

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



Caracterización Molecular de Especies de la Familia *Cactaceae* Utilizando el Fragmento *rbcL* Como Marcador.

Por:

DIEGO ARMANDO PARRA VALDES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Caracterización Molecular de Especies de la Familia Cactaceae Utilizando el Fragmento
rbcL Como Marcador.

Por:

DIEGO ARMANDO PARRA VALDES

TESIS

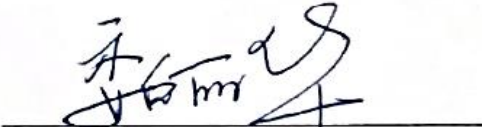
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor Principal Interno



Dra. Lihua Wei
Asesor Principal Externo



Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes
Co-Asesor



Dr. Valentín Robledo Torres
Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Caracterización Molecular de Especies de la Familia *Cactaceae* Utilizando el Fragmento *rbcL* Como Marcador.

Por:

DIEGO ARMANDO PARRA VALDES

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:



M.C. Fidel Maximiliano Peña Ramos
Presidente



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Secretario



Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes
Sinodal



Dr. Valentín Robledo Torres
Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto 2022

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Diego Armando Parra Valdes
Autor Principal

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesor; Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez. Quien hago llegar mi más sincero agradecimiento en primera instancia, por su entrega incondicional durante el desarrollo de este trabajo de investigación, la confianza que depositó en mí, su constante apoyo sin importar las circunstancias, por la gran amistad brindada durante estos años, los consejos dados, la infinita disposición que tiene con sus estudiantes para lograr transmitir sus conocimientos a través de la experiencia, por aportar siempre su granito de arena ante cualquier percance, por las grandes convicciones que tiene como persona, por las risas que nunca faltaron dentro y fuera del laboratorio, por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro. Sencillo no ha sido el proceso, pero gracias a usted por la gran perseverancia, constancia y dedicación. ¡Muchas Gracias!

A mi Co-Asesora; Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes. Quien estoy eternamente agradecido por tomarse el arduo trabajo de transmitirme sus diversos conocimientos, por la paciencia durante sus enseñanzas, sus indicaciones y orientaciones indispensables en el desarrollo de este trabajo. Esta ocasión no ha sido la excepción para exaltar su gran trabajo por ayudarme a lograr esta nueva meta. ¡Gracias!

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN); Mi Alma Mater. La mejor casa de estudios por las grandes facilidades y oportunidades presentes para todos los jóvenes de cualquier parte de la República Mexicana. Brindando los mejores elementos para el éxito de los estudiantes. ¡Buitres por siempre!

Al Departamento de Botánica; Laboratorio de Zoología. Quienes me abrieron las puertas de una manera extraordinaria donde pude trabajar de la mejor manera de una manera teórica-práctica, donde pude adquirir nuevas habilidades y conocimientos durante todo este proceso para concluir mi licenciatura.

Al Jardín Botánico. A los encargados de dicha área dentro de la Universidad. Especialmente al Ing, Froylan Meráz Saavedra por el gran apoyo técnico durante las colectas en campo con alta relevancia en este estudio presente.

A mi familia. Quienes forjaron los cimientos de mi desarrollo, todos y cada uno de ustedes han destinado tiempo para enseñarme nuevas cosas, por brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida, estando presentes en la evolución y desarrollo durante mi formación académica. Formándome con reglas y algunas libertades, pero al fin de cuenta, apoyaron constantemente este nuevo logro.

A mis compañeros. De generación CXXXII por esas grandes amistades, la confianza, por todos los momentos buenos y malos que se vivieron juntos.

DEDICATORIA

A mi madre; Denisse Valentina Valdes Bañuelos. Tus esfuerzos son impresionantes casi sobrenaturales todo por lograr sacar adelante a tus hijos, gracias por ese amor inconmensurable, por toda esa carga como mamá, por todas las atenciones, por tus cuidados y tus enseñanzas de verdad que tengo mucho por agradecerte.

A mi padre; Hugo Armando Parra Santoyo. Desde el momento que nací e incluso antes que eso, ya estabas buscando lo mejor para nosotros, tú trabajo duro sin importar los problemas, las circunstancias o lo cansado que estuvieras, siempre diste lo mejor de ti para proveer, para que nunca nos faltara nada e incluso en aquellos malos momentos. Los consejos que me has brindado han formado bases de gran importancia, ahora soy consciente de eso.

A mis hermanos; Hugo, Luis y Darío Armando Parra Valdes. Parece como si nunca hubiéramos estado en paz, siempre batallando por cualquier cuestión, sin embargo, siempre llegaron los momentos en los que nuestra lucha ceso e hicimos una tregua para lograr nuestras metas conjuntas a pesar de las adversidades. Les agradezco no solo por estar presentes en mi vida, sino por los grandes lotes de felicidad y diversas emociones que siempre me han causado. Muchas gracias hermanos.

A mi familia materna; Particularmente les dedico este logro a mi familia, que siempre han sido una gran mano derecha ante cualquier circunstancia. A mis queridos abuelitos, todos mis tíos que siempre están presentes y mucho más cuando les he necesitado, agradeciéndoles eternamente de corazón.

A mi abuela paterna; Crispina Santoyo Soto (†). Dedicado especialmente para ti, cumpliendo ante mi promesa, pero con un enorme vacío ante tu ausencia, te extraño.

A mis amigos; Francisco Javier, Ulises Neri, Luis Rodrigo, Brayan Amaya, Juan José, Juan de Dios. Quienes se han convertido en parte de mi familia, con quienes tuve el mejor apoyo tanto académico como personal durante la Universidad, donde compartí las mejores experiencias quienes siempre estuvieron apoyándome, alentándome, divirtiéndome, han sido los mejores amigos por las grandes anécdotas que quedarán marcadas a través de nuestras vidas.

A mis amigos del laboratorio; Aracely, Anel, Sofía, Mariel, Isabella, Santiago, Hugo, Saúl y Gary. Por el apoyo, los ánimos y la gran amistad que hice con ustedes estimándolos bastante.

A todos; Aquellos que me apoyaron, que estuvieron conmigo, pero me sería difícil agradecer, este logro también es de ustedes.

Para un ángel; Mi eterna amiga Lizbeth Alarcón García (†).

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VI
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	3
Objetivo General	3
Objetivos Específicos.....	3
4. HIPÓTESIS	3
5. REVISIÓN DE LITERATURA	4
5.1. Familia <i>Cactaceae</i>	4
5.2. Subfamilia	5
5.3. Tribu.....	6
5.3.1. Género <i>Ferocactus</i>	7
5.3.2. Género <i>Sclerocactus</i>	7
5.3.3. Género <i>Mammillaria</i>	8
5.4. Código de Barras de ADN	8
5.5. Uso de <i>rbcL</i> en Código de Barras de ADN.....	10
5.6. Métodos para analizar el poder discriminatorio de los Códigos de barras de ADN... ..	10
5.6.1. Edición de secuencias	10
5.6.2. BLAST.....	11
5.6.3. Unión de vecinos	12
5.7. Extracción de ADN en <i>Cactáceas</i>	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1. Colecta en campo	15
6.2. Extracción de ADN genómico	15
6.3. Electroforesis de ADN	16
6.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16

6.5.	Secuenciación.....	17
6.6.	Análisis Bioinformático	17
6.6.1.	Edición de electroferogramas	17
6.6.2.	Alineamiento de secuencias.....	18
6.6.2.1.	Descarga de secuencias de referencia.....	18
6.6.2.2.	Creación de biblioteca con secuencias de consulta	19
6.6.3.	BLAST.....	19
6.6.4.	Análisis en MEGA X.....	20
6.6.5.	Evaluación de la calidad de secuencias	20
6.6.6.	Construcción del Dendrograma	20
7.	RESULTADOS	21
7.1.	Colecta en campo	21
7.2.	Extracción de ADN genómico	24
7.3.	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	24
7.4.	Análisis de secuencias.....	25
7.5.	Edición de secuencias	25
7.5.1.	Corte de extremos	26
7.6.	Análisis en BLAST	27
7.7.	Alineamiento de las secuencias.....	28
7.8.	Análisis de las características de la secuencia.....	29
7.9.	Construcción del Dendrograma.....	30
8.	DISCUSIÓN	32
9.	CONCLUSIONES	36
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género <i>Ferocactus</i>	7
Tabla 2. Clasificación taxonómica del género <i>Sclerocactus</i>	7
Tabla 3. Clasificación taxonómica del género <i>Mammillaria</i>	8
Tabla 4. Cebador <i>rbcL</i> y programa PCR utilizado para la amplificación de ADN.	17
Tabla 5. Mezcla para realizar PCR (GoTaq MasterMix de Promega™).....	17
Tabla 6. Secuencias de referencia, tomadas del repertorio BOLD SYSTEMS junto con las descripciones de las secuencias.....	19
Tabla 7. Especies y localización geográfica de muestras colectadas.....	23
Tabla 8. Identificación género <i>Mammillaria</i> con porcentajes de identidad de la herramienta BLAST y delimitación de las secuencias.	27
Tabla 9. Identificación especie <i>Sclerocactus</i> con porcentajes de identidad de la herramienta BLAST y delimitación de las secuencias.	28
Tabla 10. Identificación ambigua <i>Ferocactus</i> con porcentajes de identidad de la herramienta BLAST y delimitación de las secuencias.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificaciones cactáceas por forma de tallo.....	5
Figura 2. Subfamilias de la familia Cactaceae.....	6
Figura 3. Puntos de colecta de cuatro especies de cactáceas en la región sureste del estado de Coahuila, México.	21
Figura 4. Especímenes colectados: a) <i>Ferocactus hamathacanthus</i> , b) <i>Mammillaria chionocephala</i> , c) <i>Mammillaria heyderi</i> , d) <i>Sclerocactus scherii</i>	22
Figura 5. Extracción de ADN genómico en muestras de especies de cactus. Carriles 1-3 <i>Ferocactus hamathacanthus</i> , carriles 4- 6 <i>Mammillaria heyderi</i> , carriles 7-9 <i>Mammillaria chionocephala</i> , carriles 10-12 <i>Sclerocactus scherii</i>	24
Figura 6. Productos de PCR obtenidos a partir del iniciador <i>rbcL</i> . Carril 1 marcador de peso molecular, Carriles 2-4 muestran los amplicones de <i>Ferocactus hamathacanthus</i> , carriles 5-7 <i>Mammillaria heyderi</i> , carriles 8-10 <i>Mammillaria chionocephala</i> , los carriles 11-13 <i>Sclerocactus scherii</i>	25
Figura 7. Purificación de gel de agarosa a partir de reacciones de PCR de 60 µl. Carril 1 marcador de peso molecular, Carriles 2-4 muestran los amplicones de <i>Ferocactus hamathacanthus</i> , carriles 5-7 <i>Mammillaria heyderi</i> , carriles 8-10 <i>Mammillaria chionocephala</i> , los carriles 11-13 <i>Sclerocactus scherii</i>	25
Figura 8. Electroferograma de <i>Mammillaria chionocephala</i>	26
Figura 9. Electroferograma de <i>Ferocactus hamathacanthus</i>	26
Figura 10. Electroferograma de <i>Mammillaria heyderi</i>	26
Figura 11. Electroferograma de <i>Sclerocactus scherii</i>	26
Figura 12. Extremo 5´ del electroferograma de <i>Ferocactus hamathacanthus</i>	27
Figura 13. Extremo 3´ del electroferograma de <i>Ferocactus hamathacanthus</i>	27
Figura 14. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencias de Consulta.	28
Figura 15. Fragmento del extremo 3´ del alineamiento múltiple que muestra la delimitación de las secuencias consulta y de referencia (línea amarilla).....	29
Figura 16. Análisis de sitios conservados procedentes de la alineación.....	30
Figura 17. Análisis de sitios variables procedentes de la alineación.	30
Figura 18. Análisis de sitios informativos procedentes de la alineación.	30
Figura 19. Dendrograma de especies <i>Cactaceae</i> a partir de un análisis de vecinos cercanos usando la región <i>rbcL</i> y con base en la distancia genética K2P.	31

RESUMEN

La familia Cactaceae es de gran interés en cuanto a su diversidad, importancia ecológica y económica. Actualmente, existen técnicas que permiten identificar las especies con base en caracteres moleculares mediante el uso de los códigos de barra de ADN. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la capacidad del marcador molecular *rbcL* para la discriminación de especies del género *Ferocactus*, *Mammillaria*, *Sclerocactus*. Los datos analizados corresponden a 12 especímenes colectados. Se llevó a cabo extracción de ADN genómico y PCR donde se amplificó la región *rbcL*, obteniendo los 12 amplicones de cactáceas. Las cuales fueron secuenciadas y posteriormente las secuencias fueron depuradas mediante alineamiento a través del programa UGENE y MEGA X, generando las secuencias consenso de cada especie. El análisis BLAST proporcionó un poder de identificación del 99% de las especies. Permittiéndonos cuantificar la similitud entre las secuencias analizadas y analizar la variabilidad de la región *rbcL*, obteniendo una tasa de éxito del 96% de secuencias alineadas correctamente. Con el método de unión de vecinos cercanos a partir de la matriz de distancia Kimura con dos parámetros (K2P) se realizó la construcción de un dendrograma, mostrando el agrupamiento de las 12 secuencias e identificando la formación de tres clados. Observando que el género *Mammillaria* y *Sclerocactus* parten de un ancestro común más reciente, el género *Ferocactus* mantiene una misma línea horizontal que representa en el árbol el mismo linaje que este divergió para las otras especies. En este estudio se pudo evaluar y corroborar la universalidad del cebador *rbcL* por su fácil amplificación, secuenciación y alineamiento en la familia Cactaceae.

1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad comprende de ciertos niveles de variación biológica como la variedad genética entre especies, la diversidad de especies y la variedad en un ecosistema. Sin embargo, los efectos antropogénicos han acelerado la pérdida de la diversidad biológica debido al cambio climático, uso inadecuado de la tierra, especies invasoras, entre otras causas. Por lo anterior se han implementado medidas para la conservación de los recursos naturales, siendo necesaria la descripción de un gran número de especies, sin embargo, la falta de información de especies se debe a la insuficiencia de estudios taxonómicos, lo complicado de la identificación a partir de la morfología y se dificulta más en especies estrechamente emparentadas, siendo limitantes para una acertada identificación para cada grupo de organismos (Blaxter, 2003).

El 40% del territorio nacional mexicano está conformado por zonas semiáridas y áridas, siendo una de las regiones con mayores especies de cactáceas en el mundo. Las cactáceas son plantas endémicas y originarias del continente americano, este grupo consta de aproximadamente 4,000 especies. México cuenta con un total de 675 especies, de las cuales el 84% son endémicas (Gámez *et al.*, 2016). Su mayor distribución abarca los estados Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí, Coahuila y el Desierto Chihuahuense, el estado de Coahuila cuenta con unas 130 especies de cactáceas (Villavicencio *et al.*, 2010).

El alto endemismo presente, los diversos usos que tienen las especies de esta familia y la explotación no sustentable son las causas de que se encuentren en riesgo de extinción. Las cactáceas han sido utilizadas para obtención de alimento a partir de los tallos y/o frutos, combustible, fabricación de artesanías, uso ornamental, tráfico ilegal, entre otras (Jiménez Sierra, 2011). Las condiciones climáticas, fisiográficas y extensión del estado de Coahuila representan un reto para el estudio de la diversidad biológica y conservación de las especies de dicha familia.

El uso de herramientas moleculares, concretamente el uso de secuencias de fragmentos de ADN estandarizados ha demostrado ser potencialmente útil en la identificación de especies. Para ello se utilizan regiones de ADN que consisten en secuencias cortas que son utilizadas como etiquetas para la identificación rápida de especies las cuales son

conocidas como “Código de Barras de ADN” (Kress *et al.*, 2015). Se han identificado varias regiones del ADN de cloroplasto como marcadores para códigos de barras en plantas, entre ellos los fragmentos *matK*, *rbcL*, *rpoB* (CBOL *et al.*, 2009), una de las grandes problemáticas es que se ha tratado de generar un marcador universal para plantas pero ninguno de los loci funcionan en todas las especies (Li *et al.*, 2015). La combinación de *matK* + *rbcL* ha permitido la discriminación entre especies en más de 72% en cactáceas (CBOL *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se utilizó el marcador *rbcL* para identificar especies de la familia Cactaceae y así evaluar su efectividad para discriminar especies de este grupo. La región *rbcL* ha sido utilizada ampliamente, presentando varias ventajas como la facilidad de amplificar, secuenciar y alinear. Sin embargo, su utilidad en la discriminación de especies aun es cuestionable, debido a una baja variación intragénero (Fazekas *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

Las limitaciones que se presentan al identificar miembros de la familia *Cactaceae* plantean la necesidad de esquemas para analizar los patrones de especies, subespecies y variedades pertenecientes a la familia, tras su dificultad para definir su estatus taxonómico. Los códigos de barras de ADN son una alternativa para la identificación taxonómica. La región *rbcL* del ADN de cloroplasto (ADNc) presenta una alternativa para la caracterización molecular de especies en la familia *Cactaceae*.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la efectividad del fragmento *rbcL* para discriminar entre especies del género *Cactaceae*.

Objetivos Específicos

Determinar las secuencias de los fragmentos *rbcL* en *Ferocactus*, *Mammillaria* y *Sclerocactus* especies de cactáceas sin reportes previos.

Búsqueda y descarga de secuencias *rbcL* en Barcode Of Life Data System (BOLD SYSTEMS).

Analizar con BLAST las regiones de similitud entre secuencias.

Cálculo de las distancias genéticas y construcción del Dendrograma a partir de la unión de vecinos cercanos de las secuencias *rbcL*.

4. HIPÓTESIS

El marcador *rbcL* permite la identificación de especies en la familia *Cactaceae* mediante el uso de Código de Barras de ADN aun entre especies estrechamente relacionadas.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Familia *Cactaceae*

Esta familia se originó en el continente americano hace aproximadamente 80 millones de años, su distribución natural abarca prácticamente todo el continente, aunque algunas especies han sido introducidas en otros continentes. Los cactus se han diversificado y adaptado a todo tipo de ambientes naturales de América desde las selvas húmedas hasta los desiertos pasando por selvas caducifolias, bosques templados y algunas especies se han logrado establecer en regiones que presentan nevadas durante el invierno. Concretamente, la mayoría de las especies, alrededor del 70% se distribuyen en regiones áridas y semiáridas (Arias, 2017).

En México, una gran variedad de las cactáceas ha conquistado los extensos territorios áridos del norte y centro del país, llegando a ser probablemente las plantas más características del paisaje mexicano. Se calcula que la familia incluye alrededor de 110 géneros y cerca de 4000 especies. Nuestro país se considera con el mayor número de diversidad de la familia contando con un alto grado de endemismo aproximadamente alrededor de 18 géneros (35%) y 675 especies (84%) existente únicamente en nuestro país (Pérez Valenzuela & Carmen, 2016).

Las cactáceas son aquellas plantas suculentas con espinas que debido a la evolución ha desarrollado diversos mecanismos de adaptación para poder sobrevivir ante las extremas condiciones de aridez, se distinguen notablemente en ser perennes. Estas plantas se pueden distinguir en contraste a diversas suculentas generalmente por tener presente areolas en sus ramas y morfológicamente disponen de la presencia de espinas, flores y (Seremi, 2015).

La mayoría de sus características morfológicas y fisiológicas están relacionadas con un uso muy eficiente del agua. Su forma globosa y robusta les permite almacenar agua, al mismo tiempo que disminuye la superficie de la planta expuesta al sol. La existencia de una cutícula impermeable que cubre toda la planta evita la pérdida de agua por transpiración. La falta de hojas y la presencia de espinas o pelos refrigerantes en algunas especies, ayuda a la planta a disminuir el calor provocado por la incidencia de los rayos solares (Bueno & Plumed, 2017).

Las cactáceas se pueden clasificar debidamente a las formas de sus tallos como:

- *Columnares*: estos suelen tener ramificaciones y forma cilíndrica.
- *Globosos*: en las cuales el tallo tiene un diámetro más grande.
- *Cladlios*: estos son caracterizados por tener un tallo en forma de raquetas planas pertenecientes al nopal como ejemplo.



Figura 1. Clasificaciones cactáceas por forma de tallo. a) Columnares, b) Globosos, c) Cladlios.

5.2. Subfamilia

Subdividiéndose en tres subfamilias, *Cactoideae* es, con mucho la subfamilia más rica en términos de diversidad morfológica y número de especies abarcando mayor del 80% de especies en cactus (Nyffeler, 2002).

- Subfamilia *Pereskioideae* son cactus con hojas planas persistentes, pero no suculentas.
- Subfamilia *Opuntioideae* son plantas arbustivas con hojas redondas y generalmente espinosas, son de forma redonda.
- Subfamilia *Cactoideae* son cactus sin hojas. Es la subfamilia más diversa y rica en especies que comprende más del 80% de las especies de cactus, su característica más destacable es la carencia total, de hojas.



Figura 2. Subfamilias de la familia Cactaceae: A) Subfamilia *Pereskioideae*, B) Subfamilia *Opuntioideae*, C) Subfamilia *Cactoideae*.

5.3. Tribu

Una tribu es una clasificación taxonómica más bajo que la familia y más alto que el género, basándose para organizar las familias que poseen muchos géneros. La tribu cactae son cactus solitarios o cespitosos, con aréolas ovales, flores pequeñas a medianas, subapicales. Tienen las características de forma globosa, aplanadas, cilíndricas y columnar, éstas pueden medir algunos centímetros de altura (*Mammillaria*) o hasta cerca de los dos metros y medio (*Ferocactus*) conformadas por areolas en el ápice, espinas radiales y centrales, flores en el meristemo superior de las areolas, un fruto espinoso o desnudo, como semillas en funículos cortos (Korotkova *et al.*, 2017).

La tribu *Cactae* es de importancia ecológica, representando uno de los grupos más diversos clasificados en los siguientes géneros: *Acharagma*, *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Cochemiea*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Echinomastus*, *Epithelantha*, *Escobaria*, *Ferocactus*, *Geohintonia*, *Leuchtenbergia*, *Lophophora*, *Mammillaria*, *Mammilloidia*, *Neolloydia*, *Obregonia*, *Ortegocactus*, *Pediocactus*, *Pelecypora*, *Sclerocactus*, *Stenocactus*, *Strombocactus*, *Thelocactus*, *Turbinicarpus*, los cuales se distribuyen en Estados Unidos, Canadá, México, Caribe, Venezuela y Colombia (Gibson & Nobel, 1986).

5.3.1. Género *Ferocactus*

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Ferocactus*.

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
ORDEN	<i>Caryophyllales</i>
FAMILIA	<i>Cactaceae</i>
SUBFAMILIA	<i>Cactoideae</i>
TRIBU	<i>Cacteeae</i>
GÉNERO	<i>Ferocactus</i>

Las plantas del género *Ferocactus* poseen una forma globular en etapa temprana y al crecer van adaptando una forma de barril, llegan a medir unos 2 cm hasta más de 30 cm dependiendo de la especie ya que pueden llegar hasta los 3 metros, son longitudinales con fuertes espinas generalmente curvadas, tienen flores con forma de campana que van de un color amarillo hasta el violeta, floreciendo en verano donde proporcionan un pequeño fruto (Flores, 2005).

5.3.2. Género *Sclerocactus*

Tabla 2. Clasificación taxonómica del género *Sclerocactus*

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
ORDEN	<i>Caryophyllales</i>
FAMILIA	<i>Cactaceae</i>
SUBFAMILIA	<i>Cactoideae</i>
TRIBU	<i>Cacteeae</i>
GÉNERO	<i>Sclerocactus</i>

Son cactus xerofitos, mayormente se encuentran en grandes altitudes en los desiertos, soportan climas extremos de veranos calurosos como inviernos bajo cero. Una de sus principales características es que estos cactus poseen tallos muy rígidos con numerosas costillas cubiertas completamente de espinas tipo gancho (Flores, 2005).

5.3.3. Género *Mammillaria*

Tabla 3. Clasificación taxonómica del género *Mammillaria*

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
ORDEN	<i>Caryophyllales</i>
FAMILIA	<i>Cactaceae</i>
SUBFAMILIA	<i>Cactoideae</i>
TRIBU	<i>Cacteeae</i>
GÉNERO	<i>Mammillaria</i>

Son un tipo de cactus de forma globosa, siendo de tamaño pequeño, mediano pero pudiendo medir desde los 2 a 25 cm de diámetro e inclusive llegar al medio metro de altura, son plantas agrupadas o solitarias, se caracterizan por poseer una estructura de espinas desde la base y llegan a cubrir toda la superficie, sus espinas son tan diversas que pueden adoptar diferentes formas, sus flores se presentan en forma de corona y llegan a florecer desde el verano hasta la llegada del otoño, su color varía entre el rojo al rosado (Flores, 2005).

5.4. Código de Barras de ADN

Los códigos de barras de ADN son secuencias cortas (400-800 pares de bases) de una región estandarizada del genoma. Estas secuencias se usan para ayudar a descubrir, caracterizar, distinguir especies y para asignar individuos no identificados a especies (Kress *et al.*, 2005). En animales, el sistema de código de barras de ADN está basado en la secuencia del citocromo *c* oxidasa 1 mitocondrial (*cox1*), demostrando con éxito la identificación de especies y el descubrimiento de nuevas especies en animales e incluso en algunas especies fúngicas (grupos Ascomycota, Basidiomycota y Chitidrimycota). Sin embargo, el gen *cox1* no es un buen candidato para la aplicación del código de barras de ADN en plantas, uno de los mayores problemas que exhiben las plantas son la baja tasa de sustitución de nucleótidos del genoma mitocondrial que las observadas en los genes plástidos o nucleares (Newmaster *et al.*, 2006). La baja tasa de sustitución de nucleótidos de *cox1*, ha hecho más desafiante la tarea de encontrar un locus que sea universal y que

tenga una divergencia de secuencia suficientemente alta a nivel de especie en plantas (Kress & Erickson, 2007).

Por lo cual se ha buscado determinar cuáles loci son los idóneos para la implementación de los códigos de barras en plantas. Según el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL), las secuencias que pueden ser consideradas como código de barras de ADN en plantas deben presentar las siguientes características (Roy *et al.*, 2010):

- Universalidad: Debe estar presente en todos los organismos de este reino.
- Calidad y cobertura: Tener secuencias con pocas bases ambiguas, tener un tamaño de secuencia corto y apropiado.
- Discriminación: La secuencia del loci debe permitir la distinción de las especies.
- Bioinformática: Contar con secuencias que permitan un buen alineamiento obteniendo altos niveles de confianza de las especies.

De acuerdo a las características anteriores, para un adecuado resultado en la implementación de los códigos de barras en plantas, se especifican los siguientes marcadores moleculares que pueden servir como códigos de barras de ADN en plantas (Tehen *et al.*, 2014):

- *rbcL* (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa – cloroplasto). Es el marcador que ha sido más caracterizado por su fácil amplificación, alineación y secuenciación, llegando a presentar una discriminación del 85 %.
- *matK* (maturasa K – cloroplasto). Es un locus que aceleradamente ha evolucionado, teniendo un 66% de discriminación. Siendo un marcador complejo durante su amplificación y alineación.
- *ITS2* (segundo espaciador transcrito interno – núcleo). Tiene una alta divergencia intraespecífica, posee un locus con el 94% de amplificación y una tasa de discriminación del 93%.
- *rpl132 – trnL* (espaciador intergénico – cloroplasto). Muestra el 78% de variabilidad siendo el espaciador intergénico de cloroplasto más informativo. Su tamaño es sumamente variable, presentando *indels* (deleciones / inserciones), por

lo que se vuelve complicado durante la amplificación y su análisis bioinformáticos.

- *trnH* – *psbA* (espaciador intergénico – cloroplasto). Tiene un porcentaje de variabilidad del 53% y en la amplificación un alto porcentaje del 93%.

5.5. Uso de *rbcL* en Código de Barras de ADN

El gen codificador de la subunidad de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (*rbcL*) dada por su universalidad en plantas, su fácil amplificación y alineación se ha sugerido para la caracterización molecular de especies dentro de la familia *cactaceae* (Kress *et al.*, 2005). En la actualidad el gen *rbcL* se utiliza para análisis filogenéticos, sin embargo, el nivel de variación proporciona una ubicación confiable de un taxón en una familia o genero de plantas (Kress & Erickson, 2007). Por ejemplo, un estudio comparó secuencias de *rbcL* de más de 1000 pb del GenBank, en este análisis encontró que *rbcL* no reconocía todas las especies de plantas, pero distinguía plantas dentro del mismo género (Cristians Niizawa, 2020), demostrando que este locus funciona bien como región central con suficiente variación para discriminar entre especies por pares congéneres.

Finalmente, a pesar de que el gen *rbcL* del plástido se ha descartado como un discriminador a nivel de especie, algunos investigadores han sugerido que esta región debería incluirse como un estándar para la comparación con otros marcadores. Sin embargo, a pesar de esta región como un código de barras de un solo locus, los niveles generales más bajos de tasas de mutación pueden requerir un código de barras de múltiples locus para discriminar al máximo entre especies de plantas (Rubinoff *et al.*, 2006).

5.6. Métodos para analizar el poder discriminatorio de los Códigos de barras de ADN

5.6.1. Edición de secuencias

Un electroferograma es un gráfico que genera el secuenciador, las secuencias de nucleótidos obtenidas a través del electroferograma permiten ensamblar cada muestra y editarla para generar una secuencia consenso definitiva. Es fundamental examinar los electroferogramas antes de proceder con los análisis de las muestras, ya que es un

indicador para la confiabilidad de los datos, calidad de la PCR y valorar su empleo en los siguientes análisis. Los cromatogramas generalmente llegan a tener “ruidos” o “interferencias” una de sus posibles causas son la contaminación de otro ADN, poco ADN molde, contaminación con otro cebador (normalmente el cebador reverso utilizado en la PCR). Para efectuar la edición de las secuencias, se verifica manualmente la asignación de los pares de bases y primordialmente los extremos en los cuales no fue posible asignar una base nitrogenada (N), recortando, eliminando las posiciones cuya calidad y lectura fue baja durante la secuenciación. Una vez generada la secuencia de interés, independientemente de la finalidad del estudio es necesario compararla con las secuencias disponibles en múltiples bases de datos situadas en internet verificando la fiabilidad de la secuencia esperada (Márquez Valdelamar *et al.*, 2014).

5.6.2. BLAST (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local)

BLAST es una de las herramientas de investigación bioinformática más utilizadas, siendo un programa de búsqueda de similitud de secuencias que se puede usar a través de una interfaz web o como una herramienta independiente para comparar la consulta de un usuario con una base de datos de secuencias. Además, por su versatilidad en búsqueda posee cinco formas diferentes:

- **Blastp:** compara una secuencia de aminoácidos contra una base de datos de secuencias de proteínas.
- **Blastn:** compara una secuencia de nucleótidos contra una base de datos de secuencias de nucleótidos.
- **Blastx:** compara una secuencia de nucleótidos traducida en sus seis posibles marcos de lectura contra una base de secuencias de proteínas.
- **Tblastn:** compara una secuencia de aminoácidos contra toda la base de datos de nucleótidos traducida en sus seis posibles marcos de lectura.
- **Tblastx:** compara las seis traducciones en sus marcos de lectura de la secuencia de nucleótidos, contra las seis traducciones en sus marcos de lectura de toda la base de datos de nucleótidos.

Para determinar la idoneidad en la identificación de especies de cada código de barras de ADN se evalúa mediante el método BLASTn. Cada fragmento de ADN en las especies recolectadas o secuencias consenso se compara dentro de las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando la herramienta BLASTn, para determinar la homología de secuencia de las secuencias amplificadas y la tasa de éxito de identificación de los individuos a través del porcentaje de identificación como cubierta de consulta mayor a un 98% en ambos casos. Finalmente nos muestra las relaciones filogenéticas entra las secuencias de nucleótidos obtenidos de las muestras estudiadas y las existentes en las bases de datos que presentan la mayor similitud con las mismas que se deben principalmente al tamaño de la muestra y la selección del taxón (Jáuregui, 2015).

5.6.3. Unión de vecinos

Es un método que fue propuesto en 1987 por Saitou y Masatoshi Nei, que produce la unión de los OTU's (unidad taxonómica operativa, por sus siglas en inglés) seleccionando al vecino más cercano, tratando de minimizar la longitud total del árbol. Es el método más rápido para resolver análisis masivos de secuencias y no requiere que todos los linajes hayan divergido en cantidades iguales. El método es especialmente adecuado para conjuntos de datos que comprenden linajes con tasas de evolución muy variables (Naruya & Masatoshi, 1987).

Por otro lado, existen métodos para el análisis filogenético: Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML). El método de NeighborJoining: consiste en identificar organismos de especies desconocidas uniendo las secuencias que tengan una menor distancia genética y son consideradas agrupaciones de miembros muy similares (Naruya & Masatoshi, 1987). El método Máxima Parsimonia: muestra el menor número de cambios evolutivos y en donde los caracteres tienen la misma influencia en su estructuración (Peña, 2011). El método de Máxima Verosimilitud calcula cada árbol posible derivado de los datos según el modelo de evolución seleccionado y puede calcular la longitud de las ramas de cada árbol (Huelsenbeck & Rannala, 1997). El método NJ es el más usado en el código de barras basado en el análisis de una secuencia de ADN que permite la identificación de las especies de organismos conocidas y el descubrimiento de desconocidas (Hebert *et al.*, 2003).

5.7. Extracción de ADN en *Cactáceas*

Se ha documentado que la extracción de ADN en cactáceas representa un procedimiento complicado, debido a que llegan a contener una gran cantidad de metabolitos secundarios y polisacáridos, que conforman complejos insolubles con los ácidos nucleicos (de la Cruz *et al.*, 1997). Estos contaminantes llegan a inhibir la acción de la ADN polimerasa. La mayoría de las plantas de la familia cactácea presenta una gran cantidad de componentes mucilaginosos generando una viscosidad, por lo que complica el proceso de extracción y amplificación genómica por PCR. El ADN genómico extraído en especies de cactáceas a menudo presenta cantidades significativas de mucílago y pectina (Yang *et al.*, 2012). La pectina es uno de los principales componentes de las paredes celulares, mientras que el mucílago es un polisacárido complejo con una estructura ramificada. Por lo tanto, la extracción de ADN sin pectina ni mucílagos es un paso clave para los análisis posteriores basados en PCR (Liu *et al.*, 2017).

El componente principal de la pared celular es la pectina y varía su composición de acuerdo a la especie, las condiciones como entorno y ubicación. Los principales componentes moleculares de la pectina son cadenas α (1 \rightarrow 4) unidas al ácido D-galacturónico intercaladas por la inserción de residuos (1 \rightarrow 2) unidos a residuos adyacentes (Goycoolea, 2003). El mucílago es un componente presente en las células parenquimatosas adyacentes que retienen el agua y células grandes (idioblastos) del clorénquima (Sepúlveda *et al.*, 2007, Nobel *et al.*, 1992). Principalmente el mucílago está compuesto por complejos polisacáridos que contienen proporciones de diversos azúcares (D-xilosa, D-galactosa, piranosa, furanosa, entre otras). En la mayoría de las especies de cactus, el mucílago se secreta en respuesta a heridas y durante el proceso de extracción de ADN. Más específicamente, durante el proceso de extracción de ADN aparece mucílago tan pronto como el tejido se pulveriza, lo que dificulta significativamente la eficiencia de la extracción y purificación (Aljanabi *et al.*, 1999).

Previamente se han reportado métodos eficaces de extracción de ADN del tejido vegetal basados en el uso de Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB por sus siglas en inglés) para producir la lisis celular (Cota-Sánchez *et al.*, 2006). Los métodos convencionales de extracción de ADN implican tres pasos básicos que a menudo está contaminado con grandes cantidades de mucílago y pectina (Patrick Griffith & Mark Porter, 2003).

- Lisis de las paredes y membranas celulares.
- Eliminación de restos celulares y otros compuestos moleculares (por ejemplo, polisacáridos, metabolitos secundarios, proteínas, taninos, alcaloides y polifenoles).
- Precipitación y purificación del ADN.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colecta en campo

Se determinaron diferentes puntos de colecta en la región sureste del estado de Coahuila, tomando en cuenta la amplia distribución de cactáceas y la importancia ecológica de la zona, además, se consideró que las especies colectadas sean endémicas al territorio mexicano y que pertenecieran a la misma tribu.

Con base en los criterios antes mencionados se seleccionaron tres ejemplares por especie los cuales fueron identificados con la guía morfológica propuesta (Flores, 2005). Se colectaron 3 gramos de tejido de brotes jóvenes y aparentemente sanos, los cuales se preservaron en alcohol de 96° para su análisis posterior. Al mismo tiempo se realizó el registro de coordenadas geográficas y toma de fotografías lo cual sirvió para el almacenamiento de las muestras “respaldo” en el Herbario Antonio Narro Saltillo México, Saltillo, Coahuila México (Herbario ANSM).

6.2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN de cada una de las muestras colectadas se realizó siguiendo el protocolo de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) “modificado” propuesto por Sharma *et al.* 2003. El cual se describe a continuación:

Con la ayuda de un mortero se molió 1g de tejido vegetal finamente y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml que contenía 700 µl de CTAB (previamente precalentado), la mezcla se dejó incubando a 60 °C/50 rpm/30 min en un incumix ThermoMixer (Select Bioproducts, México). En seguida se agregaron 0.6 volúmenes de la solución cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló por inversión durante 15 min, pasado este tiempo se procedió a centrifugar a 15000 rpm/10 min con la ayuda de una microcentrífuga (Spectrafuge 16M, Labnet International, USA). Después, se transfirió 300 µl de la fase acuosa a un microtubo de 1.5 ml nuevo y se agregaron 2 volúmenes de alcohol absoluto para precipitar el ADN, nuevamente la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min para sedimentar y formar una pastilla que contenía el ADN. Posteriormente se decantó el sobrenadante (SN) cuidando la pastilla formada y en seguida, se realizaron dos lavados con etanol al 70% (400 µl y 300 µl, respectivamente) centrifugando a 1500 rpm durante 5

min entre cada lavado, nuevamente se decantó el SN cuidadosamente, la pastilla obtenida se secó durante toda la noche, finalmente se resuspendió en 80 µl de agua libre de nucleasas y se incubó por 15 minutos a 60 °C, la muestra final de ADN se guardó a -20 °C para su posterior uso.

6.3. Electroforesis de ADN

La concentración y calidad del ADN extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, a 75 voltios durante 1:45 h, utilizando marcador de peso molecular (1 Kb, Axygen, USA), para la carga de muestras se mezclaron 3 µl de ADN + 1.5 µl de buffer de carga (5x Green GoTaq Buffer + Diamond Nuclei Acid Dye, ambos de PromegaTM), el gel se visualizó mediante el Sistema Documentación Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA).

6.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR de la región *rbcL* (Tabla 4) se llevó a cabo utilizando el estuche comercial GoTaq Green Master Mix, 2XTM (Promega, USA), según las especificaciones del fabricante. El proceso consistió principalmente en preparar una mezcla de componentes previamente optimizada (Tabla 5), con un volumen final de 20 µl de cada una de las 12 muestras de ADN genómico obtenidas. Los productos de PCR (amplicones) obtenidos se verificaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, a 75 voltios durante 1:45 h, utilizando marcador de peso molecular (1 Kb, Axygen, USA), para la carga de muestras se mezclaron 3 µl de ADN + 1.5 µl de buffer de carga (previamente mencionado), el gel se visualizó mediante el Sistema Documentación Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA). Los productos de PCR que presentaron bandas inespecíficas, se purificaron utilizando el estuche comercial Wizard SV gel and PCR Clean Up SystemTM (PROMEGA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 4. Cebador *rbcL* y programa PCR utilizado para la amplificación de ADN.

Fragmento	Cebadores (5'-3')	Producto de PCR	Referencia
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> -F: ATGTCACCACAAACAG AGACTAAAGC <i>rbcL</i> -R: GTAAAATCAAGTCCAC CRCG	94°C, 5 min; 35×(94°C, 30 s; 50°C, 40 s; 72°C, 40 s); 72°C, 10 min; ∞4°C.	(Krees <i>et al.</i> 2009)

Tabla 5. Mezcla para realizar PCR (GoTaq MasterMix de Promega™).

Componentes	Volumen	Concentración
GoTaq Green Master Mix, 2X	10 µl	1X
Primer forward	2 µl	0.1-1.0 µM
Primer reverse	2 µl	0.1-1.0 µM
ADN templado	1 µl	<250 ng
Agua libre de nucleasas	5 µl	N.A.

6.5. Secuenciación

Se enviaron 300 ng de producto de PCR y 5µl de cebadores de cada muestra al servicio de secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del CINVESTAV, Irapuato, México.

6.6. Análisis Bioinformático

6.6.1. Edición de electroferogramas

Los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación de ADN fueron visualizados mediante el programa bioinformático Unipro UGENE y con base en la definición de los picos o curvas de fluorescencia, (universalmente están asignados colores por cada base; verde para la adenina, rojo para la timina, negro para guanina y azul para citosina), se determinó la calidad de las secuencias generadas en esta investigación (secuencias de consulta).

En seguida, se procedió a realizar el corte de los lados extremos de las secuencias, con la finalidad de eliminar bases ambiguas que tienen un bajo reconocimiento de bases correctas, lo cual afecta la calidad de la secuencia. Finalmente se eligió la región que mostrará una secuenciación de buena calidad para su análisis.

6.6.2. Alineamiento de secuencias

Un alineamiento múltiple es un método en el que comparan mayor o igual a dos secuencias de ADN. Las secuencias comparadas en las bases de datos se utilizaron para realizar un alineamiento múltiple con Clustal W, pero esto puede hacerse directamente desde el programa MEGA, para lo que se entra en el menú desplegable “Aligment” y se selecciona la opción “Align by ClustalW”. El alineamiento de secuencias consistió en dos etapas:

6.6.2.1. Descarga de secuencias de referencia

El Sistema de Datos de Código de Barras de la Vida (BOLD Systems por sus siglas en inglés) es una plataforma de análisis y almacenamiento de datos a través de la identificación de especies basada en el ADN de donde se descargaron nueve secuencias de referencia en formato FASTA (Tabla 6), correspondientes a la región *rbcL* las cuales sirvieron como guía para el alineamiento de las secuencias de consulta. Considerando un rango de entre 100 pares de bases mayor o menor a la secuencia generada, previamente analizando que no tengan espaciadores no codificantes, ni caracteres que dificultarían su alineamiento y limitarían su utilidad en estudios filogenéticos a niveles taxonómicos (Paz *et al.*, 2011).

Tabla 6. Secuencias de referencia, tomadas del repertorio BOLD SYSTEMS junto con las descripciones de las secuencias.

Identificador (Bold Systems)	Marcador	Especie
KC777014	<i>rbcL</i>	<i>Astrophytum coahuilense</i>
KC776996	<i>rbcL</i>	<i>Astrophytum asterias</i>
KC777019	<i>rbcL</i>	<i>Astrophytum capricorne</i>
CACTB010	<i>rbcL</i>	<i>Mammillaria parkinsonii</i>
IHGTI012	<i>rbcL</i>	<i>Mammillaria columbiana</i>
SDH781	<i>rbcL</i>	<i>Mammillaria dioica</i>
SDH3280	<i>rbcL</i>	<i>Ferocactus viridescens</i>
SDH779	<i>rbcL</i>	<i>Ferocactus cylindraceus</i>
MG246587	<i>rbcL</i>	<i>Coryphantha vivipara</i>

6.6.2.2. Creación de biblioteca con secuencias de consulta

Se creó un archivo en formato FASTA con las secuencias de consulta editadas, un total de nueve secuencias correspondientes a tres especies de cactus formaron parte de la biblioteca de datos generados en el laboratorio. El alineamiento y ajuste de las secuencias de referencia y las secuencias de consulta se llevó a cabo utilizando la herramienta de ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implementado en MEGA X (Tamura *et al.*, 2011).

6.6.3. BLAST

Con la ayuda de la página de Internet del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), la cual es una base de datos que cuenta con repositorios como la herramienta BLAST que encuentra regiones de similitud entre secuencias para validar la identificación taxonómica. Se realizó la identificación de las secuencias generadas a partir de un análisis BLAST en BLASTn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) considerando un valor de $E < 1 \times 10^{-5}$ y aciertos máximos (98 o 100%) con una especie.

6.6.4. Análisis en MEGA X

El software de Análisis Genético Evolutivo Molecular (MEGA X) permitió realizar análisis de la genética evolutiva molecular, sirvió para interpretar la filogenia de las especies en estudio.

6.6.5. Evaluación de la calidad de secuencias

La calidad de las secuencias de consulta se realizó en MEGA X a partir del archivo FASTA que contenía el alineamiento de las secuencias. Con la herramienta de “Exploración de datos de secuencia” se obtuvo la información para la identificación de **Sitios variables (V)**: presentan alguna variación de nucleótido en al menos una de las secuencias comparadas. **Sitios conservados (C)**: regiones que no varían en grupo de secuencias o eventos de mutación, tales como **sustitución de bases** (cambio entre bases), **inserciones** (adición de una nueva base en la secuencia), **deleciones** (eliminación de una base). **Indels (Pi)**: los gaps también se conocen como Indels y son llamados así porque representan una inserción o una deleción en el genoma (Thompson *et al.*, 1994).

6.6.6. Construcción del Dendrograma

La historia evolutiva se infirió mediante el método de unión de vecinos (Saitou & Nei, 1987), el resultado es un árbol o dendrograma óptimo con la suma de la longitud de la rama (tasa evolutiva). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2 parámetros de Kimura (K2P) (Kimura, 1980) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Únicamente las especies con múltiples individuos que formaron un clado monofilético en el árbol se consideraron identificadas con éxito. Dicho análisis se realizó en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018; Stecher *et al.*, 2020).

7. RESULTADOS

7.1. Colecta en campo

En cuatro localidades de la región sureste del estado de Coahuila, México (Fig. 3). Se colectaron e identificaron morfológicamente las siguientes especies de cactáceas: *Ferocactus hamathacanthus* (Fig. 4 a), *Mammillaria chionocephala* (Fig. 4 b), *Mammillaria heyderi* (Fig. 4 c), *Sclerocactus scherii* (Fig. 4 d), cada especie estuvo representada por tres ejemplares, teniendo un total de 12 muestras colectadas (Tabla 7).

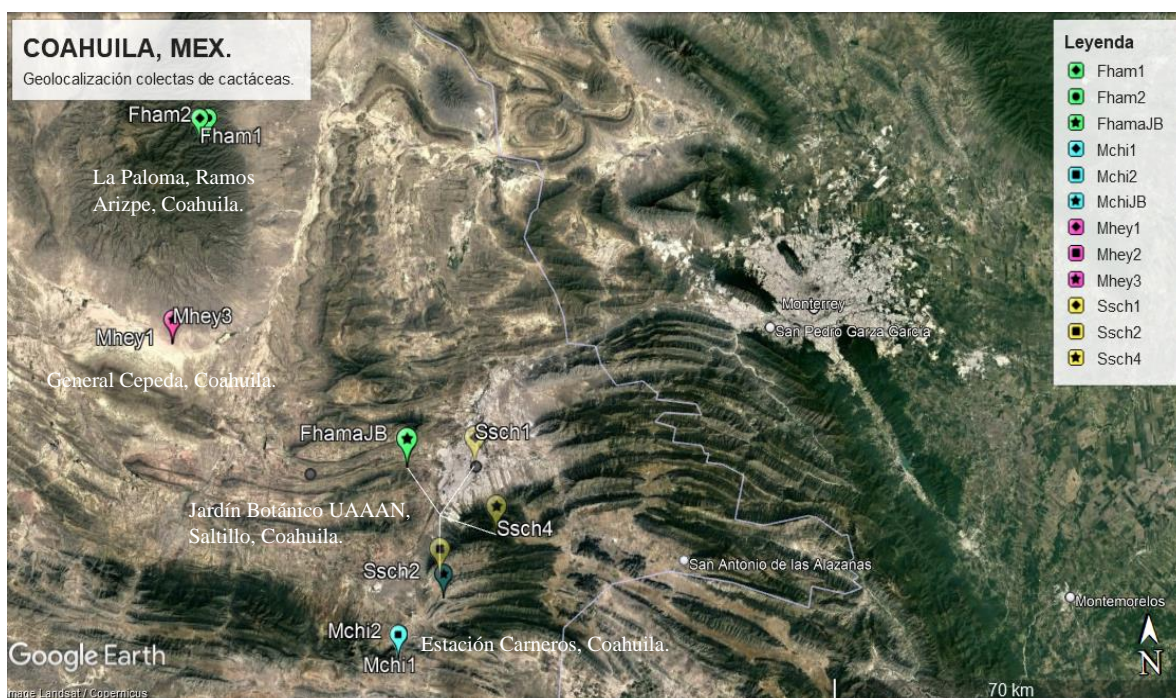


Figura 3. Puntos de colecta de cuatro especies de cactáceas en la región sureste del estado de Coahuila, México.



Figura 4. Especimenes colectados: a) *Ferocactus hamathacanthus*, b) *Mammillaria chionocephala*, c) *Mammillaria heyderi*, d) *Sclerocactus scherii*.

Tabla 7. Especies y localización geográfica de muestras colectadas

Espece	Identificador Herbario ANSM	Identificador de colecta	Latitud y Longitud	Altitud (msnm)	Localidad
<i>Ferocactus hamathacanthus</i>	103215	Fham1	25°59'27.8"N 101°29'05.8"W	1421	La Paloma, Sierra La Paila, Ramos Arizpe, Coahuila.
	103216	Fham2	25°59'27.7"N 101°28'06.2"W	1419	La Paloma, Sierra La Paila, Ramos Arizpe, Coahuila.
	103217	FhamaJB	25°21'20"N 101°01'56"W	1776	Jardín Botánico UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila.
<i>Mammillaria chionocephala</i>	103235	Mchi1	25°07'16.4"N 101°07'17.5"W	2333	Estación Carneros, Saltillo; Coahuila.
	103202	Mchi2	25°07'16.2"N 101°07'17.8"W	2335	Estación Carneros, Saltillo; Coahuila.
	103205	MchiJB	25°21'21"N 101°01'58"W	1776	Jardín Botánico UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila.
<i>Mammillaria heyderi</i>	103221	Mhey1	25°39'17.3"N 101°32'40.9"W	1138	General Cepeda, Coahuila.
	103222	Mhey2	25°39'16.8"N 101°32'38.7"W	1139	General Cepeda, Coahuila.
	103223	Mhey3	25°39'17.6"N 101°32'37.2"W	1141	General Cepeda, Coahuila.
<i>Sclerocactus scherii</i>	103218	Ssch1	25°21'29"N 101°02'10"W	1748	Jardín Botánico UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila.
	103219	Ssch2	25°21'29"N 101°02'10"W	1748	Jardín Botánico UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila.
	103220	Ssch4	25°21'29"N 101°02'09"W	1750	Jardín Botánico UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila.

7.2. Extracción de ADN genómico

Con el método de extracción de ADN utilizado se logró la extracción exitosa de las doce muestras colectadas. Se obtuvo ADN con la calidad óptima para su uso en la amplificación de ADN por PCR (Figura 5).

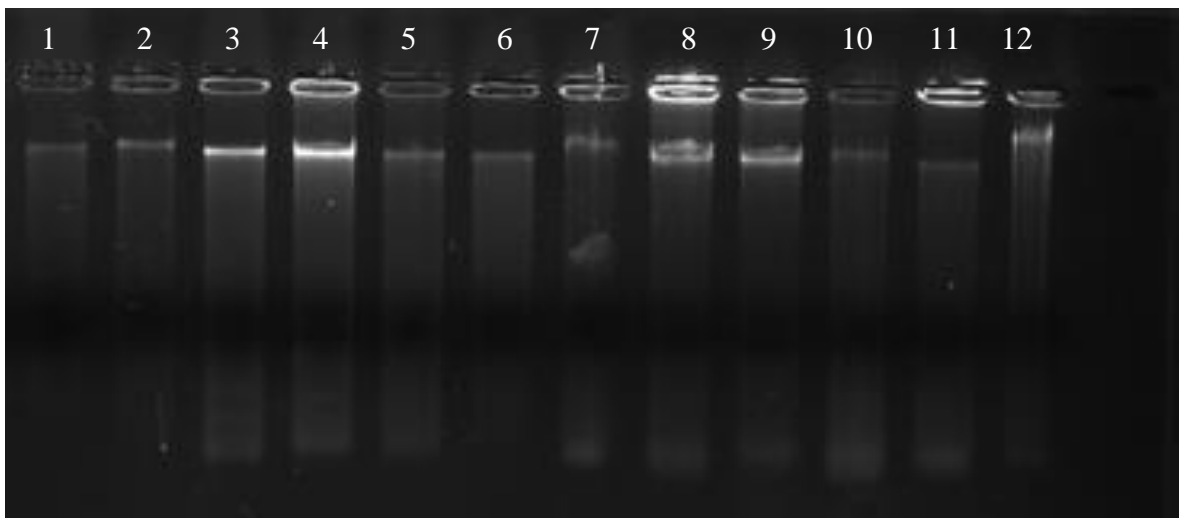


Figura 5. Extracción de ADN genómico en muestras de especies de cactus. Carriles 1-3 *Ferocactus hamathacantus*, carriles 4- 6 *Mammillaria heyderi*, carriles 7-9 *Mammillaria chionocephala*, carriles 10-12 *Sclerocactus scherii*.

7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La figura 6 muestra la obtención de productos de PCR correspondientes al fragmento *rbcL* en las diferentes especies colectadas, con un tamaño de bandas que oscila entre los 500-550 pb. La figura 7 indica la purificación de los productos de PCR en una reacción de 60 μ l.

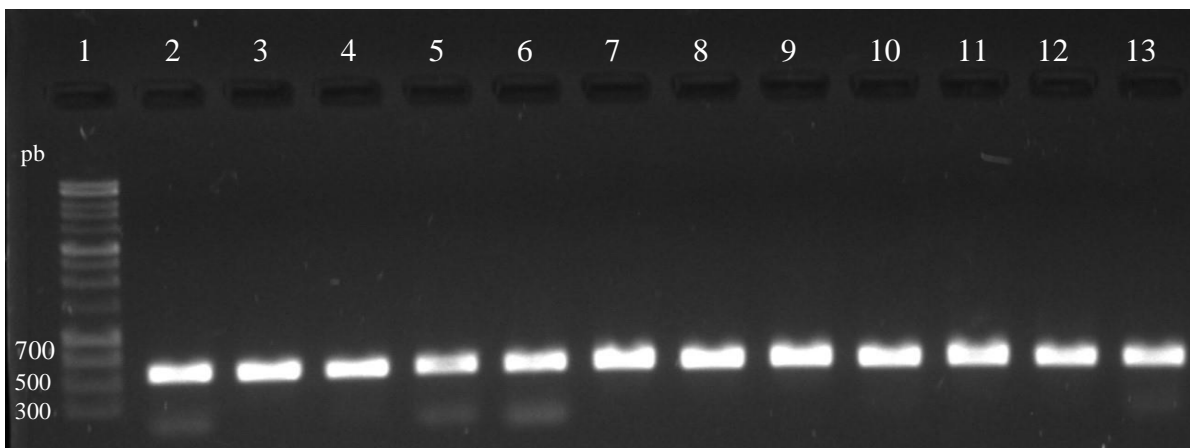


Figura 6. Productos de PCR obtenidos a partir del iniciador *rbcL*. Carril 1 marcador de peso molecular, Carriles 2-4 muestran los amplicones de *Ferocactus hamathacantus*, carriles 5-7 *Mammillaria heyderi*, carriles 8-10 *Mammillaria chionocephala*, los carriles 11-13 *Sclerocactus scherii*.

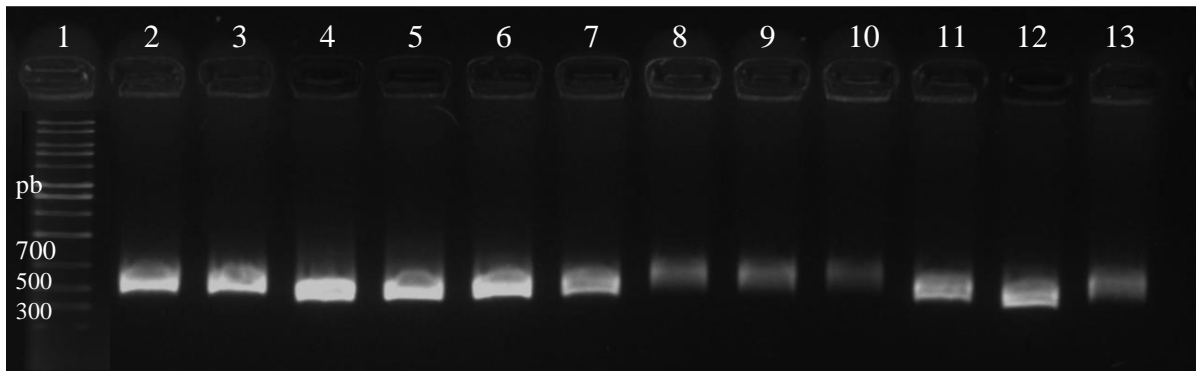


Figura 7. Purificación de gel de agarosa a partir de reacciones de PCR de 60 μ l. Carril 1 marcador de peso molecular, Carriles 2-4 muestran los amplicones de *Ferocactus hamathacantus*, carriles 5-7 *Mammillaria heyderi*, carriles 8-10 *Mammillaria chionocephala*, los carriles 11-13 *Sclerocactus scherii*.

7.4. Análisis de secuencias

La obtención de secuencias de buena calidad o recuperabilidad de secuencias fue del 100%, esto debido a que los electroferogramas presentaron una lectura de nucleótidos certera en más del 90% del total de longitud se secuencia de los 12 especímenes analizados.

7.5. Edición de secuencias

La visualización de los electroferogramas permitió verificar la calidad de las secuencias y determinar el uso de las mismas las figuras 8-11 muestran la intensidad de lectura que alcanzaron los picos de cada base nitrogenada, con ello se determinó que las secuencias de consulta generadas fueron de buena calidad.

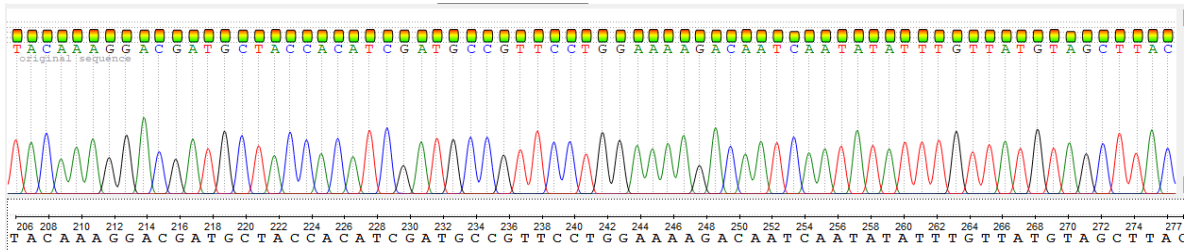


Figura 8. Electroferograma de *Mammillaria chionocephala*.

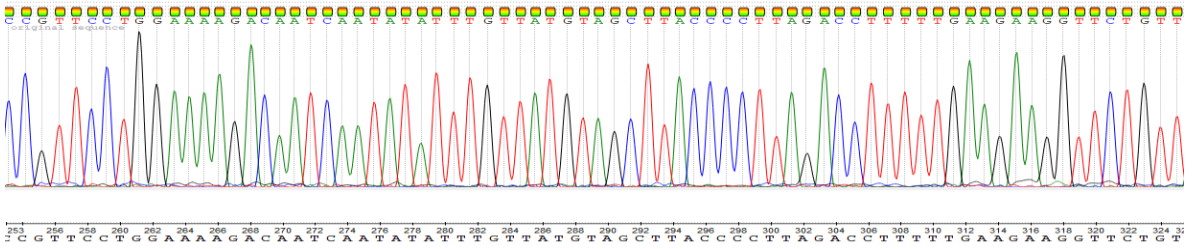


Figura 9. Electroferograma de *Ferocactus hamathacanthus*.

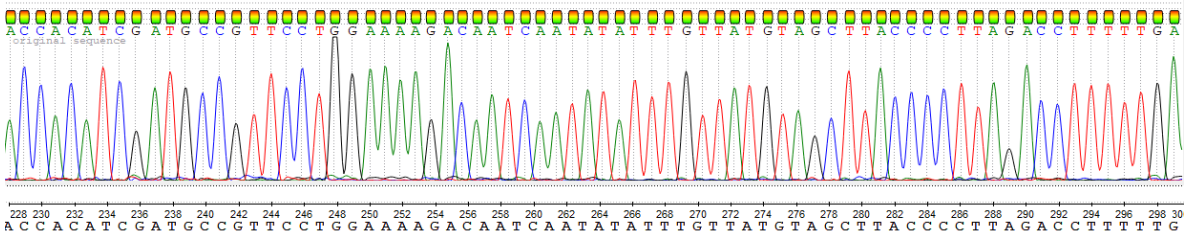


Figura 10. Electroferograma de *Mammillaria heyderi*.

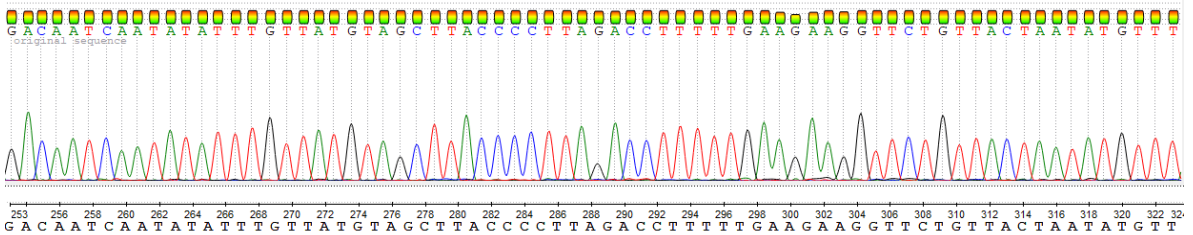


Figura 11. Electroferograma de *Sclerocactus scherii*.

7.5.1. Corte de extremos

Típicamente se eliminan los extremos de las secuencias, dado que no presentan una lectura de nucleótidos bien definida, homogéneos o con bases determinadas, lo cual, interfiere en análisis posteriores. Para ello, se consideró conservar la mayor cantidad de nucleótidos, tomando en cuenta que las barras superiores al gráfico sirven como indicadores sobre la calidad de la lectura en los nucleótidos, además, se conservaron regiones con un rango de longitud entre los 500 a 552 pb de las 12 muestras, mientras que los lados extremos fueron eliminados (Figuras 12 y 13).

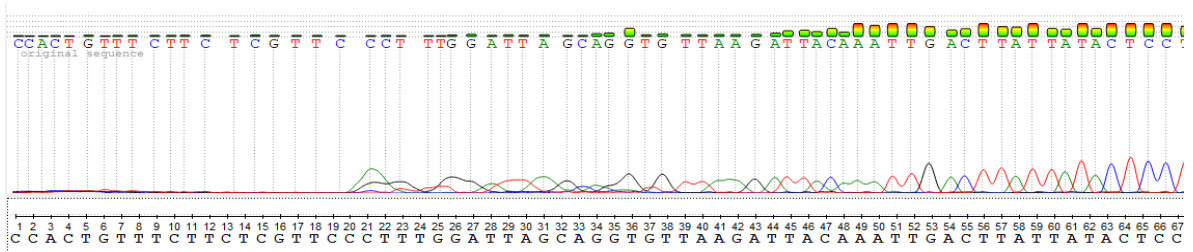


Figura 12. Extremo 5' del electroferograma de *Ferocactus hamathacanthus*.

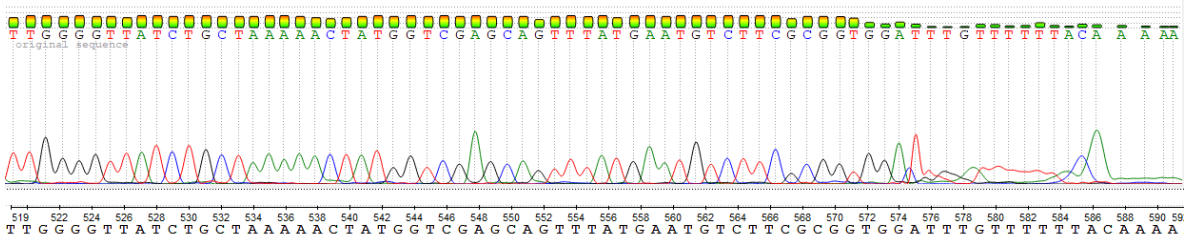


Figura 13. Extremo 3' del electroferograma de *Ferocactus hamathacanthus*.

7.6. Análisis en BLAST

El análisis BLAST determina la identificación taxonómica de una muestra, la identificación puede ser a nivel de género, especie, o en su caso cuando se identifican diferentes géneros y especies se considera como una identificación ambigua. En este estudio, las secuencias de consulta proporcionaron un poder de identificación variable en las especies (Tabla 8-10). Así, la mayor identificación a nivel de género se obtuvo en las seis secuencias de *Mammillaria* con un porcentaje del 100%, mientras que las tres secuencias pertenecientes a *Sclerocactus scherii* fueron identificadas a nivel de especie con un porcentaje de identificación del 100%, finalmente la identificación de *Ferocactus hamathacanthus* fue ambigua.

Tabla 8. Identificación género *Mammillaria* con porcentajes de identidad de la herramienta BLAST y delimitación de las secuencias.

Especies	# Pb seleccionadas	Blast (%)	Identificación
Mchi1_rb	524	100	Género
Mchi2_rb	523	100	Género
MchiJB_rb	532	100	Género
Mhey1_rb	519	100	Género
Mhey2_rb	518	100	Género
Mhey3_rb	525	100	Género

Tabla 9. Identificación especie *Sclerocactus* con porcentajes de identidad de la herramienta BLAST y delimitación de las secuencias.

Especies	# Pb seleccionadas	Blast (%)	Identificación
Ssch1_rb	515	100	Especie
Ssch2_rb	511	100	Especie
Ssch4_rb	528	100	Especie

Tabla 10. Identificación ambigua *Ferocactus* con porcentajes de identidad de la herramienta BLAST y delimitación de las secuencias.

Especies	# Pb seleccionadas	Blast (%)	Identificación
Fham1_rb	519	100	Ambigua
Fham2_rb	531	100	Ambigua
FhamJB_rb	552	99.64	Ambigua

7.7. Alineamiento de las secuencias

El alineamiento múltiple permite comparar secuencias conforme a la homología de las bases, es decir, que lleguen a compartir un ancestro en común. Al realizar el alineamiento de las secuencias de consulta resaltan las zonas de similitud (señalizadas con asteriscos en Figura 14), y al mismo tiempo permitió verificar la presencia de polimorfismos. Además, se delimitó el alineamiento cortando aquellos extremos que no tenían similitud alguna entre las múltiples bases lo cual causa espacio o “gaps” que representaran posibles deleciones o inserciones en la secuencia (Figura 15).



Figura 14. Fragmento del alineamiento múltiple de secuencias de Consulta.

observa la alta similitud entre secuencias (tres) de la misma especie, es decir, el uso de tres especímenes por especie resultó en una identificación correcta a nivel de especie en los cuatro taxones analizados.

El dendrograma generado muestra un punto de ramificación que se encuentra justo en la base del dendrograma, lo cual indica claramente un evento de especiación o divergencia entre los géneros, esto permitió a su vez, la formación de tres clados monofiléticos con los géneros *Ferocactus*, *Mammillaria* y *Sclerocactus* (respectivamente) estos dos últimos muestran una mayor similitud entre secuencias, respecto al género *Ferocactus*.

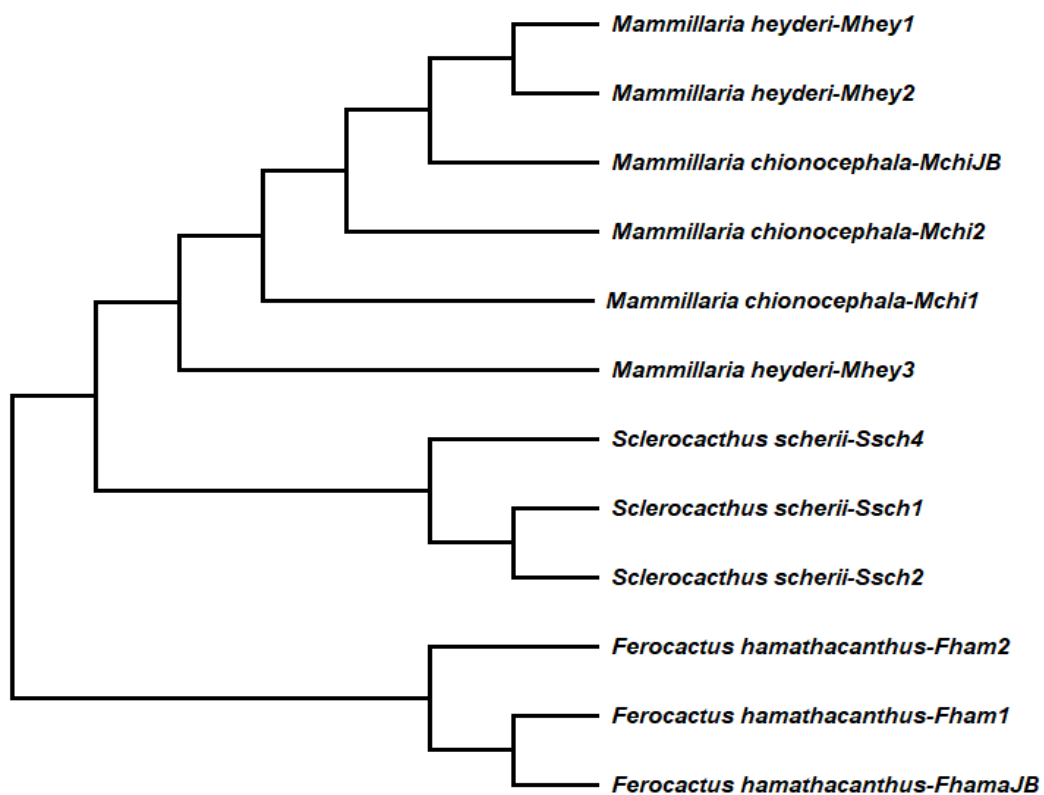


Figura 19. Dendrograma de especies *Cactaceae* a partir de un análisis de vecinos cercanos usando la región *rbcL* y con base en la distancia genética K2P.

8. DISCUSIÓN

Los miembros de la familia Cactaceae se pueden encontrar en una amplia gama de hábitats incluidos climas fríos, selvas tropicales y en zonas desérticas. Su distribución está limitada por los requerimientos fisiológicos y ambientales de cada especie en particular. Se han llevado a cabo estudios genéticos a nivel poblacional en varias especies de cactus, mostrando patrones evolutivos asociados con rasgos de historia de vida (Hamrick *et al.*, 2002). Por ejemplo, se han utilizado datos genéticos para definir las relaciones y el estado de las especies (Baker & Butterworth, 2013), determinando la alta diversidad genética y baja diferenciación de poblaciones como estrategias de identificación.

Desafortunadamente, la incertidumbre taxonómica no solo afecta negativamente la comprensión de procesos evolutivos en la familia de los cactus, sino que puede ser una amenaza importante para comprender la diversidad de las cactáceas. La conservación adecuada de las especies solo va a ser posible implementando estrategias moleculares que permitan conocer las relaciones y los límites evolutivos de las especies en comparación con sus parientes cercanos. Desde el punto de vista de la genética de la conservación, es de central interés conocer tanto los mecanismos de diversificación como una correcta identificación taxonómica por las amenazas que presentan estos grupos (Breslin *et al.*, 2021). Esto fragiliza a grandes cantidades de especímenes, poniendo en riesgo su diversidad biológica e impactando a nivel ecológico y económico. Por lo que se requieren estudios más específicos para producir clasificaciones taxonómicas más estables y comprender la divergencia de las especies. En particular, la familia de los cactus es un sistema ideal para estudiar los fundamentos de los mecanismos de especiación, potenciando así los análisis filogenéticos de grupos endémicos de la región sureste del estado de Coahuila con la implementación de marcadores genéticos, aprovechando técnicas de secuenciación y análisis de datos genómicos. Actualmente existen sistemas de verificación molecular como el código de barras de ADN. El código de barras ha sido utilizado exitosamente en la verificación de la identidad taxonómica de especies, permitiendo tener un mayor control de información en bases de datos. La caracterización molecular es un sistema muy efectivo para la diferenciación de especies que no pueden ser diferenciadas morfológicamente (Gathier *et al.*, 2013).

En este estudio la amplificación de la región *rbcL* presente en las doce secuencias de especies de cactáceas, mostró resultados consistentes como un buen indicador por sus altas tasas de éxito en amplificación obteniendo productos de amplificación del tamaño esperado. En cuanto a la secuenciación de los productos amplificados se obtuvieron secuencias de buena calidad en las muestras de referencia. Resultados similares han sido reportados en diferentes grupos de plantas (Amandita *et al.*, 2019; Fazekas *et al.*, 2008; Maloukh *et al.*, 2017). Confirmando que es posible la amplificación y secuenciación de buena calidad, en condiciones óptimas con los cebadores *rbcL* previamente reportados que aquí se utilizaron (Kress *et al.*, 2009). En estudios previos se ha aceptado como código de barras la combinación de regiones codificantes como *rbcL* con regiones intergénicas no codificantes (Kress *et al.*, 2009). La combinación de *rbcL* Y trnL-F se ha usado con éxito en la discriminación de especies (Hollingsworth *et al.*, 2009). Los resultados indican que la región del cloroplasto *rbcL* es un candidato viable para la identificación de especies en la familia Cactaceae sin la necesidad de combinación con regiones intergénicas no codificantes siendo útil como código de barras para las especies de la tribu Cactaeae. En este estudio presentaron resultados variables mostrando que la secuencia *rbcL* tuvo una cobertura alta de amplificación (100%), secuenciación (100%) y alineación (96%). Dentro de las angiospermas el gen *rbcL* ha sido ampliamente secuenciado y utilizado para inferir filogenias de plantas a niveles taxonómicos superiores (Hernández-Hernández *et al.*, 2011). Desafortunadamente *rbcL* no suele contener información para resolver las relaciones entre géneros estrechamente relacionados (Gielly & Taberlet, 1994), también se ha observado que el nivel de variación interespecífico es bajo (Gielly & Taberlet, 1994; Renner, 1999). En un estudio previo, se evaluaron 10,000 secuencias de *rbcL* del Gen Bank, como código de barras en diferentes grupos, teniendo un 88% de eficacia en musgos, sin embargo, en otros grupos se encuentra altamente conservada siendo un fracaso para gimnospermas (Newmaster *et al.*, 2006).

El método basado en similitudes de secuencia (BLAST) nos mostró que las secuencias analizadas tienen identificaciones correctas tanto a nivel género como especie, diferentes estudios han reportado altos porcentajes de identificación a nivel de género y especie, con el método de BLAST (Cabelin & Alejandro, 2016; García *et al.*, 2013; Maloukh *et al.*, 2017). Pacheco-Reyes *et al.*,(2021) reporta altos porcentajes de identificación (98.1%) en especies

de encinos, confirmando lo prometedor que es la región *rbcL* para su identificación. Permittiéndonos encontrar coincidencias correctas a pesar de variaciones de longitud de la secuencia, espacios, presencia de Indels (inserciones-delecciones) en la secuencia. Utilizando un algoritmo de alineamiento global, como el que se utiliza en el sistema de datos del código de barras de la vida (BOLD), que es más eficiente para alinear secuencias con variación de longitud con una mayor información concreta y precisa. Finalmente, este trabajo muestra que los resultados coinciden con lo expuesto por varios autores con respecto al poder discriminatorio de *rbcL*. Siendo un marcador muy utilizado en estudios filogenéticos de plantas por su robustez para ubicar un espécimen no identificado en la familia, el género y en algunos casos la especie a la que pertenece (Kress & Erickson, 2007).

En los análisis mediante la metodología de unión de vecinos cercanos (NJ) y distancias evolutivas para las doce secuencias de cactáceas se generaron 3 clados monofiléticos conforme a los géneros de las especies de acuerdo al marcador utilizado. Los resultados del árbol (NJ) proporcionó información importante sobre las relaciones filogenéticas pertenecientes a la tribu *Cactaeae*. Sin embargo a pesar que la región *rbcL* tiene una amplificación universal, su tasa de evolución es relativamente baja (Simeone *et al.*, 2013). En un análisis a 99 especies de 80 géneros de 53 familias de *rbcL* fue por mucho, la que presentó menor divergencia 0.38% en comparación de otros marcadores (Kress *et al.*, 2005). En helechos se obtuvieron secuencias homólogas entre distintas especies, sin embargo, utilizando en conjunto *rbcL* y *trnL.F* se logró la identificación de género y especie del 100% (de Groot *et al.*, 2011). Aunado a esto, García y colaboradores (2013) analizaron dos marcadores en 3 especies de *Hylocereus* y 2 de *Selenicereus*, reportan que el fragmento *matK* no presentó variación entre las especies de *Hylocereus*, mientras que *rbcL* les permitió discriminar a nivel intragénero, siendo similar a lo obtenido en nuestro trabajo. Sin embargo, en un análisis de la tribu *Cactaeae* (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013), indican que los árboles filogenéticos hechos con los marcadores *matK* y *rbcL* tienen una enorme influencia para determinar las relaciones entre los principales clados (nodos basales) a pesar del bajo número de caracteres informativos como en este trabajo. De igual manera en un análisis con cinco grupos críticos de la flora de México (Agaváceas, Cactáceas, Orquidáceas, Coníferas y Crasuláceas), se encontró que, aunque la resolución a nivel familia fue excelente, el código de barras estándar de *rbcL* tuvo un desempeño variable en la discriminación a nivel género y

especie (Gernandt *et al.*, 2011), lo que fue similar a este estudio donde el uso de *rbcL* en cactáceas logro la identificación de las secuencias de una manera correcta a nivel familia, género pero a nivel especie *Ferocactus* tuvo una identificación ambigua mostrando un punto de ramificación que se encuentra justo al inicio del dendrograma partiendo así a un mismo de un ancestro en común indicándonos un evento de especiación o divergencia entre el género *Ferocactus* sobre *Mammillaria* y *Sclerocactus*. Para que un conjunto de secuencias de distintos organismos que teóricamente están relacionados sean comparables entre sí y determinen sucesos que pudieron surgir entre linajes desde que estas secuencias divergieron a partir de un ancestro común. Cuando se conforma una matriz de datos previo a las diversas secuencias no siempre van a coincidir las bases, esto debido a que las secuencias poseen distintas longitudes que van generando el desplazamiento de las bases por ello es preciso llevar a cabo, un alineamiento.

9. CONCLUSIONES

La extracción, amplificación y secuenciación de ADN fue exitosa en todas las muestras de cactus analizadas.

Se logró la caracterización molecular de doce especímenes mediante el marcador *rbcL*

Con base en los análisis bioinformáticos se obtuvieron altos porcentajes de identificación de las secuencias generadas en este estudio.

La metodología de BLAST proporcionó diferentes porcentajes de identificación a nivel de género, especie o ambigua en los especímenes.

La metodología de unión de vecinos cercanos generó un árbol con tres clados los cuales mostraron el agrupamiento de las especies por género pertenecientes a la familia Cactaceae.

Este análisis muestra que, dada la universalidad y la capacidad para distinguir entre especies del género *Mammillaria*, *Sclerocactus* y *Ferocactus* el uso del marcador *rbcL* como código de barras de ADN parece ser esencial en la discriminación de grupos de plantas estrechamente relacionadas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S., Forget, L., & Dookun, A. (1999). An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide-and Polyphenol-Free Sugarcane DNA. In *Plant Molecular Biology Reporter* (Vol. 17).
- Amandita, F. Y., Rembold, K., Vornam, B., Rahayu, S., Siregar, I. Z., Kreft, H., & Finkeldey, R. (2019). DNA barcoding of flowering plants in Sumatra, Indonesia. *Ecology and Evolution*, 9(4), 1858–1868. <https://doi.org/10.1002/ECE3.4875>
- Arias, S. (2017). La sistemática de cactáceas en México, breve recuento y perspectivas. *Botanical Sciences*, 63, 153. <https://doi.org/10.17129/botsci.1574>
- Baker, M. A., & Butterworth, C. A. (2013). Geographic distribution and taxonomic circumscription of populations within *Coryphantha* section *Robustispina* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 100(5), 984–997. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200619>
- Blaxter, M. (2003). Molecular systematics Counting angels with DNA. *Nature Publishing Group*, 421, 122–124.
- Breslin, P. B., Wojciechowski, M. F., & Majure, L. C. (2021). Molecular phylogeny of the Mammilloid clade (Cactaceae) resolves the monophyly of *Mammillaria*. *TAXON*, 70(2), 308–323. <https://doi.org/10.1002/tax.12451>
- Bueno, V., & Plumed, J. (2017). *Los Cactus* (Universidad de Valencia, Ed.; Vol. 4). http://jardibotanic.org/fotos/pdf/publicacion_2_111_CACTUS-ESP-BAJAaaa.pdf
- Cabelin, V. L. D., & Alejandro, G. J. D. (2016). Efficiency of matK, *rbcL*, trnH-psbA, and trnL-F (cpDNA) to Molecularly Authenticate Philippine Ethnomedicinal Apocynaceae Through DNA Barcoding. *Pharmacognosy Magazine*, 12(Suppl 3), S384. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.185780>
- CBOL, Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., & Ratnasingham, S. (2009). A DNA barcode for land plants. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0905845106
- Cota-Sánchez, J. H., Remarchuk, K., & Ubayasena, K. (2006). *Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue*.
- Cristians Niizawa, S. (2020). *DNA barcodes as a tool for medicinal plants authentication*. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/>
- de Groot, G. A., During, H. J., Maas, J. W., Schneider, H., Vogel, J. C., & Erkens, R. H. J. (2011). Use of *rbcL* and trnL-F as a Two-Locus DNA Barcode for Identification of NW-European Ferns: An Ecological Perspective. *PLOS ONE*, 6(1), e16371. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0016371>

- de la Cruz, M., Ramirez, F., & Hernandez, H. (1997). DNA Isolation and Amplification from Cacti. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(4), 319–325. <https://doi.org/10.1023/A:1007428818078>
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., Percy, D. M., Hajibabaei, M., & Barrett, S. C. H. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE*, 3(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>
- Flores, A. (2005). *Guía de Cactáceas del Estado de Coahuila*. <https://sma.gob.mx/wp-content/uploads/2021/09/cactus.pdf>
- Gámez, M., Villavicencio, E., Serrato, M. A., Mejía, M., Treviño, G., & Martínez, L. (2016). *Conservación y aprovechamiento sostenible de especies ornamentales nativas de México*. www.gob.mx/sagarpa*snics.sagarpa.gob.mx
- García, M. A., Terrazas, T., Segura, L. O., Arias, S., Vibrans, H., & López-Mata. (2013). *Caracterización molecular de tres especies de Hylocereus (Cactaceae) presentes en México*. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 (1): 13 - 22. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v36n1/v36n1a2.pdf>
- Gathier, G., van der Niet, T., Peelen, T., van Vugt, R. R., Eurlings, M. C. M., & Gravendeel, B. (2013). Forensic Identification of CITES Protected Slimming Cactus (*Hoodia*) Using DNA Barcoding. *Journal of Forensic Sciences*, 58(6), 1467–1471. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12184>
- Gernandt, D., Salazar, G., Vergara, F., Arias, S., Sosa, V., García, A., Reyes, J., Cabrera, L., & Rosas, P. (2011). *Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México*. 1–33. www.conabio.gob.mx
- Gibson, A. C., & Nobel, P. S. (1986). *The cactus primer* Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Gielly, L., & Taberlet, P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 11(5), 769–777. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040157>
- Goycoolea, Francisco. (2003). *Pectins from Opuntia spp.: A short review*. <https://www.researchgate.net/publication/228769966>
- Hamrick, J., Nason, D., Fleming, T., & Nassar, J. (2002). *Cactus columnares y sus mutualistas*. The University of Arizona Press. <https://uapress.arizona.edu/book/columnar-cacti-and-their-mutualists>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

- Hernández-Hernández, T., Hernández, H. M., Arturo De-Nova, J., Puente, R., Eguiarte, L. E., & Magallón, S. (2011). Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany*, 98(1), 44–61. <https://doi.org/10.3732/AJB.1000129>
- Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K. J., John Kress, W., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S. C. H., van den Berg, C., Bogarin, D., ... Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0905845106>
- Huelsenbeck, J. P., & Rannala, B. (1997). Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5310), 227–232. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5310.227>
- Jáuregui, M. de Jesús. (2015). *Código de barras de la vida y análisis filogenético en Dasyilirion cedrosanum y D. berlandieri con base en secuencias de DNA citoplasmático*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro .
- Jiménez Sierra, Cecilia. (2011). Las cactáceas mexicanas y Los riesgos que enfren-tan. *Revista Digital Universitaria* , 12, 1–23.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Korotkova, N., Borsch, T., & Arias, S. (2017). A phylogenetic framework for the Hylocereeae (Cactaceae) and implications for the circumscription of the genera. *Phytotaxa*, 327(1), 1–46. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.327.1.1>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLoS ONE*, 2(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O., & Bermingham, E. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18621–18626. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0909820106>
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 30, Issue 1, pp. 25–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008>
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 102(23), 8369–8374.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>

- 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(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., & Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. In *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* (Vol. 90, Issue 1, pp. 157–166). <https://doi.org/10.1111/brv.12104>
- Liu, Z. F., Ci, X. Q., Li, L., Li, H. W., Conran, J. G., & Li, J. (2017). DNA barcoding evaluation and implications for phylogenetic relationships in Lauraceae from China. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175788>
- Maloukh, L., Kumarappan, A., Jarrar, M., Salehi, J., El-wakil, H., & Rajya Lakshmi, T. v. (2017a). Discriminatory power of *rbcL* barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. *3 Biotech*, 7(2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S13205-017-0746-1/FIGURES/2>
- Maloukh, L., Kumarappan, A., Jarrar, M., Salehi, J., El-wakil, H., & Rajya Lakshmi, T. v. (2017b). Discriminatory power of *rbcL* barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. *3 Biotech*, 7(2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S13205-017-0746-1/FIGURES/2>
- Márquez Valdelamar, L. Margarita., Serrato Díaz, Alejandra., & Cerritos Flores, René. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. In Amelia. Romero, Alejandra. Serrato, Beatriz. Rendón, & Martha. Rocha (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (1st ed., Vol. 1, pp. 240–242). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)
- Naruya, S., & Masatoshi, N. (1987). *The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*. <https://academic.oup.com/mbe/article/4/4/406/1029664>
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., & Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: Evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. In *Canadian Journal of Botany* (Vol. 84, Issue 3, pp. 335–341). <https://doi.org/10.1139/B06-047>
- Nobel, P. S., Cavelier, J., & Andrade, J. L. (1992). Mucilage in Cacti: Its Apoplastic Capacitance, Associated Solutes, and Influence on Tissue 5. *Journal of Experimental Botany*, 43(5), 641–648. <https://doi.org/10.1093/JXB/43.5.641>
- Nyffeler, R. (2002). Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnK/matK* and *trnL-trnF* sequences. *American Journal of Botany*, 89(2), 312–326. <https://doi.org/10.3732/AJB.89.2.312>

- Pacheco-Reyes, F. C., Wei, L., & Perez-Rodriguez, M. A. (2021). Análisis filogenético de especies de *Quercus* L. utilizando tres códigos de barras de ADN. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(2). <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.2831>
- Patrick Griffith, M., & Mark Porter, J. (2003). Back to the basics: a simple method of DNA extraction for mucilaginous cacti. *Bradleya*, 21(21), 126–128. <https://doi.org/10.25223/brad.n21.2003.a1>
- Paz, A., Maily Gonzalez, B. , & Crawford, A. J. (2011). CÓDIGOS DE BARRAS DE LA VIDA: INTRODUCCIÓN Y PERSPECTIVA DNA Barcode of Life: An Introduction and Perspective. *Acta Biol. Colomb*, 16(3), 161–176.
- Peña, C. (2011). *Métodos de inferencia filogenética*. Revista Peruana de Biología . http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332011000200023&script=sci_arttext
- Pérez Valenzuela, G., & Carmen, D. (2016). *MACRO RED ORNAMENTALES Conservación y aprovechamiento sostenible de especies ornamentales nativas de México Dirección SNICS*. www.gob.mx/sagarpa•snics.sagarpa.gob.mx
- Renner, S. S. (1999). Circumscription and phylogeny of the Laurales: evidence from molecular and morphological data. *American Journal of Botany*, 86(9), 1301–1315. <https://doi.org/10.2307/2656778>
- Roy, S., Tyagi, A., Shukla, V., Kumar, A., Singh, U. M., Chaudhary, L. B., Datt, B., Bag, S. K., Singh, P. K., Nair, N. K., Husain, T., & Tuli, R. (2010). Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with Indian berberis species. *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013674>
- Rubinoff, D., Cameron, S., & Will, K. (2006). Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.019>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Sepuívada, E., Saénz, C., Aliaga, E., & Aceituno, C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*, 68, 534–545. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.08.001>
- Seremi. (2015). *Cartilla de Identificación de Cactáceas*. Ministro Del Medio Ambiente. https://educacion.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2015/09/articles-57007_recurso_1.pdf
- 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*. www.eurofindna.com

- Stecher, G., Tamura, K., & Kumar, S. (2020). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(4), 1237–1239. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSZ312>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSR121>
- Techen, N., Parveen, I., Pan, Z., & Khan, I. A. (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 25, pp. 103–110). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.010>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994a). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994b). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22*(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T., Arias, S., & Ochoterena, H. (2013). Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Systematics and Biodiversity*, *11*(1), 103–116. <https://doi.org/10.1080/14772000.2013.775191>
- Villavicencio, E., Arredondo, A., Carranza, M., Mares, O., Comparan S., & González, A. (2010). *Cactáceas ornamentales del Desierto Chihuahuense que se distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Noreste, Campo Experimental Saltillo.
- Yang, X., Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Huang, Z. (2012). More than just a coating: Ecological importance, taxonomic occurrence and phylogenetic relationships of seed coat mucilage. *Perspectives in Plant Ecology*, *14*, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2012.09.002>