UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Uso del Marcador Molecular *matK* Como Código de Barras de ADN Para La Identificación de Cactáceas

Por:

Vanesa Cruz Ramos

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

Uso del Marcador Molecular *matK* Como Código de Barras de ADN Para La Identificación de Cactáceas

Por:

VANESA CRUZ RAMOS

TESIS

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

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:

Dra. Sonia Nohemi Ramírez Barrón
Presidente

Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Secretario

Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes
Sinodal

Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Sinodal

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

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

Buenavista, Saltillo, Coahuila
Noviembre 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Uso del Marcador Molecular *matK* Como Código de Barras de ADN Para La Identificación de Cactáceas

Por:

VANESA CRUZ RAMOS

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

Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes
Asesor principal externo

Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Co-Asesor

Dra. Rosalinda Mendoza Villareal
Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila
Noviembre 2026

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal de 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 son 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.



Vanesa Cruz Ramos

Autor principal

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por brindarme la oportunidad de seguir estudiando tan noble carrera que es la biotecnología y me permitió conocer procesos complejos y fascinantes. Por lo mismo quiero agradecer a los profesores que supieron guiarme a través del conocimiento, así pues, agradecer a mi asesora principal externa la Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes por la paciencia, tiempo y guía para que pudiera realizar este proyecto y a mi asesor de tesis el Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez que me brindo la oportunidad de instruirme en el laboratorio.

A mi familia por apoyarme en el transcurso académico y motivarme hasta concluir esta etapa importante en mi vida.

A mis amigos que por azares del destino los llegue a conocer y me regalaron momentos inolvidables, además de brindarme apoyo cuando lo requería.

DEDICATORIA

Quiero dedicar y agradecer este trabajo a la vida misma y a mi persona, porque sé que muchas veces pensé en rendirme, pero las decisiones que tomé me permitieron llegar hasta donde estoy. No ha sido un camino fácil, pero gracias a él pude conocer personas que me regalaron momentos inolvidables que ahora forman parte de mí, guardando recuerdos de risas, alegría y llanto. Gracias a esos amigos que, estando lejos de mi familia, se convirtieron en mi cobijo y en mi segundo hogar.

Dedico también este escrito a la pérdida de uno mismo, a esos momentos en los que dejas de saber qué quieres, qué te gusta o qué opinas, y cuando te preguntas "¿qué quiero yo?", solo encuentras un eco o un vacío. Sin embargo, es el mismo tiempo el encargado de poner todo en orden para descubrir que está bien sentirse así, pues es una muestra de que estás vivo.

Por último, dedico unas palabras al amor. Al amor que me brindaron principalmente mis padres; sé que hemos tenido momentos difíciles y a lo mejor a veces no he sido la mejor hija, sin embargo, nunca me han dejado sola y me han dado todo lo que su amor podía brindar. A mi hermano, a quien de igual manera tal vez le he fallado como hermana, pero es de los hombres más importantes de mi vida; un regalo que mis padres me dieron. También a mi otro hermano y su familia que siempre están con nosotros en las buenas y en las malas. Y no podía faltar el amor a mis pequeños compañeritos de cuatro patas, que sin pronunciar una sola palabra me regalaron la dicha de amarlos; aunque tan grande como es su amor es corta su presencia en mis brazos, y siempre los llevare conmigo. Finalmente, al amor de mi vida: mi *Bella*, mi gatita naranja y sus ronroneos que siempre me han acompañado.

Dicen que las personas nunca cambian; yo digo que no es del todo cierto. Cada día se conoce una versión distinta de una persona, y eso es lo fascinante de ser humano.

"La vida está llena de posibilidades, solo tienes que saber dónde mirar." — Joe Gardner

"Incluso cuando el camino parecía incierto, aprender a tropezar y levantarse fue la verdadera enseñanza." — Fullmetal Alchemist: Brotherhood

"Las grandes cosas no se logran por la fuerza, sino por la perseverancia en el tiempo." — La sociedad de los poetas muertos

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS II
DEDICATORIA III
ABREVIATURAS VIII
RESUMEN IX
Summary X
1. INTRODUCCIÓN 1
2. JUSTIFICACIÓN 2
3. OBJETIVOS 3
3.1. Objetivo general 3
3.2. Objetivo especifico 3
4. HIPÓTESIS 3
5. REVISIÓN DE LITERATURA 4
5.1. Zonas áridas de México 4
5.2. Cactáceas: Taxonomía y diversidad 5
5.3. Morfología e importancia económica 7
5.4. Código de barras de ADN en plantas 8
5.5. Marcadores moleculares en plantas 9
6. MATERIALES Y MÉTODOS 12
6.1. Colecta en campo de muestras biológicas 12
6.2. Extracción de ADN genómico 12
6.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación 13
6.4. Análisis bioinformático 14
6.4.1. Edición de electroferogramas 14
6.4.2. Descarga de secuencias de referencia 15
6.4.3. Análisis BLAST 15
6.4.4. Análisis en MEGA X 16
7. RESULTADOS 17
7.1. Colecta de campo 17
7.2. Extracción de ADN genómico 20
7.3. Amplificación por PCR y purificación del marcador de código de barras *matK* 21
7.4. Análisis bioinformático 23

7.4.1. Edición de electroferogramas 23
7.4.2. Análisis BLAST 25
7.4.3. Alineamiento de secuencias 26
7.4.4. Análisis de las características de secuencias de consulta 28
7.4.5. Construcción del Dendrograma 28
8. DISCUSIÓN 30
9. CONCLUSIONES 35
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica general de las cactáceas. 5

Tabla 2. Géneros de cactáceas que son endémicas en México. 6

Tabla 3. Componentes de la mezcla PCR (GoTaq Master Mix de PromegaTM). 14

Tabla 4. Cebadores utilizados y programa de PCR para la amplificación de ADN. 14

Tabla 5. Secuencias de referencia de la región *matK*. 15

Tabla 6. Correspondencia entre las muestras y su posicion en los carriles de los geles de las Figuras 4, 5 y 6. 20

Tabla 7. Porcentaje de identidad y nivel de asignación taxonómica obtenido con BLAST para las secuencias analizadas. 26

Tabla 8. Análisis de variabilidad y características del alineamiento de las secuencias nucleotídicas. 28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas de costillas de tallos de cactus (Pizarro 2014). 8
Figura 2. Sitios de muestreo de cactáceas en tres municipios de Coahuila. 17
Figura 3. Fotografías de especímenes colectados en campo. 19
Figura 4. Evaluación de la integridad del ADN genómico de las 16 muestras de cacaceas mediante electroforesis en gel de agarosa. 21
Figura 5. Productos de amplificación del gen *matK* obtenidos mediante PCR en las muestras analizadas. 22
Figura 6. Visualización de los productos de PCR purificados tras su separación en gel de agarosa. 22
Figura 7. Ejemplo de inicio de lectura de un electroferograma con picos poco definidos. 23
Figura 8. Ejemplo del final de lectura de un electroferograma con picos poco definidos. 24
Figura 9. Electroferograma de *Astrophytum capricorne*. 24
Figura 10. Electroferograma de *Coryphantha daeletiana*. 24
Figura 11. Electroferograma de *Echinocactus horizonthalonius.* 24
Figura 12. Electroferograma de *Acharagma roseanum*. 24
Figura 13. Electroferograma de *Mammillaria heyderi*. 25
Figura 14. Electroferograma de *Mammillaria pottsii*. 25
Figura 15. Electroferograma de *Thelocactus rinconensis*. 25
Figura 16. Segmento del alineamiento múltiple de secuencias de consulta. 27
Figura 17. Sitios parsimoniosos informativos (recuadros amarillos). 27
Figura 18. Dendrograma de similitud genética de especies de Cactaceae basado en el marcador *matK*. 29

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

atpF-atpH: Complejo ATP sintasa (Adenosine Triphosphate synthase), F: Codifica la subunidad b de la porción C F_0 de la ATP sintasa (atpF). H: Codifica la subunidad c de la porción C F_0 de la ATP sintasa (atpH).

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool/ Herramienta básica de búsqueda de alineación local.

BOLD: Barcode of Life Data System/ Sistema de datos de código de barras de vida.

CBOL: Consortium for the Barcode of Life/ Consorcio para el Codigo de Barras de la Vida.

COI: Citocromo Oxidasa I.

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide/ Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

ITS: Internal Transcribed Spacer/ Espaciador interno transcrito

matK: Maturase K/ Madurasa K

NCBI: National Center for Biotechnology Information/ Centro Regional de Información

Pb: Pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction/ Reaccion en Cadena de la Polimerasa

psbK: Photosystem II reaction center protein K (Proteína K del centro de reacción del Fotosistema II).

Psbl: Photosystem II reaction center protein L (Proteína L del centro de reacción del Fotosistema II).

rbcL: Ribulosa- 1,5 bisfosfato carboxilasa

rpoB: RNA polymerase subunit beta (Subunidad beta de la ARN polimerasa).

rpoC1: RNA polymerase subunit C1 (Subunidad C1 / beta prima de la ARN polimerasa).

trnH-psbA: ARN de transferencia para la Histidina (transfer RNA - Histidine)- proteína D1 del Fotosistema II (Photosystem II protein A).

RESUMEN

Las especies de la familia Cactaceae poseen una gran importancia ecológica y económica, tanto para el ser humano como para otros organismos. Sin embargo, su identificación mediante métodos taxonómicos tradicionales presenta dificultades debido a la alta similitud morfología entre especies y a la convergencia evolutiva, por lo que el código de barras de ADN se ha convertido en una herramienta complementaria para su delimitación taxonómica. En esta investigación se evaluó el gen cloroplastidico *matK* como marcador molecular para la identificación de especies de cactáceas distribuidas en el sureste del estado de Coahuila. Para ello, se recolectaron 16 muestras, de las cuales se obtuvo ADN genómico en el 100% de las muestras analizadas mediante el método CTAB, seguido de la amplificación de la región *matK* por PCR y su posterior secuenciación. El análisis de los electroferogramas mostró que únicamente siete secuencias presentaron la calidad necesaria para su análisis. Estas fueron evaluadas con el programa MEGA X y posteriormente identificadas mediante el algoritmo BLAST el cual arrojó una identificación exitosa a nivel de especie en 4 secuencias, dos se identificaron a nivel género y una identificación ambigua. Asimismo, se construyó un dendrograma utilizando el método Neighbor-Joining, en el que las siete secuencias se agruparon en dos clados principales. El clado A mostró una estrecha relación entre los géneros *Mammillaria* y *Coryphantha*, congruente con su pertenencia a la tribu Cacteae y al clado Mammilloide. El clado B agrupó a *Astrophytum capricorne*, *Echinocactus horizonthalonius*, *Thelocactus rinconensis* y *Acharagma roseanum*, destacando la estrecha relación filogenética entre las dos primeras especies, mientras que *Acharagma roseanum* se ubicó como un linaje de divergencia temprana dentro de este grupo. Los resultados obtenidos demuestran que el marcador *matK*, en combinación con los cebadores diseñados, constituye una herramienta útil para la identificación molecular y el análisis filogenético de especies de la familia Cactaceae.

Palabras clave: Código de barras de ADN, *matK*, cactáceas.

Summary

Species of the Cactaceae family are of great ecological and economic importance, both to humans and other organisms. However, their identification using traditional taxonomic methods presents difficulties due to the high morphological similarity between species and evolutionary convergence. Therefore, DNA barcoding has become a complementary tool for their taxonomic delimitation. In this research, the chloroplast gene *matK* was evaluated as a molecular marker for the identification of cactus species distributed in southeastern Coahuila state. Sixteen samples were collected, and genomic DNA was obtained from 100% of the samples analyzed using the CTAB method, followed by amplification of the *matK* region by PCR and subsequent sequencing. Electropherogram analysis showed that only seven sequences met the quality requirements for analysis. These sequences were evaluated using the MEGA X program and subsequently identified using the BLAST algorithm, which yielded successful species-level identification for four sequences, two were identified at the genus level, and one was ambiguous. A dendrogram was also constructed using the Neighbor-Joining method, in which the seven sequences were grouped into two main clades. Clade A showed a close relationship between the genera Mammillaria and *Coryphantha*, consistent with their membership in the tribe Cacteae and the clade Mammilloide. Clade B grouped *Astrophytum capricorne, Echinocactus horizonthalonius, Thelocactus rinconensis,* and *Acharagma roseanum*, highlighting the close phylogenetic relationship between the first two species, while *Acharagma roseanum* was identified as an early divergence lineage within this group. The results obtained demonstrate that the *matK* marker, in combination with the designed primers, constitutes a useful tool for the molecular identification and phylogenetic analysis of species of the Cactaceae family.

Keywords: DNA barcode, *matK*, cacti.

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que en México un 54 % del total de la superficie, corresponde a zonas áridas (Gómez Diaz & Monterroso Rivas, 2012), por lo que especies que se desarrollan en estas zonas se han adaptado a estas condiciones. Particularmente, las cactáceas tienen una estructura suculenta que junto a un metabolismo CAM (metabolismo ácido de las Crasuláceas) les permite vivir en un entorno carente de humedad (Jiménez Sierra, 2011). Estas se encuentran ordenadas taxonómicamente en la Clase Magnoliliopsida, subclase Caryophyllidae (Pizarro-Neyra, 2014). A nivel subfamiliar estudios filogenéticos reconocen tres subfamilias: Cactoideae, Opuntioideae y Pereskioideae (Díaz et al., 2020).

Son plantas angiospermas, nativas del continente americano. En México, la mayoría habita regiones como el Desierto Chihuahuense, Valle de Tehuacán-Cuicatlán o el Desierto Sonorense. Morfológicamente presentan características importantes como la aréola, el tallo puede presentar costillas o tubérculos en donde almacena agua. Las cactáceas pertenecen a una familia joven dentro de la evolución, que aún están en proceso de diferenciación, con mutaciones y poliploidías (Guzmán et al., 2003), por lo que en algunos casos bajo los criterios de la taxonomía clásica resulta difícil clasificarlas. Con el objetivo de resolver problemas taxonómicos en 2003 el "código de barras", término que hace referencia a la utilización de secuencias de ADN para identificar organismos de manera rápida y precisa (Hebert et al., 2003). El sistema se basó en desarrollar y crear una "biblioteca" que contenga todos los datos de las especies que habitan el planeta, así se creó el Consorcio para el código de Barras de la vida (CBOL). Además, es una herramienta que permite descubrir nuevas especies, almacenar secuencias en bases de datos, combate el tráfico ilegal de flora y fauna, control de calidad alimentaria y farmacéutica e investigaciones forenses (Letsiou et al., 2024). En plantas se han implementado genes del cloroplasto principalmente *matK y rbcL* (Lara Rivera et al., 2024). Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue aplicar la tecnología de código de barras de ADN en especies de cactáceas distribuidas en el sur de Coahuila, con la finalidad de otorgar una identidad a las especies analizadas.

2. JUSTIFICACIÓN

La familia Cactaceae es uno de los grupos de plantas con mayor diversidad en México y tiene un elevado porcentaje de especies endémicas. Sin embargo, la identificación taxonómica de muchas de sus especies representa un desafío debido a similitudes morfológicas, a la convergencia evolutiva y la variabilidad intraespecífica, factores que dificultan su delimitación utilizando únicamente caracteres morfológicos.

El código de barras de ADN se ha consolidado como una herramienta complementaria para la identificación de especies vegetales. Entre los marcadores propuestos, el gen *matK* destaca por su elevada tasa de evolución y su capacidad discriminatoria. Sin embargo, en la familia Cactaceae existen limitaciones relacionadas con la amplificación, la obtención de secuencias de calidad y la resolución de especies estrechamente emparentadas. Además, la presencia de metabolitos secundarios característicos de las cactáceas puede interferir en la extracción y análisis del ADN, reduciendo la eficiencia de los procedimientos moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1.Objetivo general

Evaluar la utilidad del marcador molecular *matK*, mediante cebadores diseñados específicamente para cactáceas, como código de barras de ADN para la identificación molecular y el análisis filogenético de especies de la familia Cactaceae del sureste del estado de Coahuila.

3.2.Objetivo especifico

- Obtener ADN genómico de especies de cactáceas colectadas en el sureste del estado de Coahuila mediante el método CTAB.
- Amplificar y secuenciar la región *matK* de las especies estudiadas.
- Determinar la capacidad de identificación taxonómica del marcador mediante el análisis BLASTn.
- Analizar las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas mediante la construcción de un dendrograma basado en las secuencias obtenidas.

4. HIPÓTESIS

Las secuencias *matK* permitirán identificar molecularmente las especies de cactáceas del sureste del estado de Coahuila, proporcionando secuencias con suficiente variabilidad genética para discriminar la mayoría de los taxones analizados y recuperar relaciones filogenéticas congruentes con la clasificación taxonómica actualmente aceptada.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1.Zonas áridas de México

México se caracteriza por los índices de aridez que predominan en su territorio, se estima que alrededor de 1 056 830 km2 pertenecientes a la República Mexicana corresponden a zonas áridas, semiáridas o subhúmedas secas que representan un 54 % del total de la superficie, (Gómez Diaz & Monterroso Rivas, 2012).

Diferentes autores manejan su propio concepto de aridez, por ejemplo González-Medrano, (2012) la define como "aquellas regiones cuya precipitación es deficiente y la humedad atmosférica suele ofrecer valores muy por debajo del promedio mundial anual", el autor describe que la aridez es la escasez de lluvia, un déficit de humedad en una región que provoca la erosión del suelo provocando un lento desarrollo de diversas actividades humanas como la agricultura y ganadería. A pesar de ello, existe gran diversidad de flora en dichas regiones por ejemplo se distribuyen especies de las familias; Cactaceae, Fagaceae, Agavaceae, Euphorbiacea, por mencionar algunos.

Una de las zonas áridas de México es el Desierto Chihuahuense, considerado el desierto más grande de Norte América. Comenzó a formarse hace unos cinco millones de años en el Plioceno y ocupa un área aproximada de 505,000 km2 (Villarreal-Quintanilla et al., 2016). Se extiende desde los estados de Guanajuato, Hidalgo, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, San Luis Potosi, Tamaulipas, y Zacatecas, hasta el norte, en el sur de Texas, Nuevo México y una pequeña porción de Arizona (Granados-Sánchez et al., 2011; Sandoval-Mata et al., 2024). Las formas de vida características del desierto Chihuahuense son las arbustivas y subarbustivas; las formas arbóreas generalmente son escasas y están confinadas a la cercanía de fuentes de agua o pendientes rocosas. Esta región destaca por su extraordinaria diversidad de cactáceas, al albergar aproximadamente 324 especies de esta familia, distribuidas en 39 géneros (Granados-Sánchez et al., 2011).

Otro gran desierto de México es el desierto Sonorense, el cual se originó aproximadamente hace 8 millones de años en el Mioceno tardío, con un área de 260,000 km2 se extiende por el estado de Sonora, península de Baja California, las islas del Mar de Cortes, sur del estado

de Arizona y sureste de California (Celaya Michel & Celaya Rosas, 2023), su vegetación, incluye cactáceas columnares, leguminosas, etc.

Por otro lado, la zona del valle de Tehuacán-Cuicatlán con un área de 10,000 km2 (Canales Martínez et al., 2006), se localiza en la parte sureste del estado de Puebla y noroeste del estado de Oaxaca (Villaseñor et al., 1990), prevalecen climas áridos y semiáridos y es un centro de diversificación de numerosos grupos de plantas entre los que destacan las cactáceas (Fernández-Borja, 2018).

5.2.Cactáceas: Taxonomía y diversidad

La taxonomía tradicional clasifica a estas plantas en la familia Cactaceae (Tabla 1). Son plantas dicotiledóneas nativas de América, caracterizadas por su capacidad de almacenar agua y la presencia de areolas (Hernández-Hernández et al., 2011; Guerrero et al., 2019), siendo México el país con más concentración de cactáceas (Hernández & Godinez, 1994).

Tabla 1. Clasificación taxonómica general de las cactáceas.

Reino	**Plantae**
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae

Diversos autores reportan variaciones en el número de géneros y especies de la familia. Por ejemplo, los autores más conservadores señalan cifras de 48 géneros y 563 especies (Hernández & Godinez, 1994). Mientras que otros estudios amplían el rango hasta aproximadamente de 127 a 139 géneros y cerca de 1450 a 1870 especies (Hernández-Hernández et al., 2011; Díaz et al., 2020). Para México en particular, se estima un total de 52 géneros y 850 especies de las cuales se estima que el 84 % son endémicos (Tabla 2) (Tenorio-Escandón et al., 2022). Estas diferencias reflejan la variabilidad en los criterios taxonómicos y metodológicos empleados en cada estudio (Jiménez Sierra, 2011).

A nivel subfamiliar estudios filogenéticos reconocen tres subfamilias: Cactoideae, Opuntioideae y Pereskioideae, siendo Cactoideae el grupo con mayor diversidad de especies (Díaz et al., 2020). Esta subfamilia está compuesta por la mayor diversidad de géneros, especies globulares y cactus columnares, Opuntioideae incluye al nopal y sus parientes caracterizado por la presencia de espinas y gloquidios con semillas encerradas por un arilo óseo. Por otro lado, Pereskioideae consta de dos géneros pobres en especies que son Maihuenia y Pereskia (Nyffeler & Eggli, 2010). Estas especies muestran caracteres "primitivos", habito arbustivo, hojas ligeramente suculentas y semillas con testa brillante, estas características muestran una divergencia temprana en la filogenia del cactus (Nyffeler & Eggli, 2010).

Tabla 2. Géneros de cactáceas que son endémicas en México.

Género	Número total de especies	Número de especies endémicas
Aporocactus	2	2
Aztekium	2	2
Cephalocereus	3	3
Escontria	1	1
Geohintonia	1	1
Leuchtenbergia	1	1
Neobuxbaumia	8	8
Obregonia	1	1
Ortegocactus	1	1
Pelecyphora	2	2
Polaskia	2	2
Rathbunia	1	1
Stenocactus	8	8
Strombocactus	1	1
Turbinicarpus	14	14

Obtenido de Hernández & Godinez, (1994) con algunas modificaciones.

5.3.Morfología e importancia económica

Lo que permite a las cactáceas tener éxito en ambientes áridos es su capacidad para almacenar agua en el tejido parenquimático, conocido como una estructura suculenta, hojas reducidas o prácticamente ausentes, reduciendo así la evapotranspiración (Jiménez Sierra, 2011). Al no poseer hojas el proceso fotosintético lo realizan en la capa denominada clorénquima ubicada en el tallo y sigue una ruta metabólica conocida como metabolismo ácido de las Crasuláceas (CAM) (Pizarro-Neyra, 2014).

Esta capacidad de adaptación ha permitido a su vez que estas especies presenten gran diversidad en la morfología de sus tallos, la cual define su hábito o forma de crecimiento (Bravo-Hollis, 1978;Anderson, 2001). En este sentido, la subfamilia Cactoideae presenta las modificaciones caulinares más evidentes. Por ejemplo, cuando el hábito es arbóreo sin ramificación, los tallos se denominan columnares, mientras que cuando presentan ramificación adoptan una forma candelabriforme (Avila-Escobar et al., 2023).

Las especies de Cactoideae se caracterizan por ser plantas suculentas perennes y, en general, carentes de hojas verdaderas.

- Tallos fotosintéticos, que pueden ser globosos, columnares o cilíndricos (Figura 1), constituyen el principal órgano funcional, presentando superficies costilladas, acanaladas o tuberculadas que facilitan la expansión para el almacenamiento de agua. Además, poseen areolas especializadas a partir de las cuales se originan espinas, flores y nuevos brotes.
- La epidermis está recubierta por ceras y presenta estomas que contribuyen a la reducción de la perdida de agua.
- Las hojas, cuando están presentes, son microscópicas y se encuentran altamente reducidas, generalmente transformadas en espinas.
- Las semillas presentan estructuras y apéndices característicos que resultan útiles para su identificación
- Las flores son notablemente diversas, frecuentemente grandes y vistosas, y están adaptadas a distintos tipos de polinización animal, como la ornitofila, melitofila y esfingofila.

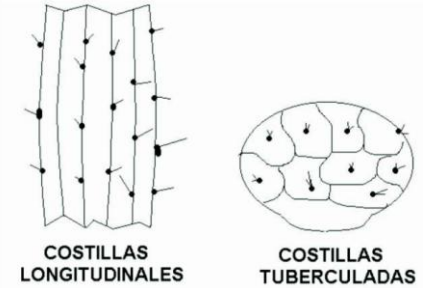

Figura 1. Formas de costillas de tallos de cactus (Pizarro-Neyra, 2014).

En México, las cactáceas tienen gran diversidad de usos (Castillo-Campohermoso et al., 2010). Muchas especies ofrecen algún beneficio al hombre y han sido utilizadas como forraje para el ganado, combustible, obtención de alimento para la población humana esto debido a que son una fuente importante de proteínas y grasas (Jiménez Sierra, 2011; Vázquez Gómez et al., 2023). De este grupo forman parte los nopales, biznagas, tetechos, viejitos, peyotes, garambullos, cardones, pitahayas, xoconostles, órganos etc., (Castillo-Campohermoso et al., 2010). En otros casos se usan como recursos prometedores en cosmética, industria farmacéutica y la producción de bioenergía (Tenorio-Escandón et al., 2022; Vázquez Gómez et al., 2023).

5.4.Código de barras de ADN en plantas

La taxonomía clásica, era la única ciencia encargada de clasificar a los organismos vivos acorde a sus características morfológicas, sin embargo, era necesaria más precisión, debido a que solo las características fenotípicas podían ser insuficientes. Regularmente las claves morfológicas son efectivas solo para una etapa de vida o género en particular, por lo que muchos individuos no pueden ser identificados (Hebert et al., 2003). Las características vegetativas son altamente susceptibles a factores ambientales, estas introducen variabilidad y ambigüedad en el proceso de identificación (Letsiou et al., 2024). Los enfoques genómicos para el diagnóstico taxonómico exploran la diversidad entre secuencias de ADN para identificar organismos, estas secuencias pueden considerarse como “código de barras” (Hebert et al., 2003). Dado que el ADN no sufre cambios por factores externos los códigos de barras son ideales para la identificación de especies ya sean vegetales o animales.

El sistema propuesto por Paul Hebert en 2003, se basó en desarrollar y crear una "biblioteca" que contenga todos los datos de las especies que habitan el planeta, así se creó el Consorcio para el código de Barras de la vida (CBOL). De manera complementaria se desarrolló una plataforma informática para la conservación y el análisis de registros de códigos de barras, conocida como BOLD (Barcode of Life Data Systems) (Vernooy et al., 2010).

El código de barras de ADN inició con la aplicación del gen COI (citocromo oxidasa 1), un gen mitocondrial presente en animales, su principal ventaja frente a ADN nuclear es su heredabilidad vía materna (Lara Rivera et al., 2024). La evolución del gen COI es rápida lo cual permite discriminar entre especies estrechamente relacionadas e investigar la diversidad intraespecífica, sin embargo, resultó no ser adecuado en plantas y en especies de hongos, su uso en protozoos y otros organismos aún están en desarrollo (Rodrigues et al., 2017). El CBOL evalúo los marcadores para su utilización en plantas basándose en tres criterios: universalidad, calidad de secuencia y poder discriminatorio (Hollingsworth et al., 2011).

5.5.Marcadores moleculares en plantas

Para la identificación de plantas, se han implementado genes del cloroplasto principalmente *matK* y *rbcL*, en hongos se usan los dos fragmentos del ADN ribosomal (ITS1 e ITS2) (Lara Rivera et al., 2024). Han surgido 7 candidatos para marcadores en plantas, de los cuales cuatro son porciones de genes codificantes (*matK, rbcL, rpoB* y *rpoC1*), el resto son espaciadores no codificantes (*atpF-atpH, trnH-psbA y psbK-psbl*) (CBOL Plant Working Group et al., 2009).

El gen *rbcL*, codifica la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RuBP) (Gielly & Taberlet, 1994), está presente en plantas terrestres y marinas, algas eucariotas, cianobacterias y la mayoría de proteobacterias fototrópicas (Tabita et al., 2007). El azúcar bisfosfato sirve como molécula aceptora de CO2, junto con la enzima RuBP carboxilasa/oxigenasa (RubisCO) catalizando la reacción primaria de fijación de CO2. Por su baja eficiencia catalítica, es la proteína más abundante de la tierra, puede comprender hasta el 50% de la proteína soluble total que se encuentra en el tejido foliar (Tabita et al., 2007), RubisCO ha sido ampliamente secuenciado a partir de numerosos taxones de plantas, los datos resultantes facilitan los estudios de filogenia vegetal (Gielly & Taberlet, 1994).

El uso de la región ITS para identificación molecular de hongos se remota a principios de la década de 1990 (Bengtsson-Palme, 2013), la región ITS contiene tres particiones: ITS1, 5.8s e ITS2 (Wang et al., 2014) la región ITS esta flanqueada por el gen ARNr 18S en el extremo 5= del espaciador ITS1 y por el gen ARNr 28s en el 3= del ITS2 (Xu, 2016), la región 5.8s (Wang et al., 2014) y la región 28s (Xu, 2016) son altamente conservados, los diversos análisis de los especialistas muestran que ITS1 tiene un mayor poder de discriminación y regiones flanqueantes más conservadas para la amplificación por PCR que ITS2 (Wang et al., 2014).

La región espaciadora interna transcrita es de aproximadamente 550 pares de bases (Bengtsson-Palme, 2013), ITS es multicopia, en pocas palabras permite la amplificación a partir de muestras con baja concentración de ADN (Monard et al., 2012). En cactáceas, la región ITS se ha empleado con otros marcadores del cloroplasto o del núcleo para esclarecer filogenias a distintos niveles, ofrece un significativo poder discriminatorio (García Aguilar, 2014), las regiones ITS2 y las secuencias de ADNr 5.8s están altamente conservadas en plantas, su estabilidad intraespecífica e intrapoblacional y la evolución rápida son los factores que han convertido a ITS en uno de los marcadores más populares en estudios filogenéticos (Hřibová et al., 2011), esto debido a que es un marcador fácil de amplificar y con un poder de discriminación alto en taxones de plantas de diferentes familias de plantas, además de distinguir entre taxones estrechamente relacionados a nivel de género y especie, (Chen et al., 2010). Por su parte el gen *matk* tiene una longitud de aproximadamente 1500 pb, se encuentra dentro del intrón del gen *trnK* y codifica una proteína similar a la madurasa, posee un tamaño ideal, una alta tasa de sustitución, gran proporción de variación a nivel de ácido nucleico en la primera y segunda posición del codón, una baja relación de transición-transversión y la presencia de sectores mutacionalmente conservados (Dhivya et al., 2008).

Investigadores concluyeron que varias combinaciones de marcadores ofrecen un buen rendimiento, los resultados condujeron a la recomendación de una combinación de *rbcL*+ *matK*, debido a que *rbcL* es fácil de amplificar, funciona en un gran número de plantas, pero distingue menos especies y *matK* evoluciona más rápido, distingue mejor las especies, pero es difícil de secuenciar por lo que ambos se complementan (Hollingsworth et al., 2011). Un código de barras de ADN multilocus como señala Kress et al. (2009), se usó para identificar

a nivel comunidad especies tropicales y construir un árbol filogenético, permitió observar que *matK* + *rbcL* mejoran la identificación.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.Colecta en campo de muestras biológicas

Para la toma de especímenes se muestrearon plantas en diferentes localidades de los municipios de Saltillo, Ramos Arizpe y General Cepeda ubicados en la región sureste del estado de Coahuila, considerando las regiones con mayor variación y su extensa distribución de cactáceas.

Por su importancia ecológica, únicamente se recolectaron 3 gramos de tejido de brotes jóvenes y sanos que se preservaron en alcohol de 96°, destacando así que para la aplicación de la tecnología de Código de Barras de ADN no es necesario el muestreo de plantas completas. Al mismo tiempo se documentaron los datos como coordenadas geográficas, altitud y fotografías de los ejemplares que se usaron como muestras "respaldo" los cuales se almacenaron en el Herbario Antonio Narro Saltillo México (Herbario ANSM) ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

6.2.Extracción de ADN genómico

De acuerdo con lo descrito por Sharma et al. (2003): Se maceró 1 g de tejido vegetal con ayuda de un mortero hasta obtener una consistencia homogénea y fina. Posteriormente, el material se colocó en un microtubo de 1.5 ml al que se añadieron previamente 700 µl de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) (caliente), incubándose a 60 °C y 50 rpm durante 30 minutos en un incumix ThermoMixer (Select Bioproducts, México). Después, se incorporaron 0.6 volúmenes de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló mediante inversión por 15 minutos. La solución se centrifugó a 15000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga (Spectrafuge 16M, Labnet International, USA).

Posteriormente, se transfirieron 300 µl de la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 ml, añadiéndose dos volúmenes de alcohol absoluto para precipitar el ADN. La muestra se centrifugó nuevamente a 15000 rpm durante 5 minutos con el fin de sedimentar y formar la pastilla de ADN.

El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70 % (400 µl y 300 µl), centrifugando a 15000 rpm por 5 minutos entre cada lavado. Finalmente, la pastilla se dejó secar durante la noche y se resuspendió en 80 µl de agua libre de nucleasas. Después de incubarse 15 minutos a 60 °C, el ADN obtenido se almacenó a −20 °C para su uso posterior.

La calidad y concentración del ADN obtenido se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, aplicando 75 V durante 1 h 45 min. Se empleó un marcador de peso molecular de 1 Kb (Axygen, USA). Para preparar las muestras, se mezclaron 3 µl de ADN con 1.5 µl de buffer de carga (5x Green GoTaq Buffer + Diamond Nucleic Acid Dye, ambos de Promega™). Finalmente, el gel se documentó utilizando el sistema Gel Documentation Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA).

6.3.Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación

La amplificación mediante PCR de la región *matK* se realizó utilizando la mezcla comercial GoTaq Green Master Mix 2X™ (Promega, USA), siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. El procedimiento consistió principalmente en la preparación de una mezcla maestra previamente optimizada (Tabla 3), con un volumen final de 20 µl para cada una de las 16 muestras de ADN genómico obtenidas y utilizando cebadores *matK* diseñados (Tabla 4). Los productos de PCR se purificaron utilizando el sistema comercial Wizard SV Gel and PCR Clean Up System™ (Promega, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR (amplicones) fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, aplicando 75 volts durante 1 h 45 min y empleando un marcador de peso molecular de 1 Kb (Axygen, USA). Para la carga de las muestras se mezclaron 3 µl de ADN con 1.5 µl de buffer de carga (6X Diamond). Finalmente, el gel se visualizó utilizando el sistema de documentación Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA) Posteriormente, para su secuenciación, se enviaron 300 ng de cada amplicón obtenido junto con 5 µl de los cebadores correspondientes de cada muestra al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, Irapuato, México.

Tabla 3. Componentes de la mezcla PCR (GoTaq Master Mix de PromegaTM).

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

Tabla 4. Cebadores utilizados y programa de PCR para la amplificación de ADN.

Fragmento	Cebadores 5´-3´	Programa de PCR	Referencia
matK	Mma-F: TAGTTTTCGGTCTAATTTGAAA Mma-R: ATAGATTCTTCTTGGTTGAGA	94°C, 5 min; 35 × (94°C, 15 s; 56°C, 20 s; 72°C, 50 s); 72°C, 10 min; ∞4°C.	Diseñados en este estudio

6.4.Análisis bioinformático

6.4.1. Edición de electroferogramas

Tras la secuenciación de ADN, los electroferogramas se visualizaron mediante el software bioinformático Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012), para evaluar la calidad de las secuencias. En los gráficos, cada base nitrogenada está representada por un color especifico en los picos de fluorescencia; rojo para timina, verde para adenina, negro para guanina y azul para citosina).

Posteriormente, se recortaron los extremos de las secuencias con el objetivo de eliminar nucleótidos ambiguos o de baja calidad que pudieran alterar el análisis. Finalmente, se seleccionaron únicamente las secuencias óptimas para los estudios posteriores, las cuales se ordenaron en un archivo tipo FASTA, de aquí en adelante dichas secuencias serán llamadas “secuencias consulta”.

6.4.2. Descarga de secuencias de referencia

Se descargaron de la plataforma del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) un total de 14 secuencias de referencia en formato FASTA correspondientes a la región *matK* (Tabla 5). Estas secuencias se emplearon únicamente como guía para el alineamiento de las secuencias consulta.

Tabla 5. Secuencias de referencia de la región *matK*.

Identificador en GenBank	**Especie**
MH037656.1	*Coryphantha pseudoradians*
OK340266.1	*Coryphantha werdermannii*
OK340258.1	*Coryphantha pycnacantha*
OK340285.1	*Thelocactus bicolor*
MK449056.1	*Thelocactus hexaedrophorus*
MK449057.1	*Thelocactus macdowellii*
MK449027	*Acharagma aguirreanum*
MK449038	*Echinocactus grusonii*
MK449034	*Ariocarpus scaphirostris*
MK449031	*Ariocarpus kotschoubeyanus*
MK449032	*Ariocarpus trigonus*
MH037655	*Mammillaria hernandezii*
OQ290466	*Mammillaria wiesingeri*
OL513241	*Mammillaria poselgeri*

6.4.3. Análisis BLAST

La identificación taxonómica de las secuencias generadas se realizó con la herramienta BLASTn del NCBI (NCBI 2026), filtrando la búsqueda de homologías bajo los criterios descritos por (Chen et al., 2015). Bajo este enfoque, una asignación se consideró exitosa si presentaba un valor de $E < 1 \times 10^{-5}$ y un porcentaje de identidad del 98% al 100% a partir de individuos de la especie esperada; se catalogó como ambigua si la secuencia problema coincidía con múltiples especies (incluida la de interés), y se reportó como fallida en los casos donde no hubo coincidencia con la especie esperada.

6.4.4. Análisis en MEGA X

En este estudio, se utilizó un árbol de unión de vecinos cercanos para evaluar la capacidad de los códigos de barras para recuperar clados. La construcción del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA X (Kumar et al., 2018); con este mismo software se evaluó la calidad de las secuencias y se determinaron los sitios conservados, polimórficos e informativamente parsimoniosos. El método de agrupamiento por unión de vecinos cercanos Neighbour-Joining se basó en la matriz de distancias obtenida de los alineamientos múltiples, una estrategia compatible con distintos modelos de evolución para estimar el árbol verdadero (Saitou & Nei, 1987). Las posiciones ambiguas se removieron para cada par de secuencias mediante la opción de eliminación por parejas (pairwase deletion). Finalmente, la identificación de especies se consideró exitosa únicamente si la totalidad de especies de un género constituían un clado monofilético.

7. RESULTADOS

7.1.Colecta de campo

En la región sureste del estado de Coahuila, específicamente en las localidades de Saltillo, General Cepeda, Ramos Arizpe y La Paila (Fig. 2), se recolectaron 16 muestras de cactáceas.

La colecta incluyó ejemplares de los géneros *Mammillaria* y *Thelocactus, Coryphantha*, *Acharagma, Ariocarpus, Astrophytum, Echinocactus, Ephithelantha, Ferocactus, Sclerocactus* y *Stenocactus* (Fig. 3).

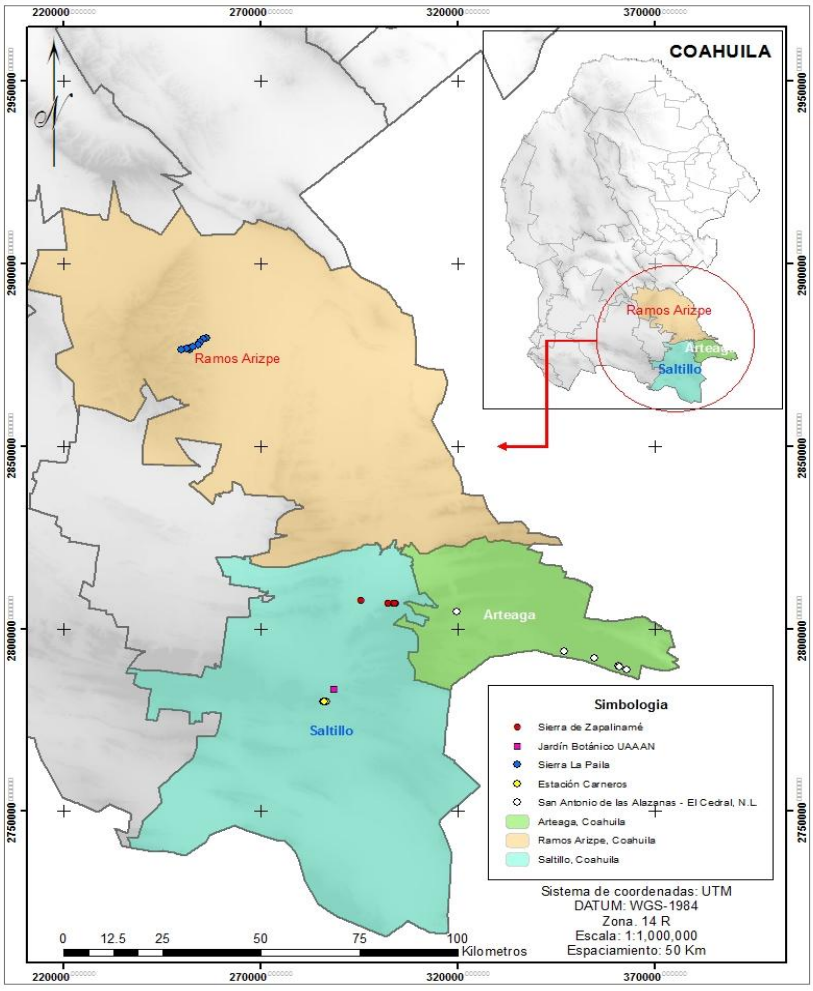

Figura 2. Sitios de muestreo de cactáceas en tres municipios de Coahuila.



Acharagma roseanum



Ariocarpus retusus



Astrophytum capricorne



Coryphantha delaetiana



Coryphantha radians



Echinocactus horizonthalonius



Epithelantha bokei



Ferocactus hamatacanthus



Mammillaria chionocephala



Mammillaria heyderi



Mammillaria pottsii



Sclerocactus scheeri



Stenocactus multicostatus



Thelocactus bicolor



Thelocactus rinconensis



Thelocactus rinconensis

Figura 3. Fotografías de especímenes de cactáceas colectados en campo.

7.2.Extracción de ADN genómico

La evaluación de la integridad del ADN genómico extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 4). En el perfil obtenido se observa una variabilidad en la concentración y calidad del material genético entre las muestras. Los carriles con los números 1, 2, 4, 6, 7, 8, 15 y 16 muestran bandas de alto peso molecular bien definidas, a pesar de que presentan un ligero barrido, lo cual indica la presencia de ARN residual o fragmentación parcial. Por otro lado, en los carriles 3, 5, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 las bandas son tenues o no visibles a simple vista, esto sugiere una baja concentración de ADN. A pesar de las diferencias visibles del gel, la presencia de ADN fue suficiente en la totalidad de las muestras, ya que el 100% de estas resultó viable y funcional en posteriores análisis. En la Tabla 6 se enlista el orden en el que fueron trabajadas todas las muestras durante los análisis experimentales, el mismo orden se siguió en todos los geles de agarosa.

Tabla 6. Correspondencia entre las muestras y su posición en los carriles de los geles de las Figuras 4, 5 y 6.

Carril	**Especie**
1	*Acharagma roseanum*
2	*Ariocarpus retusus*
3	*Astrophytum capricorne*
4	*Coryphanta delaetiana*
5	*Coryphanta radians*
6	*Echinocactus horizonthalonius*,
7	*Epithelantha bokei*
8	*Ferocactus hamatacanthus*
9	*Mammillaria Chionocephala,*
10	*Mammillaria heyderi*
11	*Mammillaria pottsii*,
12	*Sclerocactus scheeri*
13	*Stenocactus multicostatus*
14	*Thelocactus bicolor*
15	*Thelocactus rinconensis*
16	*Thelocactus rinconensis var. phymathothele.*

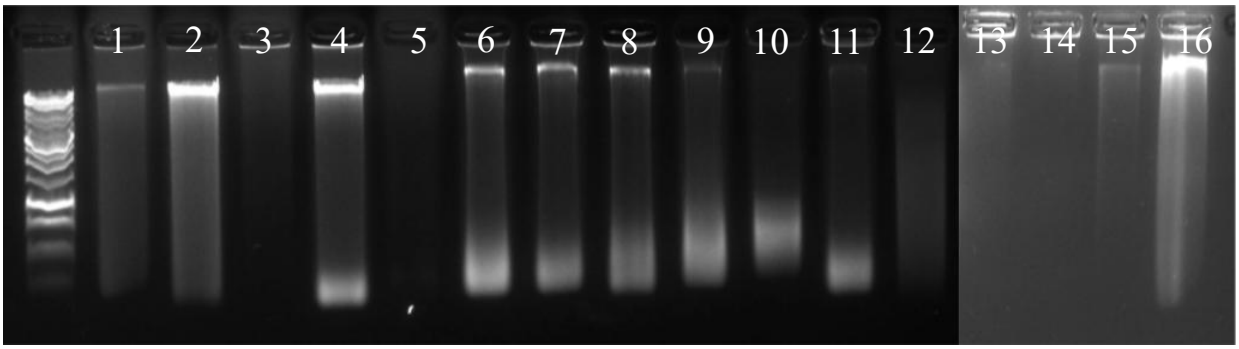

Figura 4. Evaluación de la integridad del ADN genómico de 16 muestras de cactáceas mediante electroforesis en gel de agarosa.

7.3.Amplificación por PCR y purificación del marcador de código de barras *matK*

Se llevo a cabo la amplificación por PCR del gen cloroplástico *matK*, utilizando cada una de las extracciones de ADN obtenidos. El análisis electroforético reveló la presencia de bandas nítidas y especificas en la mayoría de las muestras analizadas (Fig. 5). Los productos de amplificación presentaron un peso molecular homogéneo y acorde al tamaño esperado reportado en la literatura (de 700 a 900 pb) para este marcador molecular. Sin embargo, en la parte inferior del gel se evidencio una banda secundaria de bajo peso molecular que pudiera corresponder a dímeros de cebadores. Para garantizar la calidad y pureza requerida en la secuenciación, los amplicones específicos de *matK* fueron purificados mediante un kit comercial, eliminando exitosamente esos componentes de la reacción y aislando únicamente el protocolo de interés (Fig. 6).

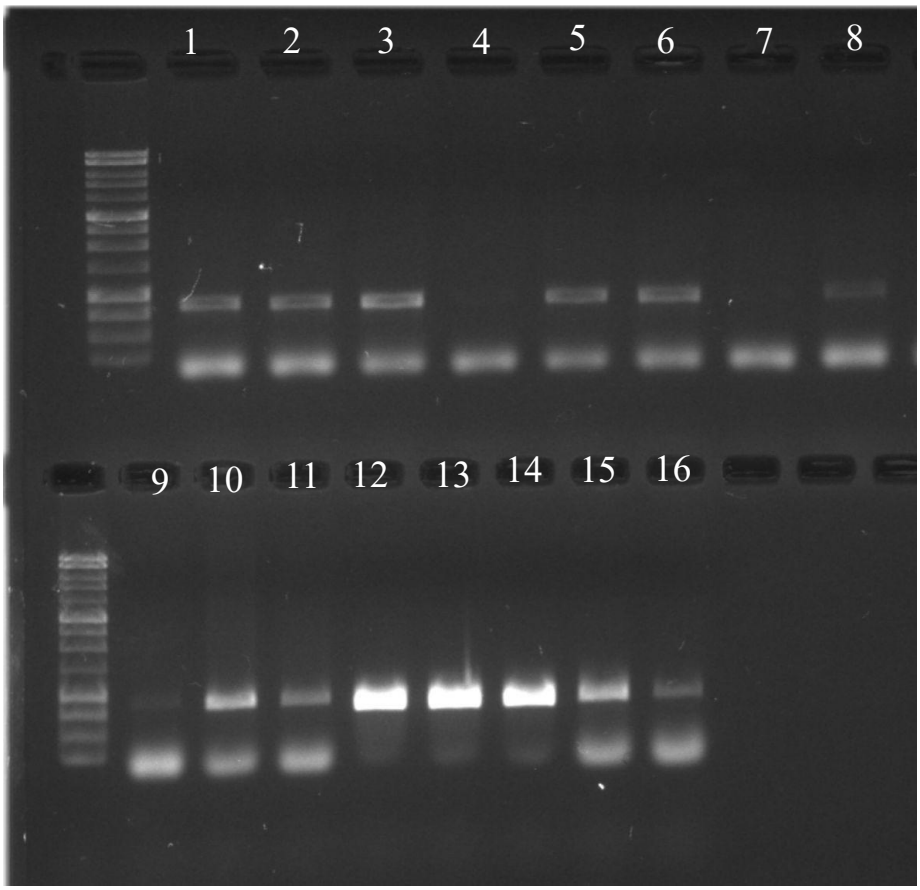

Figura 5. Productos de amplificación del gen *matK* obtenidos mediante PCR en las muestras analizadas.

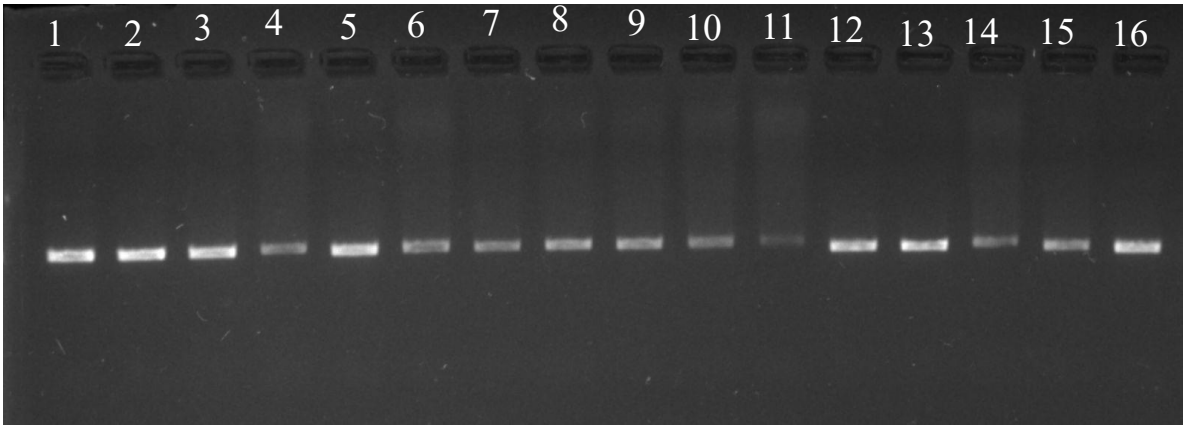

Figura 6. Visualización de los productos de PCR purificados tras su separación en gel de agarosa.

7.4.Análisis bioinformático

7.4.1. Edición de electroferogramas

La revisión de los electroferogramas permitió evaluar la calidad de las secuencias obtenidas y determinar su utilidad para los análisis posteriores. Con posterioridad, se realizó un proceso de edición y limpieza de las secuencias con el fin de eliminar el "ruido" generado por errores de secuenciación presentes al inicio y al final de las lecturas (Figuras 7 y 8 respectivamente). Estas regiones suelen presentar picos distorsionados o superpuestos debido a que los fragmentos de ADN de menor tamaño y los cebadores no incorporados migran más rápidamente durante la electroforesis capilar, provocando señales simultaneas y dificultando la interpretación de la secuencia. Asimismo, conforme la lectura avanza más allá de aproximadamente 600-800 pares de bases, la calidad de la señal disminuye gradualmente; los picos tienden a ensancharse, perder intensidad y fusionarse entre sí como consecuencia de la reducción en la eficiencia de la ADN polimerasa durante la reacción de secuenciación.

El recorte de estas regiones constituye una etapa fundamental del control de calidad, ya que permite eliminar las porciones de baja confiabilidad y conservar únicamente la región de secuencia con calidad suficiente para su análisis. De las 16 muestras recolectadas, únicamente siete presentaron secuencias de calidad adecuada para su procesamiento y análisis posteriores (Figuras 9-15). En promedio, se eliminaron 336.57 nucleótidos por secuencia durante el proceso de edición.

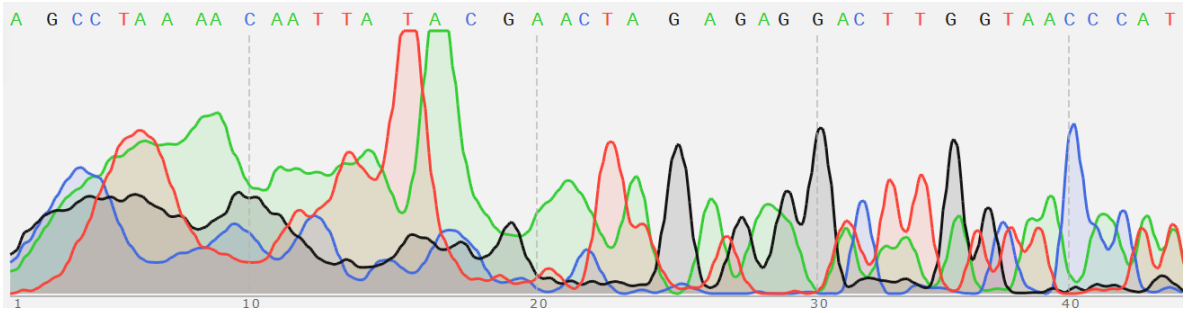

Figura 7. Ejemplo de inicio de lectura de un electroferograma con picos poco definidos.

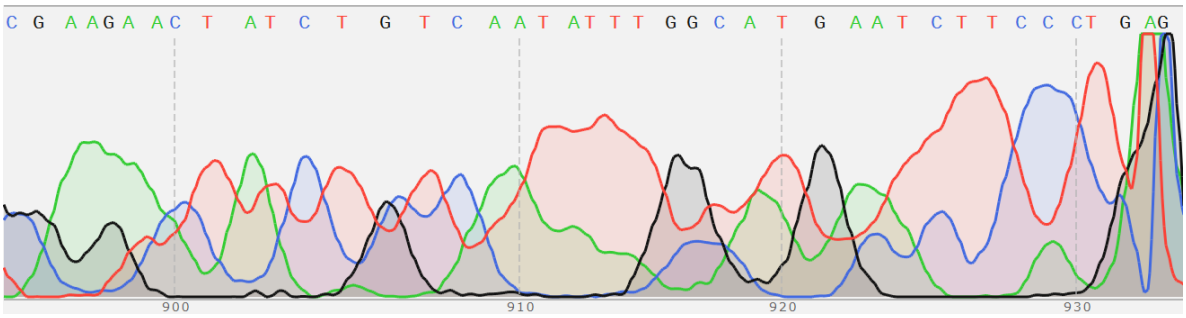

Figura 8. Ejemplo del final de lectura de un electroferograma con picos poco definidos.

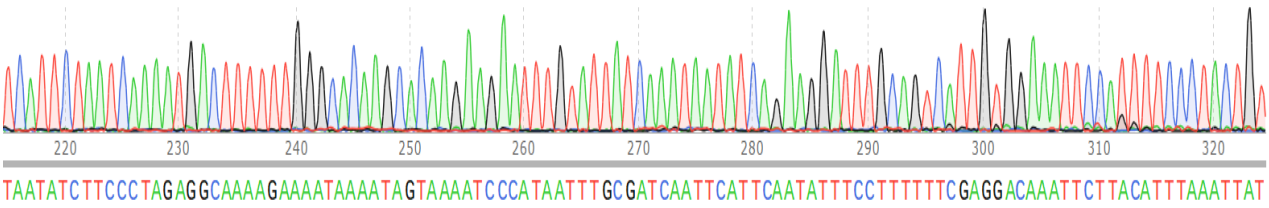

Figura 9. Electroferograma de *Astrophytum capricorne*.

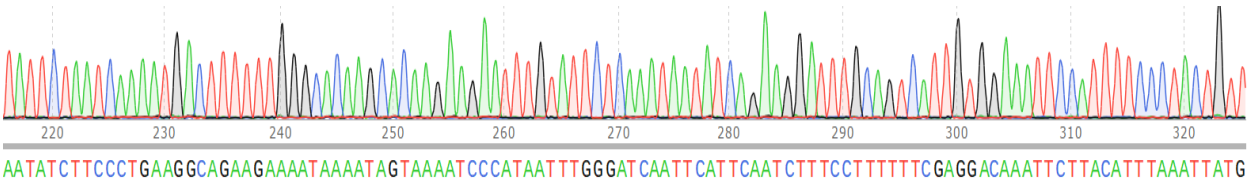

Figura 10. Electroferograma de *Coryphantha daeletiana*.

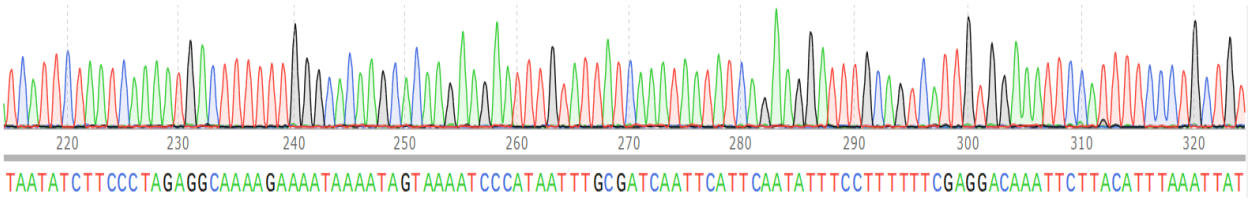

Figura 11. Electroferograma de *Echinocactus horizonthalonius*.

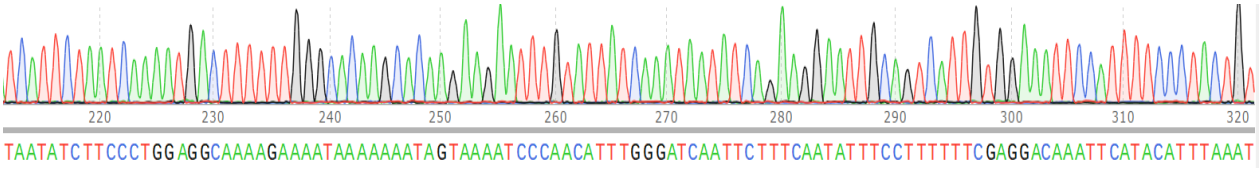

Figura 12. Electroferograma de *Acharagma roseanum*.

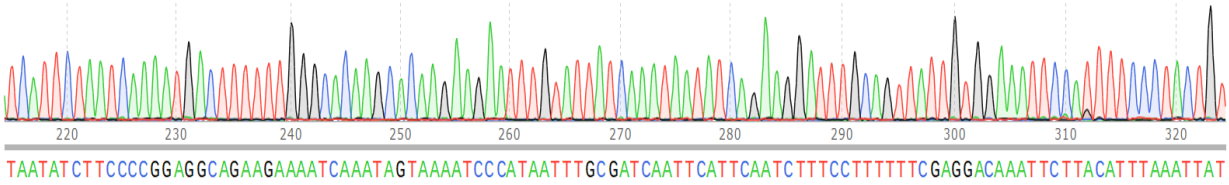

Figura 13. Electroferograma de *Mammillaria heyderi.*

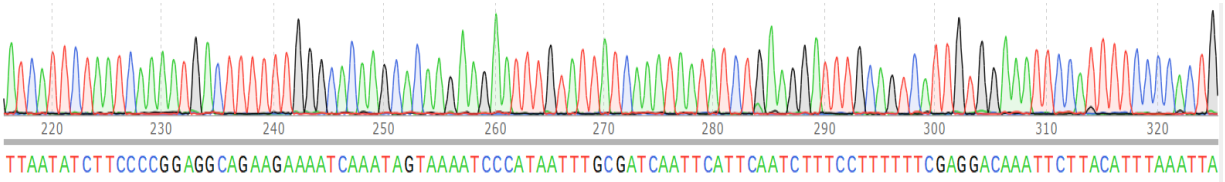

Figura 14. Electroferograma de *Mammillaria pottsii.*

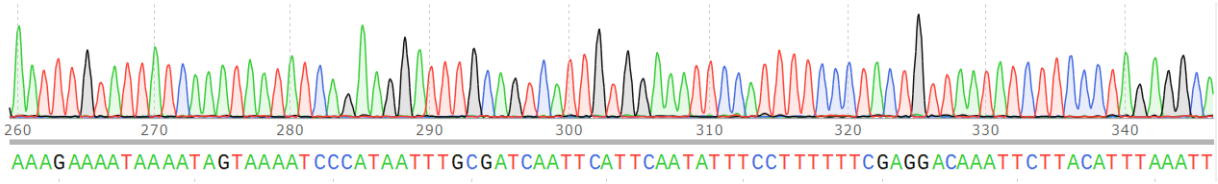

Figura 15. Electroferograma de *Thelocactus rinconensis.*

7.4.2. Análisis BLAST

La herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se utiliza para comparar secuencias en una base de datos y permite identificar especies, descubrir relaciones evolutivas, localizar un gen, diseño de primers entre otras cosas. En este caso se utilizó para comparar secuencias, las 7 secuencias de consulta obtuvieron diferentes niveles de identificación respecto de otras secuencias comparadas (Tabla 7). Cuatro fueron identificadas a nivel especie, dos a género y una ambigua.

Tabla 7. Porcentaje de identidad y nivel de asignación taxonómica obtenido con BLAST para las secuencias analizadas.

Secuencias de consulta	Nivel identificado	Identidad (%)
Astrophytum capricorne	*Astrophytum capricorne*	100
Coryphantha delaetiana	*Coryphantha*	100
Echinocactus horizonthalonius	*Echinocactus horizonthalonius*	100
Acharagma roseanum	*Acharagma roseanum*	100
Mammillaria heyderi	*Mammillaria*	100
Mammillaria pottsii	*Mammillaria pottsii*	100
Thelocactus rinconensis	Ambiguo	-

7.4.3. Alineamiento de secuencias

El alineamiento múltiple de secuencias constituye una herramienta fundamental para comparar regiones homólogas de ADN entre diferentes organismos o muestras, permitiendo establecer correspondencias posición por posición entre los nucleótidos. Este análisis facilita la identificación de regiones conservadas, las cuales suelen reflejar una alta similitud genética, así como de sitios variables o polimórficos que representan diferencias entre las secuencias analizadas.

Una vez alineadas las secuencias de consulta y referencia (Fig. 16), es posible visualizar las coincidencias nucleotídicas y evaluar el grado de homología entre ellas. En las regiones conservadas, los nucleótidos se mantienen idénticos entre las secuencias, mientras que las variaciones observadas pueden corresponder a sustituciones de bases, inserciones o deleciones (indels). Estas diferencias constituyen una fuente importante de información para la delimitación taxonómica, la identificación molecular y el estudio de las relaciones evolutivas entre los organismos.

En la Figura 17, se observa que la mayor parte de los sitios analizados presentan una elevada conservación nucleotídica, evidenciando la homología entre las secuencias comparadas. Asimismo, se identifican posiciones polimórficas (recuadros amarillos) que permiten distinguir entre las especies evaluadas y respaldan su diferenciación genética. Estas diferencias nucleotídicas son las que pueden utilizarse como "caracteres diagnostico" para la delimitación o separación entre especies.

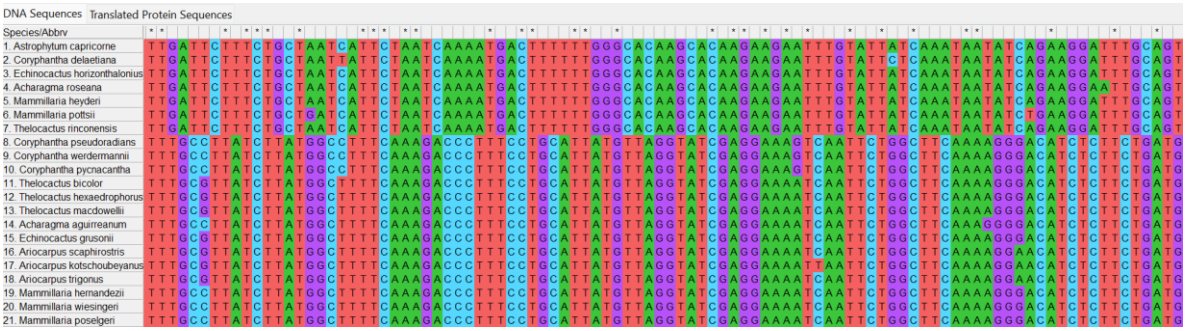

Figura 16. Segmento del alineamiento múltiple de secuencias de consulta.

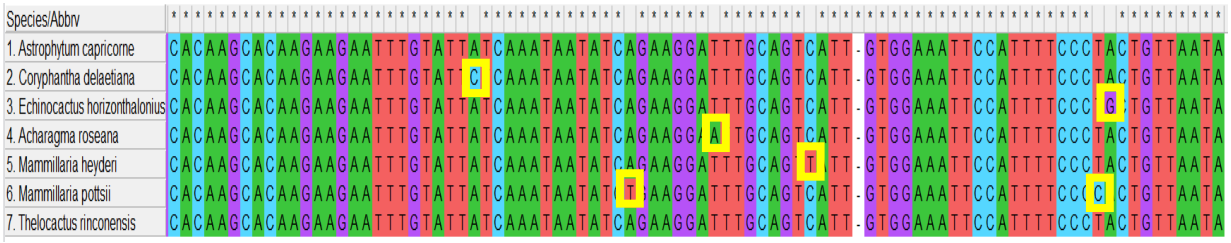

Figura 17. Sitios parsimoniosos informativos (recuadros amarillos).

7.4.4. Análisis de las características de secuencias de consulta

Posterior al alineamiento se verificó la calidad de las secuencias lo cual arrojó un contenido de G+C del 30.40%. La longitud de las secuencias después de la eliminación de los extremos fue de 523-630 pb. Además, se determinaron sitios conservados que indican que el ADN no ha cambiado a lo largo de la evolución, lo que quiere decir es que esa región posiblemente codifica para una proteína o función vital, por otro lado se pueden identificar sitios variables en donde los organismos varían en nucleótidos que nos indica que ha ocurrido una mutación en algún punto de la evolución y por ultimo los sitios informativos que deben contener al menos dos tipos de nucleótidos diferentes y debe aparecer al menos dos veces en el alineamiento, este suceso indica que comparten un ancestro en común y se pueden conectar especies con otras (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de variabilidad y características del alineamiento de las secuencias nucleotídicas.

Características de la secuencia	**Número de sitios**
Sitios variables	37
Sitios conservados	580
Sitios parsimoniosos informativos	7
Longitud de secuencia alineada	701

7.4.5. Construcción del Dendrograma

El dendrograma es una herramienta que nos permite visualizar las relaciones jerárquicas entre datos comparados; dicha herramienta obtenida por el método Neighbor-Joining basado en secuencias del gen *matK*, su estructura permitió identificar dos clados principales. El primero (Grupo A o cuadro azul) conformado por *Mammillaria heyderi*, *Mammillaria pottsii* y *Coryphantha delaetiana.* Dentro de este grupo, las especies de *Mammillaria* mostraron una relación genética más estrecha entre sí, formando un subclado que refleja su cercanía taxonómica y su pertenencia al mismo género. Por su parte, *Coryphantha delaetiana* se agrupó como taxón hermano de este subclado, sugiriendo una afinidad genética con las especies de *Mammillaria* analizadas.

El segundo clado (Grupo B o cuadro rojo) estuvo integrado por *Acharagma roseanum*, *Thelocactus rinconensis, Astrophytum capricorne y Echinocactus horizonthalonius*. En este grupo, *Astrophytum capricorne y Echinocactus horizonthalonius* presentaron la mayor similitud genética, formando un subclado bien definido. A su vez, *Thelocactus rinconensis* se agrupó como taxón hermano de dicho subclado, mientras que *Acharagma roseanum* ocupó una posición más basal dentro del grupo. Esta organización sugiere que las especies incluidas en el grupo B comparten una historia evolutiva común diferenciada de la observada en el grupo A.

En conjunto, la formación de estos dos clados indica que las secuencias del gen *matK* contienen suficiente variación para discriminar entre los taxones analizados y reflejar patrones de afinidad genética congruentes con su clasificación taxonómica dentro de la familia Cactaceae.

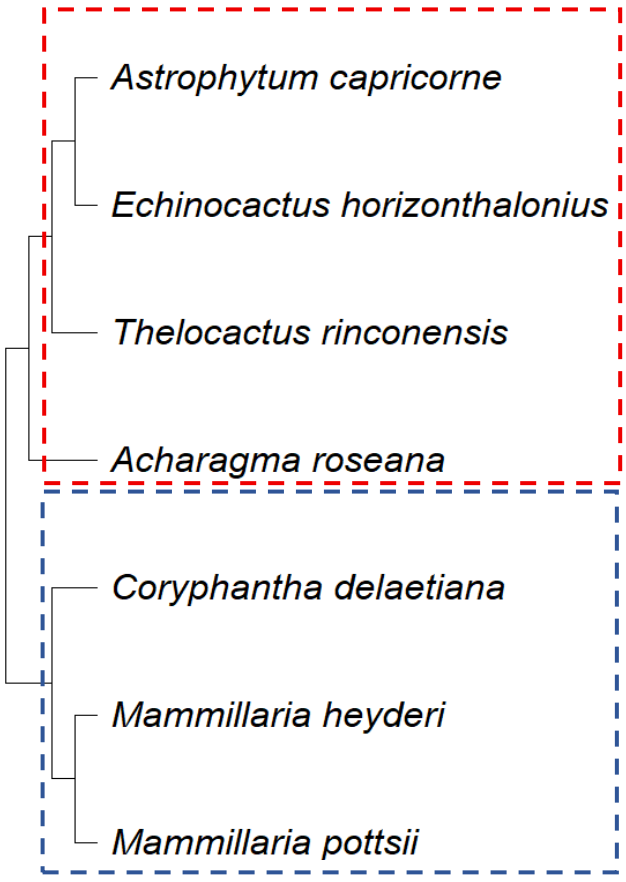

Figura 18. Dendrograma de similitud genética de especies de Cactaceae basado en el marcador *matK*. Los recuadros de color indican los principales clados/grupos formados.

8. DISCUSIÓN

Las herramientas moleculares, como el código de barras de ADN, han demostrado ser de gran utilidad para la correcta identificación y delimitación taxonómica dentro de la familia Cactaceae, un grupo que presenta importantes desafíos debido a la alta similitud morfológica entre muchas de sus especies.

En primer lugar, la extracción de ADN se realizó de manera exitosa. A pesar de que las cactáceas constituyen un grupo de difícil manipulación debido a la presencia de compuestos que pueden interferir en el proceso de extracción, el método empleado permitió obtener ADN de calidad adecuada para los análisis posteriores. Esto puede atribuirse al uso del método CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), el cual es un detergente catiónico que promueve la lisis celular mediante la ruptura de la bicapa lipídica de las membranas y la liberación del contenido celular, incluido el ADN. Asimismo, durante la extracción de ADN vegetal, el CTAB favorece la eliminación de proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos, sustancias que pueden coprecipitar con el ADN y afectar su pureza, desempeñando así un papel fundamental en la obtención de ADN de alta calidad (Schenk et al., 2023).

Posteriormente, los cebadores diseñados permitieron una amplificación exitosa de las 16 muestras de cactáceas colectadas en la región sureste del estado de Coahuila, obteniéndose una tasa de amplificación del 100 %. Este resultado supera lo reportado por diversos estudios previos. Por ejemplo, Yesson et al. (2011), trabajando con un amplio muestreo de cactáceas, señalaron dificultades en la amplificación por PCR asociadas a problemas de universalidad e hibridación de los cebadores. De manera similar, Bafeel et al. (2011), reportaron una tasa de éxito de amplificación del 69 % en especies de zonas áridas utilizando cebadores universales. En contraste, Yu et al. (2011) obtuvieron altos porcentajes de amplificación (93.1 %).

A pesar del éxito obtenido en la amplificación, únicamente siete de las 16 muestras generaron secuencias con parámetros de calidad adecuados para los análisis posteriores, lo que representa una tasa de recuperabilidad de secuencias del 43.7 %. Este resultado evidencia que la obtención de un producto de PCR no garantiza necesariamente la generación de secuencias de alta calidad.

La baja tasa de secuenciación observada puede explicarse, en parte, por las características propias de las cactáceas. Algunos autores señalan la presencia de elevadas concentraciones de metabolitos secundarios, mucílagos y pectinas, los cuales pueden asociarse con proteínas, fenoles y otros componentes celulares, dificultando la purificación del ADN (Rache-Cardenal et al., 2022). Estos compuestos permanecen como contaminantes residuales e interferir con procesos posteriores, incluyendo la actividad de la ADN polimerasa y la calidad de las secuencias obtenidas (Martínez González et al., 2017; Fehlberg et al., 2013).

Además de los posibles efectos de los inhibidores químicos, la baja recuperabilidad de secuencias también puede relacionarse con las características evolutivas del marcador *matK*. Este locus es reconocido por su elevado poder discriminatorio y rápida tasa de evolución (Hollingsworth et al., 2011), características que favorecen la identificación de especies, pero que también incrementan la probabilidad de desajustes o mismatches entre los cebadores y las secuencias blanco (Bafeel et al., 2011). Estos desajustes pueden reducir la eficiencia de la amplificación y secuenciación al afectar el correcto acoplamiento de la ADN polimerasa durante la PCR (Stadhouders et al., 2010).

La problemática observada coincide con lo señalado por el CBOL Plant Working Group et al. (2009), quienes reportaron que *matK* presenta una menor eficiencia en la recuperación de secuencias en comparación con loci más conservados como *rbcL*. Posteriormente Bafeel et al. (2011) corroboraron esta tendencia al documentar que la elevada variabilidad de *matK* puede dificultar una hibridación óptima de los cebadores.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que los cebadores diseñados para este estudio presentaron una elevada eficiencia de amplificación, logrando amplificar el total de las muestras analizadas. Sin embargo, la tasa de secuenciación obtenida evidencia que persisten limitaciones asociadas tanto a las características bioquímicas de las cactáceas como a la naturaleza evolutiva del marcador *matK*. Aun así, el éxito de amplificación alcanzado sugiere que los cebadores desarrollados poseen una capacidad de hibridación superior a la reportada en diversos estudios previos (Yesson et al., 2011; Yu et al., 2011;Bafeel et al., 2011). Lo cual constituye una herramienta prometedora para futuras investigaciones de código de barras de ADN en cactáceas.

El análisis mediante BLASTn permitió otorgar una identificación a las secuencias obtenidas en diferentes niveles de identificación, lo que demuestra que el marcador *matK*, posee un adecuado poder de identificación para las especies analizadas. Este porcentaje supera lo reportado por Yesson et al. (2011), quienes señalaron que, a pesar de presentar problemas durante la PCR, *matK* logró identificar sin ambigüedades el 77 % de las especies analizadas.

No obstante, la capacidad de discriminación de *matK* presenta ciertas limitaciones cuando se pretende resolver relaciones entre especies estrechamente emparentadas. Estudios realizados en agaves han demostrado que este marcador posee un número reducido de sitios polimórficos, consecuencia de procesos de radiación adaptativa reciente, lo que disminuye su resolución taxonómica durante los análisis de BLASTn (Jiménez-Barron et al., 2020; Ritchie, 2014). Esta situación también ha sido documentada en cactáceas (Yesson et al., 2011).

En este estudio, dichas limitaciones se evidenciaron en *Thelocactus rinconensis*, cuya identificación fue clasificada como "ambigua" en el análisis BLASTn. Sin embargo, esta ambigüedad no debe interpretarse como un error del marcador, sino como una limitación del algoritmo de búsqueda. Ross et al. (2008) explican que una identificación ambigua ocurre cuando una secuencia presenta la misma similitud con múltiples registros de referencia, impidiendo su asignación inequívoca a un solo taxón. De manera similar, Arakaki et al. (2011) atribuyen este fenómeno a la reciente radiación evolutiva de las cactáceas, estiman que el linaje de la familia se originó hace unos 35 millones de años, pero experimentó una rápida diversificación entre 10 y 15 millones de años, dando lugar a especies morfológicamente distintas que aún conservan secuencias de *matK* prácticamente idénticas. Por su parte, el análisis del dendrograma complementó los resultados del BLASTn. El dendrograma mostró la formación de dos clados principales, cuya estructura fue congruente con las relaciones evolutivas descritas previamente para la subfamilia Cactoideae.

En el clado A se observó una estrecha relación entre los géneros *Mammillaria* y *Coryphantha*. Esta asociación coincide con la clasificación propuesta originalmente por Engelmann (1856), quien consideró a *Coryphantha* como un subgénero de *Mammillaria* debido a su gran similitud morfológica. Estudios filogenéticos recientes, demostraron que ambos géneros comparten un ancestro común dentro de la tribu Cacteae y pertenecen al clado Mammilloide; sin embargo, no constituyen clados hermanos (Breslin et al., 2021).

La resolución obtenida mediante *matK* fue consistente con estos antecedentes, permitiendo corroborar la monofilia del grupo y distinguir claramente ambos géneros. Esta separación también está respaldada por caracteres morfológicos compartidos, como los tallos globosos tuberculados y las areolas dimórficas (Butterworth & Wallace, 2004; Hernández-Hernández et al., 2011).

Lo anterior indica que el marcador conserva suficientes sitios polimórficos para delimitar de manera confiable estos taxones y confirma la eficiencia de los cebadores diseñados para este estudio. Por su parte, el clado B agrupó a *Astrophytum capricorne*, *Echinocactus horizonthalonius*, *Thelocactus rinconensis* y *Acharagma roseanum*. Dentro de este grupo destacó la estrecha relación filogenética entre *Astrophytum capricorne* y *Echinocactus horizonthalonius*, los cuales conformaron un clado monofilético. Esta asociación resulta congruente con la morfología de ambas especies, caracterizadas por presentar tallos globosos y costillas longitudinales bien definidas (Hernández Hernández et al., 2011).

A pesar de su cercanía filogenética, ambas especies fueron identificadas correctamente mediante BLASTn al nivel de especie, lo que confirma que las secuencias obtenidas conservaron suficientes sitios informativos para su adecuada delimitación taxonómica.

Finalmente, *Acharagma roseanum* apareció como un linaje de divergencia temprana dentro del grupo B. Tradicionalmente, este género fue asociado con *Mammillaria* debido a la presencia de tallos tuberculados o "mamilas". Sin embargo, estudios filogenéticos han demostrado que estos caracteres surgieron de manera independiente mediante procesos de convergencia evolutiva (Butterworth et al., 2002; Hernández-Hernández et al., 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan esta hipótesis, ya que, a pesar de compartir semejanzas morfológicas con *Mammillaria*, *Acharagma roseanum* se agrupó dentro del clado B, indicando que el marcador *matK* conserva suficiente información filogenética para reflejar relaciones evolutivas más allá de las similitudes morfológicas. Sin embargo, también puede significar que la secuencia de *Acharagma roseanum* necesitaba mayor trabajo de edición bioinformático.

9. CONCLUSIONES

A pesar de las complicaciones del manejo de cactáceas en procesos moleculares, la extracción de ADN genómico y la amplificación por PCR de la región *matK* resultaron exitosas en las 16 muestras colectadas. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de la secuenciación únicamente siete muestras (43.7%) fueron de alta calidad.

Por otro lado, el análisis BLASTn demostró que el marcador *matK*, posee un poder de resolución óptimo en la identificación de las muestras de cactáceas a nivel de género o especie. No obstante, hubo limitaciones para resolver taxones estrechamente relacionados debido muy probablemente a procesos de radiación adaptativa reciente, lo que derivó en una asignación ambigua para *Thelocactus rinconensis*.

Por su parte, el dendrograma fue consistente con las relaciones evolutivas descritas para la subfamilia Cactoideae. Se corroboró la estrecha afinidad genética entre *Mammillaria* y *Coryphantha* dentro del clado *Mammilloide*. Asimismo, la posición filogenética de *Acharagma roseanum* como un linaje de divergencia temprana respalda la hipótesis de que sus similitudes morfológicas con *Mammillaria* son producto de una convergencia evolutiva.

Finalmente, se recomienda continuar con investigaciones en el ámbito molecular encaminadas a los códigos de barras de ADN de cactáceas de zonas áridas para contrarrestar las limitaciones de resolución observadas, e implementar un código de barras multilocus combinando regiones como *matK* y *rbcL*.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, E. F. (2001). The cactus family (Timber Press, Vol. 1).

Arakaki, M., Christin, P. A., Nyffeler, R., Lendel, A., Eggli, U., Ogburn, R. M., Spriggs, E., Moore, M. J., & Edwards, E. J. (2011). Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(20), 8379–8384.

Avila-Escobar, J. E., Jiménez-Noriega, M. S., & De la Rosa-Tilapa, A. (2023). Comparative stem anatomy of three species of *Coryphantha* (Cactoideae-Cactaceae). *Botanical Sciences*, *101*(1), 233–242.

Bafeel, S. O., Arif, I. A., Bakir, M. A., & Khan, H. A. (2011). Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (*matK*) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (*rbcL*) for barcoding of some arid plants. *Plant Omics Journal*, *4*(4), 195–198.

Bengtsson-Palme, J. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods In Ecology And Evolution*, *4*(10), 914–919.

Bravo-Hollis, H. (1978). Las Cactáceas de México (Vol. 1). Universidad Nacional Autónoma de México.

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.

Butterworth, C. A., Cota-Sánchez, J. H., & Wallace1, R. S. (2002). Molecular Systematics of Tribe Cacteae *(Cactaceae: Cactoideae):* A Phylogeny Based on rpl16 Intron Sequence Variation. *The American Society of Plant Taxonomists*, *27*(2), 257–270.

Butterworth, C. A., & Wallace, R. S. (2004). Phylogenetic studies of *Mammillaria* (Cactaceae)—insights from chloroplast sequence variation and hypothesis testing using the parametric bootstrap. *American Journal of Botany*, *91*(7), 1086–1098.

Canales Martínez, M., Hernández Delgado, T., Caballero Nieto, J., Romo de vivar Romo, A., Durán Díaz, Á., & Lira Saade, R. (2006). Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*, *75*, 21–43.

Castillo-Campohermoso, A. D., López-Espinosa, A., & Ocampo-Fletes, I. (2010). Conocimiento y uso de Cactáceas por familias campesinas en Coxcatlán, Puebla. *Ra Ximhai*, *6*(3), 347–353.

CBOL Plant Working Group, Peter M. Hollingsworth, Laura L. Forrest, John L. Spouge, Mehrdad Hajibabaei, Sujeevan Ratnasingham, Michelle van der Bank, Mark W. Chase,

Robyn S. Cowan, & David L. Erickson, A. J. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(31), 12794–12797.

Celaya Michel, H., & Celaya Rosas, M. (2023). Desierto Sonorense: mucho que aportar a la humanidad. *Elementos*, *132*, 101–106.

Chen, J., Zhao, J., Erickson, D. L., Xia, N., & Kress, W. J. (2015). Testing DNA barcodes in closely related species of Curcuma (*Zingiberaceae*) from Myanmar and China. *Molecular Ecology Resources*, *15*(2), 337–348.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, *5*(1).

Dhivya, S., Rajeev Kumar Sarma, & Ramalingam Sathishkumar. (2008). Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from *Zingiberaceae* for plant DNA barcoding. *Bioinformation*, *3*(1), 24–27.

Díaz, M. J. C., Ramos, C. M. B., & Arias, S. (2020). The Cactaceae family in Tabasco, Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, (127).

Engelmann, G. (1856). Annual Meeting; Synopsis of the Cactaceæ of the Territory of the United States and Adjacent Regions. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, *3*, 254–314.

Fehlberg, S. D., Allen, J. M., & Church, K. (2013). A novel method of genomic DNA extraction for Cactaceae. *Applications in Plant Sciences*, *1*(3).

Fernández-Borja, H. (2018). El valle de Tehuacán-cuicatlán: hábitat originario de mesoamérica. *Hereditas*.

García Aguilar, M. de los A. (2014). Variación Genética de tres especies silvestres del género *Hylocereus* (Berger) Britton y Rose (Cactaceae) en México con base en secuencias de *matK, rbcL, psbA, trnL-F e ITS*. Colegio de Postgraduados.

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.

Gómez Díaz, J. D., & Monterroso Rivas, A. I. (2012). Caracterización del índice de aridez en México usando dos alternativas de estimación de la evapotranspiración potencial y escenarios de cambio climático. *Cambio Climático: Extremos e Impactos*, 105–114.

González-Medrano, F. (2012). Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación. *Las Zonas Áridas y Semiáridas de México*.

Granados-Sánchez, D., Sánchez-González, A., Granados Victorino, R. L., & Borja de la Rosa, A. (2011). Ecología de la vegetación del desierto Chihuahuense. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, *17*, 111–130.

Guzmán, U., Arias, S., & Dávila, P. (2003). Catálogo de cactáceas mexicanas. *Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional Para El Conocimiento y Uso de La Biodiversidad*, (1), 315.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313–321.

Hernández, H., & Godinez, H. (1994). Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*, *26*, 33–52.

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.

Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, *6*(5).

Hřibová, E., Čížková, J., Christelová, P., Taudien, S., de Langhe, E., & Doležel, J. (2011). The ITS1-5.8S-ITS2 sequence region in the musaceae: Structure, diversity and use in molecular phylogeny. *PLoS ONE*, *6*(3).

Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding. *Genome (Canadian Science Publishing)*, *59*(11), 913–932.

Jiménez Sierra, C. L. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*, *12*(1).

Jiménez-Barron, O., García-Sandoval, R., Magallón, S., García-Mendoza, A., Nieto-Sotelo, J., Aguirre-Planter, E., & Eguiarte, L. E. (2020). Phylogeny, diversification rate, and divergence time of *Agave sensu lato* (Asparagaceae), a group of recent origin in the process of diversification. *Frontiers in Plant Science*, *11*.

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 Panamá. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(44), 18621–18626.

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), 1547–1549.

Lara Rivera, A. L., López López, M. de J., & Cervantes Díaz, L. (2024). Barcode of life, a tool to know and conserve biodiversity. *Biología y Sociedad*, *7*(13), 15–21.

Letsiou, S., Madesis, P., Vasdekis, E., Montemurro, C., Grigoriou, M. E., Skavdis, G., Moussis, V., Koutelidakis, A. E., & Tzakos, A. G. (2024). DNA Barcoding as a Plant Identification Method. In *Applied Sciences* (Vol. 14, Number 4, p. 1415).

Martínez González, C. R., Ramírez Mendoza, R., Jiménez Ramírez, J., Gallegos Vázquez, C., & Luna Vega, I. (2017). Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill.(Cactaceae). *Plant Methods*, *82*.

Monard, C., Gantner, S., & Stenlid, J. (2012). Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, *84*(1), 165–175.

Nyffeler, R., & Eggli, U. (2010). A farewell to dated ideas and concepts: Molecular phylogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia*, *6*, 109–149.

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. In *Bioinformatics* (Vol. 28, Number 8, pp. 1166–1167).

Pizarro-Neyra, J. (2014). Cactáceas de Tacna. *Ciencia & Desarrollo*, (5), 100–105.

Rache-Cardenal, L. Y., Albesiano-Hoyos, A. S., & Tall, H. (2022). Optimization of a DNA extraction method using Subepidermis from *Austrocylindropuntia* and *Opuntia*-Opuntioideae. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, *12*(2), 305–314.

Ritchie, W. (2014). An assessment of CBOL plant DNA barcodes in the genus *Manfreda Salisb.* (Asparagaceae*)* for utility in species Identification and phylogenetic studies. *Bradleya*, (32), 172–179.

Rodrigues, M. S., Morelli, K. A., & Jansen, A. M. (2017). Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. *Parasites & Vectors*, *10*(1).

Ross, H. A., Murugan, S., & Li, W. L. S. (2008). Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology*, *57*(2), 216–230.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology And Evolution*, *4*(4), 406–425.

Sandoval-Mata, T. N., Hernández-Sandoval, L., Munguía-Lino, G., Steinmann, V. W., & Delgado-Salinas, A. (2024). Regionalización de la provincia del Desierto Chihuahuense con base en la distribución de especies de *Dalea* (Fabaceae). *Botanical Sciences*, *102*(3), 975–994.

Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J., & Fabre, P. P. (2023). What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences*, *11*(3).

Sharma, R., Mahla, H. R., Mohapatra, T., Bhargava, S. C., & Sharma, M. M. (2003). Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology*, *21*(1), 43–50.

Stadhouders, R., Pas, S. D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T. H. M., & Schutten, M. (2010). The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5′ nuclease assay. *Journal of Molecular Diagnostics*, *12*(1), 109–117.

Tabita, R., Hanson, T. E., Li, H., Satagopan, S., Singh, J., & Chan, S. (2007). Function, structure, and evolution of the Rubisco-like proteins and their Rubisco Homologs. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, *71*(4), 576–599.

Tenorio-Escandón, P., Ramírez-Hernández, A., Flores, J., Juan-Vicedo, J., & Martínez-Falcón, A. P. (2022). A systematic review on *Opuntia* (Cactaceae; Opuntioideae) flower-visiting insects in the world with emphasis on Mexico: Implications for Biodiversity Conservation. In *Plants* (Vol. 11, Number 1). MDPI.

Vázquez Gómez, M. A., Farrera Sarmiento, O., Orantes García, C., & Ramos Arreola, L. del C. (2023). Etnobotánica de las cactáceas en mercados de la depresión central de Chiapas, México. *Lacandonia*, *17*(1), 7–28.

Vernooy, R., Haribabu, E., Muller, M. R., Vogel, J. H., Hebert, P. D. N., Schindel, D. E., Shimura, J., & Singer, G. A. C. (2010). Barcoding life to conserve biological diversity: Beyond the taxonomic imperative. *PLoS Biology*, *8*(7).

Villarreal-Quintanilla, J. A., Bartolomé-Hernández, J. A., Estrada-Castillón, E., Ramírez-Rodríguez, H., & Martínez-Amador, S. J. (2016). El elemento endémico de la flora vascular del Desierto Chihuahuense. *Acta Botánica Mexicana*, *118*, 65–96.

Villaseñor, J. L., Dávila, P., & Chiang, F. (1990). Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Botanical Sciences*, (50), 135–149.

Wang, X., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J., & Cai, D. (2014). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Biology and Evolution*, *15*(3).

Yesson, C., Barcenas, R. T., Hernández, H. M., Ruiz Maqueda, M. de la L., Prado, A., Rodríguez, V. M., & Hawkins, J. A. (2011). DNA barcodes for mexican Cactaceae, plants under pressure from wild collecting. *Molecular Ecology Resources*, *11*(5), 775–783.

Yu, J., Xue, J.-H., & Zhou, S. (2011). New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal Of Systematics And Evolution*, *49*(3), 176–181.