

Informe final* del Proyecto GE021
Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México

Responsable: Dr. David Gernandt
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biología
Dirección: Av Universidad # 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF,
04510 , México
Correo electrónico: dgernandt@ibiologia.unam.mx
Teléfono/Fax: 5622 9080, fax: 5550 1760
Fecha de inicio: Noviembre 28, 2008
Fecha de término: Noviembre 7, 2011
Principales resultados: Base de datos, informe final, códigos de barras
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Gernandt, D., Salazar, G., Vergara, F., Arias, S., Sosa V., García, A., Reyes, J. Cabrera, L. y P. Rosas. 2011. Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Instituto de Ecología, A.C., **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. GE021**, México D. F.

Resumen:

Los códigos de barras genéticos consisten en secuencias cortas y estandarizadas de DNA que permiten la identificación de las especies de organismos conocidas y el descubrimiento de especies desconocidas. A diferencia de muchos animales (y otros eucariontes) para los que el gen mitocondrial CO1 es fácil de secuenciar y altamente informativo, las plantas terrestres presentan problemas particulares para la selección de un código de barras. Esto se debe a la baja tasa de sustitución y la frecuencia de rearrreglos del genoma mitocondrial. También existen problemas debidos a poliploidía y paralogía en los genes nucleares. Aunque existe consenso en que el genoma del cloroplasto es la fuente más prometedora de códigos de barras genéticos para plantas, la tasa de evolución relativamente baja de muchos genes de plástidos hace necesaria la concatenación de varias secuencias para incrementar la resolución. En este proyecto se generarán códigos de barras de DNA de cloroplasto de 319 ejemplares de c. 170 especies pertenecientes a nueve familias de plantas vasculares de gran relevancia biológica, ecológica, económica y cultural en México, incluyendo Agavaceae, Cactaceae, Crassulaceae, Cupressaceae, Orchidaceae, Pinaceae, Podocarpaceae y Taxaceae. En la selección de los grupos de estudio se priorizaron los taxones listados en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Los códigos propuestos consistirán de secuencias concatenadas de cuatro regiones en total. Candidatos por evaluar incluyen las regiones codificantes de los genes matK, rbcL y rpoC1, y los espaciadores intergénicos trnH-psbA, psbK-psbI y dos más hipervariables por definir en el curso de este estudio.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

Informe Final del Proyecto GE021: Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México.

Autores:

David Gernandt, Gerardo Salazar, Francisco Vergara, Salvador Arias, Victoria Sosa, Abisai García, Jerónimo Reyes, Lidia Cabrera y Patricia Rosas.

Instituciones:

Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-367, Coyoacán 04510, México, D.F.

Instituto de Ecología, A.C., Apartado Postal 63, 91000 Xalapa, Veracruz.

Responsable:

Dr. David Gernandt, Investigador

Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM.

Tel.: 55-5622-9080

Fax: 55-5550-1760

Correo electrónico: dgernandt@ibiologia.unam.mx

Palabras clave: Agavaceae, Cactaceae, código de barras genético, Coniferales, Crassulaceae, DNA de cloroplasto, identificación, NOM-059-ECOL-2001, Orchidaceae.

CLAVE CONABIO: GE021

Monto de financiamiento: \$441,500.00

Duración del proyecto: 12 meses, 28 de noviembre del 2008 al 27 de noviembre al 2009

Resumen

Los códigos de barras genéticos consisten en secuencias cortas y estandarizadas de DNA que permiten la identificación de las especies de organismos conocidas y pueden ser auxiliares en el descubrimiento de especies desconocidas. En plantas, la búsqueda de un código de barras estándar ha sido larga y polémica. Estas dificultades se debieron a la baja tasa de sustitución en el DNA mitocondrial y la falta de un marcador de uso universal proveniente del núcleo. En el año 2009, los fragmentos parciales de los genes de cloroplasto *matK* y *rbcL* fueron elegidos como el código de barras estándar para plantas terrestres. En este proyecto evaluamos la variabilidad y aceptabilidad de estas dos regiones codificantes, en combinación con los espaciadores intergénicos *trnH-psbA*, *psbK-psbI*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG* y *rpL32-trnL*. Se generaron códigos de barras estándares para 399 ejemplares de c. 220 especies, pertenecientes a cinco grupos (ocho familias) de plantas vasculares de gran relevancia biológica, ecológica, económica y cultural en México: Agavaceae, Cactaceae, Crassulaceae, Orchidaceae, y Coniferales (Cupressaceae, Pinaceae, Podocarpaceae y Taxaceae). En la selección de los grupos de estudio se priorizaron los taxones listados en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Para cada familia se eligieron cinco especies distantemente relacionadas y dos pares de especies hermanas (con Pinaceae como representante de las Coniferales). El mayor éxito de amplificación se obtuvo con *rbcL*. En cambio, no logramos amplificación de *matK* en las coníferas con los oligonucleótidos estándares, por lo que fue necesario probar cuatro combinaciones diferentes. La amplificación de la región no codificante *trnS-G* fue exitosa, pero en algunos casos los cromatogramas fueron demasiado cortos y no se empalmaron. En el caso de *rpL32-trnL* para Cactaceae y Coníferas tampoco fue exitosa la amplificación en su totalidad y esa región fue descartada como código de barras complementario para los grupos estudiados. Fue posible distinguir 8 de 9 pares de especies con *matK* y *rbcL*. Se recomienda permitir el uso de uno o dos marcadores suplementarios en conjunto con *rbcL* y *matK*, seguir evaluando el desempeño de *rbcL* y *matK* en comparación con otros marcadores como *trnH-psbA*, promover el resguardo de DNA genómico, y promover el muestreo de múltiples individuos por especie.

Introducción

Los códigos de barras genéticos consisten de secuencias cortas y estandarizadas de DNA que permiten la identificación de las especies de organismos conocidas y el descubrimiento de especies desconocidas (Hebert et al. 2003a, b; Hebert et al. 2004). Las plantas terrestres han presentado problemas particulares para la selección de un código de barras (Chase et al. 2005), y recientemente se ha discutido hasta qué punto es intrínsecamente más difícil establecer códigos de barras en plantas que en otros grupos taxonómicos (Fazekas et al. 2009). Durante varios años han existido dudas acerca de si el cloroplasto presenta suficiente variación para distinguir entre especies hermanas; en función de lo anterior, la selección de un marcador estándar para todas las plantas ha sido mucho más lenta que en muchos animales (y otros eucariontes), donde se ha escogido emplear un fragmento del gen mitocondrial para la citocromo oxidasa 1 (CO1), que es fácil de secuenciar y altamente informativo (Hebert et al. 2003a, b). Hasta hace muy poco tiempo, no se había alcanzado un acuerdo internacional con respecto al marcador o marcadores universales para plantas, pero las regiones propuestas ya se habían reducido a un pequeño número, unas de ellas codificantes y otras no codificantes, dentro del genoma del cloroplasto (ver, por ejemplo, Fazekas et al. 2008; Ford et al. 2009)¹. La propuesta de consenso recientemente publicada (CBOL Plant Working Group 2009) recomienda el uso de un código de barras estándar o medular ('core barcode') compuesto por porciones de las regiones codificantes *matK* y *rbcL*, que puede ser complementado por uno o más de un grupo de tres espaciadores intergénicos (*trnH-psbA*, *atpF-atpH* y *psbK-psbI*). A excepción de *atpF-H*, todas las demás regiones consideradas por la comunidad internacional han sido incluidas en nuestro proyecto.

La publicación de la propuesta internacional de consenso para los códigos de barras de plantas implica su uso generalizado. Sin embargo, sigue siendo importante destacar que para las siete regiones del cloroplasto que investigamos aquí, ya sea como códigos de barras estándar o bien como marcadores complementarios, se buscó la satisfacción de criterios también reconocidos internacionalmente como indicadores de lo que representa un 'buen' código de barras. Estos criterios son: (1) la facilidad de amplificarlas y secuenciarlas en plantas mexicanas; (2) la presencia de un nivel de variación adecuada; y (3) si especies estrechamente relacionadas comparten polimorfismos ancestrales. Estos tres criterios son equivalentes y/o complementarios a los tres criterios declarados por el CBOL Plant Working Group (2009): universalidad, calidad de las secuencias y discriminación de especies.

Para este estudio fueron seleccionadas familias de plantas vasculares de gran importancia para México que además incluyen especies en alguna categoría de riesgo listados en la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT 2002). Fueron consideradas cuatro familias de plantas con flores: Agavaceae, Cactaceae, Crassulaceae y Orchidaceae, así como las cuatro familias de coníferas representadas en el país (Cupressaceae, Podocarpaceae, Pinaceae y Taxaceae).

El diseño experimental del presente proyecto incluye tres fases, orientadas a (1)

¹Otro aspecto del cloroplasto en particular, y probablemente el genoma en general para plantas, es que muchos marcadores presentan tasas de coalescencia más lenta que la tasa de especiación y como resultado especies estrechamente relacionadas pueden compartir polimorfismo ancestral.

evaluar la factibilidad de amplificar, secuenciar y alinear siete marcadores entre grupos; (2) distinguir entre especies estrechamente relacionadas, con énfasis en especies ubicadas en alguna categoría de riesgo; y 3) evaluar si agregar uno o dos marcadores complementarios al código de barra estándar permite y/o mejora la discriminación entre especies.

Materiales y Métodos

Muestreo taxonómico

Un total de 399 ejemplares pertenecientes a c. 220 especies, 75 géneros y 9 familias de plantas vasculares fueron analizados en este estudio (Apéndice 1). En la selección de los grupos de estudio se priorizaron los taxones listados en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT 2002).

La mayor parte de los ejemplares incluidos estaban disponibles en las colecciones vivas del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, el Jardín Botánico Francisco J. Clavijero del Instituto de Ecología, A.C. de Xalapa, Veracruz y el invernadero del Herbario AMO, Ciudad de México. Material complementario fue obtenido durante tres viajes de campo al estado de Oaxaca.

Extracciones de DNA

Se llevó a cabo la extracción con CTAB generalmente a partir de fragmentos de tejido fresco o secado en gel de sílice (Doyle y Doyle 1987). Solamente en el caso de dos especies de Orchidaceae (*Eurystyles auriculata* y *Galeoglossum thysanochilum*) la extracción de DNA se efectuó a partir de ejemplares de herbario.

Amplificación

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs, en inglés) se llevaron a cabo en volúmenes de 25 µL. Cada reacción tuvo los siguientes volúmenes: 0.5 µL de DNA genómico (c. 10-100 ng), 2.5 µL de 10× buffer, 1.0 µL de 10× BSA (0.4%), 1.0 µL de 1.0 mM de cloruro de magnesio, 0.5 µL de 0.1 mM dNTP, 0.25 µL de 0.1 mM de cada primer y 0.125 µL de 0.625 U/µL de Platinum *Taq*. Todos los reactivos empleados provinieron de la compañía Invitrogen.

Las condiciones para amplificar la región codificante *matK* fueron: 94°C, 2 min; 30×(94°C, 30 s; 48°C, 40 s; 72°C, 40 s); 72°C, 5 min. Para las angiospermas se usó la siguiente pareja de primers: *matK_3F_KIM_f* (CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG) y *matK_1R_KIM_R* (ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC). Esta combinación de primers amplifica una región de 850 pb, pero las reacciones en Coniferales fallaron. En vista de lo anterior, en este grupo probamos varias combinaciones alternativas de primers. La combinación que amplificó Pinaceae fue *matK_F_(Equisetum)* (ATACCCCATTTTATTCATCC) y *matK_2F_R* (CGTACTTTTATGTTTACAGGCTAA; Wang et al. 1999), los cuales amplifican la misma región. En Cupressaceae, Podocarpaceae y Taxaceae, la combinación que mejor amplificó fue *matK_NY552_F* (CTGGATYCAAGATGCTCCTT; D. Little, com. pers.) y *matK_R_(Equisetum)* (GTACTTTTATGTTTACGAGC).

Las condiciones para amplificar la región codificante *rbcL* fueron: 94°C, 2 min; 29×(94°C, 1 min; 48°C, 1 min; 72°C, 2.5 min); 72°C, 7 min. Fue posible usar un solo juego

de primers: *rbcLa_f* (ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC) y *rbcLa_Rev* (GTAAAATCAAGTCCACCRG). Esta combinación de primers amplifica una región de 553 pb, lo cual tiene la ventaja de permitir la amplificación de DNA degradado, pero la lectura es mucho más corta de lo deseable para la elaboración de una biblioteca de referencia. Entonces, también probamos el primer *rbcLa_f* con otro primer, *rbcLajf_634R* (GAAACGGTCTCTCCAACGCAT). Este par amplifica una región de 609 pb.

Las condiciones para amplificar los espaciadores *trnH-psbA*, *trnL-trnF*, *psbK-psbI*, *trnS-trnG* y *rpL32-trnL* fueron: 94°C, 2 min; 29×(94°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 1 min); 72°C, 7 min. Para *trnH-psbA* se usaron los mismos primers para todos los grupos: *trnH* (CGCGCATGGTGGATTACAATCC) y *psbA* (GTAAAATCAAGTCCACCRG). Para *trnL-trnF* se usaron los mismos primers para la mayoría de los grupos: *trnL_Taberlet_C* (CGAAATCGGTAGACGCTACG) y *trnL_Taberlet_F* (ATTTGAACTGGTGACACGAG). En algunos casos se usaron los primers internos *Bellstedt_C2* (GGATAGGTGCAGAGACTCAAT), *trnL_Taberlet_D* (GGGGATAGAGGGACTTGA) y *trnL_Taberlet_E* (GGTTCAAGTCCCTCTATCCC). Para *psbK-psbI* se usaron los mismos primers para todos los grupos: *psbK* (TTAGCCTTTGTTTGGCAAG) y *psbI-F* (AGAGTTTGAGAGTAAGCAT). Para *trnS-trnG* se usaron los mismos primers para todos los grupos: *trnS* (AGATAGGGATTTCGAACCCTCGGT) y *trnG2S* (TTTTACCACTAACTATACCCGC). Para *rpL32-trnL* se usaron los mismos primers para todos los grupos: *trnL(UAG)* (CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT) y *rpL32-F* (CAGTTCCAAAAAACGTACTTC).

Secuenciación

La secuenciación automatizada fue llevada a cabo en su mayor parte en la High-Throughput Genomics Unit, University of Washington, Seattle, EEUU y en menor proporción en el Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Canadá.

Ensamblaje, edición de cromatogramas y alineación de secuencias

Los cromatogramas en formato ABI fueron manipulados con el programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) para su ensamblaje y la simultánea verificación manual de los estados de carácter (A, C, G o T) en las secuencias de nucleótidos. Las secuencias ya editadas fueron subsecuentemente alineadas en BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999), a través de su implementación del algoritmo de alineación múltiple del programa MAFFT v. 6 (Kato, et al. 2009). Las matrices concatenadas de marcadores fueron ensambladas para cada familia por separado en Mesquite (Maddison y Maddison 2009).

Análisis de los datos para la primera fase

La primera fase consistió en secuenciar las siete regiones de DNA para cinco especies distantemente relacionadas entre sí, de cinco familias elegidas en el estudio (con Pinaceae como representante de las Coniferales). Este experimento tuvo la finalidad de evaluar la probable ‘universalidad’ y la facilidad de amplificación de cada región a partir de primers estándar. Por cada marcador se comparó el grado de éxito de PCR y secuenciación, la calidad de las secuencias obtenidas (comparando el porcentaje de traslape de la lectura “forward” y “reverse”), la variación en longitud de las secuencias obtenidas, la facilidad de alinear las secuencias sin ambigüedad adentro de y entre familias, y el número de sitios variables. La longitud de cada secuencia fue determinada en BioEdit mientras que el número de sitios

variables (sitios potencialmente informativos, “PICs” en inglés) en las alineaciones fue la suma de los sitios de los caracteres no-informativos (“singletons”) y los caracteres informativos, obtenidos en PAUP* (Swofford 2002).

Análisis de los datos para la segunda fase

En la segunda fase se comparó el poder de discriminación entre dos pares de especies cercanamente relacionadas por familia. Los pares de especies fueron elegidos con base en información previa, principalmente por similitud morfológica. En algunos casos, las especies elegidas habían sido incluidas previamente en estudios filogenéticos moleculares previos, como en *Galeoglossum* (Orchidaceae; Salazar et al. 2009); para Pinaceae se contaba con análisis de DNA del cloroplasto (Gernandt et al. 2003), mientras que para Cactaceae se utilizó una filogenia realizada para la tribu Cactae (Butterworth et al. 2002), donde se ubican las especies seleccionadas para esta fase. Para las familias Cactaceae, Crassulaceae, Orchidaceae y Pinaceae se incluyeron entre dos y cuatro ejemplares por especie mientras en Agavaceae solo disponía de un ejemplar por especie. En el caso de Orchidaceae, adicionalmente fueron comparadas dos especies previamente conocidas del género *Galeoglossum* (Salazar 2009) entre sí y con una especie adicional aún no descrita formalmente pero claramente distinguible de ambas por características morfológicas (G. A. Salazar et al., datos no publicados; Tabla 5).

Se llevaron a cabo análisis de parsimonia para cada familia mediante búsquedas branch-and-bound en PAUP* (con inserciones y deleciones tratadas como datos faltantes) y los árboles fueron guardados junto con sus longitudes de ramas (como filogramas). Los árboles fueron arraigados y dibujados en FigTree (Rambaut 2009) y en Adobe Illustrator CS2.

Análisis de los datos para la tercera fase

En la tercera fase, para todos los ejemplares se intentó secuenciar el código de barras estándar (*rbcL* + *matK*). Las secuencias fueron alineadas en MAFFT y se efectuaron análisis de parsimonia de *rbcL* y *matK* separadamente y en combinación usando el programa PAUP*. Se efectuaron búsquedas heurísticas con 10 réplicas aleatorias de adición de taxa, intercambio de ramas con método más intensivo (‘Tree bisection-reconnection’, o TBR), guardando hasta 10 árboles más cortos por réplica. Se seleccionó al azar uno de los cladogramas más parsimoniosos de cada análisis y se calcularon los árboles de consenso estricto.

Resultados

Fase 1: facilidad de secuenciación, alineación y niveles de variabilidad entre y dentro de familias.

Se incluyeron cinco especies distantemente emparentadas para cada una de cinco familias (Tabla 1). De los siete marcadores utilizados, la amplificación y secuenciación fueron exitosas en las cinco especies para cinco marcadores. El ordenamiento con respecto al número relativo de amplificaciones fallidas es *rpL32-trnL* > *trnS-trnG* > *matK* > *trnH-psbA* > *trnL-trnF* > *rbcL*. La amplificación y secuenciación fueron notablemente más consistentes para *rbcL* en todas las familias en comparación con los otros marcadores. Fue necesario usar tres combinaciones diferentes de primers para *matK*, y aún así el género *Juniperus* no logró secuenciar con uno de los pares de primers. Para esta fase, no logramos una secuenciación

satisfactoria para *trnS-trnG* en Cactaceae, y para el caso de *rpL32-trnL* en Cactaceae (una especie) y Pinaceae la amplificación no fue completamente exitosa. Por esta razón, éstas terminales fueron excluidas de algunos de los análisis subsecuentes. En todos estos casos, la explicación más plausible pareciera ser la ineficiencia de los primers para dichos grupos en particular, posiblemente debida a mutaciones en los sitios de adhesión (‘annealing’) de los primers ensayados.

Tabla 1. Muestreo y éxito de PCR y secuenciación en la fase 1. Secuencias generadas en “forward” y “reverse” están indicadas con un asterisco. NA= no amplificó, NS= no secuenció

		<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>psbK-psbI</i>	<i>rpL32-trnL</i>	<i>trnS-trnG</i>
Agavaceae	<i>Agave bracteosa</i>	*	*	*	*	*	*	NA
	<i>Agave parviflora</i>	*	*	*	*	*	*	NA
	<i>Furcraea parmentieri</i>	*	*	*	*	*	*	NA
	<i>Manfreda nanchititlensis</i>	*	*	*	*	*	*	NA
	<i>Yucca lacandonica</i>	*	*	*	*	*	*	NA
Cactaceae	<i>Ariocarpus agavoides</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Echinocactus parryi</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Mammillaria dixanthocentron</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	*	*	*	*	*	NS	*
	<i>Thelocactus hastifer</i>	*	*	*	*	*	*	*
Crassulaceae	<i>Sedum platyphyllum</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Sedum frutescens</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Echeveria moranii</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Echeveria amphoralis</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Graptopetalum macdougallii</i>	*	*	*	*	*	*	*
Orchidaceae	<i>Epidendrum dorsocarinatum</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Galeandra greenwoodiana</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Mexipedium xerophyticum</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Plectrophora alata</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Pseudogoodyeroides</i>	*	*	*	*	*	NA	*
Pinaceae	<i>Abies hidalgensis</i>	*	*	*	*	*	NS	*
	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	*	*	*	*	*	NA	*
	<i>Picea chihuahuana</i>	*	*	*	*	*	NS	*
	<i>Pinus radiata</i>	*	*	*	*	*	NS	*
	<i>Pinus nelsonii</i>	*	*	*	*	*	NS	*

La longitud de los marcadores afectó el ensamblaje de las lecturas bidireccionales de secuencias. La máxima longitud de las lecturas realizadas en la Universidad de Washington fue de 700-800 pares de bases. Como consecuencia, solamente los dos marcadores más cortos (*rbcL*, con una longitud de 553 pb y *psbK-psbI* con una longitud de 306-514 pb) alcanzaron 100% de cobertura en las dos direcciones, mientras los otros marcadores sobrepasaron esta longitud, al menos en algunas familias (Tabla 2). Las cuatro regiones no codificantes mostraron un mayor grado de variación de longitud comparado con las dos regiones codificantes (Figura 1). La cobertura en ambos sentidos fue mayor de 70% para los

marcadores *trnH-psbA* y *matK*, mientras que fue menor para *trnL-trnF* y para *trnS-trnG*.

Para *trnL-trnF* muchas especies tuvieron un “simple sequence repeat” (SSR) de poli-A/T con suficiente longitud (>11 bases) para desfasar la lectura de la secuencia y en muchos casos no permitió ningún traslape entre los primers forward y reverse. También se observaron inversiones y duplicaciones en los espaciadores *trnS-trnG* y *trnH-psbA* que dificultaron la alineación entre y dentro de las familias.

Tabla 2. Rango de longitud de cada región por familia (p.b.). Familias no representadas por cinco taxa están indicadas con un asterisco (*).

	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>trnHpsbA</i>	<i>trnLF</i>	<i>psbKpsbI</i>	<i>trnStrnG</i>	<i>rpL32trnL</i>
Agav	553	861	613-639	1190-1213	430-440	716-724	*
Cact	553	833	376-382	770-1037	450-480	1486*	*
Cras	553	791-794	239-246	555-877	409-430	1354-1407	644-653
Orch	553	790	772-1014	999-1074	306-514	1025-1448	605-973
Pina	553	813	505-636	879-916	506-512	735-910	*
Prom	553	818.1	540.4	978.5	453.08	1072.9	731.7

Las regiones con más sitios variables fueron los espaciadores más largos, *trnS-trnG* y *trnL-trnF*. Las regiones codificantes tuvieron menos sitios variables. Considerando las cinco familias en conjunto, el ordenamiento fue *trnS-trnG* > *trnL-trnF* > *trnH-psbA* > *matK* > *rpL32-trnL* > *rbcL*. El espaciador *rpL32-trnL* recibió una calificación baja entre familias porque le fue asignada la calificación más baja en las familias donde no logramos obtener secuencias (Tabla 3).

Bajo nuestro esquema de evaluación a priori de cada marcador, el mejor de ellos fue *rbcL* (a pesar de su baja variabilidad) debido a sus otras propiedades favorables como consistencia en la amplificación, facilidad en alineación adentro y entre familias, y su longitud. En segundo lugar quedaron empatadas *trnH-psbA*, *trnL-trnF* y *psbK-psbI*. El segundo marcador codificante, *matK*, quedó un punto atrás, sobre todo por ser un poco larga para la secuenciación Sanger utilizada en este trabajo y por requerir tres juegos de primers para su amplificación y secuenciación (Tabla 4).

Tabla 3. Calificación de cada región con respecto a sitios variables. Las regiones con los valores menores son las más variables.

	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>trnHpsbA</i>	<i>trnLF</i>	<i>psbKI</i>	<i>trnSG</i>	<i>rpL32trnL</i>
Agavaceae	6	4	3	1	5	2	7
Cactaceae	6	5	3	1	4	2	7
Crassulaceae	7	2.5	4	6	5	1	2.5
Orchidaceae	7	5	6	2	4	1	3
Pinaceae	6	3	2	4	5	1	7
Suma	32	19.5	18	14	23	7	26.5

Tabla 4. Calificación de cada región que considera universalidad, calidad, y variación adecuada. Valores menores indican calificaciones mejores. Parámetros para medir en cada marcador: Calidad de secuencias: 1 = 1 par de primers funciona en todos los grupos y resulta en 100% sobrelape, 2 = 2 pares de primers funcionan en todos los grupos o alcanza < de 90% sobrelape, 3 = Se requiere >2 pares de primers o alcanza < de 50% sobrelape.

Número total de pares de primers necesarios para amplificar los cinco grupos. Longitud de la región amplificada: 1= 350-700 pb, 2= <350 o >700 pb. Calidad de alineación adentro del grupo: 1 = 90% de la secuencia alineada sin ambigüedad, 2 = 90-50% de la secuencia alineada sin ambigüedad, 3 = menos de 50% alineada sin ambigüedad. Calidad de alineación entre los 5 grupos: 1 = 90% de la secuencia alineada sin ambigüedad, 2 = 90-50% de la secuencia alineada sin ambigüedad, 3 = menos de 50% de la secuencia alineada sin ambigüedad. Sitios variables por marcador y por grupo: 1 = dos marcadores que presentan el número mayor de sitios variables, 2 = dos marcadores que ocupan el 3er y el 4to lugar, 3 = los marcadores menos variables.

	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>trnHpsbA</i>	<i>trnLF</i>	<i>psbKpsbI</i>	<i>trnStrnG</i>	<i>rpL32trnL</i>
Calidad de sec	1	3	2	1	1	2	3
Longitud	1	2	1	3	1	2	1
Alineación adentro	1	1	1	1	1	2	1
Alineación entre	1	1	2	2	2	3	2
Calificación PICs	3	2	2	1	3	1	3
Suma	7	9	8	8	8	10	10
Lugar	1	5	2*	2*	2*	6*	6*

Fase 2: discriminación entre especies estrechamente relacionadas.

El éxito en la secuenciación bidireccional en esta fase del proyecto se muestra en Tabla 5. De los nueve pares de especies en cinco familias evaluadas, fue posible distinguir entre ocho de ellas (89%) con *matK* y *rbcL* (Figura 3). De las 14 especies representadas por >1 ejemplar, 12 (86%) formaron grupos monofiléticos al menos en uno de los árboles más parsimoniosos (AMPs). Una especie, *Echeveria setosa*, incluyó un ejemplar que se agrupó con su especie par, *E. longissima*. Sin embargo, la secuencia fue distinta al compararla con las tres secuencias provenientes de los ejemplares de *E. longissima*. Al agregar más marcadores no hubo mejora en el porcentaje de grupos monofiléticos, pero si hubo más diferenciación entre ejemplares, lo cuál permitió distinguir el noveno par de especies (*Pinus maximartinezii* y *P. pinceana*). En este caso las tres muestras de *P. pinceana*, no se resolvieron como grupo monofilético sino parafilético con respecto a su par, *P. maximartinezii*. En resumen, los marcadores estándar tuvieron un alto grado de éxito para distinguir entre especies, y al agregar marcadores complementarios hubo un leve incremento en distinción entre especies y una mayor cantidad de caracteres variables que apoyaban los resultados obtenidos con los marcadores estándar.

Tabla 5. Muestreo para la fase 2. Secuencias generadas en forward y reverse están indicadas con un asterisco.

		<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>psbK-psbI</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnS-trnG</i>
Agavaceae	<i>Agave striata</i>	*	*	*	*	*	*	NA
	<i>Agave stricta</i>	*	*	*	*	*	*	NA
	<i>Furcraea macdougallii</i>	*	*	*	*	*	*	NA
	<i>Furcraea pubescens</i>	*	*	*	*	*	*	NA
Cactaceae	<i>Ariocarpus fissuratus</i>	*	*	*	*	NS	*	*
	<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	*	*	*	*	NS	*	*
	<i>Aztekium hintonii</i>	*	*	*	*	NS	*	
	<i>Aztekium ritterii</i>	*	*	*	*	NS	*	
Crassulaceae	<i>Sedum torulosum</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Sedum tortuosum</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Echeveria longissima</i>	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Echeveria setosa</i>	*	*	*	*	*	*	*
Orchidaceae	<i>Galaeoglossum</i> sp. nov.	*	*	*	*	*	*	*
	<i>Galaeoglossum thysanochilum</i>	*	*	*	*	*	*	
	<i>Galaeoglossum tubulosum</i>	*	*	*	*	*	*	*
Pinaceae	<i>Pinus maximartinezii</i>	*	*	*	*	*	NA	*
	<i>Pinus pinceana</i>	*	*	*	*	*	NA	*
	<i>Pinus cembroides</i>	*	*	*	*	*	NA	*
	<i>Pinus johannis</i>	*	*	*	*	*	NA	*

Para el caso de *trnH-psbA*, la región candidata más corta seleccionada en Fase 1, analizamos con más detalle la distribución de los caracteres variables, directamente del alineamiento. En el caso de Crassulaceae, *trnH-psbA* se comporta como una buena región potencial de código de barras (Tabla 6, panel A): la proporción de sitios variables potencialmente distingue cada una de las cuatro entidades taxonómicas entre sí, mientras que al interior de los pares de especies (esto es, las especies de *Sedum* entre sí y las especies de *Echeveria* entre sí) también es posible hacer distinciones. En algunos casos, un individuo de cada grupo de tres secuencias puede ser distinguido de los otros dos de su grupo (p. ej., la secuencia 3 de *Sedum torulosum* tiene un cambio en la posición 16 de la matriz (carácter 138 del alineamiento original). El caso de la matriz de Pinaceae contrasta con el de Crassulaceae: hubo únicamente 9 sitios variables en la alineación completa (Tabla 6, panel B). Si bien la combinación de caracteres variables directamente obtenida de la alineación –esto es, el ‘DNA barcode’ preliminar– observada en *Pinus maximartinezii* es exclusiva de los tres especímenes muestreados, notamos que una de las dos terminales de *Pinus johannis* es idéntica a la combinación que presentaron las tres muestras de *Pinus cembroides*. Esta distribución de caracteres podría explicarse como homoplasia de los haplotipos de cloroplasto. El tercer caso (Cactaceae) representa una condición adicional, donde encontramos el mayor número de caracteres variables, aunque en muchos casos éstos dependen de la presencia de un indel relativamente largo que principalmente distingue a *Aztekium ritterii* de las otras dos especies (*Aztekium hintonii* y dos especies de *Ariocarpus* cercanamente relacionadas). Existe información adicional en ese segmento (caracteres 61 a 108 de la alineación original;

caracteres 19 a 66 de la matriz editada resultante) para distinguir entre los dos géneros incluidos, pero ésta es insuficiente para distinguir entre *Ariocarpus fissuratus* y *A. kotschoubeyanus*.

La consideración cualitativa de las proporciones de caracteres variables para *trnH-psbA* en Cactaceae, Crassulaceae y Pinaceae, sumada a estimaciones del número de PICs para la fase dos en estas tres familias es posible distinguir la mayoría de las especies muestreadas, aún aquellas en pares de ‘especies hermanas’, con una combinación de regiones del genoma del cloroplasto no-codificantes y codificantes.

Fase 3: evaluación del desempeño de los códigos de barras estándar con un muestreo taxonómico más amplio.

La matriz alineada de *rbcL* consistió de 619 caracteres, de los que 201 fueron potencialmente informativos para la parsimonia. El análisis cladístico de *rbcL* recuperó 15 árboles igualmente más parsimoniosos con una longitud de 588 pasos, índice de consistencia de 0.52 e índice de retención de 0.98. Por su parte, el fragmento de *matK* secuenciado resultó en una matriz alineada de 930 caracteres, de los cuales 614 resultaron potencialmente informativos para la parsimonia. El análisis de *matK* resultó en 60 árboles con índice de consistencia de 0.52 e índice de retención de 0.98. Las relaciones generales recuperadas por los dos marcadores fueron similares, en ambos casos recuperando las ocho familias estudiadas como grupos monofiléticos, pero difiriendo en el grado de resolución entre géneros y especies cercanamente relacionados, siendo mucho menos informativo a este respecto *rbcL* (datos no mostrados). El análisis combinado, que incluye el código de barras estándar y por ende es el interés central de esta fase del estudio, igualmente recobró como monofiléticas las familias y un número variable de géneros dentro de ellas (Fig. 4).

En las Coniferales los géneros *Pinus* y *Juniperus* son monofiléticos, pero *Callitropsis* no está claramente resuelto. El resto de los géneros incluyó solo una especie. Diez de las 19 especies de las cuales se analizó más de un ejemplar resultaron monofiléticas, aunque solamente dos de las 17 especies de pino lo fueron en este análisis (Fig. 5).

Las dos familias monocotiledóneas, Agavaceae y Orchidaceae, forman un clado y cada una de ellas presenta soporte por numerosos cambios de caracteres. Sin embargo, existe un marcado contraste entre la variación nucleotídica desplegada por estos dos linajes, ya que en Agavaceae hay muy poca resolución interna y sólo uno de los seis géneros (*Yucca*) resultó monofilético. La divergencia entre especies es muy pequeña (Fig. 6). En contraste, 19 de los 20 géneros de orquídeas de los cuales fue analizada más de una especie resultaron monofiléticos (Fig. 7). Una notable excepción es *Oncidium*, que resultó polifilético y tuvo anidados en él a varios otros géneros de Oncidiinae. En todas las especies representadas por más de un ejemplar las muestras conespecíficas se agruparon (p.ej. *Cyrtochiloides ochmatochila*, *Galeoglossum thysanochilum*, *G. tubulosum*, *Laelia speciosa* y *Rhynchostele cervantesii*; Fig. 7).

De modo similar, los dos linajes de suculentas eudicotiledóneas, Cactaceae y Crassulaceae, difirieron marcadamente entre sí en cuanto al desempeño de *rbcL-matK* para la distinción taxonómica. Mientras que en Cactaceae el código de barras estándar permitió la discriminación de la mayoría de las especies (32 de 44, 72%), la escasa variación presente en Crassulaceae no permitió una distinción clara a este nivel, además de que ninguno de los tres géneros de esta última familia representados por más de una especie fue recuperado como monofilético.

Tabla 6. (A) Matriz de caracteres variables en la alineación de la región no-codificante *trnH-psbA* para 12 especímenes de Crassulaceae, agrupados en dos pares de especies diferentes consideradas con gran cercanía filogenética (en base a investigación taxonómica previa). (B) Matriz de caracteres variables en una alineación de la misma región del genoma del cloroplasto para 11 especímenes de Pinaceae, agrupados de manera similar. (C) Matriz de caracteres variables en una alineación similar para Cactaceae. Los caracteres variables tuvieron distribuciones disjuntas a lo largo de la alineación original. Claves taxonómicas: (A) Crassulaceae: Sedumtorul = *Sedum torulosum*; Sedumtortu = *Sedum tortuosum*; Echevlongi = *Echeveria longissima*; Echevsetos = *Echeveria setosa*; (B) Pinaceae: Pinusmaxim = *Pinus maximartinezii*; Pinuspince = *Pinus pinceana*; Pinusjohan = *Pinus johannis*; Pinuscembr = *Pinus cembroides*; (C) Cactaceae: Ariocfissu = *Ariocarpus fissuratus*; Ariockotsk = *Ariocarpus kotschoubeyanus*; Aztekhinto = *Aztekium hintonii*; Aztekritte = *Aztekium ritterii*.

A

```

1Sedumtorul  -----CG-GATGGACTTTTTGTAGGA
2Sedumtorul  -----CG-GATGGACTTTTTGTAGGA
3Sedumtorul  -----CG-GATGGACC TTTTTGTAGGA
1Sedumtortu  -----CT-GCTAGCCATTTATGCGGG
2Sedumtortu  -----CT-GCTAGCCATAAAGTCGGG
3Sedumtortu  -----AT-GCTAGTAATTTATGCGGG
1Echevlongi  -----CT-AACGAACAAAAAGTCGAG
2Echevlongi  TTTCTCT-AACGAACATTTGTCTGAG
3Echevlongi  TTTCTCT-AACGAACATTTGTCTGAG
1Echevsetos  -----CT-GACGAACATTTGTCAAG
2Echevsetos  -----CT-GACGAACAAAAAGTCGAG
3Echevsetos  -----CTAGACGAACATTTGTCTGAG

```

B

```

1Pinusmaxim  CTACTTTTT
2Pinusmaxim  CTACTTTTT
3Pinusmaxim  CTACTTTTT
1Pinuspince  CTA AAAAAG
2Pinuspince  CCCCTTTTT
3Pinuspince  CCCCTTTTT
1Pinusjohan  TTA AAAAAG
2Pinusjohan  CTA AAAAAG
1Pinuscembr  CTA AAAAAG
2Pinuscembr  CTA AAAAAG
3Pinuscembr  CTA AAAAAG

```

C

```

1Ariocfissu  AAT--CCCCCTTCCCTTAAAAGAAACTATTCATAATTAGTTCCTTTATTGCCTTTAATTA
2Ariocfissu  AAT--CCCCCTTCCCTTAAAAGAAACTATTCATAATTAGTTCCTTTATTGCCTTTAATTA
3Ariocfissu  AAT--CCCCCTTCCCTTAAAAGAAACTATTCATAATTAGTTCCTTTATTGCCTTTAATTA

```

```

4Ariocfissu  AAT--CCCCCCTTCCCTTAAAAAGAAACTATTCATAATTAGTTCTTTATTGCCTTTAATTA
1Ariockotsc  AAC--CCCCCCTTCCCTTAAAAAGAAACTATTCATAATTAGTTCTTTATTGCCTTTAATTA
2Ariockotsc  AATCCCCCCCCCTTCCCTAAAAAGAAACTATTCATAATTAGTTCTTTATTGCCTTTAATTA
3Ariockotsc  AAT-CCCCCCTTCCCTAAAAAGAAACTATTCATAATTAGTTCTTTATTGCCTTTAATTA
4Ariockotsc  AAT-CCCCCCTTCCCTAAAAAGAAACTATTCATAATTAGTTCTTTATTGCCTTTAATTA
1Aztekhinto  CGT--CC-----TAAAAGAACTATTCATAATTAGTTCTTTATTGCCTTTAATTA
2Aztekhinto  CGT--CC-----TAAAAGAACTATTCATAATTAGTTCTTTATTGCCTTTAATTA
3Aztekhinto  CGT--CC-----TAAAAGAACTATTCATAATTAGTTCTTTATTGCCTTTAATTA
1Aztekritte  GAT---CCCTTTCCTT-----
2Aztekritte  GAT---CCCTTTCCTT-----

```

(cont.)

```

1Ariocfissu  ATTCTTAACCAATGCTTATTCTGATTCCTAG-ACG----TTGAA
2Ariocfissu  ATTCTTAACCAATGCTTATTCTGATTCCTAG-ACG----TTGAA
3Ariocfissu  ATTCTTAACCAATGCTTATTCTGATTCCTAG-ACG----TTGAA
4Ariocfissu  ATTCTTAACCAATGCTTATTCTGATTCCTAG-ACG----TTGAA
1Ariockotsc  ATTCTTAACCAATGCTTATTCTGATTCCTAG-ACG----TAGAA
2Ariockotsc  ATTCTTAACCAATGCTTATTCTGATTCCTAG-ACG----TAGAA
3Ariockotsc  ATTCTTAACCAATGCTTATTCTGATTCCTAG-ACG----TAGAA
4Ariockotsc  ATTCTTAACCAATGCTTATTCTGATTCCTAG-ACG----TAGAA
1Aztekhinto  ATTCTGCACTCCTGACTATTATGATTCCTAG-TTGAAGAATAAGG
2Aztekhinto  ATTCTGCACTCCTGACTATTATGATTCCTAG-TTGAAGAATAAGG
3Aztekhinto  ATTCTGCACTCCTGACTATTATGATTCCTAG-TTGAAGAATAAGG
1Aztekritte  -----CTATCAGAAAAGAATCAGAATAACTAACA-----CAGGG
2Aztekritte  -----CTATCAGAAAAGAATCAGAATAACTAACA-----CAGGG

```

Discusión

Fase 1

Empleando DNAs genómicos extraídos como templado en reacciones de PCR, el propósito de la primera fase del estudio fue evaluar la facilidad de amplificación por PCR, secuenciación, edición, alineación, y niveles de variabilidad de siete regiones del cloroplasto para su uso como códigos de barras, o bien para extender la utilidad del código de barras estándar (i. e. porciones concatenadas de *rbcL* y *matK*) que durante el curso de este proyecto fué seleccionado para plantas terrestres (CBOL Plant Working Group 2009). Lo anterior implica que dos de los marcadores evaluados en este proyecto oficialmente conforman el código de barras para plantas, independientemente de nuestro criterio de evaluación. De cualquier forma, el continuar con la evaluación nos ayudo a escoger los dos marcadores complementarios que planeamos usar en la segunda parte del proyecto.

En cuanto al segundo criterio tomado en cuenta por el CBOL Plant Working Group para su definición de una ‘buena región’ de código de barras genético –esto es, la posibilidad de obtener secuencias bidireccionales con facilidad– nuestros resultados permiten corroborar que *rbcL* representa una ‘buena región’, seguido por *trnH-psbA* y posiblemente *matK*. El problema con *matK* fue evidente en este estudio porque no contamos con primers universales entre coníferas y angiospermas, ni dentro de las coníferas. Considerando la anterior como un primer índice correspondiente al criterio de universalidad (ver introducción y CBOL Plant Working Group 2009, p. 12794), podemos decir que *rbcL* resulto con una mayor universalidad que *matK* para los grupos taxonómicos estudiados en el proyecto. Al incorporar las otras regiones del genoma del cloroplasto seleccionadas en el estudio, (Tabla 1),

observamos que *trnH-psbA*, *trnL-trnF* y *psbK-psbI* pueden ser considerados las siguientes buenas regiones; sin embargo, la mejor región es diferente para cada familia. Así por ejemplo para Agavaceae, Cactaceae y Orchidaceae fue *trnL-trnF* donde se obtuvieron buenas secuencias con longitud adecuada, pero para Crassulaceae fue relativamente mejor *psbK-psbI*.

En cuanto al tercer criterio del CBOL Plant Working Group –capacidad discriminatoria de las regiones ya elegidas en función de universalidad y calidad de las secuencias– la Figura 2 muestra los resultados para los siete marcadores. El muestreo taxonómico en este caso corresponde a la Fase 1 (ver Materiales y Métodos). De inmediato, sobresale el hecho de que Orchidaceae y Pinaceae poseen el mayor número de sitios variables, cuantificados directamente de la alineación. El número de sitios variables en las otras tres familias es más bajo, por lo que se recomienda el uso de otros posibles marcadores.

Fase 2

En la fase 2 se pusieron a prueba los loci seleccionados en especies cercanas de cada una de las familias seleccionadas. Se secuenció cada región en más de un espécimen, en la medida de lo posible. Para ejemplificar los resultados, aquí seguimos la propuesta del estudio de van de Wiel et al. (2009), orientado a distinguir a la especie invasiva *Hydrocotyle ranunculoides* (Araliaceae) de sus parientes cercanos no-invasivos. Según esta propuesta, es posible hacer una estimación inicial de un código de barras para una región génica determinada mediante la selección de los caracteres variables en la alineación (incluyendo sitios con gaps y/o regiones correspondientes a indels).

Para esta fase del proyecto, elegimos *trnH-psbA* para mostrar tres resultados contrastantes, tomados de tres ejemplos de las cinco familias estudiadas, para mostrar la factibilidad de que un determinado locus funcione como fuente confiable de caracteres para un código de barras genético. Además del hecho de que esta región no codificante fue seleccionada en la primera fase del proyecto, éste es el gen que usan van de Wiel y colaboradores (2009). Además, *trnH-psbA* había sido ya propuesto como un candidato fuerte a ser un código de barras estándar en plantas (Kress et al. 2005; Kress y Erickson 2007) y fue conservado como locus complementarios en la propuesta del CBOL Plant Working Group (2009).

Fase 3

Aunque la resolución a nivel de familia fue excelente y los clados recuperados coinciden con la taxonomía aceptada actualmente (Fig. 4), el desempeño del código de barras estándar (*rbcL* y *matK* combinados) para discriminar entre taxa a nivel genérico y específico varió notablemente entre familias (Figs. 5-9). La distinción taxonómica fue particularmente pobre en Agavaceae, donde existe muy poca divergencia genética entre especies y aún dentro de los géneros, resultando en una falta casi completa de resolución el nivel de discriminación aún a nivel genérico. De modo similar, registramos poca variación nucleotídica en Crassulaceae. En Orchidaceae la discriminación a nivel genérico fue buena, aunque los pocos casos en que se contó con más de una muestra de la misma especie limita las interpretaciones posibles sobre el poder discriminatorio a nivel específico de *rbcL-matK* (Fig. 7). La distinción interespecífica fue más eficiente en las Cactaceae, donde más del 70% de las especies de las que se contó con múltiples representantes fue recuperada como monofilética. Nuestros resultados confirman previas indicaciones de que el código de barras estándar puede

funcionar eficientemente en algunos grupos, pero parece inevitable que requerirá la adición de otros marcadores más variables en algunos grupos, cuáles muy probablemente tendrán que ser seleccionados caso por caso (CBOL Plant Working Group 2009).

Recomendaciones

*1. Permitir el uso de uno o dos marcadores suplementarios en conjunto con *rbcL* y *matK*.*

En este estudio de código de barras de plantas mexicanas coincidimos con algunas propuestas previas de que *rbcL* y *matK* pueden ayudar a identificar la mayoría de especies, y que en algunos grupos uno o dos marcadores complementarios pueden ser necesarios (CBOL Plant Working Group 2009). Ya que los marcadores complementarios serían usados conjuntamente con *rbcL* y *matK*, es menos importante que los primeros sean universales--por ejemplo pueden ser espaciadores como *trnH-psbA* o *trnL-trnF* que son útiles para algún grupo específico, o un gen que se piensa que no está presente en todos los clados de plantas (p. ej. *yefI* en *Pinus*). Si se toma en cuenta el costo total de coleccionar un ejemplar, identificarlo, depositarlo en una colección y extraer, amplificar y secuenciar el DNA, agregar uno o dos marcadores al código estándar no representaría duplicar el costo de generar el código de barras para ese ejemplar.

*2. Seguir evaluando el desempeño de *rbcL* y *matK* en comparación con otros marcadores como *trnH-psbA*.*

Es probable que eventualmente se modifique el código de barra estándar para plantas con base en resultados experimentales de muchos estudios.

3. Promover el resguardo de DNA genómico.

El desarrollo continuo de mejores marcadores y técnicas de secuenciación más eficientes permitirán una mejor discriminación de las especies en el futuro cercano. Al resguardar permanentemente los mismos DNAs genómicos usados para códigos de barras de *rbcL* y *matK* habrá ahorros sustanciales de recursos al no tener que recolectarse el material de nuevo en el campo.

4. Promover el muestreo de múltiples individuos por especie.

En este estudio confirmamos que hay diversidad nucleotídica entre especies, pero aún no contamos con una buena estimación de la variación intraespecífica de muchas especies que en tienen secuencias compartidas con otras especies.

Trabajo futuro

Para los dos marcadores que faltan escoger, pondremos énfasis en espaciadores intergénicos que amplifiquen en todos los grupos y que tengan entre 400 y 800 pb de longitud. Estos espaciadores deben presentar un nivel de variación parecida o superior a la que observamos en *matK*. De los cinco espaciadores que estamos evaluando, dos (*trnH-psbA* y *trnS-trnG*) han sido descartados porque no amplifican en todas las familias (Tabla 1), además de que *trnH-psbA* es muy corto (menos de 400 pb en promedio) en Cactaceae y Crassulaceae.

Los marcadores que aún están en proceso de evaluación son *trnL-trnF*, *rpl32-trnL* (Tablas 2 y 3) y en lugar de una tercera región codificante (como se había propuesto en el proyecto original) exploraremos el espaciador *psbK-psbI*. Este último ha mostrado poder resolutivo en estudios preliminares en cycadas mexicanas (Nicolalde Morejón et al.,

sometido).

Agradecimientos

Se agradece a José Linares, Robert L. Dressler, Rodolfo Solano, Eric Hágsater, Rolando Jiménez, Daniel Piñero, Omar Burge y Pedro Peña Garcillán por proporcionar material para este estudio, Sergio Hernández León por su asistencia en el laboratorio, Omar González por su ayuda en la obtención de material e información de la Colección de Crasuláceas del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM; a los Curadores de AMO y MEXU por permitir el muestreo supervisado de material de herbario para extracción de DNA y a Javier Caballero, Jefe del Jardín Botánico por permitir la toma de muestras de las colecciones vivas.

Literatura citada

Bellstedt, D. U., Linder, H.P., Harley, E. 2001. Phylogenetic relationships in *Disa* based on non-coding trnL-trnF chloroplast sequences: evidence of numerous repeat regions. *American Journal of Botany* 88: 2088–2100.

Butterworth, C., J. H. Cota y R. S. Wallace. 2002. Molecular systematics of tribe Cactaceae (Cactaceae: Cactoideae): a phylogeny based on *rpl16* intron sequence variation. *Systematic Botany* 27: 257-270.

CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 12794-12797.

Doyle, J.J., Doyle, J.J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M., Barrett, S.C.H. 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3(7): e2802.

Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R., Burgess, K.S., Percy, D.M., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Newmaster, S.G., Hajibabaei, M., Husband, B.C. 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources* 9 (Supplement 1), 130-139.

Ford, C.S, Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Van Alphen Stahl, J., Kelly, L.J., Wikstroem, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R., Hoot, S.B. , Cowan, R.S. , Chase, M.W., Wilkinson, M.J. 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 1-11.

Gernandt, D.S., Liston, A., Piñero, D. 2003. Phylogenetics of *Pinus* subsections *Cembroides* and *Nelsoniae* inferred from cpDNA sequences. *Systematic Botany* 28: 657-673.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B (Supplement)* 270, S96-S99.
- Hebert P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2: 1657-1663.
- Katoh, K., Asimenos, G. Toh, H. 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. Pp. 39-54 in: D. Posada (ed.), *Bioinformatics for DNA sequence analysis. Methods in Molecular Biology* 537. Humana Press.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 8369-8374.
- Kress, W.J., Erickson, D.L. 2008. DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 2761-2762
- Maddison, W.F., Maddison, D.R. 2009. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Ver. 2.72. <http://mesquiteproject.org>.
- Nicolalde-Morejón, F., Vergara-Silva, F., González-Astorga, J., Stevenson, D.W., Vovides, A.P., Sosa, V.. 2010. A character-based approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combinations for DNA barcoding. *Cladistics*. En prensa.
- Rambaut, A. 2009. FigTree. Tree figure drawing tool. Ver. 1.3.0. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Salazar, G.A. 2009. DNA, morphology, and systematics of *Galeoglossum* (Orchidaceae, Cranichidinae). Pp. 161-172 en A. Pridgeon (ed.), *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*. Universidad Técnica Particular de Loja, Loja, Ecuador.
- Salazar, G.A., L.I. Cabrera, S. Madriñán y M.W. Chase. 2009. Phylogenetic relationships of Cranichidinae and Prescottiinae (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 104: 403-416.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario

Oficial de la Federación, marzo de 2002.

Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). ver. 4.0 beta 10. Sunderland, Sinauer Associates.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.

Van de Wiel C.C.M., van der Schoot, J., van Valkenburg, J.L.C.H., Diustermaat, H., Smulders, M.J.M. 2009. DNA barcoding discriminates the noxious invasive plant species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides* L.f.), from non-invasive relatives. *Molecular Ecology Resources* 9: 1086-1091.

Wang, X.-R., Tsumura, Y. Yoshimaru, H., Nagasaka, K., Szmidt, A.E. 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl30-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. *American Journal of Botany* 86:1742-1753.

Figura 1. Longitud de las secuencias provenientes de cada marcador en la fase 1. Secuencias más largas que 700-800 p.b. generalmente no fueron ensambladas con 100% de cobertura en las dos direcciones.

Figura 2. El número de sitios variables para los marcadores *rbcL*, *matK*, y *trnH-psbA* en la fase 1 (cinco taxa por grupo).

Figura. 3. Discriminación de especies estrechamente emparentadas mediante análisis de parsimonia.

Figura 4. Análisis de parsimonia de la matriz combinada de *rbcL* y *matK* para los ejemplares secuenciados para este proyecto. A. Filograma (la longitud de la rama es proporcional al número de cambios).B. Árbol de consenso estricto en el que se indican los cinco taxa superiores analizados.

Figura 5. Porción del árbol de la Figura 4 referente a las coníferas. A. Filograma (la longitud de la rama es proporcional al número de cambios).B. Árbol de consenso estricto.

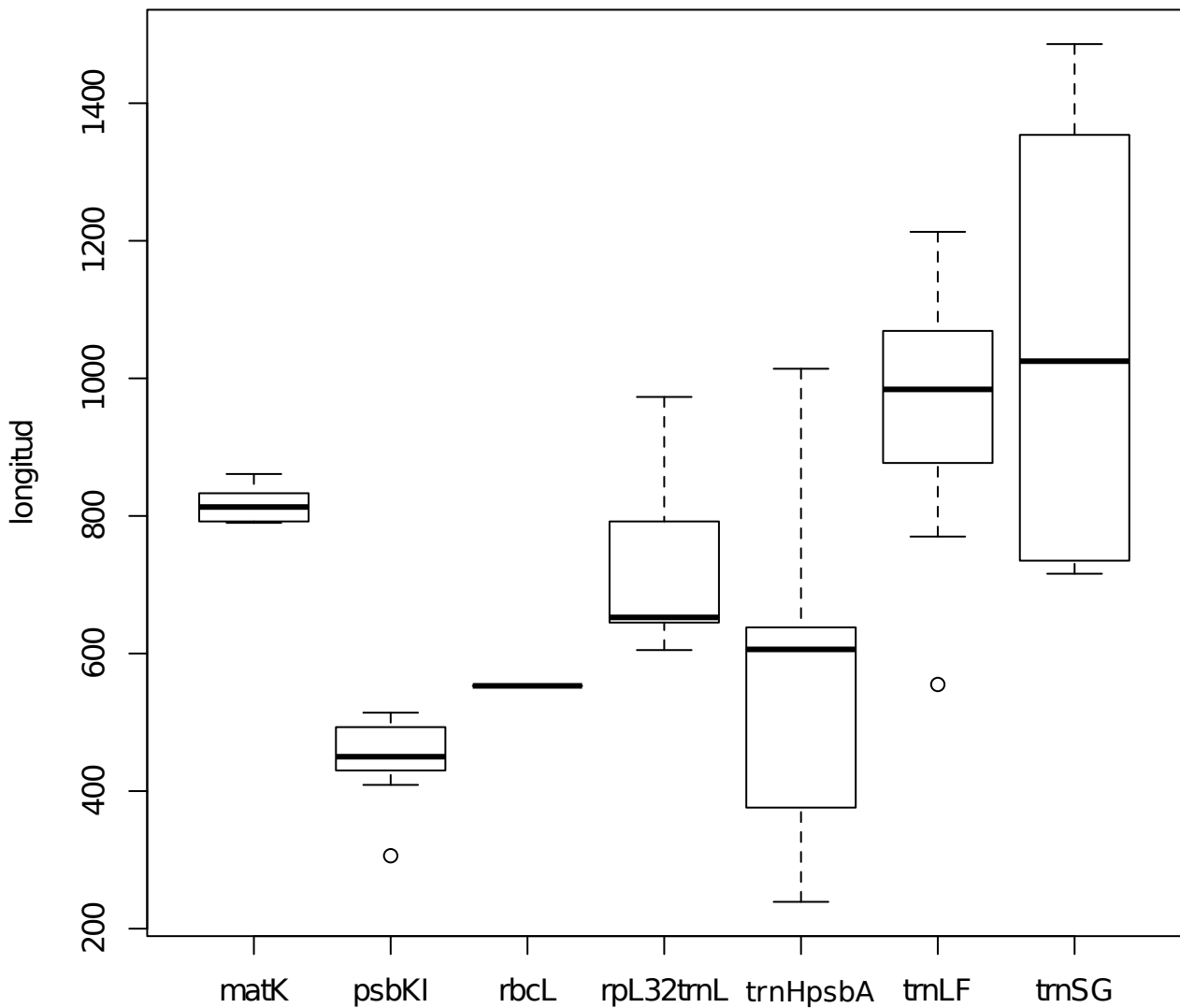
Figura 6. Porción del árbol de la Figura 4 referente a las Agavaceae. A. Filograma (la longitud de la rama es proporcional al número de cambios).B. Árbol de consenso estricto.

Figura 7. Porción del árbol de la Figura 4 referente a las Orchidaceae. A. Filograma (la longitud de la rama es proporcional al número de cambios).B. Árbol de consenso estricto.

Figura 8. Porción del árbol de la Figura 4 referente a las Crassulaceae. A. Filograma (la longitud de la rama es proporcional al número de cambios).B. Árbol de consenso estricto.

Figura 9. Porción del árbol de la Figura 4 referente a las Cactaceae. A. Filograma (la longitud de la rama es proporcional al número de cambios).B. Árbol de consenso estricto.

Figura 10. Mapa de distribución de los ejemplares secuenciados para el proyecto en BOLD 2.5.





Five critical groups of the Mexican flora [ACCCO]

[QuickMap](#) | [Multi-Layer Map](#) | [Google Earth](#)

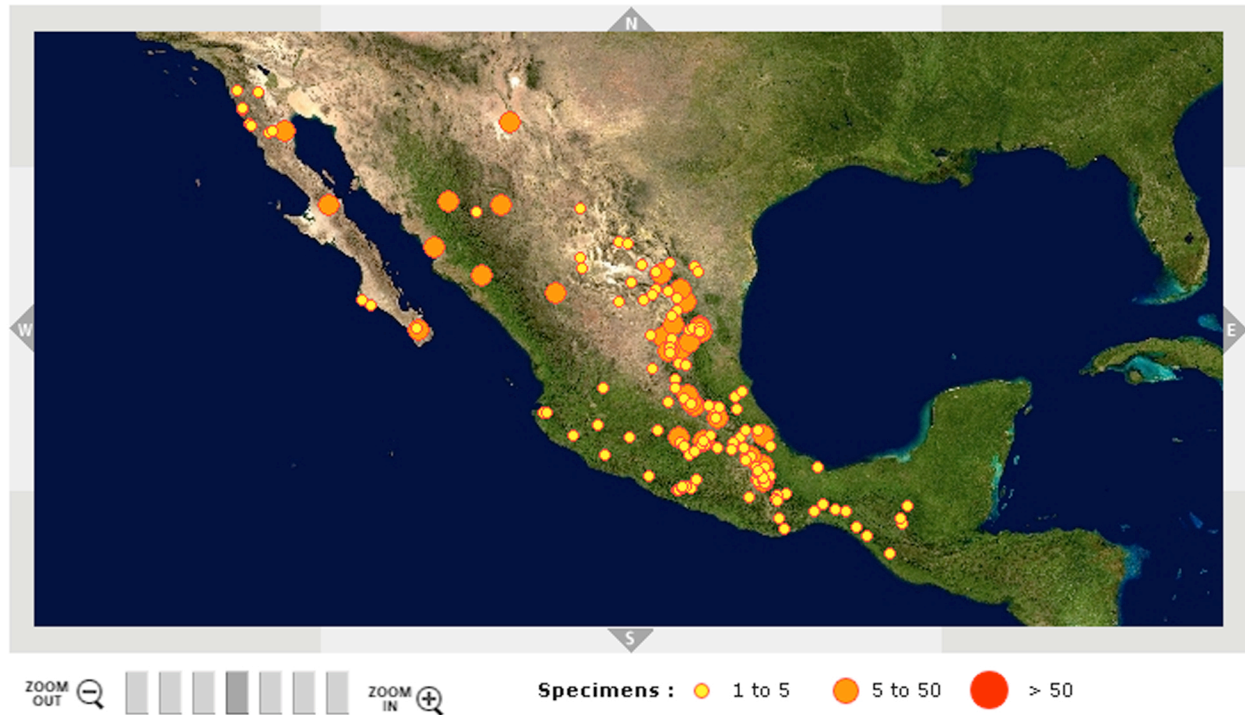
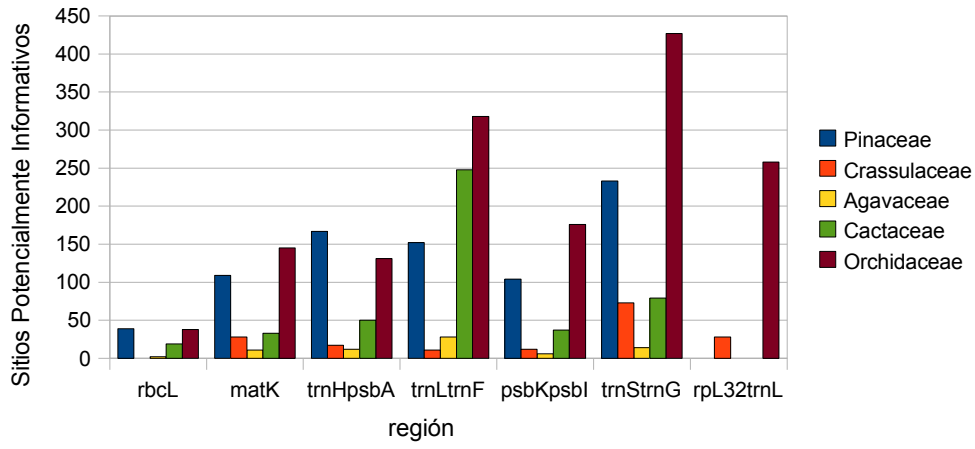


Figura 2

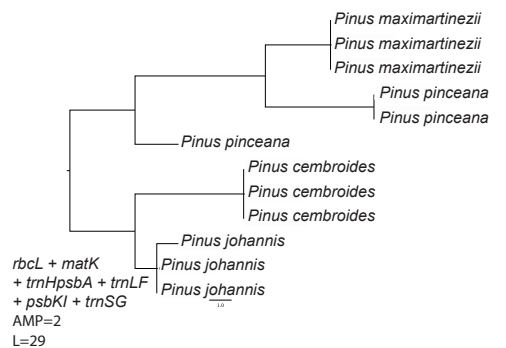
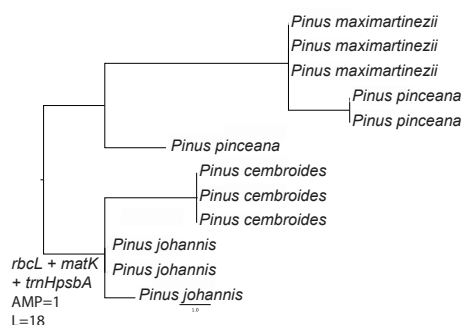
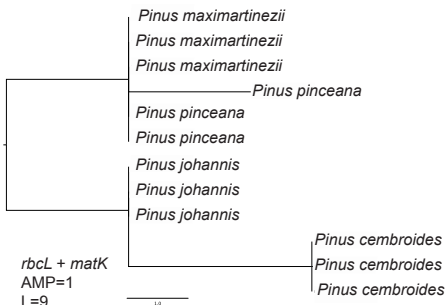
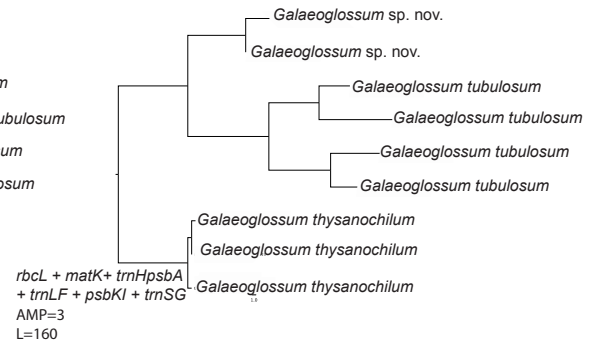
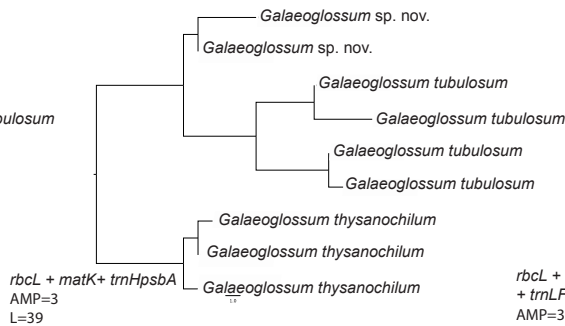
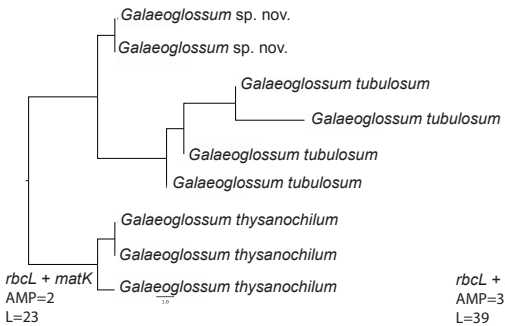
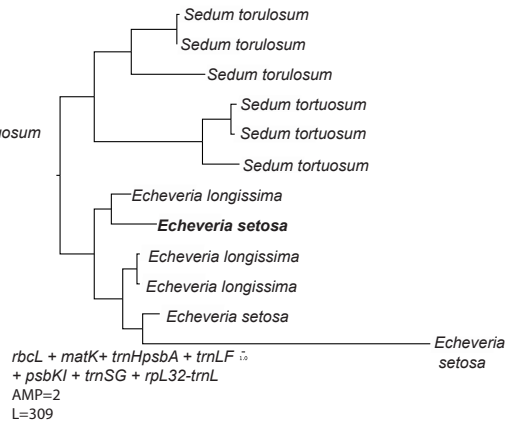
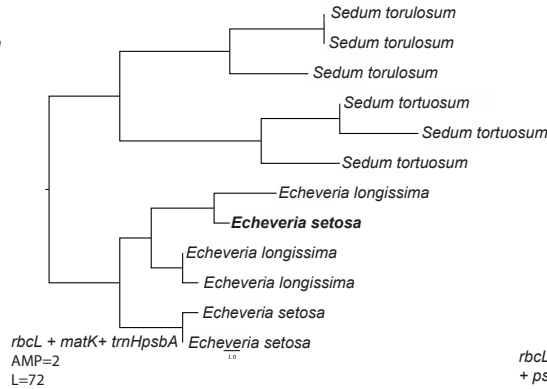
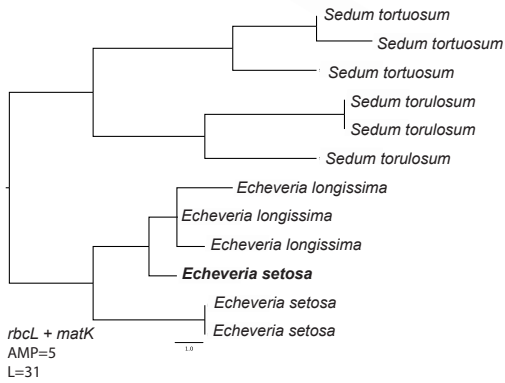
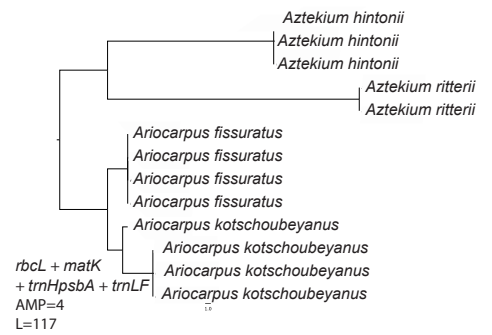
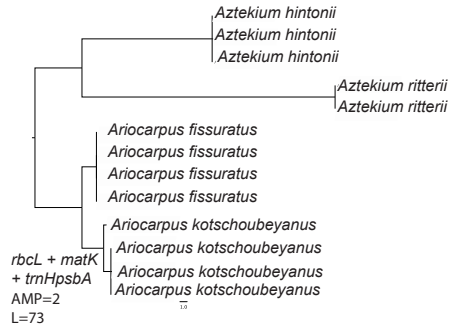
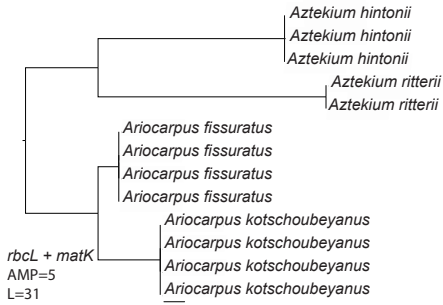
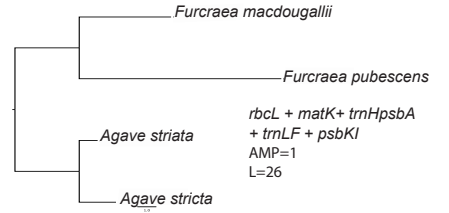
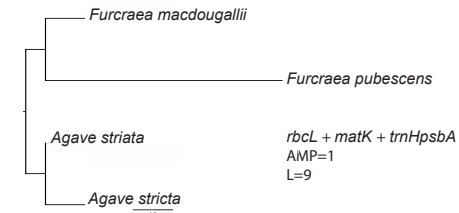
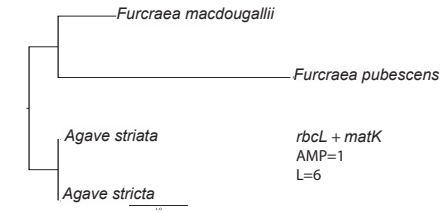
Sitios Variables Por Region

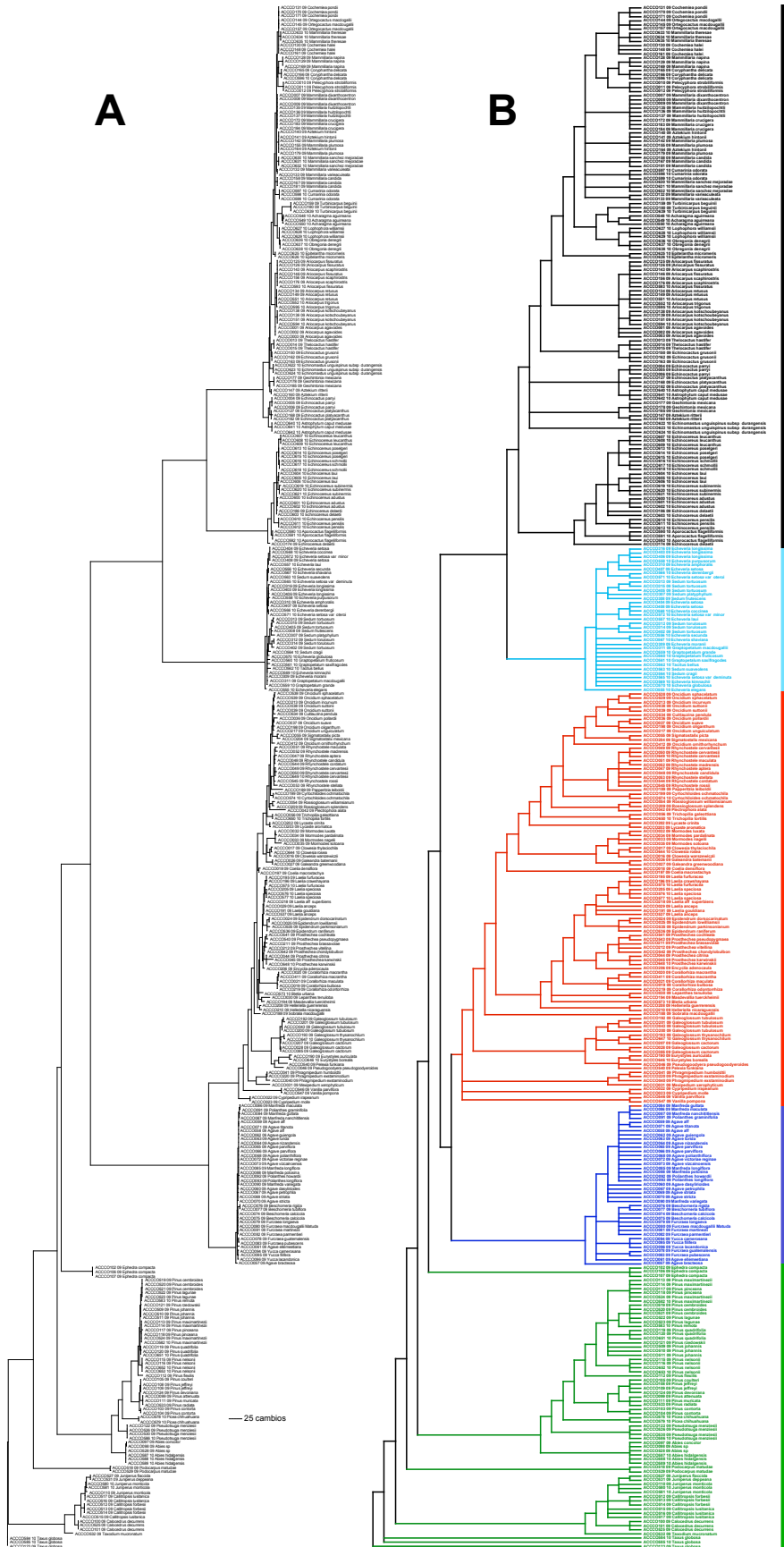


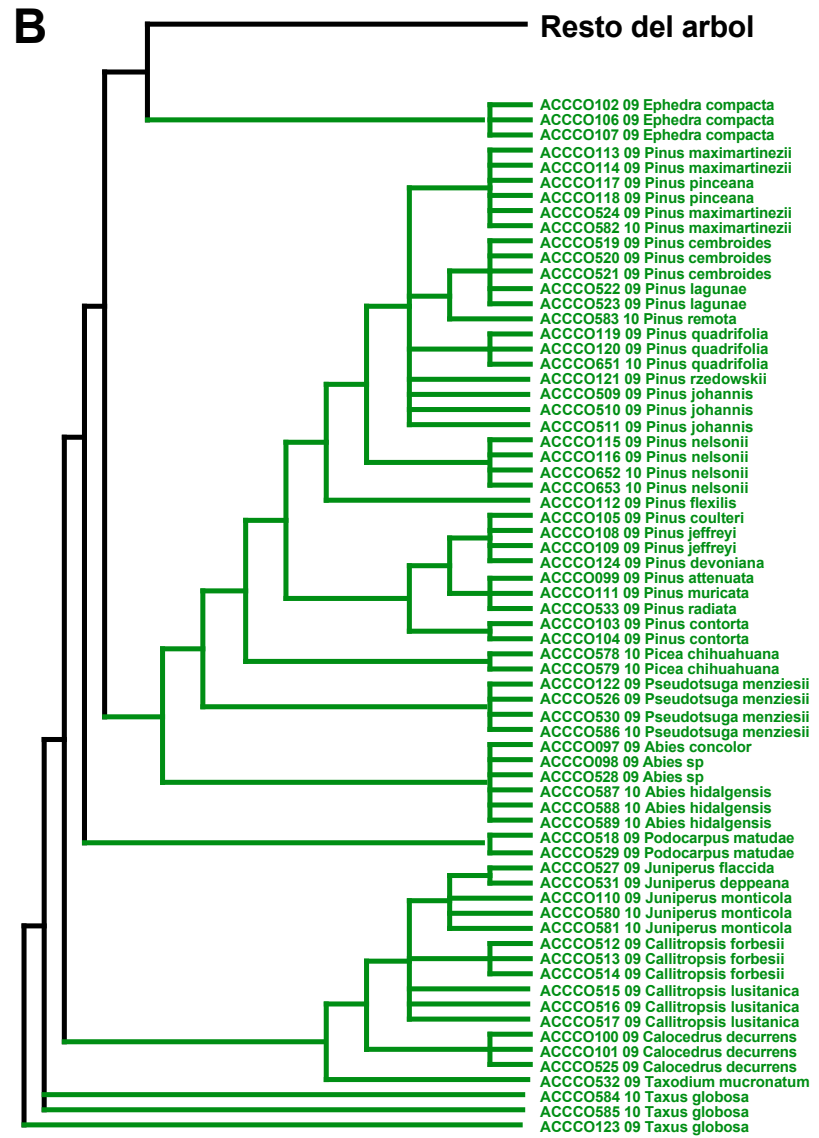
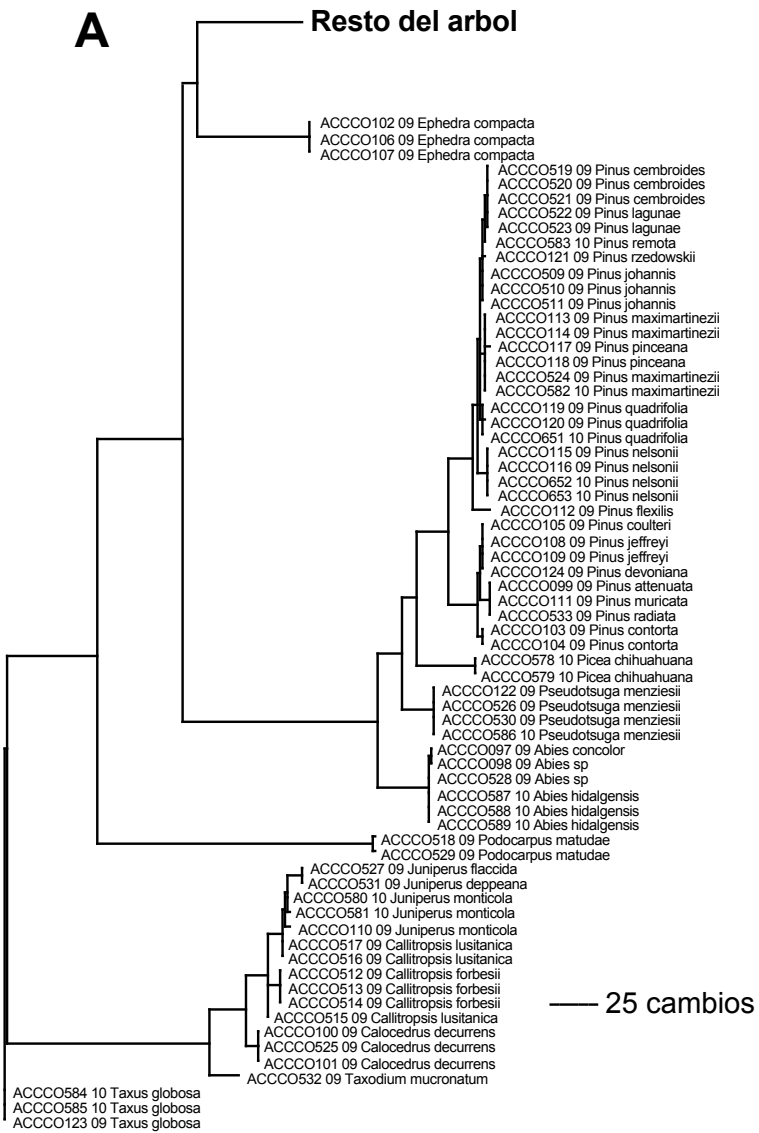
rbcl + matK

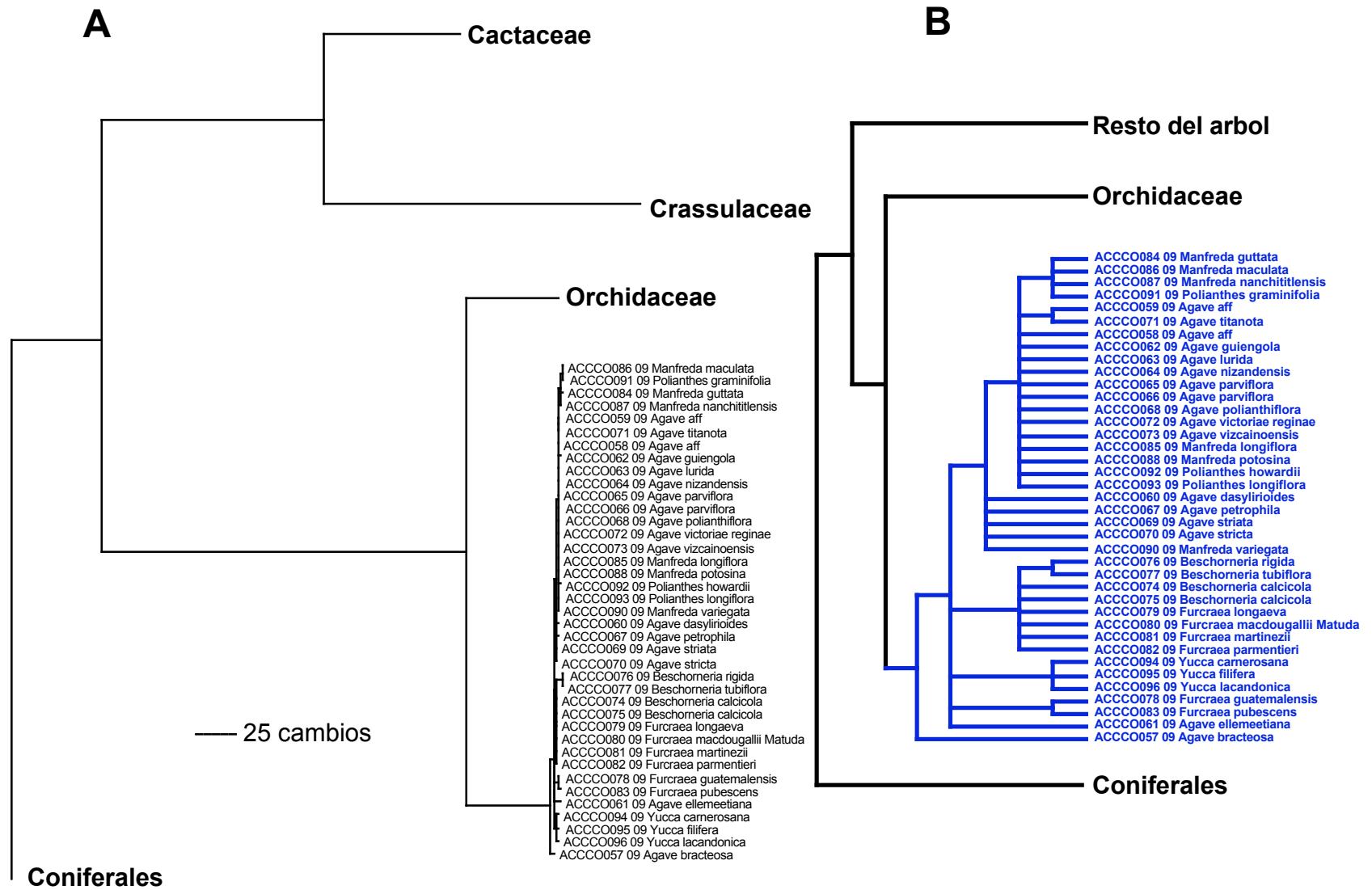
rbcl + matK + trnH-psbA

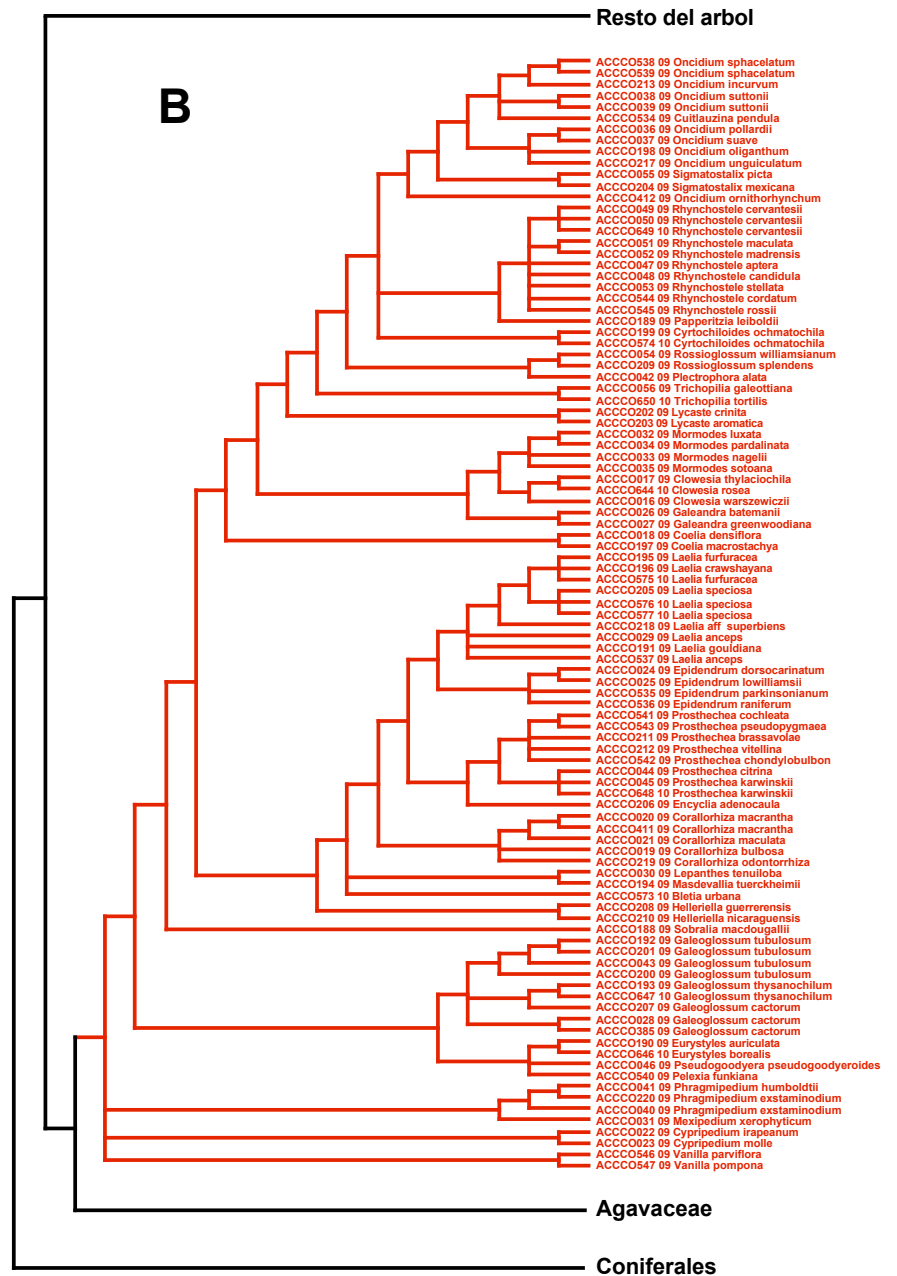
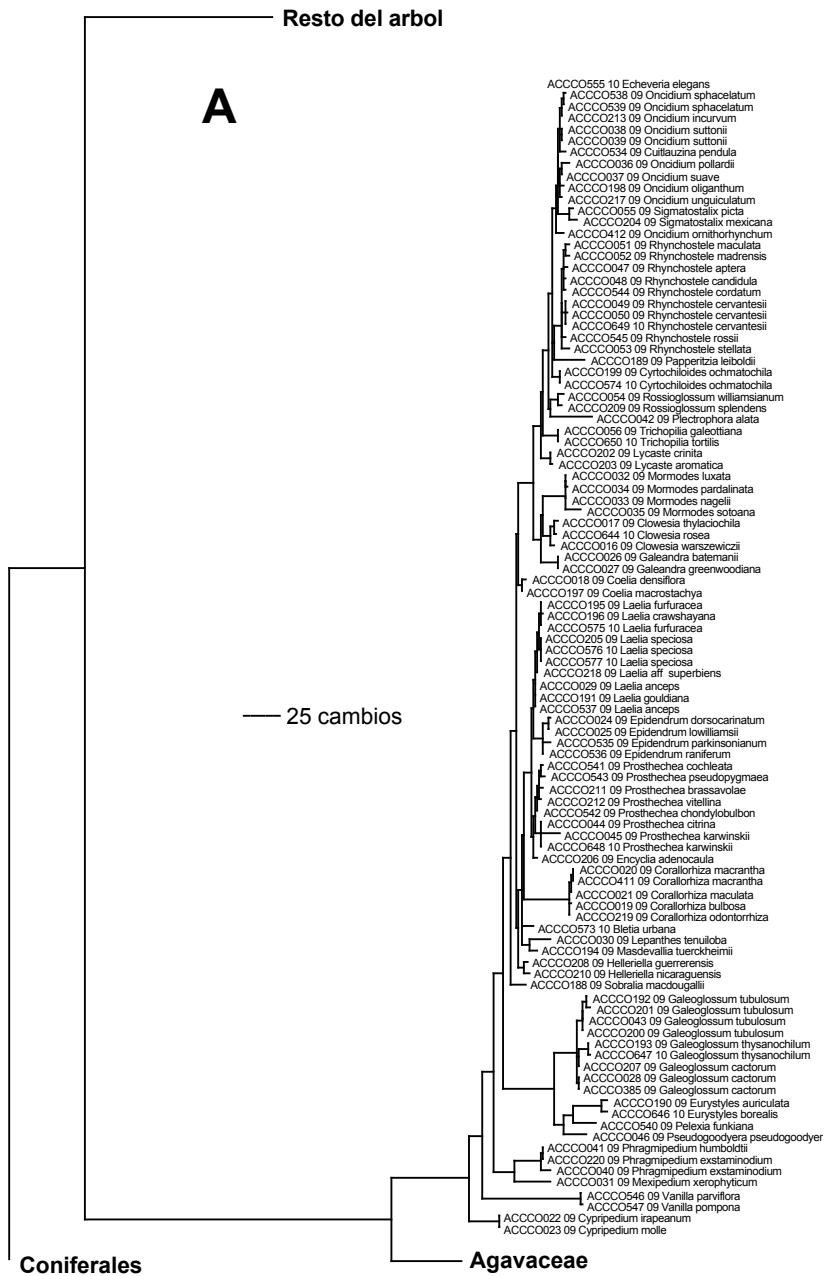
> 3 marcadores

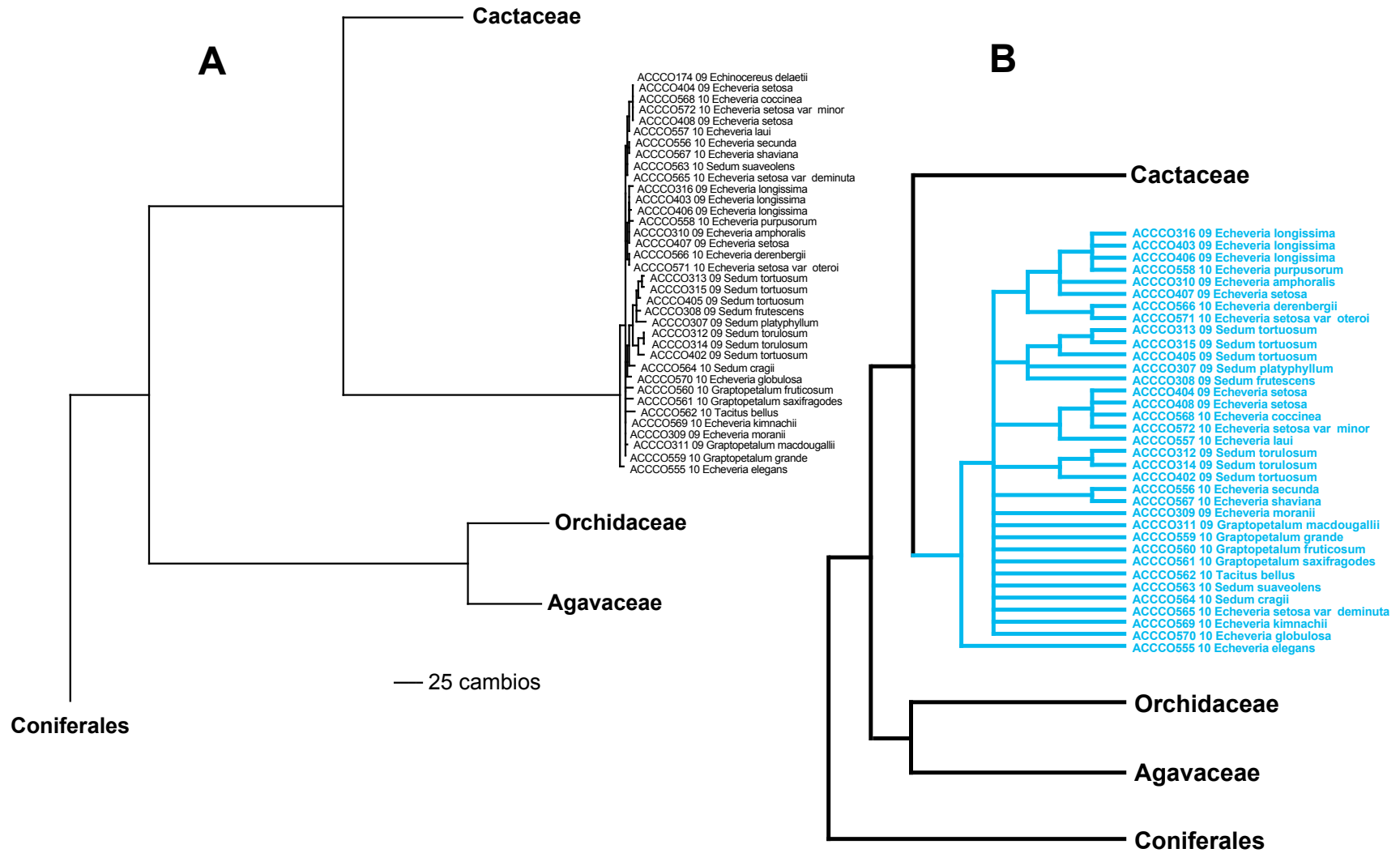


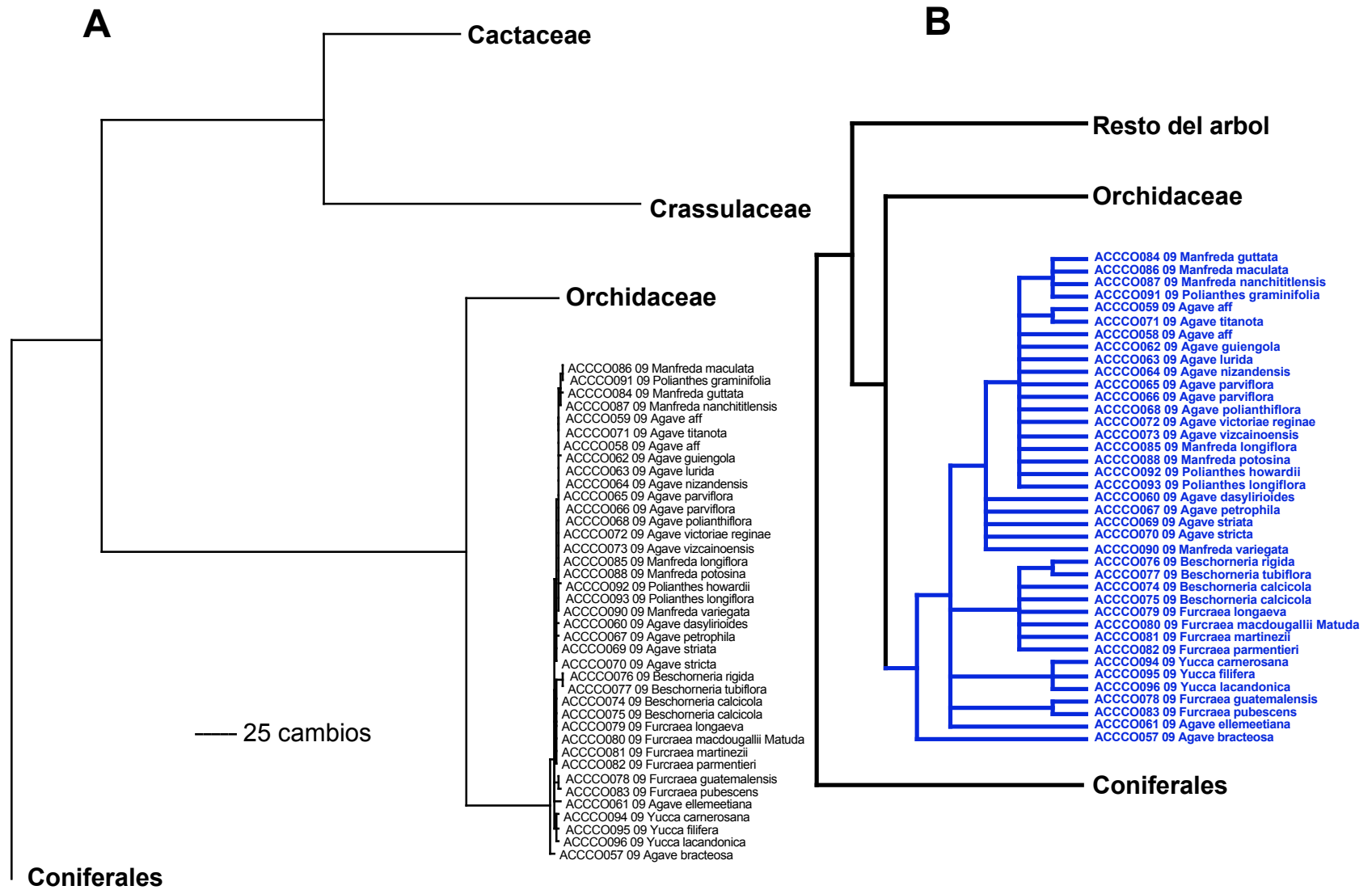


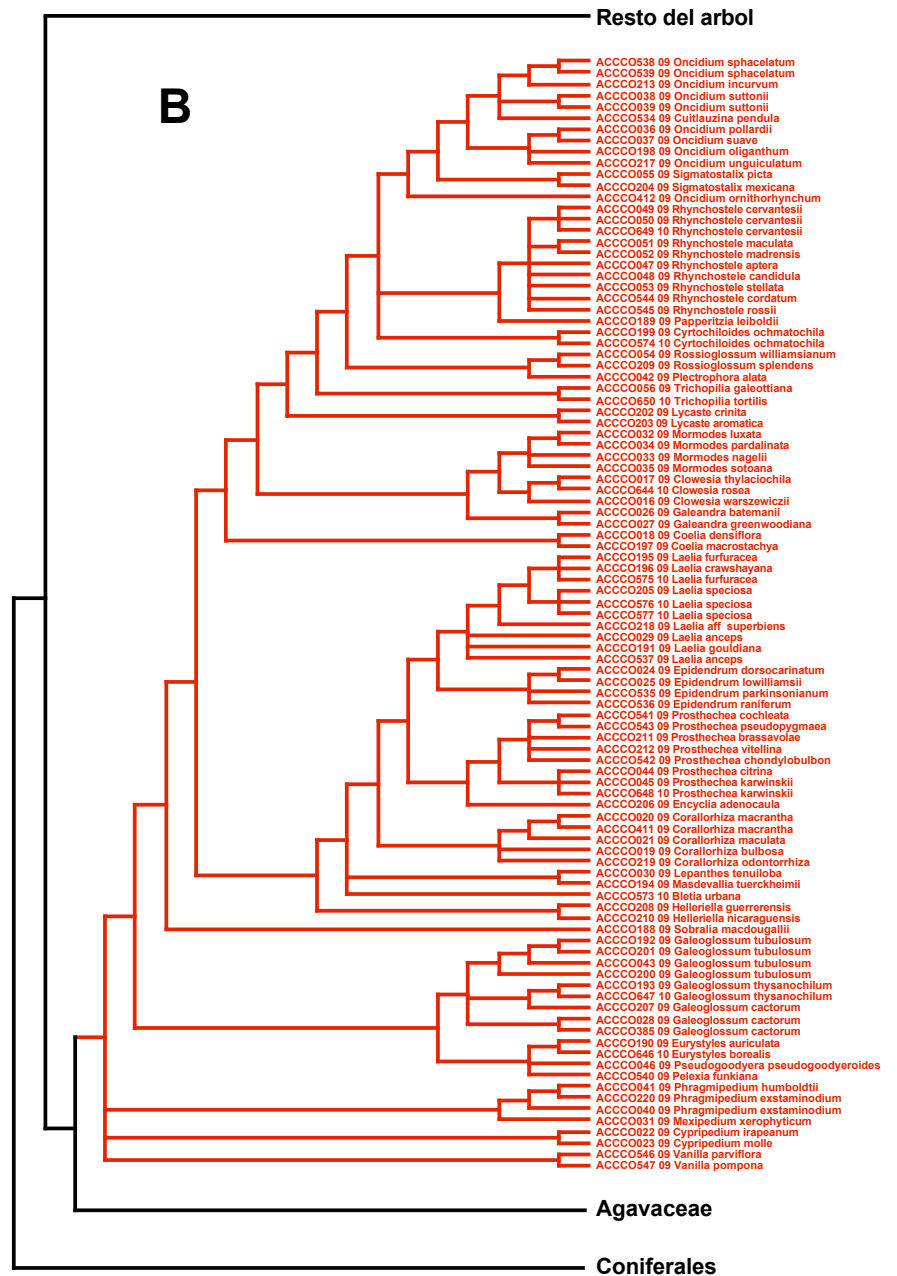
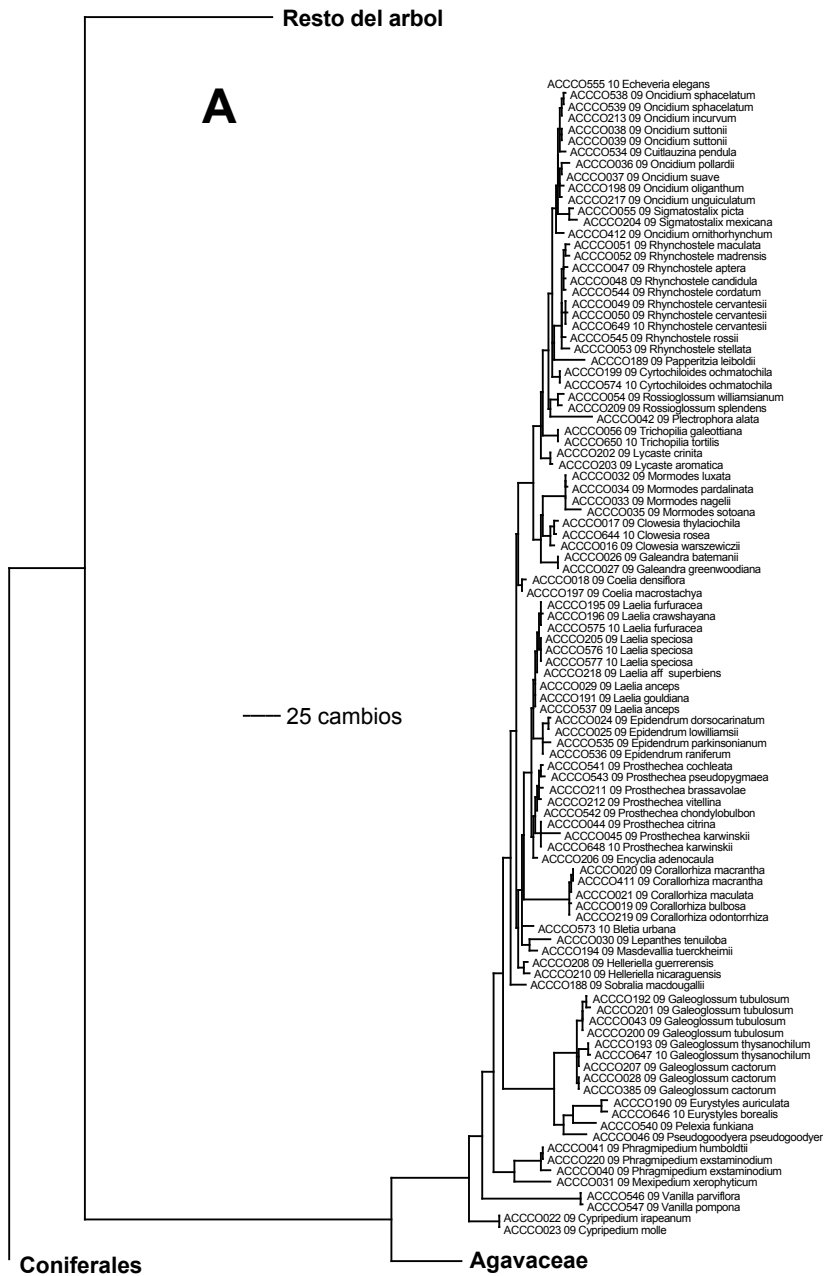


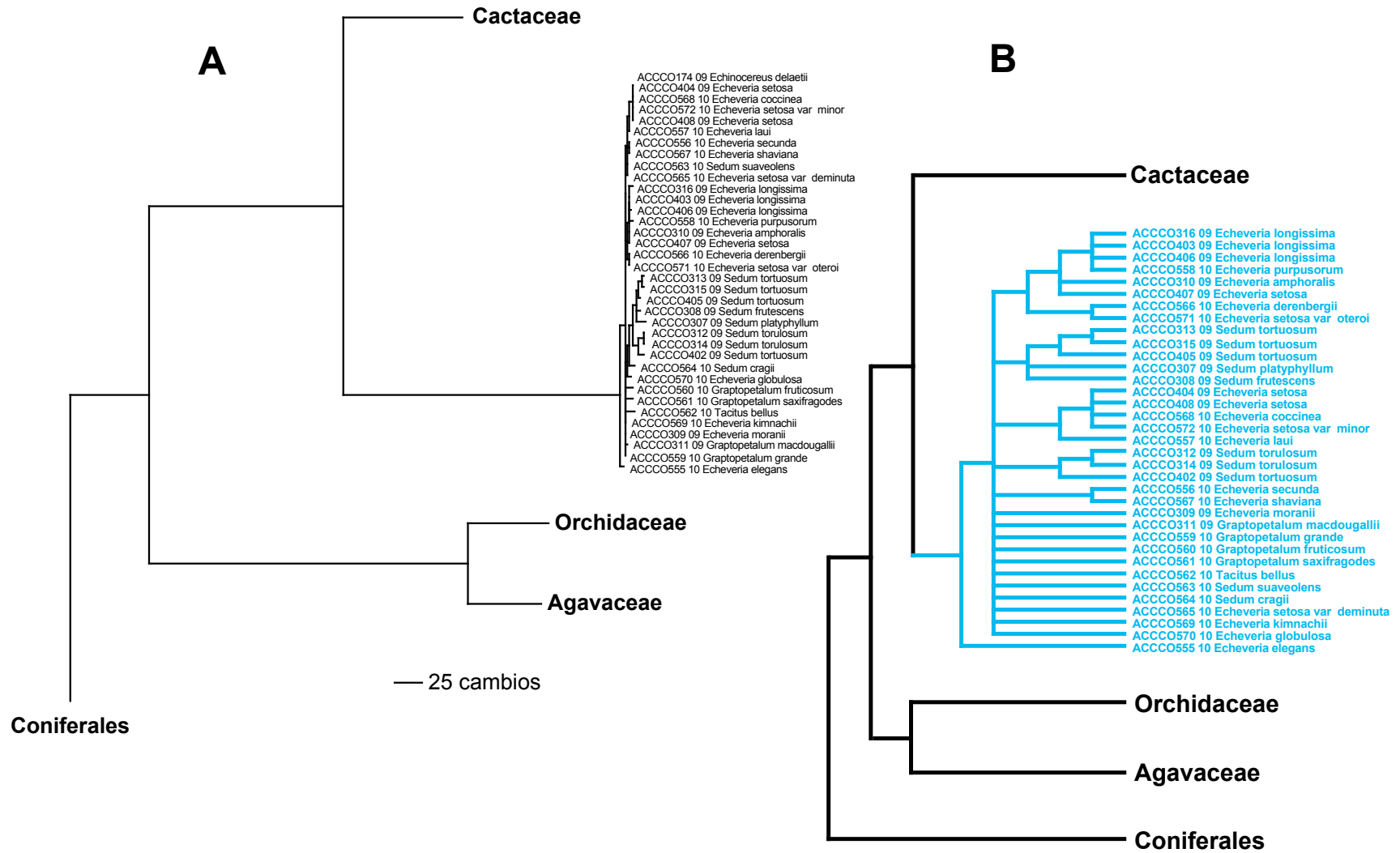












A

B



Resto del arbol

Resto del arbol

ACCCO131 09 Cochemia pondii
 ACCCO170 09 Cochemia pondii
 ACCCO171 09 Cochemia pondii
 ACCCO144 09 Ortegocactus macdougallii
 ACCCO145 09 Ortegocactus macdougallii
 ACCCO157 09 Ortegocactus macdougallii
 ACCCO633 10 Mammillaria theresae
 ACCCO634 10 Mammillaria theresae
 ACCCO635 10 Mammillaria theresae
 ACCCO130 09 Cochemia halei
 ACCCO148 09 Cochemia halei
 ACCCO161 09 Cochemia halei
 ACCCO128 09 Mammillaria napina
 ACCCO129 09 Mammillaria napina
 ACCCO169 09 Mammillaria napina
 ACCCO165 09 Coryphantha delicata
 ACCCO166 09 Coryphantha delicata
 ACCCO598 10 Coryphantha delicata
 ACCCO011 09 Pelecyphora strobiliformis
 ACCCO012 09 Pelecyphora strobiliformis
 ACCCO007 09 Mammillaria dixanthocentron
 ACCCO008 09 Mammillaria dixanthocentron
 ACCCO009 09 Mammillaria dixanthocentron
 ACCCO135 09 Mammillaria hutzilopochtli
 ACCCO136 09 Mammillaria hutzilopochtli
 ACCCO137 09 Mammillaria hutzilopochtli
 ACCCO172 09 Mammillaria crucigera
 ACCCO183 09 Mammillaria crucigera
 ACCCO184 09 Mammillaria crucigera
 ACCCO140 09 Aztekium hintonii
 ACCCO141 09 Aztekium hintonii
 ACCCO142 09 Mammillaria plumosa
 ACCCO155 09 Mammillaria plumosa
 ACCCO164 09 Aztekium hintonii
 ACCCO179 09 Mammillaria plumosa
 ACCCO630 10 Mammillaria sanchez mejoradae
 ACCCO631 10 Mammillaria sanchez mejoradae
 ACCCO632 10 Mammillaria sanchez mejoradae
 ACCCO132 09 Mammillaria varioculeata
 ACCCO133 09 Mammillaria varioculeata
 ACCCO158 09 Mammillaria candida
 ACCCO167 09 Mammillaria candida
 ACCCO191 09 Mammillaria candida
 ACCCO697 10 Cumarina odorata
 ACCCO598 10 Cumarina odorata
 ACCCO599 10 Cumarina odorata
 ACCCO159 09 Turbinicarpus begunii
 ACCCO180 09 Turbinicarpus begunii
 ACCCO639 10 Turbinicarpus begunii
 ACCCO548 10 Acharagma aguirreana
 ACCCO549 10 Acharagma aguirreana
 ACCCO550 10 Acharagma aguirreana
 ACCCO627 10 Lophophora williamsii
 ACCCO628 10 Lophophora williamsii
 ACCCO629 10 Lophophora williamsii
 ACCCO636 10 Obregonia denegrii
 ACCCO637 10 Obregonia denegrii
 ACCCO638 10 Obregonia denegrii
 ACCCO625 10 Epitelantha micromeris
 ACCCO626 10 Epitelantha micromeris
 ACCCO125 09 Ariocarpus fissuratus
 ACCCO126 09 Ariocarpus fissuratus
 ACCCO143 09 Ariocarpus scaphrostris
 ACCCO146 09 Ariocarpus fissuratus
 ACCCO156 09 Ariocarpus scaphrostris
 ACCCO178 09 Ariocarpus scaphrostris
 ACCCO593 10 Ariocarpus fissuratus
 ACCCO134 09 Ariocarpus retusus
 ACCCO149 09 Ariocarpus retusus
 ACCCO551 10 Ariocarpus retusus
 ACCCO552 10 Ariocarpus trigonus
 ACCCO596 10 Ariocarpus trigonus
 ACCCO138 09 Ariocarpus kotschoubeyanus
 ACCCO139 09 Ariocarpus kotschoubeyanus
 ACCCO151 09 Ariocarpus kotschoubeyanus
 ACCCO594 10 Ariocarpus kotschoubeyanus
 ACCCO001 09 Ariocarpus agavoides
 ACCCO002 09 Ariocarpus agavoides
 ACCCO003 09 Ariocarpus agavoides
 ACCCO013 09 Thelocactus hastifer
 ACCCO014 09 Thelocactus hastifer
 ACCCO015 09 Thelocactus hastifer
 ACCCO150 09 Echinocactus grusonii
 ACCCO162 09 Echinocactus grusonii
 ACCCO163 09 Echinocactus grusonii
 ACCCO622 10 Echinomastus unguispinus subsp du
 ACCCO623 10 Echinomastus unguispinus subsp du
 ACCCO624 10 Echinomastus unguispinus subsp du
 ACCCO177 09 Geohintonia mexicana
 ACCCO178 09 Geohintonia mexicana
 ACCCO185 09 Geohintonia mexicana
 ACCCO147 09 Aztekium ritteri
 ACCCO160 09 Aztekium ritteri
 ACCCO004 09 Echinocactus parryi
 ACCCO005 09 Echinocactus parryi
 ACCCO006 09 Echinocactus parryi
 ACCCO127 09 Echinocactus platyacanthus
 ACCCO188 09 Echinocactus platyacanthus
 ACCCO182 09 Echinocactus platyacanthus
 ACCCO640 10 Astrophytum capui medusae
 ACCCO641 10 Astrophytum capui medusae
 ACCCO642 10 Astrophytum capui medusae
 ACCCO607 10 Echinocereus leucanthus
 ACCCO608 10 Echinocereus leucanthus
 ACCCO609 10 Echinocereus leucanthus
 ACCCO613 10 Echinocereus poselgeri
 ACCCO614 10 Echinocereus poselgeri
 ACCCO615 10 Echinocereus poselgeri
 ACCCO616 10 Echinocereus schmollii
 ACCCO617 10 Echinocereus schmollii
 ACCCO618 10 Echinocereus schmollii
 ACCCO604 10 Echinocereus laui
 ACCCO605 10 Echinocereus laui
 ACCCO606 10 Echinocereus laui
 ACCCO619 10 Echinocereus subinermis
 ACCCO620 10 Echinocereus subinermis
 ACCCO621 10 Echinocereus subinermis
 ACCCO601 10 Echinocereus adustus
 ACCCO602 10 Echinocereus adustus
 ACCCO186 09 Echinocereus delateti
 ACCCO603 10 Echinocereus delateti
 ACCCO610 10 Echinocereus pensilis
 ACCCO611 10 Echinocereus pensilis
 ACCCO612 10 Echinocereus pensilis
 ACCCO590 10 Aporocactus flagelliformis
 ACCCO591 10 Aporocactus flagelliformis
 ACCCO592 10 Aporocactus flagelliformis
 ACCCO174 09 Echinocereus delateti

ACCCO131 09 Cochemia pondii
 ACCCO170 09 Cochemia pondii
 ACCCO171 09 Cochemia pondii
 ACCCO144 09 Ortegocactus macdougallii
 ACCCO145 09 Ortegocactus macdougallii
 ACCCO157 09 Ortegocactus macdougallii
 ACCCO633 10 Mammillaria theresae
 ACCCO634 10 Mammillaria theresae
 ACCCO635 10 Mammillaria theresae
 ACCCO130 09 Cochemia halei
 ACCCO148 09 Cochemia halei
 ACCCO161 09 Cochemia halei
 ACCCO128 09 Mammillaria napina
 ACCCO129 09 Mammillaria napina
 ACCCO169 09 Mammillaria napina
 ACCCO165 09 Coryphantha delicata
 ACCCO166 09 Coryphantha delicata
 ACCCO598 10 Coryphantha delicata
 ACCCO011 09 Pelecyphora strobiliformis
 ACCCO012 09 Pelecyphora strobiliformis
 ACCCO007 09 Mammillaria dixanthocentron
 ACCCO008 09 Mammillaria dixanthocentron
 ACCCO009 09 Mammillaria dixanthocentron
 ACCCO135 09 Mammillaria hutzilopochtli
 ACCCO136 09 Mammillaria hutzilopochtli
 ACCCO137 09 Mammillaria hutzilopochtli
 ACCCO172 09 Mammillaria crucigera
 ACCCO183 09 Mammillaria crucigera
 ACCCO184 09 Mammillaria crucigera
 ACCCO140 09 Aztekium hintonii
 ACCCO141 09 Aztekium hintonii
 ACCCO142 09 Mammillaria plumosa
 ACCCO155 09 Mammillaria plumosa
 ACCCO164 09 Aztekium hintonii
 ACCCO179 09 Mammillaria plumosa
 ACCCO630 10 Mammillaria sanchez mejoradae
 ACCCO631 10 Mammillaria sanchez mejoradae
 ACCCO632 10 Mammillaria sanchez mejoradae
 ACCCO132 09 Mammillaria varioculeata
 ACCCO133 09 Mammillaria varioculeata
 ACCCO158 09 Mammillaria candida
 ACCCO167 09 Mammillaria candida
 ACCCO191 09 Mammillaria candida
 ACCCO697 10 Cumarina odorata
 ACCCO598 10 Cumarina odorata
 ACCCO599 10 Cumarina odorata
 ACCCO159 09 Turbinicarpus begunii
 ACCCO180 09 Turbinicarpus begunii
 ACCCO639 10 Turbinicarpus begunii
 ACCCO548 10 Acharagma aguirreana
 ACCCO549 10 Acharagma aguirreana
 ACCCO550 10 Acharagma aguirreana
 ACCCO627 10 Lophophora williamsii
 ACCCO628 10 Lophophora williamsii
 ACCCO629 10 Lophophora williamsii
 ACCCO636 10 Obregonia denegrii
 ACCCO637 10 Obregonia denegrii
 ACCCO638 10 Obregonia denegrii
 ACCCO625 10 Epitelantha micromeris
 ACCCO626 10 Epitelantha micromeris
 ACCCO125 09 Ariocarpus fissuratus
 ACCCO126 09 Ariocarpus fissuratus
 ACCCO143 09 Ariocarpus scaphrostris
 ACCCO146 09 Ariocarpus fissuratus
 ACCCO156 09 Ariocarpus scaphrostris
 ACCCO178 09 Ariocarpus scaphrostris
 ACCCO593 10 Ariocarpus fissuratus
 ACCCO134 09 Ariocarpus retusus
 ACCCO149 09 Ariocarpus retusus
 ACCCO551 10 Ariocarpus retusus
 ACCCO552 10 Ariocarpus trigonus
 ACCCO596 10 Ariocarpus trigonus
 ACCCO138 09 Ariocarpus kotschoubeyanus
 ACCCO139 09 Ariocarpus kotschoubeyanus
 ACCCO151 09 Ariocarpus kotschoubeyanus
 ACCCO594 10 Ariocarpus kotschoubeyanus
 ACCCO001 09 Ariocarpus agavoides
 ACCCO002 09 Ariocarpus agavoides
 ACCCO003 09 Ariocarpus agavoides
 ACCCO013 09 Thelocactus hastifer
 ACCCO014 09 Thelocactus hastifer
 ACCCO015 09 Thelocactus hastifer
 ACCCO150 09 Echinocactus grusonii
 ACCCO162 09 Echinocactus grusonii
 ACCCO163 09 Echinocactus grusonii
 ACCCO622 10 Echinomastus unguispinus subsp du
 ACCCO623 10 Echinomastus unguispinus subsp du
 ACCCO624 10 Echinomastus unguispinus subsp du
 ACCCO177 09 Geohintonia mexicana
 ACCCO178 09 Geohintonia mexicana
 ACCCO185 09 Geohintonia mexicana
 ACCCO147 09 Aztekium ritteri
 ACCCO160 09 Aztekium ritteri
 ACCCO004 09 Echinocactus parryi
 ACCCO005 09 Echinocactus parryi
 ACCCO006 09 Echinocactus parryi
 ACCCO127 09 Echinocactus platyacanthus
 ACCCO188 09 Echinocactus platyacanthus
 ACCCO182 09 Echinocactus platyacanthus
 ACCCO640 10 Astrophytum capui medusae
 ACCCO641 10 Astrophytum capui medusae
 ACCCO642 10 Astrophytum capui medusae
 ACCCO607 10 Echinocereus leucanthus
 ACCCO608 10 Echinocereus leucanthus
 ACCCO609 10 Echinocereus leucanthus
 ACCCO613 10 Echinocereus poselgeri
 ACCCO614 10 Echinocereus poselgeri
 ACCCO615 10 Echinocereus poselgeri
 ACCCO616 10 Echinocereus schmollii
 ACCCO617 10 Echinocereus schmollii
 ACCCO618 10 Echinocereus schmollii
 ACCCO604 10 Echinocereus laui
 ACCCO605 10 Echinocereus laui
 ACCCO606 10 Echinocereus laui
 ACCCO619 10 Echinocereus subinermis
 ACCCO620 10 Echinocereus subinermis
 ACCCO621 10 Echinocereus subinermis
 ACCCO601 10 Echinocereus adustus
 ACCCO602 10 Echinocereus adustus
 ACCCO186 09 Echinocereus delateti
 ACCCO603 10 Echinocereus delateti
 ACCCO610 10 Echinocereus pensilis
 ACCCO611 10 Echinocereus pensilis
 ACCCO612 10 Echinocereus pensilis
 ACCCO590 10 Aporocactus flagelliformis
 ACCCO591 10 Aporocactus flagelliformis
 ACCCO592 10 Aporocactus flagelliformis
 ACCCO174 09 Echinocereus delateti