



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Fitotecnia

Maestría en Ciencias en Horticultura

MANEJO *in vitro* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
AHUEHUETE (*Taxodium mucronatum* Ten.)

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



PRESENTA:

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
ORIGINAL DE EXAMENES PROFESIONALES

CLAUDIA PAOLA MORA CÓRDOVA

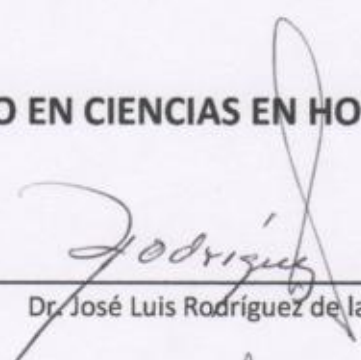
CHAPINGO, MÉXICO, 6 DE JUNIO DE 2012.

MANEJO *In vitro* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AHUEHUETE (*Taxodium mucronatum* Ten.)

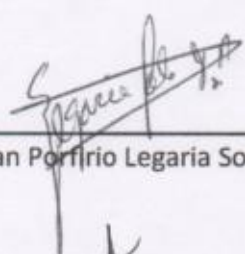
Tesis realizada por la IBT Claudia Paola Mora Córdova, bajo la dirección del comité asesor indicado; aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: _____


Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR: _____


Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR: _____


Dra. Ma. Amparo Borja de la Rosa

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme llegar a esta etapa y estar siempre presente día con día en mi vida, ayudarme a superar todos los obstáculos y guiarme durante toda la vida.

A **CONACYT** por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por abrirme las puertas de esta casa de estudios tan ampliamente reconocida y por todos los servicios proporcionados.

A mi director **Dr. José Luis Rodríguez de la O** por todo su tiempo, dedicación, apoyo incondicional y consejos durante más de dos años y más que un profesor ha sido un gran ejemplo para mí.

A mis asesores **Dr. Juan Porfirio Legaria Solano** y **Dra. Amparo Borja de la Rosa**, por el tiempo, apoyo y recursos proporcionados para la realización de mi tesis.

Al **Dr. Rolando Ramírez** de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por su aportación de datos bibliográficos a este trabajo.

Al profesor **Alejandro Corona Ambriz** de la DICIFO por sus horas dedicadas a la asesoría y análisis estadístico de los datos de esta tesis.

A todos los **profesores** que me dieron clase durante mis estudios de Maestría:

A todos los **amigos nacionales e internacionales** que conocí en Chapingo, gracias por todos los momentos de alegría y risas que compartimos y sobre todo por su gran amistad y cariño.

A mis **papás** y **hermano** por todo el apoyo otorgado durante toda mi vida, pero sobre todo durante esta última etapa.

A mis **amigos de toda la vida**, por esa amistad que ni el tiempo ni la distancia han quebrantado, sino que al contrario, se ha hecho más fuerte y que aunque cada quien comienza una etapa más en su vida, sé que siempre nos unirá esa amistad que un día se forjó.

A todos ellos, muchas gracias.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora del presente trabajo nació en Cuernavaca, Morelos, “La Ciudad de la Eterna Primavera” el 26 de enero de 1987. Realizó sus estudios de licenciatura en la Universidad Politécnica del Estado de Morelos, recibiendo el título de Ingeniera en Biotecnología en el periodo 2005-2009, donde escribió la tesina “Desarrollo de técnicas para la propagación *in vitro* y por esqueje de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*)”. Durante el periodo 2009-2010 trabajó en el Laboratorio de Control Industrial DIFAZA, como analista en el área de microbiología. En el 2010 ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo para realizar estudios de Maestría en Ciencias en Horticultura en el Departamento de Fitotecnia.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Origen y distribución del ahuehuete	4
2.2. Descripción botánica y taxonómica del ahuehuete	5
2.2.1. Clasificación taxonómica	11
2.3. Nombres comunes	12
2.4. Propagación del ahuehuete	13
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	15
2.6. Manejo <i>in vitro</i> de especies forestales	21
2.7. Marcadores moleculares	25
2.5.1. RAPD	29
2.5.2. ISSR.....	33
2.8. Caracterización molecular	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.3. Manejo <i>in vitro</i> de ahuehuete (<i>Taxodium mucronatum</i> Ten.)	37
3.3.1. Material vegetal	37

3.3.2.	Medio de cultivo.....	38
3.3.3.	Bioensayo 1.....	38
3.3.4.	Bioensayo 2.....	42
3.3.5.	Multiplicación.....	44
3.3.6.	Enraizamiento.....	44
3.3.7.	Transferencia a sustrato e invernadero.....	46
3.4.	Caracterización molecular.....	47
3.4.1.	Material vegetal.....	47
3.4.2.	Extracción de ADN.....	50
3.4.3.	Concentración y calidad de ADN.....	52
3.4.4.	Reacción PCR.....	53
3.4.5.	Electroforesis.....	56
3.4.6.	Análisis estadístico de la información.....	57
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
4.1.	Respuestas morfogénicas.....	59
4.1.1.	Bioensayo 1.....	59
4.1.2.	Bioensayo 2.....	70
4.1.3.	Enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero.....	76
4.1.4.	Escalamiento de cultivo <i>in vitro</i>	79
4.2.	Caracterización molecular.....	80

4.2.1.	Extracción de ADN	80
4.2.2.	Análisis y construcción de iniciadores	84
4.2.3.	Análisis de escalado multidimensional	90
4.2.4.	Construcción de dendrogramas.....	92
4.2.5.	Análisis de poblaciones	102
5.	CONCLUSIONES	108
6.	BIBLIOGRAFÍA	110

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en el primer bioensayo, se utilizaron como reguladores de crecimiento dos citocininas (2 ip y BA) y una auxina (2,4-D).....	39
Cuadro 2. Tratamientos utilizados en el bioensayo número 2, se utilizaron como reguladores de crecimiento dos citocininas (KIN y Zea) y una auxina (AIA).	42
Cuadro 3. Tratamientos utilizados en el bioensayo número 2, se utilizaron como reguladores de crecimiento dos citocininas (2 ip y TDZ) y una auxina (AIB).	42
Cuadro 4. Concentración de los elementos utilizados para preparar el medio de enraizamiento.....	45
Cuadro 5. Tratamientos utilizados para promover el enraizamiento, se utilizaron como reguladores de crecimiento una citocinina (BA), una auxina (AIB) y una giberelina (AG ₃).	45
Cuadro 6. Estados donde se recolectó el material vegetal para el estudio realizado con marcadores moleculares.	48
Cuadro 7. Características físicas de los árboles y de las cápsulas recolectadas..	49
Cuadro 8. Reactivos utilizados para la extracción de ADN.	51
Cuadro 9. Reactivos utilizados para PCR.	55
Cuadro 10. Iniciadores utilizados para generar los marcadores RAPD e ISSR para la caracterización de individuos de ahuehuete.....	56
Cuadro 11. Número de individuos considerados por cada población para el análisis de poblaciones.	58
Cuadro 12. Formación promedio de brotes nuevos, longitud promedio y longitud máxima de los ápices y yemas sembradas en el medio T4 durante 6 meses.....	61

Cuadro 13. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de la variable número de brotes nuevos producidos por ápice y por yema.	63
Cuadro 14. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de la variable incremento en la longitud de los brotes producidos	68
Cuadro 15. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de la variable incremento en la longitud de los explantes (ápices y brotes).	74
Cuadro 16. Longitud promedio y longitud máxima de los brotes de 1.5 cm sembrados en el medio T8 y de los ápices sembrados en el medio T11 durante 3 meses.....	75
Cuadro 17. Comportamiento del brote de ahuehuete puesto en sustrato durante 8 meses.....	77
Cuadro 18. Número de bandas obtenidas por iniciador en la caracterización de individuos de ahuehuete.	85
Cuadro 19. Matriz de similitud entre 20 individuos de ahuehuete, generada a partir de datos moleculares utilizando el coeficiente de Jaccard.	101
Cuadro 20. Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para cinco poblaciones de ahuehuete.	104
Cuadro 21. Variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones de ahuehuete (<i>Taxodium mucronatum</i> Ten.).	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del ahuehuete (<i>Taxodium mucronatum</i> Ten.) en Estados Unidos y México.	4
Figura 2. Ramas terminales péndulas del ahuehuete, las hojas están dispuestas de manera alterna en dos hileras.	7
Figura 3. Estróbilos masculinos dispuestos en racimos.	8
Figura 4. Fruto globoso en etapa juvenil.	10
Figura 5. <i>Taxodium mucronatum</i> Ten. A) Rama con flores y frutos. B) Detalle de la hoja. C) Fruto maduro. D) Semillas.	11
Figura 6. Tipos de explante utilizados en el bioensayo 1. A) Hoja, B) Yema, C) Ápice.	40
Figura 7. Yemas sembradas en medio de cultivo MS en el bioensayo 1.	41
Figura 8. Explantes de hoja basal (A) y ápice (B) sembrados en medio de cultivo en el bioensayo 1.	41
Figura 9. Brotes de diferentes tamaños utilizados en el bioensayo 2. A) Brote de 1.5 cm, B) Brote de 0.5 cm, C) Brote de 0.3 cm.	43
Figura 10. Calidad de ADN de 30 de los 70 individuos probados.	53
Figura 11. Diagrama de temperaturas y tiempos utilizados para la amplificación de ADN mediante RAPD en el termociclador Techne TC-512.	54
Figura 12. Diagrama de temperaturas y tiempos utilizados para la amplificación de ADN mediante ISSR en el termociclador Techne TC-512.	54
Figura 13. Porcentajes de oxidación que presentaron los explantes (ápices y yemas) en el bioensayo 1.	59

Figura 14. Porcentajes de los explantes contaminados, oxidados y sanos en el bioensayo 1.....	60
Figura 15. Producción de brotes nuevos comparando los cuatro tratamientos en el transcurso de 6 meses.	64
Figura 16. Respuestas morfogénicas al tratamiento T4 de los explantes de <i>T. mucronatum</i> Ten. A) Establecimiento del explante (yema); B) Explante de yema con brotes nuevos al cabo de 4 meses; C) Establecimiento del explante ápice; D) Ápice desarrollado después de 4 meses.....	65
Figura 17. Respuestas morfogénicas de <i>T. mucronatum</i> Ten. en cultivo <i>in vitro</i> con cuatro tratamientos diferentes. A) Tratamiento 1: (0.0 mg/L 2, 4-D; 0.0 mg/L AIB; 0.0 mg/L 2 ip); B) Tratamiento 2: (0.1 mg/L 2, 4-D; 0.3 mg/L AIB; 1.0 mg/L 2 ip); C) Tratamiento 3: (0.3 mg/L 2, 4-D; 1.0 mg/L AIB; 3.0 mg/L 2 ip) y C) Tratamiento 4: (1.0 mg/L 2, 4-D; 3.0 mg/L AIB; 5.0 mg/L 2 ip).	67
Figura 18. Incremento en la longitud de los brotes de <i>T. mucronatum</i> Ten., comparación entre los cuatro tratamientos utilizados.....	69
Figura 19. Número de explantes oxidados (ápices) de <i>T. mucronatum</i> Ten. a lo largo de 5 meses.	72
Figura 20. Número de explantes oxidados (brotes) de <i>T. mucronatum</i> Ten. a lo largo de 5 meses.	72
Figura 21. Calidad de ADN extraído de 30 individuos de ahuehuete.	81
Figura 22. Patrones de bandeo ISSR obtenidos al probar el iniciador IAH01. Se observa que no hay presencia de polimorfismos.	84
Figura 23. Patrones de bandeo RAPD obtenidos con los iniciadores A) B01 y B) B06 para 20 individuos de ahuehuete.	88

Figura 24. Patrones de bandeo ISSR obtenidos con los iniciadores IAH02, IAH03, IAH04 e IAH05 para 20 individuos de ahuehuate.....	89
Figura 25. Gráfica en 2 D mostrando la distribución de los grupos de los genotipos de <i>T. mucronatum</i> Ten., luego de realizar un análisis de escalado multidimensional.....	91
Figura 26. Gráfica en 3 D que muestra la distribución de grupos de los genotipos de <i>T. mucronatum</i> Ten., luego de realizar un análisis de escalado multidimensional.....	92
Figura 27. Dendrograma de relaciones entre 20 genotipos de <i>T. mucronatum</i> Ten. Obtenido con datos de RAPD.	97
Figura 28. Dendrograma de relaciones entre 20 genotipos de <i>T. mucronatum</i> Ten., obtenido con datos de ISSR.....	98
Figura 29. Dendrograma de relaciones entre 20 genotipos de <i>T. mucronatum</i> Ten., obtenido con datos de consenso “RAPD e ISSR”.	99

MANEJO *in vitro* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AHUEHUETE (*Taxodium mucronatum* Ten.)

CONTROL *in vitro* AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BALD CYPRESS (*Taxodium mucronatum* Ten.)

C. P. Mora-Córdova¹; J. L. Rodríguez-de la O²

¹Estudiante tesista de la Maestría en Ciencias en Horticultura. ²Director de tesis. Posgrado de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

RESUMEN

Se evaluaron las respuestas morfogénicas *in vitro* de ahuehuete *Taxodium mucronatum* Ten. Las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), suplementadas con 0.40 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0.1% de carbón activado para el control del necrosamiento, y la combinación de 1.0 mg.L⁻¹ de 2, 4-D; 3.0 mg.L⁻¹ de AIB y 5.0 mg.L⁻¹ de 2 ip favorecieron el desarrollo de hasta cuatro nuevos brotes y su crecimiento. La caracterización molecular con 3 marcadores del tipo RAPD y 5 ISSR, detectaron la variabilidad genética y las relaciones intergénicas entre cinco poblaciones. Se concluyó que los marcadores ISSR son mejores discriminantes que los RAPD para la formación de agrupamientos de especies, las poblaciones del Estado de México y Distrito Federal están más relacionadas, mientras que las de Oaxaca y Morelos se encuentran más alejadas genéticamente y que existe una mayor variación genética intrapoblación entre los individuos del estado de Morelos.

Palabras claves: micropropagación, auxinas, citocininas, RAPD, ISSR

ABSTRACT

It was evaluated *in vitro* morphogenic responses of bald cypress *Taxodium mucronatum* Ten. Inorganic salts of Murashige and Skoog (1962), supplemented with 0.40 mg.L⁻¹ of thiamine, 100 mg.L⁻¹ of myo-inositol, 0.1% of activated carbon to control browning, and the combination of 1.0 mg.L⁻¹ of 2, 4-D, 3.0 mg.L⁻¹ of IBA and 5.0 mg.L⁻¹ of 2-ip, favored the development of four new shoots and growth. Molecular characterization with markers, 3 RAPD type and 5 ISSR, detected a genetic variability and intergenic relationships among five populations. It was concluded that ISSR markers are better discriminant than RAPD for the formation of clusters of species, the populations Mexico State and Mexico City are more related, while those from Oaxaca and Morelos are more distant genetically, and that there exists a greater intrapopulation genetic variation among individuals of the state of Morelos.

Keywords: micropropagation, auxins, cytokinins, RAPD, ISSR

1. INTRODUCCIÓN

El ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten.) es el árbol emblemático más longevo e importante de México, esta especie incluye árboles de aproximadamente 1000 años de edad que se extienden a lo largo de manantiales y arroyos que emergen de pastizales de mezquites (Gilman *et al.*, 1994).

Es un árbol ornamental, de sombra, su madera se utiliza en la fabricación de canoas, postes y vigas, ya que ésta es muy resistente a la humedad, es suave y se puede pulir fácilmente, aunque por considerarse el árbol nacional, no se aprovecha industrialmente (Aguilera, 2001 y Zanoni, 1982).

En cuanto a sus propiedades medicinales, la resina de este árbol se utiliza como antiséptico, para curar heridas, úlceras, enfermedades cutáneas, dolores de muela, cabeza y de tipo reumáticos. La infusión de la corteza se usa como diurético. Con el tronco se combaten casos de bronquitis y afecciones del pecho (Martínez, 2009 y Zanoni, 1982).

El follaje se utiliza como ornamento en arreglos florales y de altares durante algunas celebraciones religiosas. En algunos lugares se asocia con ceremonias en donde se le agradece por ser protector de los ojos de agua o manantiales. En la ciudad de México se está utilizando en algunas investigaciones como indicador de mantos acuíferos superficiales (Aguilera, 2001 y Martínez, 2009).

En 1921, en el marco de la celebración de las fiestas del Centenario de la Consumación de la Independencia, se le decretó como Árbol Nacional, después de una votación popular convocada por la escuela Nacional Forestal fundada por Miguel Ángel de Quevedo. El ahuehuete resultó ganador de entre 21 especies más (Téllez, 1989 y Martínez, 2009).

Por sus usos diversos, *T. mucronatum* Ten. es una especie que está bajo amenaza de extinción. Otras causas de su agotamiento son: saqueo de los bosques, plagas y enfermedades no controladas, crecimiento de la mancha urbana, contaminación de los mantos acuíferos, incendios y otros.

El ahuehuete, considerado como árbol milenario y como especie importante de México, debe ser rescatado y conservado para que las futuras generaciones tengan la dicha de conocerlo en su hábitat y saber la importancia histórica y ecológica que tiene para México.

1.1. Objetivo general

Establecer las condiciones *in vitro* que permitan la multiplicación de plantas de ahuehuete *T. mucronatum* Ten., así como su caracterización molecular empleando marcadores tipo RAPD e ISSR.

1.2. Objetivos específicos

Evaluar las respuestas de diferentes explantes, medios de cultivo, tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, así como condiciones de luz y temperatura óptimas para estimular las respuestas morfogénicas *in vitro* de *T. mucronatum* Ten.

Realizar la caracterización molecular mediante RAPD e ISSR para obtener la huella genética de *T. mucronatum* Ten. y evaluar los niveles de polimorfismo entre poblaciones diferentes.

1.3. Hipótesis

Con la evaluación de diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, tipos de explantes y condiciones de crecimiento, podrán optimizarse los requisitos *in vitro* que permitan la multiplicación, enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero del ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten.).

Mediante la caracterización molecular con RAPD e ISSR se obtendrá la huella genética y se determinará la variabilidad y relaciones genéticas entre poblaciones diferentes de ahuehuete de diversas localidades o procedencias.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución del ahuehuete

El ahuehuete se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta Guatemala en América Central (Figura 1). Su distribución altitudinal varía de 300 a 2500 msnm, con precipitaciones de 900 a 1500 mm y temperatura de 18 a 26 °C. Generalmente crece a las orillas de manantiales, arroyos y ríos con las raíces sumergidas en el agua, ya sea total o parcialmente. Es un árbol propio de clima semicálido y lugares bajos; sin embargo, se adapta a lugares templados y con alto nivel freático (Anónimo, 1999; Martínez, 2009 y Zanoni, 1982).



Figura 1. Distribución del ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten.) en Estados Unidos y México.

En México se encuentra distribuido en bosques de galería como parte de la vegetación acuática y subacuática. Los estados en donde se encuentra esta especie son: Chiapas, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Aguilera, 2001) (Figura 1).

Cabe mencionar que este árbol no es natural del Valle de México, si no que fue introducido en tiempos precortesianos en Chapultepec, Popotla, Tacuba y Atenco (El Contador) (Téllez, 1989).

2.2. Descripción botánica y taxonómica del ahuehuete

Es un árbol de crecimiento lento, alcanza una altura de 30 a 45 m y un diámetro de 2 a 10 m, es subperenne, presenta tronco recto y a veces lobulado o con abultamientos irregulares, en ocasiones se divide desde la base en dos o tres secciones; la copa es de forma triangular, amplia e irregular, de 9 a 30 m de diámetro, posee ramas robustas, torcidas y extendidas de corteza fisurada y escamosa que se subdividen continuamente en ramas delgadas. Las ramas terminales son péndulas con yemas axilares globosas y escamosas (Figura 2), en cambio, las ramas basales deciduas no presentan yemas. La corteza presenta tonalidades que van desde grisáceo a café oscuro y suele desprenderse en piezas longitudinales de estructura fibrosa. La raíz es profunda, extendida, tortuosa y con abultamientos superficiales, de gran desarrollo con raicillas abundantes (Anónimo,

1999; Aguilera, 2001; Gilman *et al.*, 1994; Medina y Dávila 1997; Rojas, 2011 y Zanoni, 1982).

Sus hojas son deciduas, se acomodan de manera alterna en dos hileras colocadas en el mismo plano (Figura 2), entre 40 y 55 de cada lado de la ramilla, son simples, escamiformes, largas y en forma de aguja de color verde de pálido a oscuro que van de los 10 a 22 mm de largo y de 0.5 a 1.0 mm de ancho, compuestas, lineares, rectas o levemente falcadas con ápice agudo, hialino y borde entero, hendidas longitudinalmente en la parte central con nervadura principal notoria, haz convexo con 2 hileras de estomas y base envainante, envés con 5 a 6 hileras de estomas a cada lado de la cresta. Es sólo de hojas caducas en las regiones más frías de su área de distribución (dejan caer sus hojas junto con las ramillas en los meses de diciembre a enero), sin embargo, es siempre verde en regiones más cálidas (Aguilera, 2001; Gilman *et al.*, 1994; Medina y Dávila, 1997 y Zanoni, 1982).



Figura 2. Ramas terminales péndulas del ahuehuete, las hojas están dispuestas de manera alterna en dos hileras.

Esta especie monoica presenta flores masculinas (estróbilos) en espigas racimosas o panículas de hasta 30 cm (Figura 3), cada una formada por un aumento subsésil de 3 mm de diámetro, protegido por brácteas ovoide-triangulares alrededor de un eje; posee de 4 a 6 pequeños sacos polínicos globosos y uniloculares que se abren longitudinalmente (dehiscencia longitudinal) y contienen granos de polen globosos, posee glándulas de resina aromática en la parte dorsal (Medina y Dávila, 1997 y Zanoni, 1982).



Figura 3. Estróbilos masculinos dispuestos en racimos.

Las flores femeninas se encuentran en estróbilos colocados en las ramas gruesas, cuando están maduros son verdes o glaucos, esporofitas con prominencias y depresiones en la superficie exterior, en el interior contiene glándulas de resinas, los óvulos maduros son de 0.7 a 1.0 cm de largo y de 0.4 a 0.6 cm de ancho de color pardo rojizo (Medina y Dávila, 1997).

Presenta estróbilos principalmente en los meses de julio y agosto, aunque estos pueden aparecer desde febrero hasta noviembre. Los estróbilos masculinos maduros se observan de febrero a abril, los jóvenes desde julio hasta enero. Esta especie poliniza desde finales de febrero hasta finales de marzo. La diseminación de los óvulos maduros es en otoño, por lo tanto, los megaestróbilos maduran durante el mismo año (Aguilera, 2001).

La polinización, fertilización y dispersión de frutos ocurre durante el transcurso de un año. La floración se produce entre los meses de marzo y abril en Estados Unidos y de febrero a marzo en México (Zanoni, 1982).

Los frutos, también llamados conos, son gálbulas aromáticas y se producen generalmente en los meses de agosto y septiembre, más específicamente en los meses de septiembre a diciembre en Estados Unidos y de agosto a octubre en México, sin embargo se mantienen durante todo el año, las semillas por su parte, son más abundantes entre los meses de agosto a noviembre (Aguilera, 2001; Rojas, 2011 y Zanoni, 1982).

El fruto es oval a globoso, duro, dehiscente, aromático, de color verde azulado en la juventud y leñoso cuando madura (Figura 4), de 20 a 30 mm de largo y 17 mm de ancho, contiene glándulas resiníferas en su interior en la etapa inmadura, casi sésil; posee de 22 a 40 escamas trapezoidales (algunos autores mencionan de 20 a 28), rugosas y con vejigas resiníferas, cada escama posee de 1 a 2 semillas (Medina y Dávila, 1997).



Figura 4. Fruto globoso en etapa juvenil.

La semilla tiene forma angulosa, irregular de 8 a 9 mm de largo, la testa es de color café, lisa, coriácea, de 0.5 a 0.7 mm de grosor; el embrión es recto a ligeramente curvo, cilíndrico, color crema y colocado longitudinalmente en el centro de la semilla. Tiene dos cotiledones, la radícula es superior y dirigida al micrópilo. Presenta abundante endospermo carnososo, haploide y opaco (Zanoni, 1982). La Figura 5 muestra algunas características botánicas de las ramas, hojas, frutos y semillas del ahuehuete.

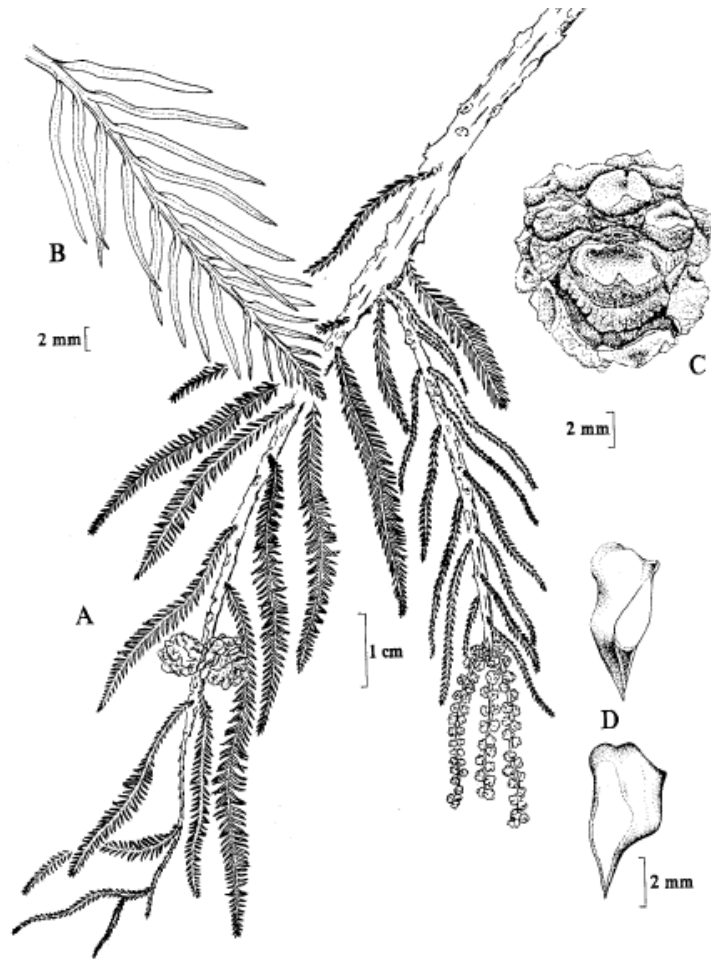


Figura 5. *Taxodium mucronatum* Ten. A) Rama con flores y frutos. B) Detalle de la hoja. C) Fruto maduro. D) Semillas.

Fuente: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Medina y Dávila, 1997.

2.2.1. Clasificación taxonómica

Su nombre genérico, *Taxodium*, viene del género *Taxus* (tejo) y del griego *eidos*, “parecido” o “semejanza”, por ser similar al tejo. El nombre *mucronatum* indica que está provisto de mucrón o de una punta fina, refiriéndose a sus hojas (Martínez, 2009). *Taxodium* es una conífera de la familia Cupressaceae, representa uno de

los géneros más importantes en esta familia, comúnmente conocidos como cipreses (Zhou, 2007).

La Unidad de Informática para la Biodiversidad (UNIBIO), a través de la ficha técnica presentada en sus Colecciones Biológicas (Anónimo, 2008), clasifica al ahuehuete de la siguiente manera:

Reino	Plantae
Phylum	Pinophyta
Clase	Pinatae
Orden	Pinidae
Familia	Taxodiaceae
Género	<i>Taxodium</i>
Epíteto específico	<i>mucronatum</i>
Nombre Científico	<i>Taxodium mucronatum</i> Ten.

Fuente: UNIBIO: Colecciones Biológicas.

2.3. Nombres comunes

Este árbol milenario es conocido vulgarmente de muchas formas. El nombre más utilizado “ahuehuete”, proviene de las raíces a, de *atl*, “agua”, y *huehuetl*, “viejo”,

es decir, “*árbol viejo de agua*”, lo que alude a la gran longevidad del árbol que crece donde hay agua (Martínez, 2009).

Otros nombres comunes que se le dan en México son: ciprés de Moctezuma, ciprés mexicano, sabino, cedro de agua, ciprés de río y en Estados Unidos: baldcypress y southern cypress (Earle, 2009 y Zaroni, 1982). En otras culturas también se llama bochil (Chiapas), haulí (Sonora), mateóco (Chihuahua-tarahumara), pénhamu (Michoacán-tarasco), quitsincui (Chiapas), T-nuyucul (Oaxaca), aayitz (Oaxaca), ndaxinda (Puebla y Oaxaca), chuche (San Luis Potosí-huasteco) (Enríquez-Peña, 2011 y Téllez, 1989).

2.4. Propagación del ahuehuete

La propagación más común del ahuehuete en viveros, es por semillas, las cuales se extraen de los conos maduros y secos a finales del otoño o principios del invierno. El porcentaje de germinación en sustrato es aproximadamente del 35 a 60 %, sin embargo algunos autores mencionan que es de 75 a 80 % cuando las semillas son frescas y la germinación tiene lugar generalmente en 21-28 días, dependiendo de la temperatura. Algunos propagadores recomiendan estratificar las semillas de 30 a 90 días para después remojarlas brevemente en alcohol y enjuagarlas con agua para así remover el aceite resinoso de la superficie de la semilla y mejorar la germinación (Aguilera, 2001 y Zhou, 2007).

Las semillas se siembran en almácigos, posteriormente se realiza el repique de las plántulas a envases individuales o charolas de poliestireno. En los almácigos la profundidad de siembra recomendada es de 2 mm. El repique de la plántula se realiza 35 ó 40 días después de la germinación (Aguilera, 2001).

Sin embargo, de manera natural, la propagación por semilla es rara e incluso nula, debido a la alteración de los hábitats naturales de esta especie, por ejemplo, la perturbación en el flujo del agua, como la inundaciones prolongadas, afectan la floración, producción de semillas y calidad del fruto, debido a que se incrementan las concentraciones de etileno y disminuyen los niveles de oxígeno (Enríquez-Peña, 2011).

Otra manera de reproducir esta especie es mediante estacas o acodos. Las estacas o acodos se extraen de ramas leñosas y se ponen a enraizar en un propagador, manteniendo el sustrato húmedo durante un año (Aguilera, 2001). Este método de reproducción asexual, ofrece una manera rápida para reproducir clones; sin embargo, el porcentaje de enraizamiento es muy bajo, ya que esta especie se considerada de difícil enraizamiento (Zhou, 2007).

En algunos países como China, se han optimizado protocolos para alentar la producción de clones de especies del género *Taxodium*, mediante propagación

asexual. Las plantas son crecidas durante un año y después se reducen a una altura de 0.31-0.91 m. Esta poda severa promueve la producción de brotes verticales que se utilizan como estacas, las cuales presentan altos porcentajes de enraizamiento (Zhou, 2007).

Al igual que la propagación por semillas, la producción de hijuelos de manera natural se ve afectada por la disponibilidad de agua y la contaminación. La compactación del suelo e inundaciones prolongadas disminuyen el crecimiento, ocasionando senescencia foliar, daño y abscisión (Enríquez-Peña, 2011).

2.5. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Es una propagación artificial de tipo asexual de plantas utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, consiste en regenerar una planta a partir del cultivo de material vegetal, el cual, a su vez procede de tejido especializado. Esto se debe a la *totipotencialidad* de las células vegetales, es decir, la capacidad de desdiferenciarse y bajo condiciones controladas *in vitro*, regenerar una planta completa a partir de una célula aislada o un tejido vegetal. Todos los cultivos se inician a partir de un explante que puede ser un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta ya sea tallo, hoja, raíz, yemas, primordios florales, anteras u otros (George *et al.*, 2008; Pérez, 2009 y Castillo, 2001).

El cultivo de tejidos no es una técnica nueva, se originó a partir de los primeros intentos de cultivo *in vitro* hechos por el científico alemán Haberlandt a principios del siglo XX, quien colocó algunas células vegetales aisladas en un cultivo con diferentes azúcares, sales inorgánicas y aminoácidos (Pierik, 1998; Castillo, 2001 y Nunez *et al.*, 2006) y a partir de entonces se han podido desarrollar técnicas y procedimientos para la regeneración de plantas en el laboratorio.

El cultivo *in vitro* se realiza de manera aséptica y bajo estrictas condiciones de los factores que intervienen en el desarrollo de la planta como disponibilidad de nutrientes, hormonas, fuentes de carbono y factores abióticos como temperatura, luz, entre otros (Castillo, 2001 y Estopà, 2005).

El cultivo *in vitro* genera algunas ventajas, una de ellas es el hecho que ésta técnica no sólo sirve para micropropagar un cultivo, sino que también proporciona saneamiento y mantenimiento de plantas libres de patógenos; gracias a ello, comercialmente, las plantas producidas mediante esta técnica incrementan su valor. Además, esta técnica es considerada como una técnica de clonación, es decir, se pueden propagar plantas élite con características específicas, las cuales al ser propagadas tradicionalmente por otro método de multiplicación vegetativa o cruza clásicas, no permanecerían en la planta hija (Estopà, 2005).

Los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en el desarrollo de la planta *in vitro*, ya que controlan procesos bioquímicos y fisiológicos de la planta. El uso de un regulador, su concentración y la combinación con otro tipo de regulador, o bien, la combinación con las hormonas endógenas de la planta dan como resultado una respuesta en la morfología de la planta (Karam *et al.*, 2007).

El uso de reguladores de crecimiento en el cultivo de tejidos vegetales, se remonta al año de 1939, cuando Gautheret, Nobecourt y White demostraron que la auxina ácido indolacético estimula la producción de callos indiferenciados en un cultivo y en la década de los 50's Miller y otros científicos descubrieron que el ingrediente activo en la leche de coco y en el extracto de levadura que promovía el crecimiento en el cultivo era una nueva clase de hormona, a la cual denominaron citocinina. Con esta información se determinó la importancia del balance hormonal. Por tanto, Skoog y Miller, reportaron en 1957 que el balance auxina-citocinina era muy importante para el crecimiento de las células en el cultivo. Con niveles relativamente altos de auxinas y niveles relativamente bajos de citocininas, ocurría el crecimiento indiferencial de callo. Por el contrario, niveles relativamente altos de citocininas respecto a auxinas inducían la aparición de ramas diferenciadas. En 1962, Murashige y Skoog publicaron los detalles de un medio distinto con altos niveles de NH_4 , medio que hasta la fecha ha sido utilizado con excelentes resultados en el cultivo de tejidos vegetales (Pierik, 1998; Castillo, 2001; Nunez *et al.*, 2006 y Magallanes-Cedeño, 2004).

La regeneración de plantas *in vitro* de cualquier especie vegetal presenta cinco etapas principales: 0) selección de las plantas madre, 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de brotes, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas (Pérez, 2009 y Olmos *et al.*, 2010).

Etapas 0: selección de las planta madre. Es una etapa preparativa, en la que se seleccionan y acondicionan las plantas madres de las cuales saldrán los explantes para el cultivo *in vitro*. Esta etapa se suele llevar a cabo en un invernadero y las plantas madres se tratan con fungicidas de 1 a 4 meses, todo esto para minimizar las posibilidades de contaminación microbianas. Otros tipos de pretratamientos sirven para cambiar el estado fisiológico de la planta y así favorecer el establecimiento del cultivo *in vitro* como por ejemplo cambios en la temperatura, fotoperiodo, fertilización, aplicación de reguladores de crecimiento o podas severas para estimular el surgimiento de tejido fotosintético nuevo (Pérez, 2009).

Etapas 1: establecimiento del cultivo. En esta etapa se realiza la elección del explante y los procesos de asepsia en los tejidos vegetales que se van a cultivar. Para la elección del explante, en general, los órganos jóvenes tienen mejor respuesta en el cultivo *in vitro*. En cuanto a los procesos de asepsia del material vegetal se realizan principalmente con el empleo de etanol a 70 %, diferentes concentraciones de cloro comercial o bien detergentes (Pérez, 2009 y Olmos *et al.*, 2010).

Etapas 2: multiplicación. El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel importante sobre la multiplicación de los explantes. Existen tres vías para la multiplicación *in vitro*: la organogénesis, la embriogénesis somática y la multiplicación por yemas, ápices o meristemos (Pérez, 2009 y Olmos *et al.*, 2010).

La *organogénesis* es la capacidad de formar nuevos órganos vegetales a partir del explante como raíces y brotes adventicios, esta puede ser de dos tipos: organogénesis directa y organogénesis indirecta. La organogénesis directa consiste en la formación de los órganos en el lugar del explante original, en la organogénesis indirecta se origina primero tejido calloso y a partir de éste se comienzan a originar los órganos (Pérez, 2009 y Olmos *et al.*, 2010).

La *embriogénesis somática* se define como la capacidad de algunas células para formar embriones en condiciones de cultivo *in vitro*. Al igual que en la organogénesis, existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa (ESD) y la indirecta (ESI). La primera consiste en la aparición de los embriones en el explante original y en la segunda se requiere primero proporcionar al tejido las condiciones para inducir la formación de embriones, ya que este no presenta células proembriogénicas; para posteriormente cambiarlo a condiciones que sean propicias para la diferenciación de embriones (Pérez, 2009).

Por último, la multiplicación por yemas y ápices se basa en la formación de nuevos brotes a partir de meristemas, lo que no implica fenómenos de desdiferenciación y rediferenciación como ocurre en las otras dos vías de multiplicación *in vitro* descritas anteriormente. Sin embargo, esta vía de cultivo *in vitro* resulta ser menos efectiva que las anteriores, ya que se produce sólo una planta por meristemo (Pérez, 2009 y Barbat, 2006).

De acuerdo a Olmos y colaboradores (2010) los principales problemas que pueden presentarse durante los sucesivos subcultivos *in vitro* son la *vitrificación* y la producción de *compuestos fenólicos* por parte de los explantes. La vitrificación es un proceso de morfogénesis anormal con cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que producen hojas de una apariencia vidriosa. Este proceso está regulado por dos factores clave que son la humedad relativa y el potencial de agua, lo que afecta a dos procesos fisiológicos fundamentales: la fotosíntesis y la transpiración.

Etapas 3: enraizamiento. Formación y elongación del sistema radical para su posterior manipulación y hacer más viable su adaptación al ambiente externo. El enraizamiento se puede lograr separando los brotes y transfiriéndolos a un medio de cultivo con mayor concentración de auxinas o con carbón activado. Para evitar la oxidación de los cultivos también se puede probar la transferencia de los brotes

generados directamente al sustrato con previa aplicación de enraizador comercial y manteniendo el ambiente con alta humedad relativa (Pérez, 2009).

Etapas 4: aclimatación. La aclimatación consiste en transferir la plántula obtenida *in vitro*, a un nuevo ambiente, generalmente a un invernadero con condiciones adecuadas para superar las dificultades que las plántulas enfrentan al ser retiradas de su medio de cultivo en el laboratorio. Este proceso es crítico, ya que la plántula pasa de un ambiente totalmente aséptico a otro sujeto a la presencia de microorganismos saprófitos y patógenos. En esta etapa, la plántula puede presentar diferentes tipos de estrés como hídrico, mecánico, entre otros, además de pasar de un estado heterotrófico a un estado autótrofo, puede presentar respuestas bioquímicas y físicas al cambio de luz, temperatura, humedad y clima, lo que implica cambios en la expresión génica. Mantener una alta humedad y temperatura es una pequeña regla general en la fase de aclimatación (De Rezende *et al.*, 2000).

2.6. Manejo *in vitro* de especies forestales

La deforestación es el problema más grave que afecta a los bosques, según la FAO (2010) entre el año 2000 y 2010 se han perdido 13 millones de hectáreas al año. Esta deforestación se debe en gran medida al incremento en la demanda de productos forestales, así como al crecimiento de la mancha urbana y las actividades del hombre como la agricultura, ganadería, industria y construcción.

De esta manera surge la necesidad de reforestar las zonas devastadas por la mano del hombre. A partir de esta necesidad y con base en los estudios de las ciencias biológicas y el avance de la biotecnología, se han desarrollado métodos para la producción de árboles que respondan a esta problemática, tanto para ocupar en la reforestación de zonas como para el uso potencial de derivados vegetales para la producción de energéticos (Magallanes-Cedeño, 2004).

Estas palabras se traducen en plantar árboles de ciclo corto, con madera de buena calidad, troncos uniformes y de rápido crecimiento; y por otro lado diseñar un sistema que permita la multiplicación masiva de individuos con características deseadas (Magallanes-Cedeño, 2004).

Sin embargo, el mejoramiento genético de especies forestales de manera convencional, no es tan rápido como el de especies agrícolas, debido a que el periodo de crecimiento desde la siembra de la semilla hasta la floración es demasiado largo en comparación con los cultivos básicos (Magallanes-Cedeño, 2004).

Esta es una razón por la cual los métodos de propagación vegetativa son una posible solución para este tipo de problemas. De alguna manera, este tipo de propagación se ha convertido en una técnica rutinaria para la propagación de

especies como *Pinus taeda*, *Pinus virginiana* y *Pinus radiata* (Aimers-Halliday, 1992).

Al hacer propagación vegetativa, prácticamente se están produciendo clones de la planta madre, proceso que ocurre de manera natural, sin embargo, en el laboratorio es posible modificar y acelerar este proceso mediante el manejo *in vitro* (Magallanes-Cedeño, 2004).

La propagación y mejoramiento de especies hortícolas y agrícolas se ha llevado a cabo desde la década de los 40. En el caso de especies forestales, aun cuando los primeros estudios sobre esta técnica se hicieron en especies de árboles, los primeros trabajos que se presentaron fueron hasta la década de los 70, los cuales se referían a la regeneración *in vitro* de diferentes gimnospermas (Villalobos *et al.*, 1983 y Magallanes-Cedeño, 2004).

A diferencia de las especies anuales y bianuales, las especies perennes han mostrado mayor grado de dificultad para su micropropagación. Por lo general, se emplean tejidos jóvenes como fuente de explante, debido a que los tejidos maduros presentan poca sensibilidad a las condiciones *in vitro* (Magallanes-Cedeño, 2004).

Básicamente en el cultivo *in vitro* de especies arbóreas mientras más joven es el tejido y se encuentre en crecimiento activo, mejores serán los resultados obtenidos en el proceso de diferenciación de órganos (Magallanes-Cedeño, 2004).

Debido a la desaparición de algunas especies forestales y a que muchas otras se encuentran en peligro de extinción o amenazadas, se están llevando a cabo trabajos con especies tales como *Santalum album* y *Pterocarpus santalinus* para lograr su regeneración *in vitro*, como medio de multiplicación con fines de conservación (Murugesh *et al.*, 1999) citado por Toribio y Celestino, 2000.

En especies forestales, el método de propagación *in vitro* usado con más éxito ha sido la producción de brotes adventicios a partir de cotiledones de semillas en germinación; se reporta su uso en más de 25 especies de gimnospermas. Algunas de las especies en las que se reporta gran éxito con esta técnica son: *P. radiata* (Aitken *et al.*, 1981), *P. taeda* (Mott y Amerson, 1981), *P. brutia* (Abdullah y Grace, 1987), *P. virginiana* (Chang *et al.*, 1991), *P. eldarica* (Sen *et al.*, 1993), todos ellos citados por Toribio y Celestino (2000).

En España, como mencionan Toribio y Celestino (2000), muchos grupos de investigación han trabajado con organogénesis a partir de yemas axilares como vía de regeneración con diferentes especies para la propagación clonal y

regeneración después de la transformación genética de plantas. Tal es el caso de especies como: *Eucalyptus globulus* (Villar *et al.*, 1999; Bernardo *et al.*, 1999), *Quercus robur* (Vieitez *et al.*, 1994; Barceló-Muñoz *et al.*, 1999), *Ulmus minor* y el híbrido *U. minor x pumilla* (Díez y Gil, 1999) y *Pinus pinea* (García-Férriz *et al.*, 1994; Ordás y Humara, 1999).

Por otro lado, la embriogénesis somática se está postulando como una opción más efectiva para la regeneración de plantas en especies forestales. Hoy en día, se han publicado protocolos de regeneración por embriogénesis somática en varias especies tanto forestales como frondosas (Toribio y Celestino, 2000).

En la actualidad, el establecimiento y estandarización de protocolos *in vitro* con tejidos de alta respuesta de regeneración en especies leñosas se considera fundamental para procesos de micropropagación masiva y para facilitar la tecnología de transformación genética (Ocampo y Núñez, 2007).

2.7. Marcadores moleculares

Hasta mediados de la década de los 60, los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, sin embargo, el número limitado de marcadores morfológicos reducía la probabilidad de encontrar asociaciones significativas entre estos marcadores y los polimorfismos de una especie o a su vez con caracteres

de importancia económica, lo cual limitaba su empleo en estudios de diversidad y mejoramiento genético (Nieto *et al.*, 2005).

Los marcadores moleculares proporcionan medios para caracterizar el germoplasma, más que para evaluarlo. No obstante, estos marcadores son valiosos para analizar diferencias en secuencias específicas de ADN ya que permiten determinar polimorfismos genéticos y niveles de diferenciación, para distinguir procedencias, progenies e incluso individuos, y para proporcionar conocimiento sobre la historia evolutiva (Arnold *et al.*, 2002 y Ledig, 2004).

Los organismos vivos poseen diferentes secuencias nucleotídicas en su genoma (polimorfismos) que los hacen diferentes de otros individuos y fungen como huella genética y como marcadores moleculares. Esta variabilidad o polimorfismos genéticos ocurren de manera natural entre y dentro de diferentes poblaciones de organismos (Trigiano y Caetano-Anolles, 1995).

Para evaluar estos polimorfismos, se pueden utilizar dos clases de marcadores: los morfológicos y los moleculares. Los primeros marcadores que se empezaron a utilizar fueron los de tipo bioquímico: metabolitos secundarios, proteínas estructurales y principalmente las isoenzimas y aloenzimas (Mendoza-Herrera y Simpson, 1996).

Las isoenzimas son enzimas que convierten el mismo sustrato, pero no son necesariamente productos del mismo gen. Las isoenzimas pueden estar activas en diferentes etapas de la vida del individuo o en diferentes compartimentos celulares. Las aloenzimas por su parte, son isoenzimas que son codificadas por genes ortólogos, pero difieren por uno o más aminoácidos debido a las diferencias alélicas. La principal ventaja de las aloenzimas, es que son de herencia codominante y técnicamente simples y de bajo costo. Las desventajas son que presentan número limitado de aloenzimas disponibles, requieren tejido fresco y son fácilmente influenciados por el ambiente (Weising *et al.*, 2005 y Mendoza-Herrera y Simpson, 1996).

El análisis de isoenzimas y aloenzimas es relativamente fácil. Se realiza la electroforesis del extracto de tejido preparado en un gel de almidón o poliacrilamida. Las proteínas de este extracto son separadas por su carga neta y tamaño. Después de la electroforesis, la posición de un enzima particular en el gel es detectada por la adición de un sustrato colorante que tiñe el gel. Dependiendo el número de *loci*, su estado de homo o heterocigosidad y la configuración enzimática, se pueden visualizar de una a varias bandas (Weising *et al.*, 2005).

Posteriormente, con la llegada de las técnicas modernas de biología molecular que permitieron extraer y purificar ADN, se pudieron generar diversos métodos de detección de polimorfismos genéticos, de esta manera se pudieron visualizar

diferencias entre las secuencias homólogas de ADN de los organismos. Estas diferencias son resultado de cambios o rearrreglos entre las bases que forman el ADN como translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Estos marcadores, además tienen la ventaja de ser dominantes o codominantes y no son influenciados por el ambiente (Nieto *et al.*, 2005 y Valadez y Kahl, 2000).

Los marcadores moleculares de ADN pueden agruparse en tres categorías, dependiendo el tipo de técnica que se utiliza para generarlos. La primera categoría se basa en la técnica de hibridación (Southern), cuyo propósito principal es explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos de ADN ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa particular (Valadez y Kahl, 2000). En esta categoría entran los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción RFLP (Bostein *et al.*, 1980).

La segunda categoría agrupa aquellos marcadores generados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables. Estas secuencias pueden ser aleatorias, semialeatorias o específicas (Valadez y Kahl, 2000). En esta categoría entran marcadores como Polimorfismos del ADN Amplificado al Azar (RAPD) (William *et al.*, 1990), Primers arbitrarios con Reacción en Cadena de la Polimerasa (AP-PCR) (Welsh y

McClelland, 1990), Amplificación de la Huella de ADN (DAF) y Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Weber y May, 1989), estos últimos tienen la desventaja de que se debe conocer previamente la ubicación de una secuencia en el genoma de interés.

Por último, la tercera categoría combina las técnicas de la PCR o sus productos con la hibridación Southern. En este tipo de marcadores se requiere la síntesis previa de ADN mediante PCR y posteriormente se hibrida con alguna sonda que detecte microsatélites. De esta manera, con el resultado de la PCR se detecta un patrón de fragmentos llamados de primera generación y al hibridar las huellas con una sonda radioactiva, detecta microsatélites y se revela un patrón llamado de segunda generación, este es el caso de los RAHM o RAMPO (Valadez y Kahl, 2000).

2.5.1. RAPD

En 1990, Williams *et al.* y Welsh y McClelland, independientemente, describieron la utilización de un iniciador oligonucleótido de secuencia simple y al azar en una PCR de baja severidad (35-45 °C) para la amplificación simultánea de varios fragmentos de ADN. Estos fragmentos los refirieron como amplificación de

polimorfismos de ADN al azar (RAPD) y “primers” arbitrarios PCR (AP-PCR), respectivamente (Mohler y Schwarz, 2004).

Esta metodología consiste en la amplificación de ADN mediante PCR utilizando oligonucleótidos al azar, generalmente de 10 pb de longitud, que varían en el contenido de GC (de 40 a 100%). Normalmente un solo oligonucleótido es utilizado como iniciador, que trabaja hacia adelante o hacia atrás y las regiones flanqueadas por secuencias repetidas invertidas homólogas al oligonucleótido son amplificadas de acuerdo con las condiciones normales para amplificación de PCR y se logran amplificar fragmentos de 1 a 10 sitios genómicos de manera simultánea (Bolívar, 2007 y Mohler y Schwarz, 2004).

Los fragmentos amplificados tienen un tamaño que va de los 0.5 a 5 Kb. El iniciador se usa como punto de partida para que la ADN polimerasa termoestable (Taq) sintetice la segunda cadena a partir de un ADN genómico molde y una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), de esta manera la secuencia genómica se extiende a partir del extremo OH-3' de los iniciadores (Williams *et al.*, 1990).

Este proceso se realiza en un termociclador con programa de varios ciclos por un tiempo y temperaturas específicas, divididos en tres etapas básicas que incluyen: 1) desnaturalización térmica del ADN: consiste en la separación de las dos cadenas de ADN a una temperatura de 90 a 95 °C; 2) alineamiento de los iniciadores: los oligonucleótidos se alinean a las cadenas simples de ADN molde,

este proceso ocurre a temperaturas de 36 a 60 °C y 3) extensión del iniciador: la ADN polimerasa integra los dNTPs a las nuevas cadenas de ADN a temperaturas de aproximadamente 72 °C. Este ciclo se repite de 25 a 45 veces, en cada ciclo los fragmentos de ADN se amplifican exponencialmente. Los productos amplificados pueden separarse mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida y visualizarse mediante la tinción de estos geles con bromuro de etidio o nitrato de plata (Williams *et al.*, 1990).

Los polimorfismos entre individuos resultan principalmente de diferencias en las secuencias en uno o en ambos sitios iniciadores o de inserciones-delecciones y son visibles en los geles, cada uno de los fragmentos amplificados representaría un *locus* específico en el genoma y se visualizan como bandas presentes (alelo 'A') o ausentes (alelo 'a'). Por lo tanto, los RAPD son marcadores de tipo dominante, ya que un fragmento se presenta únicamente cuando es homocigoto (AA) o heterocigoto (Aa); sin embargo, los alelos homólogos pueden a veces ser identificados con la ayuda de información detallada del pedigree (Bolívar, 2007 y Mohler y Schwarz, 2004).

La inserción de grandes fragmentos de ADN entre los dos sitios de alineación origina un fragmento muy largo provocando que se pierda, por otra parte la delección o pérdida de un fragmento de ADN que lleve uno de los dos sitios de alineación provoca también su pérdida. También existen polimorfismos debidos a la sustitución de un nucleótido que puede afectar el alineamiento de uno de los

dos iniciadores y a la inserción o delección de pequeños fragmentos de ADN lo que origina cambios en el tamaño del fragmento (Bolívar, 2007).

El método de RAPD presenta varias ventajas: no se requiere conocer la secuencia genética, existen iniciadores universales y comerciales, el protocolo es relativamente fácil y rápido, se requieren cantidades pequeñas de ADN y la automatización es posible (Aureoles, 2006). Sin embargo, sus desventajas son: por su naturaleza dominante, no se pueden identificar heterocigotos; además, la reproducibilidad de los resultados no es exacta, estos pueden depender del tipo de Taq ADN polimerasa, la competición de los fragmentos de ADN, el equipo termociclador y el de electroforesis que se utilice (Williams *et al.*, 1990).

Esta técnica ha sido la más utilizada para construir mapas y analizar la semejanza de genotipos. También es utilizada para estudios a nivel individual (identificación genética), estudios de diversidad genética de cultivares, así como estudios de especies relacionadas entre sí y su relación con sus ancestros silvestres (Nieto *et al.*, 2005 y Williams *et al.*, 1990).

Debido a los problemas de reproducibilidad de los RAPD, muchos investigadores han tratado de resolver este problema y han desarrollado otro tipo de marcadores. Paran y Michelmore (1993) convirtieron los fragmentos RAPD a marcadores de PCR simples y robustos llamados Secuencias Caracterizadas de Regiones Amplificadas (SCAR). En estos marcadores, los iniciadores son derivados de los

fragmentos RAPD clonados, los cuales son extendidos de su tamaño original con 10 a 15 bases (Mohler y Schwarz, 2004)

2.5.2. ISSR

Las secuencias entre repeticiones simples o ISSR, son las regiones situadas entre microsatélites. La técnica se basa en la amplificación de PCR de las secuencias ubicadas entre los microsatélites. En esta técnica, desarrollada por Zietkiewicz *et al.* (1994), se utilizan iniciadores cuya secuencia debe estar formada por di o trinucleótidos con un nucleótido extra en la terminación 3'. El nucleótido extra permite la amplificación únicamente si el iniciador se ancla en la terminación 5' del microsatélite con un primer nucleótido disponible en la secuencia flanqueadora (Bornet y Branchard, 2001 y Weising *et al.*, 2005).

Los nucleótidos extras funcionan como “anclas” y aseguran que la amplificación sea iniciada en la misma posición 5' del microsatélite en cada ciclo, en donde el iniciador localiza dos regiones microsatélite separadas por una secuencia genómica amplificable del ADN molde, la reacción de PCR generará una banda de tamaño particular para ese locus, representando el fragmento de ADN que se encuentra entre los microsatélites (Bornet y Branchard, 2001 y Weising *et al.*, 2005).

Las huellas genéticas obtenidas con esta tecnología revelan polimorfismos inter e intraespecíficos en una amplia variedad de especies eucariotas; además, permiten detectar alta variación genética entre individuos muy cercanos y son altamente reproducibles, debido a que este método es más exigente y utiliza altas temperaturas de alineación durante la PCR. Otra de las ventajas de esta técnica es que para diseñar los iniciadores no se necesita conocer secuencias del genoma del organismo de interés (Bornet y Branchard, 2001 y Weising *et al.*, 2005).

Esta clase de marcadores es de tipo dominante, al igual que los RAPD, cada banda corresponde a un locus. La presencia de la banda representa el genotipo dominante, mientras que la ausencia de la misma representa al genotipo recesivo (Bornet y Branchard, 2001 y Weising *et al.*, 2005).

2.8. Caracterización molecular

La caracterización de la diversidad genética y la determinación de la relación genética entre coníferas son importantes para la conservación sostenible y el uso de los recursos genéticos de plantas, así como para medir la variación genética de los individuos y/o poblaciones (Soliman *et al.*, 2010).

Existe una variedad de métodos para medir la variación genética en plantas, desde medidas morfológicas hasta marcadores genético-moleculares. Los métodos frecuentemente no muestran resultados concordantes entre ellos, debido

a que los patrones de la variación para marcadores moleculares generalmente están más influenciados por la deriva génica y el flujo génico, y los caracteres morfológicos están más influenciados por la selección natural (Ledig, 2004).

A lo largo de los últimos años se han ido aplicando a especies forestales diferentes marcadores que revelan polimorfismos en la secuencia de bases del ADN. Los principales marcadores genéticos utilizados en estos casos son los RAPD y los AFLP (Toribio y Celestino, 2000).

Los RAPD se han usado para caracterizar clones en especies de los géneros *Populus* y *Salix* (Lin *et al.*, 1994). En cuanto al uso de AFLP, se pueden citar: la caracterización de especies, variedades y cultivares de *Castanea* (Yamamoto *et al.*, 1998) y la caracterización de clones y determinación de la variabilidad en *Salix* (Barker *et al.*, 1999) como lo mencionan Toribio y Celestino (2000).

En cuanto a especies del género *Taxodium*, se mencionan casos de estudios con marcadores moleculares como los realizados por Li (2006), quien completó un análisis genético de 18 genotipos de *Taxodium* y encontró considerable diversidad utilizando RAPD. En este caso determinó, de acuerdo a los análisis de agrupamiento que existe una relación genética cercana entre *Taxodium distichum* Rich. y *T. ascendens* Brongn (Zhou, 2007).

Por otro lado, Chen *et al.* (2002) condujo análisis de RAPD para encontrar polimorfismos genéticos de 12 genotipos e identificar su relación. Estos genotipos incluían 8 híbridos sospechosos posiblemente de *T.mucronatum*, el progenitor hembra híbrida de *T. mucronatum* y la misma clase de progenitor masculino híbrido de *Cryptomeria fortunei* y *C. Japonica* (Zhou, 2007)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3. Manejo *in vitro* de ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten.)

El cultivo *in vitro* de esta especie abarcó cuatro etapas: establecimiento *in vitro*, multiplicación, enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero. Cabe mencionar que la etapa de enraizamiento y transferencia a sustrato se realizó de manera paralela.

El experimento de cultivo *in vitro* se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Se establecieron diferentes bioensayos para valorar el mejor tratamiento, tipo de explante y condiciones de manejo de la planta *in vitro*.

3.3.1. Material vegetal

Esta etapa de la investigación se realizó con plantas jóvenes de ahuehuete de aproximadamente 2 años de edad, las cuales se compraron en el mercado de flores de Xochimilco ubicado en la Ciudad de México. Los árboles se trataron con fungicida antes de iniciar el experimento de manejo *in vitro* para obtener explantes sanos. Para este paso se utilizó fungicida de tipo sistémico Promyl® 30 g/L según las indicaciones del producto.

Los árboles se regaron cada tercer día con agua normal, la aplicación de fungicida se realizó cada semana. Este proceso de desinfestación previo al experimento, se realizó por un periodo de tres semanas.

3.3.2. Medio de cultivo

Se probaron 12 tratamientos con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento. El medio de cultivo general utilizado es el descrito por Murashige y Skoog (medio MS) en 1962, suplementado con: Tiamina (0.4 mg/L), Sulfato de adenina (100 mg/L) y mio-inositol (100 mg/L). Como fuente de carbono se utilizó sacarosa (30 g/L), como agente gelificante agar (7 g/L) con un pH de 5.7 ± 0.1 .

3.3.3. Bioensayo 1

En el bioensayo 1 se utilizó el medio de cultivo MS base. Se utilizaron 4 tratamientos con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento. Los reguladores utilizados fueron dos citocininas: 2 isopentiladenina (2 ip) y Benciladenina (BA) y una auxina: 2-4 diclorofenoxiacético (2,4-D) en diferentes concentraciones (Cuadro 1). Se agregó al medio carbón activo a 0.1 %.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en el primer bioensayo, se utilizaron como reguladores de crecimiento dos citocininas (2 ip y BA) y una auxina (2,4-D).

Tratamientos	Concentración de reguladores (mg/L)		
	2,4-D	BA	2 ip
T1	0.0	0.0	0.0
T2	0.1	0.3	1.0
T3	0.3	1.0	3.0
T4	1.0	3.0	5.0

En este bioensayo se trabajó con cinco tipos diferentes de explantes: yema, hoja basal, hoja media, hoja apical y ápices (Figura 6). Los explantes seleccionados se lavaron con detergente y Tween 80 con agitación. Después se sumergieron en etanol a 70 % durante 1 minuto. Con ayuda de una pinza estéril, se sacaron los explantes y tras eliminar el exceso de alcohol se sumergieron en una solución de cloro a 20 % durante 15 minutos.



Figura 6. Tipos de explante utilizados en el bioensayo 1. A) Hoja, B) Yema, C) Ápice.

Se preparó una solución antioxidante compuesta por ácido cítrico (150 mg/L) y ácido ascórbico (100 mg/L) en agua destilada estéril, con la cual se enjuagaron los explantes antes de sembrarlos en el medio de cultivo. La siembra se realizó transfiriendo cada explante a frascos tipo Gerber con medio de cultivo (Figura 7 y Figura 8) y se colocaron en área de incubación (ciclos de 16 h luz blanca/8 h oscuridad, con una intensidad lumínica de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y una temperatura de 25°C).

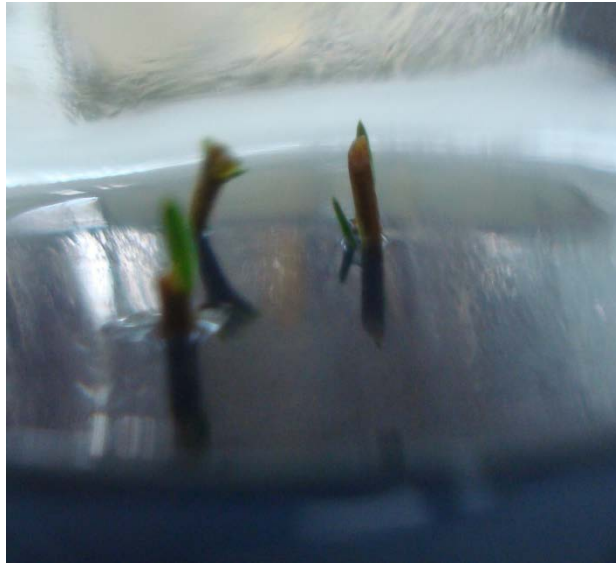


Figura 7. Yemas sembradas en medio de cultivo MS en el bioensayo 1.

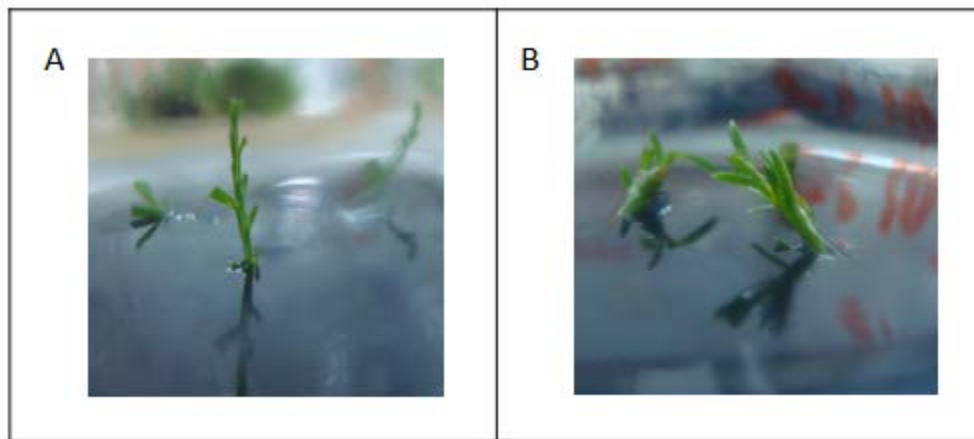


Figura 8. Explantes de hoja basal (A) y ápice (B) sembrados en medio de cultivo en el bioensayo 1.

3.3.4. Bioensayo 2

Para este bioensayo se probaron nuevos reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones. Los reguladores utilizados fueron, en una primera combinación, dos citocininas: kinetina (KIN) y zeatina (Zea) y una auxina: ácido indolacético (AIA) (Cuadro 2) y la segunda combinación, dos citocininas: thidiazurón (TDZ) y 2 isopentiladenina (2 ip) y una auxina: ácido indolbutírico (AIB) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Tratamientos utilizados en el bioensayo número 2, se utilizaron como reguladores de crecimiento dos citocininas (KIN y Zea) y una auxina (AIA).

Tratamientos	Concentración de reguladores (mg/L)		
	AIA	KIN	Zea
T5	0.0	0.0	0.0
T6	0.1	0.3	1.0
T7	0.3	1.0	3.0
T8	1.0	3.0	5.0

Cuadro 3. Tratamientos utilizados en el bioensayo número 2, se utilizaron como reguladores de crecimiento dos citocininas (2 ip y TDZ) y una auxina (AIB).

Tratamientos	Concentración de reguladores (mg/L)		
	AIB	TDZ	2 ip
T9	0.0	0.0	0.0
T10	0.1	0.3	1.0
T11	0.3	1.0	3.0
T12	1.0	3.0	5.0

Los explantes utilizados fueron ápices de aproximadamente 0.5 cm de longitud y brotes de hojas de 0.3, 0.5 y 1.5 cm de longitud (Figura 9). El proceso de desinfestación se realizó lavando con detergente y Tween 80, alcohol a 70 % por un minuto y cloro a 10 % por 15 minutos. Se sembraron 10 ápices y 10 brotes por cada tratamiento. Las condiciones de incubación fueron: ciclos de 16 h luz blanca/8 h oscuridad, con una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y una temperatura de 25 °C.

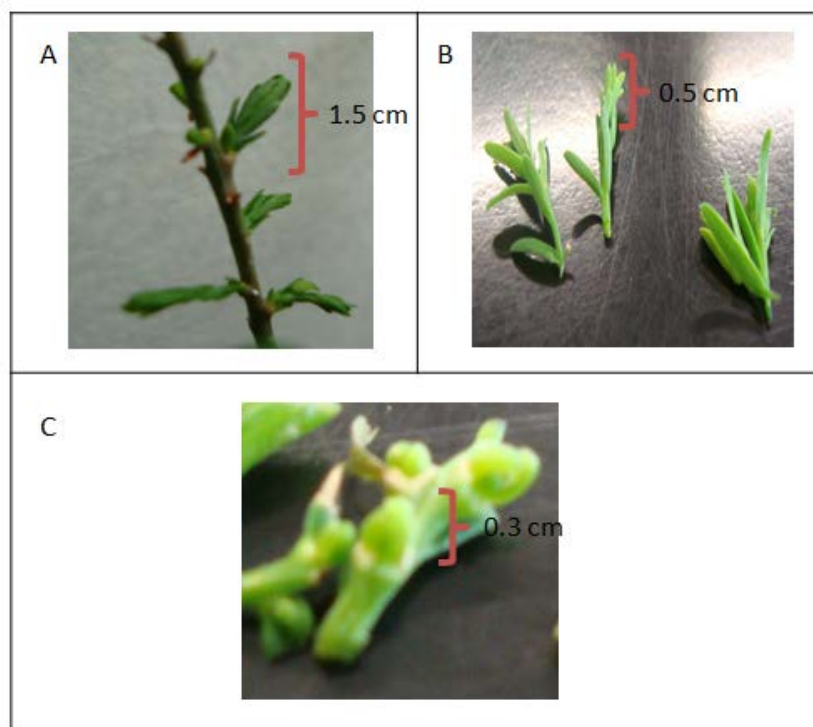


Figura 9. Brotes de diferentes tamaños utilizados en el bioensayo 2. A) Brote de 1.5 cm, B) Brote de 0.5 cm, C) Brote de 0.3 cm.

3.3.5. Multiplicación

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 4 X 3, para bioensayo 1 y completamente al azar con arreglo factorial 8 X 2 para el bioensayo 2; con 15 y 10 repeticiones respectivamente. Las unidades experimentales fueron frascos tipo Gerber con 3 a 4 explantes en cada uno.

Las variables evaluadas fueron:

Incremento en la longitud del explante. Esta variable se determinó en cm con la diferencia entre la longitud inicial del explante y la longitud final.

Incremento en el número de brotes. Se determinó la cantidad de brotes nuevos que desarrolló cada explante.

Los análisis estadísticos realizados para las variables antes mencionadas fueron: análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$) y comparación de medias (Tukey $\alpha \leq 0.05$). Este análisis se realizó utilizando el paquete computacional SAS (Statistical Analysis System) versión 9.

3.3.6. Enraizamiento

Para promover el enraizamiento se probaron 3 tratamientos utilizando un medio MS diferente al utilizado en la etapa de establecimiento del cultivo (Cuadro 4). En

este medio se aumentó la concentración de sacarosa a 6 % y como reguladores de crecimiento se utilizó una combinación de una auxina, una citocinina y una giberelina en diferentes concentraciones (Cuadro 5).

Cuadro 4. Concentración de los elementos utilizados para preparar el medio de enraizamiento.

Reactivo	Concentración
Sales del medio MS	100 %
Mioinositol	100 mg/L
Sulfato de adenina	100 mg/L
Carbón activo	0.1 %
Sacarosa	6 %
Tiamina	0.4 mg/L
Agar	7 g/L

Cuadro 5. Tratamientos utilizados para promover el enraizamiento, se utilizaron como reguladores de crecimiento una citocinina (BA), una auxina (AIB) y una giberelina (AG₃).

Tratamientos	Concentración de reguladores (mg/L)		
	AIB	AG ₃	BA
T1	0.5	0.5	1.0
T2	0.5	0.5	2.0
T3	1.0	1.0	3.0

Durante la fase de enraizamiento se utilizaron los explantes de los tratamientos 2, 3 y 4, ya que fueron los que presentaban mayor crecimiento y formación de nuevos brotes. Cada explante se seccionó en dos o tres partes dependiendo el número de brotes nuevos que presentó cada uno. Cada explante nuevo se colocó en un tubo de ensayo con medio de cultivo. Todo el proceso se realizó bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar. Las condiciones de incubación fueron: ciclos de 16 h luz blanca/8 h oscuridad, con una intensidad lumínica de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y una temperatura de 25°C .

3.3.7. Transferencia a sustrato e invernadero

Los explantes que se utilizaron para pasar a sustrato fueron directamente los que se obtuvieron de la fase de multiplicación, sin pasar por la fase de enraizamiento. El sustrato utilizado fue Peat Moss ® 100 % en combinación con micorriza (0.28 g/Kg).

El sustrato fue colocado en vasos de unicel del número 10, a los cuales se les hizo agujeros en la parte inferior para permitir el drenado de agua. Cada explante se sacó del tubo de ensayo y se enjuagó en una solución fungicida a 2 % para eliminar los restos de medio de cultivo y evitar la formación de hongos. Los explantes se seccionaron y se les aplicó en la parte basal un enraizador comercial en polvo a base de auxinas Radix 2000 ® y se colocó uno en cada vaso con sustrato, teniendo en total 6 explantes en sustrato. Cada vaso se colocó en una

bolsa de plástico y se amarró con una liga para proporcionar una atmósfera húmeda al explante.

3.4. Caracterización molecular

3.4.1. Material vegetal

Para este análisis se probaron diferentes tejidos de ahuehuete (*T. mucronatum* Ten.) como hojas jóvenes, hojas maduras, estróbilos y semillas. La extracción de ADN fue a partir de semillas. Para obtener las semillas, se recolectaron las cápsulas maduras y semimaduras directamente de los árboles. Las cápsulas tenían un diámetro aproximado de entre 1 a 3 cm.

Se estudiaron en un principio 70 materiales, colectados en 6 estados diferentes: Distrito Federal, Estado de México, Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro (Cuadro 6). Los individuos de cada región presentaron diferentes características en cuanto a altura del árbol, tamaño de los conos y tamaño y color de las semillas (Cuadro 7).

Cuadro 6. Estados donde se recolectó el material vegetal para el estudio realizado con marcadores moleculares.

Estado	Municipio o delegación	Localidad
Distrito Federal	Coyoacán	Viveros de Coyoacán
Estado de México	Texcoco	Carretera Peñón-Texcoco
Estado de México	Texcoco	Chapingo
Morelos	Jiutepec	Las Fuentes
Morelos	Cuernavaca	Río Apatlaco
Oaxaca	Concepción Buenavista	Agencia Río Las Palmas
Puebla	Puebla	Parque San Baltazar
Querétaro	Querétaro	Río Querétaro

Cuadro 7. Características físicas de los árboles y de las cápsulas recolectadas.

Estado	Localidad	Altura de árboles aproximada (m)	Diámetro promedio de los conos (cm)	Longitud promedio de las semillas (cm)	Color de las semillas
Distrito Federal	Viveros de Coyoacán	30	2	0.4	Café claro
Estado de México	Carretera Peñón- Texcoco	30	1.5	0.3	Café oscuro
Estado de México	Chapingo	20	2	0.3	Café oscuro
Morelos	Las Fuentes	30	3	0.5	Café oscuro
Morelos	Río Apatlaco	30	3	0.5	Café oscuro
Oaxaca	Agencia Río Las Palmas	30	3	0.5	Café oscuro
Puebla	Parque San Baltazar	7	1.5	0.3	Café claro
Querétaro	Río Querétaro	15	2	0.4	Café claro

3.4.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo establecido por Dellaporta *et al.* (1983). El experimento se estableció en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Autónoma Chapingo.

Se maceraron 0.3 g de semilla de cada individuo en nitrógeno líquido evitando el descongelamiento, posteriormente el tejido pulverizado se colocó en microtubos de 1.5 mL con 600 µL de amortiguador de extracción y se mezcló con agitación para después incubar a 65 °C por 10 minutos con inversión ocasional de los tubos. Posteriormente se adicionaron 200 µL de acetato de potasio 5 M, se agitó por inversión y se dejó reposar 30 minutos en hielo, luego se centrifugó a 15 000 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Después el sobrenadante se transfirió a otro microtubo con 700 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se colocó a -20 °C durante 30 minutos. Más tarde se centrifugó 5 minutos a 10 000 xg a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 200 µL de solución para diluir (TE).

Para eliminar el ARN, se añadió 2 µL de ARNasa A y se incubó a 37 °C por 1 h. Después se adicionaron 20 µL de acetato de sodio 3 M y 200 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20 °C por 2 h. Transcurrido este

tiempo, se centrifugó por 5 minutos a 10 000 xg a temperatura ambiente. Después se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 300 µL de etanol a 70 %, se dejó secar la pastilla y se disolvió en 100 µL de TE. Por último se almacenó a 4 °C. Los reactivos utilizados para el proceso de extracción de ADN se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Reactivos utilizados para la extracción de ADN.

Reactivo	Componentes	Concentración	pH
Amortiguador de extracción	Tris-HCl	100 mM	8.0
	EDTA-Na ₂	50 mM	
	NaCl	500 mM	
	2-Mercaptaetanol	10 mM	
	SDS	1.3 %	
Acetato de potasio	KC ₂ H ₃ O ₂	5 M	NA
Solución para diluir	Tris-HCl	50 mM	8.0
	EDTA-Na ₂	1 mM	
Amortiguador TE	Tris-HCl	10 mM	8.0
	EDTA-Na ₂	1 mM	
Acetato de sodio	NaC ₂ H ₃ O ₂	3 M	
ARNasa ^Z (10 mg/mL)	Tris-HCl	10 mM	7.0
	CaCl ₂	5 mM	
	glicerol	50 %	

^Z. Antes de usar, hervir en baño de agua por 30 minutos

3.4.3. Concentración y calidad de ADN

El ADN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro Jenway 6305 ® UV/vis a una absorbancia de 260 nm. La calidad de ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % (p/v). Cada pozo se cargó con 10 µl de muestra y 1.5 µl de amortiguador de carga (0.1 % azul de bromofenol, 0.1 % xilen cianol, 30 % de Ficoll y 1 % de SDS). Se utilizó el marcador 1kb ADN ladder plus (GeneRuler). El amortiguador de corrida que se utilizó fue TAE 10 X (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na₂-EDTA), diluido a una proporción de 0.5 X. La electroforesis se realizó a 100 V por 2 h. Los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Las fotos de los geles fueron tomadas con un transiluminador de luz ultravioleta KODAK EDAS-290.

Se realizaron diluciones de ADN para obtener una concentración de 10 ng/µL para amplificar los RAPD e ISSR. La calidad del ADN se definió como aceptable, al obtener una banda completa y nítida por arriba de 12,000 pb aproximadamente, de cada una de los individuos evaluados (Figura 10).

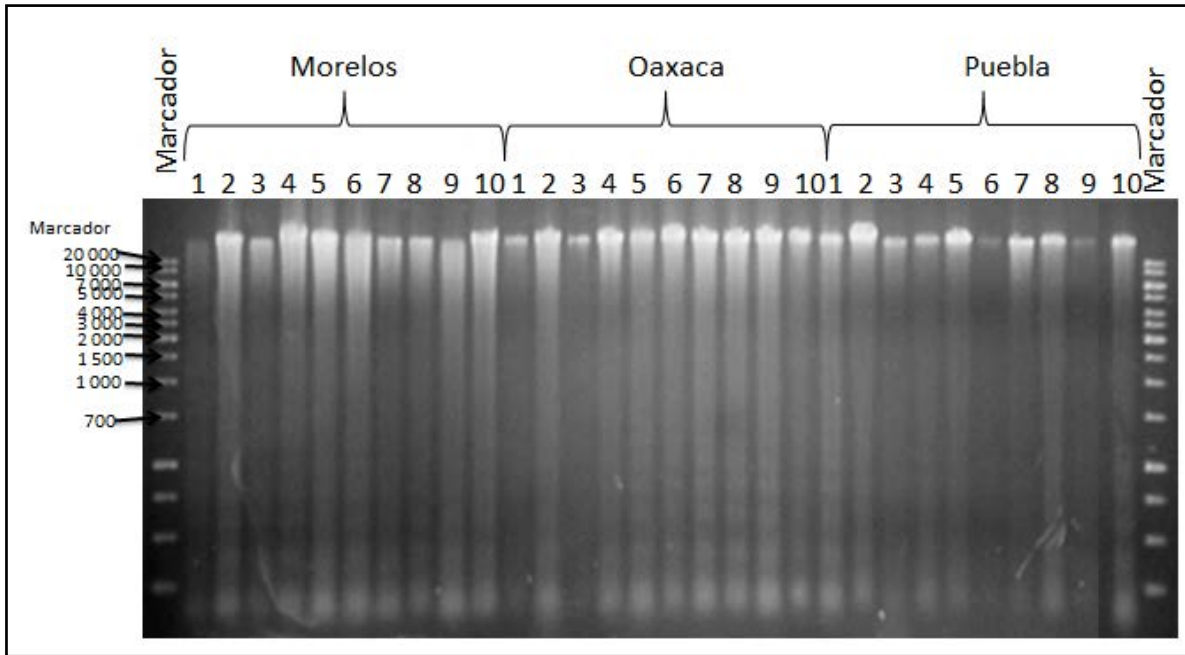


Figura 10. Calidad de ADN de 30 de los 70 individuos probados.

3.4.4. Reacción PCR

La amplificación se llevó a cabo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un termociclador. Los programas utilizados se ajustaron a los iniciadores que se probaron. Al final se utilizaron los siguientes programas en el termociclador Techne TC-512: para RAPD el programa comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C; 38 ciclos con desnaturalización de 30 s a 94 °C, alineamiento de 30 s a 30 °C, extensión de 1 min 30 s a 72 °C y 1 ciclo final de extensión de 3 min a 72 °C (Figura 11); para los ISSR el programa comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C; 38 ciclos con desnaturalización de 30 s a 94 °C, alineamiento de 30 s a 50 °C, extensión de 1 min 30 s a 72 °C y 1 ciclo de extensión de 3 min a 72 °C (Figura 12). Para realizar el PCR tanto en

RAPD como en ISSR se realizaron mezclas de componentes en tubos eppendorf, los cuales se muestran en el Cuadro 9.

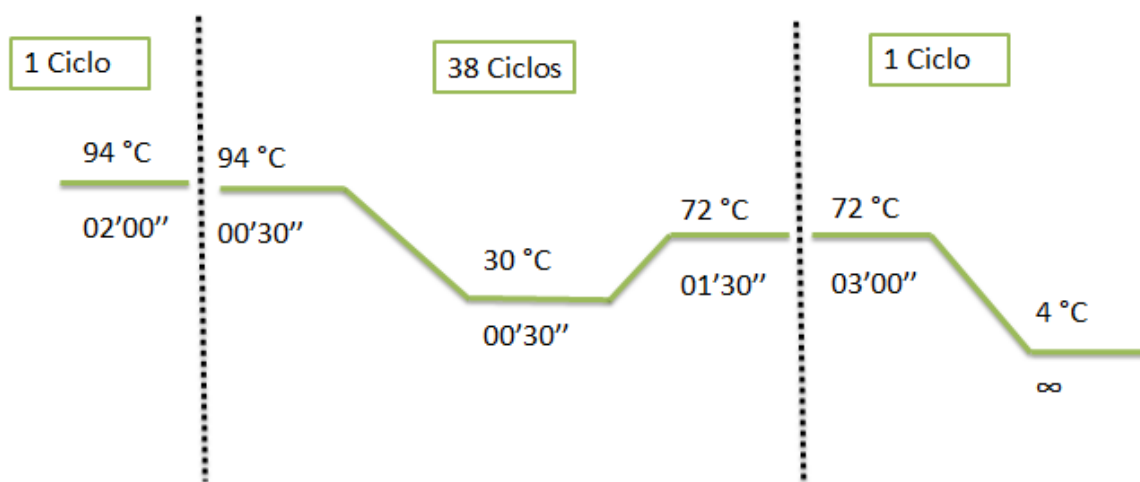


Figura 11. Diagrama de temperaturas y tiempos utilizados para la amplificación de ADN mediante RAPD en el termociclador Techne TC-512.

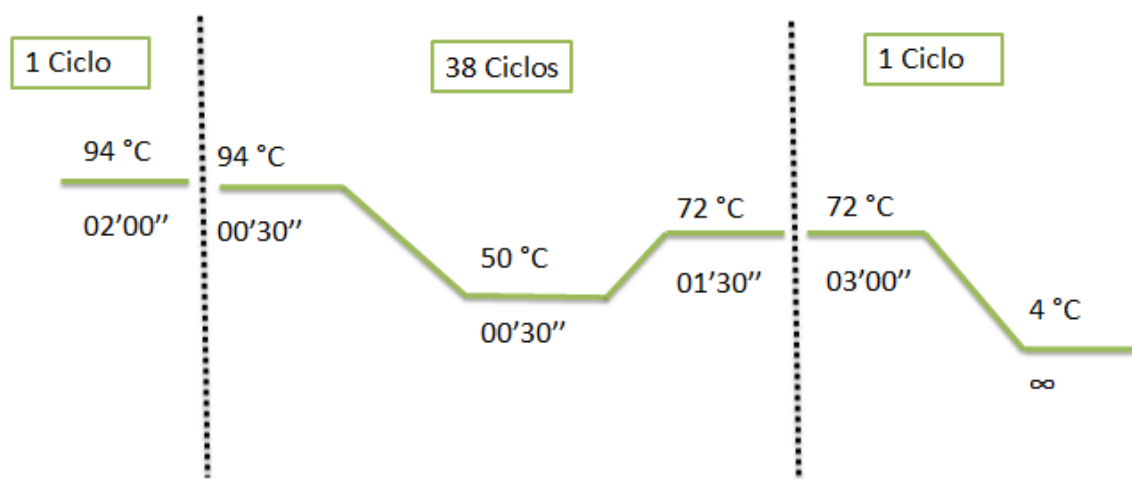


Figura 12. Diagrama de temperaturas y tiempos utilizados para la amplificación de ADN mediante ISSR en el termociclador Techne TC-512.

Cuadro 9. Reactivos utilizados para PCR.

Componente	Volumen final (μL)
H ₂ O destilada	3.2
Amortiguador (10 X)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	2
dNTPs (500 μM)	10
Iniciador (10 pmol/μL)	3
Taq ADN polimerasa (5 U/μL)	0.3
ADN (10 ng/μL)	4
Volumen final de reacción	25

Se probaron 40 iniciadores para RAPD de los cuales se utilizaron solamente 2. Además, se sintetizaron 5 iniciadores para RAPD y 5 para ISSR en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, a partir de los datos referidos en el trabajo de Soliman *et al.* (2010), (Cuadro 10).

Cuadro 10. Iniciadores utilizados para generar los marcadores RAPD e ISSR para la caracterización de individuos de ahuehuete.

Iniciadores	Secuencia
RAPD	
B01	5'-GTTTCGCTCC-3'
B06	5'-TGCTCTGGCC-3'
ISSR	
IAH02	5'-GTGTGTGTGTGTGG-3'
IAH03	5'-GAGAGAGAGAGACC-3'
IAH04	5'-CACCACCACGC-3'
IAH05	5'-GAGGAGGAGGC-3'

3.4.5. Electroforesis

Después de la PCR se realizó la electroforesis en geles de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador de corrida TAE 0.5 X (Tris base 40 mM, pH 7.6; acetato de sodio 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0). En cada pozo se agregó 12.5 µL de muestra y 2 µL de amortiguador de carga. Los geles se corrieron a 100 V durante 2 h y se tiñeron con bromuro de etidio por 15 minutos y se visualizaron en un transiluminador. Para la documentación de las huellas de ADN se utilizó el sistema Kodak High Performance Ultraviolet Transilluminator EDAS-290.

3.4.6. Análisis estadístico de la información

Con los patrones de bandeo generados se realizó una matriz de datos, se determinó el número de bandas o polimorfismos de cada genotipo mediante presencia o ausencia (1 ó 0, respectivamente) de las bandas visualizadas en los geles de agarosa para cada iniciador. Se calculó la matriz de similitud aplicando el coeficiente de Jaccard mediante el software NTSYSpc (Rohlf, 1992), y a partir de los datos obtenidos de esta matriz, se realizó un análisis de agrupamiento y se generó un dendrograma tomando a cada accesión como una unidad taxonómica operacional (OTU).

Por último, considerando como muestra de dos a seis individuos de cada población (Cuadro 11) y mediante el uso del programa PopGen32 (Yeh y Yang, 1999), se obtuvo el porcentaje de *loci* polimórficos en las poblaciones (p), número de alelos observados por locus (N_a), número efectivo de alelos por locus (N_e), índice de diversidad genética de Shannon (I), el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}), número de individuos migrantes (N_m) y el dendrograma de poblaciones utilizando el coeficiente de identidad de Nei (H).

Cuadro 11. Número de individuos considerados por cada población para el análisis de poblaciones.

Población	Número de individuos por población
Distrito Federal	3
Estado de México	2
Morelos	6
Oaxaca	6
Querétaro	3

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Respuestas morfológicas

Los explantes que tuvieron mejores respuestas a las condiciones *in vitro*, fueron: del bioensayo 1, las yemas y ápices en el tratamiento T4 (1.0 mg/L de 2, 4-D; 3.0 mg/L de AIB; 5.0 mg/L de 2 ip) y del bioensayo 2, los brotes de 1.5 cm en el tratamiento T11 (0.3 mg/L de AIB; 1.0 mg/L de TDZ; 3.0 mg/L de 2 ip).

4.1.1. Bioensayo 1

4.1.1.1. Establecimiento y control

Para el control de la oxidación en el bioensayo 1, se utilizaron los antioxidantes ácido cítrico y ácido ascórbico, sin embargo, los porcentajes de oxidación siguieron siendo muy altos (Figura 13).

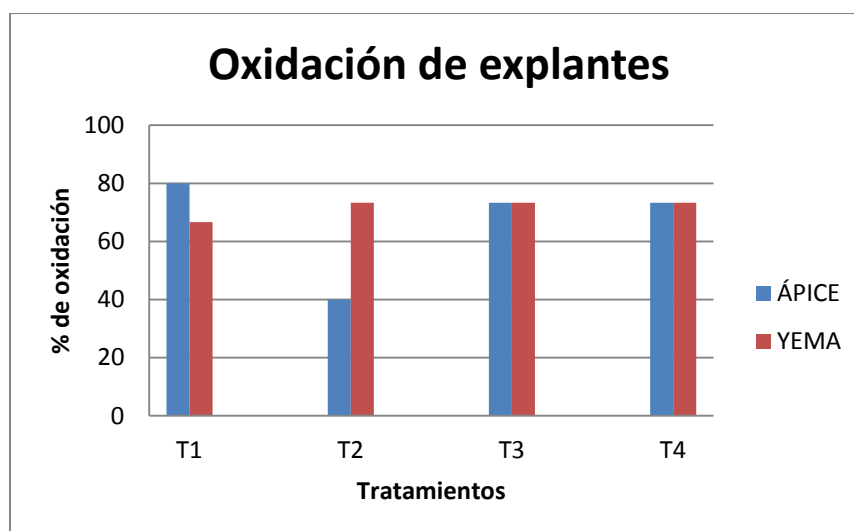


Figura 13. Porcentajes de oxidación que presentaron los explantes (ápices y yemas) en el bioensayo 1.

En cuanto a la contaminación, ésta se controló de manera satisfactoria mediante el proceso de desinfestación que se utilizó rutinariamente para estos experimentos (detergente y Tween 80, alcohol 70 % por 1 minuto y cloro a 20 % por 15 minutos). El porcentaje de contaminación fue bajo, tan sólo del 4.16 %, de esta manera y tomando en cuenta el porcentaje total de explantes perdidos por oxidación (69.17 %), el total de explantes con los cuales se trabajó a partir de este punto fueron 29, es decir, 24.17 % (Figura 14).

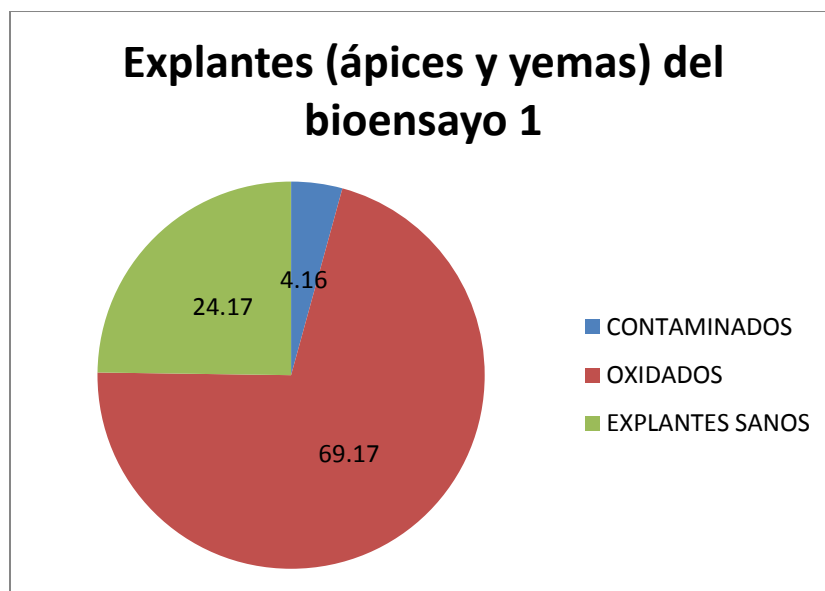


Figura 14. Porcentajes de los explantes contaminados, oxidados y sanos en el bioensayo 1.

4.1.1.2. Multiplicación

El mejor tratamiento en este bioensayo, como se mencionó anteriormente, fue el T4. Las yemas sembradas en este medio presentaron formación de hasta tres

brotes nuevos con una longitud promedio de 1.375 cm en un lapso de 4 meses. Los ápices, por otro lado, llegaron a alcanzar una longitud de hasta 3.5 cm en 6 meses (Cuadro 12).

Cuadro 12. Formación promedio de brotes nuevos, longitud promedio y longitud máxima de los ápices y yemas sembradas en el medio T4 durante 6 meses.

Fecha de observación	Explante	Brotes nuevos en promedio	Longitud promedio (cm)	Longitud máxima (cm)
26 noviembre 2010	Ápice	0	0.5	0.5
	Yema	0	0	0
14 diciembre 2010	Ápice	2	0.8	1
	Yema	1	0.17	0.5
18 enero 2011	Ápice	2	1.075	1.8
	Yema	1	0.4	0.7
10 febrero 2011	Ápice	2	1.375	2
	Yema	2	0.55	0.8
23 febrero 2011	Ápice	2	1.7	2.5
	Yema	2.25	0.725	1
14 marzo 2011	Ápice	2	2.025	3
	Yema	2.25	0.85	1.1
22 marzo 2011	Ápice	2	2.325	3.2
	Yema	2.25	0.95	1.1
5 abril 2011	Ápice	2	2.425	3.3

	Yema	2.25	1	1.2
14 abril 2011	Ápice	2	2.5	3.3
	Yema	2.25	1.075	1.2
26 abril 2011	Ápice	2	2.625	3.4
	Yema	2.25	1.125	1.3
9 mayo 2011	Ápice	2	2.725	3.4
	Yema	2.25	1.2	1.3
18 mayo 2011	Ápice	2	2.8	3.5
	Yema	2.25	1.325	1.5
30 mayo 2011	Ápice	2	2.875	3.5
	Yema	2.25	1.375	1.6

El desarrollo de los nuevos brotes se produjo a partir de los ápices puestos en cultivo. El análisis de varianza muestra que se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) como efecto de los diferentes tratamientos con respecto a la variable número de brotes nuevos producidos por el explante, observándose así que el mayor número promedio de brotes nuevos ocurrió cuando el medio se suplementó con reguladores de crecimiento. Sin embargo, cabe señalar que la variable número de brotes muestra un comportamiento inversamente proporcional a la variable incremento de longitud, ya que a menor concentración de reguladores (T2), hubo mayor producción de brotes nuevos pero de menor longitud (Cuadro 13 y Figura 15).

En cuanto a los explantes de yema sólo el T4 demostró tener influencia en la formación de nuevos brotes. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para este tipo de explante como se muestra en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de la variable número de brotes nuevos producidos por ápice y por yema.

Tratamientos	NBA	NBY
T1 (0.0 mg/L 2, 4-D; 0.0 mg/L AIB; 0.0 mg/L 2 ip)	0.7200 B	0.0 B
T2 (0.1 mg/L 2, 4-D; 0.3 mg/L AIB; 1.0 mg/L 2 ip)	1.8095 A	0.0 B
T3 (0.3 mg/L 2, 4-D; 1.0 mg/L AIB; 3.0 mg/L 2 ip)	1.5397 A	0.0 B
T4 (1.0 mg/L 2, 4-D; 3.0 mg/L AIB; 5.0 mg/L 2 ip)	1.5238 A	1.53968 A
CV	90.35579	134.6627
Significancia	*	*

NBA = Número de brotes por ápice

NBY = Número de brotes por yema

* Estadísticamente significativo

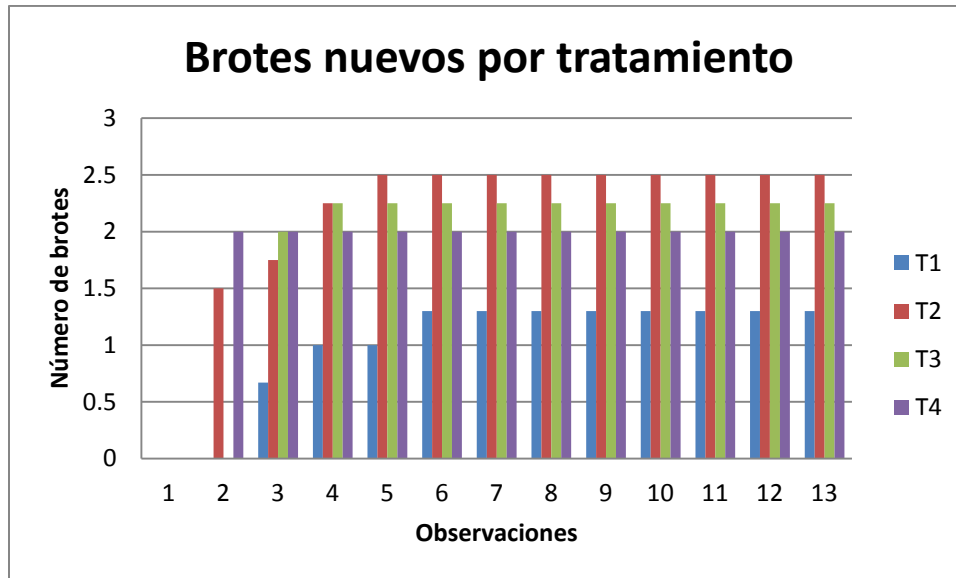


Figura 15. Producción de brotes nuevos comparando los cuatro tratamientos en el transcurso de 6 meses.

Algunas de las respuestas morfogénicas de los explantes de ahuehuete en la presencia del tratamiento 4 se muestran en la Figura 16. Estas respuestas se presentaron transcurridos 4 meses, se puede observar la formación de brotes nuevos en el explante de yema y la enlongación de los explantes de ápice, así como también la formación de brotes nuevos a partir de este.

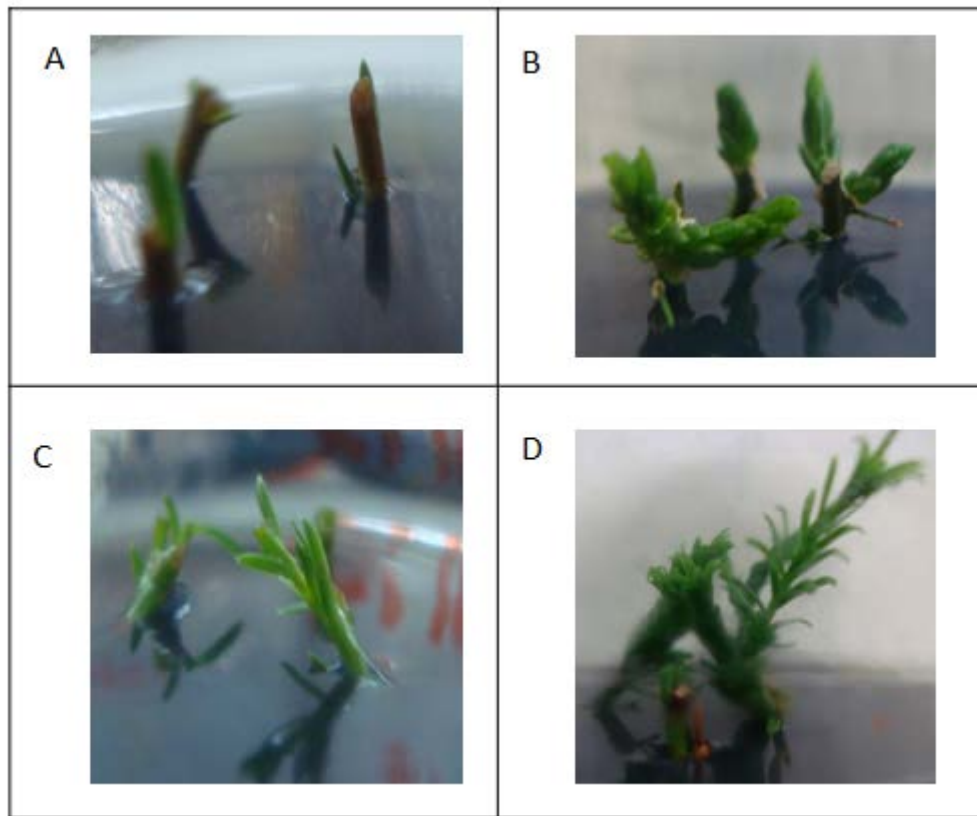


Figura 16. Respuestas morfogénicas al tratamiento T4 de los explantes de *T. mucronatum* Ten. A) Establecimiento del explante (yema); B) Explante de yema con brotes nuevos al cabo de 4 meses; C) Establecimiento del explante ápice; D) Ápice desarrollado después de 4 meses.

En el caso del cultivo *in vitro* de ahuehuete, la adición de citocininas al medio de cultivo favoreció de manera significativa la formación de brotes nuevos a partir de los ápices con el T2 (0.1 mg/L de 2, 4-D; 0.3 mg/L de AIB; 1.0 mg/L de 2 ip) y a partir de yema axilar con el T4 (1.0 mg/L de 2, 4-D; 3.0 mg/L de AIB; 5.0 mg/L de 2 ip). Estos resultado son comparables con los obtenidos en especies forestales como roble (Suárez *et al.*, 2006), donde se presentó mayor formación de brotes nuevos a partir de yemas cuando utilizaron 6-Bencil aminopurina (BAP) a una

concentración de 17.76 μM . Otros trabajos reportan que el efecto combinado de por lo menos dos citocininas incrementan en gran medida el desarrollo de brotes nuevos, como es el caso de teca (*Tectona grandis*) donde Daquinta *et al.* (2001) utilizando explantes con yemas, reportaron que el efecto combinado de kinetina (1.83 μM) con BAP (4.44 ó 6.66 μM) indujo una tasa de 2.4 a 2.6 nuevos brotes por explante en un periodo de seis semanas, de igual manera estos autores reportaron en el 2002, que también a partir de callo, el uso combinado de estas citocininas promovía la formación de brotes nuevos.

Por otro lado, Biroscikova *et al.* (2004) indican que los explantes de árboles adultos de olmo (*Ulmus glabra*), aumentaron de 3.05 brotes nuevos por explante en un medio suplementado con BAP a 5.88 brotes nuevos por explante con un medio suplementado con BAP en combinación con thidiazurón (TDZ).

La producción de nuevos brotes a partir de las yemas axilares, es uno de los efectos más importantes que se observan al adicionar al medio de cultivo citocininas en presencia de explantes con meristemas axilares preexistentes. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada en la micropropagación de especies forestales (Ahuja, 1992; Castro, 1999; Suárez *et al.*, 2006).

En cuanto a la variable incremento en la longitud promedio de los brotes producidos, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$)

entre tratamientos, donde la longitud de los explantes cultivados en medios con las más altas concentraciones de citocininas presentaron mayor longitud que aquellos que crecieron en concentraciones menores o nulas (Figura 17 y Cuadro 14).

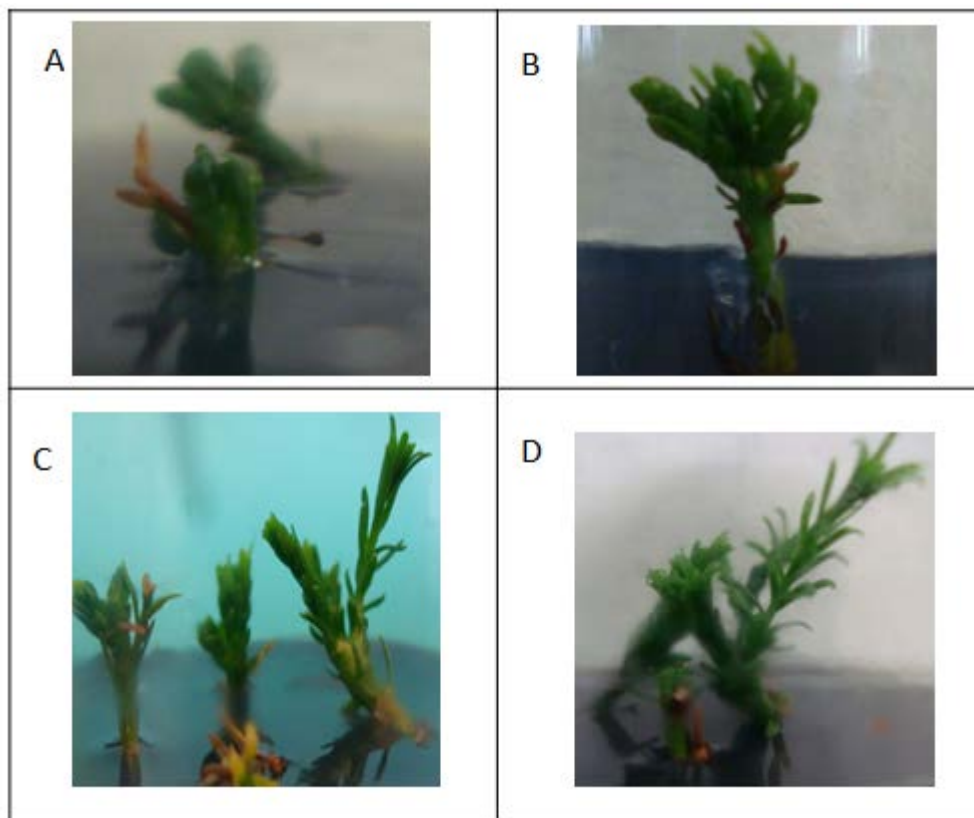


Figura 17. Respuestas morfológicas de *T. mucronatum* Ten. en cultivo *in vitro* con cuatro tratamientos diferentes. A) Tratamiento 1: (0.0 mg/L 2, 4-D; 0.0 mg/L AIB; 0.0 mg/L 2 ip); B) Tratamiento 2: (0.1 mg/L 2, 4-D; 0.3 mg/L AIB; 1.0 mg/L 2 ip); C) Tratamiento 3: (0.3 mg/L 2, 4-D; 1.0 mg/L AIB; 3.0 mg/L 2 ip) y C) Tratamiento 4: (1.0 mg/L 2, 4-D; 3.0 mg/L AIB; 5.0 mg/L 2 ip).

Cuadro 14. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de la variable incremento en la longitud de los brotes producidos

Tratamientos	ILBA	ILBY
T1 (0.0 mg/L 2, 4-D; 0.0 mg/L AIB; 0.0 mg/L 2 ip)	0.9200 B	0.06667 B
T2 (0.1 mg/L 2, 4-D; 0.3 mg/L AIB; 1.0 mg/L 2 ip)	1.3937 A	0.07619 B
T3 (0.3 mg/L 2, 4-D; 1.0 mg/L AIB; 3.0 mg/L 2 ip)	1.5365 A	0.07619 B
T4 (1.0 mg/L 2, 4-D; 3.0 mg/L AIB; 5.0 mg/L 2 ip)	1.7222 A	0.68254 A
CV	54.88996	114.4282
Significancia	*	*

ILBA = Incremento en la longitud del brote en ápice

ILBY = Incremento en la longitud del brote en yema

* Estadísticamente significativo

Por otro lado, se observó que en las primeras semanas del experimento, el tratamiento T2 presentaba una mejor respuesta que el tratamiento T3; sin embargo, en la semana 5 el T3 mostró una respuesta que superó por mucho al T2, incluso se observó que tenía una respuesta casi comparable con el T4 (Figura

18). No obstante, el T4 siempre resultó ser el mejor tratamiento para incrementar la longitud de los ápices.

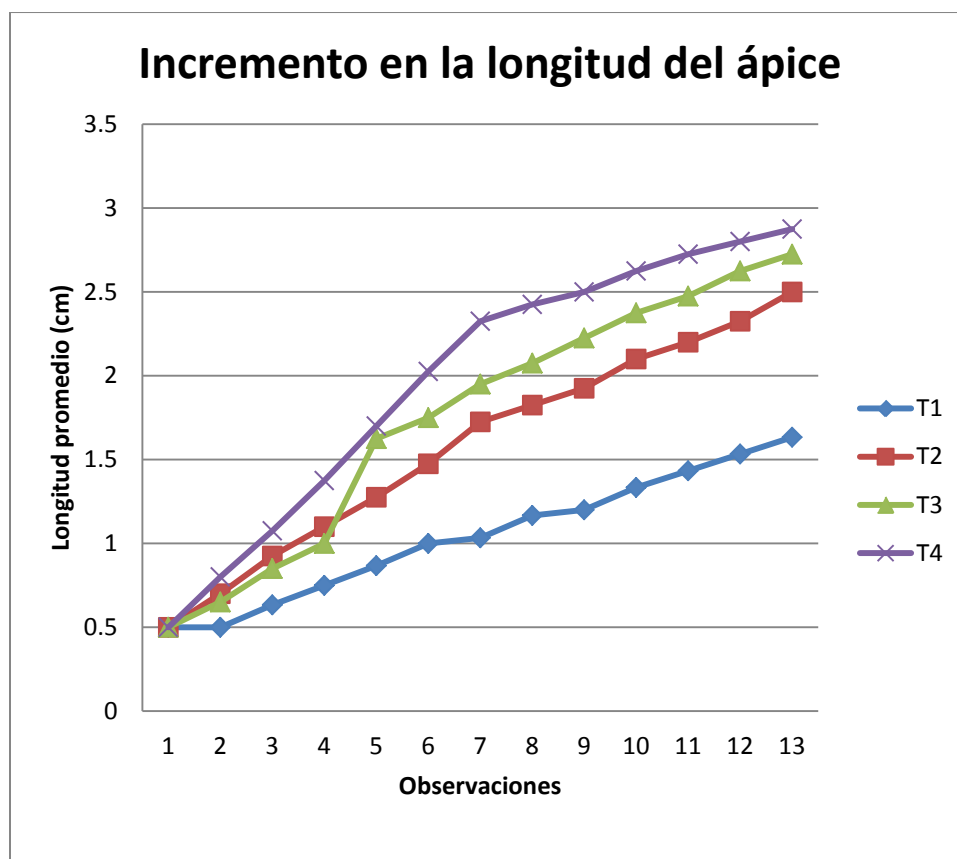


Figura 18. Incremento en la longitud de los brotes de *T. mucronatum* Ten., comparación entre los cuatro tratamientos utilizados.

En cuanto a la elongación de ápices Castro *et al.* (2002) reportan que la mayor tasa de multiplicación en teca (*Tectona grandis*) se obtuvo cuando los explantes con meristemos apicales se cultivaron en medio MS suplementado con 2.22 μ M de BAP.

En el presente trabajo no sólo se utilizaron combinaciones de citocininas para promover la multiplicación de los explantes, si no que se trabajó en combinación con auxinas, de esta manera se observó una respuesta favorable directamente proporcional a las concentraciones utilizadas. Estos resultados coinciden con algunos trabajos donde indican que la combinación de citocininas y auxinas tiene efectos favorables en la multiplicación de especies forestales como teca (*Tectona grandis*), reportado por Tiwari *et al.* (2002) quienes observaron la mayor tasa de multiplicación de los explantes en medio MS suplementado con 22.2 μM de BAP y 0.57 μM de ácido indolacético (AIA). Otro trabajo con esta misma especie realizado por Abdelnour *et al.* (2005), reportaron que cuando se combinó el BA (2 mg/L) con AIA (0.02 mg/L) se observó el mayor porcentaje de brotación (80%) y la mayor producción de ejes por estaca (4, 6 ejes por estaca), además se menciona en este mismo trabajo que la kinetina y la isopentiladenina (2ip), aun cuando fueron evaluadas en concentraciones bajas, fueron efectivas para inducir la brotación. Así mismo, Bunn *et al.* (2005) trabajaron con una dosis de 0.57 μM de AIA en combinación con 0.5 μM de zeatina para multiplicar meristemos axilares de *Eucalyptus phylacis*.

4.1.2. Bioensayo 2

4.1.2.1. Establecimiento y control

En el bioensayo 2, se trabajó con los tratamientos T5 a T8, utilizando concentraciones diferentes de AIA, KIN y Zea; y los tratamientos T9 a T12 donde se utilizaron los reguladores AIB, TDZ y 2 ip. Como explantes se utilizaron, brotes

de 3 tamaños diferentes (0.3, 0.5 y 1.5 cm), ápices y yemas; sin embargo las yemas no tuvieron ningún tipo de crecimiento, por lo tanto, no se presentan estos datos.

Aunque los explantes de yema axilar para los tratamientos T1 a T4 (bioensayo 1) presentaron respuesta favorables a las condiciones *in vitro*, para los tratamientos restantes (T5 a T12) la tasa de supervivencia de este tipo de explante fue de 0 %. En cuanto a los ápices, la tasa de supervivencia (8 %) fue mayor a la de las yemas, esto puede deberse a que en el cultivo de ápices, como la menciona Pérez (2009), se requieren explantes de mayor tamaño que los utilizados en el cultivo de yemas axilares, esto aumenta la probabilidad de supervivencia, sin embargo este método no es aplicable cuando se requieren plantas libres de patógenos.

En este trabajo se observó que los brotes de mayor tamaño (1.5 cm) utilizados como explantes que se utilizaron en los tratamientos T5 al T12 fueron los que tuvieron mayor tasa de supervivencia, los de menor tamaño murieron a causa de la oxidación presentada en los explantes (Figuras 19 y 20). La oxidación se presentó principalmente en la primera semana después de puesto el cultivo, sin embargo, la oxidación de los ápices fue progresiva y se presentó en las semanas siguientes. En cuanto a los brotes la oxidación sólo se presentó en la primera semana, después todos los brotes sobrevivientes continuaron su desarrollo, como se mencionó anteriormente, los brotes que sobrevivieron fueron principalmente los de 1.5 cm.

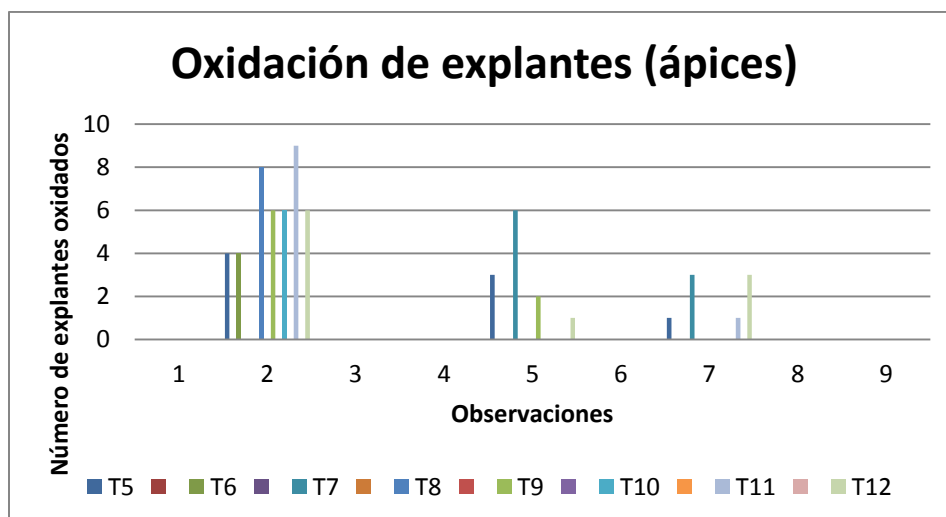


Figura 19. Número de explantes oxidados (ápices) de *T. mucronatum* Ten. a lo largo de 5 meses.

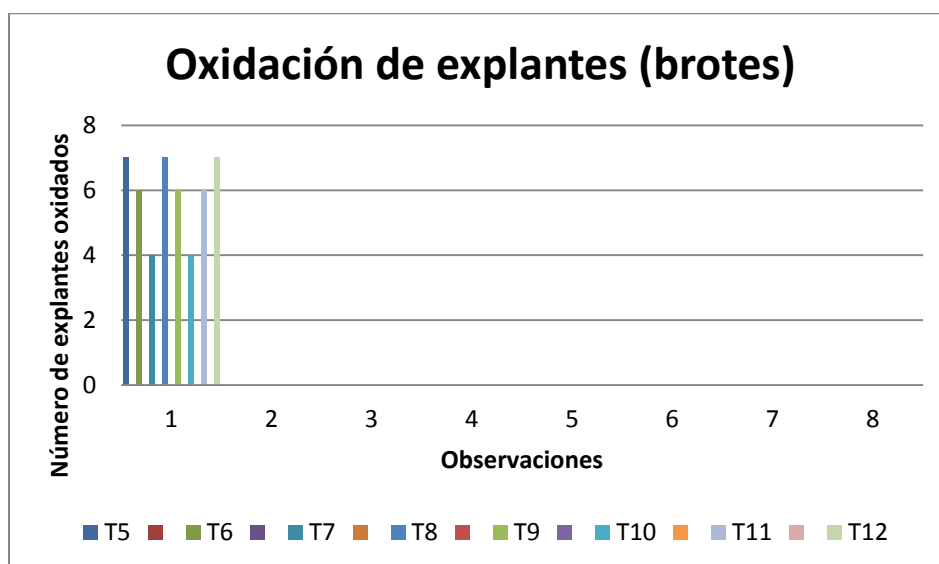


Figura 20. Número de explantes oxidados (brotes) de *T. mucronatum* Ten. a lo largo de 5 meses.

4.1.2.2. Multiplicación

Para la variable incremento de longitud de los explantes, los tratamientos tuvieron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$), a pesar de que hubo una alta tasa de oxidación de los explantes (Cuadro 15). En estos tratamientos no se presentó formación de brotes nuevos, solamente elongación de los explantes. El tratamiento T11 (0.3 mg/L AIB; 1.0 mg/L TDZ; 3.0 mg/L 2 ip) presentó mayor respuesta en el incremento de la longitud de los brotes, los que comenzaron con una longitud de 1.5 cm alcanzaron hasta una longitud de 2.2 cm en un lapso de 3 meses y el T8 (1.0 mg/L AIA; 3.0 mg/L KIN; 5.0 mg/L Zea) resultó más efectivo para incrementar la longitud de los ápices en ese mismo lapso de tiempo, los cuales alcanzaron una longitud de hasta 2 cm (Cuadro 16).

Cuadro 15. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de la variable incremento en la longitud de los explantes (ápices y brotes).

Tratamientos	ILEA	ILEB
T5 (0.0 mg/L AIA; 0.0 mg/L KIN; 0.0 mg/L Zea)	0.58421 B ^Ω	1.2360 AB
T6 (0.1 mg/L AIA; 0.3 mg/L KIN; 1.0 mg/L Zea)	0.50000 B	1.3735 AB
T7 (0.3 mg/L AIA; 1.0 mg/L KIN; 3.0 mg/L Zea)	0.58600 B	1.1294 AB
T8 (1.0 mg/L AIA; 3.0 mg/L KIN; 5.0 mg/L Zea)	0.94583 A	1.1526 AB
T9 (0.0 mg/L AIB; 0.0 mg/L TDZ; 0.0 mg/L 2 ip)	0.60000 B	1.2462 AB
T10 (0.1 mg/L AIB; 0.3 mg/L TDZ; 1.0 mg/L 2 ip)	0.70294 B	0.9600 B
T11 (0.3 mg/L AIB; 1.0 mg/L TDZ; 3.0 mg/L 2 ip)	0.50000 B	1.4100 A
T12 (1.0 mg/L AIB; 3.0 mg/L TDZ; 5.0 mg/L 2 ip)	0.50000 B	1.2360 AB
CV	37.57619	41.89475
Significancia	*	*

ILEA = Incremento en la longitud del explante en ápice

ILEB = Incremento en la longitud del explante en brote

^Ω Medias con la misma letra dentro de las columnas son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

* Estadísticamente significativo

Cuadro 16. Longitud promedio y longitud máxima de los brotes de 1.5 cm sembrados en el medio T8 y de los ápices sembrados en el medio T11 durante 3 meses.

Fecha de observación	Tratamiento 11		Tratamiento 8	
	Longitud promedio brotes (cm)	Longitud máxima brotes (cm)	Longitud promedio ápices (cm)	Longitud máxima ápices (cm)
22 marzo 2011	1.5	1.5	0.5	0.5
4 abril 2011	1.5	1.6	0.65	0.7
15 abril 2011	1.55	1.7	0.85	0.9
26 abril 2011	1.55	1.7	1.05	1.1
9 mayo 2011	1.75	1.9	1.3	1.4
18 mayo 2011	1.85	2	1.5	1.6
30 mayo 2011	1.95	2.2	1.65	1.8
15 junio 2011	2.15	2.4	1.85	2

Cabe señalar que a pesar de que las respuestas presentadas en el cultivo *in vitro* de ahuehuete son comparables con las obtenidas en varias especies forestales, por su misma naturaleza recalcitrante al crecimiento en condiciones *in vitro*, son menores a otras plantas especialmente de porte herbáceo (Amutha *et al.*, 2006 y Suárez *et al.*, 2006).

4.1.3. Enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero

Como se mencionó en la metodología, la etapa de enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero se realizó a la par, ya que en algunas especies forestales, la etapa de enraizamiento *in vitro* es remplazada por la aplicación mediante inmersión temporal de la parte basal de los brotes en una solución de auxinas para así incorporarlos a un sustrato en condiciones *ex vitro*. El enraizamiento en condiciones *in vitro* fue nulo, debido a que los brotes que se seccionaron y se colocaron en medio de enraizamiento mostraron un comportamiento desfavorable al presentar amarillamiento y pérdida de vigor.

En cuanto a los brotes colocados en sustrato, 5 de los 6 brotes transferidos murieron a causa de presencia de hongos y sólo uno presentó elongación del brote en condiciones *ex vitro*, incluso se observó la aparición de un brote nuevo, sin embargo, no mostró aparición de raíz. Este individuo sobreviviente se monitoreó hasta por ocho meses y durante este tiempo manifestó apariencia vigorosa y color verde brillante pero sin presencia de raíz. Cabe señalar que durante seis meses se conservó en bolsa de plástico para proporcionar la atmósfera húmeda, con ventilación semanal de una hora aproximadamente y riego. En el séptimo mes se decidió sacar completamente de la bolsa, sin embargo, se observó que las hojas de la parte inferior del brote comenzaron a marchitarse aunque siguió presentando vigor. En el octavo mes se observó que empezó a perder vigor, sin embargo continuó verde (Cuadro 17).

Cuadro 17. Comportamiento del brote de ahuehuete puesto en sustrato durante 8 meses.

Mes	Apariencia física	Atmósfera húmeda	Longitud	Brote nuevos
Junio	Brote vigoroso de color verde brillante	Sí	2.4	0
Julio	Brote vigoroso de color verde brillante	Sí	2.4	0
Agosto	Brote vigoroso de color verde brillante Incremento de longitud	Sí	2.4	0
Septiembre	Brote vigoroso de color verde brillante Comienza aparición de brotes nuevos	Sí	2.5	1
Noviembre	Brote vigoroso de color verde brillante Continúa elongación del brote	Sí	2.7	1
Diciembre	Brote vigoroso de color verde brillante	Sí	2.9	1
Enero	Brote vigoroso de color verde Comienzan a marchitarse las hojas basales del brote	No	2.9	1
Febrero	Pérdida de vigor Color verde	No	2.9	1

Con base en estos resultados y en la literatura consultada, se considera que las tasas de recuperación de especies leñosas producidas *in vitro*, son demasiado bajas en comparación con especies de porte herbáceo. Estas tasas bajas de recuperación han sido una de las principales limitantes para la aplicación del cultivo de tejidos vegetales en especies forestales llegando en algunos casos a ser inferior a 10% de recuperación (Castro *et al.*, 1999).

En algunos trabajos desarrollados con especies leñosas se han utilizado otros medios de cultivos, los cuales, han demostrado tener mayor efecto que el medio MS, como lo muestran los trabajos desarrollados por Ocampo y Nuñez (2007), donde trabajaron con segmentos nodales de árboles de guayaba y utilizaron como medios de cultivo el MS y el WPM, de esta manera observaron que el medio WPM presentó mayor número de brotes a los 30 días. Esto sugiere que el tipo de sales del medio basal tiene una influencia directa en la inducción de brotes. En otros trabajos de cultivo *in vitro* de especies leñosas se ha utilizado el medio WPM satisfactoriamente como en el caso de pino (Rebolledo *et al.*, 2006) y *Madhuca latifolia* (Bansal, 2000). Otro medio que se ha utilizado de manera exitosa en especies forestales es el medio Broadleaved Tree Medium (BTM) (Chalupa, 1983), como lo menciona Abedini *et al.* (2000) quienes trabajaron micropropagación de *Parkinsonia aculeata*, donde este medio demostró mejores resultados en comparación con el medio WPM, el MS, el CH (Cheng y Voqui, 1977) y el CD (Campbell y Durzan, 1976). Otros trabajos mencionan el uso de BTM como medio de cultivo para especies leñosas como *Nothofagus pumilio* (Martínez, 1997).

A pesar de estos resultados, cabe mencionar que un informe reciente del International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) indica que las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* se están haciendo imprescindibles para la conservación *ex situ* y el intercambio de germoplasma de las especies que se propagan vegetativamente o que tienen semillas recalcitrantes (Ashmore, 1997 y Toribio y Celestino, 2000), es por ello que la continuación del estudio y desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* sería adecuado para optimizar la producción de ahuehuete debido a que el porcentaje de germinación de esta especie varía de 35 a 60 % (Zanoni, 1982), por otro lado, debido a la perturbación de los sitios donde crece naturalmente este árbol, sobre todo por la perturbación en el flujo del agua, los procesos de regeneración de semillas y brotes se han visto gravemente afectados (Enríquez-Peña, 2010).

4.1.4. Escalamiento de cultivo *in vitro*

Según los datos obtenidos en la multiplicación de brotes nuevos a partir de explantes de *T. mucronatum* Ten., se puede desarrollar un escalamiento para establecer una plantación comercial u obtener una multiplicación *in vitro* de esta especie o para cualquier otro fin, una propuesta sería la siguiente:

Establecer el cultivo *in vitro* se propone utilizar como explantes las yemas, ápices o brotes mayores de 1.5 cm, en un medio de cultivo de sales MS, suplementado

con Tiamina (0.4 mg/L), Sulfato de adenina (100 mg/L) y mio-inositol (100 mg/L). Como fuente de carbono: sacarosa (30 g/L), agente gelificante: agar (7 g/L) con un pH de 5.7 ± 0.1 . Para promover el desarrollo de brotes a partir de yemas y ápices se recomienda utilizar como reguladores de crecimiento: 1.0 mg/L de: 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 3.0 mg/L de Benciladenina (BA) y 5.0 mg/L de 2 isopentiladenina (2 ip). En cuanto a los brotes de 1.5 cm, además de los reguladores anteriores, también se pueden utilizar: 0.3 mg/L de ácido indolbutírico (AIB), 1.0 mg/L de thidiazurón (TDZ) y 3.0 mg/L de 2 isopentiladenina (2 ip), o bien, 1.0 mg/L de ácido indolacético (AIA), 3.0 mg/L de kinetina (KIN) y 5.0 mg/L de zeatina (Zea). La siembra del explante se realizará en frascos de 5.5 X 6.8 cm y en un periodo de 4 meses se obtendrían de 3 a 4 brotes por explante.

4.2. Caracterización molecular

4.2.1. Extracción de ADN

El ADN de los individuos analizados obtenido durante la purificación fue de buena calidad (Figura 22), las bandas que se observan son bien definidas y de alto peso molecular en la parte superior del gel.

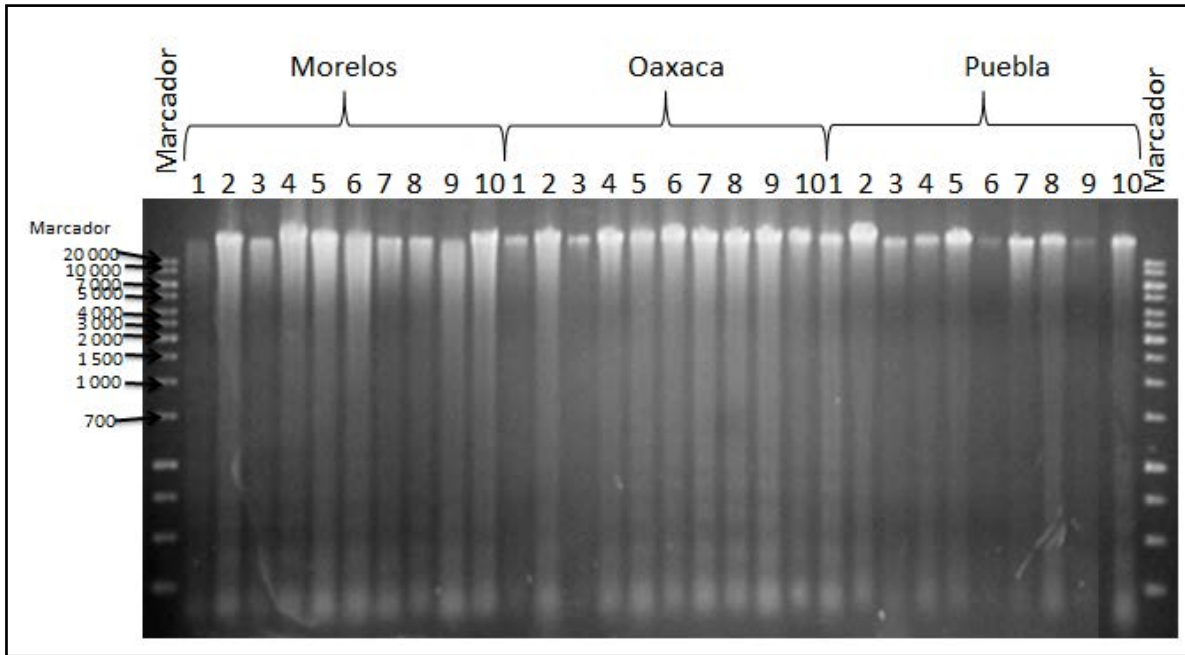


Figura 21. Calidad de ADN extraído de 30 individuos de ahuehuete.

Sin embargo, es necesario optimizar el proceso de extracción de ADN en especies leñosas, en este caso del ahuehuete, debido a que durante el procesamiento de las muestras, hubo presencia evidente de algunos compuestos fenólicos que interfirieron en el proceso de purificación del ADN, estos se hicieron evidentes por el color café que presentaba la mezcla de extracción. En primera instancia, fue difícil la extracción de ADN de las hojas, incluso de las más jóvenes, ya que en pruebas preliminares no se observó ningún rastro de ADN en los geles de agarosa después de la electroforesis durante las primeras extracciones que se llevaron a cabo de las hojas jóvenes, estróbilos y frutos. Por otra parte, no hubo amplificación de todos los individuos probados (70) de los cuales se extrajo ADN satisfactoriamente de las semillas, durante la amplificación, la mayoría de estas

muestras no tuvieron resultados satisfactorios, es decir, no se presentó la amplificación.

Algunas plantas poseen contaminantes como polisacáridos, compuestos fenólicos y pigmentos que son difíciles de separar del ADN y se pueden identificar por su consistencia gelatinosa y de color café. Estos compuestos interfieren en el momento de aislar el ADN en el proceso de extracción y con la acción de la ADN polimerasa en el momento de la amplificación en la PCR y con los mecanismos de acción de otras enzimas como ligasas y endonucleasas (Grattapaglia, 1994; Lisau *et al.*, 2008 y Nieto *et al.*, 2005).

La extracción de ADN resulta ser más difícil cuando se trabaja con especies perennes o árboles. Estos contaminantes se encuentran en abundancia en el follaje de árboles perennes y en el extracto de ADN consecuentemente. Varios factores son conocidos como limitantes del aislamiento de ADN puro de estas especies las cuales son ricas en impurezas como terpenos, polifenoles y polisacáridos. Tales factores incluyen la cantidad de tejido disponible, las condiciones del material vegetal y el número de pasos involucrados en el proceso de extracción y el grado de pureza requerido (Liasu *et al.*, 2008).

En algunos casos, donde se encuentran este tipo de problemas de compuestos que interfieren en la purificación de ADN, muchas proteínas son removidas por desnaturalización y precipitación del extracto usando cloroformo y/o fenol. Los antioxidantes son comúnmente usados para resolver problemas relacionados con compuestos fenólicos, por ejemplo el β -mercaptoetanol, ácido ascórbico, albúmina y PVP entre otros (Dawson y Magee, 1995 y Clark, 1997).

Las extracciones con fenol cuando se combinan con SDS son muy útiles. Sin embargo, en las plantas con un alto contenido de compuestos polifenólicos, las soluciones SDS-fenol tienden a producir bajos rendimientos de ADN (Puchooa, 2004).

El uso de Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) como amortiguador de extracción se ha empleado en muchos casos debido a que es un detergente catiónico que por sus propiedades precipita los ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos de soluciones con baja fuerza iónica. Bajo estas condiciones las proteínas y los polisacáridos neutros permanecen en la solución. CTAB forma complejos con las proteínas y todos los demás polisacáridos ácidos, pero no precipita los ácidos nucleicos. Además, tiene la capacidad de mejorar la tasa de renaturalización de cadenas de ADN complementario y estabiliza la doble cadena de ADN una vez formada (Sambrook y Rusell, 2001). Este tipo de amortiguadores se ha probado con éxito en la purificación de ADN en especies leñosas como *Tectona grandis*

(Nieto *et al.*, 2005), *Capsicum annuum* (Liasu *et al.*, 2008) y *Litchi chinensis* Sonn (Puchooa, 2004).

4.2.2. Análisis y construcción de iniciadores

Se probaron 40 iniciadores para RAPD y sólo 2 presentaron buena resolución y diferenciación en el patrón de bandeo. De los iniciadores RAPD que sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, sólo uno presentó amplificación (dato no presentado). En cuanto a los ISSR, 4 de los 5 iniciadores sintetizados presentaron bandas polimórficas, sólo uno de ellos no indicó polimorfismo (Figura 23).

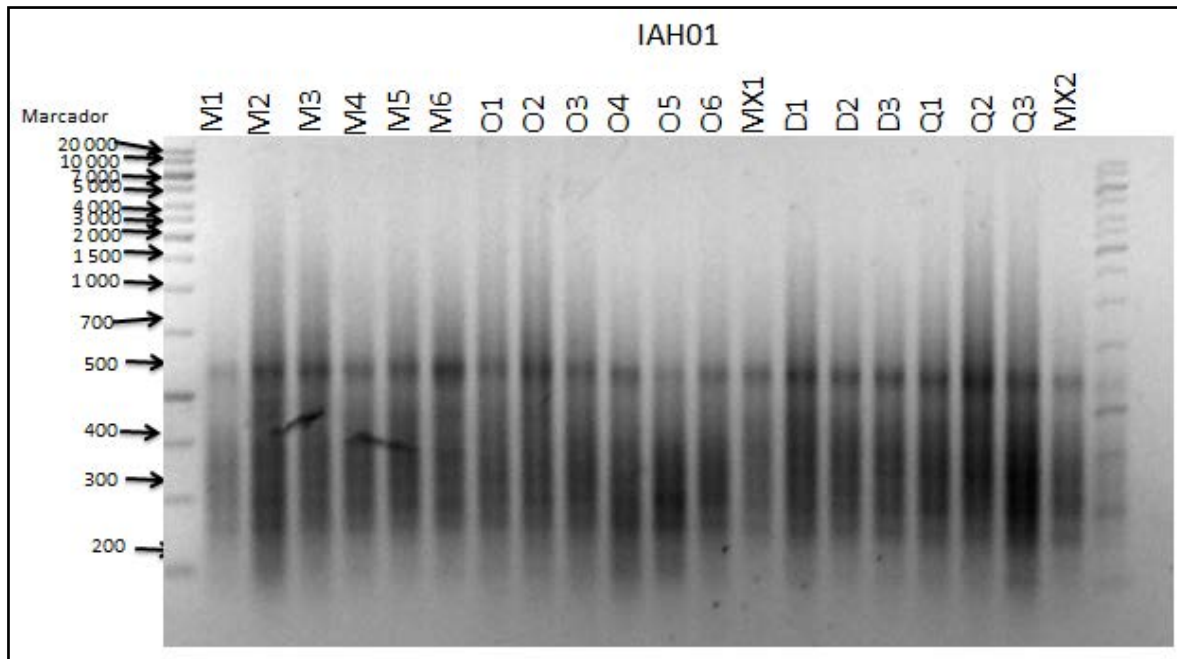


Figura 22. Patrones de bandeo ISSR obtenidos al probar el iniciador IAH01. Se observa que no hay presencia de polimorfismos.

Los iniciadores que generaron mayor número de bandas fueron los ISSR, presentando un total de 28 bandas. En cuanto a los RAPD, los iniciadores amplificaron un total de 16 bandas (Cuadro 18).

Cuadro 18. Número de bandas obtenidas por iniciador en la caracterización de individuos de ahuehuate.

Iniciadores	Secuencia	Número total de bandas	Número total de bandas polimórficas	% de polimorfismos
RAPD				
B01	5'-GTTTCGCTCC-3'	8	7	87.5
B06	5'-TGCTCTGGCC-3'	8	5	62.5
ISSR				
IAH02	5'-GTGTGTGTGTGTGG-3'	6	3	50
IAH03	5'-GAGAGAGAGAGACC-3'	9	8	88.9
IAH04	5'-CACCACCACGC-3'	7	4	57.14
IAH05	5'-GAGGAGGAGGC-3'	6	2	33.3
Total de bandas		44	29	

El porcentaje de polimorfismos detectados con los iniciadores RAPD fue 62.5 % para B06 y 87.5 % para B01. Para los ISSR el porcentaje de polimorfismo varió de 33.3 % a 88.9 % con los iniciadores IAH05 y IAH03, respectivamente. Esto

significa que los marcadores ISSR presentan mayor discriminación en relación a los RAPD.

En un estudio comparativo de *Taxodium distichum* con otras cinco especies forestales, utilizaron cinco RAPD (mismos que se utilizaron en esta investigación) y presentaron un total de 66 bandas, 25 de ellas fueron polimórficas (37.88 %). Por otra parte en este mismo estudio los ISSR mostraron un total de 81 bandas, donde 38 de ellas eran polimórficas, es decir, 47.95 %, por ello se consideró que los marcadores ISSR son útiles para identificar coníferas (Soliman, *et al.*, 2010).

Muchas de las bandas generadas en el estudio de Soliman *et al.* (2010) las presentaron conjuntamente las especies *Sequoia sempervirens* y *T. distichum*. La primera de estas especies pertenece a la familia de las Cupressaceae, al igual que *Taxodium*. *T. distichum*, fue altamente diferenciado por la presencia de un único marcador denominado OP-F05 (5' CCGAATTCCC 3'), sin embargo para el caso de *T. mucronatum* en este estudio, este marcador no presentó amplificación alguna.

Los resultados de ISSR confirman el papel de los fragmentos polimórficos en la identificación de coníferas. Estos datos coinciden con los presentados con Soliman *et al.* (2010) quien concluye que los marcadores ISSR se creó que están

distribuidos a través del genoma completo. Muchos de ellos no tienen efecto directo en los fenotipos morfológicos debido a que estas secuencias de ADN no son amplificadas de genes funcionales.

Los resultados sugieren que la diversidad genética de ISSR no necesariamente marca las diferencias morfológicas entre las especies usadas. Los ISSR utilizados en este estudio facilitan el conocimiento del flujo genético entre especies, estructura genética de especies, diversidad genética y relación evolutiva entre individuos. En la Figura 24 se muestran ejemplos de la variabilidad genética detectada en los individuos de ahuehuete generados con RAPD y en la Figura 25 se muestran los patrones generados por los ISSR.

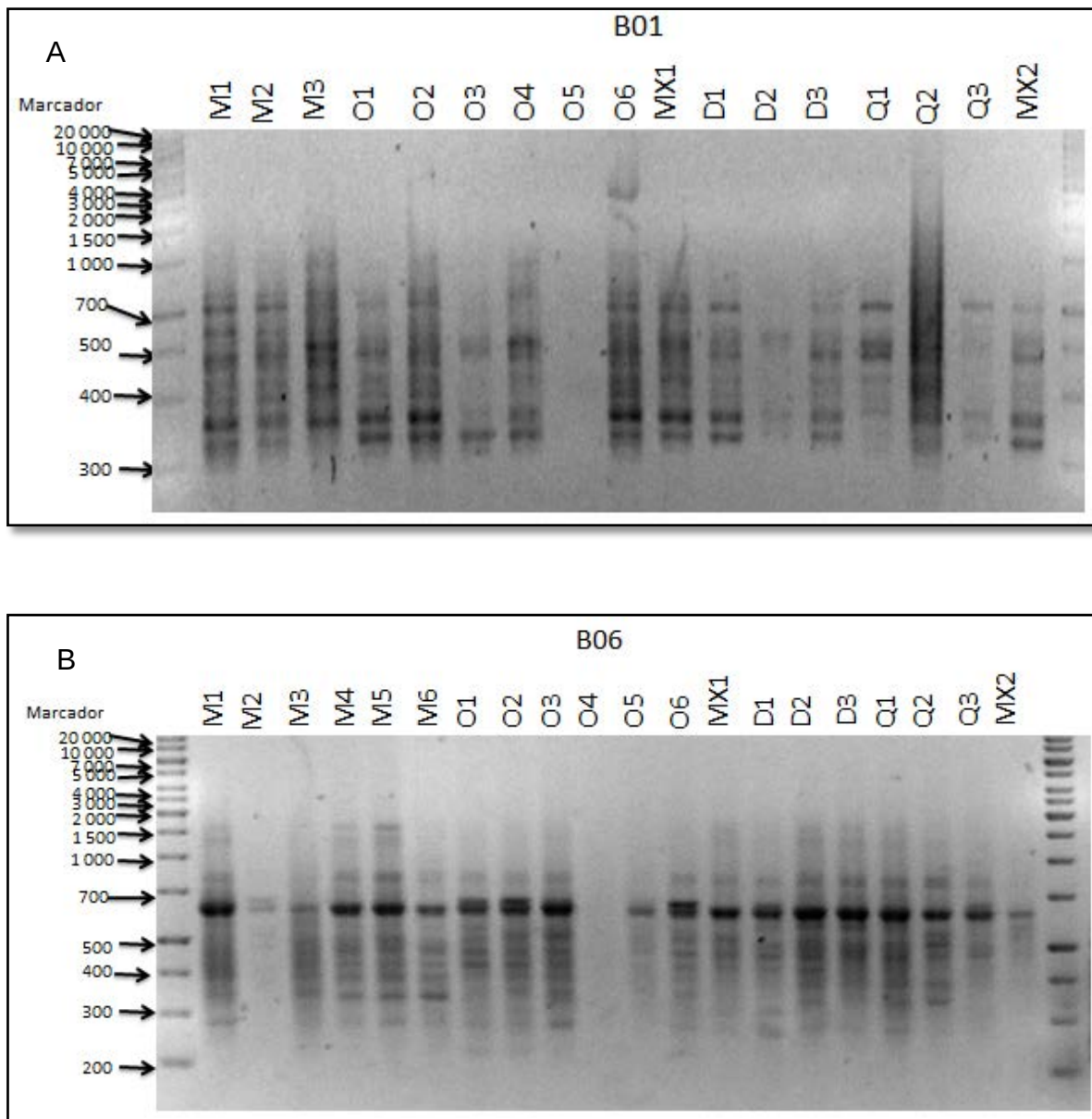


Figura 23. Patrones de bandeo RAPD obtenidos con los iniciadores A) B01 y B) B06 para 20 individuos de ahuehuete.

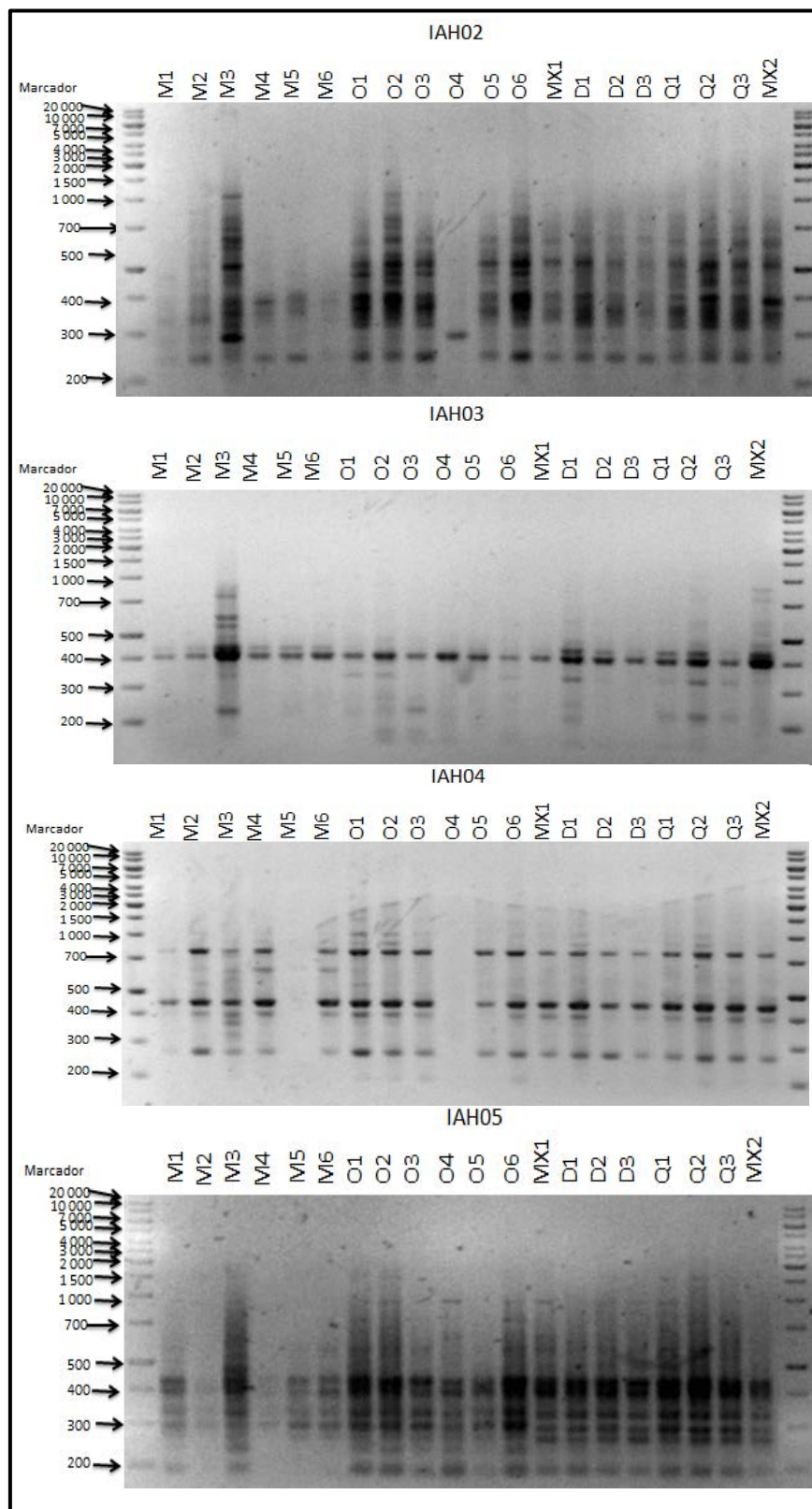


Figura 24. Patrones de bandeo ISSR obtenidos con los iniciadores IAH02, IAH03, IAH04 e IAH05 para 20 individuos de ahuehuete.

4.2.3. Análisis de escalado multidimensional

Con los datos obtenidos de la matriz consenso “RAPD e ISSR” se realizó el análisis de escalado multidimensional. Este análisis se hizo con el fin de identificar la distribución adecuada de los genotipos resultantes, los cuales se muestran en las Figuras 26 y 27, en 2 y 3 dimensiones respectivamente.

En los gráficos 2 D y 3 D obtenidos con los datos de la matriz consenso, se observó la formación de 3 grupos. El primer grupo y más grande estuvo conformado por Mor 1, Mor 2, Mor 3, Mor 4, Mor 5, Mor 6, Oax 1, Oax 2, Oax 6, Qro 2, Qro 3 y D F 2; el segundo grupo lo conformaron los individuos Qro 1, Méx 2, Oax 4 y Oax 5; por último se formó un grupo más pequeño al cual pertenecían los individuos Oax 3, D F 1 y Méx 1.

En este análisis se observó que todos los individuos de Morelos quedaron agrupados en un mismo plano. Los individuos de los demás estados no presentan un agrupamiento uniforme en un solo conjunto, se puede observar que existen individuos de un mismo estado presentes en los tres diferentes grupos, como por ejemplo Oaxaca.

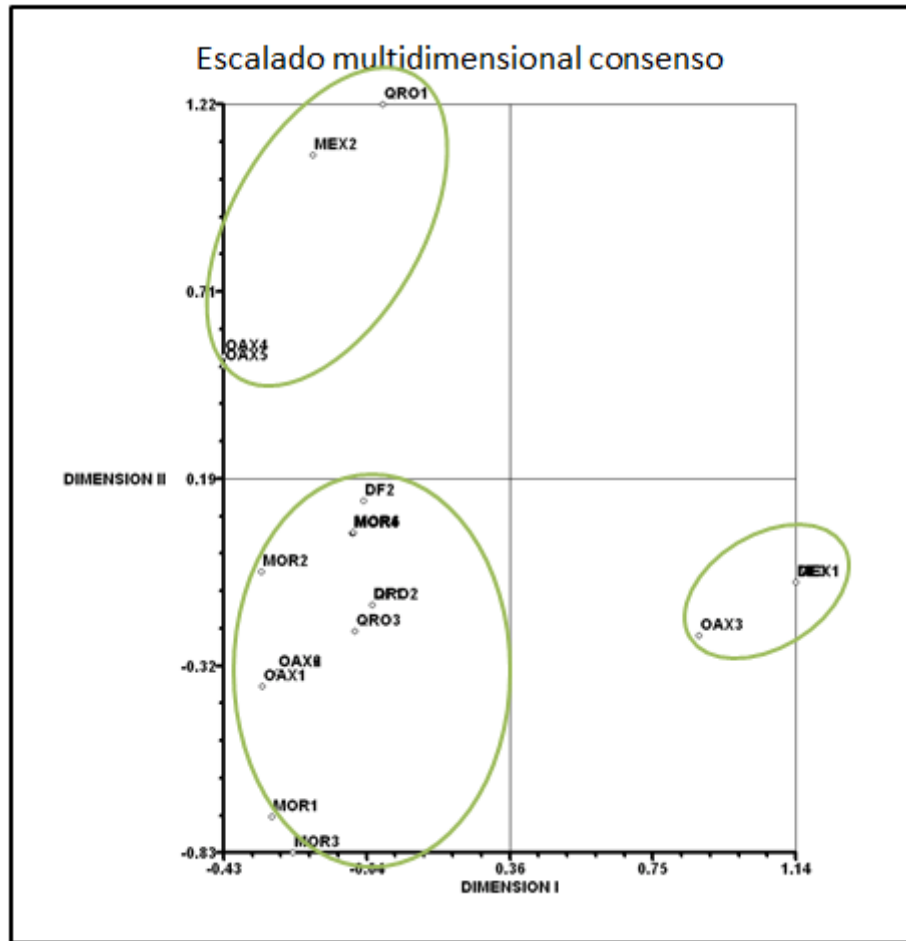


Figura 25. Gráfica en 2 D mostrando la distribución de los grupos de los genotipos de *T. mucronatum* Ten., luego de realizar un análisis de escalado multidimensional.

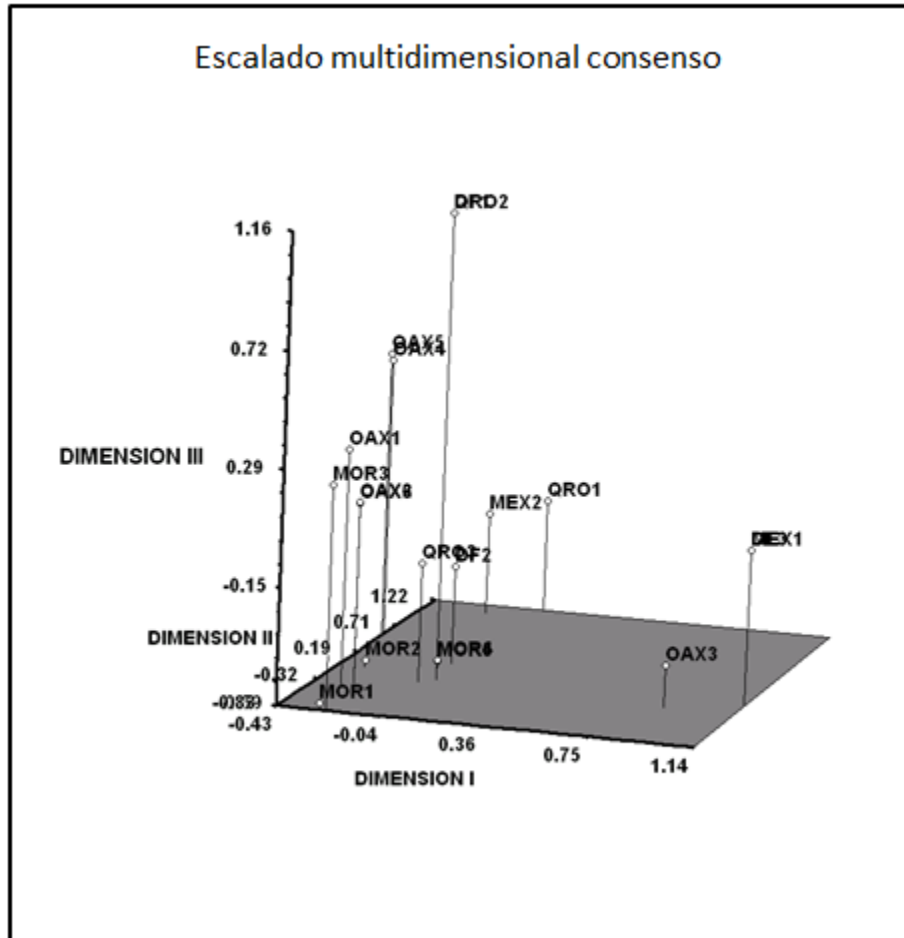


Figura 26. Gráfica en 3 D que muestra la distribución de grupos de los genotipos de *T. mucronatum* Ten., luego de realizar un análisis de escalado multidimensional.

4.2.4. Construcción de dendrogramas

En el análisis de conglomerados de RAPD se formaron cuatro grupos a un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.74 (Figura 28), quedando integrados de la siguiente manera:

- Grupo 1: Morelos 1, Oaxaca 2, Oaxaca 6, Morelos 2, Oaxaca 1, Morelos 4, Morelos 3, D. F. 3, Querétaro 1, Querétaro 2; estos individuos se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.80.
- Grupo 2: Oaxaca 4, Oaxaca 5, México 1, D. F. 1, México 2; estos individuos se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.76.
- Grupo 3: Morelos 5, Morelos 6, Querétaro 3; estos individuos se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.82.
- Grupo 4: Oaxaca 3, D. F. 2; estos individuos se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.76.

Los individuos que presentaron mayor cercanía genética fueron Oax 2 con Oax 6 y Oax 4 con Oax 5 por una parte y por otra parte Mor 5 con Mor 6. En cuanto a poblaciones, en el grupo más grande se integran varios individuos de Morelos y Oaxaca, lo que determinaría que estas poblaciones se encuentran más relacionadas, a pesar de estar alejadas geográficamente. En este grupo también se integran dos individuos de Querétaro y un individuo más del Distrito Federal, aunque en relación con los demás individuos de Morelos y Oaxaca, estos se encuentran más distantes genéticamente, sobre todo los de Querétaro a un coeficiente de similitud de 0.80.

En cuanto al análisis de conglomerado para ISSR también mostró la formación de cuatro grupos a un coeficiente de similitud de 0.80 (Figura 29). Los grupos se formaron de la siguiente manera:

- Grupo 1: Morelos 1, Morelos 2, Morelos 4, Morelos 5, Morelos 6; estos individuos se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.81.
- Grupo 2: Morelos 3 y México 2; estos se individuos se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.84.
- Grupo 3: Oaxaca 1, Oaxaca 2, Oaxaca 3, D. F. 1, Querétaro 2, Querétaro 1, Querétaro 3; estos individuos se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.82.
- Grupo 4: Oaxaca 4, Oaxaca 5, Oaxaca 6, México 1, D. F. 3, D. F. 2; estos individuos se agruparon a un coeficiente de similitud de 0.82.

Para este caso los individuos que presentaron mayor cercanía genética fueron Mor 2, Mor 4, Mor 5 y Mor 6, al igual que Oax 4 y Oax 5 por un lado y Méx 1 con DF 3. En cuanto a poblaciones, se puede observar que cada una de ellas se agrupa mejor que con los RAPD, es decir, que los individuos de cada población presentan mayor cercanía entre sí (a excepción de Méx 2 y D F 1), de esta manera las poblaciones se encuentran mejor ordenadas y presentan coeficientes de similitud mayores. Además, se puede observar que con los ISSR las

poblaciones de Morelos y Oaxaca no se encuentran tan relacionadas como con los RAPD.

Para determinar un mejor agrupamiento de los individuos, se realizó un dendrograma con los datos obtenidos del consenso “RAPD e ISSR” (Figura 30). En esta ocasión se obtuvieron cinco grupos a un coeficiente de similitud de 0.74. Los individuos se agruparon de la siguiente manera:

- Grupo 1: Morelos 1, Morelos 2, Morelos 4, Morelos 5, Morelos 6; agrupados a un coeficiente de similitud de 0.79.
- Grupo 2: D. F. 2; a un coeficiente de similitud de 0.66.
- Grupo 3: Oaxaca 1, Oaxaca 2, Oaxaca 6, Oaxaca3, D. F. 1, Querétaro 2, Querétaro 1, Querétaro 3; quedando agrupados a un coeficiente de similitud de 0.78.
- Grupo 4: Oaxaca 4, Oaxaca 5, México 1, D. F. 3; quedando agrupados a un coeficiente de similitud de 0.81.
- Grupo 5: Morelos 3 y México 2, agrupados a un coeficiente de similitud de 0.74.

De esta manera se observó que al igual que con los RAPD, los que presentan mayor cercanía genética son los individuos Mor 6 con Mor 5 y Oax 4 con Oax 5. Sin embargo en este caso no se observó una cercanía tan estrecha entre Oax 2 y Oax 6 como se había observado en el dendrograma de RAPD.

Con base en la línea de corte de los tres dendrogramas se puede observar que los individuos de Morelos se encuentran estrechamente relacionados, al igual que los individuos de Oaxaca, sin embargo, hay que notar que uno que otro individuo de estas poblaciones se separa demasiado del resto, sobretodo este fenómeno se observa en los individuos de Morelos (Mor 3) con RAPD + ISSR y en menor escala con ISSR; y Oaxaca (Oax 4 y Oax 5) con RAPD, ISSR y RAPD + ISSR. Querétaro sólo presenta mayor similitud entre sus individuos con ISSR y en la matriz consenso, la cual está conformada mayormente por iniciadores ISSR. Para individuos de Distrito Federal y Estado de México presentan mayor similitud con ISSR, aun así, se observa claramente que se encuentran muy alejados un individuo de otro en esas poblaciones, curiosamente poblaciones que se encuentran geográficamente cerca. De esta manera se sugiere que los marcadores ISSR son más eficientes para formar grupos con individuos de diferentes procedencias.

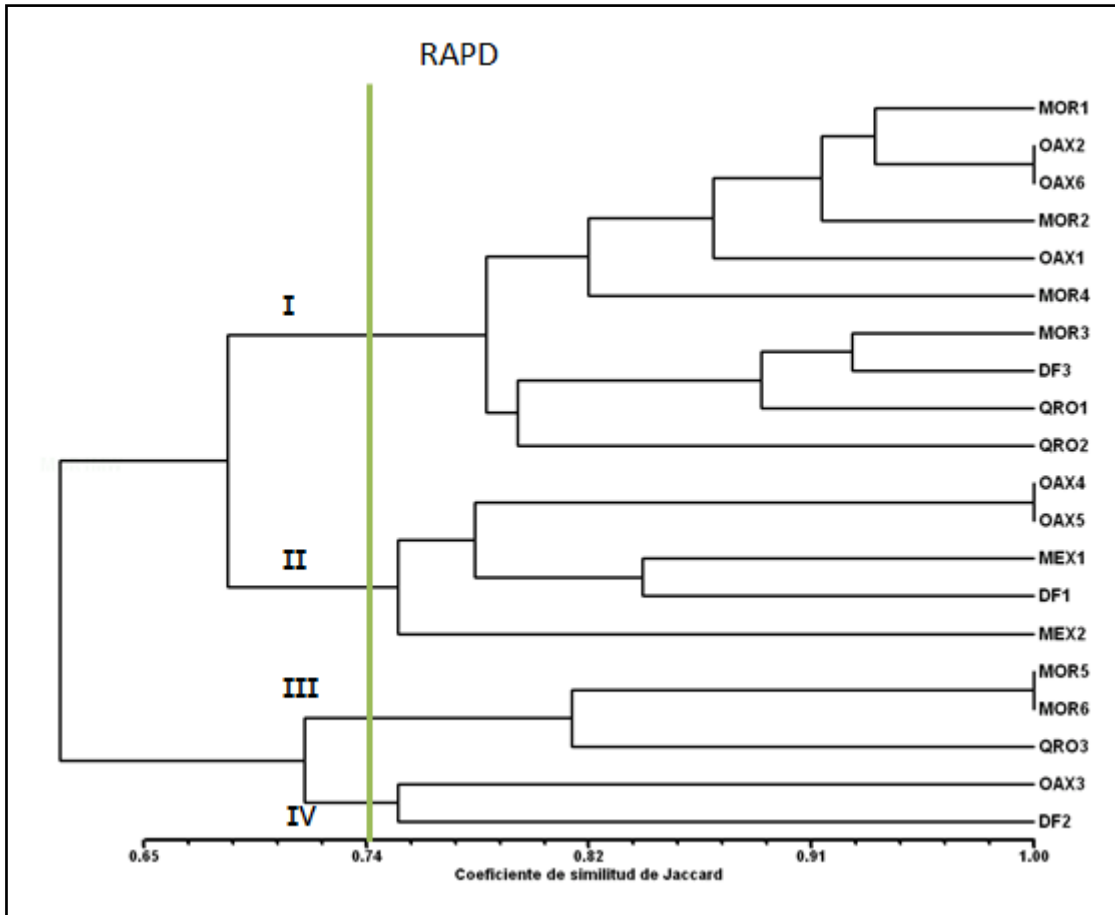


Figura 27. Dendrograma de relaciones entre 20 genotipos de *T. mucronatum* Ten. Obtenido con datos de RAPD.

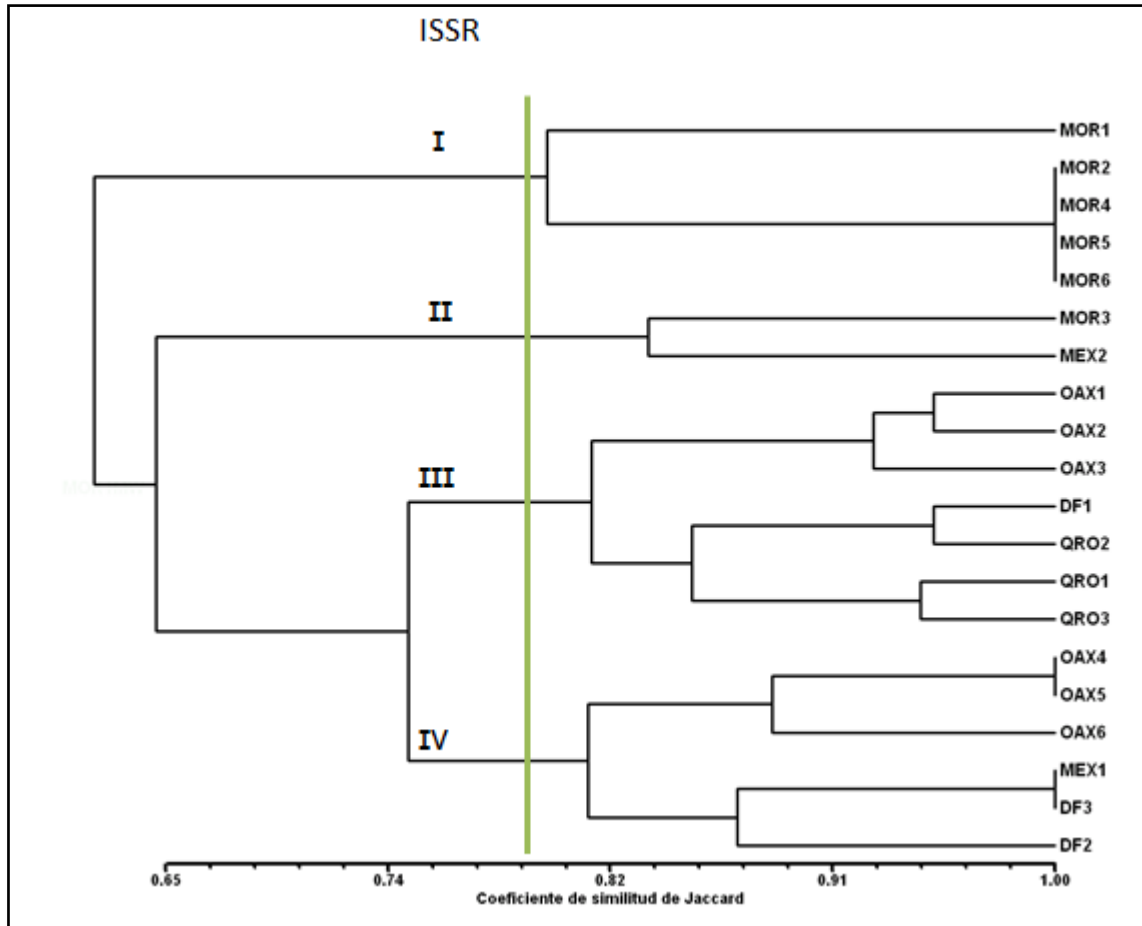


Figura 28. Dendrograma de relaciones entre 20 genotipos de *T. mucronatum* Ten., obtenido con datos de ISSR.

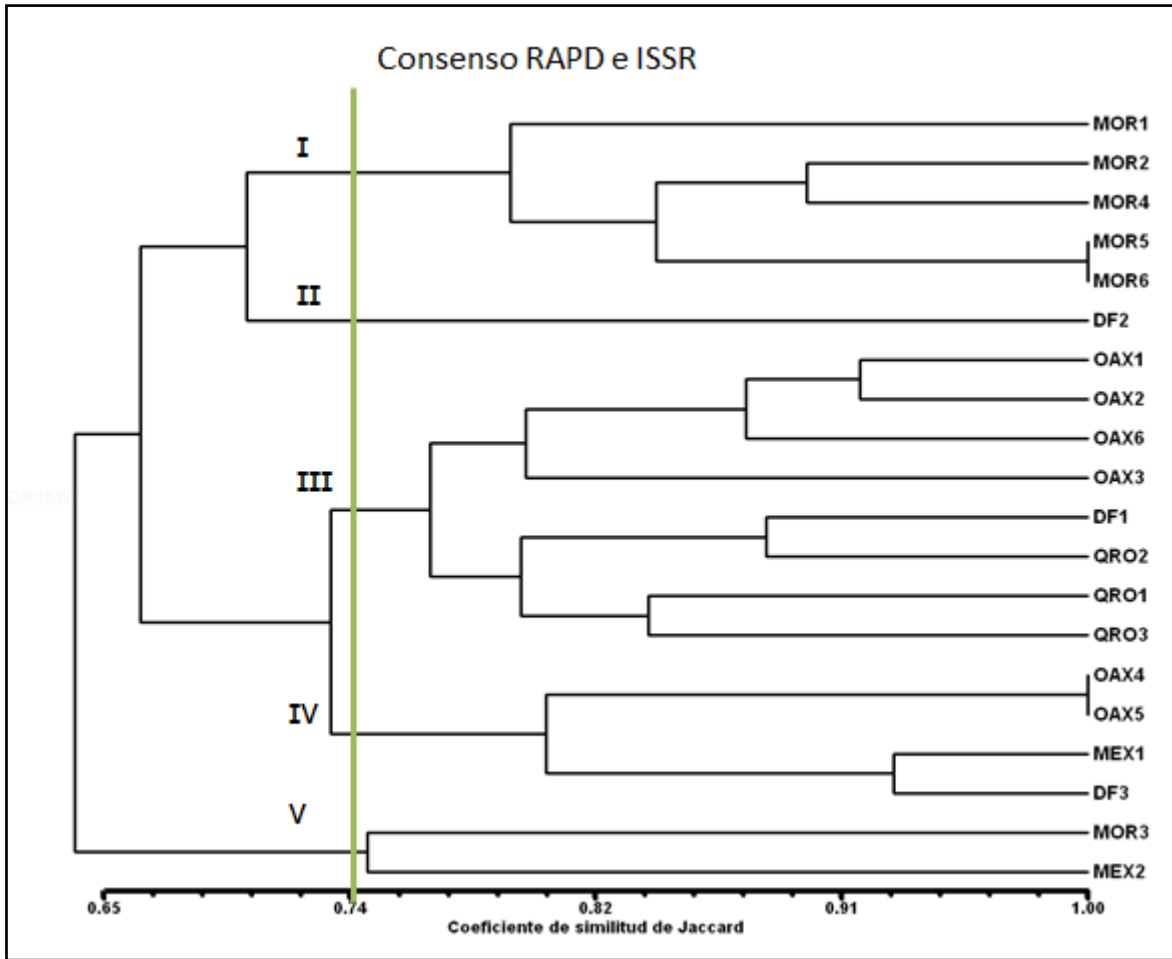


Figura 29. Dendrograma de relaciones entre 20 genotipos de *T. mucronatum* Ten., obtenido con datos de consenso "RAPD e ISSR".

El índice de similitud entre cada uno de los 20 individuos de ahuehuete analizados se muestra en el Cuadro 19. El menor índice de similitud se presentó entre los individuos Mor 5 y Mor 6 con Oax 4 y Oax 5; con un valor de 0.51. Esto indica que a pesar de los datos presentados en el dendrograma RAPD, donde presentaban mayor similitud estas dos poblaciones, Morelos y Oaxaca no se encuentran relacionadas estrechamente y la cercanía genética entre estas dos poblaciones es menor que entre las otras poblaciones, lo que infiere que los ISSR arrojan mejor

información acerca de la similitud y formación de grupos de individuos de ahuehuate. El mayor índice de similitud lo mostraron los individuos Oax 1 y Oax 6 con Oax 2 con un valor de 0.92, determinándose así que son los más cercanos genéticamente, esto se puede deber a que los individuos representantes de este estado se recolectaron en la margen de un río en una zona aislada y la reproducción de estos árboles es a través de hijuelos, lo que indica que muchos de los árboles son clones de un mismo individuo, por lo tanto la variabilidad genética es realmente baja y por tanto la similitud entre individuos es alta.

Cuadro 19. Matriz de similitud entre 20 individuos de ahuehuate, generada a partir de datos moleculares utilizando el coeficiente de Jaccard.

	MOR1	MOR2	MOR3	MOR4	MOR5	MOR6	OAX1	OAX2	OAX3	OAX4	OAX5	OAX6	MEX1	MEX2	DF1	DF2	DF3	QRO1	QRO2	QRO3
MOR1	1.00																			
MOR2	0.84	1.00																		
MOR3	0.63	0.65	1.00																	
MOR4	0.81	0.90	0.67	1.00																
MOR5	0.77	0.80	0.59	0.89	1.00															
MOR6	0.77	0.80	0.59	0.89	1.00	1.00														
OAX1	0.72	0.66	0.65	0.63	0.59	0.59	1.00													
OAX2	0.71	0.69	0.72	0.67	0.59	0.59	0.92	1.00												
OAX3	0.64	0.58	0.62	0.55	0.60	0.60	0.81	0.84	1.00											
OAX4	0.70	0.63	0.63	0.60	0.51	0.51	0.72	0.76	0.69	1.00										
OAX5	0.70	0.63	0.63	0.60	0.51	0.51	0.72	0.76	0.69	1.00	1.00									
OAX6	0.77	0.75	0.73	0.72	0.64	0.64	0.84	0.92	0.76	0.82	0.82	1.00								
MEX1	0.72	0.70	0.68	0.72	0.63	0.63	0.69	0.73	0.66	0.83	0.83	0.79	1.00							
MEX2	0.55	0.54	0.74	0.55	0.56	0.56	0.55	0.58	0.59	0.64	0.64	0.59	0.71	1.00						
DF1	0.67	0.65	0.68	0.67	0.63	0.63	0.78	0.82	0.70	0.67	0.67	0.74	0.79	0.70	1.00					
DF2	0.71	0.64	0.63	0.71	0.72	0.72	0.55	0.63	0.70	0.66	0.66	0.69	0.73	0.65	0.68	1.00				
DF3	0.78	0.76	0.74	0.78	0.69	0.69	0.70	0.78	0.71	0.78	0.78	0.85	0.93	0.67	0.74	0.80	1.00			
QRO1	0.74	0.71	0.74	0.74	0.70	0.70	0.71	0.79	0.77	0.74	0.74	0.81	0.81	0.72	0.80	0.81	0.88	1.00		
QRO2	0.68	0.66	0.69	0.68	0.64	0.64	0.79	0.87	0.81	0.63	0.63	0.79	0.69	0.63	0.89	0.74	0.75	0.86	1.00	
QRO3	0.65	0.58	0.67	0.65	0.71	0.71	0.72	0.71	0.74	0.65	0.65	0.72	0.72	0.69	0.76	0.77	0.73	0.84	0.77	1.00

4.2.5. Análisis de poblaciones

Se realizó un análisis de 5 poblaciones de ahuehuete utilizando el programa Popgene 32 (Yeh y Yang, 1999). Las poblaciones consideradas fueron Morelos, Oaxaca, Estado de México, Distrito Federal y Querétaro.

El Cuadro 20 muestra los valores de identidad (por arriba de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) entre las cinco poblaciones evaluadas. Las poblaciones más relacionadas fueron Estado de México con Distrito Federal con un valor de identidad de 0.9371 y Querétaro con Distrito Federal con un valor de 0.9219. Como se observa, tanto Estado de México y Querétaro tiene una identidad genética muy estrecha con el Distrito Federal. Este dato no sorprende tanto si nos referimos al Estado de México, puesto que ambas son entidades colindantes; sin embargo, para Querétaro, estado que no colinda con el Distrito Federal, la relación es de igual manera muy cercana, esto puede justificarse debido a que el Estado de México pudiera representar un puente de unión entre población y población.

Sin embargo, observamos de igual manera que el valor de identidad entre Querétaro y Estado de México (para justificar de manera más amplia la hipótesis de este “puente” entre poblaciones), es de 0.8628, un valor muy aceptable para considerar estrechamente relacionadas estas poblaciones de estados colindantes;

sin embargo, es un valor menor que el que presenta la identidad genética entre Querétaro y Distrito Federal (poblaciones separadas geográficamente).

Por otro lado Morelos, estado colindante con el Distrito Federal, no muestra una identidad genética muy elevada (0.8622) en comparación con la que muestra Querétaro (0.9219), por ejemplo, en relación con el mismo Distrito Federal. Por último las poblaciones menos relacionadas fueron Morelos y Oaxaca con un valor de identidad genética de 0.7811. Cabe destacar que a pesar de la relativa cercanía entre los estados de Morelos y México, el valor de identidad resultó bajo (0.7964), más aun si comparamos la ubicación geográfica del Estado de México y Oaxaca respecto a Morelos, es decir, la distancia entre Oaxaca y Morelos es mayor que la distancia entre Estado de México y Morelos, sin embargo, el valor de identidad genética (0.7811 y 0.7964, respectivamente) es muy similar. Los valores de identidad entre todas las poblaciones estuvieron en un rango de 0.7811 y 0.9371.

Cuadro 20. Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para cinco poblaciones de ahuehuate.

Población	Morelos	Oaxaca	México	D. F.	Querétaro
Morelos	****	0.7811	0.7964	0.8622	0.8383
Oaxaca	0.2470	****	0.8631	0.8785	0.8597
México	0.2277	0.1472	****	0.9371	0.8628
D. F.	0.1483	0.1295	0.0650	****	0.9219
Querétaro	0.1763	0.1512	0.1476	0.0814	****

Como se mencionó anteriormente en el Cuadro 18, los iniciadores que generaron mayor números de bandas fueron los ISSR presentando un total de 26 bandas, con las cuales se elaboró una matriz de datos con 520 caracteres. Con los iniciadores RAPD se obtuvieron un total de 18 bandas, obteniendo así una matriz de datos con 360 caracteres. Los RAPD presentaron un porcentaje de polimorfismos de 62.5 a 87.5 % y en cuanto a los ISSR los porcentajes variaron de 33.3 a 88.9 %.

A partir de la evaluación de parámetros que definen la estructura de las poblaciones (Cuadro 21), se observó que no todas las poblaciones presentan los mismos porcentajes de polimorfismo, mismos que varían de 20.45 % en el caso de Querétaro, a 45.45 % para Morelos, siendo este último la población que presentó

mayor porcentaje de polimorfismo genético. El porcentaje de polimorfismo entre todas las poblaciones fue de 65.91 %.

En cuanto a diversidad genética de Nei de las poblaciones (H), ésta varió de 0.0870 a 0.1448, ello significa que la diversidad genética dentro de las poblaciones no es muy alta o existe uniformidad entre los individuos (Cuadro 21). En cuanto la comparación entre todas las poblaciones, la diversidad genética aumentó a 0.2311. Estos resultados implican que las poblaciones de ahuehuete, debido a su baja variabilidad genética tienden a formar una línea pura lo que conlleva a la expresión de genes deletéreos que provocarían en algún momento la extinción de la especie debido a la infertilidad de los individuos causada por esta baja variabilidad genética.

Cuadro 21. Variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones de ahuehuate (*Taxodium mucronatum* Ten.).

Población	Ubicación	P (%)	Na	Ne	H	I	G _{ST}	Nm
1	Morelos	45.45	1.4545	1.2398	0.1421	0.2175	-	-
			0.5037 ^Z	0.3525 ^Z	0.1871 ^Z	0.2688 ^Z	-	-
2	Oaxaca	31.82	1.3182	1.2681	0.1448	0.2059	-	-
			0.4712 ^Z	0.4026 ^Z	0.2153 ^Z	0.3055 ^Z	-	-
3	Estado de México	22.73	1.2273	1.1607	0.0941	0.1374	-	-
			0.4239 ^Z	0.2998 ^Z	0.1756 ^Z	0.2564 ^Z	-	-
4	Distrito Federal	29.55	1.2955	1.2100	0.1185	0.1734	-	-
			0.4615 ^Z	0.3583 ^Z	0.1922 ^Z	0.2765 ^Z	-	-
5	Querétaro	20.45	1.2045	1.1592	0.0870	0.1254	-	-
			0.4080 ^Z	0.3371 ^Z	0.1782 ^Z	0.2540 ^Z	-	-
Entre población	Todas	65.91	1.6591	1.4025	0.2311	0.3439	0.4568	0.5945
			0.4795 ^Z	0.3935 ^Z	0.2061 ^Z	0.2894 ^Z	-	-

P (%) = Porcentaje de polimorfismos, Na = Número de alelos observados, Ne = Número de alelos efectivos, H = Diversidad genética (Nei), I = Diversidad de Shannon, Nm = Número de individuos migrantes, G_{ST} = Coeficiente de diferenciación entre poblaciones, Z= Desviación estándar.

La estimación del número de individuos migrantes, relacionado con el grado de flujo génico (Nm = 0.5945) indicó que hay menos de un individuo migrante entre las poblaciones. Una vez más estos resultados implican que al haber menos de un

individuo migrante, las poblaciones son muy homogéneas con tendencia a formar líneas puras, ya que no existe el cruzamiento entre individuos con diferente genotipo para que exista mayor variabilidad genética entre las poblaciones, debido a que las variaciones en los porcentajes de flujo de genes están en función directa con la anatomía de la planta, barreras geográficas, expresión genética, interacción ambiental e interacción genotipo-ambiente (Alarcón, 2009).

El coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones (G_{ST}) fue de 0.4568, es decir, 45.68 %, lo cual nos indica que las poblaciones están medianamente diferenciadas. Estos datos arrojan que aproximadamente 45.68 % de la variación detectada es debida a las diferencias entre las poblaciones, el otro 54.32 % representa la diversidad genética dentro de las poblaciones. Estos datos indican que los individuos no muestran mucha diferencia entre y dentro de poblaciones, con lo que podemos afirmar que esta especie mantiene homogeneidad en todas las poblaciones aun cuando las localidades muestreadas se encuentran algunas más alejadas de otras.

Por último, el análisis de poblaciones indicó que los individuos pertenecientes a la población de Morelos, presentan mayor variabilidad genética, seguidos por los individuos representantes de Oaxaca, Distrito Federal, Estado de México y por último Querétaro.

5. CONCLUSIONES

Para establecer un protocolo que estandarice las condiciones *in vitro* para el cultivo de *Taxodium mucronatum* Ten., es necesario llevar a cabo más estudios a fin de optimizar factores como tipo y concentración de reguladores de crecimiento y tipos de explantes a utilizar.

Las concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento utilizadas fueron aceptables y resultaron ser mejores las que tenían mayor concentración de estos fitorreguladores. La combinación de dos citocininas y una auxina en la propagación *in vitro* de esta especie forestal resultó favorable y se considera apropiada para trabajos a futuro.

Los explantes que dieron mayores y mejores resultados fueron los ápices, los cuales se consideran los mejores para trabajar en cultivo *in vitro* de ahuehuete. Estos ápices llegaron a producir hasta 4 brotes e incrementar su longitud de 0.5 cm a 3.5 cm con la mayor concentración de reguladores de crecimiento.

En cuanto al medio de cultivo utilizado Murashige y Skoog (1962) podría decirse que fue efectivo; sin embargo, sería aconsejable probar con otro tipo de medios específicos para especies leñosas como el Woody Plant Medium (Lloyd y McCown, 1980).

Con el escalamiento para la producción de ahuehuete *in vitro*, se pueden producir plántulas de 3 a 4 brotes en un lapso de cuatro meses, sin embargo, hay que profundizar en la investigación para formular un medio adecuado para la formación de raíces, ya sea *in vitro* o *ex vitro*.

Mediante la caracterización molecular con RAPD e ISSR se obtuvo la huella genética, la variabilidad y las relaciones genéticas entre cinco poblaciones diferentes de *Taxodium mucronatum* Ten. Se encontró una baja variabilidad entre poblaciones y las más relacionadas fueron las del Estado de México con las del Distrito Federal y las menos relacionadas Morelos con Oaxaca.

6. BIBLIOGRAFÍA

ABDELNOUR, A. y MUÑOZ, A. 2005. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L. f). Kurú: Revista Forestal Costa Rica 2 (5): 1-11.

ABEDINI, W.; BOERI, P.; MARINUCCI, L.; RUSCITTI, M.; SCELZO L. 2000. Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas. Invest. Agr. Sist. Recur. For. 9 (1): 31-43.

AHUJA, M. 1992. Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 536 pp.

AGUILERA R., M. 2001. *Taxodium mucronatum* Ten. Archivo Personal. SIRE-Paquetes Tecnológicos. Consultada en: 2010-4-19. Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/reforestacion/Fichas%20Tecnica s/Taxodium%20mucronatum.pdf>

AIMERS-HALLIDAY, J. 1992. Clonal propagation and genetic testing of Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). Ph.D. dissertation. Texas A&M University, College Station, Texas. 124 pp.

ALARCÓN CRUZ, N. 2009. Caracterización morfológica y molecular de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) del estado de Guerrero, México. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México, México. 112 p.

AMUTHA, S.; MURUGANANTHAM, M. y GANAPATHI, A. 2006. Thidiazuroninduced high-frequency axillary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiata* (L.) wilczek. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 42(1):26-30.

ANÓNIMO. 1999. *T. mucronatum* Tenore. Nota Técnica sobre Manejo de Semillas Forestales- CATIE (Costa Rica). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 185-186.

ANÓNIMO. 2008. *Taxodium mucronatum* Ten 1853. Instituto de Biología. IBUNAM: MEXU: PA100746. UNIBIO: Colecciones Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2010-04-19. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PA100746>

ARNOLD, C.; ROSETTO, M.; MCNALLY, J. y HENRY, R. J. 2002. The applications of ISSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. Am. J. Bot. 89: 22-28.

ASHMORE, S. E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma, Italy. 27-38.

BALLESTER, A. y VIEITEZ, A. M. 2006. Producción Forestal y Biotecnología. Agricultura Revista Agropecuaria, ISSN: 0002-1334. Editorial Agrícola Española 520-522.

BANSAL, Y. K. y CHIBBAR, T. 2000. Micropropagation of *Madhuca latifolia* Macb through nodal culture. Plant Biotechnology 17 (1): 17- 20.

BARBAT, T. 2006. La multiplicación de las plantas. Viveros II Extra. 33-38.

BIROSCIKOVA, M.; SPISAKOVA, K.; LIPTAK, S.; PICHLER, V. y DURKOVIC, J. 2004. Micropropagation of mature Wych elm (*Ulmus glabra* Huds). Plant Cell Reports 22(9):640-644.

BOLÍVAR Z., F. G. 2007. Fundamentos y Casos Exitosos de la Biotecnología Moderna. Segunda Edición. El Colegio Nacional. 718 p.

BORNET, B. y BRANCHARD, M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19:209-215.

BOSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. 1980, Construction of linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Amer. J. Human Genet. 32: 314-331.

BUNN, E.; SENARATNA, T.; SIVASITHAMPARAM, K. y DIXON, K. 2005. *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill, a critically endangered relict from Western Australia. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 41(6):812-815.

CAPMBELL, R. A. y DURZAN, D. J. 1976. Vegetative propagation of *Picea glauca* by tissue culture. Can. J. For. Res., 6:240-243.

CASTILLO, A. 2001. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) Las Brujas, Argentina. Consultada en: 2010-04-19. Disponible en: http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf

CASTRO, D.; DÍAZ, J. y MURILLO, M. 1999. Estrategias de trabajo para la multiplicación clonal *in vitro* de árboles adultos de Teca (*Tectona grandis*), Melina

(*Gmelina arborea*) y Roble (*Tabebuia rosea*). Universidad Católica de Oriente, Rionegro, p16-51.

CASTRO, D.; DÍAZ, G. y LINERO, J. 2002. Propagación clonal *in vitro* de árboles élitos de teca (*Tectona grandis* L.). Revista Colombiana de Biotecnología 4(1):49-53.

CHALUPA V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees Commun. Inst. Forest. Czechosl., 13:7-39.

CHEN, Y.; PAN, S.; ZHANG, J.; ZHU, W.; NIU, H.; QU, Z.; WANG, J.; SHEN, D. y YE, Z. 2002. RAPD Analysis of Genetic Relationships among Natural Populations of Hybrid *Taxodium mucronatum* Tenore. Journal of Fudan University (Natural Science). 41(6):641-645.

CHENG, T. Y. y VOQUI, T. H. 1977. Regeneration of Douglas fir plantlets through tissue culture. Science 198: 306-307.

CLARK, M. S. 1997. Plant Molecular Biology - A laboratory manual; Springer-Verlog Berlin Heidelberg, New York, pp. 305-328.

DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; TRINA, D. y ESCALONA, M. 2001. Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F.). Revista Forestal Centroamericana 35:23-28.

DAQUINTA, M.; RAMOS, L.; CAPOTE, I.; LEZCANO, Y.; RODRÍGUEZ, R.; TRINA, D. y ESCALONA, M. 2002. Morfogénesis *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.). Invest. Agr.: Sist. Recur. For. 11:(1) 137-144.

DAWSON, C. R. y MAGEE, R. J. 1995. Plant tyrosinase (polyphenol oxidase). In: Colowick SP, Kaplan NO (Eds) Methods in Enzymology (Vol 2). Academic Press New York, pp. 817-827.

DE REZENDE, A.; BORTOLOTTI, A. y PASQUAL, M. 2000. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. Ciênc. agrotec., Lavras 24(1) : 9-12.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J. y HICKS, J. B. 1983. A plant mini-preparation: Version II. Plant Mol. Biol. Report, 1: 19-21.

EARLE, C. J. 2009. *Taxodium mucronatum*. The Gymnosperm Database. Consultada en: 2010-04-19. Disponible en: <http://www.conifers.org/cu/tax/mucronatum.html>.

ENRÍQUEZ-PEÑA, E. G. y SUZÁN-AZPIRI, H. 2010. Estructura poblacional de *Taxodium mucronatum* en condiciones contrastantes de perturbación en el estado de Querétaro, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 82: 153-167.

ESTOPÀ, M. 2005. El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. Revista Extra 2005. Consultado en 2010-04-19. Disponible en: http://www.horticom.com/revistasonline/extra05/M_Estopa.pdf.

FAO, 2010. Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2010.

GEORGE, E. D.; HALL, M. A. y DE KLERK G. J. 2008. PLANT Propagation by Tissue Culture. Thir edition. Springer. Dordrecht, The Netherlands. 501 pp.

GILMAN, E. F.; WATSON, D. G. 1994. *Taxodium mucronatum* Montezuma Baldcypress. Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of

Florida. Consultada en: 2010-04-19. Disponible en: <http://hort.ufl.edu/trees/TAXMUCA.pdf>

GRATTAPAGLIA, D. 1994. Genetic mapping of quantitatively inherent economically important traits in *Eucalyptus* Ph.D. Dissertation, North Carolina State University. 289 pp.

HUANG, L.; WANG, Q.; LI, X.; WANG, W.; CHEN, Z. y JIANG, Z. 2000. Studies on the variation of provenances and families in Genus *Taxodium*: variation on shoot cutting rooting ability. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology. 27(1):1-6.

KARAM, L.; DUTRA, J.; DIAS, D. y BENEVENGA, M. 2007. Micropropagação de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha Wendl.*): Efeito da benzilaminopurina na multiplicação. Ciênc. agrotec. Lavras 31(5): 1380-1385.

LANGRIDGE P., y CHALMERS, K. 2004. The Principle: Identification and Application of Molecular Markers. In: LÖRZ, H. y WENZEL, G. (eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 55 Molecular Marker Systems. Berlín, Alemania. Springer. 478 pp.

LARA, A.; VALVERDE, R.; GÓMEZ, L. e HIDALGO A. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psycotria acuminata* L. Agronomía Costarricense 27:7-20.

LEDIG, F. T. 2004. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. *In*: VARGAS H.; BERMEJO V., J. B. y LEDIG, F. T. (eds.). Manejo de Recursos Genéticos Forestales, Segunda Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. 2-18.

LI, H. 2006. Study on genetic analysis on *Taxodium* Rich. using RAPD. MS thesis, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, P.R. China. p. 44.

LIASU O., A.; OBOH, B.; ONIFADE, B.; ADEWALE O., A.; ADEWUMI T., A. y TEMITOPE O., O. 2008. An improved method of extracting genomic DNA from preserved tissues of *Capsicum annuum* for PCR amplification. *EurAsian Journal of BioSciences* 2: 115-119.

LLOYD, G. y MCCOWN, B. 1980. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society, pp. 421-427.

MAGALLANES-CEDEÑO, M. E. 2004. Aplicación de la Tecnología del Cultivo *In Vitro* en la Propagación de Especies Forestales. *In*: VARGAS H.; BERMEJO V., J. B. y LEDIG, F. T. (eds.). Manejo de Recursos Genéticos Forestales, Segunda Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. 200-209.

MARTÍNEZ, L. 2009. Árboles y áreas verdes urbanas de la Ciudad de México y su zona metropolitana. Fundación Xochitla. 1-5.

MARTÍNEZ P., G. y ARENA M., M. 1997. Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. Bosque 18(2): 43-50.

MEDINA L., ROSALINDA; DÁVILA A., P. 1997. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 12. Gymnospermae LINDL. Departamento de Botánica. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México. México, D. F. 29 p.

MENDOZA-HERRERA, A. y SIMPSON, J. 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. XV Aniversario de la Unidad Irapuato. Avances y Perspectivas 16: 53-57.

MOHLER, V. y SCHWARZ, G. 2005. Genotyping Tools in Plant Breeding: From Restriction Fragment Length Polymorphisms to Single Nucleotide Polymorphisms. In: LÖRZ, H. y WENZEL, G. (eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 55 Molecular Marker Systems. Springer. Berlín, Alemania. 478 pp.

MONDRAGÓN C., J. 2003. Molecular characterization using RAPDs of cactus (*Opuntia* spp. *Cactaceae*) collection from Central México as basis for plant breeding. Revista Chapingo Serie Horticultura 9 (1): 97-114.

MURASHIGE T. y SKOOG T. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

NIETO R., J. E.; RAMOS G., L. y MOTTE D., EMMERIK. 2005. Extracción y purificación de ADN de *Tectona grandis* L. para su empleo en la técnica RAPD. *Foresta Veracruzana* 7(002): 1-6.

NUNEZ, H.; CANTLIFFE, D.; KLEE, H.; OCHOA, N.; RAMÍREZ, R. y PÉREZ, E. 2006. Methods in Plant Tissue Culture. *In*: SHETTY, K.; PALIYATH, G.; POMETTO, A. y Levin, R. E. (eds.). Food Biotechnology. Taylor & Francis Group. New York, USA. 650 pp.

OCAMPO, F.; NÚÑEZ, V. M. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(1): 22-27.

OLMOS, S.; LUCIANI, G. y GALDEANO, E. 2010. Parte V, Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. *In*: LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; HOPP, E y MROGINSKI, L. (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Buenos Aires, Argentina. 643 pp.

PARAN I. y MICHELMORE, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85:985–993.

PÉREZ, E. 2009. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 185 p.

PIERIK, R. 1998. In Vitro Culture of Higher Plants: 4th Edition. Springer. Dordrecht, Netherlands. 353 p.

PUCHOOA, D. 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). African Journal of Biotechnology 3 (4):253-255.

REBOLLEDO C., V.; APARICIO R., A.; CRUZ J., H. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. Foresta Veracruzana 8:(002), 27-32.

ROHLF, F. J. 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 2.1). State University of New York. Pp.

ROJAS R., J. 2011. El ahuehute. Tríptico Distribuidora de Semillas Forestales de Árboles y Arbustos.

SAMBROOK, J. y RUSELL, D. W. 2001. Molecular Cloning: A laboratory Manual, Volumen 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Long Island, New York, USA. 2344 pp.

SOLIMAN, M. H.; GAD M., M. A.; HUSSEIN, H. M. y MOHAMED, A.S. 2010. Biochemical and Molecular genetic Evaluation of some conifers genetic resources. Journal of American Science 6(12) 1498-1509.

SUÁREZ, I. E.; JARMA, A. J. y ÁVILA, M. 2006. Desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). Temas Agrarios. 11: (2) 52:62.

SWAMY, S. L.; PURI, S. y KANWAR, K. 2002. Propagation of *Robinia pseudoacacia* Linn. And *Grewia optiva* Drummond from rooted stem cuttings. Agroforestry Systems 55: 231-237.

TANKSLEY, 1983. Molecular markers in plant breeding. Plant Molecular Biology Reporter 1: 3-8.

TÉLLEZ, O. 1989. El ahuehuete. Ciencias Revista de difusión 20.

TIWARI, S.; TIWARI, K. y SIRIL, E. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. Plant Cell, Tissue and organ Culture 71:1-6.

TORIBIO, M. y CELESTINO C. 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Invest. Agr. Sist. Recur. For. 2: 249-260.

TRIGIANO, ROBERT N.; CAETANO.ANOLLES, G.; BRANT J. BASSAM, G. B.; WINDHAM, M. T. 1995. DNA amplification fingerprinting provides evidence that *Discula destructiva*, the cause of dogwood anthracnose in North America, is an introduced pathogen. *Mycología* 87 (4): 490-500.

VALADEZ-MOCTEZUMA, E. y KAHL, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas, teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa. D.F., México. 147 p.

VILLALOBOS A.; THORPE, T. A. y YEUNG, E. C. 1983. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo* 51: 43-59.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. 1989 Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.

WEISING, K.; NYBOM. H.; WOLFF, K. y KAHL G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants, Principles, Methods, and Applications. Segunda Edición, Taylor & Francis Group. Florida, E. U. 470 pp.

WELSH, J. y MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18:7213–7218.

WILLIAMS, J. G.; KUBLIK, K.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, K. J. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.

YEH, C. y YANG, R. 1999. Popgene Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Tim Boyle, Center for International Forestry Research. 29 p.

ZANONI, T. A. 1982. Taxodiaceae. *Flora de Veracruz*. 259 p.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A. y LABUDA, D. 1994. Genoma fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

ZHOU, L. 2007. Salt tolerance, propagation and provenance evaluation of *Taxodium* as a landscape and coastal wetland tree. Tesis de maestría. Universidad Stephen F. Austin. 68 p.