



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**ÁREA ACADÉMICA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AGROPECUARIAS**

**“VARIABILIDAD GENÉTICA INTRA E INTER ESPECÍFICA EN *ARGEMONE*”**

**TESIS PROFESIONAL**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN**  
**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**BRISEYDA BELEN BARRIOS MORALES**

TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO, MEXICO

JULIO, 2025

---



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
 Instituto de Ciencias Agropecuarias  
Instituto de Ciencias Agropecuarias

Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo, a 27 de junio de 2025  
**Numero de Control:** IBT-Aut-003-2025  
**Asunto:** Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
**Directora de Administración Escolar de la UAEH**

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado al pasante de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, **Briseyda Belen Barrios Morales**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado “Variabilidad genética intra e inter específica en **Argemone**”, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

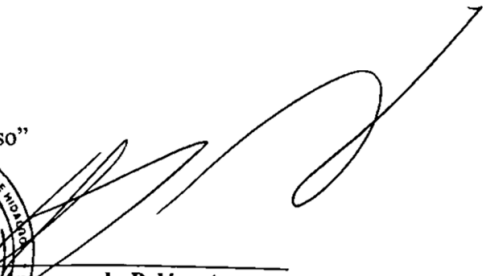
**PRESIDENTE** Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana  
**SECRETARIO** Dra. Margarita Islas Pelcastre  
**VOCAL 1** Dra. Juana Juárez Muñoz  
**SUPLENTE 1** Dra. Nydia Edith Reyes Rodríguez

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente  
 “Amor, Orden y Progreso”



**Dr. Paul Misael Garza López**  
 Coordinador del Ingeniería en  
 Biotecnología

**Dr. Armando Peláez Acero**  
 Director del Instituto de Ciencias  
 Agropecuarias



Avenida Universidad #133, Col. San Miguel  
 Huatengo. C.P. 43775. Santiago Tulantepec de  
 Lugo Guerrero, Hidalgo, México.  
 Teléfono: 7717172000 Ext. 42000  
 pelaeza@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

*“Shine, dream, smile”*

- *BTS*

*“I’m gonna take over the world, you and me”*

*“ I’m proud of you”*

- *Christian Yu (DPR IAN)*

## DEDICATORIA

Al amor más grande que tengo en esta vida, que es mi padre, **Diodoro Barrios Sánchez**. Gracias por todo, por tus sacrificios, por tus enseñanzas, por confiar en mí. Soy demasiado afortunada por tenerte como padre, no existen palabras con las que pueda expresar mi gratitud y amor hacia ti.

A mis hermanas, **Gloria y Angélica Fernanda**, y a mi hermano, **Pedro Emiliano**, por ser mi inspiración diaria, por motivarme a superarme y por recordarme siempre lo valioso que es seguir adelante.

A **Socorro** por su apoyo y paciencia a lo largo de mi vida.

Y a mí misma, porque solo yo conozco el esfuerzo, el tiempo y la dedicación que implicó llegar hasta aquí. Reconozco mi lucha y me abrazo con orgullo por haber llegado a este punto.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Juana Juárez Muñoz**, por su acompañamiento y enseñanza a lo largo de mi formación académica. Gracias por compartir su conocimiento, por su tiempo, paciencia y comprensión, así como por asesorarme, resolver mis dudas, y por esos momentos de conversación y escucha que tanto significaron para mí.

A la **Dra. Margarita Islas Pelcastre**, por su constante apoyo en distintas etapas de mi formación, por sus enseñanzas, sus valiosas observaciones y consejos que me han ayudado a crecer tanto académicamente como en lo personal. Gracias por su tiempo y por estar siempre dispuesta a escucharme.

A la **Dra. Nydia Edith Reyes Rodríguez**, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por su paciencia, comprensión y por el apoyo moral brindado durante este proceso.

A la **Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana**, por su guía y enseñanza a lo largo de mi trayectoria académica, por sus observaciones siempre acertadas, y por alentarme a mejorar no solo como estudiante, sino también como persona.

A **Sabrina Macias**, por ser mi amiga y compañera en este camino. Gracias por tu apoyo incondicional, por ser ese hombro en el que siempre puedo apoyarme sin temor a ser juzgada, por escucharme en los momentos difíciles y animarme a seguir adelante. Gracias por motivarme siempre, por los momentos compartidos y por las risas que aligeraron el camino. Espero que en otra vida podamos volver a encontrarnos. Te quiero mucho.

A **Sofía Tamara**, por tu amistad sincera, por tu compañía, tiempo y comprensión. Gracias por estar en los días tormentosos y hacerlos más llevaderos. Por aliviar mis penas y por ser un refugio cuando el mundo parece desmoronarse. En otra vida, espero que volvamos a coincidir. Gracias por permitirme ser parte de tu mundo. 사랑해

A **Ceferina Vite**, por su apoyo, compañía y calidez durante mi estancia en la universidad.

A **BTS y DPR IAN**, porque a través de su música encontré consuelo y compañía.

Y a todas y cada una de las personas que formaron parte de esta etapa: maestras, maestros, amistades, compañeras, compañeros y personas que conocí en el camino. Gracias por su enseñanza, su amistad y su compañía. Una sola página no basta para mencionar a todos, pero cada uno de ustedes tiene un lugar importante en esta historia.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
2.1 Descripción morfológica de <i>Argemone árida, ochroleuca y grandiflora</i> .....	15
2.2 Distribución geográfica.....	19
2.3 Clasificación taxonómica.....	21
2.4 La evolución de la taxonomía vegetal y sus retos actuales.....	23
2.5 Detección de la variabilidad genética.....	24
2.5.1 Amplificación por reacción de cadena en polimerasa (PCR).....	25
2.5.2 Técnicas para la Detección de la Variabilidad Genética.....	26
2.5.3 Marcadores moleculares en <i>Argemone</i> .....	29
2.5.4 Método para evaluar la integridad del ADN.....	30
Electroforesis en gel de agarosa.....	30
2.6 Métodos de agrupamiento genético para la construcción de dendrogramas a partir de datos moleculares.....	31
2.6.1 Método de agrupamiento UPGMA e índice de similitud JACCARD... Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA).....	33
Método de Unión de Vecinos.....	33
2.6.2 Coeficiente de similitud de Jaccard.....	33
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
6.1 Colecta de material biológico.....	38

6.2 Identificación taxonómica de <i>Argemone ochroleuca</i> y <i>Argemone árida</i> .....	38
6.3 Liofilización del material biológico.....	39
6.4 Aislamiento de ADN Genómico a partir de Tejido Foliar.....	40
6.5 Evaluación del grado de integridad del ADN.....	41
6.5.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	42
6.5.2 Determinación de la pureza y concentración del ADN.....	42
6.6 Selección de iniciadores (primers) y Amplificación del ADN -pcr.....	43
6.7 Separación de los fragmentos.....	45
6.8 Análisis de agrupamiento para estimar la relación genética intra e interespecífica.....	46
6.9 Análisis de varianza molecular.....	47
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>48</b>
7.1 Evaluación de la pureza y calidad del ADN.....	48
7.2 Selección de iniciadores e identificación de productos amplificados intra e interespecífico.....	50
7.5 Análisis de la relación genética en las poblaciones de <i>Argemone</i> <i>ochroleuca</i> y <i>Argemone árida</i> .....	56
7.6 Determinación de la relación genética de tres especies del género <i>Argemone</i> .....	59
7.7 Análisis de Varianza Molecular.....	62
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>PROYECCIONES FUTURAS.....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....</b>	<b>66</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>74</b>



## LISTA DE FIGURAS

### Figura

1. A) *Argemone Ochroleuca* (1. Flor abierta, 2. Capula, 3. Rama con flor, 4. Tallo, 5. Cápsula). B) *Argemone grandiflora* (1. Botones, 2. Flor, 3. Fruto, 4. Cápsula, 5. Botones).
2. Distribución geográfica del género *Argemone* por el territorio mexicano *Argemone árida*, *Argemone ochroleuca*, *Argemone grandiflora*
3. Compilación de fotografías de especies de *Argemone*.
4. Etapas PCR: 1. Desnaturalización, 2. Hibridación, 3. Amplificación
5. Ejemplo del cálculo de la similitud de Jaccard entre dos conjuntos (C1 y C2): muestra una matriz binaria de presencia/ausencia, un diagrama de Venn con su intersección y la fórmula resultante  $J=0.5$ .
6. Primer con mayor número de polimorfismo (H03) con tamaños estimados de 500-1500 pb, La flecha color amarillo nos muestra, una banda específica. (Och- *A. ochroleuca*, Ari- *A. árida*)
7. Primer G14 generó múltiples fragmentos con tamaños entre 400 y 2000 pb, mostrando una amplia variación entre las especies. Se identificaron bandas específicas en los genotipos 3 y 5 de *A. árida*, originalmente señaladas con flechas amarillas.(Och-*A. ochroleuca*, Ari-*A. árida*).
8. Figura 8. Primer H02 generó un patrón distinto a los anteriores, caracterizado por una menor cantidad de bandas en un intervalo de 600-2000 pb. La flecha amarilla, nos muestra una banda específica, en el genotipo 3 en la especie *A. árida*. (Och- *A. ochroleuca*, Ari-*A. árida*).
9. Primer B04 produjo un patrón más amplio respecto a los anteriores primers, con tamaños estimados entre los 200-2300 pb. La flecha color amarillo nos

señala una banda específica en el genotipo 5 de la especie *A. árida*. (Och- *A. ochroleuca*, Ari- *A. árida*).

10. Patrón de bandas de amplificación obtenido con RAPD en *A. ochroleuca* (Och), *A. árida* (Ari) y *A. grandiflora* (Gra), con los iniciadores G14, H03, G19, H17, B01, B04, y B05
11. Dendrograma de dos poblaciones de *Argemone* (*A. árida* y *A. ochroleuca*) obtenido con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard.
12. Dendrograma de tres especies de *Argemone* obtenido con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard.

## LISTA DE TABLAS

### Tabla

1. Secuencias y porcentajes de GC (%) de los iniciadores utilizados en este trabajo.
2. Pureza y concentración del ADN de 11 individuos de *Argemone árida* Rose (A. ari) y 11 *Argemone ochroleuca* Sweet (A. och) del estado de Hidalgo.
3. Bandas polimórficas y monomórficas obtenidas en *Argemone* con los iniciadores evaluados
4. Tamaño de fragmentos específicos de especies de *Argemone* obtenidos con primers para RAPDS.
5. Resumen del análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro y entre poblaciones de *Argemone*.
6. Matriz binaria de *Argemone ochroleuca* (A) y *Argemone árida* (B).
7. Matriz binaria de cuatro especies de *Argemone*.

## INTRODUCCIÓN

México es reconocido a nivel mundial como uno de los países más megadiversos, gracias a su ubicación geográfica, su topografía variada y su amplia gama de ecosistemas. Estos factores han permitido el desarrollo de una gran biodiversidad que abarca desde selvas tropicales hasta desiertos, originando una gran diversidad de condiciones climáticas y microclimas que facilitan la coexistencia de innumerables especies de flora y fauna (Espinosa et al., 2008). Esta riqueza biológica no solo es un patrimonio natural, sino también constituye una fuente de recursos para el hombre y mantenimiento de los ecosistemas.

Si bien las especies agroalimentarias han sido las más aprovechadas, en los últimos años se están incorporando algunas malezas o especies invasoras, las cuales se han asociadas a la degradación de ecosistemas agrícolas y naturales. Sin embargo, algunas de ellas contribuyen al control de la erosión del suelo, un problema crítico en áreas con agricultura intensiva o con deforestación acelerada. Estas plantas al fijarse al suelo previenen la pérdida de nutrientes esenciales, ayudando a mantener la fertilidad y estabilidad del terreno (Huenneke et al., 2001; Sarukhan, 2008). También, algunas tienen la capacidad de fijar nitrógeno en el suelo, mejorando la calidad de este, lo cual disminuye la necesidad de utilizar fertilizantes químicos (Huenneke et al., 2001). Estas especies no solo tienen importancia ambiental, sino también económica, ya que pueden ayudar a reducir los costos en la producción agrícola y a disminuir la dependencia de agroquímicos. Además, algunas de estas especies han sido objeto de investigaciones por su potencial para ser utilizadas como materia prima en la elaboración de productos y compuestos bioactivos con aplicaciones tanto medicinales como industriales (Leite et al., 2024). De manera similar, especies del género *Argemone*, como *Argemone mexicana* y *Argemone ochroleuca*, han sido evaluadas por su capacidad de acumulación de aceites, los cuales también pueden ser transformados en biodiésel mediante procesos de transesterificación. Adicionalmente, en años recientes, se ha incrementado el interés por explorar el uso de extractos vegetales provenientes de *A. mexicana* y *A. ochroleuca* para la elaboración de

bioplaguicidas. Estos compuestos naturales presentan actividad insecticida, fungicida y/o bactericida, y han sido propuestos como alternativas sostenibles frente al uso de agroquímicos sintéticos, los cuales suelen tener un impacto ambiental negativo debido a su persistencia, volatilidad y toxicidad hacia organismos no blanco. La aplicación de bioplaguicidas derivados de estas especies podría contribuir significativamente a la reducción del uso de contaminantes químicos en la agricultura, promoviendo así prácticas más seguras y respetuosas con el medio ambiente (Asfaw et al., 2025; Mlombo et al., 2025). Entre estas especies se incluyen las del género *Argemone*, perteneciente a la familia Papaveraceae. Este género incluye 60 especies distribuidas por todo el mundo, de las cuales 18 se encuentran ampliamente distribuidas en México (Juárez-García et al., 2020; Ownbey, 1958). Entre las especies más estudiadas y colectadas están *A. mexicana*, *A. ochroleuca*, *A. pleiacantha*, del resto de las especies hay muy poca o no existe información

Los estudios de estas especies, se han enfocado principalmente en los campos farmacéutico y químico, debido a la presencia de metabolitos secundarios (Cuéllar et al., 2015). Tales como la berberina y la sanguinaria los cuales han demostrado tener efectos antibacterianos y antifúngicos, por lo que han despertado gran interés para la medicina, ya que podrían ofrecer alternativas naturales para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas, contribuyendo a disminuir el desarrollo de enfermedades crónicas asociadas al daño oxidativo en las células (Hernández-Ruiz et al., 2020). Otros estudios han sugerido que otros compuestos presentes en *Argemone* podrían emplearse en la producción de biopesticidas y biofertilizantes, lo que ayudaría a promover una agricultura más sostenible (Martínez-Delgado et al., 2022). Debido a estas propiedades en las zonas rurales hay un aprovechamiento intensivo de las especies, pero no cuentan con programas o estrategias de conservación, lo cual podría ocasionar a mediano o largo plazo la pérdida de la diversidad genética de las poblaciones naturales por lo que es fundamental realizar investigaciones enfocadas a conocer la constitución y variación genética de las poblaciones ya que si bien se han realizado algunos estudios con marcadores moleculares entre los que destacan los microsátélites o

secuencias simples repetidas (SSR), polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), estos se han realizado en Arabia y se han enfocado a estudios filogenéticos de algunas especies del género *Argemone* (Karnawat & Malik, 2011) y al estudio de relaciones interespecíficas entre *A. mexicana*, *A. ochroleuca* (Bazaid et al., 2011). Por lo que es primordial realizar estudio de la variación genética intra e interespecífica de las poblaciones de especies de *Argemone* de interés medicinal y económico entre las que se encuentra *A. árida*, *A. ochroleuca* y *A. grandiflora*, las cuales se aprovechan en las zonas rurales de México, con el propósito de contribuir a su conservación y al desarrollo de estrategias de aprovechamiento.

## ANTECEDENTES

### 2.1 Descripción morfológica de *Argemone árida*, *ochroleuca* y *grandiflora*.

*Argemone árida*, conocida comúnmente como “Amapola del desierto”, es una planta herbácea anual tiende a alcanzar una altura de 0.70 m a 1 m, tiende a tener un tallo único, aunque en ocasiones puede contener varios en la base, los cuales conforme van creciendo tienden a ramificarse, de igual forma son moderadamente espinosos, las espinas son delgadas y tienen un ángulo recto. Sus hojas son verdosas oblongas, tienden a tener un largo de 13 cm y 5 cm de ancho, contiene dientes marginales agudos con espinas finas, en la zona del envés se encuentran espinas sobre todo en el área de las venas principales de las hojas. Los botones florales tienen una forma tubular con un largo de aproximadamente de 2 cm y 1.5 cm de ancho, su capa exterior está conformada por espinas extremadamente delgadas (Ownbey, 1958).

Sus flores contienen 6 pétalos de color blanco vibrante que con el paso del tiempo se tornan de un color café oscuro, el tamaño de cada pétalo va desde los 3.5 a 5.5 cm de largo y de 4 a 4.5 cm de ancho, cuenta con entre 80 a 120 e incluso más estambres por flor, los cuales son de un tono amarillo claro e incluso en algunas ocasiones pueden llegar a ser de un tono rojizo, las anteras generalmente son amarillas o teñidas de morado (Ownbey, 1958).

El fruto es una cápsula con forma ovalada, el cual cuenta con 3 a 5 carpelares, su largo incluyendo el estigma es de alrededor de 25 a 45 mm y el diámetro de 12 a 18 mm, dejando fuera las espinas esparcidas alrededor del fruto, estas tienen un largo aproximado de 8mm, sin embargo, tienden a ser desiguales, dentro de esta cápsula contiene semillas oleaginosas de unos 2mm de diámetro (Ownbey, 1958).

*Argemone ochroleuca*, también conocida como “chicalote”, es una planta herbácea bienal que puede alcanzar una altura de 0.30 m a 1 m. Sus tallos ramificados contienen fuertes espinas esparcidas, de manera perpendicular o ligeramente en posición vertical. Sus hojas en un tono verde claro o verde azulado contienen segmentos dentados acompañados con una espina terminal, los nervios del envés

en ciertos individuos tienden a desarrollar espinas al igual que las del haz, éstas por lo general tienen un largo de 35 cm, sin embargo, pueden llegar a tener un mayor o menor tamaño, dependiendo de las cuestiones climáticas a las que se vea afectada sometida la planta (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005).

Sus flores tienen un diámetro de 4 -7 cm, el color de sus pétalos varía pueden ser un tono amarillo-limón, amarillo blancuzco, crema, raramente amarillo-oscuro, la forma de sus pétalos es cuneada en la parte interna y obovada en la parte exterior. *A. ochroleuca* cuenta con entre 40 y 75 estambres por flor, ovarios con al menos 4 o 6 carpelos (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005; Ownbey, 1958).

Los botones tienen una forma ovalada, de 15-18 mm de largo por 8-11 mm de ancho, los sépalos de la planta varían en tamaño pueden ser de 8mm e incluso alcanzar un largo de 12 mm incluyendo la espina terminal (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005; Ownbey, 1958).

El fruto es una capsula de 25-50 mm de largo incluyendo el estigma, su cubierta contiene espinas grandes de 8-12 mm de largo, dentro de la capsula podemos encontrar pequeñas semillas de color negro de un tamaño de 1.5-1.8 mm (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005).

*Argemone grandiflora*, conocida comúnmente como “amapola grande”, es una de las especies más notables del género debido a sus grandes y vistosas flores.

Es una planta herbácea anual, que cuenta con una altura de 0.3 m a 1.5 m de altura he incluso en ocasiones puede llegar a ser algunos centímetros más alta, de lo habitual, contiene un tallo ramificado con carencia de espinas en comparación con las especies anteriormente descritas (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005; Ownbey, 1958).

Sus hojas basales y caulinares son grandes, pueden llegar a medir más de 40 cm de largo y 15 cm de ancho, la hojas intermedias y superiores son progresivamente de menor tamaño, regularmente en la cúspide de la plantas, se encuentran en menor tamaño, el de color de estas es un tono glauco (verde azulado), con



márgenes dentados, sin embargo en esta especie el haz y envés al igual que el tallo carecen de espinas, de igual manera están recubiertas por una sustancia serosa la cual ayuda a contrarrestar la pérdida de agua (Ownbey, 1958).

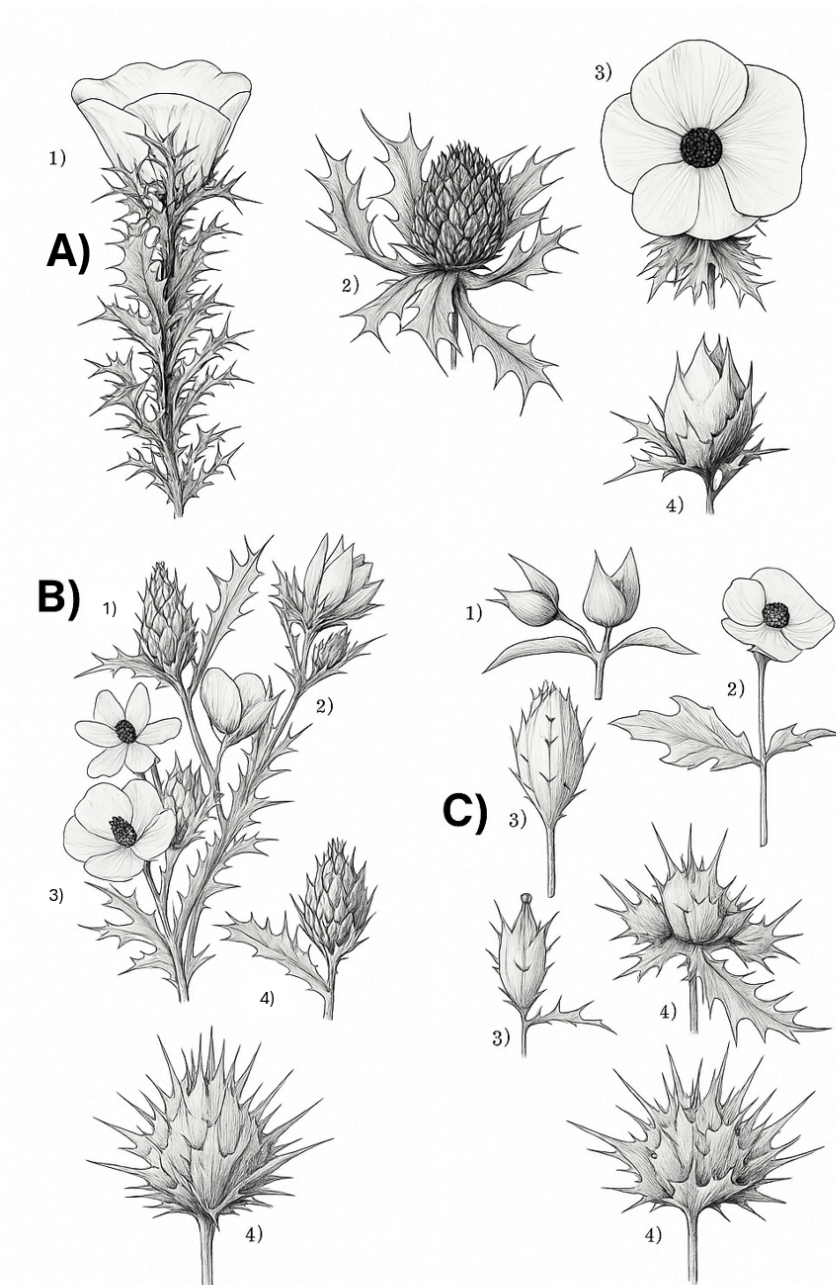


Figura 1. A) *Argemone ochroleuca* (1. Flor abierta, 2. Cápsula, 3. Rama con flor, 4. Cápsula). B) *Argemone grandiflora* (1. Botones, 2. Fruto, 3. Flor, 4. Cápsula). Fuente: Barrios Morales.

Los botones florales tienen una forma semi esférica (Figura 1.), su tamaño va desde los 14 a 20 mm de largo y 12 a 17 mm de ancho, posee una mínima cantidad e incluso en ocasiones una escasez de espinas y cuentan con cuernos apicales de 7 a 15 mm de largo, que, aunque finalicen con una punta afilada no generan un daño al estar en contacto con ellos (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005).

Las flores son el rasgo más distintivo de esta especie, ya que son grandes, de color blanco o ligeramente rosadas, y pueden medir de 6 a 12 cm de diámetro, lo que le da el nombre de *grandiflora* (que significa “flor grande”). Tiene entre 4 a 6 pétalos, los cuales tienen un largo de 3 a 6 cm y un ancho de 3 a 5 cm, estas cuentan con más de 150 filamentos con anteras amarillas. Sus grandes flores atraen a diversos polinizadores como abejas, mariposas y otros insectos, lo que facilita la reproducción de la planta (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005).

El fruto, al igual que en las otras especies, es una cápsula elíptica espinosa de 20 a 40 mm de largo contando el estigma y 10 a 18 mm de ancho dejando fuera las espinas que la rodean, contiene semillas negras y oleaginosas con un diámetro de 2mm cada una. Esta especie se diferencia sobre todo por la altura, ausencia de espinas en comparación con las que con anterioridad fueron descritas (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005).

## 2.2 Distribución geográfica

*Argemone* pertenece a la familia Papaveraceae, este género está conformado por 60 especies, de las cuales 24 se encuentran distribuidas a lo largo del territorio mexicano (Figura. 2). Las especies más encontradas en el norte del país son *Argemone ochroleuca*, *Argemone mexicana*, *Argemone aenea* y *Argemone grandiflora* (Ownbey,1958;Ojeda, 1982).

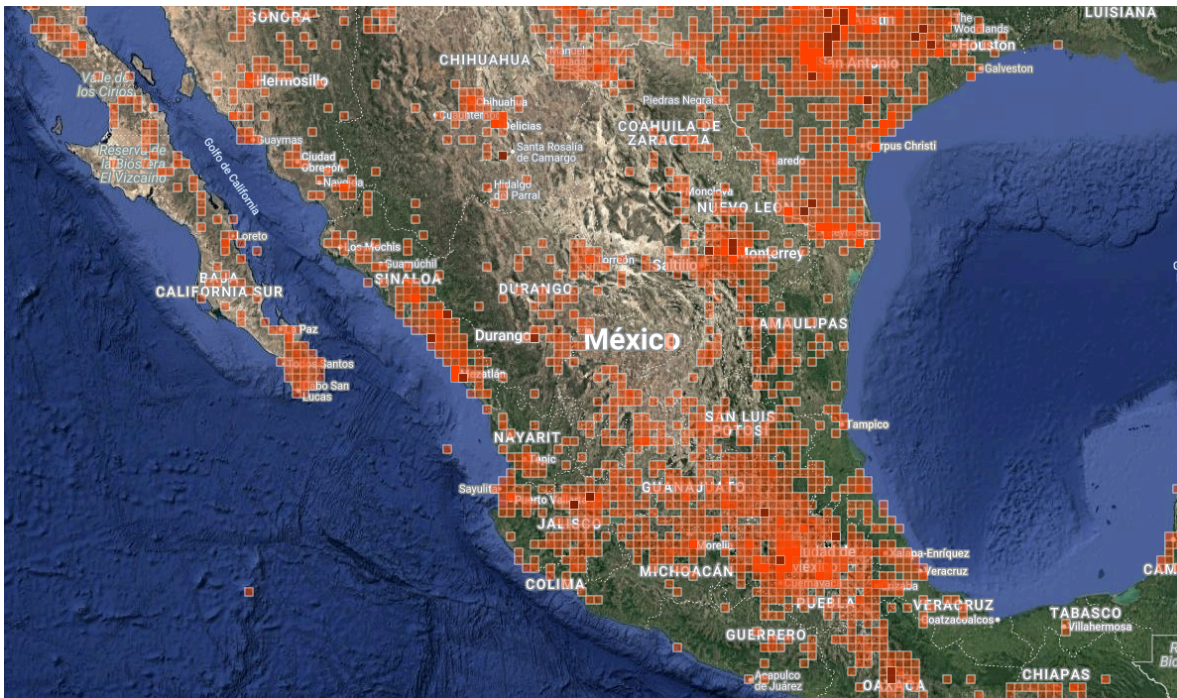


Figura. 2 Distribución geográfica del género *Argemone* por el territorio mexicano. Fuente: <https://mexico.inaturalist.org/taxa/58951-Argemone>

*A. árida* se encuentra distribuida principalmente en el altiplano mexicano, abarcando los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato e Hidalgo. Esta especie se desarrolla en altitudes que van desde los 1900 hasta los 2300 metros sobre el nivel del mar, lo que la sitúa en áreas semiáridas y de clima templado. A pesar de ser considerada una maleza por su capacidad de adaptación a diversos suelos perturbados y ambientes marginales, en realidad, es una especie poco común en términos de densidad poblacional, ya

que no es abundante en las regiones donde se distribuye. Su presencia es intermitente, y en muchas áreas se le encuentra de manera escasa (Ojeda, 1982).

*A. ochroleuca*, es una planta ampliamente distribuida a lo largo de México, siendo especialmente común en las regiones áridas y semiáridas del país, la podemos encontrar en los estados de Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Sinaloa, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Ciudad de México, Estado de México, Puebla, Tlaxcala, Veracruz y Guerrero. Su presencia es notable en el altiplano central y en las zonas desérticas del noroeste, donde prospera en ambientes alterados por la actividad humana. Es frecuente encontrarla a lo largo de caminos, carreteras y áreas de vegetación perturbada, lo que refleja su capacidad de adaptarse a suelos degradados y condiciones adversas (Ojeda, 1982).

Esta especie, se desarrolla en altitudes que oscilan entre los 1700 y 2200 metros sobre el nivel del mar. Las zonas donde prolifera están caracterizadas por un clima árido a semiárido, con largos periodos de sequía, lo que subraya su resistencia y capacidad de sobrevivir en condiciones extremas (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005).

*A. fructicosa* es una planta endémica de México, la cual cuenta con una distribución geográfica restringida, hasta el momento la escasa literatura disponible hasta la fecha, su presencia ha sido únicamente documentada en el estado de Coahuila. Esta especie probablemente se encuentre en microhábitats específicos dentro del ecosistema árido coahuilense, lo que podría explicar su limitada distribución (Ojeda, 1982). *A. grandiflora*, es una especie que se encuentra distribuida en las partes semiáridas del noroeste del país principalmente en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y Veracruz. Se desarrolla en altitudes que abarcan desde los 650 hasta los 2200 metros sobre el nivel del mar, lo que le permite habitar en una variedad de ecosistemas (Ojeda, 1982).

### 2.3 Clasificación taxonómica

La taxonomía proporciona un marco organizativo fundamental para reconocer, interpretar y valorar la diversidad de los seres vivos. Esta disciplina es esencial para la conservación de la biodiversidad, ya que permite clasificar y nombrar las especies, facilitando su estudio y protección (Maxted et al., 1997; Sarukhan, 2008).

Además, la actividad taxonómica aporta información clave para cuantificar y evaluar la variabilidad genética de los organismos. Esto permite comprender el rango de variación dentro de un taxón, así como la distribución geográfica y la frecuencia relativa de los diferentes tipos de hábitats en los que se encuentran. Estos datos son fundamentales para la recolección de germoplasma y la determinación del grado de amenaza de extinción en distintos taxones (Frankel et al., 1995; Sarukhan, 2008).

Por lo tanto, la taxonomía no solo organiza el conocimiento sobre la diversidad biológica, sino que también desempeña un papel crucial en la planificación y ejecución de estrategias de conservación efectivas.

Las especies de la familia Papaveraceae entre las que se encuentran las del género *Argemone*, incluyen hierbas anuales, bienales o perennes y, en casos excepcionales, arbustos perennifolios o pequeños árboles. Estas plantas pueden producir un látex de consistencia lechosa o acuosa, que puede o no estar pigmentado (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005; Ownbey, 1958).

En cuanto a la morfología externa, algunas especies presentan estructuras punzantes como espinas y, en ciertos casos, coléteres, que son estructuras especializadas en la secreción de sustancias (Ownbey, 1958).

Las hojas, en su mayoría, son alternas, aunque en algunas especies pueden disponerse en pares, en verticilos alrededor del tallo o concentradas en la base de la planta. Generalmente, están divididas en secciones y pueden presentar bordes dentados o espinosos. En algunas especies, las hojas se han modificado en

zarcillos que facilitan su capacidad trepadora. Cabe destacar que las plantas de esta familia carecen de estípulas (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005; Ownbey, 1958).

Si bien estas son características generales de la familia, dentro del género *Argemone* se observan diferencias morfológicas entre sus especies, lo que permite su diferenciación. Algunos de los rasgos más evidentes incluyen la disposición y ramificación de las hojas, la presencia y densidad de espinas, la coloración de las flores y la forma de la cápsula. Las diferencias en estas características son la base de la presente clasificación taxonómica a nivel de las especies en *Argemone ochroleuca*, *Argemone mexicana*, *Argemone aenea* y *Argemone grandiflora*, y el resto de las especies del género (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005; Ownbey, 1958).

#### Clasificación taxonómica de las especies del género *Argemone*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliidae
Subclase	Magnoliidae
Orden	Papaverales
Familia	Papaveraceae
Subfamilia	Papavereae
Género	<i>Argemone</i> L.



Figura 3. Compilación de fotografías de especies de *Argemone*. Fuente: <https://mexico.inaturalist.org/taxa/58951-Argemone>

A pesar de que los sistemas de clasificación taxonómicos actuales están bien fundamentados, aún existen dificultades para definir correctamente los grupos dentro de la familia a nivel de serie. Esto resalta la necesidad de complementar los estudios taxonómicos tradicionales con herramientas bioquímicas, citogenéticas y moleculares, que permitan establecer una clasificación más precisa y robusta.

## 2.4 La evolución de la taxonomía vegetal y sus retos actuales

La taxonomía vegetal constituye un pilar fundamental para el estudio de la biodiversidad, al encargarse de identificar, nombrar y organizar las especies. Su desarrollo ha pasado de enfoques prácticos y descriptivos a una disciplina científica que integra principios evolutivos y herramientas genéticas. En particular, los avances en biología molecular han facilitado la identificación de especies, la delimitación de grupos taxonómicos y el análisis de sus relaciones evolutivas, aspectos cruciales al estudiar la variabilidad genética dentro y entre especies (Rouhan & Gaudeul, 2021).

No obstante, esta área enfrenta limitaciones importantes, como la falta de especialistas y recursos, especialmente en regiones con alta diversidad biológica. Ante ello, se ha impulsado una taxonomía integradora que considere características morfológicas, genéticas y ecológicas, con el fin de lograr clasificaciones más sólidas (Rouhan & Gaudeul, 2021).

## 2.5 Detección de la variabilidad genética

La replicación del ADN es un proceso altamente eficiente y fascinante, en gran medida debido a la precisión de las ADN polimerasas y a los sofisticados sistemas de corrección de errores presentes en las células. Estos mecanismos trabajan en conjunto para asegurar que la integridad de la molécula de ADN se mantenga estable a lo largo de las divisiones celulares. Sin embargo, a pesar de esta eficiencia, la replicación del ADN no es completamente infalible. Diversos factores pueden inducir cambios en la secuencia de nucleótidos, lo que puede resultar en mutaciones. Estas mutaciones, a su vez, son responsables de la generación de la variabilidad genética dentro de una población (Ramírez-Bello, 2019).

La variabilidad genética es un fenómeno crucial en la evolución y adaptación de las especies. Se origina principalmente a partir de mutaciones cromosómicas y génicas, que pueden alterar la estructura o la función de los genes. Estas mutaciones se transmiten a través de la reproducción, ya sea asexual o sexual, permitiendo que las variaciones genéticas se propaguen a lo largo de las generaciones. En la reproducción asexual, las mutaciones se transmiten directamente a la descendencia, mientras que, en la reproducción sexual, la recombinación genética y la segregación independiente de los cromosomas durante la meiosis contribuyen a la diversidad genética (Duarte-Escalante et al., 2014).

Para detectar y estudiar estas variaciones en la secuencia del ADN dentro del genoma, se han desarrollado diversos métodos y técnicas. Entre ellos se incluyen la secuenciación del ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación genómica comparativa (CGH), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), y los análisis de microsatélites, entre otros. Cada uno de estos métodos ofrece ventajas particulares dependiendo del tipo de variabilidad genética que se desea investigar y de la precisión requerida en el análisis (Duarte-Escalante et al., 2014).



El estudio de la variabilidad genética no solo es fundamental para comprender los mecanismos evolutivos, sino que también tiene aplicaciones prácticas en campos como la medicina, la agricultura y la conservación de la biodiversidad (National Research Council, 1989). Por ejemplo, en la medicina, la identificación de variaciones genéticas puede ayudar a predecir la susceptibilidad a ciertas enfermedades, a desarrollar tratamientos personalizados y a comprender mejor las bases genéticas de diversas patologías (Kumar, 2025).

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

En 1986 se desarrolla la técnica reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction, por Kary Mullis ganando en 1993 el premio Nobel de Química, *ya que* es una de las técnicas más importantes de la biología molecular, puesto a que nos permite obtener de manera in vitro millones de copias partiendo de un fragmento de ADN (Klug et al., 2006; González et al., s/f; Zhu et al., 2020).

Esta técnica se basa en tres pasos esenciales, el primero, desnaturalización, en donde la doble cadena de ADN se desnaturaliza a una temperatura de 90-95°C, lo que genera dos cadenas sencillas, este paso se alcanza en aproximadamente 5 minutos (Figura 4) (González et al., s/f; Zhu et al., 2020).

El segundo paso se denomina hibridación, en este se disminuye la temperatura de reacción hasta unos 50-70°C, a esta temperatura los cebadores se unen al ADN de cadena sencilla (Figura 4). Por último, tenemos la etapa de la amplificación, en la cual entra una DNA polimerasa que sea resistente a altas temperaturas (*Taq polimerasa*), puesto que la síntesis de DNA se realiza en 70-75°C. La *Taq* polimerasa extiende los cebadores y va adicionando nucleótidos en una dirección 5´- 3´, logrando así una copia de la hebra molde de ADN (Figura 4) (Zhu et al., 2020).

Esta técnica se basa en la replicación celular en donde actúan varias proteínas que ayudan a sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra, la cual

funciona como hebra molde (Bohinski, 1991). La información obtenida de la hebra molde es utilizada para sintetizar dos cebadores oligonucleótidos (extremo 5' y extremo 3'). Se agregan cebadores a una muestra en donde las cadenas de ADN se encuentren separadas, para que estos se unan a los nucleótidos complementarios que flanquean la secuencia a clonar. Luego de la hibridación se agrega el DNA polimerasa que sea resistente a altas temperaturas, esta proteína sintetiza una segunda cadena de ADN. La reiteración de estos pasos crea más copias del ADN, en conclusión, la PCR está dada por 3 pasos (desnaturalización, hibridación y amplificación) (Figura 4) (Klug et.al, 2006;(González et al., s/f; Zhu et al., 2020).

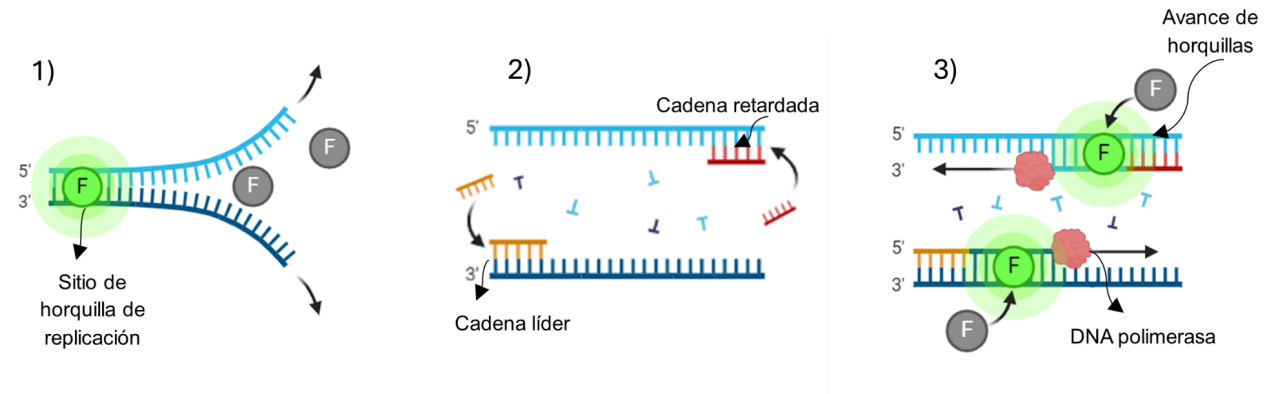


Figura 4. Etapas PCR: 1. Desnaturalización, 2. Hibridación, 3. Amplificación. Fuente: Barrios Morales.

### 2.5.2 Técnicas para la Detección de la Variabilidad Genética

Los marcadores moleculares son herramientas fundamentales en el estudio de la genética, ya que permiten acceder a la información genética específica de cada organismo. Estos marcadores son capaces de identificar variaciones en la secuencia del ADN, lo que resulta esencial para la investigación genética y la caracterización del germoplasma vegetal. Debido a su precisión y utilidad, los marcadores moleculares se emplean extensamente en estudios de diversidad genética, mapeo de genes y en la identificación de características hereditarias

(Ricci & Junqueira, 2008). El Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), son marcadores genéticos de tipo dominante, que pueden ser monitoreados de manera codominante (Williams et al., 1990). Utilizan la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para examinar de manera rápida y eficiente la diversidad genética en diferentes grupos poblacionales. La alta reproducibilidad y facilidad de uso de los AFLP los hace especialmente valiosos en áreas como la sistemática, la tipificación patogénica, la genética de poblaciones, el mapeo de loci asociados a características cuantitativas (QTL), así como en la creación de huellas o perfiles de ADN específicos (de Carvalho et al., 2020) . Estas características convierten a los AFLP en una herramienta versátil y de gran utilidad en la genética.

ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), son marcadores genéticos dominantes que identifican variaciones tanto en homocigotos como en heterocigotos. Aunque la reproducibilidad de los RAPD puede depender de la estricta adherencia a los protocolos experimentales, su simplicidad es destacable ya que no requieren información genómica previa (Elkady et al., 2022). Los RAPD utilizan iniciadores universales y solo necesitan una pequeña cantidad de ADN, lo que los hace ideales para la construcción de mapas genéticos, el mapeo de características específicas en poblaciones, la generación de huellas de ADN, el análisis de germoplasma y la evaluación de distancias genéticas entre individuos. Además, son útiles para calcular la contribución relativa de los progenitores en estudios de cruzamiento (Babu et al., 2021).

La técnica Polimorfismo Asociado a Sitios de Restricción (RFLP), es utilizada para el análisis de un número moderado de muestras con un nivel de resolución relativamente bajo (Elkady et al., 2022). Es especialmente eficaz en el mapeo de genes tanto en mamíferos como en plantas. Los marcadores RFLP son codominantes, lo que significa que pueden detectar variaciones genéticas en homocigotos y heterocigotos (Ullah et al., 2021). Según las necesidades del experimento, pueden requerir o no información previa sobre la secuencia del ADN. RFLP es especialmente útil para la detección de mutaciones conocidas, lo que lo

convierte en una herramienta flexible para la investigación genética (Labadie-Bracho & Adhin, 2023).

ECOTILLING es una técnica derivada del método de Localización Dirigida de Lesiones Inducidas en Genomas (TILLING) utilizada para la identificación de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) (Selvakumar et al., 2023). A diferencia del método original, ECOTILLING no utiliza agentes mutagénicos para inducir mutaciones, sino que se basa en la formación de heteroduplex y en el corte enzimático en las posiciones donde se produce un cambio de nucleótido, utilizando monitoreo fluorescente. Esta técnica es ampliamente utilizada para descubrir SNPs tanto en humanos como en plantas, y su alta sensibilidad la hace ideal para estudios genéticos detallados (Chen et al., 2014).

Análisis de Número Variable de Repeticiones en Loci Múltiples (MLVA), es una técnica que se emplea para estudiar la variabilidad en el número de repeticiones de secuencias cortas en múltiples loci a lo largo del genoma. Este tipo de marcador molecular es particularmente útil en estudios de genética forense, análisis de parentesco, y en la investigación de la diversidad genética dentro de poblaciones (Fasanella et al., 2005; Khan et al., 2020). MLVA ofrece una alta resolución y es capaz de diferenciar entre individuos con gran precisión (Nadon et al., 2013).

Los microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencias simples (SSRs), consisten en secuencias cortas de ADN que se repiten en tándem y presentan un alto grado de polimorfismo. Dada su abundancia en los genomas de organismos eucariotas y su gran variabilidad entre individuos, los microsatélites son ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones, mapeo de genes y análisis de parentesco. Su naturaleza codominante y alta reproducibilidad los convierten en una herramienta poderosa para detectar variaciones genéticas y estudiar la estructura genética de poblaciones (Milbourne et al., 1998).

### 2.5.3 Marcadores moleculares en *Argemone*

El uso de marcadores moleculares ha revolucionado la manera de estudiar la variabilidad genética y la dinámica evolutiva de las especies. A través de técnicas como los microsatélites (SSR), el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), ha sido posible analizar tanto la diversidad genética intra e inter poblacional como las adaptaciones que permiten a estas plantas del género *Argemone*, prosperar en una amplia gama de hábitats. Estas herramientas han brindado información respecto a la genética de *Argemone*, sobre su potencial ecológico y económico, ofreciendo nuevas perspectivas para su conservación y aprovechamiento sostenible (Bazaid et al., 2011; Cuéllar et al., 2015; Hernández-Ruiz et al., 2020; Karnawat & Malik, 2011; Martínez-Delgado et al., 2022).

Hasta el momento, la literatura reporta el uso de la técnica RAPD-PCR para el análisis molecular de nueve muestras del género *Argemone*, empleando diez cebadores aleatorios. En dicho estudio se obtuvo un total de 108 fragmentos de ADN, de los cuales 28 presentaron características polimórficas. Las muestras codificadas como PS21 mostraron un número variable de fragmentos amplificados: 84, 82, 83, 87 y 85, respectivamente. Entre los 108 fragmentos obtenidos, se identificaron 14 fragmentos únicos, los cuales pueden funcionar como marcadores moleculares, ya que permiten reconocer características genéticas específicas de las plantas analizadas (Bazaid et al., 2011).

La identificación de estos fragmentos únicos fue posible gracias al uso de múltiples cebadores en la técnica RAPD-PCR, lo que permitió una amplificación significativa del ADN y facilitó la distinción de marcadores genéticos particulares. Este enfoque no solo brindó información valiosa sobre la diversidad genética presente entre las muestras, sino que también representa una base sólida para futuras investigaciones en el campo de la genética vegetal (Bazaid et al., 2011).

#### 2.5.4 Método para evaluar la integridad del ADN

La evaluación de la integridad del ADN es un paso clave en estudios genéticos y biotecnológicos, ya que cualquier daño o degradación en la molécula puede alterar significativamente los resultados obtenidos. Para garantizar la calidad de las muestras de ADN, existen diversas técnicas que permiten detectar su estado. Una de las más frecuentemente empleadas es la electroforesis en gel de agarosa, una técnica ampliamente usada para la separación y análisis de fragmentos de ADN (Herráez & Luque Bazán, 2012; Klug et al., 2011).

##### Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es un método que se basa en la migración de partículas cargadas a través de un campo eléctrico. Este fenómeno se aprovecha para separar moléculas, como el ADN, según su tamaño y carga (*Bioseparaciones*, 2011; Cases & Hens, 1994). Un sistema de electroforesis generalmente consta de tres fases interrelacionadas. La primera es una fase líquida que contiene electrolitos, los cuales facilitan la conducción de la corriente eléctrica a través del sistema. La segunda es una fase sólida, que puede ser de diferentes tipos (papel, membranas, o geles como los de agarosa), y que actúa como el soporte por el cual migran las moléculas. Por último, hay una fase gaseosa que está en equilibrio con el líquido (*Bioseparaciones*, 2011; Herráez & Luque Bazán, 2012).

Antes de iniciar el proceso de separación, es esencial que el sistema alcance un estado de equilibrio termodinámico. Esto significa que el sistema debe estar en una situación estable en cuanto a temperatura, además de contar con potenciales eléctricos y químicos uniformes. Este equilibrio asegura que no haya variaciones locales que interfieran con el comportamiento de las moléculas durante su migración (Cases & Hens, 1994).

Una vez que el ADN u otras moléculas cargadas ingresan al sistema, este equilibrio se rompe temporalmente, ya que las partículas responden de manera diferente al campo eléctrico en función de su carga y tamaño. En el caso del ADN,

que está negativamente cargado, las moléculas migrarán hacia el electrodo positivo, con fragmentos más grandes moviéndose más lentamente que los pequeños, debido a la resistencia impuesta por el gel. Además del campo eléctrico, otros fenómenos como la difusión también juegan un papel importante, ya que las moléculas tienden a desplazarse de áreas de mayor concentración a áreas de menor concentración. Todos estos procesos permiten que las moléculas se separen y se distribuyen a lo largo del gel, generando un patrón característico (*Bioseparaciones*, 2011; Cornejo Romero et al., 2014; Valcárcel Cases & Gómez Hens, 1994).

Esta técnica es especialmente útil para separar macromoléculas biológicas, como ácidos nucleicos o proteínas, debido a su capacidad para discriminar en función del tamaño (Cases & Hens, 1994). La electroforesis en gel de agarosa se ha convertido en una herramienta esencial en laboratorios de biología molecular, ya que proporciona una manera relativamente simple y rápida de evaluar la integridad del ADN, permitiendo visualizar si las muestras están intactas o si han sufrido fragmentación (Klug et al., 2011).

## 2.6 Métodos de agrupamiento genético para la construcción de dendrogramas a partir de datos moleculares.

La construcción de árboles filogenéticos es un proceso esencial en la biología molecular y la bioinformática. Los métodos disponibles pueden clasificarse en varias categorías según el enfoque empleado, como aquellos basados en distancias, parsimonia, máxima verosimilitud y modelos bayesianos. Cada uno de estos métodos ofrece ventajas y se adapta a diferentes tipos de datos y preguntas de investigación (Kolhmann, 1994; Tamura et al., 2011).

En los métodos basados en distancias, se utiliza esta medida como una representación del grado de divergencia entre dos secuencias, considerándola una aproximación al tiempo transcurrido desde que ambos se separaron de un ancestro común. El procedimiento comienza con la generación de una matriz de distancias por parejas de secuencias, obtenida a partir de un alineamiento

múltiple. En este proceso, toda la información sobre similitudes y diferencias entre dos secuencias queda resumida en un único número, lo que simplifica la representación de las relaciones evolutivas (Kolhmann, 1994; Tamura et al., 2011)

El cálculo de la distancia entre secuencias puede hacerse de varias maneras. Aunque podría emplearse un estadístico sencillo, como el porcentaje de posiciones diferentes entre dos secuencias, en la práctica se suelen aplicar métodos más preferidos. Estos métodos tienen en cuenta el fenómeno de saturación, que ocurre cuando múltiples mutaciones afectan la misma posición en una secuencia y enmascaran los cambios reales observables. Para superar este problema, se utilizan modelos de mutación que permiten estimar la distancia real calculando en los cambios detectados, lo que asegura que esta se mantiene en proporción lineal con el tiempo (Kolhmann, 1994).

Una vez generada la matriz de distancias, se utilizan diversos métodos estadísticos para reconstruir el árbol filogenético. Entre los más comunes se encuentran el UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y el método de unión de vecinos (Neighbor-Joining). Estos métodos no son exclusivos de la filogenia y también se emplean en otros contextos que requieren clasificaciones jerárquicas. Su principal ventaja radica en su velocidad y eficiencia, ya que permiten analizar secuencias largas y un gran número de individuos con recursos computacionales relativamente limitados (Hua et al., 2017)

El análisis no termina con la construcción del árbol, ya que es necesario evaluar su precisión y confiabilidad. Esto se realiza mediante pruebas como la prueba de compensación cofenético, que compara una nueva matriz de distancias, generada a partir del árbol, con la matriz original para determinar el nivel de compensación entre ambas. También se puede emplear un análisis de bootstrap, que consiste en realizar muestreos repetidos de los datos originales para validar la robustez de las ramas y asegurar la solidez de las conclusiones (Romesburg, 2004).

En resumen, los métodos basados en distancias ofrecen una herramienta poderosa para reconstruir árboles filogenéticos de manera eficiente, aunque su



correcta aplicación depende de entender sus limitaciones y validar adecuadamente los resultados obtenidos (Kolhmann, 1994; Romesburg, 2004; Tamura et al., 2011).

#### 2.6.1 Método de agrupamiento UPGMA e índice de similitud JACCARD.

Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA)

El método UPGMA es una técnica de agrupamiento utilizada para reconstruir árboles filogenéticos. Se basa en identificar las parejas de secuencias más similares y calcular la media de las distancias entre ellas y el resto de las secuencias. A partir de este proceso, se construye un árbol filogenético.(Hua et al., 2017; Romesburg, 2004).

Este método es únicamente adecuado cuando se cumple la hipótesis del reloj molecular, es decir, cuando todas las secuencias han evolucionado a la misma velocidad. UPGMA genera árboles ultra métricos, lo que significa que todas las ramas desde la raíz hasta los nodos terminales tienen la misma longitud (Lin et al., 2015).

Método de Unión de Vecinos

El método de unión de vecinos es ampliamente utilizado en la construcción de filogenias de secuencias. A diferencia de UPGMA, los árboles generados por este método no son ultra-métricos, lo que lo hace ideal para casos en los que no se puede garantizar que todas las ramas hayan evolucionado a la misma velocidad. En otras palabras, es el método recomendado cuando no se cumple la hipótesis del reloj molecular, permitiendo reflejar tasas de evolución variables entre diferentes ramas (Lin et al., 2015).

#### 2.6.2 Coeficiente de similitud de Jaccard

El coeficiente de similitud de Jaccard, también conocido como coeficiente de Tanimoto, mide la similitud entre dos conjuntos de datos binarios (Figura 5). Se

define como el tamaño de la intersección dividido por el tamaño de la unión de los conjuntos.

Este coeficiente produce un valor entre 0 y 1, donde:

1. **0** indica que no hay elementos en común.
2. **1** indica que ambos conjuntos son idénticos.

A partir de estos valores, se genera una matriz de similitud que luego se convierte en una matriz de distancia, calculada como **1 - matriz de similitud**. Las matrices de distancia utilizan caracteres alfanuméricos como identificadores para representar las relaciones entre los datos analizados (Halffter et al., 2005).

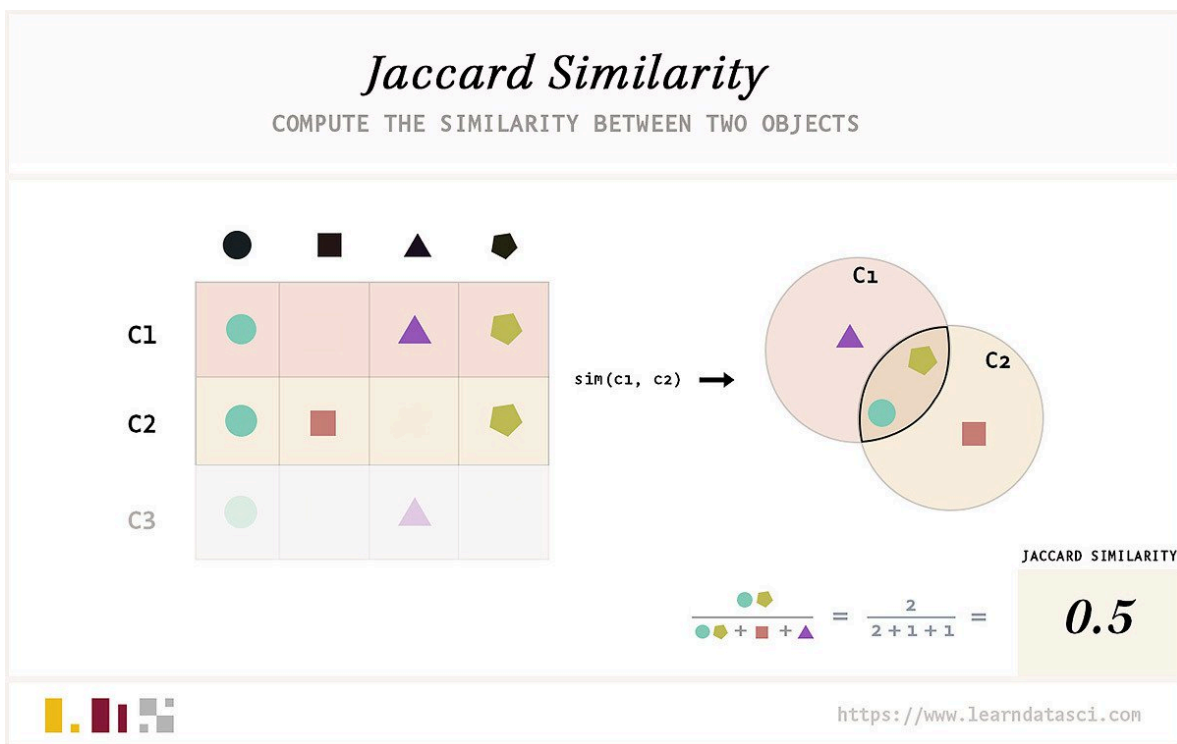


Figura 5. Ejemplo del cálculo de la similitud de Jaccard entre dos conjuntos (C1 y C2): muestra una matriz binaria de presencia/ausencia, un diagrama de Venn con su intersección y la fórmula resultante  $J=0.5$ . Fuente: [https://storage.googleapis.com/lids-media/images/jaccard\\_similarity.width-1200.jpg](https://storage.googleapis.com/lids-media/images/jaccard_similarity.width-1200.jpg)

## JUSTIFICACIÓN

El estudio de la variabilidad genética en especies del género *Argemone* es crucial, ya que este grupo de plantas representa tanto un recurso biológico de valor potencial en la medicina tradicional y la agricultura sostenible como un componente clave para la salud de los ecosistemas en México. Aunque en algunos casos estas especies se consideran invasoras, su capacidad de controlar la erosión y su potencial para enriquecer suelos pobres las hace valiosas en áreas de agricultura intensiva o degradadas.

Dado que las especies de *Argemone* son ampliamente aprovechadas en comunidades rurales, su explotación sin un manejo adecuado puede llevar a una pérdida significativa de diversidad genética, afectando la resiliencia y adaptabilidad de sus poblaciones naturales. La variabilidad genética constituye una base esencial para la adaptación y supervivencia de las especies, y su estudio ofrece un fundamento sólido para desarrollar estrategias de conservación informadas.

Esta investigación también se justifica por el potencial ecológico y económico de los metabolitos secundarios presentes en *Argemone*, como la berberina y la sanguinaria, que poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas con posibles aplicaciones en la industria farmacéutica y en la agricultura. El conocimiento de la variabilidad genética en relación con la composición química podría abrir nuevas oportunidades para su aprovechamiento sostenible y, al mismo tiempo, reducir la dependencia de agroquímicos en cultivos agrícolas.

Además, los resultados de este estudio podrían orientar la implementación de políticas de conservación y manejo de las especies de *Argemone*, facilitando el desarrollo de estrategias de preservación de su diversidad genética en un contexto de explotación controlada. Esto no solo contribuirá a la protección de los recursos biológicos de México, sino que también fortalecerá las oportunidades de desarrollo sostenible para las comunidades que dependen de estos recursos.

## **HIPÓTESIS**

Las poblaciones de especies del género *Argemone* en México presentan una alta diversidad genética intra e interespecífica, la cual está correlacionada con variaciones en la producción de metabolitos secundarios como la berberina y la sanguinaria. Esta diversidad genética y química confiere a las poblaciones ventajas adaptativas que les permiten persistir en ecosistemas con distintos grados de perturbación y suelos degradados, y constituye un recurso potencial para la selección de poblaciones con propiedades bioactivas óptimas para aplicaciones farmacéuticas y agrícolas sostenibles.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar la variabilidad genética intra e interespecífica de poblaciones mexicanas de *Argemone* árida, *Argemone* ochroleuca y *Argemone* grandiflora, con el propósito de generar conocimiento que contribuya a la conservación de su diversidad genética y a la exploración de su potencial aprovechamiento en aplicaciones medicinales y agrícolas.

### Objetivos Específicos

- Identificar el o los iniciadores con el que se obtiene mayor polimorfismo y bandas específicas a nivel intra e interespecífico.
- Determinar las relaciones genéticas intraespecíficas e interespecíficas de poblaciones naturales de *Argemone* en diferentes regiones de México mediante el uso de RAPD de como marcadores moleculares.
- Determinar si el uso de marcadores moleculares RAPD permite la discriminación o diferenciación entre especies del género *Argemone*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Colecta de material biológico

Se colectaron plantas de *Argemone árida*, *Argemone ochroleuca*, *Argemone grandiflora*, respectivamente en los estados de Hidalgo, Guanajuato y Michoacán de la república mexicana (Figura 6), *A. árida* Rose fue recolectada en terrenos adyacentes a la carretera México-Tuxpan, en las proximidades del municipio de Singuilucan, en el estado de Hidalgo. Se colectaron 12 plantas, respetando una distancia de 5 metros entre cada una de ellas para asegurar la representatividad de la población.

*A. ochroleuca* Sweet fue recolectada en el municipio de Tulancingo de Bravo, Hidalgo, a una distancia de 15 metros de la orilla de la carretera Tulancingo-Santiago Tulantepec. En este sitio se obtuvo una muestra de 12 individuos, al igual que con *A. árida* se tomó una respectiva distancia de 5 metros entre cada individuo.

*A. grandiflora* Sweet, se realizó la colecta de 2 individuos con una distancia de 8 metros entre cada individuo, en el Cerro Prieto, localizado a 3 kilómetros al norte de Atarjea, en el estado de Guanajuato

De las poblaciones de *A. ochroleuca* y de *A. árida*, adicionalmente se colectó y prensó un ejemplar para posteriormente corroborar con las claves taxonómicas de la especie.

### 6.2 Identificación taxonómica de *Argemone ochroleuca* y *Argemone árida*

Para la corroborar las especies las plantas de *Argemone ochroleuca* y *Argemone árida*, previamente secadas en prensas botánicas se llevaron al Herbario de la Universidad Nacional Autónoma de México y para la identificación se utilizaron claves taxonómicas especializadas del género (*Argemone en Flora de Norteamérica*, s/f). El primer paso en la identificación consistió en la observación general de la planta, prestando especial atención a su tamaño y forma. Luego, se

examinó el tallo, donde se registró la presencia de espinas, el tipo de ramificación y el exudado lechoso característico del género *Argemone*.

Posteriormente, se analizaron las hojas, tomando en cuenta su disposición, ya fuera alterna u opuesta, así como su forma y el tipo de margen, que podía ser dentado o lobulado. También se observó la presencia de espinas y la coloración del follaje.

El estudio continuó con la observación de las estructuras reproductivas. En las flores, se describe el color de los pétalos, el número total de estos y su diámetro, además de registrar la presencia de nectarios. En cuanto al fruto, se identificó el tipo de cápsula, prestando especial atención a su forma y la existencia de espinas. Finalmente, se analizaron las semillas, evaluando su tamaño, forma y color. Durante el proceso de la identificación se siguió paso a paso la clave taxonómica y las características observadas fueron comparadas con ejemplares de referencia existentes en el Herbario de la Universidad Nacional Autónoma de México. Una vez corroborada su identidad, los ejemplares estudiados fueron formalmente depositados en dicho herbario, donde quedarán disponibles para futuras investigaciones y consultas científicas, con el siguiente número de folio No. 1567169 para *A. ochroleuca* y No.1567170 para *A. árida*.

### 6.3 Liofilización del material biológico

Las hojas de las plantas colectadas fueron almacenadas individualmente en bolsas de papel glassine de 5x8cm con pequeños orificios, los cuales ayudan a dar paso al aire frío. En cada bolsa se colocaron independientemente cuatro hojas de los 28 individuos colectados de *Argemone*, y se etiquetan siguiendo un protocolo riguroso de manejo de muestras y número asignado a las muestras de cada especie.

Posteriormente para garantizar la óptima conservación de las muestras y el éxito en la extracción de ADN las muestras fueron sometidas a un proceso de

liofilización utilizando un equipo LABCONCO modelo 00180547, bajo las siguientes condiciones:

1. Temperatura de congelación inicial: Las hojas se congelaron a una temperatura de **-80°C**, lo que permitió la formación rápida de cristales de hielo pequeños, minimizando el daño estructural en los tejidos vegetales.
2. Presión aplicada: Se aplicó un vacío de 200 Pa / 2 mBar para facilitar la sublimación del agua contenida en las hojas sin que ésta pasara por la fase líquida.
3. Tiempo de liofilización: El proceso de sublimación primaria se extendió durante 120 horas continuas, asegurando la eliminación completa del agua en las muestras.
4. Fase de desorción secundaria: Una vez finalizada la sublimación, las muestras pasaron por una etapa de desorción secundaria a una temperatura de (insertar temperatura) durante (insertar tiempo), con el fin de eliminar cualquier rastro de humedad residual adsorbida en las hojas.

#### 6.4 Aislamiento de ADN Genómico a partir de Tejido Foliar

El ADN genómico de las plantas fue aislado a partir de 0.3 g de tejido foliar liofilizado, siguiendo un método modificado de Dellaporta (1983) como se detalla a continuación:

1. Maceración del tejido foliar: Se colocaron 0.3 g de tejido foliar en morteros previamente esterilizados, y se maceran hasta obtener un polvo fino.
2. Lisis celular: El tejido pulverizado se transfirió a tubos Corning de 15 ml de capacidad. A cada muestra se le añadieron 7 ml de Solución A (500 mM de NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 1.3% SDS, 0.2%  $\beta$ -Mercaptoetanol) y se incubó en baño maría a 65°C durante 10 minutos.
3. Precipitación de proteínas: Se añadieron 3 ml de Solución B (5M Acetato de Potasio) a cada muestra, mezclando suavemente, y se incubaron en hielo durante 30 minutos.



4. Centrifugación: Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 4000 rpm.
5. Precipitación de ADN: El sobrenadante se transfirió a un tubo Corning limpio, se añadieron 7 ml de isopropanol frío, y se incubó a -20°C durante 5 horas.
6. Recuperación del ADN: Tras centrifugar las muestras por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se transfirió la pastilla de ADN a tubos Eppendorf de 2 ml de capacidad. La pastilla se secó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Resuspensión del ADN: La pastilla se resuspendió en 600 µl de amortiguador de dilución (50 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA). A continuación, se añadieron 5 µl de RNAsa (10 mg/mL), mezclando suavemente, e incubando a 37°C durante 2 horas.
8. Detención de la reacción enzimática: Para detener la reacción enzimática, se añadieron 75 µl de Acetato de Na (3M) y 400 µl de isopropanol frío, seguido de una incubación a -20°C durante 20 minutos.
9. Limpieza del ADN: Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm y 4°C durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó tres veces con 500 µl de etanol al 80%, mezclando suavemente.
10. Secado y almacenamiento: Finalmente, se centrifugó la muestra a 12,000 rpm y 4°C, se secó la pastilla en un desecador con vacío durante 1 hora, y se resuspendió en 100 µl de TE. El ADN se almacenó a 4°C hasta su posterior uso.

#### 6.5 Evaluación del grado de integridad del ADN

Para evaluar la integridad del ADN previamente extraído, se emplearon dos métodos complementarios. En primer lugar, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para visualizar la calidad y posible degradación del ADN. Posteriormente, aquellas muestras que presentaban una buena resolución en el gel fueron analizadas mediante espectrofotometría, con el fin de determinar su pureza y concentración (García-Alegría et al., 2020; Klug et al., 2011).

### 6.5.1 Electroforesis en gel de agarosa

Este es uno de los métodos más comunes y sencillos para evaluar la integridad del ADN (Cornejo Romero et al., 2014). Para evaluar la integridad del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. La corrida electroforética se llevó a cabo a un voltaje de 42 V durante un período de 4 horas, en el cual el frente de migración avanzó aproximadamente 6 cm. Este proceso se realizó utilizando una fuente de poder THERMO EC 3000-90 conectada a una cámara de electroforesis horizontal.

Cada pozo del gel fue cargado con un volumen total de 25  $\mu$ L, compuesto por 20  $\mu$ L de muestra de ADN y 5  $\mu$ L de colorante de carga, lo que permitió visualizar la migración de las muestras a lo largo del gel. Como medio de conducción, se empleó amortiguador TAE 1X, asegurando una adecuada separación de las bandas de ADN.

Las bandas resultantes fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio. Para ello, los geles fueron sumergidos en una solución de bromuro de etidio durante 30 minutos, permitiendo la incorporación del tinte a las moléculas de ADN. Posteriormente, la observación y documentación de las bandas se realizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta (UV), utilizando el sistema BioDoc-It para la captura de imágenes.

### 6.5.2 Determinación de la pureza y concentración del ADN

La determinación de la pureza y concentración de ADN se realizó mediante el método espectrofotométricos utilizando el equipo NanoDrop 2000. Este instrumento permite evaluar las características del ADN mediante mediciones de absorbancia a diferentes longitudes de onda, proporcionando información tanto de su concentración como de su pureza.

Para llevar a cabo el análisis, se tomó independientemente un volumen de 1  $\mu$ l de cada muestra de material genético y se colocó sobre el pedestal del equipo, para que la muestra entre en contacto con los sensores y el software del NanoDrop

iniciará automáticamente la medición. El software determina la pureza del ADN utilizando los valores de las relaciones entre las longitudes de onda 260/280 nm y 260/230 nm., mientras la concentración de ADN se calcula a partir de la absorbancia medida a 260 nm. Por convención, se asume que una muestra de ADN puro tiene una absorbancia de 1 a 260 nm cuando su concentración es de 50 µg/ml. El NanoDrop utiliza la siguiente fórmula para determinar la concentración:

$$\text{Concentración de ADN (µg/ml)} = A_{260} \times 50 \times \text{Factor de dilución}$$

Esta fórmula permite convertir las mediciones espectrofotométricas en una estimación precisa de la concentración de ADN en la muestra analizada. La pureza del ADN se evalúa mediante las dos relaciones principales de absorbancia indicadas anteriormente:

La relación 260/280, indica el grado de pureza del ADN respecto a la contaminación con proteínas. Un valor de A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> cercano a 1.8 sugiere que el ADN tiene un alto grado de pureza. Por el contrario, valores menores pueden ser indicativos de contaminación con proteínas o compuestos como el fenol, que pueden interferir en el análisis. En cambio, la relación 260/230, evalúa la presencia de contaminantes como sales, carbohidratos y compuestos fenólicos. Una relación A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> en el rango de 2.0 a 2.2 es indicativa de una muestra relativamente pura. Valores más bajos pueden señalar la presencia de contaminantes como sales residuales o solventes orgánicos (Lucena-Aguilar et al., 2016).

## 6.6 Selección de iniciadores (primers) y Amplificación del ADN -pcr

Antes de iniciar el análisis de amplificación con RAPD, se realizó una prueba de amplificación con 11 iniciadores (primers) de 10 pares de bases (pb) (Tabla 1) y un contenido de GC entre 60 y 70% (características óptimas para temperaturas de alineamiento de entre 34 y 37°C en ensayos de RAPD-PCR.), en tres muestras de ADN, en las que se incluyó un ejemplar de *A. árida*, *A. ochroleuca*, y *A. grandiflora*, para seleccionar los mejores iniciadores (primers) basándose en la

intensidad o resolución, tamaño y número de productos amplificados. Posteriormente con los iniciadores (primers) seleccionados se realizó la amplificación del ADN de las muestras de las poblaciones de Argemone y de las 4 especies de Argemone utilizadas como referencia en esta investigación. Para los ensayos de amplificación de las cuatro especies utilizadas como ejemplares de referencia. En el caso de *A. grandiflora*, se realizó una mezcla de ADN de 2 individuos poniendo cantidades iguales de ADN, mientras que, para *A. árida*, *A. ochroleuca* se mezcló el ADN de 10 individuos por especie que conforman la población. En el caso del análisis de la variación intraespecífica se amplificó independientemente el ADN de 10 individuos de la población de *A. árida* y *A. ochroleuca*. En todos los casos la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 25µL: 10 µm de Tris-HCl con un pH de 8.0, 50 µm de KCl (proporcionado por el amortiguador 10x de la Taq polimerasa), 3 µm de MgCl<sub>2</sub>, 200 µm de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 20 pmol de cada iniciador (primers), 1.5 unidades de Taq polimerasa, 60 ng de ADN molde, y agua estéril. Es importante que cada uno de estos reactivos se prepare y mezcle con precisión para garantizar la eficacia de la reacción de amplificación (para detalles sobre la preparación de las soluciones, consulte el Apéndice).

La reacción de amplificación se realizó utilizando un termociclador modelo TECHNE TC-412. El programa de amplificación incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C, con una duración de 30 segundos durante los primeros tres ciclos, seguido de 15 segundos en los ciclos del 4 al 38. Posteriormente, se llevó a cabo una fase de alineamiento a 35°C durante 30 segundos, seguida por la fase de extensión a 72°C durante 1 minuto y 30 segundos. Este ciclo térmico fue diseñado para maximizar la eficiencia de la amplificación, asegurando la correcta desnaturalización del ADN, la alineación específica de los primers y la síntesis completa de las nuevas cadenas de ADN.

**Tabla 1**

Secuencias y porcentajes de GC (%) de los iniciadores (primers) utilizados en este trabajo.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Longitud (nt)</b>	<b>%GC</b>
<b>B1</b>	AGGGGTCTTG	10	60
<b>B2</b>	TTCGAGCCAG	10	60
<b>B3</b>	GGTGCGGGAA	10	70
<b>B4</b>	AACGCGCAAC	10	70
<b>B5</b>	TCACGTCCAC	10	60
<b>H03</b>	AGACGTCCAC	10	60
<b>H14</b>	ACCAGGTTGG	10	60
<b>H09</b>	TGTAGCTGGG	10	60
<b>G19</b>	GTCAGGGCAA	10	60
<b>G11</b>	TGCCCGTCGT	10	60
<b>H02</b>	TCGGACGTGA	10	60

Fuente: Barrios Morales.

### 6.7 Separación de los fragmentos.

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. La electroforesis se llevó a cabo a 42 voltios durante un período de 4 horas, tiempo durante el cual el frente de migración del gel recorrió aproximadamente 6 cm. Este proceso se realizó utilizando una fuente THERMO EC 3000-90 de poder conectada a una cámara de electroforesis horizontal.

En cada uno de los pozos del gel se depositaron 25 microlitros de muestra, compuestos por 20 microlitros del producto amplificado y 5 microlitros de colorante

de carga, lo cual permitió visualizar la migración de las muestras durante la electroforesis. Para mantener una separación efectiva de las bandas de ADN, se utilizó amortiguador TAE 1X como medio de conducción.

Las bandas de ADN resultantes fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio. Los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio durante 30 minutos, lo que permitió la incorporación del tinte a las bandas de ADN. Posteriormente, las bandas teñidas se observaron y documentaron mediante un transiluminador UV, utilizando el modelo BioDoc-It para la captura de imágenes. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN, se utilizó como referencia un marcador molecular de 100 pares de bases (pb) de la marca Gibco, cuyo fragmento de mayor tamaño corresponde a 2072 pb.

#### 6.8 Análisis de agrupamiento para estimar la relación genética intra e interespecífica.

Para llevar a cabo el análisis de agrupamiento, se construyó una matriz binaria basada en los patrones de bandas obtenidos con los diferentes iniciadores (primers) en los geles de electroforesis. En esta matriz, cada fila representa una muestra de Argemone analizada, mientras que cada columna corresponde a una banda de tamaño específico (pares de bases) observada en los geles. Los valores de la matriz se codificaron de manera binaria: se asignó un valor de "1" para indicar la presencia de una banda y un valor de "0" para su ausencia (esta codificación es requerida para el análisis) (Juárez-Muñoz et al., 2002).

Posteriormente, se realizó el análisis de agrupamiento con el método UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard usando el software NTSYS (Numerical Taxonomy System) versión 2 (Rohlf, 1993). Para generar el dendrograma de relaciones de similitud intraespecífica de las poblaciones estudiadas y la interespecífica de las cuatro especies utilizadas como referencia.

## 6.9 Análisis de varianza molecular

La diversidad genética dentro y entre poblaciones basada en la variación del patrón RAPD se determinó analizando los componentes de varianza molecular con el Programa AMOVA, versión 1.55 (Excoffier et al., 1992; Stewart Jr. & Excoffier, 1996). Con AMOVA se calcularon los componentes de varianza y sus niveles de significancia para la variación entre poblaciones y dentro de la población usando datos RAPD de 6 plantas de la población *A. árida* y de 8 plantas de la población de *A. ochroleuca*. El programa también extrae análogos de la  $F$  estadísticas (también llamada  $\Phi_{st}$  estadísticas). A partir del valor de  $\Phi_{st}$ , se estimó un el flujo de genes ( $N_e m$ ) (número efectivo de migrantes por generación), utilizando la fórmula. La distancia genética ( $\Phi_{st}$ ) entre las poblaciones y sus niveles de significancia también se obtuvieron usando AMOVA (Excoffier et al., 1992; Juárez-Muñoz et al., 2002; Stewart Jr. & Excoffier, 1996).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1 Evaluación de la pureza y calidad del ADN

Al determinar la pureza del ADN de las muestras de *Argemone* mediante la relación de longitud de onda 260/280 nm, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000, se obtuvieron valores en un rango de 1.4 a 2.1 (Tabla 2). Aunque la mayoría de las muestras no presentaron valores dentro del intervalo óptimo de 1.8 a 2.0, el cual indica un alto grado de pureza de los ácidos nucleicos, los valores obtenidos se consideran aceptables para su uso en la técnica RAPD. Esto se debe a que dicha técnica no requiere un ADN con niveles de pureza extremadamente altos. Los valores inferiores a 1.8 sugieren contaminación por restos de proteínas, las cuales, a diferencia del SDS y el fenol, no interfieren significativamente con la reacción de PCR. No obstante, en algunas muestras se identificó contaminación por fenoles, deducida a partir de los valores de longitud de onda, lo que requirió realizar una nueva extracción de ADN.

**Tabla 2.** Pureza y concentración del ADN de 11 individuos de *Argemone árida* Rose (*A. ari*) y 11 *Argemone ochroleuca* Sweet (*A. och*) del estado de Hidalgo.

Muestra	Pureza (A260/A280)	Concentración (ng/μl)
1-A. och	1.60	1510.7
2 A. och	1.78	245.3
3-A. och	1.79	1927.9
4-A. och	1.74	2869.7
5-A. och	1.60	1345.2
6-A. och	1.82	191
7-A. och	1.91	196.7
8-A. och	1.73	201.6
9-A. och	1.46	272.2



10-A. och	1.67	2143.9
11-A. och	1.46	173.8
1- A. ari	1.85	303.8
2- A, ari	1.63	71.3
3-A. ari	1.76	144.3
4-A. ari	1.82	1091.9
5-A. ari	1.89	206
6-A. ari	1.62	250
7-A. ari	1.78	278.1
8-A. ari	1.46	31.9
9-A. ari	1.75	172.5
10-A. ari	1.66	90.6
11-Ari	1.71	305.7

Fuente: Barrios Morales.

La evaluación de la integridad del ADN en geles de agarosa mostró que, en la mayoría de las muestras, el ADN se resolvió en una banda relativamente uniforme y bien definida. Sin embargo, en aquellas contaminadas con fenoles, no se observó una buena resolución de las bandas en el gel. No obstante, estos resultados indican que el método de Dellaporta permite obtener ADN a un nivel medio-alto de pureza e integridad adecuado para la reacción de RAPD-PCR. a pesar de que la presencia de fenoles en las plantas del género *Argemone* representa un desafío considerable para la extracción de ADN con un alto grado de pureza.

7.2 Selección de iniciadores e identificación de productos amplificados intra e interespecífico.

De los 10 iniciadores (primers) probados para la amplificación del ADN de las tres muestras de referencia y en los individuos de las poblaciones de *Argemone ochroleuca* y *Argemone árida* con cinco iniciadores (G14, G11, B04, H02 y H03) se observaron patrones de 6 a 7 bandas (Tabla 3) con un alto grado de resolución y reproducibilidad. Con el iniciador H03 se observó el mayor número de bandas polimórficas (7 bandas) mientras que con el B03 se visualizaron solo 2 bandas monomórficas y no se observaron bandas polimórficas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Bandas polimórficas y monomórficas obtenidas en *Argemone* con los iniciadores evaluados .

Primer	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas
G14	6	1
H09	3	0
G11	6	0
B05	4	0
B04	6	0
B03	0	2
B02	4	0
H02	6	0
G19	2	1
H03	7	2
Total	44	6

Fuente: Barrios Morales.

En las figuras 6, 7, 8 y 9 se muestra los patrones de amplificación obtenidos respectivamente con los primers H03, H02, G14 y B04 en los individuos de las poblaciones de *A. ochroleuca* y *A. árida*, así como el tamaño de los fragmentos, el cual osciló en un rango de 100 pb a 2500 pb. Otros autores analizando huellas genéticas en nueve individuos de *A. mexicana* provenientes de diferentes regiones, utilizando RAPD encontraron patrones de bandas amplificadas de 1 a 15

fragmentos y tamaños de 300 a 2500 pb (Bazaid et al, 2011) rangos muy cercanos a los observados en las poblaciones de *A. ochroleuca* y *A. árida* estudiadas en la presente investigación, las pequeñas diferencias pueden atribuirse a que las secuencias de los iniciadores no son las mismas ni la especie. Este resultado refleja la diversidad genética, lo cual es congruente con la biología reproductiva y la historia evolutiva del género.

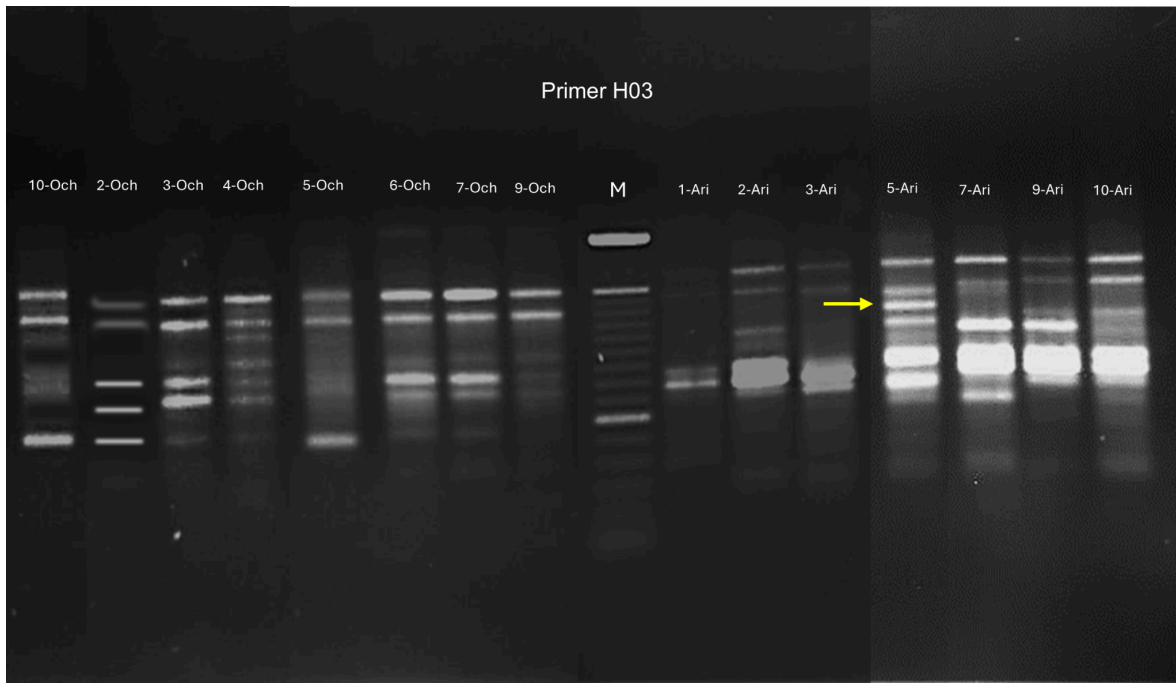


Figura 6. Primer con el mayor número de polimorfismo (H03) con tamaños estimados de 500-1500 pb, La flecha color amarillo nos muestra, una banda específica. (Och- *A. ochroleuca*, Ari- *A. arida*). Fuente: Barrios Morales.

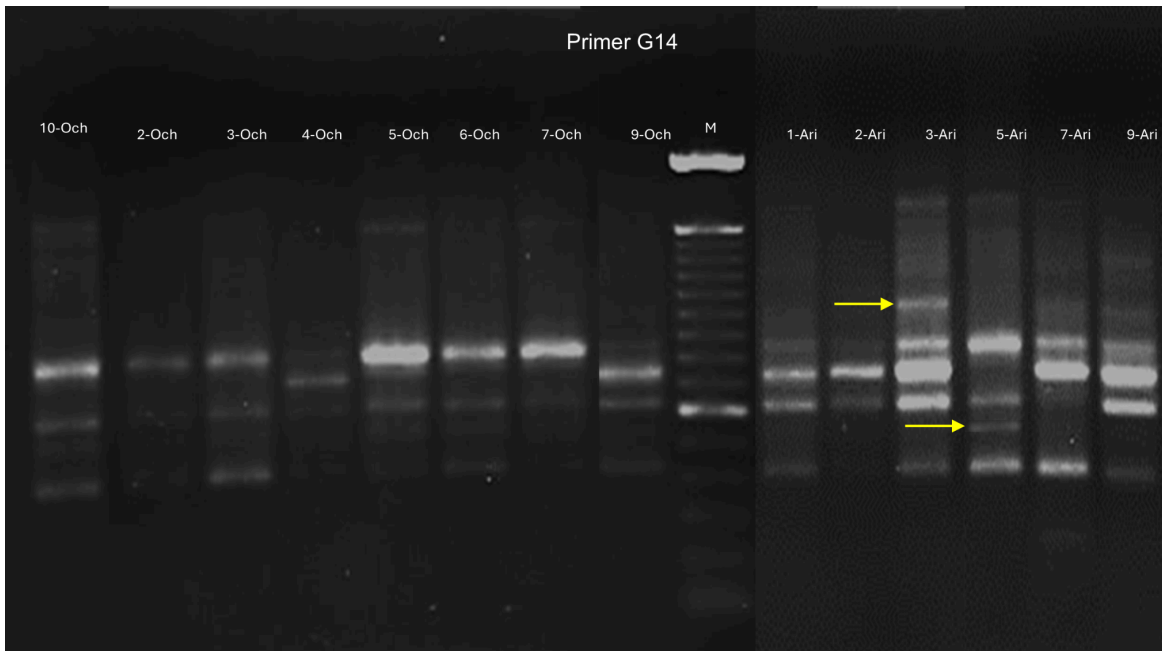


Figura 7. Primer G14 generó múltiples fragmentos con tamaños entre 400 y 2000 pb, mostrando una amplia variación entre las especies. Se identificaron bandas específicas en los genotipos 3 y 5 de *A. árida*, originalmente señaladas con flechas amarillas. (Och-*A. ochroleuca*, Ari-*A. árida*). Fuente: Barrios Morales.

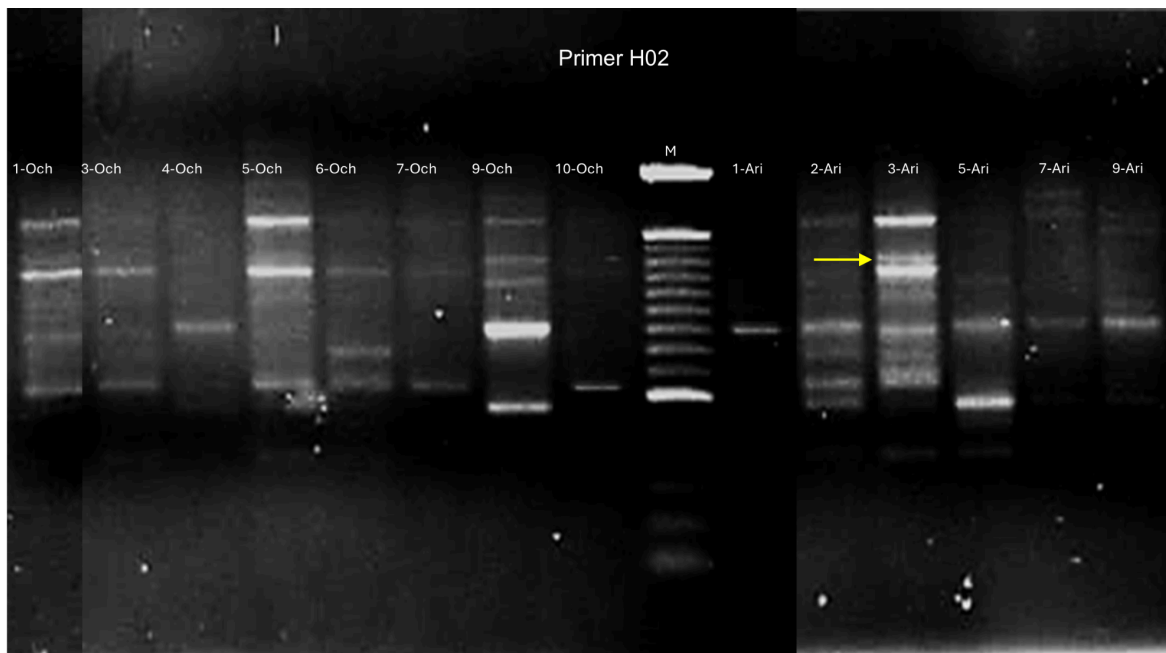


Figura 8. Primer H02 generó un patrón distinto a los anteriores, caracterizado por una menor cantidad de bandas en un intervalo de 600-2000 pb. La flecha amarilla, nos muestra una banda específica, en el genotipo 3 en la especie *A. árida*. (Och-*A. ochroleuca*, Ari-*A. árida*). Fuente: Barrios Morales.

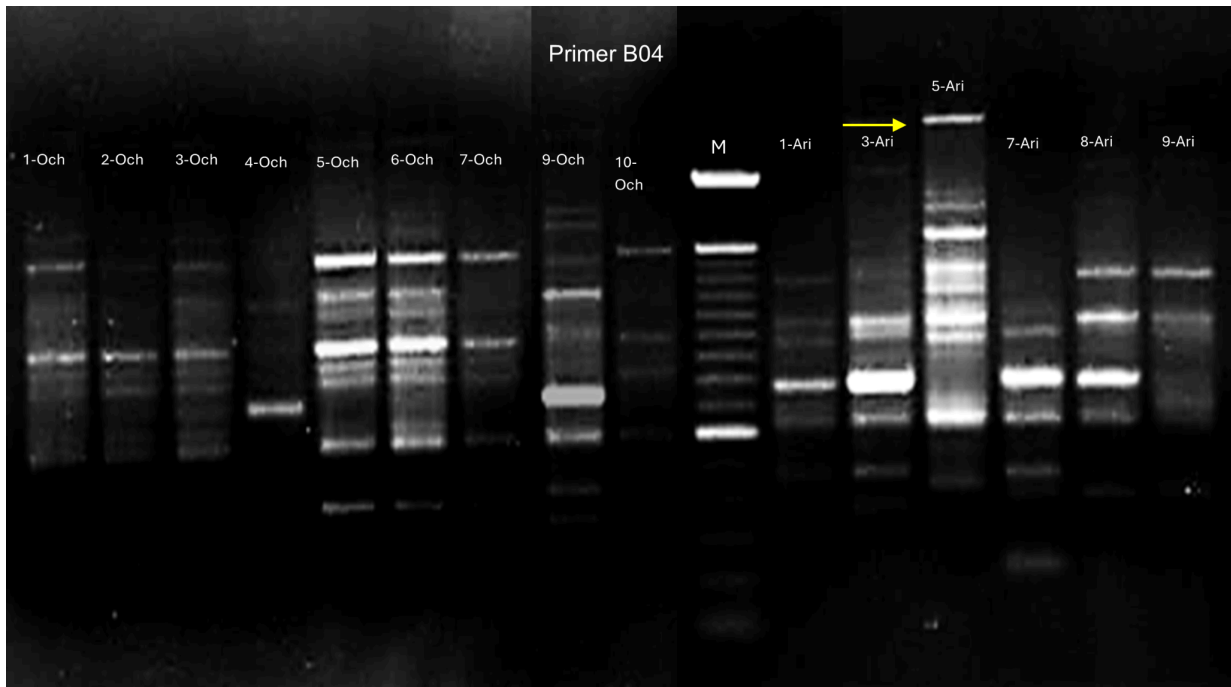


Figura 9. Primer B04 produjo un patrón más amplio respecto a los anteriores primers, con tamaños estimados entre los 200-2300 pb. La flecha color amarillo nos señala una banda específica en el genotipo 5 de la especie *A. árida*. (Och- *A. ochroleuca*, Ari- *A. árida*). Fuente: Barrios Morales.

En la figura 10 también puede apreciarse qué si bien en ambas poblaciones se observan patrones similares, en la población de *A. árida* con el iniciador H03, H02, G14 y B04 se observaron respectivamente bandas específicas o únicas de 100, 1300, 500, 1100 y 2300 pb., en los genotipos 3 y 5, mientras que en los individuos de la población de *A. ochroleuca* no se observaron bandas únicas. Estos resultados contrastan con los de (Bazaid et al., 2011) quien observó bandas únicas con algunos de los iniciadores probados.

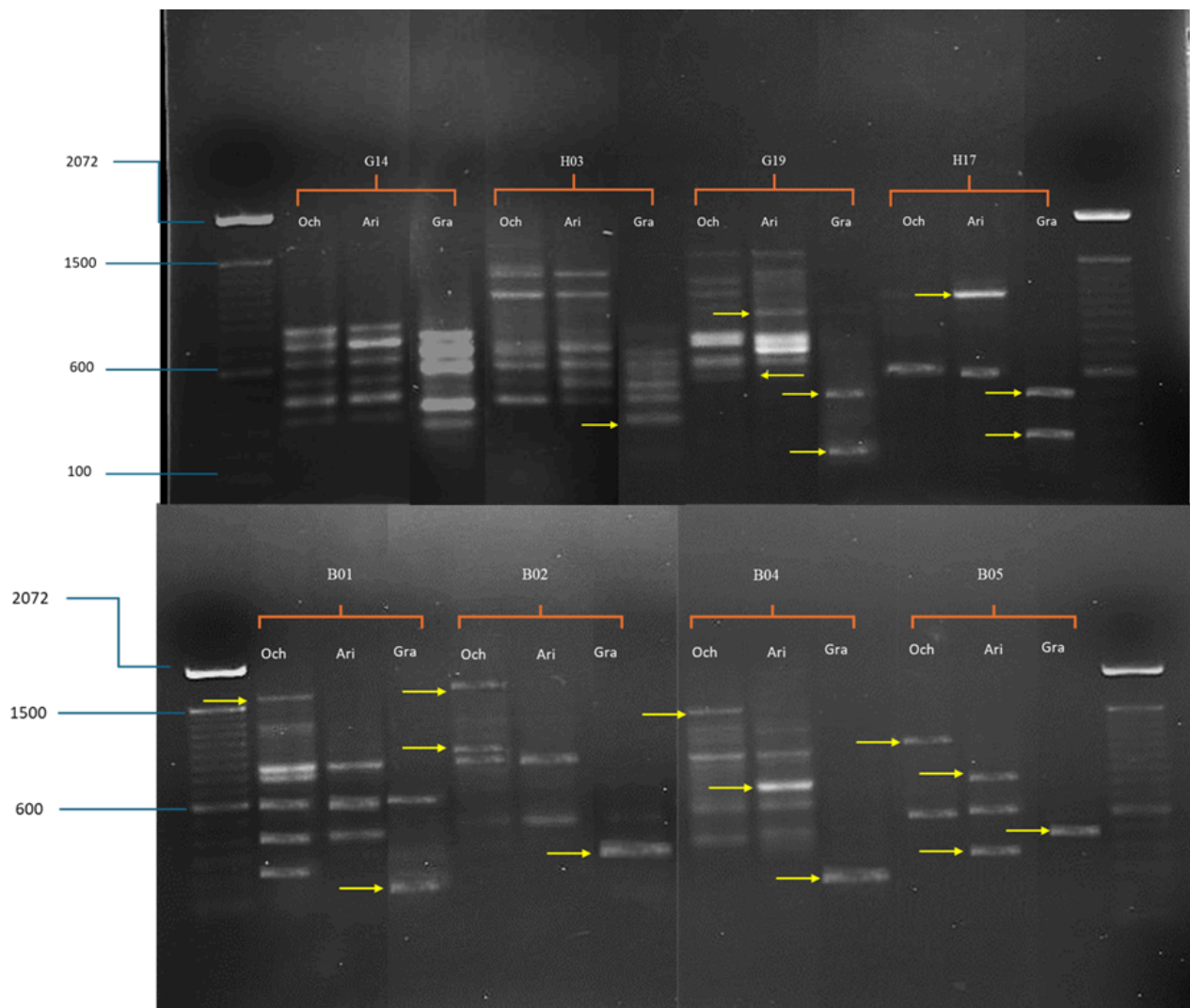


Figura 10. Patrón de bandas de amplificación obtenido con RAPD en *A. ochroleuca* (Och), *A. árida* (Ari) y *A. grandiflora* (Gra), con los iniciadores G14, H03, G19, H17, B01, B04, y B05. Fuente: Barrios Morales.

Al analizar los patrones de amplificación en las especies de *Argemone* mediante la técnica RAPD y utilizando los 10 iniciadores seleccionados (Tabla 1), se observaron diferencias en los patrones de amplificación y se detectó un total de 50 bandas bien definidas, con tamaños que oscilan aproximadamente entre 100 y 2072 pb. Con los iniciadores H03, H17, B01, y B02 se observaron de una a 2 bandas específicas en alguna de las especies estudiadas, mientras que con los iniciadores G19, B04 y B05 se observaron bandas específicas en las tres especies (Tabla 4). Con el iniciador G19 en *A. árida*, *A. ochroleuca* y *A. grandiflora* respectivamente se observaron bandas específicas o únicas de 1000 pb, 500 pb y 150pb, con el primer B04 en *A. árida*, *A. ochroleuca* y *A. grandiflora* el tamaño de las bandas únicas respectivamente fueron de 800 pb, 1500 pb y 300 pb. Con el iniciador B05 en *A. árida* se detectaron dos bandas específicas de 400pb y 800 pb, mientras que en *A. árida*, y *A. grandiflora* solo se observó respectivamente una banda específica de 1300 pb y 500 pb (Tabla 4 y figura 10 ). Karnawat & Malik, (2011), refieren en *A. mexicana* y *A. ochroleuca* utilizando RAPD, al igual que en el presente trabajo observaron diferencias en los patrones de amplificación y bandas específicas en cada especie (Karnawat & Malik, 2011). Con RAPD e ISSR se han podido establecer relaciones genéticas entre los híbridos de estas dos especies (Karnawat et al., 2013).

**Tabla 4** Tamaño de fragmentos específicos de especies de *Argemone* obtenidos con primers para RAPDS.

Tamaño de fragmentos (pb) y primers								
Especie	G14	H03	G19	H17	B01	B02	B04	B05
Ochr	-	-	500	-	1600	1700 1000	1500	1300
Árida	-	-	1000	1100	-	-	800	850 400
Grandi	-	300	150	400 200	200	300	300	500

Fuente: Barrios Morales.

Estos resultados y los de otros autores muestran que dependiendo de la secuencia del iniciador se pueden detectar bandas únicas en el género *Argemone* y que con RAPD es posible detectar variación intraespecífica en poblaciones del género *Argemone* y que las bandas específicas que resultan particularmente interesante, ya que podrían estar asociadas a diferencias intraespecíficas e interespecíficas. La presencia o ausencia de estas bandas específicas podrían ser utilizada como marcador diagnóstico para distinguir entre especies, así como para identificar híbridos (Karnawat et al., 2013). Estos fragmentos también podrían estar asociados a características fenotípicas o adaptativas particulares, abriendo la posibilidad para realizar estudios más profundos en genética funcional o evolución adaptativa en *Argemone spp.*

#### 7.5 Análisis de la relación genética en las poblaciones de *Argemone ochroleuca* y *Argemone árida*

Para el estudio de la variabilidad genética de la población silvestre de *Argemone ochroleuca* en el municipio de Tulancingo de Bravo, Hidalgo, se seleccionaron 10 iniciadores (primers) del tipo RAPD (Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar) para analizar la diversidad genética presente en 20 individuos, correspondientes a dos poblaciones. Además, se incluyó como referencia un ejemplar taxonómicamente caracterizado de *A. ochroleuca* y otro de *A. árida*, utilizados como controles morfológicos y genéticos. Para asegurar la calidad y confiabilidad de los resultados, únicamente se consideraron aquellas muestras cuyos patrones de bandas amplificadas se mostraron bien definidos y reproducibles, por lo que, se trabajó finalmente con 14 genotipos de los cuales ocho correspondientes a *A. ochroleuca* y seis a *A. árida*.

Con los 10 iniciadores seleccionados (de los 12 inicialmente evaluados), se obtuvo un total de 50 bandas bien definidas, de las cuales 35 fueron polimórficas, lo que representa un porcentaje de polimorfismo del 70%. Los patrones de amplificación generados mostraron entre 6 y 9 bandas por iniciador, con un rango de tamaño molecular estimado entre 100 y 2072 pares de bases (pb), lo que indica una buena resolución y capacidad discriminativa de los marcadores utilizados.



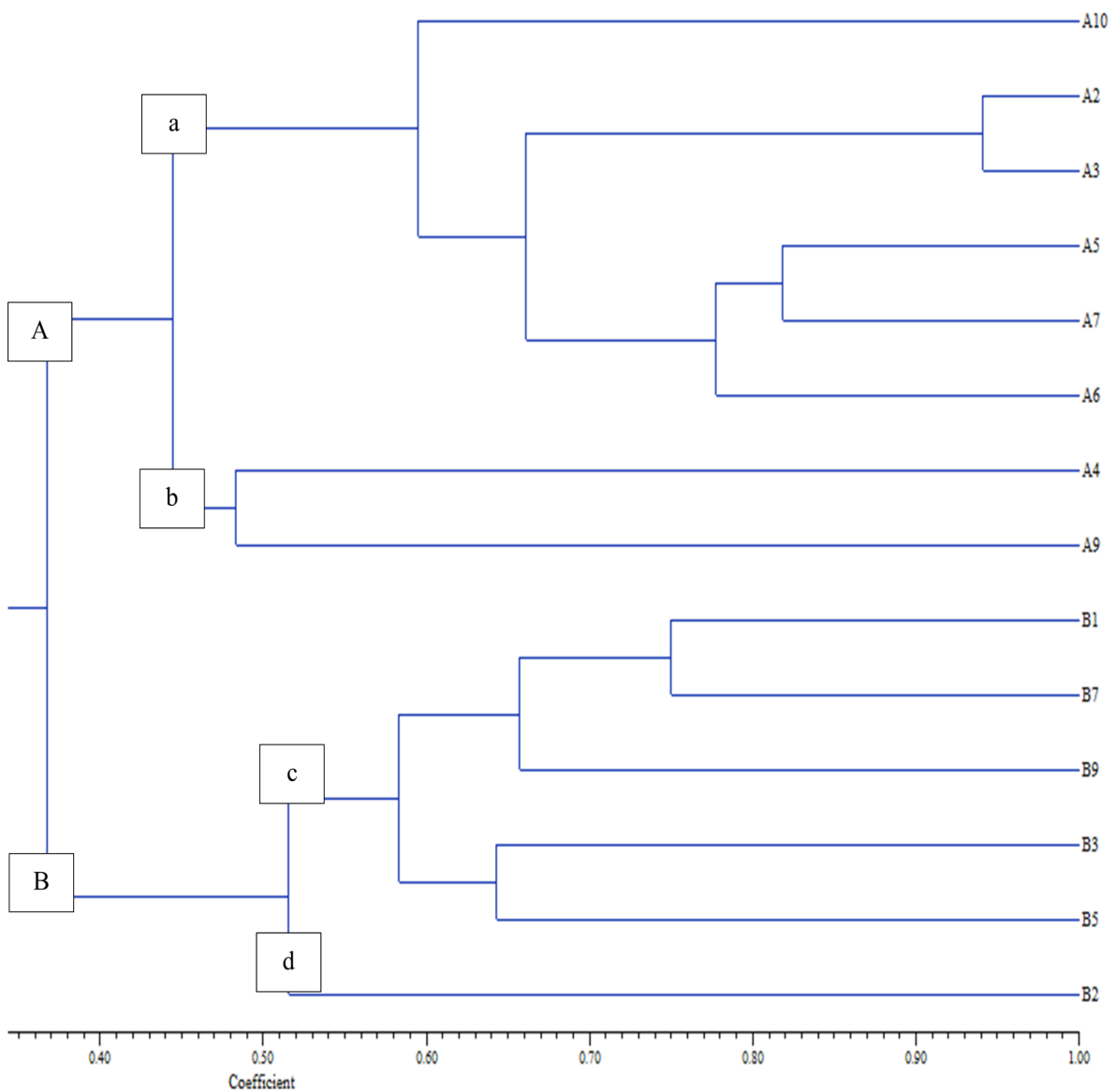


Figura 11. Dendrograma de dos poblaciones de Argemone (*A. árida* y *A. ochroleuca*) obtenido con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard. Fuente: Barrios Morales.

Con los 50 fragmentos obtenidos, se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia (Tabla 6), la cual fue utilizada para generar un dendrograma que muestra las relaciones de similitud genética entre los individuos estudiados. Este dendrograma fue elaborado mediante el uso del coeficiente de similitud de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). En la figura 10, se muestra que los 14 genotipos analizados fueron agrupados en dos grupos principales (A y B), por un coeficiente de similitud de 0.36, lo que indica una diferenciación genética moderada entre los grupos. En el grupo A se concentraron todos los individuos de la población de *A. árida* y en el grupo B los individuos de la población de *A. ochroleuca*.

El grupo A se subdividió en dos subgrupos (*a* y *b*) con un coeficiente de similitud de 0.45. El subgrupo *a* se dividió en 4 grupos en el que se incluyeron el 75% de los individuos de la población de *A. árida* y el subgrupo *b* incluyó al 25 % de los individuos de esta población. Por otro lado, el grupo B se subdividió en los subgrupos *c* y *d*, con un coeficiente de similitud de 0.55. El subgrupo *c*, se dividió en varios subgrupos en los que se incluyeron el 83.3% de los individuos de la población de *A. ochroleuca* y el subgrupo *d* incluyó al 16.7% de los individuos de esta población.

El hecho de que los individuos de cada población están conformado por un solo grupo muestra que la técnica de RAPD permite detectar variabilidad interespecífica, mientras que la subdivisión de grupos en varios subgrupos y que los rangos de similitud entre estos últimos varíen de 0.95 a 0.5 indica que existe gran variabilidad intraespecífica en las poblaciones analizadas. En las especies del género los estudios de variabilidad genética a nivel de poblaciones son escasos. Sin embargo, en un estudio en el que se analizó con RAPD la variabilidad genética en nueve plantas de *A. mexicana* provenientes de diferentes regiones de Arabia, al igual que en la presente investigación se detectó variabilidad intraespecífica, pero en *A. mexicana* los rangos de similitud fueron de 0.93 a 0.98 (Bazaid et al., 2011). Lo cual indica que existe poca diferenciación genética entre los individuos de *A. mexicana* posiblemente por un flujo genético

limitado por aislamiento geográfico o a que los genotipos introducidos en esas regiones eran genéticamente muy similares, mientras que los rangos de similitud de 0.95 a 0.5 observados en las poblaciones de *A. árida* y *A. ochroleuca* en la presente investigación puede atribuirse a que hay mayor flujo genético entre los individuos que conforman las poblaciones y que hay diferencias genéticas entre ellos. También con AFLP Cervantes et al (2010), detectaron variabilidad intraespecífica e interespecífica en poblaciones de *A. pleiacantha* subsp. *pinnatisecta*, *A. pleiacantha* subsp. *pleiacantha*, *A. squar-rosa*, and *A. polyanthemos* (Cervantes et al., 2010).

Los resultados de la presente investigación permiten inferir la existencia de una diferenciación genética clara entre *A. árida* y *A. ochroleuca*, así como una variabilidad genética significativa dentro de las poblaciones analizadas, lo que puede estar relacionado con procesos de adaptación local, flujo génico interno entre los individuos de la población de cada especie.

#### 7.6 Determinación de la relación genética de tres especies del género *Argemone*.

Al estudiar la relación genética de tres especies del género *Argemone* mediante la técnica RAPD y utilizando los 10 iniciadores indicados (Tabla 1), se detectó un total de 50 bandas bien definidas, con tamaños que oscilaban entre 100 y 2072 pb. De estas bandas, 33 fueron polimórficas. Las 50 bandas se emplearon para construir la matriz de datos (Tabla 7), a partir de la cual se elaboró un dendrograma utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA.

En el dendrograma (Figura 8), se observa la formación de dos grupos principales (A y B). El grupo A está conformado por *A. ochroleuca* y *A. árida* con un coeficiente de similitud de 0.67, mientras que *A. grandiflora* se separó de estas especies por un coeficiente de similitud de 0.09. El coeficiente de similitud entre *A. ochroleuca* y *A. árida* indica que existe una alta similitud genética entre estas especies, mientras que el índice de similitud entre estas especies y *A. grandiflora sugiere* la existencia de una diversidad genética significativa entre las especies

analizadas, destacando especialmente la marcada diferencia del índice de similitud de *A. grandiflora* dentro de las especies analizadas. Otros autores al igual que en el presente trabajo encontraron marcadas diferencias en el índice de similitud, al estudiar las relaciones genéticas entre *A. mexicano* y *A. ochroleuca*, utilizando RAPD, ISSR observaron respectivamente índices de similitud de 0.25 y 0.10 (Karnawat et al., 2013; Karnawat & Malik, 2011).

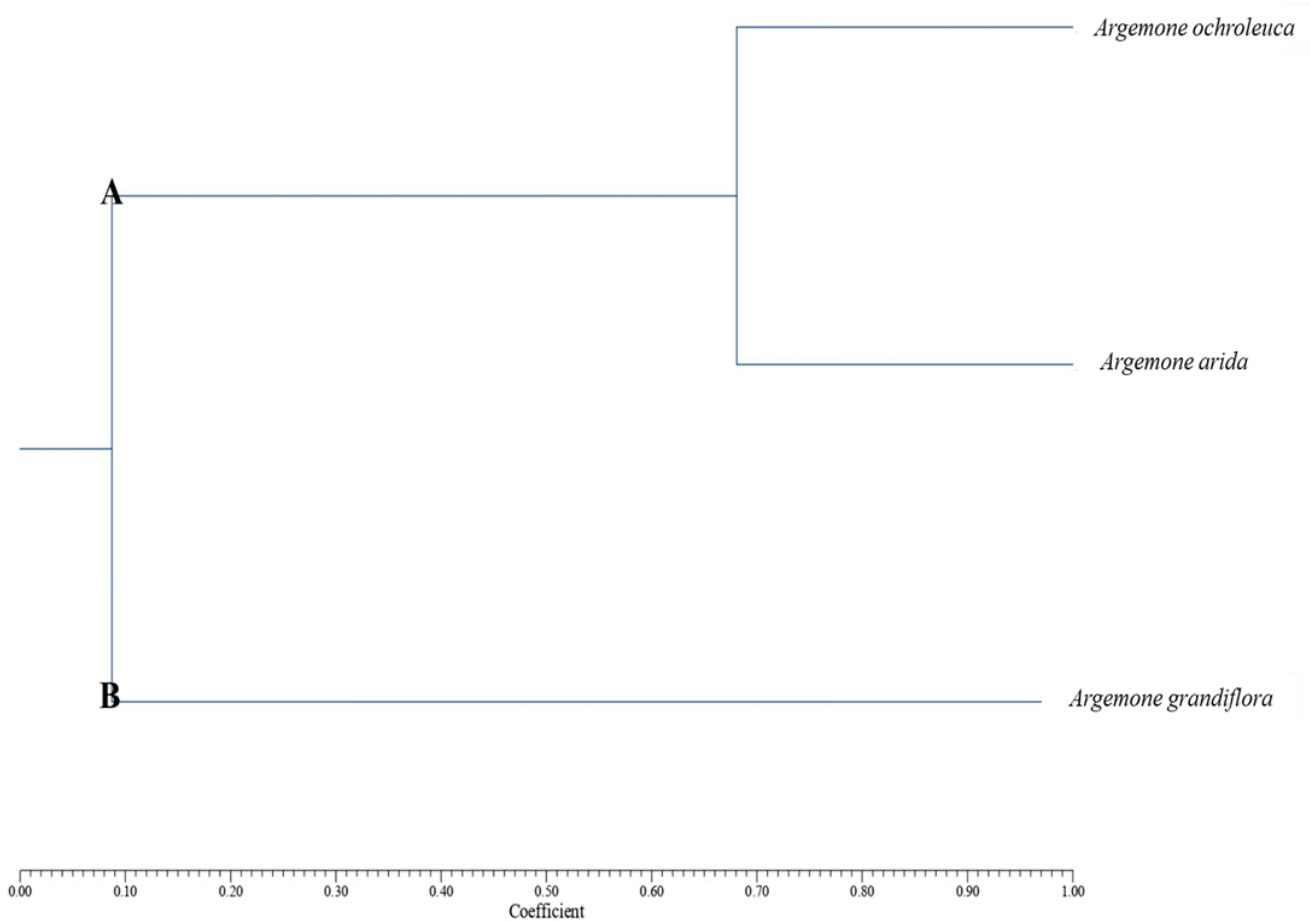


Figura 12. Dendrograma de tres especies de *Argemone* obtenido con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard. Fuente: Barrios Morales.

Estos valores son muy cercanos a los observados en la presente investigación. Sin embargo, las diferencias en los valores del índice obtenidos con RAPD, se pueden atribuir que se compararon especies diferentes y se emplearon iniciadores distintos. Las diferencias entre los valores de RAPD, ISSR se atribuyen al grado de sensibilidad del marcador e indican que ISSR es más sensible que RAPD y permite discriminar más diferencias genéticas entre las especies.

Los resultados de la presente investigación el menor índice de similitud que presentan *A. grandiflora* con respecto *A. ochroleuca* y *A. árida* sugiere un mayor grado de diferenciación evolutiva. Las diferencias observadas en los índices de similitud en el dendrograma, guardan correspondencia con las diferencias morfológicas observadas entre *A. grandiflora* y las otras dos especies las cuales son más similares entre y es posible que las diferencias estén relacionadas con el tamaño y coloración de la flor, la forma del fruto, tamaño de las espinas y época de floración (Ownbey, 1958).

## 7.7 Análisis de Varianza Molecular.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para dos poblaciones de *Argemone* reveló que la mayor proporción de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones 58.41 %, mientras que el 41.59 % de la variación corresponde a diferencias entre poblaciones. Estos resultados indican que, si bien existe una alta variabilidad genética, también hay una diferenciación genética considerable entre las poblaciones evaluadas. El valor de  $\Phi_{st}$  obtenido fue de 0.416, lo cual representa una diferenciación genética moderada a alta entre las poblaciones. Además, el análisis de permutaciones mostró un valor de  $P < 0.0099$ , indicando que la diferenciación genética observada entre poblaciones es estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que las poblaciones analizadas de *Argemone* presentan estructuras genéticas distintas y que la mayor parte de la diversidad genética está distribuida entre los individuos de cada una de las poblaciones, lo que podría estar relacionado con un sistema reproductivo parcialmente alógamas y con un flujo génico moderado.

**Tabla 5.** Resumen del análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro y entre poblaciones de *Argemone*.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Variación (%)	P	$\Phi_{st}$	$N_e m$
Entre poblaciones	1	36.7262	4.4455	41.59%	<0.009 9	0.41 6	0.35
Dentro de poblaciones	2	74.9167	6.2431	58.41%	-	-	-
<b>Total</b>	13	111.6429	10.6886	100%	-	-	-

*El análisis se basa en matrices de distancia entre 14 haplotipos. El nivel de significancia se estimó utilizando 100 permutaciones.*

Fuente: Barrios Morales.

No obstante, el porcentaje relativamente alto de variación entre poblaciones y el valor de  $N_e m$  de 0.35, también sugiere un grado de diferenciación genética, posiblemente influido por factores como barreras ecológicas tales como condiciones de suelos perturbados, barreras bióticas como la competencia con otras especies, la depredación y el aislamiento causado por actividades antropogénicas. Hasta el momento, no se han encontrado estudios específicos sobre el análisis de varianza molecular (AMOVA) en poblaciones del género *Argemone*. Sin embargo, en poblaciones de especies silvestre pertenecientes a la misma familia (Papaveraceae) del género *Argemone* y que comparten características biológicas similares. Shibing et al (2010) al analizar la variación genética con RAPD en *Meconopsis quintuplinervia* han reportado 78% de variación dentro de las poblaciones y entre poblaciones 21.7 % (Shibing et al., 2010), mientras que en poblaciones del género *Glaucium* con este mismo marcador se encontró un 67% de variabilidad entre las poblaciones y dentro de las poblaciones un 17%, (Jiao et al., 2021). En este mismo género con ISSR la variación observada entre poblaciones fue de 55% y dentro de poblaciones de 45%. Los resultados de estas investigaciones y los del presente trabajo indican que el nivel de variabilidad genética depende en gran medida del género, de la forma de vida de la planta, la distribución geográfica, el mecanismo de dispersión del polen, la selección natural y las actividades antropogénicas. Aunque actualmente, no sé a dado importancia a la conservación de la diversidad genética en el género *Argemone* es necesario preservar el mayor número posible de poblaciones silvestres mediante programa de conservación in situ o ex situ. En la conservación ex situ las introducciones deben realizarse para incluir representantes de tantas poblaciones como sea posible. La alta diversidad genética del material disponible, que podría utilizarse en programas de propagación artificial, debería reducir la depresión endogámica y facilitar el control de calidad de la producción de fármacos a partir de las plantas. Los resultados de este estudio muestran que los RAPD proporcionarán una herramienta valiosa para la caracterización molecular de las poblaciones y la identificación de especies del género.

## CONCLUSIONES

La técnica de RAPD permitió detectar bandas específicas a nivel intraespecífico e interespecífico en el género *Argemone*, así como la discriminación a nivel de especie

El iniciador H03 fue con el que se detectó mayor polimorfismo de bandas y con los que se observaron bandas específicas tienen gran potencial para la detección de variabilidad genética en poblaciones de otras especies del género y la identificación de especies.

Los valores de similitud de relaciones genéticas entre *A. árida* y *A. ochroleuca*, así como la clara divergencia de *A. grandiflora*, fueron coherentes con las diferencias morfológicas de las especies

La mayor proporción de variación genética se encontró dentro de las poblaciones, lo cual sugiere un sistema reproductivo parcialmente alógamas y un flujo génico moderado. Sin embargo, el grado considerable de diferenciación genética entre poblaciones indica la influencia de factores ecológicos, geográficos y antropogénicos sobre la estructura genética.

Este trabajo representa una aportación inicial al estudio de genética de poblaciones del género de *Argemone* spp. en México, dada la escasez de investigaciones con marcadores moleculares y análisis AMOVA. Además, destaca la necesidad de establecer estrategias de conservación y aprovechamiento sustentable de estas especies, muchas de las cuales poseen potencial medicinal y agrícola, aún poco explorado. Lo cual puede contribuir al fortalecimiento de la identidad biocultural y al desarrollo regional.



## PROYECCIONES FUTURAS

### **Secuenciación y análisis bioinformático de bandas específicas**

A partir de las bandas específicas obtenidas, se propone llevar a cabo su secuenciación para realizar un análisis detallado mediante bases de datos genómicas abiertas. Esto permitirá determinar si dichas secuencias corresponden a genes previamente caracterizados o a regiones funcionales de interés, lo que aportaría información valiosa sobre su posible función biológica.

### **Ampliación del estudio de variabilidad genética en el género *Argemone***

Se plantea extender el análisis de variabilidad genética a un mayor número de especies dentro del género *Argemone*, dado que actualmente existe escasa información científica al respecto. Este enfoque contribuirá a un conocimiento más integral de la diversidad genética y evolutiva del grupo.

### **Vinculación del conocimiento científico con acciones socioambientales**

Es fundamental promover la articulación del conocimiento científico con iniciativas de educación ambiental, rescate del conocimiento tradicional e implementación de estrategias de aprovechamiento sustentable que incluyan la participación de las comunidades locales. Estas acciones no solo contribuirán a la conservación de los recursos genéticos, sino también al fortalecimiento de la identidad biocultural y al impulso del desarrollo regional sostenible.

### **Exploración del potencial biotecnológico de las especies estudiadas**

Se sugiere orientar futuros análisis hacia la identificación de compuestos con propiedades medicinales o aplicaciones agrícolas presentes en las especies del género. Esto permitirá evaluar su viabilidad como fuentes de productos bioactivos con potencial para su desarrollo en el ámbito farmacéutico o agroindustrial.

## BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

*Argemone en Flora de Norteamérica*. (s/f). efloras. Recuperado el 3 de junio de 2025, de [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=1&taxon\\_id=102532](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=102532)

Asfaw, M. D., Yadeta, A. T., Yewalie, B. G., & Negash, Y. W. (2025). Production and characterization of biodiesel from *Argemone mexicana* seed oil. *Results in Chemistry*, 13, 102055. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2025.102055>

Babu, K. N., Sheeja, T. E., Minoo, D., Rajesh, M. K., Samsudeen, K., Suraby, E. J., & Kumar, I. P. V. (2021). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Derived Techniques. En P. Besse (Ed.), *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols* (pp. 219–247). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_13)

Bazaid, S. A., Mohamed Muneera, A. S., Hussein Sonya, H. M., & Sadik, A. S. (2011). Determination of DNA fingerprinting of nine *Argemone* plant samples using RAPD-PCR tool. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 8(2), 55–66.

*Bioseparaciones* (Segunda edición) (with Tejada Mansir, A., Gumán Zamudio, R., & Montesinos Cisneros, R. M.). (2011). Universidad de Sonora Pearson Educación.

Bohinski, R. C. (1991). *Bioquímica*. Alhambra Mexicana, Editorial, S.A. de C.V.

Calderón de Rzedowski, G., & Rzedowski, J. (2005). *Flora fanerogámica* (2a. ed). Instituto de Ecología, A.C., y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Cases, M. V., & Hens, A. G. (1994). *Técnicas analíticas de separación*. Reverte.

Cervantes, S. D., Tonne, P., Govindarajulu, R., Alexander, P. J., & Bailey, C. D. (2010). Population Genetic Analysis of Argemone Pleiakantha Subsp. Pinnatisecta (Sacramento Prickly Poppy, Papaveraceae) And Re-Evaluation Of Its Taxonomic Status. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 4, 261–269.

Chen, L., Hao, L., Parry, M. A. J., Phillips, A. L., & Hu, Y.-G. (2014). Progress in TILLING as a tool for functional genomics and improvement of crops. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(5), 425–443. <https://doi.org/10.1111/jipb.12192>

Cornejo Romero, A., Serrato Díaz, A., Rendón Aguilar, B., & Rocha Munive, M. G. (Eds.). (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos Y Prácticos* (1a ed.). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Cuéllar, N. M., Luján, M. C., & Cosa, M. T. (2015). Argemone Subfusiformis (Papaveraceae) Especie Nativa De Interés Etnomédico: Su Anatomía Y Aplicación En El Control De Calidad. *Arnaldoa*, 20, 69–82.

de Carvalho, J. A., Hagen, F., Fisher, M. C., de Camargo, Z. P., & Rodrigues, A. M. (2020). Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic Sporothrix species. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(7), e0008330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008330>

Duarte-Escalante, E., Frías-De-León, M. G., Zúñiga, G., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., & Reyes-Montes, M. del R. (2014). Molecular markers in the epidemiology and diagnosis of coccidioidomycosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.011>

Elkady, F. M., Al-Askar, A. A., Tawab, A. A., Alkherkhis, M. M., Arishi, A. A., & Hashem, A. H. (2022). Comparative Genotypic Analysis of RAPD and RFLP Markers for Molecular Variation Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Medicina*, 58(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/medicina58091245>

Espinosa, D., Ocegueda, S., Aguilar, C., Flores, O., & Llorente, J. (2008). *El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural*. 1, 33–65.

Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>

Fasanella, A., Van Ert, M., Altamura, S. A., Garofolo, G., Buonavoglia, C., Leori, G., Huynh, L., Zanecki, S., & Keim, P. (2005). Molecular Diversity of *Bacillus anthracis* in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3398–3401. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.7.3398-3401.2005>

Frankel, O. H., Brown, A. H. D., & Burdon, J. J. (1995). *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press.

García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., Rascón-Durán, M. L., & Astiazaran-García, H. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020(1), 8896738. <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>

González, L., López, R., Domínguez, M. y Gutiérrez, A. (2022). Reacción en cadena de la polimerasa. *Unidades de Apoyo para el Aprendizaje*. CUAIEED/FES Cuautitlán-UNAM. Recuperado el 5 de junio de 2025, de:

[https://repositorio-uapa.cuaed.unam.mx/repositorio/moodle/pluginfile.php/2162/mod\\_resource/content/4/contenido/index.html](https://repositorio-uapa.cuaed.unam.mx/repositorio/moodle/pluginfile.php/2162/mod_resource/content/4/contenido/index.html)

Halffter, G., Soberón, J., Koleff, P., & Melic, A. (2005). *Sobre Diversidad Biológica: El significado de las diversidades alfa, beta y gamma*. (1a ed., Vol. 4). m3m Monografías 3er Milenio.

Hernández-Ruiz, J., Bernal, J., Ruiz-Nieto, J. E., Gonzales-Castañeda, J., & Mireles-Arriaga, A. I. (2020). Argemone ochroleuca: (Papaveraceae), Alkaloid Potential Source for Agricultural and Medicinal Uses. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2), Article 2. <https://doi.org/10.56369/tsaes.2844>

Herráez, Á., & Luque Bazán, J. C. (2012). *Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud* (2a. edición). Elsevier.

Hua, G.-J., Hung, C.-L., Lin, C.-Y., Wu, F.-C., Chan, Y.-W., & Tang, C. Y. (2017). MGUPGMA: A Fast UPGMA Algorithm with Multiple Graphics Processing Units Using NCCL. *Evolutionary Bioinformatics*, 13. <https://doi.org/10.1177/1176934317734220>

Huenneke, L. F., Clason, D., & Muldavin, E. (2001). Spatial heterogeneity in Chihuahuan Desert vegetation: Implications for sampling methods in semi-arid ecosystems. *Journal of Arid Environments*, 47(3), 257–270. <https://doi.org/10.1006/jare.2000.0678>

Jiao, L., Xiao, H., Zhao, X., & Abarghuei, M. (2021). RAPD profiling in detecting genetic variation in *Glaucium* (papaveraceae) species: Edible and medicinal plant. *Genetika*, 53(3), 1081–1092. <https://doi.org/10.2298/GENSR2103081J>



Juárez-García, R. A., Sanzón-Gómez, D., Ramírez-Santoyo, L. F., & Gonzales-Castañeda, J. (2020). Revisión: El Género *Argemone* (Papaveraceae) Y Los Usos Para El Control De Plagas En El Sector Agrícola. *1*(2), 71–83.

Juárez-Muñoz, J., Carrillo-Castañeda, G., Arreguin, R., & Rubluo, A. (2002). Inter- and intra-genetic variation of four wild populations of *Prosopis* using rapd-pcr fingerprints. *Biodiversity & Conservation*, *11*(5), 921–930.  
<https://doi.org/10.1023/A:1015375803204>

Karnawat, M., Hora, A., & Malik, C. P. (2013). The use of RAPD and ISSR markers for Genetic Relationship of two *Argemone* Species and Natural “Hybrids”. *Journal of Plant Science Research*, *29*(1), 55.

Karnawat, M., & Malik, C. P. (2011). Determination of nature of polyploidy in *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* Sweet. *The Nucleus*, *54*, 153–158.

Khan, A. S., Amara, P. S., & Morse, S. A. (2020). Forensic public health. *Microbial Forensics*, 105–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815379-6.00008-8>

Klug, W. S., Cummings, M. R., & Spencer, C. A. (2011). *Conceptos de genética* (8<sup>a</sup> ed). Pearson Prentice Hall.

Kolhmann, B. C. (1994). Algunos aspectos de la taxonomía numérica y sus usos en México. En J. Llorente Bousquets & I. Luna Vega (Eds.), *Taxonomía biológica* (pp. 65–82). Ediciones Científicas Universitarias, UNAM.

Kumar, D. (2025). 5—The genomic and precision medicine in clinical practice—Current perspectives and future directions. En D. Kumar & R. Chadwick (Eds.), *Genomics, Populations, and Society* (pp. 123–136). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91799-5.00017-6>

Labadie-Bracho, M. Y., & Adhin, M. R. (2023). Advocating for PCR-RFLP as molecular tool within malaria programs in low endemic areas and low resource settings. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(11), e0011747.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011747>

Leite, A. A. S., Weber, L. V., Correa, J. P. A., de Castro, T. L. A., da Silva, C. C. M., da Costa e Silva, R. M. F., Cardoso, C. A. L., & Konradt-Moraes, L. C. (2024). Biodiesel production potential of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms: Comparison of collection sites and different alcohol transesterifications. *Scientific Reports*, 14(1), 1586. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51913-y>

Lin, Y., Lin, C., Hung, C., Chung, Y., & Lee, K. (2015). GPU-UPGMA: High-performance computing for UPGMA algorithm based on graphics processing units. *Concurrency and Computation: Practice and Experience*, 27(13), 3403–3414. <https://doi.org/10.1002/cpe.3355>

Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270.

<https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>

Martínez-Delgado, A. A., Anda, J. de, León-Morales, J. M., Mateos- Díaz, J. C., Gutiérrez-Mora, A., & Castañeda-Nava, J. J. (2022). Argemone species: Potential source of biofuel and high-value biological active compounds. *Environmental Engineering Research*, 27(2). <https://doi.org/10.4491/eer.2020.619>

Maxted, N., Ford-Lloyd, B. V., & Hawkes, J. G. (Eds.). (1997). *Plant Genetic Conservation*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1437-7>



Milbourne, D., Meyer, R. C., Collins, A. J., Ramsay, L. D., Gebhardt, C., & Waugh, R. (1998). Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular and General Genetics MGG*, 259(3), 233–245.

<https://doi.org/10.1007/s004380050809>

Mlombo, N. T., Makhubu, F. N., Dube, Z. P., & Tshikalange, T. E. (2025). Uso potencial de *Argemone ochroleuca* Sweet y *Argemone mexicana* Linn como plaguicidas alternativos: Una revisión sistemática sobre su actividad biológica y fitoquímica. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 136, 102534.

<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102534>

Nadon, C. A., Trees, E., Ng, L. K., Nielsen, E. M., Reimer, A., Maxwell, N., Kubota, K. A., Gerner-Smidt, P., & Group, C. the M. H. W. (2013). Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance.

*Eurosurveillance*, 18(35), 20565.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.35.20565>

National Research Council. (1989). *Opportunities in Biology*. The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/742>

Ojeda, E. M. (1982). Flora de Veracruz-Papaveraceae. En *Flora de Veracruz*. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.

<https://doi.org/10.21829/fv.466.1982.22>

Ownbey, Gerald B. (1958). Monograph of the genus *Argemone* for North America and the West Indies. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 21, 1–159.

Ramírez-Bello, J. (2019). Papel de la variabilidad genética en las enfermedades mendelianas y multifactoriales. *Gaceta Médica de México*, 155(5).

<https://doi.org/10.24875/GMM.18004156>

Ricci, M. D., & Junqueira, P. A. de A. (2008). Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 54, 189–189. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000300001>

Romesburg, H. C. (2004). *Cluster analysis for researchers*. Lulu Press.

Rouhan, G., & Gaudeul, M. (2021). Plant Taxonomy: A Historical Perspective, Current Challenges, and Perspectives. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2222, 1–38. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_1)

Sarukhan, J. (Ed.) (with Soberón Mainero, J.). (2008). *Capital natural de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Selvakumar, R., Jat, G. S., & Manjunathagowda, D. C. (2023). Allele mining through TILLING and EcoTILLING approaches in vegetable crops. *Planta*, 258(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04176-2>

Stewart Jr., C. N., & Excoffier, L. (1996). Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *Journal of Evolutionary Biology*, 9(2), 153–171. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1996.9020153.x>

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

Ullah, I., Afridi, S. G., Khan, A. U., Israr, M., Ali, A., Shams, S., Jabeen, H., Rasool, A., Akbar, F., Rahat, M. A., Haris, M., Khan, A., Siraj, M., & Shah, M. (2021). PCR-RFLP Based genetic diversity of *Plasmodium vivax* genotypes in district Mardan, Pakistan. *Brazilian Journal of Biology*, 82, e241110. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.241110>

Valcárcel Cases, M., & Gómez Hens, A. (1994). *Técnicas analíticas de separación*. Reverté, S. A.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, *18*(22), 6531–6535.  
<https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR Past, Present and Future. *BioTechniques*, *69*(4), 317–325.  
<https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>

## APÉNDICE

### **Preparación de Iniciadores:**

Los iniciadores liofilizados fueron disueltos en 1000 microlitros (1 ml) de agua desionizada estéril para preparar una solución con una concentración final de 10 pmol/ $\mu$ L. La cantidad exacta de iniciador utilizada para esta disolución se determinó en función del peso molecular del iniciador específico, el cual es proporcionado por los fabricantes comerciales al momento de la compra. Este paso es fundamental para garantizar que la concentración de los iniciadores sea precisa y adecuada para las reacciones subsecuentes de PCR o cualquier otro procedimiento de amplificación de ADN. La precisión en la preparación de los iniciadores es crucial, ya que la concentración incorrecta puede llevar a la amplificación ineficiente o a la generación de productos no deseados.

### **Preparación de la Mezcla de dNTPs:**

Para preparar la mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), se añadió a un tubo Eppendorf un volumen de 5  $\mu$ L de cada una de las soluciones concentradas de dNTPs (guanina, citosina, timina y adenina) proporcionadas por la casa comercial Gibco. Cada una de estas soluciones se encontraba originalmente en una concentración de 100 mM, lo que es estándar para estos reactivos. Tras la

adición de los nucleótidos, se completó el volumen final de la mezcla añadiendo 980  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, obteniendo así un volumen total de 200  $\mu\text{L}$  de una solución dNTPs. Esta mezcla final tiene la concentración adecuada para la PCR, donde los dNTPs son esenciales para la síntesis de nuevas cadenas de ADN. La preparación precisa y estéril de la mezcla asegura que no haya contaminantes que puedan interferir con las reacciones subsecuentes.

#### **Amortiguador TAE 10X:**

24 g de hidroximetil aminometano

5.71 ml de ácido acético glacial

10 ml de EDTA (0.5M, pH 8)

Aforar a un volumen de 500 ml con agua destilada.

#### **Preparación de Amortiguador TAE 1X:**

Tomar 10 ml de TAE 10x y aforar a 100 ml con agua destilada.

#### **Gel de agarosa:**

Para la preparación del gel de agarosa, se pesaron 1.2 g de agarosa tipo II (Sigma) y se disolvieron en 100 mL de amortiguador TAE 1X dentro de un matraz Erlenmeyer con capacidad de 500 mL. La mezcla se calentó en un horno de microondas durante 1 minuto con 40 segundos hasta que la agarosa se fundió por completo. Posteriormente, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 30°C.

Una vez enfriado, la solución se vertió en la cámara de electroforesis previamente preparada, asegurando el sellado de los extremos y la correcta colocación del peine, lo que permitió la formación de los pozos para la carga de las muestras. Estas cantidades fueron las necesarias para la preparación de un gel con dimensiones de 15 × 15 cm y 7 milímetros.

Cabe destacar que, en la evaluación de la integridad del ADN, se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, con la única modificación en la concentración de agarosa, empleando 0.8 g en lugar de 1.2 g, con el fin de optimizar la resolución de fragmentos de mayor tamaño.

#### **Colorante de carga:**

Cantidades para 10 ml

50% glicerol                      10 ml

0.1% Azul de bromofenol    10 ml

0.1% Xilen cianol                10 mg

La preparación se llevó a cabo en un vaso de precipitados con capacidad de 15 mL. Se agregaron los tres componentes y la mezcla se colocó sobre una parrilla eléctrica con agitación durante 15 minutos, hasta lograr una disolución homogénea.

Este colorante de carga se utiliza para facilitar la visualización y seguimiento de la migración de las muestras de ADN durante la electroforesis en gel de agarosa.

#### **Marcador 100 pb DNA (50 µg/µL):**

Cantidades para 100 µL.

Para la preparación de una solución de marcador de 100 pb de ADN con una concentración final de 0,1 µg/µL, se tomó un volumen de 10 µL del marcador original (50 µg/µL) y se diluyó en 90 µL de colorante de carga. La dilución se realizó en un tubo Eppendorf de 1 mL, asegurando una adecuada homogeneización de la solución.

Esta solución diluida se empleó como referencia para la estimación del tamaño de los fragmentos de ADN durante la electroforesis en gel de agarosa.

#### **Preparación de la solución de bromuro de etidio (5 mg/mL):**

La preparación de la solución de bromuro de etidio (5 mg/mL) debe realizarse con estrictas medidas de seguridad, debido a la naturaleza tóxica y potencialmente cancerígena de este compuesto. Para minimizar el riesgo de contaminación y exposición, se recomienda el uso de guantes, mascarilla y gafas de seguridad durante su manipulación.

La solución debe prepararse en un recipiente pequeño exclusivo para este propósito, asegurando que no entre en contacto con otros materiales de laboratorio. Además, se debe trabajar en un área designada y bien ventilada, preferiblemente dentro de una campana de extracción. Tras su uso, cualquier residuo o material contaminado debe ser desecado siguiendo los protocolos establecidos para residuos peligrosos.

**Tabla 6.** Matriz binaria de *Argemone ochroleuca* (A) y *Argemone árida* (B).

Fenotipo	Patrón de bandas													
	A10	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A9	B1	B2	B3	B5	B7	B9
Primer														
G14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
G14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G14	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
G14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G14	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0
G14	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
H09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
H09	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
G11	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
G11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
G11	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

G11	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
G11	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
G11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
B05	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
B05	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
B05	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
B04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B04	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
B04	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
B04	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
B04	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
B04	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
B02	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B02	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
B02	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
B03	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B03	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H02	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
H02	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
H02	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
H02	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
H02	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
H02	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
G19	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
G19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
G19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H03	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

H03	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H03	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H03	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
H03	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
H03	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
H03	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
H03	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0

Fuente: Barrios Morales.

**Tabla 7.** Matriz binaria de cuatro especies de *Argemone*.

Patrón de bandas			
Fenotipo	<i>A.ochroleuca</i>	<i>A.árida</i>	<i>A.grandiflora</i>
Primer			
G14	1	1	1
G14	1	1	0
G14	1	1	0
G14	1	1	0
G14	1	1	1
G14	1	1	0
H02	1	0	0
H02	0	0	0
H02	0	0	0
H02	0	0	0
H03	1	1	0
H03	1	1	0
H03	1	1	0
H03	1	1	0



H03	1	1	1
H03	1	1	0
H03	0	0	0
G19	1	1	0
G19	0	1	0
G19	1	1	0
G19	1	1	0
G19	0	1	0
G19	1	1	0
G19	1	1	0
G19	0	1	0
G19	1	1	0
G19	1	1	0
G19	0	0	0
G19	0	0	0
H17	1	0	0
H17	1	0	0
H17	1	1	0
H17	1	0	0
B01	1	1	0
B01	1	1	0
B01	1	0	1
B01	0	0	0
B01	1	0	0
B01	1	0	0
B01	1	1	0
B01	1	1	0
B02	1	0	0
B02	1	1	0

B02	1	0	0
B02	1	0	0
B04	1	1	0
B04	1	0	0
B04	1	1	0
B04	1	1	0
B04	0	1	0
B04	1	1	0
B04	0	1	0
B04	1	1	0
B05	0	0	0
B05	1	0	0
B05	0	1	0
H09	1	1	0
H09	0	0	0
H09	0	0	0
H09	1	1	0

---

Fuente: Barrios Morales.