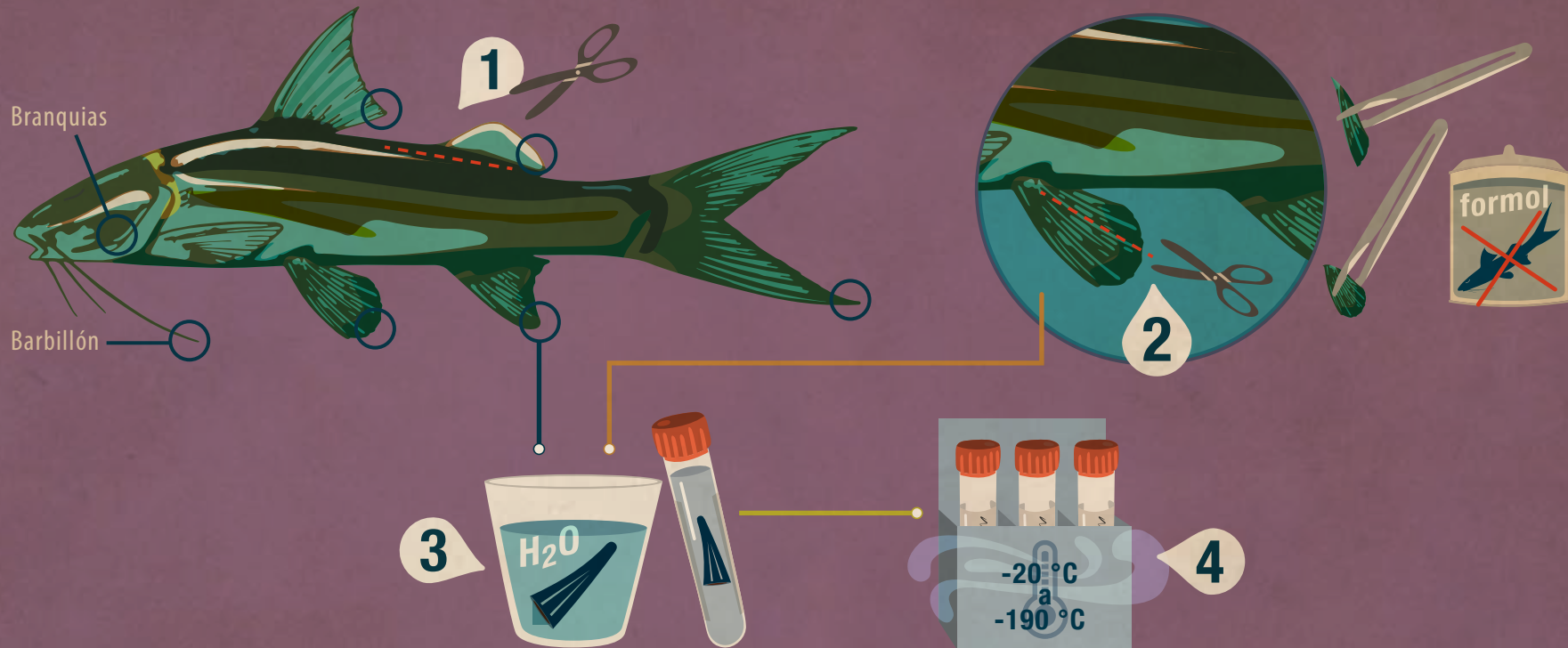
3. En especímenes varados o capturados accidentalmente, tomar un fragmento de 1 cm³ de las zonas señaladas en el paso 1 que presenten menor descomposición. Si se realiza autopsia, tomar tejido cardíaco evitando tomar muestras de hígado porque se degradan rápidamente.
4. Depositar la muestra en un tubo y cubrirla con etanol al 96 %.
5. Almacenar las muestras refrigeradas entre -20 y -190 °C. En campo, conservar las muestras en una nevera con hielo o hielo seco.



RECOLECCIÓN

1. Anestesiarse al espécimen con aceite de clavo (*Sygium aromaticum* o *Eugenia aromatica*, 30-150 mg/L dependiendo de su tamaño) o MS-222 (*Tricaina metanosulfonato*) en un balde con agua de su hábitat.
2. Tomar la muestra en el menor tiempo posible.
 - A. **Aleta:** cortando un fragmento del borde de la aleta caudal.
 - B. **Frotis bucal:** frotando cuidadosamente por cinco segundos la lengua y mejillas del pez con un hisopo sin dañar las branquias.
 - C. **Escamas:** arrancando entre 5 y 6 escamas.

3. Sumergir al individuo en un balde con agua del hábitat sin anestésico para su recuperación y liberación.
4. Lavar con agua destilada los fragmentos de aleta y depositarlos en un tubo con buffer o depositar directamente el hisopo en un tubo con buffer. Algunos hisopos vienen con su propio tubo de almacenamiento y no requieren buffer.
5. Refrigerar las muestras entre -20 °C y -190 °C.



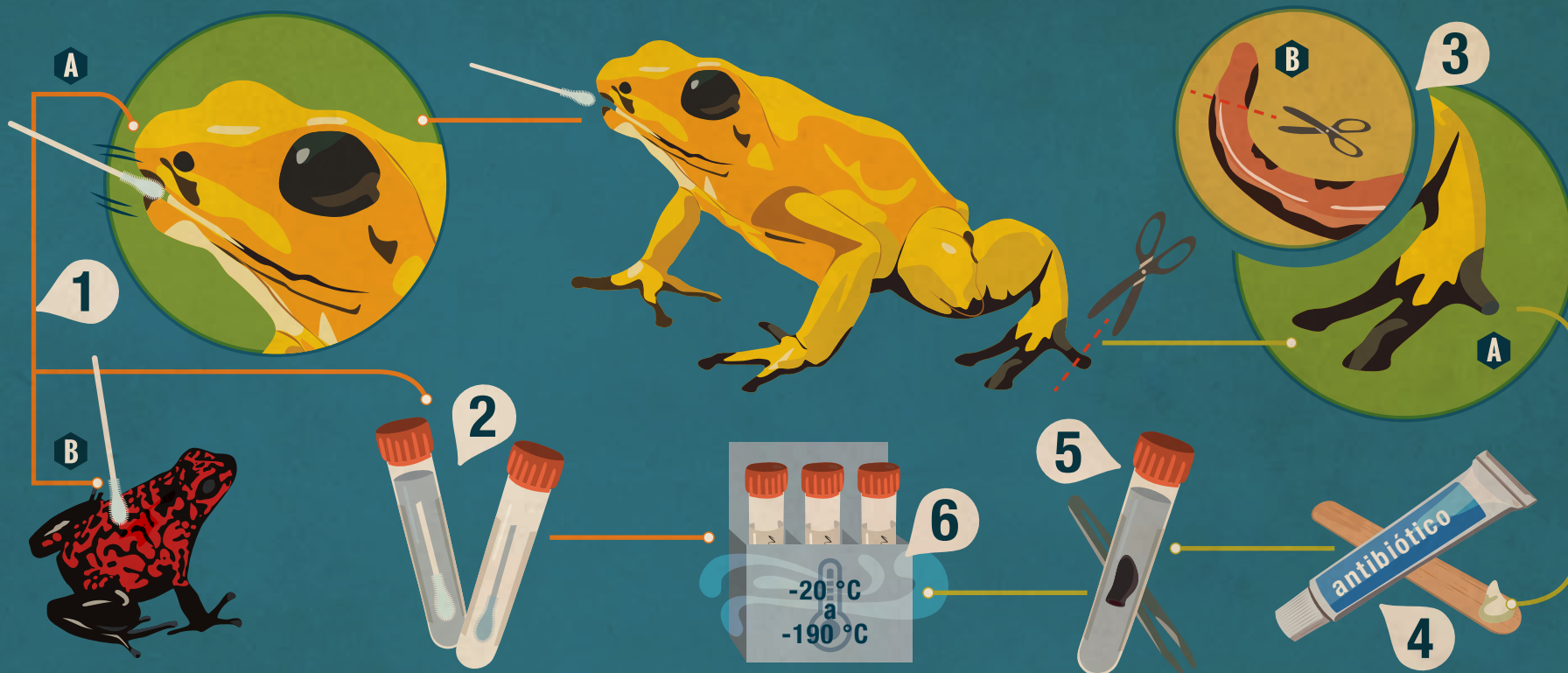
ESPÉCIMEN RECIÉN RECOLECTADO

1. Cortar un fragmento de músculo de 5 mm³, aletas, branquias o barbillones.

2. ESPÉCIMEN DE MUSEO

Cortar un fragmento de la aleta pélvica derecha: dos o tres radios en peces grandes o toda la aleta en peces pequeños. No usar muestras conservadas en formol.

3. Lavar con agua destilada los fragmentos de aleta y depositarlos en un tubo con buffer.
4. Refrigerar las muestras lo más pronto posible entre -20 °C y -190 °C.



FROTIS CON HISOPO

1. Frotar varias veces con un hisopo:
 - A. El interior de la boca, de arriba hacia abajo.
 - B. La piel dorsal o ventral, evitando tocar suciedades.
2. Introducir el hisopo en un tubo con o sin buffer, preferiblemente en seco.

CORTE DE EXTREMIDAD

3. Cortar con tijeras:
 - A. **Anuros:** el disco dactilar del dedo exterior de las patas traseras; dos en especímenes pequeños. Evitar cortar el dedo más largo.
 - B. **Salamandras:** la punta de la cola.
4. Untar antibiótico cremoso en la herida para evitar que se infecte.
5. Tomar el tejido con pinzas y depositarlo en un tubo con buffer.
6. Almacenar las muestras refrigeradas entre -20 °C y -190 °C .

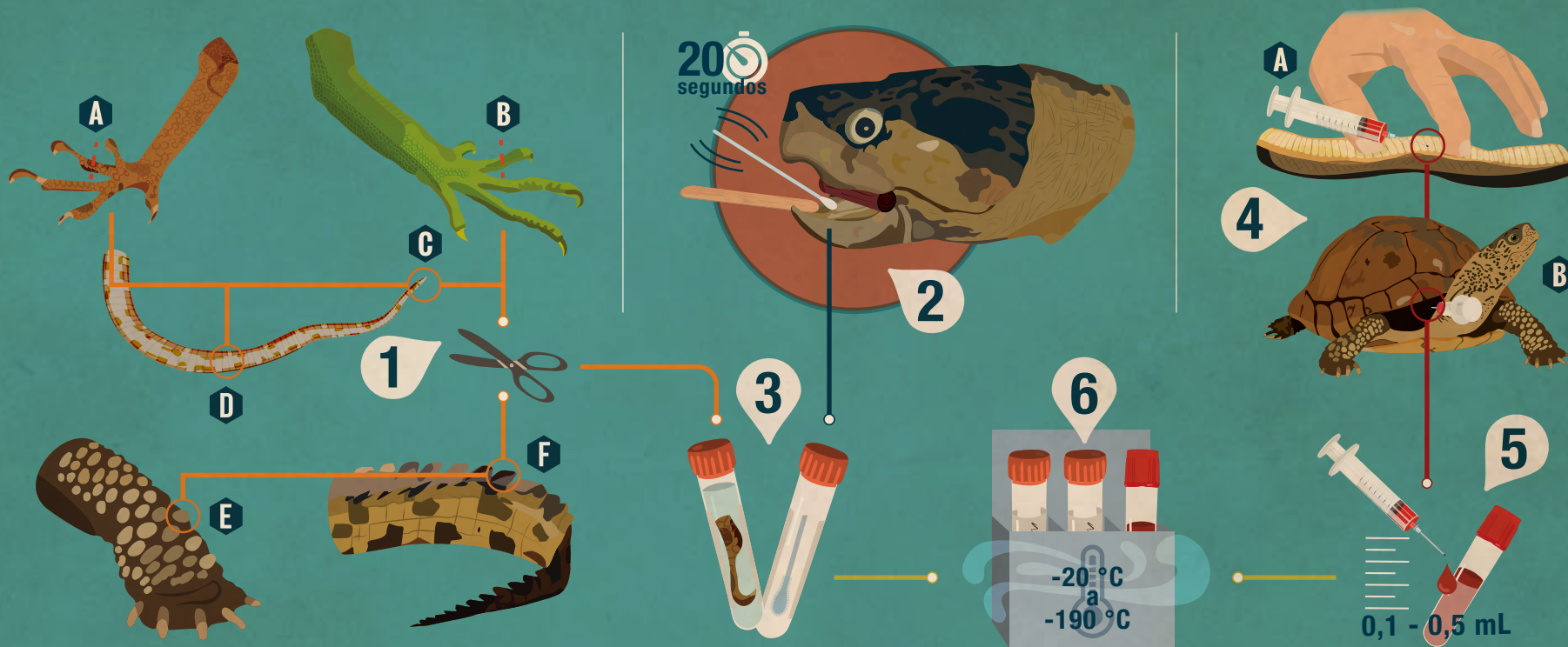


EUTANASIA

- Método A:** untar anestesia tópica dentro de la boca o en la superficie ventral con un bajalenguas y depositar el espécimen de nuevo en su bolsa con el vientre hacia arriba.
- Método B:** introducir el espécimen en un recipiente con una solución de alcohol al 10 % o hidrocloreto de benzocaína >250 mg/L y tapan. Asegurarse de que permanezca nadando y no adherido a la pared del recipiente.
- Verificar que el espécimen haya muerto observando cuidadosamente el cese de latidos en el pecho.

TOMA DE MUESTRA

- Poner el individuo sobre su espalda en una superficie limpia.
- Método A:** realizar una incisión en el costado izquierdo y extraer la mayor porción de hígado posible. Evitar cortar por el centro y romper la vesícula biliar. Este es el método más recomendado.
- Método B:** tomar tejido muscular del muslo de la pata trasera izquierda.
- Método C:** cortar un fragmento de la pata trasera izquierda por debajo de la rodilla. Cortarla por encima de la rodilla si el espécimen es muy pequeño.
- Depositar el tejido en un tubo con buffer y almacenarlo refrigerado entre -20 °C y -190 °C.



CORTE DE FALANGES, COLA Y ESCAMAS

1. Cortar con una tijera:

- A. Lagartos pequeños:** dos falanges a la altura de la articulación de dos dedos diferentes, uno de extremidad anterior y otro de extremidad posterior. Evitar cortar el primer y quinto dedo.
- B. Lagartos grandes:** 1-2 falanges de un mismo dedo de extremidades anteriores a la altura de la articulación. Evitar cortar el primer y quinto dedo.
- C. Serpientes pequeñas y lagartos:** 1-2 mm de porción terminal de la cola.
- D. Serpientes grandes:** porciones (>0,5 cm²) de escamas ventrales.
- E. Tortugas:** porciones (>0,3 cm²) de escamas de las extremidades.
- F. Cocodrilos y caimanes:** una porción (>0,5 cm²) de una escama caudal que incluya tejido.

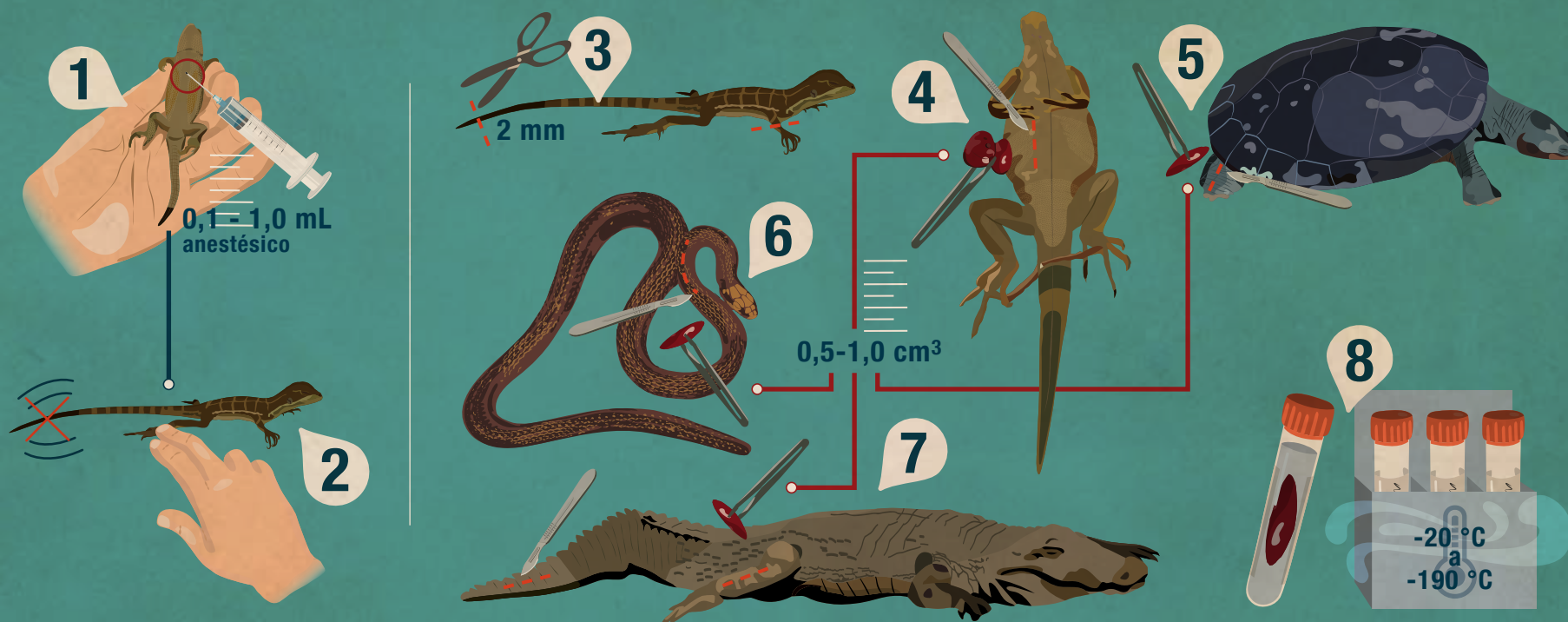
RASPADO BUCAL Y CLOACAL

2. Abrir la boca de tortugas, serpientes no venenosas y lagartos grandes con bajalenguas, introducir un palo de madera para mantenerla abierta y raspar las partes blandas de la cavidad bucal o cloaca con un hisopo por 20 s.

3. Depositar las muestras en un tubo con buffer.

SANGRE

4. Introducir aguja hipodérmica de calibre acorde al tamaño del espécimen:
- A. Serpientes:** 1-2 mm hasta antes de tocar las vértebras caudales, entre los escudos ventrales a 5-10 cm de la punta de la cola.
- B. Tortugas:** en el seno venoso, ubicado en la línea media de la porción posterior del primer escudo del caparazón.
5. Extraer 0,1-0,5 mL de sangre y depositarla en un tubo con ocho veces más buffer.
6. Almacenar las muestras refrigeradas entre -20 °C y -190 °C.



EUTANASIA

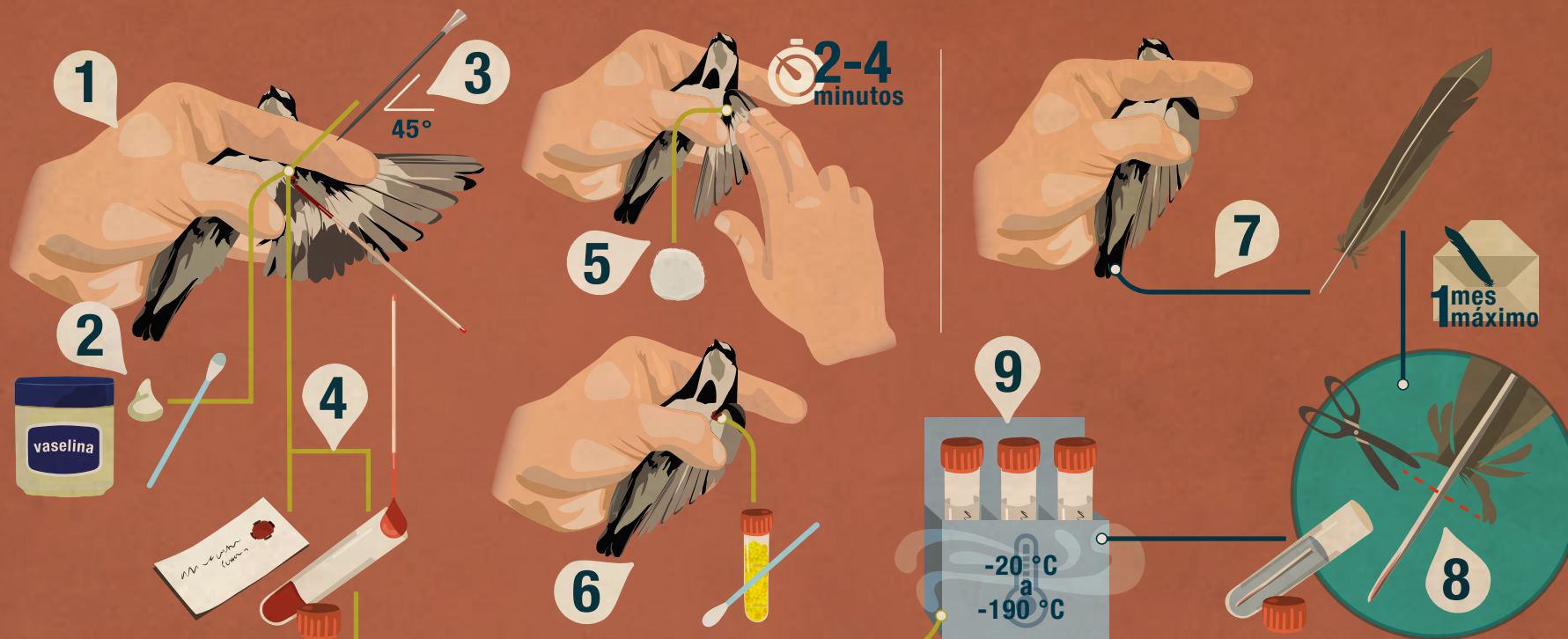
1. Inyectar 0,1-1,0 mL de anestésico, como procaína, nembutal o roxicaima, en el corazón, cavidad celómica o directamente en el cerebro. Inyectar más volumen en especímenes muy grandes. En serpientes y lagartos, localizar el corazón masajeando con el dedo pulgar la parte ventral en el primer tercio del espécimen y presionarlo hasta que no se desplace más.
2. Confirmar que el espécimen haya muerto presionando uno de sus miembros o cola y verificando que no se mueva.

TOMA DE MUESTRAS

3. **Lagartos pequeños:** cortar 2 mm de la porción terminal de la cola o una de las extremidades anteriores completas.

4. **Lagartos grandes:** realizar una incisión en la parte lateral izquierda en vista ventral del espécimen y extraer 0,5-1,0 cm³ de hígado u otro tejido muscular.
5. **Tortugas:** cortar 0,5-1,0 cm³ de tejido muscular de alguno de los miembros posteriores.
6. **Serpientes:** hacer un corte lateral a la altura del corazón y extraer 0,5-1,0 cm³ de músculo cardíaco u otro tejido muscular.
7. **Cocodrilos y caimanes:** cortar 0,5-1,0 cm³ de tejido muscular de la cola o alguno de los miembros posteriores.

8. Depositar las muestras en un tubo con buffer y almacenarlas refrigeradas entre -20 °C y -190 °C.



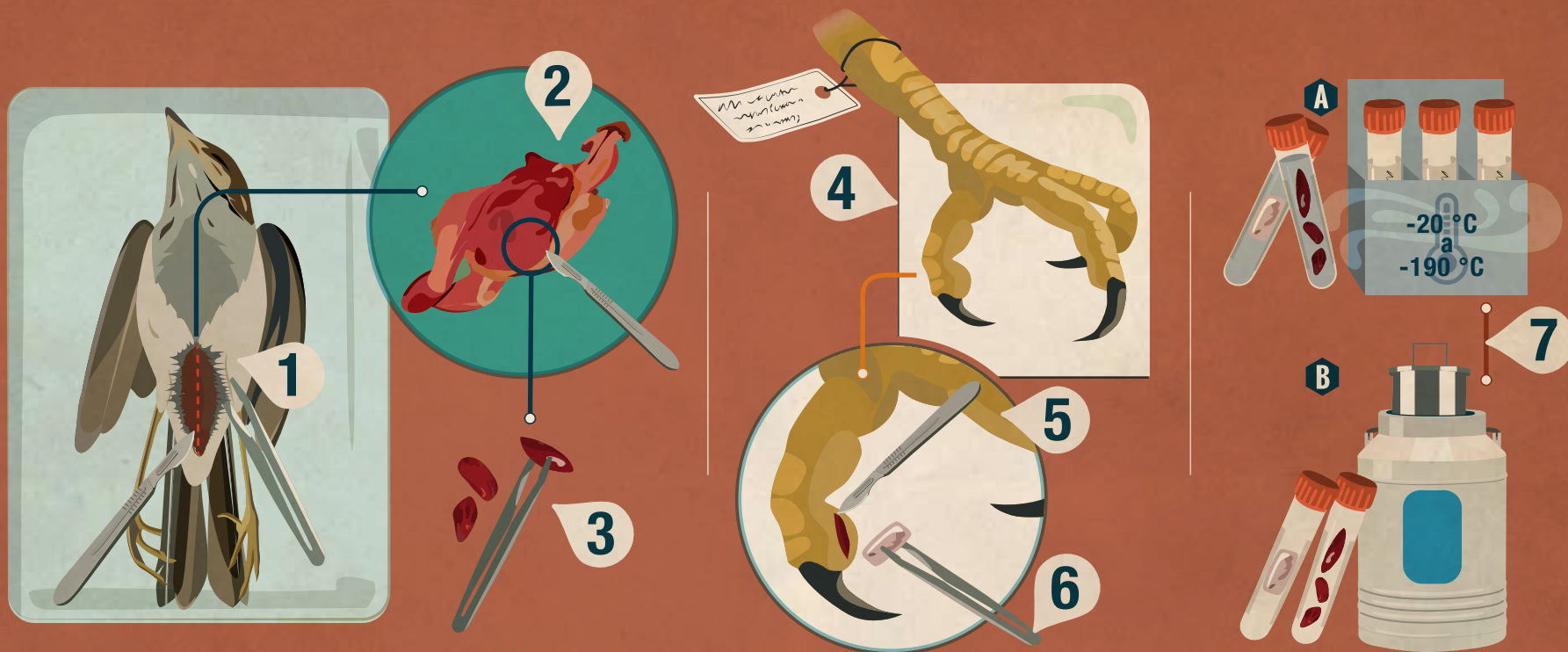
SANGRE

1. Sujetar el espécimen con la mano y extender una de las alas completamente.
2. Despejar el área de la vena braquial utilizando un hisopo con etanol y posteriormente aplicar vaselina.
3. Punzar la vena diagonalmente (45°) con una aguja hipodérmica de calibre adecuado.
4. Recoger no más del 1 % del volumen total de sangre con un capilar sin heparina y transferirla a un tubo con buffer o papel para almacenar sangre.
5. Cubrir el sitio de la punción con un trozo pequeño de algodón y cerrar el ala sujetándola con la mano durante 2-4 minutos para detener el sangrado.

6. Untar polvo coagulante si el sangrado persiste y sostener el espécimen con el ala cerrada hasta que el sangrado cese.

PLUMAS

7. Extraer una pluma de la cola, o de las alas si no tiene cola, con la mano mientras se sujeta el espécimen con las alas cerradas.
8. Cortar la parte basal de la pluma (raquis) y depositarla en un tubo de 1,5 ml con buffer suficiente para cubrirla. Guardar las plumas en un sobre por máximo un mes si no se pueden procesar inmediatamente.
9. Almacenar las muestras refrigeradas entre -20 °C y -190 °C.

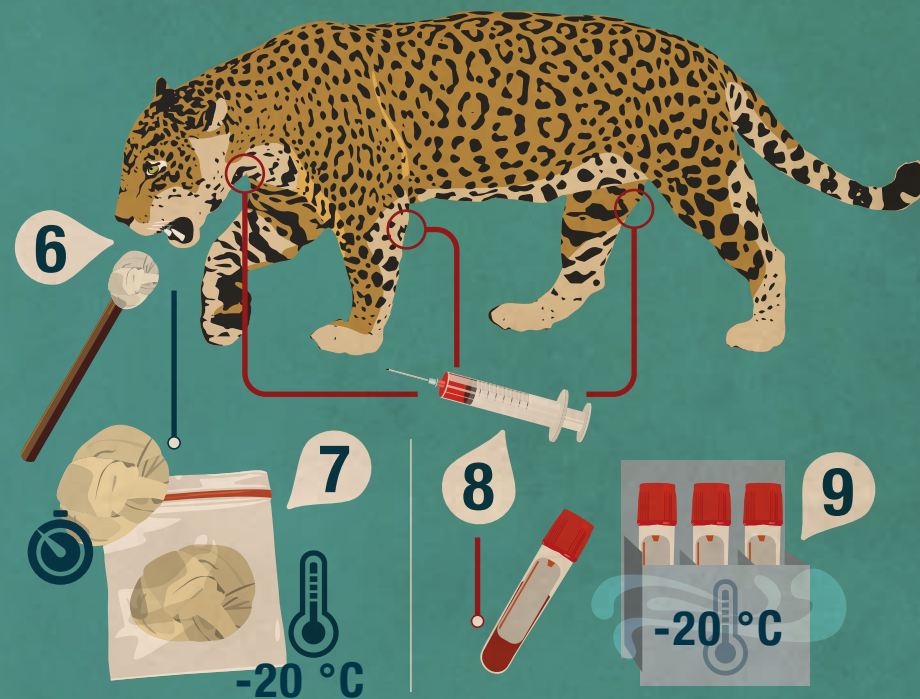


ESPÉCIMEN RECIÉN RECOLECTADO

1. Despejar las plumas de la zona ventral del espécimen sin desprenderlas y realizar una incisión pequeña.
2. Extraer la carcasa de la piel.
3. Cortar varios fragmentos de músculo cardíaco y esquelético y fragmentarlos en pedazos pequeños.

ESPÉCIMEN DE MUSEO

4. Ubicar la piel de una de las patas del individuo sobre un fondo blanco en un lugar bien iluminado.
5. Cortar ligeramente ambos costados de la plantilla de los dedos o parte media de la pata, donde detecte más tejido y no se comprometa la integridad del espécimen.
6. Remover un fragmento pequeño, el tamaño depende de las dimensiones del espécimen.
7. Almacenar la muestra en:
 - A. Líquido:** un tubo con suficiente buffer para cubrirlos por completo y refrigerarlos entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - B. Seco:** un tubo y almacenarlo inmediatamente en nitrógeno líquido.



PELOS CON BULBO

1. Extraer, de un estirón rápido con pinzas grandes, un mechón de pelos con bulbo de cualquier parte del cuerpo y depositarlo en una bolsa de papel.
2. Almacenar las muestras a 4 °C.

MANCHA DE SANGRE

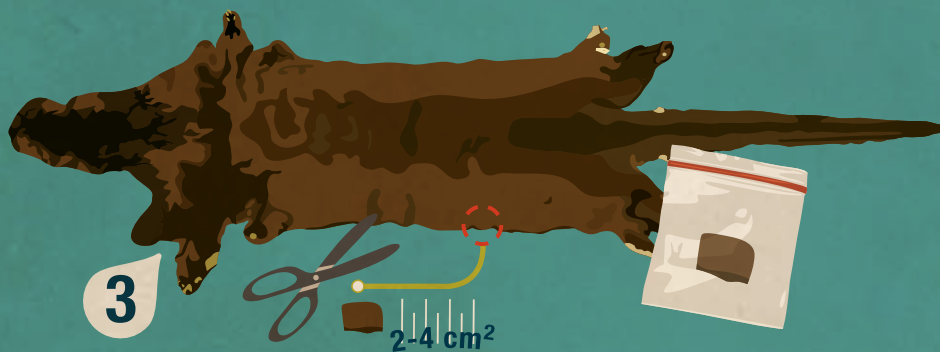
3. Desinfectar una oreja o dedo del espécimen con alcohol.
4. Punzar con una lanceta y depositar varias gotas de sangre en un trozo pequeño de gasa estéril o papel para almacenar sangre.
5. Dejar secar la sangre en la gasa o tarjeta y almacenarla a -20 °C en una bolsa de papel pequeña dentro de una bolsa plástica.

SALIVA

6. En animales agresivos y en cautiverio, introducir en la boca del espécimen un trozo de tela estéril o una bola de cinta de enmascarar sujeta a un palo largo. En animales no agresivos, introducir dos escobillones en la boca y realizar frotis de la parte interna o empaparlos de saliva.
7. Dejar secar el trozo de tela, bola de cinta o escobillón y almacenarlo en una bolsa plástica a -20 °C.

SANGRE

8. En centros de rescate o zoológicos, extraer 1-2 mL de sangre con una jeringa de la vena femoral, humeral, safena externa o yugular.
9. Depositar la sangre en un vacutainer con EDTA disódico, mezclarlo bien, alicuotarlo en tubos plásticos de 1,5 mL y almacenarlos a -20 °C.



MÚSCULO

1. Cortar 5-10 g de músculo de las extremidades, principalmente de los muslos.
2. Depositar la muestra en un tubo con buffer y almacenarlo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PIELES DE MUSEO

3. Cortar un trozo de piel de $2\text{-}4\text{ cm}^2$ sin causar daños al resto de la piel y depositarlo en una bolsa plástica.

HUESOS

4. Lavar la superficie de la muestra de hueso con hipoclorito de sodio al 2 % en agua destilada por 5 minutos y dejar secar.

5. Obtener 10-30 g de hueso:
 - A. Especímenes de museo:** con un taladro. Preferiblemente, llegar hasta el centro del hueso donde hubo tejidos blandos. Depositar el polvo de hueso en un tubo.
 - B. Especímenes cazados:** con una sierra y depositarlo en una bolsa plástica. En especímenes pequeños se puede tomar el hueso completo, preferiblemente fémur o tibia.

UÑAS Y DIENTES

6. Extraer varias uñas o dientes del espécimen con pinzas y bisturí. Depositarlas en una bolsa plástica.
7. Almacenar las muestras a temperatura ambiente o refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

INTRODUCCIÓN

- Arbeláez-Cortés E, Torres MF, López-Álvarez D, Palacio-Mejía JD, Mendoza AM, Medina CA. 2015. Colombian frozen biodiversity: 16 years of the tissue collection of the Humboldt Institute. *Acta Biológica Colombiana*, 20 (2): 163-173.
- Palacio-Mejía JD. 2006. Tissue collections as a mean of storing DNA: a contribution to the conservation of Colombian biodiversity. En: de Vicente MC, Andersson MS (Eds). *DNA banks – providing novel options for genebanks?* International Plant Genetic Resources Institute. Italia.

RECOMENDACIONES GENERALES

- Camacho-Sanchez M, Burraco P, Gomez-Mestre I, Leonard JA. 2013. Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular Ecology Resources*, 13 (4): 663-673.
- Nagy ZT. 2010. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Organisms, Diversity & Evolution*, 10 (1): 91-105.
- Pokluda P, Čížek L, Stříbrná E, Drag L, Lukeš J, Novotný AV. 2014. A goodbye letter to alcohol: an alternative method for field preservation of arthropod specimens and DNA suitable for mass collecting methods. *European Journal of Entomology*, 111 (2): 175-179.
- Prendini L, Hanner R, DeSalle R. 2002. Obtaining, storing and archiving specimens and tissue samples for use in molecular studies. En: DeSalle R, Giribet G, Wheeler W (Eds). *Techniques in molecular systematics and evolution*. Springer. Suiza.
- Straube D, Juen A. 2013. Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: a case study on earthworms. *European Journal of Soil Biology*, 57: 13-18.
- Suarez AV, Tsutsui ND. 2004. The value of museum collections for research and society. *BioScience*, 54 (1): 66-74.
- Szinwelski N, Fialho VS, Yotoko KSC, Seleme LR, Sperber CF. 2012. Ethanol fuel improves arthropod capture in pitfall traps and preserves DNA. *Zookeys*, 196: 11-22.
- Wong PB, Wiley EO, Johnson WE, Ryder OA, O'Brien SJ, Haussler D, Koepfli KP, Houck ML, Perelman P, Mastrodonato G, Bentley AC, Venkatesh B, Zhang YP, Murphy RW, G10KCOS. 2012. Tissue sampling methods and standards for vertebrate genomics. *GigaScience*, 12 (1): 8.

MUESTRAS AMBIENTALES

- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4 (4): 423-425.
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MT, Orlando L, Willerslev E. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21 (11): 2565-2573.

- Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, Bellemain E, Besnard A, Coissac E, Boyer F, Gaboriaud C, Jean P, Poulet N, Roset N, Copp GH, Geniez P, Pont D, Argillier C, Baudoin JM, Peroux T, Crivelli AJ, Olivier A, Acqueberge M, Le Brun M, Møller PR, Willerslev E, Dejean T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25 (4): 929-942.
- Biggs J, Ewald N, Valentini A, Gaboriaud C, Dejean T, Griffiths RA, Foster J, Wilkinson JW, Arnell A, Brotherton P, Williams P, Dunn F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183: 19-28.
- Simmons M, Tucker A, Chadderton WL, Jerde CL, Mahon AR. 2016. Active and passive environmental DNA surveillance of aquatic invasive species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 73 (1): 76-83.
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4 (2): 150-157.

PLANTAS

- Gemeinholzer B, Rey I, Weising K, Grundmann M, Muellner AN, Zetzsche H, Droege G, Seberg O, Petersen G, Rawson D, Weigt L. 2010. Organizing specimen and tissue preservation in the field for subsequent molecular analyses. En: Eymann J, Degreef J, Häuser C, Monje JC, Samyn Y, VandenSpiegel D (Eds). *Manual on field recording techniques and protocols for all taxa biodiversity inventories. Volumen 8. Abc Taxa*. Bélgica.
- Neubig KM, Whitten MW, Abbott RJ, Elliot S, Soltis DE, Soltis PS. 2014. Variables affecting DNA preservation in archival plant specimens. En: Applequist WL, Campbell LM (Eds). *DNA banking for the 21st century*. William L. Brown Center. Perú.

MACROALGAS

- O'Meally D, Livingston SP, Mason RAB. 2011. Opportunistic collection of tissue in the field. *Australian Museum*. Australia.
- Pence VC. 2014. Tissue cryopreservation for plant conservation: potential and challenges. *International Journal of Plant Sciences*, 175 (1): 40-45.
- Viana IG, Aboal JR, Fernández JA, Real C, Villares R, Carballeira A. 2010. Use of macroalgae stored in an environmental specimen bank for application of some European framework directives. *Water Research*, 44 (6): 1713-1724.
- Young-Hyun J, Sung-Pil K, Tae-Ho S, Sung-Je C, Kang HK, Kazuyoshi K, Naotsune S, Ming-Yong K, Jong-Ahm S. 2003. Cryopreservation of sporothalli of the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, 18 (4): 321-331.

REFERENCIAS

HONGOS

- Cepero de García MC, Restrepo Restrepo S, Franco-Molano AE, Cárdenas Toquica M, Vargas Estupiñán N. 2012. Biología de hongos. Universidad de los Andes. Colombia.
- Franco-Molano AE, Vasco-Palacios AM, Lopez-Q C, Boekhout T. 2005. Macromicetes de la región del medio Caquetá. Multimpresos. Colombia.
- Halling R, Mueller G. 2005. Common mushrooms of the Talamanca Mountains, Costa Rica. The New York Botanical Garden. Estados Unidos de América.
- Largent DL. 1977. How to identify mushrooms to genus I: macroscopic features. Mad River Press. Estados Unidos de América.
- Lodge J, Ammirati J, O'Dell TE, Mueller G. 2004. Collecting and describing macrofungi. En: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds). Biodiversity of fungi: inventoring and monitoring methods. Elsevier. Estados Unidos de América.

CORALES Y ESPONJAS

- Dawson MN, Raskoff KA, Jacobs DK. 1998. Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7 (2): 145–152.
- Etnoyer P, Cairns SD, Sanchez JA, Reed JK, Lopez JV, Schroeder WW, Brooke SD, Watling L, Baco-Taylor A, Williams GC, Lindner A, France SC, Bruckner AW. 2006. Deep-sea coral collection protocols. NOAA Technical Memorandum. Estados Unidos de América.
- Gaither MR, Szabó Z, Crepeau MW, Bird CE, Toonen RJ. 2011. Preservation of corals in salt-saturated DMSO buffer is superior to ethanol for PCR experiments. *Coral Reefs*, 30 (2): 329–333.
- O' Meally D, Livingston SP, Mason RAB. 2011. Opportunistic collection of tissue in the field. Australian Museum. Australia.
- Riesgo A, Pérez-Porro AR, Carmona S, Leys SP, Giribet G. 2012. Optimization of preservation and storage time of sponge tissues to obtain quality mRNA for next-generation sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 12 (2): 312–322.
- Salgado A, Vieiralves T, Lamarão FRM, Assumpção LLM, Gomes D, Jascione L, Valadão AL, Albano RM, Lôbo-Hajdu G. 2007. Field preservation and optimization of a DNA extraction method for Porifera. En: Custodio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G (Eds). Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability. Museu Nacional, Rio de Janeiro. Brasil.

ZOOPLANCTON Y MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS

- Prosser S, Martínez-Arce A, Elías-Gutiérrez M. 2013. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources*, 13 (6): 1151–1155.

CRUSTÁCEOS Y MOLUSCOS

- Galindo LA, Puillandre N, Strong EE, Bouchet P. 2014. Using microwaves to prepare gastropods for DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 14 (4): 700–705.
- Reiehl T, Brenke N, Brix S, Driskell A, Kaiser S, Brandt A. 2014. Field and laboratory methods for DNA studies on deep-sea isopod crustaceans. *Polish Polar Research*, 35 (2): 203–224.
- Li Y, Wang W, Liu X, Luo W, Zhang J, Gul Y. 2011. DNA extraction from crayfish exoskeleton. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49 (12): 953–957.
- Moorad JA, Mayer MS, Simovich MA. 1997. Extraction of DNA from anostracan cysts (Crustacea, Branchiopoda) for use in RAPD-PCR analysis. *Hydrobiologia*, 359: 159–162.
- Steele AN, Simovich MA, Pepino D, Schroeder KM, Vandergast AG, Bohonak AJ. 2009. Optimized DNA extraction methods for encysted embryos of the endangered fairy shrimp, *Branchinecta sandiegonensis*. *Conservation Genetics*, 10 (6): 1777–1781.
- Yednock BK, Neigel JE. 2014. Detecting selection in the blue crab, *Callinectes sapidus*, using DNA sequence data from multiple nuclear protein-coding genes. *PLOS ONE*, 9 (6): e99081.

INSECTOS

- Castalaneli MA, Severtson DL, Brumley CJ, Szito A, Footitt RG, Grimm M, Munyard K, Groth DM. 2010. A rapid non-destructive DNA extraction method for insects and other arthropods. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13 (3): 243–248.
- Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M. 2007. DNA Extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLOS ONE*, 2 (3): e272.
- King JR, Porter SD. 2004. Recommendations on the use of alcohols for preservation of ant specimens (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 51 (2): 197–202.
- Quicke DLJ, Lopez-Vaamonde C, Belshaw R. 1999. Preservation of hymenopteran specimens for subsequent molecular and morphological study. *Zoologica Scripta*, 28 (1–2): 261–267.
- Rowley DL, Coddington JA, Gates MW, Norrbom AL, Ochoa RA, Vanderbeng NJ, Greenstone MH. 2007. Vouchering DNA-barcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Molecular Ecology Resources*, 7 (6): 915–924.
- Vink CJ, Thomas SM, Paquin P, Hayashi CY, Hedin M. 2005. The effects of preservatives and temperatures on arachnid DNA. *Invertebrate Systematics*, 19 (2): 99–104.

PECES CARTILAGINOSOS Y MAMÍFEROS ACUÁTICOS

- Pichler FB, Dalebout ML, Baker CS. 2001. Nondestructive DNA extraction from sperm whale teeth and scrimshaw. *Molecular Ecology Resources*, 1 (1–2): 106–109.

REFERENCIAS

PECES ÓSEOS

- Campanella JJ, Smalley JV. 2006. A minimally invasive method of piscine tissue collection and an analysis of long-term field-storage condition for sample. *BMC Genetics*, 7: 32.
- Kidd A, Reid S, Wilson C. 2014. Non-invasive DNA sampling from small-bodied species at risk. Ontario Ministry of Natural Resources. Canadá.
- Le Vin AL, Adam A, Tedder A, Arnold KE, Mable BK. 2011. Validation of swabs as a non-destructive and relatively non-invasive DNA sampling method in fish. *Molecular Ecology Resources*, 11 (1): 107-109.
- Lucentin L, Caporali S, Palomba A, Lacioni H, Panara F. 2006. A comparison of conservative DNA extraction methods from fins and scales of freshwater fish: a useful tool for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 7: 1009-1012.
- Rumph PF, Williams JC. 1986. A comparison of the efficiency of water and ethanol at removing formaldehyde from immersion fixed muscle tissues. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 15 (3): 269-276.
- Ucar A, Atamanalp M. 2010. The effects of natural (clove oil) and synthetical (2-phenoxyethanol) anesthesia substances on hematology parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta fario*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9 (14): 1925-1933.

ANFIBIOS

- American Veterinary Medical Association. 2013. AVMA guidelines for the euthanasia of animals. American Veterinary Medical Association. Estados Unidos de América.
- Goldberg CS, Kaplan ME, Schwalbe CR. 2003. From the frog's mouth: buccal swabs for collection of DNA from amphibians. *Herpetological Review*, 34 (3): 220-221.
- Gonser RA, Collura RV. 1996. Waste not, want not: toe-clips as a source of DNA. *Journal of Herpetology*, 30 (3): 445-447.
- Mendoza AM, García-Ramírez JC, Cárdenas-Henao H. 2012. Blood puncture as a nondestructive sampling tool to obtain DNA in frogs: comparison of protocols and survival analysis. *Molecular Ecology Resources*, 12 (3): 470-475.
- Mendoza AM, García-Ramírez JC, Cárdenas-Henao H. 2012. Epithelial mucosa as an alternative tissue for DNA extraction in amphibians. *Conservation Genetics Resources*, 4 (4): 1097-1099.
- Streicher JW, Ng DJJ, Bickford DP. 2014. Extracting and amplifying DNA from skin swabs of a forest dwelling tree frog species (*Nyctixalus pictus*). *Herpetological Review*, 45 (3): 421-424.

REPTILES

- Avery HW, Vitt LJ. 1984. How to get blood from a turtle. *Copeia*: 209-210.
- Beebee TJC. 2008. Buccal swabbing as a source of DNA from squamate reptiles. *Conservation Genetics*, 9 (4): 1087-1088.
- Gorzula SJ, Arocha-Pinango CL, Salazar C. 1976. A method of obtaining blood by venipuncture from large reptiles. *Copeia*: 838-839.
- Miller HC. 2006. Cloacal and buccal swabs are a reliable source of DNA for microsatellite genotyping of reptiles. *Conservation Genetics*, 7 (6): 1001-1003.
- Pidancier N, Miquel C, Miaud C. 2003. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetological Journal*, 13 (4): 175-178.

AVES

- Owen JC. 2011. Collecting, processing, and storing avian blood: a review. *Journal of Field Ornithology*, 82 (4): 339-354.
- Voss M, Shutler D, Werner J. 2010. A hard look at blood sampling of birds. *The Auk*, 127 (3): 704-708.
- Winker K. 2000. Obtaining, preserving, and preparing bird specimens. *Journal of Field Ornithology*, 71 (2): 250-297.

MAMÍFEROS

- Hillis DM, Moritz C, Mable BK. 1996. *Molecular systematics*. Sinauer Associates. Estados Unidos de América.
- Ruiz-García M, Vásquez C, Camargo E, Leguizamón N, Gálvez H, Vallejo A, Pinedo M, Castellanos-Mora L, Shostell J, Alvarez D. 2011. Molecular phylogeny inferences of the *Aotus* genus (Cebidae, Primates). *International Journal of Primatology* 32 (5): 1218-1241.
- Ruiz-García M, Pinedo-Gastro M, Shostell JM. 2014. How many genera and species of woolly monkeys (Atelidae, Platyrrhine, Primates) are? First molecular analysis of *Lagothrix flavicauda*, an endemic Peruvian primate species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79: 179-198.
- Ruiz-García M, Escobar-Armel P, Leguizamón N, Manzur P, Pinedo-Gastro M, Shostell J. 2014. Genetic characterization and structure of the endemic Colombian silvery brown bare-face tamarin, *Saguinus leocopus* (Callitrichinae, Cebidae, Primates). *Primates*, 55 (3): 415-435.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos de América.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10 (4): 506-513.

