**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

# Caracterización Molecular de Especies de la Familia Cactaceae Utilizando el Fragmento ITS2 Como Marcador.

Por:

**MIREYA SÁNCHEZ SALINAS**

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 ITS2 Como Marcador.

Por:

**MIREYA SÁNCHEZ SALINAS**

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. Elor Cristina Pacheco Reyes
Asesor Principal Externo

Dra. Silvia Yudit Martínez Amador
Co-Asesora

Dra. Rosalinda Mendoza Villareal
Co-Asesora

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Abril del 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Caracterización Molecular de Especies de la Familia Cactaceae Utilizando el Fragmento ITS2 Como Marcador.

Por:

**MIREYA SÁNCHEZ SALINAS**

TESIS

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

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Aprobada por:

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
**Presidenta**

Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes
Secretaria

Dra. Rosalinda Mendoza Villareal
Sinodal

Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Sinodal

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

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

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Abril del 2026

**AGRADECIMIENTOS**

El principal agradecimiento a **Dios** quien me ha guiado a lo largo de mi existencia me ha brindado fortaleza y esperanza en momentos de dificultad para poder seguir adelante.

Valoro y estimo a mi alma mater **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por haberme permitido formarme en ella como una profesionista competitiva, llena de conocimientos y expectativas al abrirme sus puertas, convirtiéndose en mi segundo hogar. ¡Una vez buitre, siempre buitre!

A mi asesor **Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez** agradezco profundamente por su valiosa orientación, su apoyo brindado, su paciencia y comprensión durante mi formación profesional, además de su amistad brindada, demostrando ser una persona solidaria que me alentó con consejos acertados desde mi inicio en la universidad desempeñando también el papel de tutor.

Agradezco a mi co-asesora **Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes** por su invaluable apoyo, por el conocimiento y sobre todo aprecio profundamente el tiempo brindado para llevar a cabo esta investigación. Su paciencia, experiencia y compromiso académico fueron fundamentales para fortalecer cada etapa de este proyecto.

Gracias a **mi familia** por siempre confiar en mí, por su apoyo y palabras de motivación en situaciones adversas, por su ejemplo de perseverancia, su apoyo incondicional en cada una de mis metas; siendo ellos mi principal fuente de motivación.

Por último, agradezco al **departamento de botánica** por haberme abierto sus puertas convirtiéndose en mi lugar de trabajo en el trayecto de esta investigación. Así mismo, agradecer a mis **compañeros de laboratorio** que me asesoraron y acompañaron a lo largo de esta etapa.

A **mis amigos** que me acompañaron durante este trayecto y estuvieron en los momentos buenos y malos apoyándome de manera incondicional. Especialmente a **Luz Graciela Ramos Marín**, por tu apoyo durante el desarrollo de este proyecto. Tu compañía, tus palabras de ánimo y tu interés en mi trabajo fueron una gran motivación para continuar y concluir esta investigación. También a la **familia Gómez Pacheco** por haberme aceptado en su hogar como un miembro más de ellos, en mi etapa de prácticas profesionales, por su orientación y

apoyo siendo una inspiración para ser una mejor persona cada día. Por último, agradezco a **Octavio Javier Pérez García** por tu apoyo y comprensión durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por tu paciencia, por escucharme y por motivarme a continuar en los momentos en que el proceso se volvió más demandante.

## DEDICATORIA

**A mi madre:**

Virginia Salinas Mendieta con todo mi amor y gratitud le dedico este logro, porque ha sido el pilar más fuerte en mi camino. Gracias por todo su esfuerzo y cada sacrificio silencioso, por creer en mi incluso cuando yo dudaba, por los consejos, valores y principios inculcados. Este proyecto no solo representa años de estudio y dedicación, sino también cada uno de tus esfuerzos, tus palabras de aliento y tu ejemplo de fortaleza. Todo lo que soy y lo que he alcanzado tiene su raíz en tu amor.

Gracias por ser mi guía, mi inspiración y mi hogar. Este triunfo también es suyo.

**A mis hermanos:**

Liliana, Sonia, Javier, Tatiana y Víctor Hugo Sánchez Salinas Por su apoyo incondicional y los consejos que fueron fundamentales en este camino para lograr mis metas.

**INDICE GENERAL**

**RESUMEN** ..... **11**

**ABSTRACT** ..... **12**

**INTRODUCCIÓN** ..... **13**

**1. JUSTIFICACIÓN** ..... **14**

**2. OBJETIVOS** ..... **14**

2.1 Objetivo general ..... 14

2.2 Objetivos específicos ..... 14

**3. HIPÓTESIS** ..... **15**

**4. REVISIÓN DE LITERATURA** ..... **16**

4.1 Familia Cactaceae ..... 16

4.1.1 Subfamilias de Cactaceae ..... 16

4.1.2 Géneros y formas de la tribu cacteae ..... 17

4.2 Código de Barras de ADN ..... 24

4.3 Marcadores de código de barras ..... 26

4.3.1 ITS2: segundo espaciador transcrito interno del cistrón ribosomal nuclear ..... 27

4.4 Métodos analíticos ..... 27

4.4.1 BLAST ..... 27

4.4.2 Dendrograma ..... 28

4.5 Métodos de extracción de ADN y sus problemáticas en cactáceas ..... 29

**5. MATERIALES Y MÉTODOS** ..... **30**

5.1 Colecta en campo ..... 30

5.2 Extracción de ADN genómico ..... 31

5.3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa ..... 31

5.4 Secuenciación ..... 33

5.5 Análisis bioinformático ..... 33

5.5.1 Edición de electroferogramas ..... 33

5.5.2 Alineamiento de secuencias ..... 33

5.5.3 Descarga de secuencias de referencia ..... 34

5.5.4 Creación de biblioteca con secuencias de consulta ..... 34

5.5.5 BLAST ..... 34
5.5.6 Evaluación de la calidad de secuencias ..... 34
5.5.7 Construcción del dendrograma ..... 34
**6. RESULTADOS ..... 35**
6.1 Colecta en campo ..... 35
6.2 Extracción de ADN genómico ..... 39
6.3 Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) ..... **¡Error! Marcador no definido.**
6.4 Análisis bioinformático ..... 40
6.5 BLAST ..... 40
6.6 Edición de electroferogramas ..... 40
6.7 Alineamiento de secuencias ..... 42
6.8 Evaluación de la calidad de secuencias ..... 43
6.9 Construcción del dendrograma ..... 46
**7. DISCUSIÓN ..... 48**
7.1 Extracción y amplificación de ADN ..... 48
7.2 Análisis bioinformático ..... 49
**8. CONCLUSIONES ..... 51**
**9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 52**

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Subfamilia de la familia Cactaceae..... 17

**Figura 2.** Formas de crecimiento de la tribu Cacteae ..... 18

**Figura 3.** Género *Astrophytum* perteneciente a la tribu Cacteae. ..... 18

**Figura 4.** Género *Coryphantha* perteneciente a la tribu Cacteae..... 19

**Figura 5.** Género *Echinocactus* perteneciente a la tribu Cacteae..... 20

**Figura 6.** Género *Ferocactus* perteneciente a la tribu Cacteae. ..... 20

**Figura 7.** Género *Mammillaria* perteneciente a la tribu Cacteae. ..... 21

**Figura 8.** Género *Thelocactus* perteneciente a la tribu Cacteae..... 22

**Figura 9.** Género *Acharagma* perteneciente a la tribu Cacteae. ..... 22

**Figura 10.** Género *Epithelantha* perteneciente a la tribu Cacteae. ..... 23

**Figura 11.** Género *Stenocactus* perteneciente a la tribu Cacteae. ..... 23

**Figura 12.** Ejemplificación representativa de un dendrograma o árbol filogenético. ..... 29

**Figura 13.** Puntos de colecta de las especies en el estado de Coahuila México..... 35

**Figura 14.** Especies colectadas..... 37

**Figura 15.** Extracción de ADN genómico en especies de cactus.. ..... 39

**Figura 16.** Amplificación por reacción en cadena de polimeraza (PCR). ..... 40

**Figura 17.** Electroferograma de la especie *Astrophytum capricorne* ..... 42

**Figura 18.** Electroferograma de la especie *Coryphantha daeletiana*..... 42

**Figura 19.** Electroferograma de la especie *Ariocarpus retusus*. ..... 42

**Figura 20.** Análisis de secuencias consulta y secuencias referencia no alineadas. ..... 43

**Figura 21.** Análisis de secuencias consulta y secuencias referencia alineadas. ..... 43

**Figuara 22.** Sitios conservados generados en la alineación con marcador ITS2..... 45

**Figura 23.** Sitios variables generados en la alineación con marcador ITS2. ..... 45

**Figura 24** Sitios informativos generados en la alineación con marcador ITS2. ..... 46

**Figura 25.** Dendrograma de las secuencias ..... 47

**INDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Mezcla para realizar PCR (GoTaq MasterMix de programasTM). ..... 32

**Tabla 2.** Cebadores y programas de PCR utilizados para la amplificación de ADN ..... 32

**Tabla 3.** Especies y lugares de colecta de muestras colectadas. ..... 37

**Tabla 4:** Identificación de las especies en BLAST. ..... 40

**RESUMEN**

La familia Cactaceae es uno de los grupos vegetales más diversos de México; sin embargo, su identificación taxonómica resulta compleja debido a la variabilidad morfológica y a la naturaleza efímera de muchos de sus caracteres diagnósticos. Como respuesta a esta problemática el código de barras de ADN se posiciona como una herramienta eficaz para la identificación de especies, independientemente de su estado fenológico. Este proyecto de investigación tuvo como objetivo la caracterización molecular de especies de la familia Cactaceae distribuidas en el estado de Coahuila, utilizando el fragmento ITS2 del ADN ribosomal. Las muestras vegetales fueron recolectadas en diferentes localidades del estado de Coahuila. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN genómico mediante el método CTAB modificado, seguido de la amplificación por PCR de la región ITS2. Los productos amplificados fueron secuenciados y analizados mediante herramientas bioinformáticas, que incluyeron la edición de secuencias, alineamiento, comparación en bases de datos utilizando BLAST y la construcción de un dendrograma basado en distancias genéticas. Los resultados mostraron que el marcador ITS2 presentó una alta eficiencia de amplificación y buena calidad de secuencias, lo cual permitió identificar la mayoría de las especies analizadas a nivel de especie o género. El análisis filogenético mostró clados bien definidos, congruentes con sus características morfológicas, lo que demuestra el poder discriminatorio del marcador ITS2. Aunque algunas especies presentaron identificaciones ambiguas, en general los resultados respaldan la utilidad de esta región para estudios taxonómicos en cactáceas, su uso contribuye significativamente al fortalecimiento de estudios taxonómicos y filogenéticos en grupos con alta complejidad morfológica.

**ABSTRACT**

The Cactaceae family is one of the most diverse plant groups in Mexico; however, its taxonomic identification is complex due to morphological variability and the ephemeral nature of many of its diagnostic characteristics. In response to this challenge, DNA barcoding has emerged as an effective tool for species identification, regardless of their phenological stage. This research project aimed to characterize Cactaceae species distributed throughout the state of Coahuila using the ITS2 fragment of ribosomal DNA. Plant samples were collected from various locations in Coahuila. Genomic DNA was then extracted using a modified CTAB method, followed by PCR amplification of the ITS2 region. The amplified products were sequenced and analyzed using bioinformatics tools, including sequence editing, alignment, comparison with databases using BLAST, and the construction of a dendrogram based on genetic distances. The results showed that the ITS2 marker exhibited high amplification efficiency and good sequence quality, allowing for the identification of most of the analyzed species at the species or genus level. Phylogenetic analysis revealed well-defined clades, consistent with their morphological characteristics, demonstrating the discriminatory power of the ITS2 marker. Although some species presented ambiguous identifications, the overall results support the usefulness of this region for taxonomic studies in cacti, and its use significantly contributes to strengthening taxonomic and phylogenetic studies in groups with high morphological complexity.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas de la familia Cactaceae se caracterizan por poseer el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), una adaptación fisiológica que les permite hacer un uso más eficiente del agua en condiciones de escasez hídrica. Gracias a este mecanismo, pueden establecerse en una amplia variedad de ambientes, que abarcan desde zonas áridas, como los desiertos costeros, hasta ecosistemas con mayor humedad, como valles interandinos, laderas occidentales y selvas tropicales. Este grupo está conformado por angiospermas dicotiledóneas cuya distribución natural se restringe al continente americano, y destaca por su importancia ornamental y su elevada capacidad de adaptación ecológica. La identificación morfológica de las Cactáceas presenta múltiples dificultades taxonómicas y prácticas debido a la enorme variabilidad de sus caracteres externos, la presencia de plasticidad fenotípica, hibridación natural, y la ausencia de caracteres diagnósticos consistentes entre especies cercanas. Además, la historia taxonómica de la familia refleja que muchos caracteres morfológicos son homoplásicos (es decir, han evolucionado independientemente en linajes no relacionados), lo que limita su valor como indicadores fiables de parentesco y puede llevar a clasificaciones inestables o sin consenso entre especialistas. Estudios modernos integran datos moleculares para superar estas limitaciones, pero la dificultad de recolectar y curar especímenes debido a su morfología espinosa ha prolongado la inestabilidad de algunas definiciones taxonómicas basadas en morfología.

El uso de código de barras se ha utilizado como la principal y más reciente alternativa para la identificación taxonómica de especies, ya que se basa en la presencia de secuencias de ADN ortólogas (Ali, 2014). Para que un fragmento genómico funcione como marcador eficaz, debe presentar suficiente diferenciación entre especies (variabilidad interespecífica) y, al mismo tiempo, mantener una menor variación dentro de una misma especie (variabilidad intraespecífica). Es ahí cuando surge el concepto de barcoding gap, que se refiere a que entre mayor sea la diferencia en la variabilidad habrá mayor exactitud en la identificación de las especies.

Bajo esta perspectiva, el objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización molecular de diversas especies de cactáceas empleando la región nuclear ITS2, con el propósito de analizar su eficacia en la discriminación entre especies.

# 1. JUSTIFICACIÓN

México se reconoce como el principal centro de diversificación de especies de la familia Cactaceae a nivel mundial. Sin embargo, la identificación taxonómica es complicada debido a que un gran número de especies presentan de manera efímera caracteres morfológicos importantes. Por ello, se han buscado herramientas alternativas que ayuden en la identificación de plantas sin importar su edad o fenología. El uso del código de barras de ADN ha tenido gran impacto en la identificación de especies, estudios evolutivos y de filogenia en diferentes familias de plantas.

# 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente mediante el uso de la región ITS2 especies de la familia Cactaceae distribuidas en el estado de Coahuila.

## 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar especies de cactáceas utilizando cebadores de la región ITS2.

- Evaluar la calidad de secuencias y determinar el poder discriminatorio de la región ITS2

## 3. HIPÓTESIS

El marcador ITS2 permite la caracterización molecular y la identificación de especies de cactáceas, además su poder discriminatorio permite la separación de clados monofiléticos en un dendrograma.

# 4. REVISIÓN DE LITERATURA

## 4.1 Familia Cactaceae

Se estima que existen alrededor de 1,400 especies de cactáceas en el mundo, nativas de América. Investigaciones taxonómicas indican que México alberga la mayor diversidad, distribuida de la siguiente forma: Cerca del 60% de los géneros de cactáceas en México se localiza en los desiertos de Chihuahua y Sonora, además de algunos valles de Hidalgo y Querétaro; de estos, el 25% corresponde a especies endémicas. En la región de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla y Oaxaca) se han identificado al menos 81 especies, de las cuales el 25% son propias de la región. En cuanto a diversidad, San Luis Potosí sobresale con un registro de 151 especies (Vásquez et al., 2020). Estudios actuales señalan que el territorio mexicano alberga 63 géneros y cerca de 670 especies de cactáceas, con un total de 518 especies endémicas, las cuales se distribuyen principalmente en zonas áridas y semiáridas (Guzmán et al., 2003). Por lo tanto, los estados del norte, noroeste y sur del país, donde existen condiciones de aridez y estacionalidad marcada en la vegetación tienen la mayor diversidad de especies (Arias y Aquino, 2019).

Las características anatómicas, morfológicas y fisiológicas presentes en las cactáceas les atribuyen la capacidad para sobrevivir en las condiciones ambientales extremas típicas de los ambientes áridos y semiáridos donde habitan (Cenizo et al., 2013). La rápida absorción de agua por las raíces después de una sequía prolongada y el metabolismo acido de las crasuláceas (CAM) son atributos fisiológicos principales, la forma columnar y globular son particularidades morfológicas importantes, así como el tamaño, la posición del tallo y la presencia de espinas los cuales les permiten tolerar condiciones de estrés abiótico como alta radiación solar y sequía (Loza-Cornejo et al., 2003).

### 4.1.1 Subfamilias de Cactaceae

La familia está compuesta por tres subfamilias principales: Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae. Las cuales se describen brevemente a continuación.

Pereskioideae: denominados comúnmente cactus con hojas representan las especies más antiguas dentro de la familia Cactaceae. Se caracterizan por ser el único grupo con hojas permanentes, las cuales carecen de suculencia **(Fig.1 A)** (Anderson, 2001).

Opuntioideae: grupo de plantas arbustivas que presentan tallos segmentados, caracterizados por la presencia de gloquidios y espinas. En el género *Opuntia*, dichos segmentos son conocidos como cladodios **(Fig. 1 B)** (Gibson y Nobel, 1986; Rebman y Pinkava, 2001).

Cactoideae: representa la subfamilia más extensa dentro de la familia, con 9 tribus y aproximadamente 90 géneros. Entre ellos, destaca Mammillaria, considerado uno de los géneros más diversos de este grupo **(Fig. 1 C)** (Anderson, 2001).

**Figura 1**. Subfamilia de la familia Cactacea A) Subfamilia Pereskioideae, B) Subfamilia Opuntioideae, C) Subfamilia Cactoideae.

### 4.1.2 Géneros y formas de la tribu cacteae

En la subfamilia Cactoideae se distinguen varias tribus, entre ellas la tribu Cacteae, cuyos integrantes presentan distintos hábitos de crecimiento determinados por la forma del tallo. Estos incluyen el tipo cilíndrico (**Fig. 2 A**) caracterizado por presentar mayor desarrollo en altura que en diámetro, sin que esta exceda el doble de su grosor, el columnar (**Fig. 2 B**) donde la altura puede ser de dos a más de cinco veces el diámetro, el globoso (**Fig. 2 C**) en el que la altura y el diámetro son aproximadamente iguales y el globoso-deprimido (**Fig. 2 D**) en el cual el diámetro es mayor que la altura, mostrando un eje vertical comprimido (Vázquez-Sánchez et al., 2012).

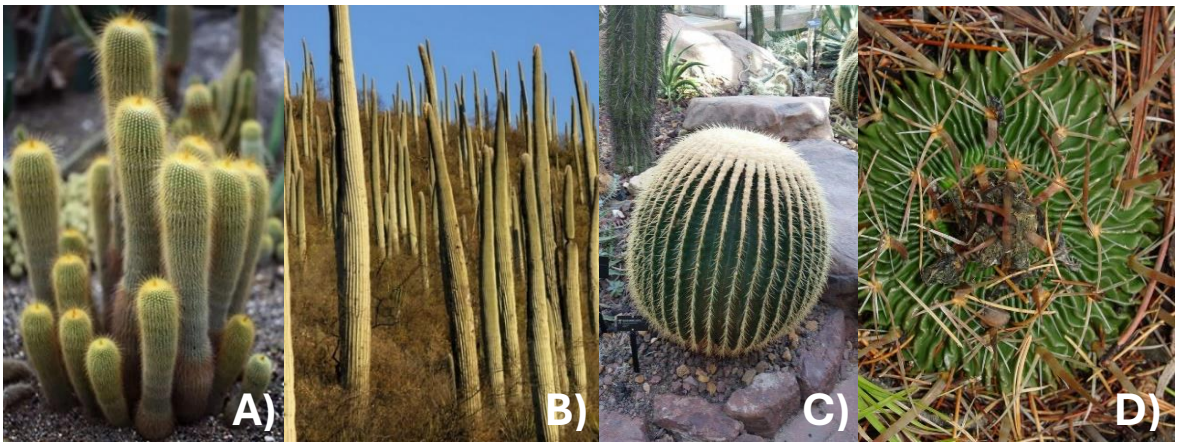



**Figura 2.** Formas de crecimiento de la tribu cacteae; a) cilíndrica, b) columnar, c) globosa, d) globosa – deprimida.

En la tribu Cacteae, predominan los géneros con individuos de talla baja, como *Aztekium* y *Mammillaria*, sin embargo, también existen géneros cuyos integrantes tienen alturas de más de 1 metro como *Echinocactus* y *Ferocactus* o son de tallas intermedias (20-30 cm) como *Escobaria*, *Neolloydia* y *Thelocactus* (Vázquez-Sánchez et al., 2012).

La tribu Cacteae cuenta con una gran diversidad de géneros entre los que destacan los siguientes:

- *Astrophytum*

Este género tiene una morfología consistente son cactus globosos o columnares cortos con apariencia estrellada cuando se ven desde arriba (con la excepción de *A. caputmedusae,* que tiene una morfología tuberculada distintiva). De hecho, la palabra “Astrophytum” significa "planta con forma de estrella". Cabe destacar que todas las especies presentan un acumulo de tricomas blancos en su epidermis en la actualidad se incluyen 6 especies aceptadas (**Figura 3**) (Condini, 2024).

**Figura 3.** Género *Astrophytum* perteneciente a la tribu Cacteae.

- *Coryphantha*

Dentro de la tribu Cacteae, este género ocupa el segundo lugar en riqueza de especies, únicamente por debajo de *Mammillaria.* Su distribución geográfica se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de México, alcanzando regiones como Oaxaca (Hunt et al., 2006). Las especies de *Coryphantha* tienen tallos predominantemente globosos, ovoides, cilíndrico-ovoides y globosos deprimidos. Los tubérculos presentan diferentes formas y varían de acuerdo con su posición en el tallo. Sin embargo, predomina la forma de crecimiento cilíndrica; en los tubérculos más jóvenes y viejos, estos son cónicos y cónico-deltoides medialmente Recientemente, un análisis filogenético de las especies reconocidas de *Coryphantha. Coryphantha* reveló que el género es monofilético, incluyendo 43 especies recuperadas (**Figura 4)** (Avila-Escobar et al., 2023).

**Figura 4.** Género *Coryphantha* perteneciente a la tribu Cacteae.

- *Echinocactus*

De acuerdo con Mauseth (2006) el nombre del género *Echinocactus* deriva de vocablos griegos, donde echinos hace referencia a “erizo”, aludiendo al aspecto espinoso de estas plantas. Entre sus rasgos distintivos se encuentra la presencia de abundantes tricomas en la región apical, los cuales forman una estructura densa y lanosa que cubre el meristemo. Las plantas del género Echinocactus presentan tallos que pueden ser globosos o columnar cortos, con costillas bien definidas y aréolas grandes que originan espinas centrales y radiales diferenciadas. La región apical está cubierta por una densa capa de tricomas que protege el meristemo, y sobre esta zona se desarrollan las flores, dispuestas en corona y parcialmente ocultas entre los tricomas. Los pétalos muestran tonalidades que van del amarillo al rosa purpúreo. Estas especies se encuentran distribuidas en diversos estados de México, como

Oaxaca, Puebla, Coahuila, Durango, Hidalgo, Querétaro, Guanajuato, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (**Figura 5)** (López-Escamilla et al., 2018)

**Figura 5.** Género *Echinocactus* perteneciente a la tribu Cacteae.

- *Ferocactus*

Son cactus perennes y, en su mayoría, crecen de manera solitaria con tallos cilíndricos o columnar. Cada planta presenta entre 11 y 40 costillas, que pueden ser rectas o ligeramente espirales y, en ocasiones, muestran depresiones transversales. De las areolas surgen espinas centrales y radiales, que varían en forma: pueden ser aciculares, anilladas, rectas o curvadas, con ápices rectos o ganchudos. El ápice de estos cactus suele estar algo aplanado, siendo la zona donde se desarrollan las flores. Este género está compuesto por aproximadamente 33 especies, las cuales se encuentran principalmente en los desiertos Sonorense y Chihuahuense, asociadas a vegetación micrófila y crasicaules. Su distribución geográfica se extiende desde el suroeste de Estados Unidos hasta Oaxaca, México, siendo Baja California la región con mayor diversidad y con los ejemplares de mayor tamaño (**Figura 6)** (López y López, 2017).

**Figura 6.** Género *Ferocactus* perteneciente a la tribu Cacteae.

- *Mammillaria*

Rendón Aguilar et al. (2022) mencionan que México concentra la mayor diversidad del género *Mammillaria*, con alrededor de 143 especies y 61 subespecies. En Oaxaca se han registrado 26 especies, siete de ellas endémicas, situando al estado entre los que presentan mayor número de endemismos, después de Baja California Sur y Tamaulipas. Estas cactáceas son apreciadas por su tamaño reducido, la forma de sus tubérculos y espinas, así como por la belleza y colorido de sus flores, lo que las convierte en plantas ornamentales populares. Además, algunas especies tienen usos tradicionales, como la extracción de látex, el alivio de dolencias, y el consumo de sus frutos, denominados chilillos o chilitos, en diversas comunidades del centro y sur del país.

**Figura 7.** Género *Mammillaria* perteneciente a la tribu Cacteae.

- *Thelocactus*

Anderson (2001) indica que los cactus del género *Thelocactus* son de tamaño pequeño a mediano, con tallos que pueden ser redondeados o ligeramente cilíndricos, alcanzando cerca de 25 cm de altura. La mayoría de las especies crecen individualmente, aunque algunas pueden formar pequeños grupos o racimos. Cada planta presenta entre 7 y 20 costillas, a lo largo de las cuales se desarrollan tubérculos con areolas. De estas últimas emergen espinas, siendo las centrales más largas y robustas, mientras que las radiales son más cortas y numerosas, ofreciendo protección a la planta. Los colores de las espinas varían según la especie, predominando tonos blancos y grises, aunque también pueden presentarse amarillos o marrones. Las flores brotan durante la primavera y miden hasta 7cm de diámetro (**Figura 8)** (Anderson, 1987).

**Figura 8.** Género *Thelocactus* perteneciente a la tribu Cacteae.

- *Acharagma*

Según Anderson, (2001), el género está conformado por dos especies de cactus propias del norte de México. Estas plantas suelen desarrollarse de manera aislada, aunque en algunos casos forman agrupaciones pequeñas. Presentan tallos con forma de esfera, cuyo tamaño oscila entre 3 y 7 cm de ancho. Sus costillas presentan tubérculos bien definidos y areolas que no muestran surcos, las flores se encuentran en las puntas de los tallos y varían de color crema a rosa y amarillo. Presenta un conjunto desconcertante de características sutiles, desde el tipo de semilla y fruto hasta la formación de tubérculos (Janeba y Kalas, 2007). Recientemente, este género fue nombrado *Acharagma*; sin embargo, su reconocimiento todavía es limitado. En los alrededores de Saltillo, Coahuila suelen habitar 2 subespecies del género; la subespecie roseanus, común en la zona baja del valle, en alturas comprendidas entre 1000 a 1300 msnm, donde crece con índices de población hasta de 1 planta por metro cuadrado (**Figura 9)** (Salas Cruz, 2014).

**Figura 9.** Género *Acharagma* perteneciente a la tribu Cacteae.

- *Epithelantha*

Su nombre deriva del griego “epi” = sobre, “thele” = pezón y “anthos” = flores, aludiendo a que las flores se desarrollan en la punta de los tubérculos. Este género inicialmente se relacionó con el género *Mammillaria,* pero después se demostró que existen diferencias entre las areolas de ambos géneros (Villavicencio Gutierrez et al., 2012) . Plantas pequeñas, simples o agrupadas, completamente cubiertas por las espinas blancas dispuestas en varias series; ápice hundido y recubierto por un mechón de espinas, con tubérculos numerosos y diminutos, sin surco; flores muy pequeñas emergiendo muy poco entre la lana y las espinas del ápice del tallo (**Figura 10)** (González Elizondo et al., 2015).

**Figura 10.** Género *Epithelantha* perteneciente a la tribu Cacteae.

- *Stenocactus*

Género endémico de México, su centro de distribución se encuentra en el estado de Hidalgo, sur de Querétaro, así como una porción de Guanajuato, en San Luis Potosí, las zonas sur y central concentran el mayor número de especies. Estas plantas son cespitosas, con tallos que varían de globosos a globosos aplanados y rara vez superan los 12 cm de diámetro (Delgado Alvarado, 2007). El ápice se encuentra a veces hundido, con presencia de lana y, en ocasiones, tapado por espinas. Costillas numerosas ensanchadas alrededor de las areolas escasas, espinas diferenciadas dispuestas en torno de toda la areola, flores que brotan de areolas jóvenes del ápice **(Figura 11)** (Jaramillo, 2021).

**Figura 11.** Género *Stenocactus* perteneciente a la tribu Cacteae.

### 4.2 Código de Barras de ADN

En las últimas décadas, las herramientas de biología molecular han adquirido un papel central en la identificación de especies y en el estudio de sus relaciones evolutivas, proporcionando información clave para la diferenciación taxonómica y el entendimiento de la diversidad de especies (Stoeckle y Thaler, 2014). El uso de códigos de barras de ADN se presentó como una herramienta de identificación taxonómica de especímenes y como un mecanismo para descubrir especies crípticas (Paz et al., 2011). No obstante, la ausencia de coincidencias entre secuencias obtenidas de muestras desconocidas y los registros de bases de datos de referencia puede interpretarse como un indicio de vacíos en dichas bases o como evidencia potencial de taxones aún no descritos (Hebert y Gregory, 2005; Zito et al., 2022). Por otro lado, pueden revelar divergencia genética muy alta dentro de una misma especie putativa sugiriendo la existencia de especies crípticas (Paz et al., 2011).

De acuerdo con el Consortium for the Barcode of Life, el código de barras de ADN puede contribuir al cumplimiento de diversos Objetivos de Desarrollo del Milenio, así como apoyar las metas de la Convención sobre la Diversidad Biológica (CBOL, 2009).

- El uso del código de barras de ADN contribuye al reconocimiento oportuno de organismos plaga en sistemas agrícolas, incluso en distintas fases de su desarrollo, lo que mejora las estrategias de manejo y ayuda a disminuir pérdidas productivas, favoreciendo así la seguridad alimentaria (Hajibabaei et al., 2007).
- Esta herramienta molecular resulta eficaz para la identificación precisa de organismos que actúan como vectores de enfermedades en humanos y animales, aun cuando presentan características morfológicas similares entre especies (Stoeckle et al., 2005).
- Asimismo, el código de barras de ADN constituye un recurso útil para evidenciar el comercio ilegal de productos derivados de recursos naturales, incluyendo aquellos que han sido procesados, lo que facilita la detección de especies explotadas y contribuye a su conservación (Asis et al., 2016; Camacho-Oliveira et al., 2020).
- De igual forma, esta técnica es empleada por las autoridades para rastrear el origen de productos provenientes de especies amenazadas que se comercializan en mercados locales, fortaleciendo las acciones orientadas a la protección de la biodiversidad (Mishra et al., 2017).

- Por otra parte, el DNA barcoding se aplica en el monitoreo de la calidad del agua mediante la identificación de especies indicadoras, incluso aquellas que presentan dificultades para su reconocimiento por métodos tradicionales (Ramos et al., 2012).

El código de barras de ADN se define como una metodología molecular que permite la identificación ágil y precisa de especies mediante el análisis de fragmentos cortos y estandarizados del material genético. Una región genómica puede emplearse como código de barras de ADN siempre que permita discriminar entre la variabilidad existente entre especies relacionadas (interespecífica) y la que ocurre dentro de una misma especie (intraespecífica). A partir de lo anterior, surge el concepto de "barcoding gap", el cual se refiere a la diferencia entre la variación interespecífica e intraespecífica. A mayor amplitud de esta diferencia, más precisa será la discriminación e identificación (Paz et al., 2011).

El concepto de código de barras genético fue propuesto formalmente en 2003 por Paul Hebert y su equipo de investigación en la University of Guelph, Canadá. En dicho planteamiento, publicado bajo el título "Identificación biológica a través de los códigos de barras de ADN", se planteó el uso de un fragmento aproximado de 500 pares de bases del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) como marcador universal para la identificación de especies animales (Ramos et al., 2012). No obstante, este enfoque presenta limitaciones en algunos grupos taxonómicos, como las plantas superiores, donde el gen COI muestra un alto grado de conservación, lo que restringe su capacidad para discriminar entre especies. Para ello, se deben emplear genes de plástidos (*rbcL*, ndhF) o de ADN ribosomal nuclear (ITS). Asimismo, en varios grupos de animales, hongos y algas, COI es insuficiente para distinguir especies y es preciso secuenciar genes nucleares, resulta imposible emplear COI, pues dichos organismos carecen de mitocondrias (los microsporidios) (Lanteri, 2007). El propósito principal del ADN barcoding fue establecer un método estandarizado y confiable que permitiera identificar especies a partir del análisis de secuencias cortas de ADN (Hebert et al., 2003)

### 4.3 Marcadores de código de barras

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Se utilizan para localizar y aislar genes de interés (Alcántara, 2007) Los principales marcadores moleculares utilizados en la codificación genética son: *matK*, *rbcL*, rpl32-*trnL, trnH-psbA* e ITS2. Siendo estos los cuales cumplen con las características para que una secuencia pueda ser considerada como código de barras propuestas por el CBOL (Cristians, 2020). La alternativa ha sido emplear dos regiones de genes en el cloroplasto (*matK* y *rbcL*) consideradas como las regiones estándar/universales para este grupo de organismos (Altamirano-Benavides y Yanez-Moretta, 2016).

Por su parte, rbcL comprende una región de aproximadamente 599 pares de bases ubicada en el extremo 5' del gen que codifica para la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), y es considerado uno de los loci mejor caracterizados debido a su fácil amplificación y alineación, además de contar con un amplio número de secuencias disponibles en bases de datos como GenBank; sin embargo, presenta una capacidad de discriminación relativamente moderada (~85%) (CBOL Plant Working Group, 2009; Kress et al., 2005).

En contraste, matK abarca cerca de 850 pb en la región central del gen que codifica la enzima maturasa K. Este locus se caracteriza por su rápida tasa de evolución, lo que le confiere una alta capacidad de discriminación, aunque su tasa de recuperación puede ser menor (~66%) y su amplificación y alineación suelen requerir mayor optimización (CBOL Plant Working Group, 2009; Hollingsworth et al., 2011).

Por otro lado, el espaciador intergénico rpl32-trnL del cloroplasto presenta altos niveles de variabilidad entre distintos linajes de angiospermas (~78%); no obstante, su longitud variable (543–1417 pb) y la presencia de INDELs extensos dificultan tanto su amplificación como su análisis bioinformático, aunque resulta útil para la diferenciación a nivel específico en ciertos grupos (Shaw et al., 2007).

Finalmente, el espaciador intergénico trnH-psbA muestra una variabilidad considerable (~53%) y un alto éxito de amplificación (~93%). Sin embargo, presenta limitaciones como

la dificultad para obtener secuencias bidireccionales, la presencia de bases ambiguas y problemas en la alineación debido a inversiones asociadas con secuencias palindrómicas, lo que puede afectar la correcta delimitación de especies cercanas (Kress et al., 2005; Hollingsworth et al., 2011).

#### 4.3.1 ITS2: segundo espaciador transcrito interno del cistrón ribosomal nuclear.

El marcador ITS2 se caracteriza por presentar una elevada eficiencia de amplificación (94%), así como una considerable divergencia interespecífica y una alta capacidad de discriminación entre especies, alcanzando valores de hasta 93%. Las secuencias ITS2 se han utilizado en estudios filogenéticos desde principios de los años 90 (Schultz y Wolf, 2009). Actualmente puede servir como un nuevo código de barras universal para la identificación de una gama más amplia de taxones de plantas, ITS2 tiene gran potencial como marcador molecular adecuado aplicable para la clasificación taxonómica y las reconstrucciones filogenéticas (Chen et al., 2010).

### 4.4 Métodos analíticos

#### 4.4.1 BLAST

La herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) constituye un sistema computacional avanzado diseñado para realizar búsquedas rápidas en bases de datos de secuencias de ADN y proteínas. Este programa permite evaluar la similitud entre una secuencia problema y múltiples secuencias almacenadas, ya sea mediante su uso en línea o como aplicación independiente. Su funcionamiento se basa en la comparación de la secuencia de interés con distintas combinaciones de secuencias nucleotídicas o proteicas presentes en la base de datos. Para ello, emplea un algoritmo heurístico que detecta coincidencias iniciales entre secuencias y, a partir de estas, extiende alineamientos potenciales para determinar regiones de similitud significativa. Además de realizar alineaciones, BLAST proporciona información estadística sobre cada trabajo llevado a cabo (Guzmán-López et al., 2023). En estudios científicos sobre identificación molecular en *Cactaceae* mediante BLAST, no existe

un porcentaje mínimo universalmente aceptado que garantice que una asignación taxonómica sea correcta, ya que la precisión depende del marcador genético utilizado, la variabilidad del grupo y la calidad de la base de datos. Investigaciones recientes muestran que incluso usando regiones estándar de código de barras vegetal como *matK*, *rbcL* o ITS2, la identificación a nivel de especie puede ser limitada y, en algunos casos, solo alrededor de la mitad de las secuencias se asignan correctamente, lo que indica que el porcentaje de identidad por sí solo no es suficiente como criterio definitivo (Wei et al., 2024). Aunque en barcoding vegetal suele considerarse que valores de identidad ≥97–99 % sugieren coincidencia a nivel de especie, en cactáceas este rango debe interpretarse con cautela y complementarse con otros parámetros como cobertura de alineamiento, valor E y análisis filogenético para obtener identificaciones confiables (Wei et al., 2024).

### 4.4.2 Dendrograma

Desde hace tiempo el uso de las estrategias de agrupamientos y dendrográficos han sido utilizados por las ciencias naturales y la estadística (Hernández, 2014). La bioinformática ha contribuido de manera significativa al avance de la investigación científica, particularmente mediante el empleo de herramientas computacionales diseñadas para el alineamiento de secuencias y la construcción de estructuras comparativas. Gracias a estos enfoques, ha sido posible identificar nuevas especies, así como asignar con mayor precisión la identidad taxonómica de organismos a partir de sus secuencias genéticas, entre otros aportes relevantes. Para llevar a cabo la identificación de una muestra biológica, es necesario realizar inicialmente la extracción de ADN. Posteriormente, una vez obtenidas las secuencias, estas se analizan utilizando diversos programas especializados. Entre ellos se encuentran BioEdit, GenDoc, MEGA, AutoDimer y DnaSP5, que permiten el alineamiento y análisis de secuencias de ADN. Asimismo, herramientas como PAUP, MrBayes, BEAST, DAMBE y las extensiones de MEGA X son empleadas en la construcción de árboles filogenéticos, comúnmente representados como dendrogramas. Finalmente se analizan los resultados obtenidos (Madrigal-Valverde, 2017). En los dendrograma, la conexión entre individuos refleja su nivel de similitud, siendo más cercana entre aquellos más parecidos. De igual manera, el grado de relación entre especies está determinado por la antigüedad de su ancestro común. **Figura 12.** Una vez obtenido el dendrograma, los grupos se determinan mediante

cortes en el árbol: los individuos por debajo del nivel del corte permanecen en el mismo grupo, el patrón de ramificación en un árbol filogenético refleja cómo las especies u otros grupos evolucionaron a partir de una serie de ancestros comunes (Zou et al., 2024).

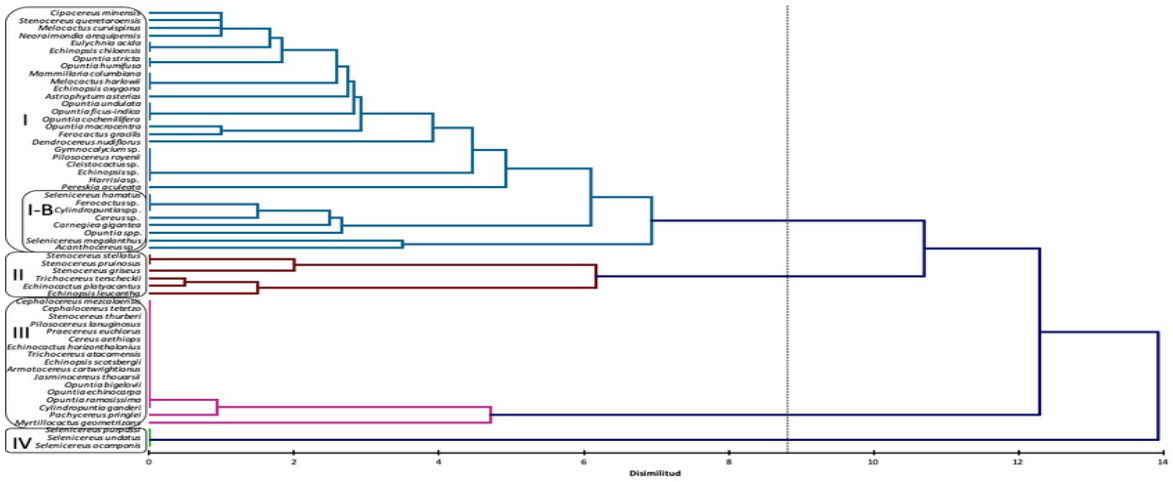



**Figura 12**. Ejemplificación representativa de un dendrograma o árbol filogenético (Pérez-González et al., 2019)

### 4.5 Métodos de extracción de ADN y sus problemáticas en cactáceas

El procedimiento general de extracción de ácidos nucleicos consiste en tres etapas consecutivas: disgregación de las células o tejidos (lisis celular), inactivación de las nucleasas intracelulares y en separación de los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares.

La extracción de ADN genómico constituye una etapa fundamental en estudios que emplean marcadores moleculares. En cactáceas, este procedimiento suele ser complejo debido a la composición química de sus tejidos, caracterizados por altas concentraciones de polisacáridos que tienden a co-precipitar con el ADN, formando soluciones viscosas que dificultan su manipulación y pueden inhibir reacciones de PCR. Asimismo, los compuestos fenólicos pueden oxidarse, unirse al ADN o incluso degradarlo, reduciendo su calidad. Por otra parte, la presencia de metabolitos secundarios y compuestos ácidos, especialmente en tejidos suculentos, puede dificultar la manipulación, afectar la eficiencia de la extracción, interferir con la actividad enzimática y comprometer los análisis moleculares posteriores.

Aunque el uso de kits comerciales es común debido a su capacidad y diseño para optimizar el rendimiento y la calidad del material genético (Díaz-Cárdenas et al., 2009; Kumar et al.,

2024). Para contrarrestar estas dificultades se han descrito protocolos de extracción de ADN en plantas utilizando el método bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y modificaciones de este, que se basan en ajustar las concentraciones según las especies estudiadas (Rache-Cardenal et al., 2022). Se han reportado diversos métodos para la extracción de ADN en plantas ricas en polisacáridos, empleando material fresco de hojas. En cactáceas, el aislamiento de ADN se ha realizado a partir de pequeñas porciones de tejido utilizando CTAB o SDS para llevar a cabo la lisis celular. Para evitar el problema del mucílago, también se ha realizado la extracción a partir de las espinas, con un protocolo extenso que incluye el secado de las espinas y el rompimiento del tejido, teniendo bajos rendimientos de ADN (Rache-Cardenal et al., 2022). El protocolo CTAB modificado constituye una estrategia altamente eficiente para la extracción de ADN en plantas con alto contenido de polisacáridos y polifenoles, debido a la incorporación de ajustes como elevadas concentraciones de sales y el uso de compuestos como PVP (polivinilpirrolidona), un agente que se une a los polifenoles y evita su oxidación y su interacción con el ADN, permitiendo así eliminar eficazmente estos metabolitos secundarios que interfieren con la pureza del material genético. Este método no solo mejora la calidad del ADN obtenido, sino que también incrementa su estabilidad y capacidad de amplificación en técnicas como PCR. Entre sus principales ventajas destacan su rapidez, bajo costo, consistencia en los resultados, su aplicabilidad en diferentes tipos de tejidos vegetales —incluso aquellos considerados problemáticos— y el hecho de que no requiere el uso de nitrógeno líquido, lo que simplifica el procedimiento y lo hace más accesible en laboratorios con recursos limitados. Por ello, se considera una herramienta confiable y ampliamente utilizada en estudios moleculares y filogenéticos (Sue-Porebski et al., 1997).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Colecta en campo

Se realizó la recolección de material vegetal en poblaciones naturales ubicadas en diferentes municipios de la región sureste del estado de Coahuila. El muestreo de cada ejemplar se realizó mediante la recolección de aproximadamente 5 g de tejido vegetativo sano, el cual se

conservó en alcohol al 96 %. Durante la colecta, se documentaron datos de identificación, ubicación geográfica y se tomaron fotografías; posteriormente, el material fue depositado en el ANSM (Herbario Antonio Narro, Unidad Saltillo, México), ubicado en el Departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

### 5.2 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico de cada muestra se llevó a cabo empleando el protocolo de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) modificado, basado en lo propuesto por Sharma et al. (2003), el cual se describe a continuación:

Se precalentaron 700 µl de solución CTAB (BIOSCIENCES, G-Biosciences) a 60 °C. Posteriormente, se trituró 1 g de tejido vegetal hasta obtener un polvo fino, el cual fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenía la solución previamente calentada. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 60 °C en un ThermoMixer (Select BioProducts, México). A continuación, se añadieron 0.6 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión durante 15 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga (Labnet International, EE. UU.). Para la precipitación del ADN, se recuperaron 300 µl de la fase acuosa, los cuales se transfirieron a un tubo nuevo, donde se agregaron 2 volúmenes de alcohol absoluto. La mezcla se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm durante 5 minutos, obteniéndose una pastilla de ADN. La pastilla se lavó en dos ocasiones con etanol al 70 % (400 µl y 300 µl, respectivamente), centrifugando a 15,000 rpm durante 5 minutos entre cada lavado. Posteriormente, el pellet se dejó secar durante toda la noche y, una vez seco, se resuspendió en 70 µl de agua libre de nucleasas. Finalmente, la muestra se incubó a 50 °C durante 30 minutos a 50 rpm en un ThermoMixer (Select BioProducts, México). El ADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

### 5.3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La 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 (1Kb, Axygen, USA). La

preparación de las muestras para su carga consistió en mezclar 5 µl de ADN genómico de las especies recolectadas con 3 µl de buffer de carga (5X Green Go Taq® Reaction Buffer, PROMEGA, EE. UU.). Posteriormente, el analisis visual del gel se llevó a cabo mediante un sistema de documentación de geles Axygen (Axygen GD-1000, EE. UU.).

El ADN se empleó para llevar a cabo la amplificación. La PCR se realizó utilizando la mezcla comercial GoTaq® Green Master Mix, 2XTM (Promega, USA), según las especificaciones del fabricante (**Tabla1**), con cebadores y programas de PCR establecidos en la literatura (**Tabla 2**). Posteriormente, la mezcla se sometió a amplificación en un termociclador (Axygen MaxyGene II™, EE. UU.). La verificación de los productos obtenidos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, y se visualizaron con un sistema de documentación de geles Axygen (Axygen GD-1000, EE. UU.). Las muestras de ADN se conservaron a -20 °C para su uso posterior.

**Tabla 1.** Mezcla para realizar PCR (GoTaq MasterMix de programasTM).

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

**Tabla 2.** Cebadores y programas de PCR utilizados para la amplificación de ADN

| **Fragmento** | **Cebadores (5´ - 3´)** | **Producto de PCR** | **Referencia** |
|---|---|---|---|
| ITS2 | ITS2-F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT ITS2-R: GACGCTTCTCCAGACTACAAT | 5°C, 4 min; 35 x (94°C, 45 s; 56°C, 1 min; 72°C, 1 min); 72°C, 10 min; ∞ 4°C | (Chen, et al., 2010) |

## 5.4 Secuenciación

Se enviaron 300 ng de producto de PCR de cada muestra al servicio de secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato (CINVESTAV), Guanajuato, México.

## 5.5 Análisis bioinformático

### 5.5.1 Edición de electroferogramas

En el programa de Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012) se analizaron los electroferogramas generados en la secuenciación de ADN, de acuerdo con la definición y solapamiento de los picos presentes en el electroferograma se definió la calidad de las secuencias recopiladas, por consiguiente, se realizaron cortes en los extremos de las secuencias, con la finalidad de eliminar bases ambiguas que pudieran representar contaminantes o bases incorrectas, obteniendo así secuencias de buena calidad para un análisis más preciso. El valor de recuperabilidad se estimó con base en el total de secuencias obtenidas tras el proceso de inspección y depuración de calidad descrito previamente. Durante esta evaluación, las secuencias cuyos electroferogramas presentaron picos de fluorescencia mal definidos o ambiguos fueron clasificadas como de baja calidad y confiabilidad en la asignación nucleotídica, por lo que se excluyeron del conjunto de datos final. En consecuencia, el porcentaje reportado corresponde exclusivamente a las secuencias que exhibieron señales electroforéticas nítidas, perfiles de lectura consistentes y parámetros adecuados de calidad, consideradas aptas para análisis bioinformáticos posteriores.

### 5.5.2 Alineamiento de secuencias

Los alineamientos se realizaron el software de MEGA X (Kumar et al., 2018a) con la finalidad de realizar un alineamiento múltiple de las secuencias comparadas. Para ello se visualizaron las secuencias en MEGA, accediendo a la lista despegable en “alignment” seleccionando “Align by clustalW”.

### 5.5.3 Descarga de secuencias de referencia

Doce secuencias de referencia correspondientes a la región ITS2 fueron descargadas del Sistema de Datos de Barras de la Vida (BOLD Systems) en formato FASTA, con el fin de realizar su alineamiento con las secuencias analizadas.

### 5.5.4 Creación de biblioteca con secuencias de consulta

Se creó un archivo en formato FASTA con secuencias de consulta previamente editadas y secuencias de referencia obtenidas en las plataformas de bioinformática BOLD (Barcode of Life Data System) (BoldSystems, 2023) y NCBI (National Center Biotechnology Information) (NCBI, 2023).

### 5.5.5 BLAST

En el National Center for Biotechnology Information (NCBI) se encuentra disponible la herramienta BLAST, utilizada para detectar similitudes entre secuencias biológicas. Mediante este programa es posible comparar secuencias de ADN o proteínas con información almacenada en bases de datos. que contienen información genética ya registrada. Las secuencias generadas fueron identificadas a través de un análisis BLASTn en la plataforma del NCBI, estableciendo como criterio un valor de E inferior a $1 \times 10^{-5}$ y coincidencias de entre 98 y 100 % con especies registradas.

### 5.5.6 Evaluación de la calidad de secuencias

El análisis de la calidad de las secuencias se determinó en MEGA X con el archivo fasta de nuestras secuencias alineadas. Con el apoyo de la herramienta “Exploración de datos de secuencia” con esto pudimos obtener el número de: Sitios variables (V), conservados (C) e informativos (Pi).

### 5.5.7 Construcción del dendrograma

Para estimar las distancias evolutivas se empleó el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980). Posteriormente, se llevó a cabo el análisis filogenético mediante el método Neighbor-Joining (NJ) utilizando MEGA X (Kumar et al., 2018), herramienta con la cual se

construyó el dendrograma. La confiabilidad de los agrupamientos se determinó mediante 500 réplicas de bootstrap.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Colecta en campo

La colecta de muestras se realizó en doce localidades ubicadas en el estado de Coahuila, México (**Figura 13**), las especies se ubicaron en una variación de altitud que oscila entre los 1139 y 2140 msnm (**Tabla 3**). La **Figura 14** muestra la morfología de las especies colectadas.

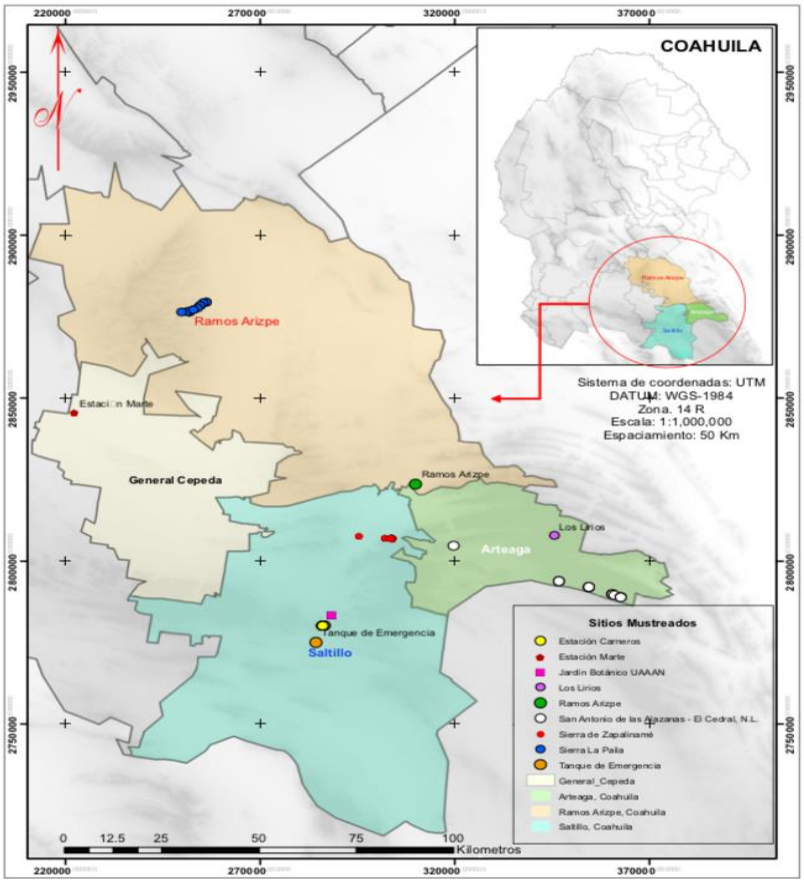



**Figura 13.** Puntos de colecta de las especies en el estado de Coahuila México.

*Astrophytum capricorne*

*Ariocarpus retusus*

*Acharagma roseanum*

*Coryphantha delaetiana*

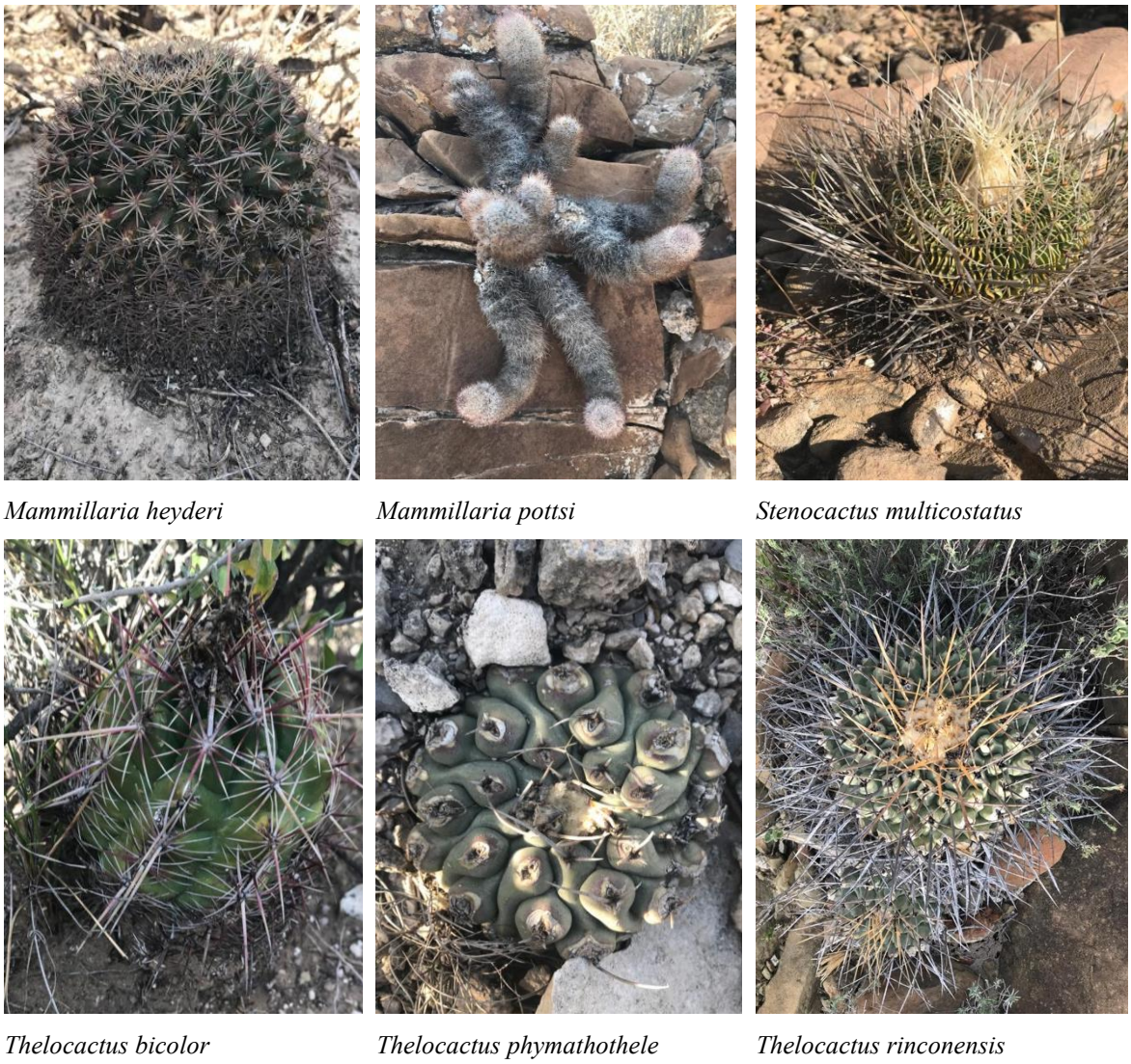
*Coryphantha radians*

*Epithelantha bokei*

*Echinocactus horizonthanolius*

*Ferocactus hamatacanthus*

*Mammillaria chionocephala*



*Mammillaria heyderi* *Mammillaria pottsi* *Stenocactus multicostatus*

*Thelocactus bicolor* *Thelocactus phymathothele* *Thelocactus rinconensis*

**Figura 14**. Especies de cactáceas colectadas.

**Tabla 3.** Especies y lugares de colecta de muestras colectadas.

| ID | Especie | Lugar de colecta | Municipio |
|---|---|---|---|
| Acap2 | *Astrophytum capricorne* | Pilar de Richardson, Estación Marte | General Cepeda |
| Acap3 | *Astrophytum capricorne* | Pilar de Richardson, Estación Marte | General Cepeda |
| Acap4 | *Astrophytum capricorne* | Pilar de Richardson, Estación Marte | General Cepeda |
| Aret2 | *Ariocarpus retusus* | Las Colonias | Saltillo |
| Aret3 | *Ariocarpus retusus* | Las Colonias | Saltillo |
| Aret5 | *Ariocarpus retusus* | Tanque de emergencia | Saltillo |
| Cdae1 | *Coryphantha delaetiana* | Las Colonias | Saltillo |
| Cdae3 | *Coryphantha delaetiana* | Las Colonias | Saltillo |
| Cdae4 | *Coryphantha delaetiana* | Las Colonias | Saltillo |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Crad1 | *Coryphantha radians* | El Saucillo | Ramos Arizpe |
| Crad2 | *Coryphantha radians* | El Saucillo | Ramos Arizpe |
| Crad3 | *Coryphantha radians* | El Saucillo | Ramos Arizpe |
| Eros1 | *Acharagma roseanum* | Ejido Guajardo | Ramos Arizpe |
| Eros2 | *Acharagma roseanum* | Ejido Guajardo | Ramos Arizpe |
| Eros3 | *Acharagma roseanum* | Ejido Guajardo | Ramos Arizpe |
| Ebok1 | *Epithelantha bokei* | El Saucillo | Ramos Arizpe |
| Ebok3 | *Epithelantha bokei* | El Saucillo | Ramos Arizpe |
| Ebok4 | *Epithelantha bokei* | El Saucillo | Ramos Arizpe |
| Ehor2 | *Echinocactus horizonthalonius* | Noria de la Sabina | General Cepeda |
| Ehor3 | *Echinocactus horizonthalonius* | Noria de la Sabina | General Cepeda |
| Fham1 | *Ferocactus hamatacanthus* | La Paloma, Sierra La Paila | Ramos Arizpe |
| Fham2 | *Ferocactus hamatacanthus* | La Paloma, Sierra La Paila | Ramos Arizpe |
| FhamJB | *Ferocactus hamatacanthus* | Jardín Botánico UAAAN, Buenavista | Saltillo |
| Mchi | *Mammillaria chionocephala* | Estación Carneros | Saltillo |
| Mchi | *Mammillaria chionocephala* | Estación Carneros | Saltillo |
| MchiJB | *Mammillaria chionocephala* | Jardín botánico, Buenavista | Saltillo |
| Mhey1 | *Mammillaria heyderi* | Noria de la Sabina | General Cepeda |
| Mhey2 | *Mammillaria heyderi* | Noria de la Sabina | General Cepeda |
| Mhey3 | *Mammillaria heyderi* | Noria de la Sabina | General Cepeda |
| Mpot1 | *Mammillaria pottsi* | Pilar de Richardson, Estación Marte | General Cepeda |
| Mpot3 | *Mammillaria pottsi* | Pilar de Richardson, Estación Marte | General Cepeda |
| Smul1 | *Stenocactus multicostatus* | Rancho El Refugio | Saltillo |
| Smul5 | *Stenocactus multicostatus* | Rancho El Refugio | Saltillo |
| Smul6 | *Stenocactus multicostatus* | Rancho Los Ángeles | Saltillo |
| Tbic 2 | *Thelocactus bicolor* | Rancho El Refugio | Saltillo |
| Tbic 3 | *Thelocactus bicolor* | Rancho El Refugio | Saltillo |
| Tbic 4 | *Thelocactus bicolor* | Rancho El Refugio | Saltillo |
| Tphy1 | *Thelocactus phymathothele* | Sierra de Zapalinamé | Saltillo |
| Tphy2 | *Thelocactus phymathothele* | Sierra de Zapalinamé | Saltillo |
| Tphy3 | *Thelocactus phymathothele* | Sierra de Zapalinamé | Saltillo |
| Trin.s.nJB | *Thelocactus rinconensis subsp. nidulans* | Jardín Botánico UAAAN, Buenavista | Saltillo |
| Trin.s.rJB | *Thelocactus rinconensis subsp. rinconensis* | Jardín Botánico UAAAN, Buenavista | Saltillo |
| Trin1 | *Thelocactus rinconensis subsp. rinconensis* | Ejido Guajardo | Ramos Arizpe |
| Trin2 | *Thelocactus rinconensis subsp. rinconensis* | Ejido Guajardo | Ramos Arizpe |

### 6.2 Extracción de ADN genómico

El método de extracción utilizado permitió obtener ADN con una calidad, óptima para su uso en la amplificación por PCR (**Figura 15**).

### 6.3 Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La **figura 16** ilustra los productos obtenidos tras la amplificación por PCR realizada con cebadores ITS2 en las especies estudiadas observándose en todos los casos bandas cercanas a 500 pb.

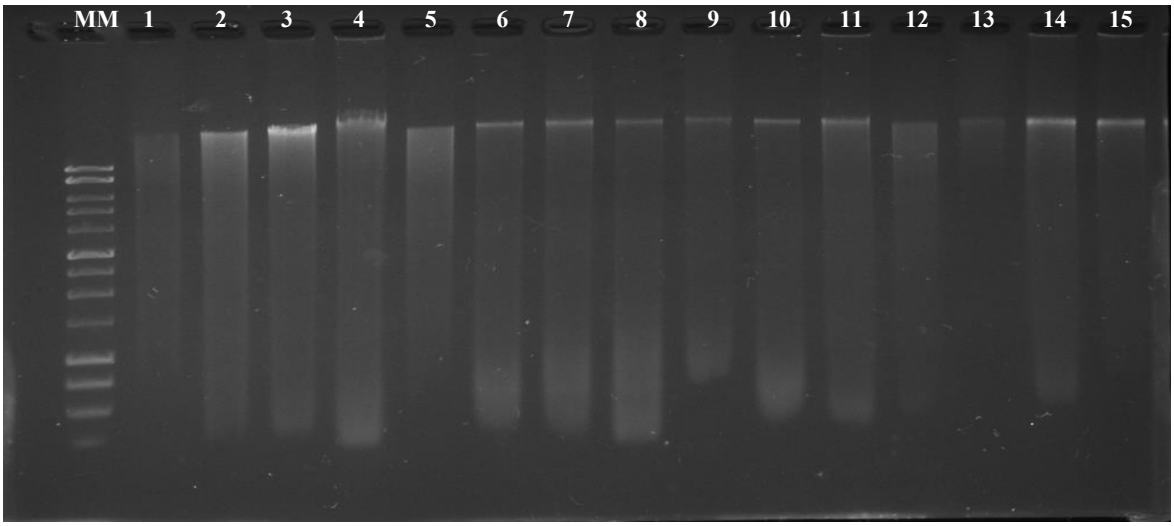



**Figura 15.** Extracción de ADN genómico en especies de cactus. MM: marcador molecular Axygen 1 kb, carril 1: *Astrophytum capricorne,* carril 2: *Ariocarpus retusus,* carril 3: *Coryphantha delaetiana,* carril 4: *Coryphantha radians,* carril 5: *Acharagma roseanum, carril* 6: *Epithelantha bokei,* carril 7: *Echinocactus horizonthanolius,* carril 8: *Ferocactus hamatacanthus,* carril 9: *Mammillaria chionocephala,* carril 10: *Mammillaria heyderi,* carril 11: *Mammillaria pottsi,* carril 12: *Stenocactus multicostatus,* carril 13: *Thelocactus bicolor,* carril 14: *Thelocactus phymathothele,* carril 15: *Thelocactus rinconensis subsp. rinconensis.*

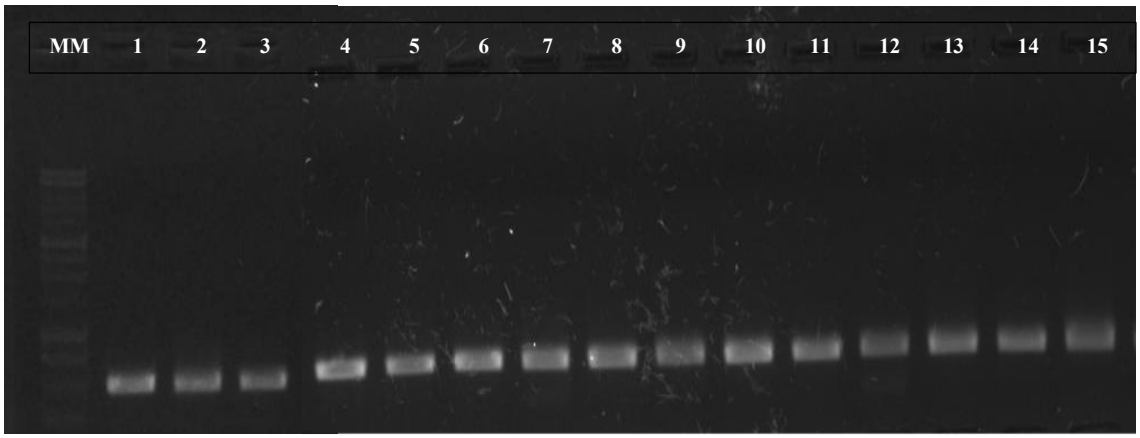



**Figura 16.** Amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR). MM: marcador molecular Axigen 1 kb, carril 1: *Astrophytum capricorne,* carril 2: *Ariocarpus retusus,* carril 3: *Coryphantha delaetiana,* carril 4: *Coryphantha radians,* carril 5: *Acharagma roseanum, carril* 6: *Epithelantha bokei,* carril 7: *Echinocactus horizonthanolius,* carril 8: *Ferocactus hamatacanthus,* carril 9: *Mammillaria chionocephala,* carril 10: *Mammillaria heyderi,* carril 11: *Mammillaria pottsi,* carril 12: *Stenocactus multicostatus,* carril 13: *Thelocactus bicolor,* carril 14: *Thelocactus phymathothele,* carril 15: *Thelocactus rinconensis subespecie rinconensis.*

### 6.4 Análisis bioinformático

Se generó un archivo en formato FASTA que contenía veinte secuencias de consulta, previamente editadas, junto con dieciocho secuencias de referencia.

### 6.5 BLAST

En los análisis BLAST llevados a cabo en esta investigación, se obtuvo un 80% de identificación a nivel especie o género. Por otra parte, las dos secuencias de *Coryphantha delaetiana*, una de las secuencias de *Mammillaria chionocephala* y la de *Thelocactus rinconensis subespecie nidulans* tuvieron una identificación ambigua.

### 6.6 Edición de electroferogramas

Se observaron de manera individual cada uno de los electroferogramas obtenidos de la secuenciación, se verificó que cada base nucleotídica estuviera representada por una curva de fluorescencia definida, las cuales representan una base nitrogenada, verde para adenina, rojo para timina, negro para guanina y azul para citosina (**Figura 17 y 18**). La definición de estos picos representa una buena calidad de secuenciación. Para mejorar la calidad de

secuencias se realizaron cortes en los extremos 5´ y 3´ donde se observaron picos con mala definición (**Figura 19**), dicho paso se realiza debido a que generalmente existe baja calidad de reconocimiento de nucleótidos en ambos extremos y esto podría afectar el alineamiento de las secuencias analizadas. Una vez realizado dicho análisis se detectó una recuperabilidad de secuencias del 45%.

**Tabla 4:** Identificación de las especies en BLAST.

| **Especie** | **Identificación%** | **Nivel** |
|---|---|---|
| *Astrophytum capricorne* | 99.72% | Especie |
| *Ariocarpus retusus* | 100.00% | Especie |
| *Ariocarpus retusus* | 100.00% | Especie |
| *Acharagma roseanum* | 100.00% | Especie |
| *Acharagma roseanum* | 100.00% | Especie |
| *Coryphantha delaetiana* | 100.00% | Ambigua |
| *Coryphantha delaetiana* | 100.00% | Ambigua |
| *Echinocactus horizonthalonius* | 100.00% | Especie |
| *Ferocactus hamatacanthus* | 97.75% | Género |
| *Ferocactus hamatacanthus* | 100.00% | Género |
| *Mammillaria chionocephala* | 100.00% | Género |
| *Mammillaria chionocephala* | 100.00% | Ambigua |
| *Mammillaria heyderi* | 100.00% | Especie |
| *Mammillaria heyderi* | 100.00% | Especie |
| *Thelocactus bicolor* | 100.00% | Género |
| *Thelocactus bicolor* | 100.00% | Género |
| *Thelocactus phymathothele* | 100.00% | Género |
| *Thelocactus phymathothele* | 100.00% | Género |
| *Thelocactus phymathothele* | 100.00% | Género |
| *Thelocactus rinconensis* subesp. *nidulans* | 93.35% | Ambigua |

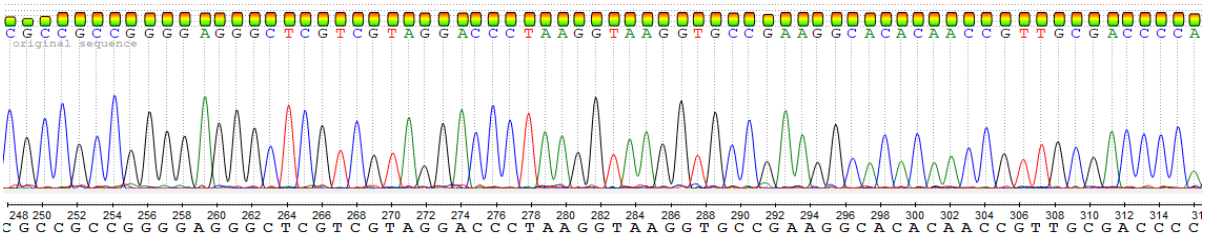


**Figura 17.** Electroferograma de la especie *Astrophytum capricorne* con curvas de fluorescencia bien definidas.

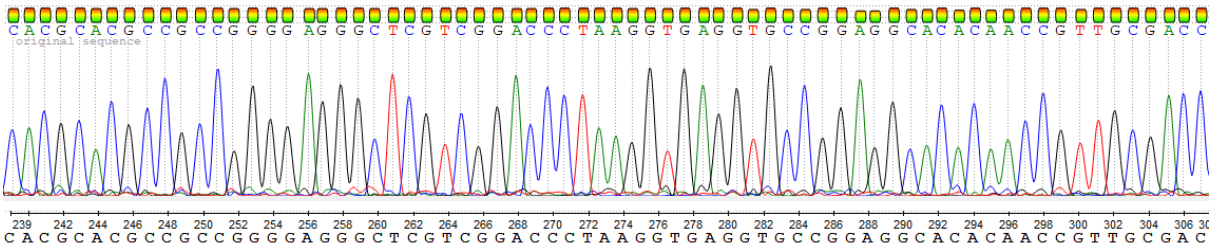


**Figura 18.** Electroferograma de la especie *Coryphantha delaetiana* con curvas de fluorescencia bien definidas.

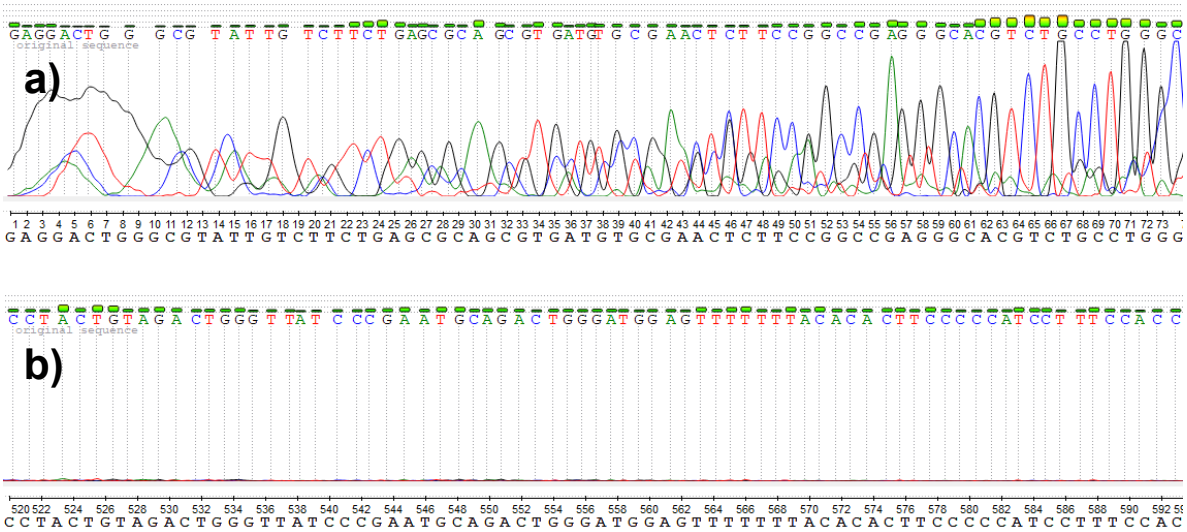



**Figura 19.** Electroferograma de la especie *Ariocarpus retusus* extremo a) 5´ y b) 3´ antes del corte de extremos.

### 6.7 Alineamiento de secuencias

El proceso de alineamiento de secuencias permite analizar y comparar múltiples secuencias simultáneamente de esta manera se observa la relación de homología que existe entre secuencias. La **figura 20** muestra las secuencias consulta y secuencias referencia no

alineadas. En la **figura 21** puede observarse el alineamiento de las secuencias, donde se detectan diferencias que podrían indicar la existencia de posibles sitios polimórficos.

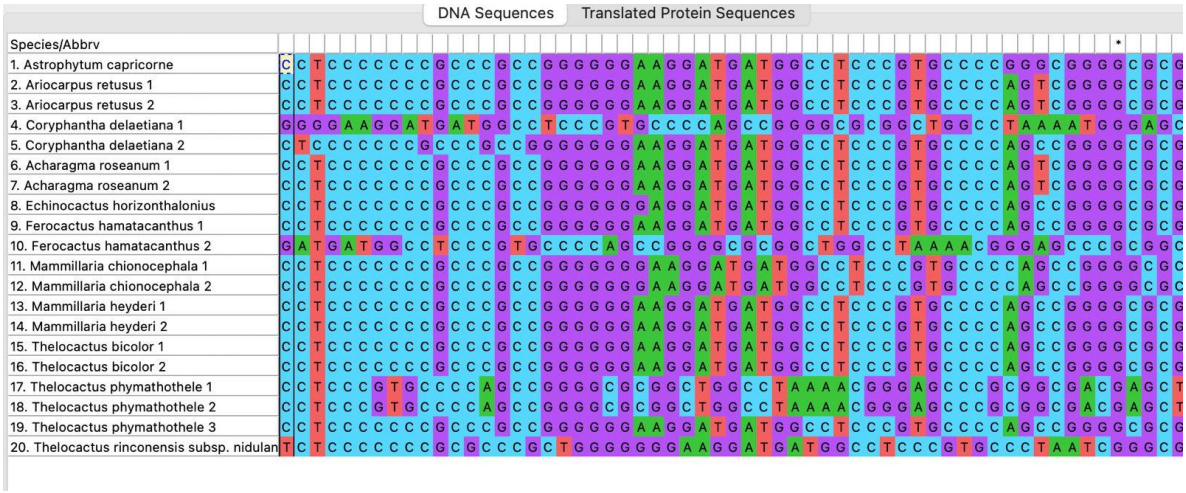



**Figura 20.** Análisis de secuencias consulta y secuencias referencia no alineadas.

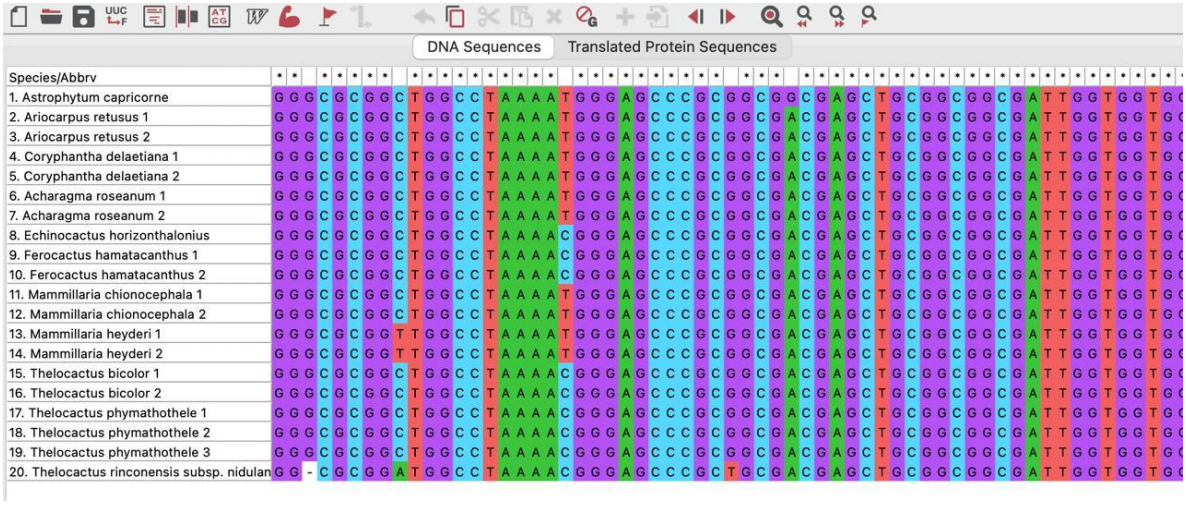



**Figura 21.** Análisis de secuencias consulta y secuencias referencia alineadas.

### 6.8 Evaluación de la calidad de secuencias

Para asegurar la calidad de las secuencias, se tomaron en consideración los siguientes parámetros, longitud total de la secuencia, sitios variables (V), sitios conservados (C), sitios informativos (Pi). Estos se representan en las figuras que se incluyen a continuación:

**Sitios conservados:** Corresponden a posiciones dentro de un alineamiento de secuencias en las cuales todos los taxones presentan el mismo carácter (nucleótido o aminoácido) como se muestra en la **Figura 22**, lo que indica ausencia total de variación en esa posición. Estos sitios, no aportan señal filogenética para resolver relaciones evolutivas debido a su falta de variabilidad, y generalmente reflejan regiones funcional o estructuralmente restringidas del gen o marcador analizado. **Sitios variables:** Se definen como aquellas posiciones del alineamiento en las que al menos una secuencia difiere en su carácter respecto a las demás, evidenciando la presencia de polimorfismos o sustituciones nucleotídicas entre los taxones, como se muestra en la **Figura 23**. Estos sitios representan diversidad genética; sin embargo, no todos contribuyen a la inferencia filogenética, ya que algunos cambios pueden ser exclusivos de un solo taxón y, por tanto, carecer de valor informativo para establecer relaciones evolutivas. **Sitios informativos**: Constituyen un subconjunto de los sitios variables y se caracterizan por presentar al menos dos estados de carácter distintos, cada uno de los cuales aparece en al menos dos secuencias diferentes dentro del alineamiento, como se muestra en la **Figura 24**. Este patrón de distribución permite que dichos sitios influyan en la resolución de topologías filogenéticas bajo criterios de parsimonia, ya que aportan evidencia comparativa capaz de discriminar entre hipótesis alternativas de relaciones evolutivas (Nei y Kumar, 2000).

Longitud de secuencia más corta: 310 pb

Longitud de secuencia más larga: 356 pb

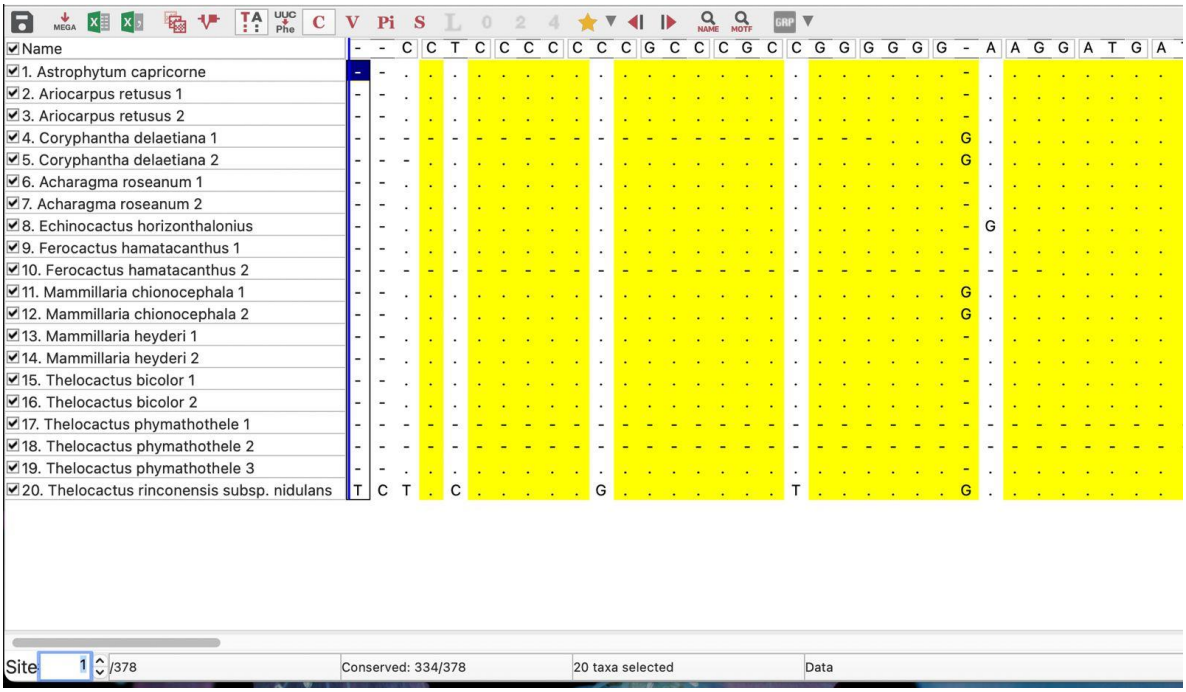



**Figura 22.** Sitios conservados generados en la alineación con marcador ITS2.

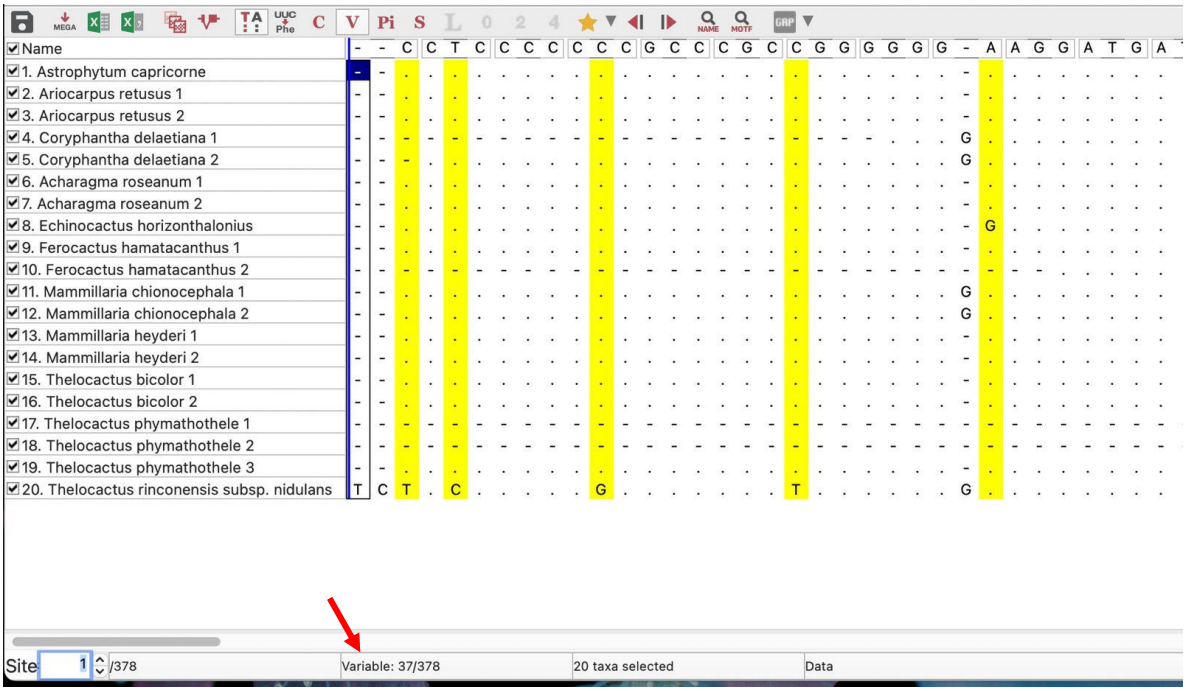



**Figura 23.** Sitios variables generados en la alineación con marcador ITS2.

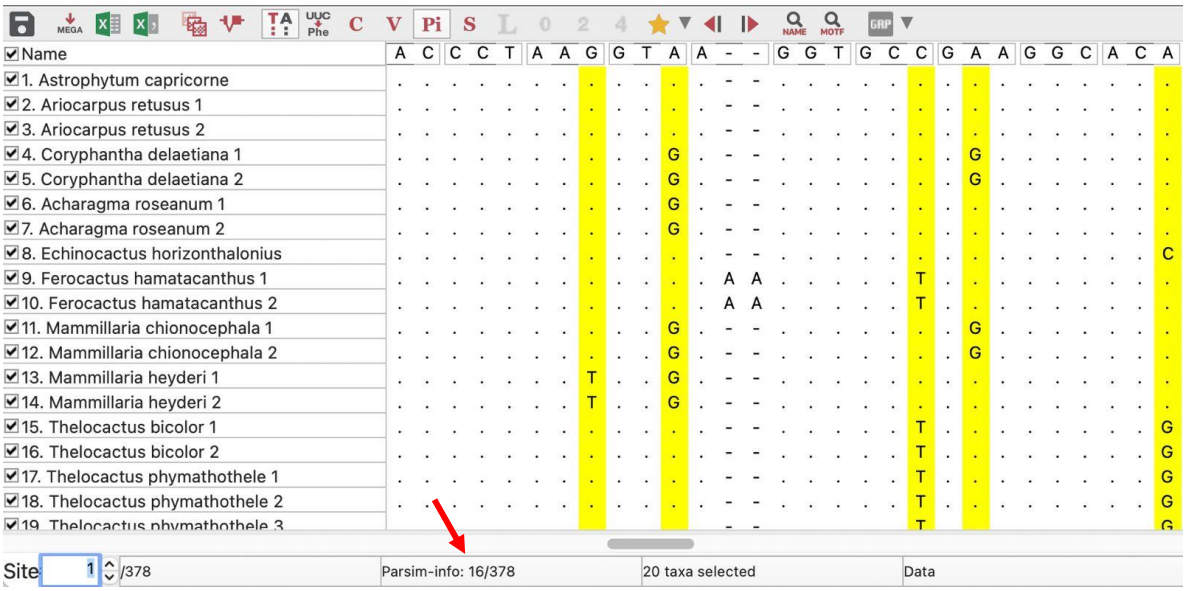



**Figura 24.** Sitios informativos generados en la alineación con marcador ITS2.

### 6.9 Construcción del dendrograma

El dendrograma se generó con un total de 20 secuencias consulta pertenecientes a 11 especies de la familia cactácea (**Figura 25**). El dendrograma permitió la agrupación acorde a la similitud entre las especies, observándose seis clados monofiléticos a nivel especie, *Ariocarpus retusus* (1 y 2), *Acharagma roseanum* (1 y 2), *Mammillaria heyderi* (1 y 2), *Ferocactus hamatacanthus* (1 y 2) *Thelocactus bicolor* (1 y 2) *Thelocactus phymatothele* (1, 2 y 3). Estos confirman coherencia genética intraespecífica. Se identificó un clado monofilético bien sustentado a nivel género*, Thelocactus* (todas sus especies). También se observan dos clados principales de alto nivel, clado superior: *Ariocarpus, Acharagma, Mammillaria* y *Coryphantha*, clado inferior*: Ferocactus* y *Thelocactus* evidenciando consistencia intraespecífica y estructura evolutiva jerárquica dentro del grupo analizado. Lo cual es indicativo de secuenciaciones con regiones de ITS2 de buena calidad, además, los clados se agruparon acorde a la similitud de las características morfológicas de las especies.

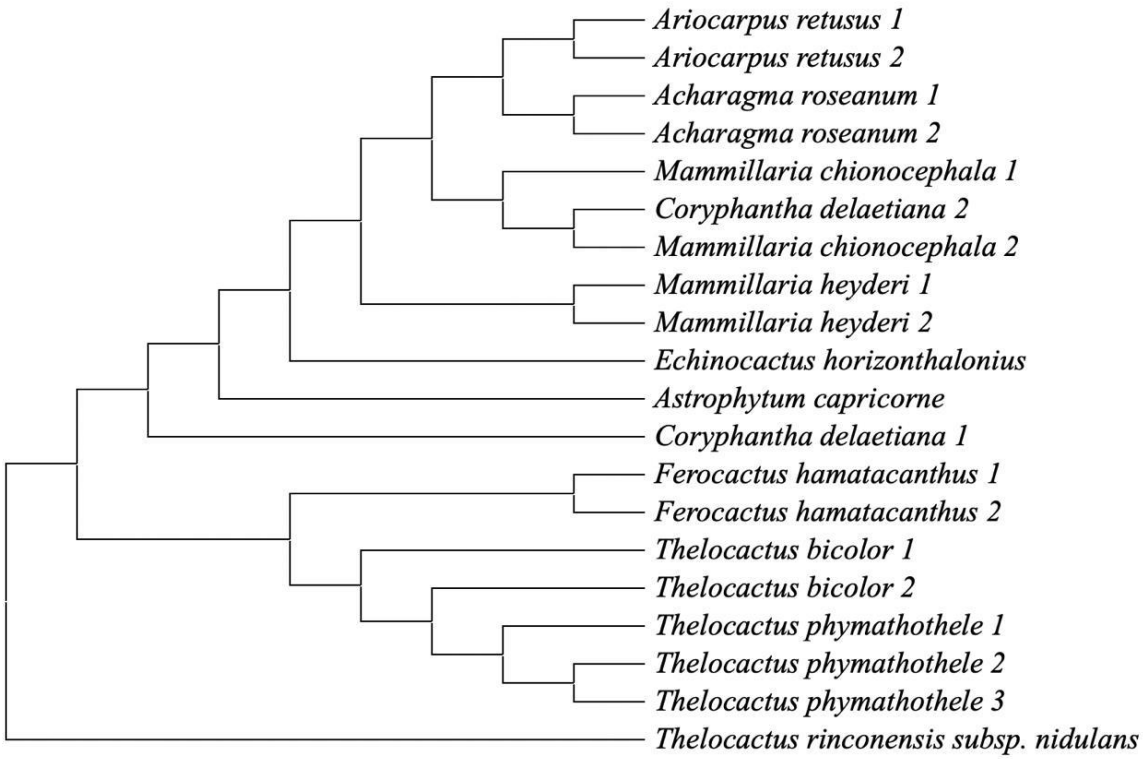



**Figura 25.** Dendrograma de secuencias de especies de cactáceas a partir del análisis de vecinos cercanos usando cebadores ITS2 y con base en la distancia genética K2P.

# 7. DISCUSIÓN

## 7.1 Extracción y amplificación de ADN

Los resultados obtenidos en la extracción y amplificación del ADN genómico confirman la idoneidad del protocolo metodológico empleado, evidenciando su eficacia para la obtención de material genético de calidad. El uso del método CTAB modificado permitió superar las limitaciones asociadas a la composición bioquímica de los tejidos vegetales presentes en cactáceas, los cuales pueden presentar concentraciones variables de polifenoles, polisacáridos y compuestos ácidos que interfieren tanto en el proceso de extracción como en los análisis moleculares posteriores (Shedbalkar et al., 2010; Lorenzo et al., 2017). Diversos estudios han señalado que la aplicación del método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), así como sus modificaciones, constituye una estrategia eficiente para contrarrestar estos efectos (Sue-Porebski et al., 1997), lo cual concuerda con los resultados observados en el presente estudio.

La amplificación consistente con cebadores ITS2 en todas las especies evaluadas refuerza su utilidad como código de barras molecular en cactáceas. En este sentido, los resultados amplían lo señalado por estudios previos en plantas suculentas, los cuales destacan a ITS2 como una región altamente conservada en sitios flanqueantes que permiten la correcta amplificación de ADN (Li et al., 2015; Chen et al., 2010). Este hallazgo concuerda con lo reportado en estudios recientes que señalan que el ITS2 es un marcador robusto para plantas con alto contenido de polisacáridos y metabolitos secundarios, como las cactáceas, donde otros marcadores cloroplásticos suelen presentar dificultades técnicas (Zhao et al., 2018; Tan et al., 2020).

A pesar de que la recuperabilidad de secuencias fue moderada (45%) esta refleja una constante metodológica adecuada entre calidad y cantidad de datos. La eliminación de regiones ambiguas en los extremos 5’ y 3’ fortalece la confiabilidad de los alineamientos y del análisis filogenético posterior, aun cuando reduce el número final de secuencias utilizables. Este enfoque conservador es consistente con buenas prácticas en estudios de caracterización molecular, donde la calidad de la secuencia es prioritaria frente al volumen de datos (Kumar et al., 2018).

### 7.2 Análisis bioinformático

Por otro lado, en la evaluación de la calidad de las secuencias y el poder discriminatorio de la región ITS2, los análisis bioinformáticos revelaron las fortalezas y limitaciones del marcador. La evaluación de sitios conservados, variables e informativos mostró una proporción adecuada de variabilidad (37 sitios variables y 16 informativos), lo cual es consistente con la capacidad de ITS2 para diferenciar especies cercanas filogenéticamente (Yao et al., 2010). La longitud de las secuencias obtenidas (310–356 pb) se encuentra dentro del rango reportado para la región en angiospermas, lo que permite comparaciones confiables con bases de datos de referencia (Kress et al., 2015).

El análisis BLAST permitió identificar aproximadamente el 80% de las secuencias a nivel de especie o género, lo cual coincide con informes que documentan tasas de identificación entre 70 y 90% para ITS2 en plantas con relaciones evolutivas recientes (Hollingsworth et al., 2016; Liu et al., 2012). No obstante, la identificación ambigua observada en algunas secuencias, por ejemplo, *Coryphantha delaetiana*, *Mammillaria chionocephala* y *Thelocactus rinconensis* subsp. *nidulans* sugiere que, en ciertos linajes o taxones, la región ITS2 puede no contener suficiente variabilidad para una discriminación correcta a nivel infraespecífico. Esta limitación ha sido previamente señalada en géneros de cactáceas con divergencia reciente o eventos de hibridación, donde se recomienda el uso de marcadores multilocus para mejorar la resolución taxonómica (Majure et al., 2017; Vázquez-Sánchez et al., 2021).

El dendrograma obtenido mediante el análisis de vecinos cercanos basado en la distancia genética K2P y secuencias de la región ITS2, mostró una estructuración filogenética coherente entre las especies de cactáceas analizadas. En general, el árbol filogenético obtenido muestra una estructura jerárquica bien definida en la que se distinguen dos linajes principales dentro del conjunto analizado. Por un lado, se agrupa un clado conformado por especies de *Ariocarpus, Acharagma, Mammillaria y Coryphantha*, cuyos nodos internos indican relaciones de parentesco cercanas y consistencia genética entre réplicas de una misma especie, lo que respalda la coherencia taxonómica de los muestreos. Por otro lado, se observa un clado separado que incluye a *Ferocactus y Thelocactus*, donde también se observa la formación de un clado monofilético bien sustentado a nivel género *Thelocactus* (Todas sus

especies). La posición relativa de ciertas muestras, particularmente aquellas que no se agrupan estrictamente con sus réplicas conspecíficas, sugiere posibles procesos de variación intraespecífica, divergencia genética reciente o efectos de muestreo. En conjunto, la topología del árbol respalda afinidades evolutivas congruentes con la delimitación genérica tradicional y evidencia patrones de diversificación dentro de los linajes analizados. La congruencia observada entre los clados moleculares y las características morfológicas tradicionales refuerza la validez de los resultados y coincide con estudios recientes que destacan la correspondencia entre datos moleculares y taxonomía clásica cuando se utilizan marcadores nucleares adecuados (Hernández-Hernández et al., 2014; Bárcenas et al., 2011).

Desde una perspectiva metodológica, una fortaleza de este estudio radica en la integración de trabajo de campo, técnicas moleculares y análisis bioinformático, lo cual proporciona una caracterización integral de las especies analizadas. Asimismo, la incorporación de secuencias de referencia provenientes de BOLD y NCBI fortalece la confiabilidad de las identificaciones obtenidas. Sin embargo, entre las limitaciones se encuentra el tamaño relativamente reducido del conjunto de secuencias recuperadas y la dependencia de un único marcador molecular, lo que puede afectar la resolución en taxones complejos.

Finalmente, con base en los resultados se recomienda ampliar el muestreo geográfico y taxonómico, incorporar marcadores complementarios como *matK*, *rbcL* o regiones intergénicas cloroplásticas con el fin de evaluar enfoques multilocus para resolver complejos de especies difíciles.

## 8. CONCLUSIONES

El uso de la región ITS2 demostró ser un marcador molecular eficaz para la caracterización genética e identificación taxonómica de especies de la familia Cactaceae en el estado de Coahuila, validando la pertinencia del enfoque metodológico empleado para el análisis de plantas adaptadas a ambientes áridos.

La combinación de cebadores específicos y un protocolo de extracción de ADN basado en CTAB modificado permitió obtener ADN genómico de calidad adecuada para su amplificación y secuenciación, evidenciando la robustez técnica del ITS2 en cactáceas.

El análisis bioinformático confirmó un alto poder discriminatorio del marcador, con aproximadamente el 80% de las muestras identificadas a nivel de especie o género, aunque se observaron limitaciones en taxones estrechamente relacionados, lo que sugiere la necesidad de enfoques multilocus.

Los análisis filogenéticos generaron clados congruentes con la clasificación morfológica tradicional, reforzando la utilidad del ITS2 como herramienta complementaria en estudios taxonómicos y evolutivos. En conjunto, estos resultados aportan información molecular relevante para cactáceas del noreste de México y establecen bases para futuras investigaciones orientadas a la conservación y el estudio de su biodiversidad.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. Ecología molecular, 18(1), 541-566.

Ali, M. A. (2014). The changing epitome of species identification – DNA barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Retrieved from

Altamirano-Benavides, M., y Yanez-Moretta, P. (2016). El código de barras de ADN (barcoding): una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en Ecuador. La Granja, 23(1).

Anderson, E. F. (1987). A revision of the genus *Thelocactus* B. y R. (Cactaceae). Bradleya, 1987(5), 49–76.

Anderson, E. F. (2001). The Cactus Family. Timber Press. pp. 108–109.

Arias, S., y Aquino, D. (2019). La familia Cactaceae. Flora Del Bajío y Regiones Adyacentes, Fascículo, 209, 1-278.

Asis, A. M. J. M., Lacsamana, J. K. M., y Santos, M. D. (2016). Illegal trade of regulated and protected aquatic species in the Philippines detected by DNA barcoding. Mitochondrial DNA Part A, 27(1), 659–666.

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

Bárcenas, R. T., Yesson, C., y Hawkins, J. A. (2011). Molecular systematics of the Cactaceae. Cladistics, 27(5), 470–489.

Barcode of Life Data System. (2023). BOLD v5: A platform for DNA barcode data.

Camacho-Oliveira, R. B., Daneluz, C. M., do Prado, F. D., Utsunomia, R., Rodrigues, C. E., Foresti, F., y Porto-Foresti, F. (2020). DNA barcode reveals the illegal trade of rays commercialized in fishmongers in Brazil. Food Science and Nutrition, 2, 95–97.

CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(31), 12794–12797.

Cenizo, V. J., Mazzola, M. B., Corró Molas, B. M., y Kin, A. G. (2013). Características morfológicas y anatómicas de las plántulas de *Trichocereus candicans* (Cactaceae). Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica, 48(3–4), 443–451.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., et al,. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PloS One, 5(1), e8613.

Condini, S (2024). Desarrollo de protocolos de propagación in vitro en especies amenazadas del género *Astrophytum*: un enfoque sostenible para la producción de cactáceas con interés ecológico y comercial [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia].

Consortium for the Barcode of Life. (2009). DNA barcoding: Uses and global benefits.

Cristians, S. (2020). Los códigos de barra moleculares como una herramienta para la identificación de plantas medicinales. Mensaje Bioquímico, 44, 31–33.

Delgado Alvarado, E. A. (2007). Valor taxonómico de los perfiles fenólicos del polen de algunas especies de la familia Cactaceae (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango.

Díaz-Cardenas, B., y VC, G. F. L. R. E. (2009). Obtención de ADN de cactáceas: comparación de dos métodos de extracción en *Ferocactus histrix*. Avances en la investigación científica en el CUCBA, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico, 123-129.

Gibson, A. C., y Nobel, P. S. (1986). The cactus primer. Harvard University Press.

González Elizondo, M., Elizondo, G., y Retana Rentería, F. I. (2015). Informe final del Proyecto JF032 Florística de las cactáceas de Durango. Florística de Las Cactáceas de Durango.

Guzmán, U., Arias, S., y Dávila, P. (2003). Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Guzmán-López, O., Ricaño-Rodríguez, C., Luis-Yong, D., y Ricaño-Rodríguez, J. (2023). NCBI: generalidades del repositorio y breve descripción de recursos aplicables al estudio de la fitogenética. Revista Fitotecnia Mexicana, 46(1), 63–76.

Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Clare, E. L., y Hebert, P. D. N. (2007). Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. BMC Biology, 5, 24.

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

Hebert, P. D. N., y Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. Systematic Biology, 54(5), 852–859.

Hernández-Hernández, T., Brown, J. W., Schlumpberger, B. O., Eguiarte, L. E., y Magallón, S. (2014). Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. New Phytologist, 202(4), 1382–1397.

Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., et al. (2011). A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(31), 12794–12797.

Hollingsworth, P. M., Li, D.-Z., van der Bank, M., y Twyford, A. D. (2016). Telling plant species apart with DNA: from barcodes to genomes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 371(1702).

Hunt, D., Taylor, N., y Charles, G. (2006). The new cactus lexicon. DH Books.

Janeba, Z., y Kalas, R. (2007). *Acharagma aguirreanum* in Sierra de la Paila. Cactus and Succulent Journal, 79(6), 244–245.

Jaramillo, A. H. (2021). Delimitación Morfológica De Las Especies Del Complejo *Stenocactus obvallatus* (Cactaceae).[Tesis de licenciatura Universidad Nacional Autónoma De México].

Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., y Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. Trends in Ecology y Evolution, 30(1), 25–35.

Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., y Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS, 102(23), 8369–8374.

Kumar, S., et al. (2024). Rapid and efficient DNA extraction protocol from plant tissues rich in secondary metabolites. Methods and Protocols, 8(3), 50.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6), 1547–1549.

Lanteri, A. A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. Revista de La Sociedad Entomológica Argentina, 66(3–4), 15–25.

Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., y Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. Biological Reviews, 90(1), 157–166.

Liu, Z., Zeng, X., Yang, D., Chu, G., y Yuan, Z. (2012). Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family Araliaceae. Gene, 499(1), 76–80.

López Escamilla, A. L., Olguín Santos, L. P., y Saby Vercamer, L. (2018). *Echinocactus platyacanthus* la planta del acitrón. Ciencias (México, D.F.)

López, M. del P. C., y López, A. M. (2017). Representación de plantas en la imaginería del arte rupestre en México. Arqueología Mexicana, 25(145), 22–31.

Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., López-Mata, L., y Trejo, C. (2003). Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. Interciencia, 28(2), 83–89.

Madrigal-Valverde, K. A. (2017). Uso de herramientas para alineación de secuencias y creación de árboles filogenéticos para la determinación de especies. Revista Tecnología En Marcha, 30, 30–34.

Majure, L. C., Judd, W. S., Soltis, P. S., y Soltis, D. E. (2017). Taxonomic revision of the *Opuntia humifusa complex* (Opuntieae: Cactaceae) of the eastern United States. Phytotaxa, 290(1), 1–65.

Masatoshi Nei, M., y Sudhir Kumar, S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press.

Mauseth, J. D. (2006). Structure-function relationships in highly modified shoots of cacti. *Annals of Botany*, 98(5), 901–926.

Mishra, P., Kumar, A., Sivaraman, G., Shukla, A. K., Kaliamoorthy, R., y Velusamy, S. (2017). Character-based DNA barcoding for authentication and conservation of IUCN Red listed threatened species of genus Decalepis. Scientific Reports, 7, 1–12.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2023). NCBI databases.

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., y team, the U. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics, 28(8), 1166–1167.

Paz, A., Gonzalez, M., y Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. Acta Biológica Colombiana, 16(3), 161–176.

Pérez-González, S. B., Reyes-Oliva, A., y Rendón, B. (2019). Damage in Cactaceae, their geographic distribution and new evidences. Botanical Sciences, 97(4), 551–567.

Rache-Cardenal, L. Y., Albesiano-Hoyos, A. S., y Tall, H. (2022). Optimización de un método de extracción de ADN utilizando Subepidermis de *Austrocylindropuntia* y *Opuntia*-Opuntioideae. Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación, 12(2), 305–314.

Ramos, C. M. B., Martínez, L. I. C., Escobar, P. R., Pliego, P. E., Olivera, M. D. los Á. G., et al., (2012). Códigos de barras de adn: Una nueva herramienta para la sistemática. Kuxulkab', 18(35).

Rebman, J. P., y Pinkava, D. J. (2001). Opuntia (Cactaceae) and closely related genera. En Flora of North America.

Rendón Aguilar, B., Bernal Ramírez, L. A., Arias-Montes, Á. S., Jiménez-Sierra, C. L., Ballesteros-Barrera, C., et al., (2022). Aspectos florísticos, ecológicos y etnobotánicos de *Mammillaria deherdtiana* subsp. *dodsoni*i (Cactaceae), una planta endémica y amenazada. Acta Botánica Mexicana, (129).

Salas Cruz, L. R. (2014). Aplicación de zeolitas en la propagación, aclimatación y Reintroducción de cactáceas en dos zonas ecológicas del Noreste de México [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León].

Schultz, J., y Wolf, M. (2009). ITS2 sequence–structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics. Molecular Phylogenetics and Evolution, 52(2), 520–523.

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

Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., y Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies. American Journal of Botany, 94(3), 275–288.

Shedbalkar, U. U., Adki, V. S., Jadhav, J. P., y Bapat V. A. (2010). Opuntia and other cacti: applications and biotechnological insights. Tropical Plant Biology, 3, 136-150.

Stoeckle, M. Y., Winker, K., y Dove, C. J. (2005). DNA barcoding: birds through the looking glass. PLoS Biology, 3(12), e422.

Stoeckle, M. Y., y Thaler, D. S. (2014). DNA barcoding works in practice but not in (neutral) theory. PLoS ONE, 9(7), e100755.

Sue-Porebski, Grant-Bailey, L., y Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 15, 8-15.

Tan, W. H., Chai, L. C., y Chin, C. F. (2020). Efficacy of DNA barcode internal transcribed spacer 2 (ITS2) in phylogenetic study of Alpinia species from Peninsular Malaysia. Physiology and Molecular Biology of Plants, 26(9), 1889–1896.

Vásquez, A. P., Aquino, D. R. S., y Flores, M. E. P. (2020). Importancia socioeconómica de la producción del fruto de tunillo [*Stenocereus stellatus* (Pfeiffer) Riccobono] en Valles Centrales de Oaxaca, México. Revista de La Realidad Global AcademiaJournals. Com, 9(1), 59.

Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T. y Arias, S. (2021). La taxonomía integrativa revela diversidad críptica en cactáceas mexicanas. Revista Botánica de la Sociedad Linneana, 195(3), 353–370.

Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T., y Arias, S. (2012). Growth form and wood evolution in the tribe Cacteae (Cactaceae). Botanical Sciences, 90(2), 97–108.

Vera, S. P., Jiménez, P., y Franco-Lara, L. (2012). Uso de herramientas bioinformáticas en la evaluación de secuencias "DNA barcode" para la identificación a nivel de especie. Revista Facultad de Ciencias Básicas, 8(2), 196–209.

Villavicencio Gutierrez, E. E., González Cortes, A., Carranza Pérez, M. A., y Arredondo Gómez, A. (2012). Micropropagación y producción de *Epithelantha micromeris* (engelm.) f: a: c: weber ex britt. y rose cactácea ornamental del desierto de Chihuahuense.

Wei, L., Pacheco-Reyes, F. C., Villarreal-Quintanilla, J. Á., Robledo-Torres, V., Encina-Domínguez, J. A., Lara-Ramírez, E. E., y Pérez-Rodríguez, M. Á. (2024). Effectiveness of DNA barcodes (*rbcL*, *matK*, ITS2) in identifying genera and species in Cactaceae. Pakistan Journal of Botany, 56(5), 1911–1928.

Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., y Xiao, P. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. PloS One, 5(10), e13102.

Zhao, L.-L., Feng, S.-J., Tian, J.-Y., Wei, A.-Z., y Yang, T.-X. (2018). Internal transcribed spacer 2 (ITS2) barcodes: A useful tool for identifying Chinese Zanthoxylum. Applications in Plant Sciences, 6(6), e01157.

Zito, A., Rigon, T., y Dunson, D. B. (2022). Inferring taxonomic placement from DNA barcoding allowing discovery of new taxa. arXiv.

Zou, Y., y collaborators. (2024). Common methods for phylogenetic tree construction and clustering analysis. Bioengineering, 11(5), 480.