



Universidad Autónoma Chapingo
Departamento de Fitotecnia
Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS
CACTÁCEAS MEXICANAS ENDÉMICAS Y
PROTEGIDAS**

P R E S E N T A

Gustavo Acosta Santoyo

Como requisito parcial para obtener el
grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Chapingo, México. Diciembre, 2013

La presente tesis titulada: **PROPAGACIÓN IN VITRO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS CACTÁCEAS MEXICANAS ENDÉMICAS Y PROTEGIDAS**. Realizada por el **C. GUSTAVO ACOSTA SANTOYO**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

DIRECTOR:

CONSEJO PARTICULAR



Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR:



Dra. Maria del Rosario Garcia Mateos

ASESOR:



Dr. Jaime Sahagun Castellanos

Chapingo, Estado de México, Diciembre de 2013

Dedicatória:

*“É preciso a certeza de que tudo vai mudar;
É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós:
onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.
O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração;
Pois a vida está nos olhos de quem sabe ver...
Se não houve frutos, valeu a beleza das flores.
Se não houve flores, valeu a sombra das folhas.
Se não houve folhas, valeu a intenção da semente”.*

Henfil.

A mis Padres, a mis hermanos, a Rolando, a mis profesores y mis amigos.

Agradecimientos:

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme apoyado y financiado para lograr la consolidación de mis estudios de posgrado.

A mi Madre, por apoyarme y estar conmigo siempre que la necesito. Todas las palabras del mundo no alcanzarían para expresar lo agradecido que me siento por ser hijo de una madre tan maravillosa como tú.

A mi Padre, por cada una de sus enseñanzas. Por ser un gran hombre a quien admiro mucho y me siento agradecido por estar conmigo y darme tu apoyo.

A Rolando. Admiro mucho tu forma de pensar. Gracias sinceramente por estar siempre ahí y preocuparte por mí.

Al Dr. Juan Porfirio Legaria Solano.

A la Dra. María del Rosario García Mateos.

Al Dr. Jaime Sahagún Castellanos.

A mis profesores.

A mis amigos: Arturo Muñoz Pérez y Pedro Humberto Martínez Rojo por compartir muchos momentos, tardes de estudio, de compañerismo, por la convivencia y ayuda.

Al Dr. Óscar García Rubio y al M. en C. Mario Alberto Robledo Mejía por facilitarme el material vegetal utilizado en este estudio.

Datos Biográficos:

Gustavo Acosta Santoyo, nació en la Ciudad de Irapuato, Guanajuato, el 11 de febrero de 1986. Ingresó a la Universidad Autónoma de Querétaro para realizar sus estudios de Licenciatura, esta última en la carrera de Licenciado en Biología, egresando en el año 2007 obteniendo una titulación por la Tesis Individual “Caracterización Subcelular y Funcional de la ATPasa de Ca^{2+} de Retículo Endoplásmico (SERCA) en Células Derivadas de Cáncer Mamario (MCF-7)” en abril de 2009. En enero del año 2012 ingresó a la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS CACTÁCEAS MEXICANAS ENDÉMICAS Y PROTEGIDAS.

Acosta-Santoyo, G.; Legaria-Solano, J. P.

RESUMEN

Mammillaria mathildae y *Echinocactus grusonii* son dos cactáceas microendémicas del Estado de Querétaro que se encuentran amenazadas. En este trabajo se probaron dos tratamientos de escarificación química para estas dos especies: ácido clorhídrico concentrado y agua oxigenada por diferentes tiempos. El mejor tratamiento para *E. grusonii* fue la exposición a agua oxigenada por 3 minutos previos a la siembra de semillas; para *M. mathildae* no se mostró una tendencia de que estos tratamientos mejoraran o perjudicaran el porcentaje o la velocidad de germinación. Se utilizaron algunas de estas plantas generadas *in vitro* para observar su capacidad de aclimatación, y se observó que para ambas especies hubo un 95 % de sobrevivencia en invernadero. Con las plantas obtenidas mediante germinación *in vitro*, se procedió a la formación de callos a partir de segmentos de plantas como explantes, se encontró que para ambas especies los reguladores de crecimiento vegetal Benciladenina (BA), Ácido Naftalenacético (ANA) o el Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) no tuvieron un efecto importante en la formación de callos dado que bajo condiciones control se generaron igualmente callos con el tipo de explante mencionado. A partir de los callos generados en experimentos previos se procedió a la formación de brotes mediante organogénesis indirecta. La formación de brotes para *E. grusonii* fue mejor propiciada en callos provenientes del tratamiento con ANA $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y tratados con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina (ZEA) produciendo en promedio 2.2 brotes por explante. En el caso de *M. mathildae* la mejor combinación resultó ser callos provenientes del tratamiento con $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y tratados con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ZEA, produciendo en promedio 3.4 callos por callo. Para enraizar los brotes generados en ambas especies se llevaron a cabo experimentos utilizando Ácido Indolbutírico (AIB) en concentraciones pequeñas, y los datos arrojaron información acerca de que el mejor tratamiento para brotes de ambas especies resultó ser el de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB, produciendo para *E. grusonii* entre 4 y 5 raíces por brote de entre 2 y 3 cm de largo y para *M. mathildae* entre 5 y 7 raíces por brote de entre 2.5 y 4 cm de largo. También se llevaron a cabo experimentos para inducir

morfogénesis directa a partir de mamilas de ambas especies y en estos experimentos resultaron ser los mejores tratamientos las concentraciones de 1.0 y 2.0 mg·L⁻¹ de AIB para el caso de *E. grusonii* y el de 2.0 mg·L⁻¹ de AIB para *M. mathildae*. Con las mismas plantas generadas *in vitro*, se purificó ADN genómico para llevar a cabo un análisis de poblaciones en *E. grusonii* y *M. mathildae*, con el que se demostró que tanto la población de *E. grusonii* como las tres poblaciones de *M. mathildae* tienen diversidad genética baja, lo que las podría colocar en peligro de extinción.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* PROPAGATION OF TWO ENDEMIC AND ENDANGERED MEXICAN CACTI

Acosta-Santoyo, G; Legaria-Solano, J.P.

ABSTRACT

Echinocactus grusonii and *Mammillaria mathildae* are two microendemic and endangered cacti from the State of Querétaro in Mexico. In this work, we proved two scarification treatments to improve the germination rate and percentage, which included hydrochloric acid (HCl) and hydrogen peroxide (H₂O₂) for different times of exposure prior sowing seeds. For *E. grusonii*, the best treatment was the exposure for 3 minutes on H₂O₂, but for *M. mathildae*, there was no tendency found on these treatments that improved or decreased these values. We used some of the plantlets generated from the *in vitro* culture to observe the acclimatization capacity of our plants, and it was observed that for both species this value was superior to 95% of acclimatization success in greenhouse conditions.

Also, with the *in vitro* generated plants, we induced callogenesis with segments of the plants used as explants, on this set of experiments we demonstrated that there is no tendency that BA, ANA or 2,4-D could affect the formation of calli, due the observation of the formation of this structures on control conditions with this type of explant. Shoot formation for *E. grusonii* was best propitiated on callus from treatment with ANA 0.25 mg·L⁻¹ and treated with 1.0 mg·L⁻¹ ZEA, producing 2.2 shoots in average, for explant. For *M. mathildae*, the best combination of treatments was callus induced with 0.25 mg·L⁻¹ BA and treated with 1.0 mg·L⁻¹ ZEA, generating 3.4 callus for explanting. Root formation for these shoots was conducted with the use of AIB in small concentrations, and the results showed that, the best treatment for both species was 1.0 mg·L⁻¹ AIB producing for *E. grusonii* between 4 and 5 roots per shoot of 2 and 3 cm long and for *M. mathildae* the treatment produced between 5 and 7 roots per shoot of between 2.5 and 4 cm long. We also induced direct morphogenesis from mammillae on both, for these experiments, the best treatment was 1.0 and 2.0 mg·L⁻¹ AIB for *E. grusonii* and 2.0 mg·L⁻¹ AIB for *M. mathildae*. With the *in vitro* generated plants, we extracted genomic DNA to accomplish population and intra population analysis on *E. grusonii* and the three populations of *M. mathildae*, on which we demonstrated that *E. grusonii* has low genetic diversity, and the populations of *M. mathildae* also have low genetic diversity but these

populations are generating different groups of diversification, which can be justified for the isolation of communities due to the growth of the urban area of the city of Santiago de Querétaro.

Índice General

DEDICATORIA:	III
AGRADECIMIENTOS:	IV
DATOS BIOGRÁFICOS:	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
ÍNDICE GENERAL	10
ÍNDICE DE CUADROS	13
ÍNDICE DE FIGURAS	18
ABREVIATURAS USADAS	24
MEDIDAS / DIMENSIONES	24
COMPUESTOS / SUSTANCIAS.....	25
I. INTRODUCCIÓN	26
OBJETIVOS	32
HIPÓTESIS	32
II. REVISIÓN DE LITERATURA	33
2.1. GENERALIDADES DE CACTÁCEAS.....	33
2.2. PROBLEMAS DE CONSERVACIÓN DE CACTÁCEAS MEXICANAS	34
2.3. DESCRIPCIÓN DE <i>MAMILLARIA MATHILDAE</i> KRAEHEB. & KRAINZ, 1973	35
2.4. DESCRIPCIÓN DE <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> , HILDM., 1981	37
2.5. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS VEGETALES.....	40
2.6. FACTORES DE RIESGO DE LA FAMILIA CACTACEAE EN QUERÉTARO	41

2.7. INVESTIGACIONES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN LA FAMILIA CACTACEAE	46
2.8 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	50
2.9. ESTIMADOS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA CON CARACTERES MOLECULARES	53
2.10. MARCADORES GENÉTICOS Y MARCADORES MOLECULARES	55
2.10.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	56
2.10.2. Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSRs)	58
2.11. INVESTIGACIONES PREVIAS EN CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA FAMILIA CACTACEAE.	62
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
3.1. MATERIAL VEGETAL	64
3.2. DESINFESTACIÓN DE SEMILLAS	64
3.3. MEDIOS DE CULTIVO	64
3.4. SIEMBRA DE SEMILLAS.....	65
3.5. GERMINACIÓN DE SEMILLAS	66
3.6. CALLO GÉNESIS	66
3.7. MORFOGÉNESIS INDIRECTA	67
3.8. ENRAIZAMIENTO DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE CALLO (MORFOGÉNESIS INDIRECTA).....	68
3.9. MORFOGÉNESIS DIRECTA.....	68
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE METODOLOGÍA DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	69
3.11. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO.....	69
3.12. CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DE ADN	70
3.13. SELECCIÓN DE INICIADORES	71
3.14. CONDICIONES DE LA PCR	71
3.15. ELABORACIÓN DE GELES.....	72
3.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MARCADORES MOLECULARES	73
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
4.1. GERMINACIÓN.	74

4.1.1. Porcentaje de Germinación de semillas de <i>M. mathildae</i> con varios tratamientos de escarificación química	77
4.1.2. Porcentaje de germinación de semillas de <i>E. grusonii</i> bajo tratamientos de escarificación química	81
4.2. ACLIMATACIÓN.....	85
4.3. CALLOGÉNESIS.....	88
4.4. MORFOGÉNESIS INDIRECTA	94
4.4.1. Morfogénesis indirecta en explantes de <i>Echinocactus grusonii</i>	94
4.4.2. Morfogénesis indirecta en explantes de <i>Mammillaria mathildae</i>	102
4.5. ENRAIZAMIENTO DE LOS BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE CALLO (MORFOGÉNESIS INDIRECTA)	109
4.6. MORFOGÉNESIS DIRECTA.	117
4.7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	123
4.7.1. Análisis de especies y sus poblaciones	125
4.7.2. Análisis de Poblaciones y sus individuos	127
4.7.2.1. Escalado Multidimensional No-Métrico (MD Scale).....	136
4.7.2.2. Análisis de Componentes Principales.....	137
V. CONCLUSIONES	140
VI. LITERATURA CITADA	143

Índice de Cuadros

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i>	37
CUADRO 2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i>	39
CUADRO 3. ESPECIES DE LA FAMILIA CACTACEAE QUE SE HAN PROPAGADO POR MEDIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (TOMADO DE FAY <i>ET AL.</i> , 1995).	49
CUADRO 4. DIVERSIDAD GENÉTICA EN PLANTAS DE LAS ZONAS ÁRIDAS DE MÉXICO.	52
CUADRO 5. COMPONENTES Y VOLÚMENES UTILIZADOS EN LAS REACCIONES DE PCR.	72
CUADRO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>M. MATHILDAE</i> EN LA TERCERA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA EN DIFERENTES TRATAMIENTOS.	78
CUADRO 7. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>M. MATHILDAE</i> A LA TERCERA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA ENTRE DIFERENTES TRATAMIENTOS.	79
CUADRO 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>M. MATHILDAE</i> A LA SEXTA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA EN DIFERENTES TRATAMIENTOS.	80
CUADRO 9. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>M. MATHILDAE</i> A LA SEXTA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA ENTRE DIFERENTES TRATAMIENTOS.	80
CUADRO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>E. GRUSONII</i> A LA TERCERA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DIFERENTES TRATAMIENTOS.	82
CUADRO 11. COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>E. GRUSONII</i> A LA TERCERA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA.	83
CUADRO 12. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>E. GRUSONII</i> A LA TERCERA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DIFERENTES TRATAMIENTOS.	84
CUADRO 13. COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>E. GRUSONII</i> A LA SEXTA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA.	85
CUADRO 14. PROMEDIO GENERAL EN PORCIENTO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LAS PLANTAS DE <i>E.</i> <i>GRUSONII</i> Y <i>M. MATHILDAE</i> . EL PROMEDIO GENERAL CORRESPONDE A TRES REPETICIONES DE AL MENOS 30 INDIVIDUOS CADA UNA.	88
CUADRO 15. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA NÚMERO DE CALLOS POR EXPLANTE DE <i>E. GRUSONII</i>	90

CUADRO 16. COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE CONTROL CONTRA LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA INDUCIR CALLO GÉNESIS EN <i>E. GRUSONII</i>	91
CUADRO 17. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES DE <i>M. MATHILDAE</i> CON VARIOS TRATAMIENTOS.	93
CUADRO 18. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA FORMACIÓN DE CALLOS EN <i>M. MATHILDAE</i> DE LOS TRATAMIENTOS CONTRA EL CONTROL.....	93
CUADRO 19. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA FORMACIÓN DE BROTES CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ZEATINA A PARTIR DE CALLOS GENERADOS CON BA DE <i>E. GRUSONII</i>	95
CUADRO 20. COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE EL CONTROL Y LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i> PROVENIENTES DE BA Y TRATADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	96
CUADRO 21. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA FORMACIÓN DE BROTES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA A PARTIR DE CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i> PROVENIENTES DE TRATAMIENTOS CON ANA.	97
CUADRO 22. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA FORMACIÓN DE BROTES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA A PARTIR DE CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i> PROVENIENTES DE TRATAMIENTO CON ANA.	98
CUADRO 23. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA BROTES OBTENIDOS DE CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i> OBTENIDOS A PARTIR DE TRATAMIENTOS CON 2,4-D Y TRATADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	99
CUADRO 24. COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE EL CONTROL Y LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i> PROVENIENTES DE 2,4-D Y TRATADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	100
CUADRO 25. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LOS MEJORES TRATAMIENTOS PARA FORMACIÓN DE BROTES A PARTIR DE CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i>	101
CUADRO 26. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA NÚMERO DE BROTES EN LOS TRES MEJORES TRATAMIENTOS PARA <i>E. GRUSONII</i>	102

CUADRO 27. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i> PROVENIENTES DE TRATAMIENTOS CON BA Y TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.....	103
CUADRO 28. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA PARA NÚMERO DE BROTES EN <i>M. MATHILDAE</i> CON CALLOS OBTENIDOS CON TRATAMIENTO DE BA Y TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	104
CUADRO 29. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i> PROVENIENTES DE TRATAMIENTOS CON ANA Y TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.....	105
CUADRO 30. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA NÚMERO DE BROTES EN <i>M. MATHILDAE</i> CON CALLOS OBTENIDOS CON TRATAMIENTO DE ANA Y TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	105
CUADRO 31. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i> PROVENIENTES DE TRATAMIENTOS CON 2,4-D Y TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.....	106
CUADRO 32. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA NÚMERO DE BROTES EN <i>M. MATHILDAE</i> CON CALLOS OBTENIDOS CON TRATAMIENTO DE 2,4-D Y TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	107
CUADRO 33. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LOS MEJORES TRATAMIENTOS PARA FORMACIÓN DE BROTES A PARTIR DE CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i>	108
CUADRO 34. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA LOS MEJORES TRATAMIENTOS PARA FORMACIÓN DE BROTES A PARTIR DE CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i>	108
CUADRO 35. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA NÚMERO DE RAÍCES EN BROTES DE <i>E. GRUSONII</i> EN DIFERENTES TRATAMIENTOS.	111
CUADRO 36. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA EL NÚMERO DE RAÍCES POR TRATAMIENTO EN <i>E. GRUSONII</i>	112
CUADRO 37. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LONGITUD DE RAÍZ EN BROTES DE <i>E. GRUSONII</i> CON DIFERENTES TRATAMIENTOS.	113

CUADRO 38. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA LONGITUD DE RAÍZ MÁS LARGA (EN CM) PARA <i>E. GRUSONII</i>	113
CUADRO 39. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA NÚMERO DE RAÍCES EN BROTES DE <i>M. MATHILDAE</i> CON DIFERENTES TRATAMIENTOS.	115
CUADRO 40. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA NÚMERO DE RAÍCES DE <i>M. MATHILDAE</i>	115
CUADRO 41. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LARGO DE RAÍZ EN BROTES DE <i>M. MATHILDAE</i> CON DIFERENTES TRATAMIENTOS.	116
CUADRO 42. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA LONGITUD DE RAÍZ MÁS LARGA EN <i>M. MATHILDAE</i>	117
CUADRO 43. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA NÚMERO DE RAÍCES EN DIFERENTES TRATAMIENTOS DE EXPLANTES DE <i>E. GRUSONII</i>	118
CUADRO 44. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA NÚMERO DE RAÍCES EN EXPLANTES DIRECTOS DE <i>E.</i> <i>GRUSONII</i>	119
CUADRO 45. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA MORFOGÉNESIS DIRECTA EN EXPLANTES DE <i>E. GRUSONII</i> PARA LONGITUD DE RAÍZ.	120
CUADRO 46. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA LONGITUD DE RAÍZ EN EXPLANTES DE <i>E. GRUSONII</i> EN DIFERENTES TRATAMIENTOS PARA INDUCIR MORFOGÉNESIS DIRECTA A PARTIR DE CULTIVO DE MAMILAS.	120
CUADRO 47. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EXPLANTES DE <i>M. MATHILDAE</i> EN NÚMERO DE RAÍCES POR EXPLANTE EN DIFERENTES TRATAMIENTOS.	121
CUADRO 48. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA LAS MEDIAS DE NÚMERO DE RAÍCES POR EXPLANTES DE <i>M.</i> <i>MATHILDAE</i>	122
CUADRO 49. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LONGITUD DE RAÍZ EN EXPLANTES DE <i>M. MATHILDAE</i> INDUCIDOS CON VARIOS TRATAMIENTOS.	123
CUADRO 50. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA LONGITUD DE RAÍCES EN EXPLANTES DE <i>M. MATHILDAE</i> CON DIFERENTES TRATAMIENTOS PARA INDUCIR MORFOGÉNESIS DIRECTA.	123
CUADRO 51. INICIADORES SELECCIONADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE <i>ECHINOACTUS GRUSONII</i> Y LAS TRES POBLACIONES DE <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i>	125

CUADRO 52. MARCADORES UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE POBLACIONES DE <i>E. GRUSONII</i> Y <i>M. MATHILDAE</i> . SE MUESTRA TAMBIÉN EN EL CUADRO EL NÚMERO DE BANDAS AMPLIFICADAS POR CADA UNO DE LOS INICIADORES UTILIZADOS.	129
CUADRO 53. RESUMEN DE ESTADÍSTICOS DE VARIACIÓN GENÉTICA PARA TODOS LOS <i>LOCI</i> DENTRO DE LAS POBLACIONES.	133
CUADRO 54. RESUMEN DE ESTADÍSTICOS DE VARIACIÓN GENÉTICA PARA TODOS LOS <i>LOCI</i> ENTRE LAS POBLACIONES.	134
CUADRO 55. MEDIDAS DE IDENTIDAD GENÉTICA Y DISTANCIA GENÉTICA DE <i>NEI</i>	135

Índice de Figuras

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> EN LAS CERCANÍAS DE LA CIUDAD DE SANTIAGO DE QUERÉTARO. EN LA FIGURA SE MUESTRA LA UBICACIÓN DE LAS TRES POBLACIONES QUE FUERON ANALIZADAS EN ESTE ESTUDIO. IMAGEN OBTENIDA DEL JARDÍN BOTÁNICO REGIONAL DE CADEREYTA DE MONTES.....	36
FIGURA 2. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA REGISTRADA DE <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> . EN LA FIGURA SE RESALTA LA LOCALIDAD DE EL INFIERNILLO, QUE COLINDA CON EL ESTADO DE HIDALGO, DONDE SE REPORTAN ALGUNOS EJEMPLARES ESPORÁDICOS EN EL MUNICIPIO DE ZIMAPÁN. IMAGEN OBTENIDA DEL JARDÍN BOTÁNICO REGIONAL DE CADEREYTA DE MONTES.....	38
FIGURA 3. MAPA DEL DESIERTO CHIHUAHUENSE, RESALTANDO LA ZONA ÁRIDA QUERETANO-HIDALGUENSE. TOMADO DE HERNÁNDEZ <i>ET AL.</i> , (2007).....	42
FIGURA 4. EL “CUADRANTE TOLIMÁN” EN LA REGIÓN DEL SEMIDESIERTO QUERETANO Y SITIOS DE PRIORIDAD PARA LA CONSERVACIÓN, CON LOS SUBCUADRANTES IMPORTANTES RESALTADOS EN NARANJA, SE MUESTRAN TAMBIÉN LOS VALORES DE VALOR ABSOLUTO DE COMPLEMENTARIEDAD (TOMADO DE HERNÁNDEZ <i>ET AL.</i> , 2007).....	44
FIGURA 5. <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> EN SU HÁBITAT (FOTO TOMADA DE JIMÉNEZ-SIERRA, 2011).....	45
FIGURA 6. <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> EN SU HÁBITAT. FOTO DE ARACELI GUTIÉRREZ DE LA ROSA (TOMADA DE HERNÁNDEZ-ORIA <i>ET AL.</i> , 2007).....	46
FIGURA 7. ESQUEMA MOSTRANDO LOS DIFERENTES PASOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): A) PASO DE DESNATURALIZACIÓN A 92-95 ° C, B) ALINEACIÓN DE INICIADOR (37-38 ° C DEPENDIENDO DE LA TÉCNICA), C) PASO DE EXTENSIÓN A 72 ° C (P= TAQ-ADN POLIMERASA) Y D) FINAL DEL FRAGMENTO DE ADN. LOS DOS FRAGMENTOS RESULTANTES PROPORCIONAN EL MOLDE DE ADN PARA EL SIGUIENTE CICLO, DOBLANDO LA CANTIDAD DE ADN DUPLICADA EN CADA CICLO (SEMAGN <i>ET AL.</i> , 1997).....	57
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN SOLO INICIADOR (AG ₈), NO ANCLADO (A=, ANCLADO AL EXTREMO 3' (B), ANCLADO AL EXTREMO 5' (C). EL INICIADOR NO ANCLADO PUEDE ALINEARSE EN CUALQUIER PARTE DEL ADN TEMPLADO (MOLDE), LOS INICIADORES ANCLADOS A UNO U OTRO	

EXTREMO DEL ADN (B, C) SOLO SE UNIRÁN EN REGIONES ESPECÍFICAS DE LA CADENA PRODUCIENDO BANDEOS DIFERENTES. (TOMADO DE PRADEEP <i>ET AL.</i> , 2002).	59
FIGURA 9. SEGMENTOS LONGITUDINALES DE CACTÁCEAS UTILIZADOS PARA INDUCIR CALLOGÉNESIS EN PLANTAS PROVENIENTES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>M. MATHILDAE</i> Y <i>E. GRUSONII</i>	67
FIGURA 10. PROCESO DE SIEMBRA DE SEMILLAS <i>IN VITRO</i> DE <i>E. GRUSONII</i> Y <i>M. MATHILDAE</i> . (A) LAS SEMILLAS SE SEMBRARON EN FRASCOS “GERBER” ESTÉRILES BAJO CONDICIONES ASÉPTICAS. (B) INICIO DE LA GERMINACIÓN; (C) SEMILLAS TOTALMENTE GERMINADAS Y COMENZANDO A DESARROLLARSE; (D) PLANTAS DE 6 MESES DE EDAD DE <i>E. GRUSONII</i> ; (E) PLANTAS DE 6 MESES DE EDAD DE <i>M. MATHILDAE</i>	74
FIGURA 11. PRUEBAS DE GERMINACIÓN EN MEDIO BASAL (MS COMPLEMENTADO CON CARBÓN ACTIVADO AL 8 %) DE SEMILLAS DE <i>E. GRUSONII</i> Y DE TRES POBLACIONES DE <i>M. MATHILDAE</i> (J= CAÑADA DE JURIUQUILLA, C= LOS CAJONES Y H= CAÑADA DE HÉRCULES), LOS DATOS SE MUESTRAN EN SEMANAS TRANSCURRIDAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA DE SEMILLAS.....	76
FIGURA 12. NÚMERO DE SEMILLAS GERMINADAS DE <i>M. MATHILDAE</i> CUANTIFICADAS A LA TERCERA SEMANA DESPUÉS DE LA SIEMBRA CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ESCARIFICACIÓN QUÍMICA CON ÁCIDO CLORHÍDRICO CONCENTRADO Y AGUA OXIGENADA AL 9% A DIFERENTES TIEMPOS.	78
FIGURA 13. NÚMERO DE SEMILLAS GERMINADAS PARA LA SEXTA SEMANA DE CULTIVO CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ESCARIFICACIÓN PARA <i>M. MATHILDAE</i>	79
FIGURA 14. NÚMERO DE SEMILLAS GERMINADAS PARA LA TERCERA SEMANA DE CULTIVO CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ESCARIFICACIÓN PARA <i>E. GRUSONII</i>	82
FIGURA 15. NÚMERO DE SEMILLAS GERMINADAS PARA LA SEXTA SEMANA DE CULTIVO CON DIFERENTES TRATAMIENTOS DE ESCARIFICACIÓN PARA <i>E. GRUSONII</i>	84
FIGURA 16. PLANTAS PROVENIENTES DE MICROPROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> TRANSFERIDAS A SUSTRATO “PEAT MOSS” PARA ACLIMATACIÓN. (A) <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> ; (B) <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> (LOS CAJONES); (C) <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> (CAÑADA DE JURIUQUILLA) Y (D) <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> (CAÑADA DE HÉRCULES).....	87

FIGURA 17. FORMACIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES PROVENIENTES DE PLANTAS SEMBRADAS <i>IN VITRO</i> DE (A) <i>E. GRUSONII</i> Y (B) <i>M. MATHILDAE</i> DESPUÉS DE CUATRO Y DOCE SEMANAS POSTERIOR AL CULTIVO.	89
FIGURA 18. NÚMERO DE CALLOS POR TRATAMIENTO PARA FORMACIÓN DE CALLOS <i>EN E. GRUSONII</i>	90
FIGURA 19. NÚMERO DE CALLOS POR TRATAMIENTO PARA FORMACIÓN DE CALLOS <i>EN M. MATHILDAE</i>	92
FIGURA 20. NÚMERO DE BROTES OBTENIDOS CON CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i> PROVENIENTES DE LOS TRATAMIENTOS CON BA Y POSTERIORMENTE TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON ZEATINA.	95
FIGURA 21. NÚMERO DE BROTES OBTENIDOS CON CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i> PROVENIENTES DE TRATAMIENTO CON ANA, Y TRANSFERIDOS A MEDIO MS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	97
FIGURA 22. NÚMERO DE BROTES OBTENIDOS CON CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i> PROVENIENTES DE TRATAMIENTO CON 2,4-D Y TRANSFERIDOS A MEDIO MS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	99
FIGURA 23. MEJORES TRATAMIENTOS PARA FORMAR BROTES A PARTIR DE CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i>	101
FIGURA 24. NÚMERO DE BROTES OBTENIDOS CON CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i> PROVENIENTES DE LOS TRATAMIENTOS CON BA Y POSTERIORMENTE TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	103
FIGURA 25. NÚMERO DE BROTES OBTENIDOS CON CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i> PROVENIENTES DE LOS TRATAMIENTOS CON ANA Y POSTERIORMENTE TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	104
FIGURA 26. NÚMERO DE BROTES OBTENIDOS CON CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i> PROVENIENTES DE LOS TRATAMIENTOS CON 2,4-D Y POSTERIORMENTE TRANSFERIDOS A MEDIO MS SUPLEMENTADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ZEATINA.	106
FIGURA 27. MEJORES TRATAMIENTOS PARA INDUCIR BROTES EN CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i>	107
FIGURA 28. TÉCNICA UTILIZADA PARA INDUCIR ENRAIZAMIENTO EN BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS TRATADOS CON ZEATINA (0.3, 0.7 Y 1.0 MG·L ⁻¹). EN LA FIGURA SE MUESTRAN BROTES DE <i>M.</i>	

<i>MATHILDAE</i> (A), LOS CUALES FUERON TRANSFERIDOS A MEDIO MS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS (B).....	109
FIGURA 29. INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE RAÍCES EN BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE CALLO EN PLANTAS DE <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> EN DISTINTOS TRATAMIENTOS: A) CONTROL; B) =.5 MG·L ⁻¹ DE AIB; C) 1.0 MG·L ⁻¹ DE AIB Y D) CARBÓN ACTIVADO AL 8 %	110
FIGURA 30. NÚMERO DE RAÍCES EN DISTINTOS TRATAMIENTOS DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS DE <i>E. GRUSONII</i>	111
FIGURA 31. LONGITUD DE LA RAÍZ MÁS LARGA (EN CM) DE BROTES DE <i>E. GRUSONII</i> OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS BAJO DISTINTOS TRATAMIENTOS.	112
FIGURA 32. RESULTADOS DE LA INDUCCIÓN DE RAÍCES EN BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE CALLO EN <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> , EN LOS QUE SE MUESTRA A) CONTROL; B) 0.5 MG·L ⁻¹ AIB; C) 1.0 MG·L ⁻¹ AIB Y D) CARBÓN ACTIVADO AL 8 %	114
FIGURA 33. NÚMERO DE RAÍCES EN DISTINTOS TRATAMIENTOS DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i>	114
FIGURA 34. NÚMERO DE RAÍCES EN DISTINTOS TRATAMIENTOS DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE CALLOS DE <i>M. MATHILDAE</i> . EN LA FIGURA SE MUESTRAN LOS TRATAMIENTOS CON CONCENTRACIONES DE 0.5 Y 1.0 G·L ⁻¹ DE AIB Y CARBÓN ACTIVADO (CA).	116
FIGURA 35. TÉCNICA UTILIZADA PARA INDUCIR MORFOGÉNESIS DIRECTA. SE DISECTARON MAMILAS DE PLANTAS PROVENIENTES DE CULTIVO IN VITRO DE <i>E. GRUSONII</i> Y <i>M. MATHILDAE</i> (A) PARA POSTERIORMENTE TRANSFERIRSE A MEDIO MS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS (B).	117
FIGURA 36. NÚMERO DE RAÍCES FORMADAS POR CULTIVO DE AREOLAS EN DIFERENTES TRATAMIENTOS DE AIB Y CARBÓN ACTIVADO (CA) EN <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i>	118
FIGURA 37. LONGITUD DE LA RAÍZ MÁS LARGA DE MAMILAS DE <i>E. GRUSONII</i> SEMBRADAS PARA INDUCIR MORFOGÉNESIS DIRECTA.	119
FIGURA 38. NÚMERO DE RAÍCES POR EXPLANTE DE <i>M. MATHILDAE</i> EN EXPLANTES DE MAMILAS PARA INDUCIR MORFOGÉNESIS DIRECTA.	121
FIGURA 39. LONGITUD DE LA RAÍZ MÁS LARGA PARA EXPLANTES DE <i>M. MATHILDAE</i>	122

FIGURA 40. ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA PARA TRES MUESTRAS DE <i>E. GRUSONII</i> Y DOS MUESTRAS DE CADA UNA DE LAS POBLACIONES DE <i>M. MATHILDAE</i> . BP= PARES DE BASES; M= MARCADOR DE PESO MOLECULAR.	124
FIGURA 41. PATRONES DE BANDEO PARA <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> (EG) Y <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> (MM) PARA LOS INICIADORES ISSR IAH02, IAH03, A3, A4 Y A5 UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIES Y EL ANÁLISIS DE POBLACIONES Y EL ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL (M=MARCADOR MOLECULAR; BP= PARES DE BASES).	124
FIGURA 42. PATRONES DE BANDEO PARA ISSR DE LAS POBLACIONES EVALUADAS, SE UTILIZÓ LOS INICIADORES IAH03, A3, P1 Y A4. (M= MARCADOR; BP=PARES DE BASES; G= <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> ; H= <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> , POBLACIÓN CAÑADA DE HÉRCULES; J= <i>M. MATHILDAE</i> , POBLACIÓN CAÑADA DE JURQUILLA; C= <i>M. MATHILDAE</i> , POBLACIÓN LOS CAJONES).....	126
FIGURA 43. DENDROGRAMA MOLECULAR OBTENIDO A PARTIR DE 16 INICIADORES ISSR DE LAS SERIES IAH, A Y P, UTILIZANDO EL COEFICIENTE DE JACCARD.....	127
FIGURA 44. PATRONES DE BANDEO DE ISSR DE INDIVIDUOS DENTRO DE LAS ESPECIES, LOS PATRONES SE OBTUVIERON CON LOS INICIADORES A5, A9, P2 Y P3. (M= MARCADOR; BP=PARES DE BASES).....	128
FIGURA 45. DENDROGRAMA DE INDIVIDUOS DE POBLACIONES DE <i>E. GRUSONII</i> Y <i>M. MATHILDAE</i> UTILIZANDO EL COEFICIENTE DE JACCARD Y ANALIZANDO LOS DATOS MEDIANTE UPGMA. E= <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> , H= <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> , POBLACIÓN DE CAÑADA DE HÉRCULES, J= <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> , POBLACIÓN DE CAÑADA DE JURQUILLA Y C= <i>MAMMILLARIA MATHILDAE</i> , POBLACIÓN DE LOS CAJONES.	130
FIGURA 46. DENDROGRAMA DE POBLACIONES BASADO EN LA DISTANCIA GENÉTICA DE NEI UTILIZANDO EL MÉTODO UPGMA.....	136
FIGURA 47. ESCALADO MULTIDIMENSIONAL NO MÉTRICO EN: A) DOS DIMENSIONES Y B) TRES DIMENSIONES, EN LAS QUE SE MUESTRA EL AGRUPAMIENTO DE LOS INDIVIDUOS ANALIZADOS EN ESTE ESTUDIO. H= <i>M. MATHILDAE</i> , POBLACIÓN CAÑADA DE HÉRCULES; C= <i>M. MATHILDAE</i> , POBLACIÓN LOS CAJONES; J= <i>M. MATHILDAE</i> , POBLACIÓN CAÑADA DE JURQUILLA Y E= <i>ECHINOCACTUS GRUSONII</i> .	137
FIGURA 48. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PARA LOS INDIVIDUOS DE LAS 4 POBLACIONES ESTUDIADAS, EN ESTA FIGURA SE MUESTRA LA DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS EN TRES GRUPOS,	

UNO COMPRENDIENDO LAS POBLACIONES DE *M. MATHILDAE* DE LA CAÑADA DE JURQUILLA Y LOS
CAJONES, OTRO CONTENIENDO SOLAMENTE A LA POBLACIÓN DE *M. MATHILDAE* DE CAÑADA DE
HÉRCULES Y UN ÚLTIMO GRUPO CONTENIENDO LOS INDIVIDUOS DE *E. GRUSONII* (E= *ECHINOCACTUS*
GRUSONII; *MAMMILLARIA MATHILDAE* H= HÉRCULES; J= JURQUILLA, C=CAJONES). 138

ABREVIATURAS USADAS

Medidas / Dimensiones

°C: Grados centígrados

ha: Hectárea

h: Hora

Kg: Kilogramo

mg: Miligramos

kb: Kilobase

pb: Pares de bases

L: Litro

M: Molar

min: Minutos

seg: Segundos

mM: Milimolar

μM: Micromolar

pM: Picomolar

μL: Microlitro

rpm: Revoluciones por Minuto

AM: Micorriza arbuscular.

AMF: Micorriza fúngica arbuscular.

Compuestos / Sustancias

MS: Medio de cultivo formulado con sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962).

Agua oxigenada (H₂O₂) al 9 %

Ácido clorhídrico concentrado.

BA: Benciladenina o 6- Bencilaminopurina

2,4-D: Ácido 2,4 diclorofenoxiacético

ANA: α -Ácido Naftalenacético

AIB: Ácido Indolbutírico

ZEA: Zeatina

CA: Carbón Activado

I. INTRODUCCIÓN

La propagación vegetal en invernaderos, ya sea sexual o asexual, es de gran importancia para establecer estrategias de conservación en especies en peligro de extinción o amenazadas. Las cactáceas pueden reproducirse de manera tradicional por semillas, por propagación vegetativa, por esqueje y por injerto, sin embargo, estos métodos son poco exitosos cuando la germinación y el índice de crecimiento son bajos. Una alternativa potencial para el cultivo de cactáceas es la tecnología de cultivo *in vitro*, la cual puede ser de gran valor en la preservación y utilización de especies de cactáceas en vías de exterminio, ya que por estos medios es posible obtener cientos o miles de plantas al año (Johnson y Emino, 1979; Smith, 1991).

El término cultivo *in vitro* es muy genérico, que se refiere más bien a una metodología que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico como químico en el que se sitúa la semilla o el explante. Esta técnica tiene algunos inconvenientes ya que es muy complejo reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el biotipo de la planta en condiciones naturales (Montoya, 1991).

El uso de semillas para la germinación *in vitro* es uno de los componentes más importantes para la conservación y propagación de material vegetal, ya que permite mantener la variabilidad genética de las poblaciones naturales y no solamente clones, como en el cultivo de tejidos (Flores-Escobar *et al.*, 2011).

La familia Cactaceae, originaria del continente americano, agrupa a cerca de 2000 especies, las cuales han logrado adaptarse a los climas desérticos.

Bauxbaum (1958) fue el primero en describir el grupo como una “unidad filogenética uniforme” en la cual incluyó todos los cactus columnares pequeños a globosos que tenían flores sin espinas nativos de Norteamérica. Hasta el momento se reconocen 33 géneros por la CITES lista de Cactaceae (Hunt, 1999), aunque al menos otros 34 géneros han sido descritos. Hunt (1999) acepta la existencia de 314 especies (más 224 especies provisionalmente aceptadas), mientras que Anderson (2001) reconoce 26 géneros y 384 especies. El rango geográfico de distribución se extiende desde el oeste de Canadá (*Escobaria vivipara* (Nuttall) Bauxbaum) hasta Colombia, Venezuela y el Caribe (*Mammillaria colombiana* Salm-Dyck y *M. mammillaris* (L.) Karsten).

México es el país con mayor riqueza de estas plantas, con 913 taxones, de los cuales el 80 por ciento son endémicos del país. Las zonas desérticas y semidesérticas representadas por los desiertos de Sonora y Chihuahua, las selvas bajas caducifolias y la zona de depresión del Balsas contienen gran diversidad de cactáceas. En el centro de México destacan el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la Barranca de Metztitlán (Jiménez-Sierra, 2011). Esta familia presenta un alto endemismo en México. Los géneros *Coryphanta* y *Mammillaria* se encuentran entre los cuatro géneros con mayor riqueza de especies para el país. *Mammillaria* contiene 182 especies de las cuales 171 son endémicas (Coombes *et al.*, 2003).

Los métodos de propagación convencionales son ineficientes en la multiplicación de cactáceas debido a que son especies de lento crecimiento y producen escasos brotes (Quiala *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006; Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011). Un problema frecuente que se ha reportado en la producción asexual es la segregación y el largo estado juvenil, por lo que

Hudstenberg *et al.* (1992) propusieron la propagación clonal mediante la regeneración de plantas por medio de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para satisfacer la demanda de plantas, tomando como principio la totipotencialidad y plasticidad de las células vegetales, manteniéndose bajo condiciones físicas y químicas controladas para dar origen a nuevas plantas en menos tiempo (García-Rubio y Malda-Barrera, 2009; Quiala *et al.*, 2009).

La urbanización se ha convertido en la mayor fuerza de cambio en el uso de suelo en el mundo (Kalnay y Cai, 2003; Behnke, 2008). Querétaro es hoy por día una de las ciudades con mayor crecimiento en México, con una tasa de crecimiento anual de 12.5 % (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008). La población humana creció de 816,481 en el 2000 a 1,058,210 en el 2009, por lo que el uso de suelo se ha modificado drásticamente en la última década y un gran número de áreas naturales y tierra de cultivo han sido convertidos en ambientes urbanos, por lo que se ha removido casi un tercio de la selva tropical caducifolia (PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ, 2008) y esto ha ocasionado que el hábitat natural de *M. mathildae* se haya reducido y fragmentado, por lo que se requieren acciones inmediatas para conservar esta especie (García-Rubio y Malda-Barrera, 2010b).

Para sustentar estos datos, M. Hernández-Martínez y E. Sánchez (2002), publicaron una evaluación del estado de este taxón en la revista "Cactáceas y Suculentas Mexicanas", el resultado arrojó un valor de 13 puntos, indicativo de la situación de riesgo de la especie que la ubica en la categoría P (en peligro de extinción), como se mencionó anteriormente. A pesar de que la especie figura en los listados nacionales de riesgo desde 1994. Su situación en el campo no ha mejorado y las poblaciones actualmente registradas peligran seriamente.

Adicionalmente, los autores comentan que, efectivamente, los factores de riesgo como la deforestación y la fragmentación del hábitat por el avance de la mancha urbana de la ciudad de Querétaro, las empresas mineras que extraen materiales para la construcción de la misma ciudad, los tiraderos de basura clandestinos, los efluvios contaminantes de las áreas habitacionales son causas que inciden negativamente en el desarrollo y estructura de las poblaciones de esta especie (Hernández-Martínez y Sánchez, 2002).

En los últimos años, se publicó un trabajo de García-Rubio *et al.* (2010) en donde se predicen y confirman distribuciones de *M. mathildae* utilizando predicción de nichos y análisis espacial con los que se determinaron nuevas poblaciones dentro del Municipio de Querétaro. García-Rubio y Malda-Barrera también publicaron otros trabajos exhaustivos, el primero de ellos se refiere a la descripción de cambios fenológicos de *M. mathildae* asociados a cambio climático en bosque tropical caducifolio (2010a), uno más concerniente a una estrategia de micropropagación y reintroducción de la especie a su hábitat natural (2010b), un artículo más referente a una técnica para inducir la floración con inóculos de AM en cultivo aeropónico y finalmente utilizando este método un trabajo más sobre la reintroducción en campo inoculados con AMF nativo en el mismo año (2010c; 2010d).

Las diferencias que distinguen una planta de otra se encuentran codificadas dentro de su material genético que constituye el genoma de la planta, aunque ya se han secuenciado genomas completos de algunas plantas como *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome initiative, 2000) y del arroz (The Rice Genome Mapping Project, 2005) para ayudar a identificar genes localizados en un

cromosoma en particular, se utilizan actualmente métodos alternativos para la mayoría de las plantas conocidos como marcadores genéticos, que pueden ser definidos como una porción específica del ADN con una posición conocida dentro del genoma y que se usan para identificar un individuo o una célula que lo porta (Semagn *et al.*, 2006).

Dentro de la familia Cactaceae, se han llevado a cabo trabajos de sistemática molecular, como el de Butterworth y colaboradores (2002) quienes aplicaron análisis de parsimonia en secuencias *rp116* de plástidos de 62 miembros de la tribu obteniendo relaciones marcadas entre géneros de Cactaceae, en los cuales se incluyen *Mammillaria* y *Ferocactus*. En el año 2011 se publicó el trabajo de Hernández-Hernández y colaboradores, quienes realizaron análisis filogenéticos usando métodos de parsimonia y similitud, con una matriz concatenada de 6148 pares de bases con marcadores tanto de plastidios como nucleares (*trnK/matK*, *matK*, *trnL-trnF*, *rpl16* y *ppc*) que incluyeron 224 especies lo que representó el 85 % de los géneros de la familia, mostrando que las familias se separan en dos clados: Cactae (que incluye a las formas globosas y de barril norteamericanas) y el núcleo Cactoideae, que incluye a la diversidad más grande que se distribuye en todo el continente americano, este estudio representa el marco de referencia más completo disponible para entender las relaciones evolutivas de la familia Cactaceae. El uso de marcadores moleculares ha sido escaso para estas dos especies, en el año 2008, Hardesty y colaboradores realizaron la caracterización con microsatélites de *E. grusonii* en la que se aislaron secuencias de una biblioteca no enriquecida y se encontraron 57 secuencias en un arreglo de

microsatélite, de las cuales 12 fueron polimórficas y se analizaron 30 individuos de una sola población silvestre.

Objetivos

- Evaluar la velocidad de germinación de semillas de *E. grusonii* y *M. mathildae*.
- Generar una estrategia de cultivo *in vitro* que acelere la velocidad de germinación y aumente el porcentaje total de semillas germinadas de ambas especies.
- Inducir la propagación *in vitro* de *M. mathildae* y *E. grusonii* a partir de la brotación directa de explantes provenientes de cultivo *in vitro* de semillas utilizando diferentes tratamientos.
- Inducir organogénesis indirecta a partir de callogénesis y organogénesis directa a partir de siembra de mamilas en las dos especies estudiadas.
- Evaluar la variabilidad genética presente en tres poblaciones de *M. mathildae* (Juriquilla, La Cañada de Juriquilla y La Cañada de Hércules), así como una población de *E. grusonii* utilizando marcadores moleculares tipo ISSR.

Hipótesis

- La regulación de las respuestas morfogénicas de *M. mathildae* y *E. grusonii* es dependiente de las concentraciones aplicadas de auxinas (2,4-D, Ácido Diclorofenociacético y ANA, Ácido Naftalenacético) y citocininas (BA, 6-benciladenina), como ocurre en otras especies de cactáceas.
- La variabilidad genética dentro de las poblaciones de *M. mathildae* y *E. grusonii* es baja y posiblemente afectada por la forma de propagación y por la perturbación ambiental provocada por el hombre en las regiones donde se distribuye actualmente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de Cactáceas

Las cactáceas son plantas que han desarrollado muchas adaptaciones, las cuales les permiten enfrentar las condiciones climáticas adversas de las zonas áridas y semiáridas donde la mayor parte de estas plantas se distribuyen (Becerra, 2000).

A lo largo de su evolución y adaptación a las condiciones climáticas, las cactáceas han transformado su morfología y fisiología perdiendo sus hojas (a excepción de la familia Pereskioideae) mostrando grandes modificaciones de estas en forma de espinas o pelos refrigerantes que ayudan a desalentar a los herbívoros, además de contribuir a disminuir el calor provocado por la incidencia directa de los rayos solares. Las cactáceas presentan varios tipos de tallos suculentos (globoso o columnar, grandes o pequeños) que les permiten almacenar y conservar grandes cantidades de agua, además de presentar un importante desarrollo de los parénquimas responsables de la succulencia y poseen una cutícula gruesa impermeable que evita la pérdida de agua por evo-transpiración. Sus flores son de tamaños diversos, de colores diversos lo cual las hace de gran belleza y valor estético para muchos coleccionistas alrededor del mundo (Becerra, 2000), sus raíces son largas, ramificadas y superficiales mismas que permiten la captación más eficiente del agua durante las lluvias ocasionales o de la condensación de humedad atmosférica que ocurre durante la noche. Las cactáceas presentan metabolismo tipo MAC (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas), lo cual les permite realizar los procesos fotosintéticos durante la noche cuando la

temperatura es menor, evitando de esta manera la desecación (Bravo-Hollis, 1978; Cházaro *et al.*, 2001; Anderson, 2001; Landrum, 2002; Hernández, 2006).

2.2. Problemas de Conservación de Cactáceas Mexicanas

La problemática de la protección y conservación de las cactáceas es muy compleja, ya que la mayoría de las especies que se encuentran amenazadas pertenecen a poblaciones pequeñas o de distribución restringida y muchas veces son especies recientemente descubiertas por los científicos, por lo que se conoce muy poco de su biología, aunado a esto, la práctica de la cacto-filia se ha convertido en una seria amenaza para la familia; el saqueo indiscriminado de especies cada vez se hace más intenso, lo que aumenta la vulnerabilidad de las mismas y el riesgo de extinción. Las grandes amenazas en las poblaciones de plantas generalmente se dan por el cambio de uso del suelo con fines urbanos o agrícolas. Un ejemplo bien documentado es el de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *A. agavoides* cuyos hábitats (San Luis Potosí y la población de Tula, Tamaulipas, respectivamente) se han visto amenazados por la conversión del uso de la tierra a agrícola y por la extensión de un tiradero municipal (Fitz y Anderson, 1997).

Otro ejemplo es la construcción de una autopista que abarca desde la Ciudad de México hasta Oaxaca y atraviesa por el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Puebla y Oaxaca), la cual fomentó la destrucción de parte del hábitat de algunas especies de suculentas como *Cephalocereus columna trajani*, *Agave titanota* y *Fouquieria purpussi* (Fitz y Anderson, 1997).

Recientemente, Pulido (2006) integrante de la Sociedad Mexicana de Cactología denunció la destrucción de una extensa zona de cactáceas endémicas

oaxaqueñas en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, detectando la pérdida de cantidades grandes de cactáceas columnares y globosas (por ejemplo, *Mammillaria huitzilopochtli*), debido a la introducción de maquinaria pesada y dinamita que eliminó peñascos completos, tan solo por la ampliación de la carretera que va desde San Juan Bautista Cuicatlán a la población de Concepción Pápalo, evidenciando la falta de respeto de las autoridades y constructores hacia los ecosistemas protegidos.

Hernández y Godínez (1994) señalan que en México existen zonas donde se encuentran un gran número de cactáceas amenazadas, entre ellas el Desierto Chihuahuense y la zona árida Queretano-Hidalguense, particularmente en los estados de Coahuila con 29 especies amenazadas, San Luis Potosí con 26 especies, Tamaulipas con 25, Nuevo León con 24, Querétaro con 20 e Hidalgo con 18 especies amenazadas, lo anterior debido a factores de riesgo tales como uso de cactáceas como alimento, medicinal, forraje, combustible, construcción u ornamental lo cual origina la declinación dramática de la densidad poblacional de estas especies (Fitz y Anderson, 1997).

2.3. Descripción de *Mamillaria mathildae* Kraehenb. & Krainz, 1973

Mammillaria mathildae es un cactus micro-endémico del Estado de Querétaro, México, confinado a poblaciones de baja densidad previamente reportadas cerca de la ciudad de Santiago de Querétaro (Figura 1). La población tipo, localizada cerca del pueblo de La Cañada, tiene solo 76 individuos y está seriamente amenazada por actividades mineras descontroladas. Para otra población, localizada en Juriquilla, Querétaro, se reportaba que tenía 209 individuos en 2003

(Hernández-Oria *et al.*, 2003); pero para el 2007 esta población se redujo a solo 133 plantas (García-Rubio y Malda-Barrera, 2010a). Afortunadamente, la región donde esta población crece se ha convertido en un área natural protegida por las autoridades nacionales (FIQMA, Fideicomiso Queretano para el medio Ambiente), y debido a su vulnerabilidad y pérdida de hábitat debida a la proximidad de las poblaciones remanentes a las zonas urbanas, este cactus se ha incluido como endémico y protegido (SEMARNAT, 2010).

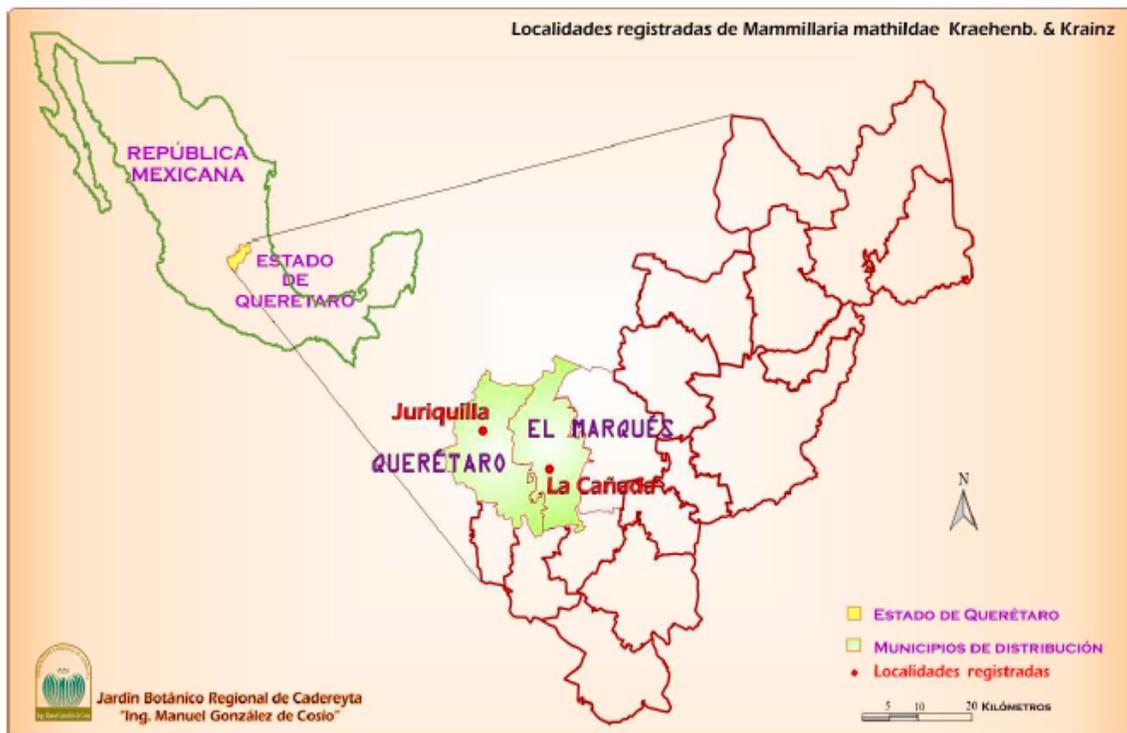


Figura 1. Distribución geográfica de *Mammillaria mathildae* en las cercanías de la Ciudad de Santiago de Querétaro. En la figura se muestra la ubicación de las tres poblaciones que fueron analizadas en este estudio. Imagen obtenida del Jardín Botánico Regional de Cadereyta de Montes.

La distribución conocida de esta especie se ha visto ampliada recientemente al localizarse (y documentarse) una nueva población al noroeste de la capital queretana. El nuevo sitio es una barranca cerca de la presa del fraccionamiento

residencial “Provincia Juriquilla”, en el municipio de Querétaro, Qro (Hernández-Martínez y Sánchez, 2002; Hernández-Oria et al., 2003).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Mammillaria mathildae*.

Reino	PLANTAE
División	ANGIOSPERMAE
Clase	MAGNOLIOPSIDA
Orden	CARYOPHYLLALES
Familia	CACTACEAE
Género	Mammillaria
Especie	Mathildae

2.4. Descripción de *Echinocactus grusonii*, Hildm., 1981

Echinocactus grusonii es una cactácea nativa del centro de México que se desarrolla como una planta esférica grande y llega a medir hasta un metro de altura después de muchos años y tener hasta 35 costillas en plantas maduras (Oonsivilai et al., 2010). Pertenece al género *Echinocactus*, que junto con los miembros del género *Ferocactus* son conocidos como “cactus barril”. A pesar de ser una de las cactáceas más populares en jardinería (conocida como “barril de

oro”, “bola de oro” o “asiento de suegra”), en condiciones naturales es muy rara y se encuentra críticamente amenazada (Figura 2). La especie se halla distribuida actualmente en el Estado de Querétaro, en el municipio de Cadereyta de Montes y en Hidalgo en el municipio de Zimapán (Ortega-Varela, 2004). Antes de la construcción de la presa “Fernando Hiriart Balderrama” (Presa de Zimapán), en la década de los noventas, las poblaciones se localizaban desde el poblado de La Vega (sobre el río San Juan) hasta 8 km aguas arriba de “La Boquilla” (confluencia de los ríos San Juan y Tula, lugar conocido también como “El Infiernillo”) por el río Tula y, desde ese punto hasta 7 km por el río Moctezuma (en el punto conocido como “La Ventana 1” (Ortega-Varela, 2004).

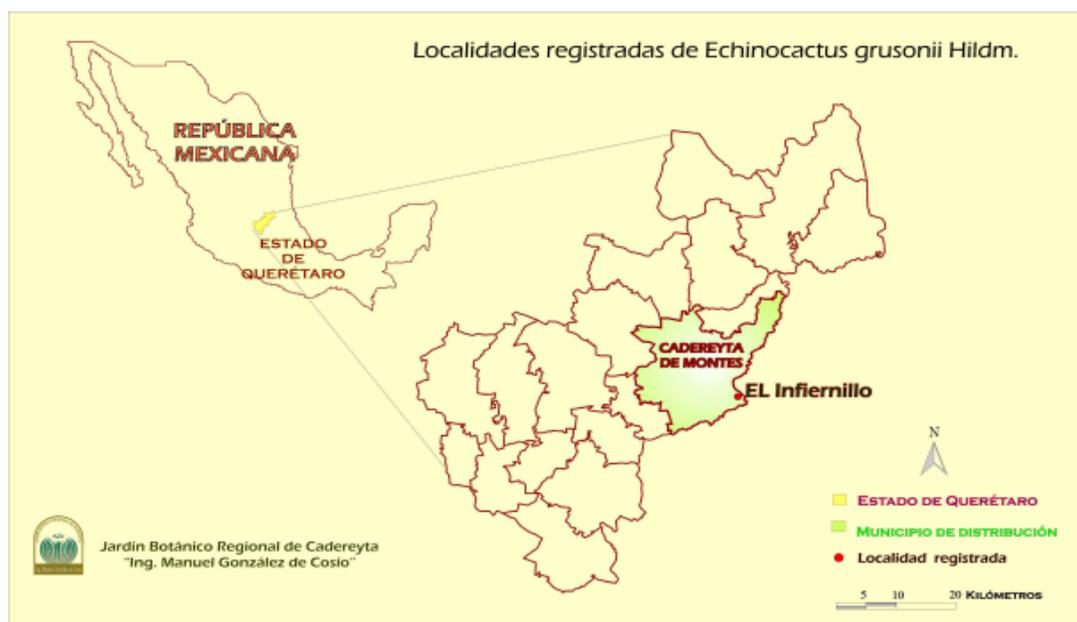


Figura 2. Localización geográfica registrada de *Echinocactus grusonii*. En la figura se resalta la localidad de El Infiernillo, que colinda con el Estado de Hidalgo, donde se reportan algunos ejemplares esporádicos en el municipio de Zimapán. Imagen obtenida del Jardín Botánico Regional de Cadereyta de Montes.

Su hábitat actual está determinado por la presencia de rocas sedimentarias calizas y prefiere zonas con fuerte insolación, esta planta se desarrolla en Matorral

Desértico Micrófilo, Crasicaule y Submontano (Ortega-Varela, 2004). La especie es de interés botánico por tratarse de un taxón muy distintivo.

Filogenéticamente es importante y constituye la especie basal del grupo que incluye a los géneros *Echinocactus* y *Astrophytum* (Cota y Wallace, 1996). Su relevancia ecológica dentro de los matorrales abiertos que habita, radica en la contribución a la biomasa de la comunidad y su consecuente papel en los procesos biológicos de captura y transferencia de energía. Las condiciones que permitieron su evolución con el carácter de micro-endémica ameritan un estudio profundo para asegurar su futuro. En el nivel utilitario la especie ha mostrado ser altamente ornamental y su potencial de aprovechamiento en los invernaderos del mundo es de sobra conocido (Fuller y Fitzgerald, 1987). La especie se encuentra bien representada en las colecciones *ex situ* que mantienen los Jardines Botánicos de México y para el año 2000 al menos 9 de estos sitios la contenían en sus colecciones y 6 la propagaban (Hernández-Martínez y Sánchez, 2000). Actualmente este cactus se encuentra en la categoría de endémico y protegido según la norma oficial vigente (SEMARNAT, 2010).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Echinocactus grusonii*.

REINO	PLANTAE
DIVISIÓN	ANGIOSPERMAE
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
ORDEN	CARYOPHYLLALES
FAMILIA	CACTACEAE
GÉNERO	<i>Echinocactus</i>
ESPECIE	<i>grusonii</i>

2.5. Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se refiere a la propagación artificial de tipo asexual o sexual de plantas utilizando técnicas controladas en laboratorio, consiste en regenerar una planta a partir del cultivo de material vegetal, el cual, a su vez procede de tejido especializado (George *et al.*, 2008; Pérez, 2009 y Castillo, 2001). El cultivo de tejidos es un proceso por el que piezas pequeñas de tejido vivo (explantes) se aíslan de una planta y se cultivan asépticamente por periodos indefinidos de tiempo en un medio nutritivo.

Este tipo de propagación es posible dada la *totipotencialidad* de las células vegetales, es decir, su capacidad para 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; Castillo, 2001 y Mora, 2012). Para que el cultivo de tejidos sea exitoso es mejor iniciar con un explante rico en células indiferenciadas e indeterminadas; por ejemplo los del córtex o de tejido meristemático debido a que tales células son capaces de proliferar rápidamente.

En 1957 Skoog y Miller reportaron 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 indiferenciado 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, 1990; Castillo, 2001 y Mora, 2012).

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).

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. 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 cruas clásicas, no permanecerían en la planta hija (Estopà, 2005).

2.6. Factores de Riesgo de la Familia Cactaceae en Querétaro

El estudio de la flora de las regiones semiáridas es de interés especial ya que, más allá de su aspecto agreste, dichas áreas son ricas en biodiversidad, pero sus ecosistemas son frágiles. Este es el caso, por ejemplo, de las zonas semiáridas del estado de Querétaro, México que albergan entre 93 y 112 especies descubiertas de cactáceas (Hernández *et al.*, 2004 y Scheinbar, 2004). Muchas de

ellas endémicas y en peligro de extinción. Por ello, el desarrollo de sistemas de monitoreo de los factores que afectan su dinámica es fundamental para el entendimiento y conservación de los ecosistemas (Vera-Alfaro *et al.*, 2010).

El Semidesierto Queretano, en el centro de México, alberga uno de los principales ensambles de cactáceas amenazadas en el desierto chihuahuense (Figura 3), la ecoregión con la mayor diversidad de Cactaceae en el mundo. Desde hace algunas décadas se reconoce una aguda y compleja problemática para la supervivencia de estos taxa, debido principalmente a las actividades antropológicas y la extracción ilegal. Las especies amenazadas comúnmente son biológicamente raras, dadas sus limitadas áreas de distribución y abundancia (Hernández-Oria *et al.*, 2007).



Figura 3. Mapa del Desierto Chihuahuense, resaltando la zona árida queretano-hidalguense. Tomado de Hernández *et al.*, (2007).

Uno de los casos más críticos de afectación a las especies de Querétaro y sus poblaciones se ha registrado en el saqueo que es efectuado por extranjeros y por pobladores de las localidades con mayor riqueza de especies endémicas, otro caso relevante de daño directo a las cactáceas ha sido en contra de las poblaciones de *Echinocactus platyacanthus* (“biznaga de acitrón”) y *Astrophytum ornatum*, ya que de las 41 poblaciones registradas y documentadas, se observó que el 85 % presenta daños causados por la destrucción de los ejemplares para servir de alimento para el ganado (Chávez-Martínez *et al.*, 2007).

En esta región de Querétaro, la destrucción del hábitat es primordialmente causado por la extracción de recursos naturales como la leña ya que en muchos casos la mayoría de las plantas leñosas cumplen el papel de nodrizas para las comunidades de cactáceas y son fundamentales para el establecimiento de nuevos individuos; por otra parte, también el sobrepastoreo contribuye de manera significativa en la destrucción de la cubierta vegetal (Arias, 1993).

Entre los factores de riesgo más alarmantes para la región del Semidesierto Queretano se encuentran el cambio de uso de suelo para la agricultura, la construcción de nuevas viviendas, la apertura de campos de extracción de materiales y la implementación de caminos (Hernández y Bárcenas, 1995).

Es evidente que se requiere la aplicación de medidas de control y vigilancia más estrictas por parte de las autoridades competentes, además de un programa de manejo integral que incluya el control de especies invasoras como las que conforman la ganadería extensiva, ya que se está afectando la diversidad biológica de una de las zonas más ricas a nivel mundial de especies de la familia Cactaceae, que es el Semidesierto Queretano (Chávez-Martínez *et al.*, 2007).

A partir de los hallazgos mencionados se determinó la importancia de un área denominada el “Cuadrante Tolimán” (Figura 4), que documenta la presencia de 55 especies, 13 de las cuales se encuentran en alguna categoría de amenaza en su sobrevivencia y son de distribución geográfica restringida, esta diversidad y endemismo son equiparables a la de otros cuadrantes como “El Huizache” en San Luis Potosí con 75 especies, “Xichú” en Guanajuato con 56 especies y “Mier y Noriega” en Nuevo León con 56 especies. En el Semidesierto Queretano, la estrategia actual consiste en aplicar el principio de complementariedad como base para seleccionar sitios prioritarios para la conservación (Hernández *et al.*, 2007).

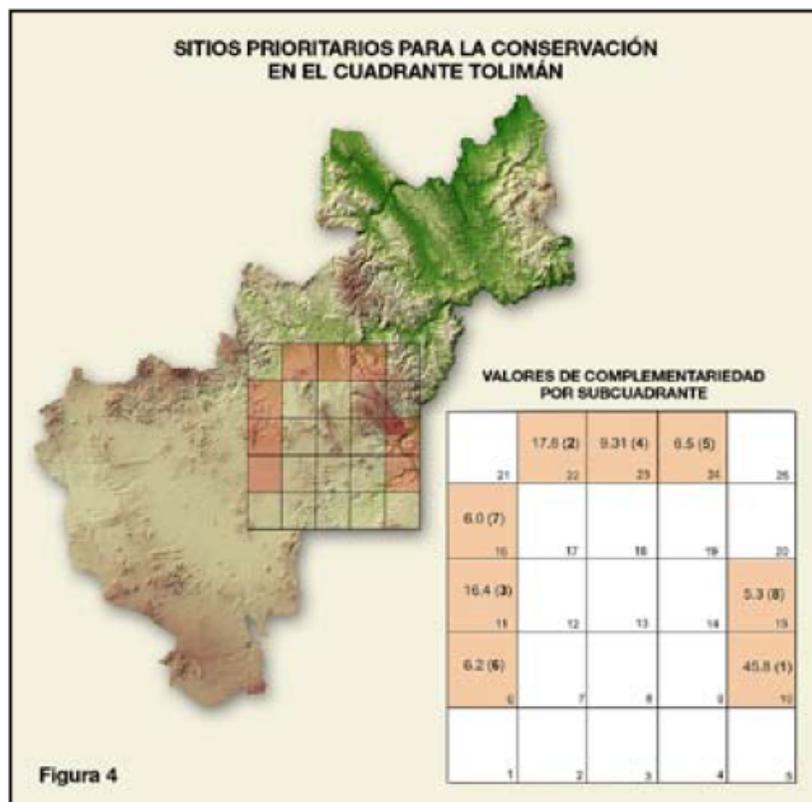


Figura 4. El “Cuadrante Tolimán” en la región del Semidesierto Queretano y sitios de prioridad para la conservación, con los subcuadrantes importantes resaltados en naranja, se muestran también los valores de valor absoluto de complementariedad (Tomado de Hernández *et al.*, 2007).

E. grusonii (Figura 5) se encuentra en uno de los sub cuadrantes importantes dentro del “Cuadrante Tolimán” y se encuentra dentro de la lista de especies de Cactaceae amenazadas en el Semidesierto Queretano como protegida en la NOM-059, en categoría II para la CITES y en peligro crítico (CR) para la IUCN. Es una especie de belleza excepcional. Aunque existen ejemplares en los jardines botánicos de diversas partes del mundo, sus poblaciones naturales casi han desaparecido por completo. Su rango de distribución está limitado a algunas zonas de Querétaro e Hidalgo. La zona donde era más abundante ha quedado cubierta por las aguas de la presa de Zimapán, construida hace apenas unas decenas de años (Jiménez-Sierra, 2011).



Figura 5. *Echinocactus grusonii* en su hábitat (Foto tomada de Jiménez-Sierra, 2011).

En el caso de *M. mathildae* (Figura 6) uno de los principales factores que amenazan la estabilidad estacional es la destrucción de su hábitat causado principalmente por el acelerado cambio de uso de suelo para fines urbanos e industriales. La flora nativa de los alrededores de la ciudad de Querétaro presenta

transformaciones importantes debido al crecimiento urbano acelerado, lo que ha conducido a la disminución de las áreas con vegetación natural y por lo tanto ha incrementado el riesgo de las especies con hábitats reducidos (Hernández-Oria *et al.*, 2003).



Figura 6. *Mammillaria mathildae* en su hábitat. Foto de Araceli Gutiérrez de la Rosa (Tomada de Hernández-Oria *et al.*, 2007).

2.7. Investigaciones de Cultivo *in vitro* en la Familia Cactaceae

La micropropagación es quizá la técnica más empleada dentro del cultivo de tejidos vegetales para propagar plantas de interés hortícola, ornamental y forestal, entre otros (Hu y Wang, 1983; George y Sherrington, 1984; Debergh, 1987; Evans, 1990, George y Debergh, 2008). Este método se basa en la obtención del mayor número de plantas posibles, con caracteres uniformes, libres de enfermedades, prácticamente en cualquier época del año y a partir de solo una pequeña porción de tejido (explante inicial) que va desde embriones, semillas, meristemos apicales, callos, células aisladas o granos de polen (Hu y Wang, 1983; George y

Starrington, 1984; Collin y Edwards, 1998; Razdan, 2003; George y Debergh, 2008).

La propagación de cactus nativos se hace generalmente a partir de semilla y brotes enraizados, sin embargo, los protocolos convencionales de propagación son inadecuados para las especies que exhiben solo pocos brotes, dormancia de semillas, tasas de germinación bajas, auto-esterilidad, crecimiento lento o que requieren muchos años para madurar. Estas dificultades afectan a distintas especies que se encuentran actualmente amenazadas con extinguirse (Clayton *et al.*, 1990).

El cultivo de tejidos *in vitro* puede solucionar muchas de las limitaciones asociadas con la propagación convencional de cactus raros. El establecimiento de cultivos de callos de muchos géneros de cactus (King, 1957; Minocha y Mehra, 1974; Havel y Kolar, 1983), estudios de morfogénesis (Mauseth y Halperin, 1975; Kolar *et al.*, 1976; Johnson y Emino, 1979) son reportados. Al menos 24 especies de 16 géneros de cactus han sido micropropagados mediante enraizamiento de brotes a partir de explantes de yemas axilares (Mauseth, 1979; Johnson y Emino, 1979; Vyskot y Jara, 1984; Starling, 1985; Ault y Blackmon, 1985; 1987; Escobar *et al.*, 1986; Rubluo *et al.*, 1986). La micropropagación con axilas ha demostrado una gran uniformidad dentro de las clonas (Mauseth, 1979; Ault y Blackmon, 1987).

Más recientemente, se encuentran trabajos como los de Clayton *et al.* (1990), en el cual se micropropagaron 11 cactus raros o amenazados pertenecientes a la Subtribu Cactinae mediante el enraizamiento de brotes a partir de mamilas axilares.

Un trabajo más actual es el de Téllez-Román (2012) en el cual se estudiaron las condiciones de cultivo *in vitro* y las respuestas morfogénicas de las cactáceas *Echinopsis chamacereus*, *Gymnocalidium mihanovichii* y *Mammillaria plumosa*; mediante la regeneración de brotes se establecieron protocolos eficientes para la germinación masiva *in vitro* a partir de la vía organogénica directa e indirecta y se evaluaron varios tipos de uniones para el establecimiento de microinjertos.

En el año 2008, García y Malda realizaron un trabajo en el cual se micro propagó *Mammillaria mathildae* con el propósito de re-introducirla en su hábitat natural utilizando micorrizas para aumentar el éxito de aclimatación en las condiciones naturales agrestes de esta especie. Este mismo grupo publicó un trabajo en el 2010 donde establecieron un protocolo rápido de multiplicación de *M. mathildae* utilizando brotes de tres tipos de explante (apical, lateral y basal) obtenidos de plantas generadas a partir de cultivo *in vitro* e induciendo la formación de brotes con benciladenina y ácido indol acético (BA/AIA), obteniendo una producción de 1.14 ± 0.07 nuevos brotes de explantes laterales y 4.09 ± 0.13 brotes nuevos provenientes de explantes apicales.

El-Kazzaz y colaboradores de la Universidad de El Cairo desarrollaron un método efectivo para la micropropagación rápida de *E. grusonii* en 1999 utilizando cultivo de tejidos mediante la generación de callos a partir de tratamientos con benciladenina y manteniendo los callos formados utilizando 2,4-D, obteniendo excelentes resultados. Rodríguez-González (2006) propagó la planta *in vitro* utilizando explantes longitudinales que colocó en medio MS adicionado con tres diferentes citocininas: benciladenina, 2-isopentenil adenina y kinetina a diferentes concentraciones (1, 2 y 3 mg·L⁻¹) más un tratamiento control, encontrando que las

plantas tratadas con 2iP en una concentración de 3 mg·L⁻¹ fue la más adecuada, posteriormente enraizó los brotes en medio MS basal (sin reguladores) observando crecimiento de raíces después de 15 días.

Finalmente, Fay *et al.* (1995) publicaron un listado donde señalan que para la familia Cactaceae, hasta ese momento, había 25 trabajos de propagación para 22 especies, 17 de los cuales fueron realizados durante el año 1994. Entre la lista de especies se encuentran géneros como *Echinocactus*, *Astrophytum* y *Mammillaria* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Especies de la familia Cactaceae que se han propagado por medio de cultivo de tejidos vegetales (Tomado de Fay *et al.*, 1995).

Especie	Explante	Medio	Hormonas (mg/L)	Respuesta morfog.	Brotes (B/E)	Otros	Autor
<i>Mammillaria elongata</i>	T	MS	2iP/AIB 10/1	callo, raíces y brotes	n.e.	E y Ac	Johnson y Emino, 1979
<i>Leuchtenbergia principis</i>	A	MS	BA/ANA 10/0.1	brotes	25	n.e.	Starling, 1985
<i>Cereus peruvianus</i>	A y La	MS + B5	Ba y K + AIA y ANA: 0, 0.01, 0.1 y 1	brotes		n.e.	Machado y Prioli, 1996
<i>Mammillaria candida</i>	L	MS	K 5 + 1 % Carbón Activado	brotes	2	n.e.	Elías-Rocha <i>et al.</i> , 1998
<i>Coryphanta clavata</i>	A y B	MS	BA 1 BA2	brotes	4.73	E y Ac	Pérez- Molphe- Balch <i>et al.</i> , 1998
<i>Echinocactus platyacanthus</i>			BA/ANA 1/0.01		9		
<i>Echinofossulocactus sp</i>			BA/ANA 1/0.1		12.5		
<i>Nyctocereus serpentinus</i>					2.15		
<i>Astrophytum myrisostigma</i>					9.23		

<i>Mammillaria sphacelata</i>					17.5		
<i>Stenocactus coptonogogus</i>					16.75		
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>					5.83		
<i>Mammillaria formosa</i>					4.42		
<i>Turbinicactus laui</i>	L	MS	2,4-D/K - ANA/BA	callo y brotes	n.e.	n.e.	Martínez <i>et al.</i> , 1999
<i>Epithelantha micromeris</i>	A y B	MS	2iP/ANA 1/0.1 6/0.1	brotes	14.75 17.25	84 % de éxito en Ac	Velázquez y Soltero, 2001
<i>Acharagma aguirreana</i>	A y Ta	MS	2iP:2 BA:3	brotes	5.8, 2.4, 4.3, 3,	Ac con 90-100 % de	Castro-Gallo <i>et al.</i> , 2002
<i>Coryphanta elephantidens</i>			BA:3 2iP:4		3.3, 2.8, 7	sobre- vivencia	
<i>Pachycereus schottli</i>			BA:2				
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>			2iP:4 BA:1				
<i>Stenocereus stellatus</i>							
<i>Opuntia erinacea</i>	n.e	MS y Robert	(BA/ANA) 1/0.1	brotes	12.5	n.e.	Ramírez <i>et al.</i> , 2002
<i>Mammillaria obscura</i>			6/0.1		9.6		
<i>Duvalia sulcata</i>			10/0.01		10		
<i>Echinocactus platyacanthus</i>					1.5		

A= Apical, B= Basal, La= Lateral, L= Longitudinal, T= Tubérculos, Ta= Transversal, n.e.= No Especificado, E= enraizamiento, Ac= Aclimatación, Org. Ind= organogénesis indirecta, B/E= Brotes por explante.

2.8 Diversidad Genética.

La diversidad genética es de importancia fundamental para la continuidad de las especies y permite la adaptación en condiciones ambientales bióticas y abióticas adversas; permite también el cambio en la composición genética de los organismos cuando éstos se someten a cambios en el ambiente (Çalışkan, 2012).

La variabilidad genética o diversidad genética se refiere, entonces, al componente

más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie, de ahí que su conocimiento y comprensión sea de vital importancia tanto para la conservación y el avance de la genética evolutiva (Piñero, 2008; Lowe, 2004).

Este conocimiento puede ser utilizado en varias vertientes: a) para evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas conscientes o inconscientes; b) evaluar los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos que disminuyen nuestra capacidad de sobrevivencia como sociedad y como especie; c) conocer la riqueza genética de la nación y su distribución geográfica; d) planear estrategias de aprovechamiento y conservación de las poblaciones, especies y recursos genéticos; e) entender la forma, la velocidad y las causas de la pérdida de diversidad genética; f) evaluar los riesgos de introducción de enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones, especies nativas y recursos genéticos de plantas, animales y humanos (Piñero, 2008, Lowe, 2004).

Alrededor de un tercio de la vegetación del territorio nacional corresponde a las zonas áridas, que de manera más general pueden dividirse en el Desierto Sonorense, el Desierto Chihuahuense y el Desierto del Valle de Tehuacán. Estos ecosistemas albergan buena parte de los endemismos que elevan la biodiversidad de México, por lo que el análisis de la diversidad genética de sus principales especies es particularmente importante. Todos los estudios se han realizado en angiospermas con alguna importancia biológica o económica. Muchos se han

centrado en las cactáceas columnares, ya que México cuenta con 75 de las 170 especies conocidas, y de las cuales 12 se encuentran bajo cultivo en huertas campesinas y 20 bajo manejo silvícola. Otro porcentaje importante se ha realizado en *Agave*, ya que nuestro país cuenta con 125 de las 166 especies del mundo. En el Cuadro 4 se muestran los estudios más recientes de diversidad genética en plantas de las zonas áridas de México, con referencia a qué desierto pertenece la planta, el marcador molecular utilizado y la referencia bibliográfica según Piñero (2008).

Cuadro 4. Diversidad genética en plantas de las zonas áridas de México.

Desierto	Especie	Marcador	Referencia
Sonorense	<i>Carnegiea gigantea</i>	Isoenzimas	Hamrick <i>et al.</i> , 2002
Sonorense	<i>Lophocereus schottii</i>	Isoenzimas	Nason <i>et al.</i> , 2002
Sonorense	<i>Pachycereus pringlei</i>	Isoenzimas	Hamrick <i>et al.</i> , 2002
Sonorense	<i>Stenocereus thurberi</i>	Isoenzimas	Hamrick <i>et al.</i> , 2002
Sonorense	<i>Stenocereus gummosus</i>	Isoenzimas	Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003
Sonorense	<i>Stenocereus eruca</i>	Isoenzimas	Clark-Tapia, 2000
Sonorense	<i>Stenocereus eruca</i>	RAPD	Clark-Tapia <i>et al.</i> , 2005
Sonorense	<i>Bursera microphylla</i>	Isoenzimas	Hernández, 1999
Sonorense	<i>Bursera hindsiana</i>	Isoenzimas	Vargas, 2000
Sonorense	<i>Olneya tesota</i>	Isoenzimas	A. Domínguez y L. Hernández, (no publicado).
Sonorense	<i>Kallstroemia grandiflora</i>	Isoenzimas	Cuevas, 2005
Sonorense	<i>Agave cerulata</i>	RAPD	Navarro-Quesada <i>et al.</i> , 2003
Sonorense	<i>Agave deserti</i>	RAPD	Navarro-Quesada <i>et al.</i> , 2003
Sonorense	<i>Agave subsimplex</i>	RAPD	Navarro-Quesada <i>et al.</i> , 2003
Chihuahuense	<i>Agave victoriae-regina</i>	Isoenzimas	Martínez-Palacios <i>et al.</i> , 1999
Chihuahuense	<i>Agave lechuguilla</i>	Isoenzimas	Silva-Montellano y Eguiarte, 2003
Chihuahuense	<i>Larrea tridentata</i>	Isoenzimas	Duran <i>et al.</i> , 2005
Tehuacán	<i>Escontria chiotilla</i>	Isoenzimas	Tinoco <i>et al.</i> , 2005
Tehuacán	<i>Polaskia chichipe</i>	Microsatélite	Otero-Arnaiz <i>et al.</i> , 2005b

s			
Tehuacán	<i>Polaskia chichipe</i>	Isoenzimas	Lucio, 2006
Tehuacán	<i>Stenocereus stellatus</i>	Isoenzimas	Casas <i>et al.</i> , 2006
Tehuacán	<i>Polaskia chende</i>	Isoenzimas	Ruiz-Durán, 2006

2.9. Estimados de la Variación Genética con Caracteres Moleculares

Los enfoques que actualmente se han usado para entender la variación genética en especies mexicanas incluyen isoenzimas, polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente en mayor o menor grado (RAPD y AFLP, repetidos en secuencias internas (ISSR), microsatélites y secuencias de ADN) (Piñero *et al.*, 2008).

La elección de los marcadores depende de varios factores, como el tipo de pregunta a responder y algunas de las características del marcador, como: tipo de herencia y la facilidad en su uso y costo (Piñero *et al.*, 2008).

Dentro de la teoría de Genética de Poblaciones (que estudia los patrones y causas de la diversidad genética en las poblaciones) existen conceptos que descomponen la variación genética en diferentes factores. Hay una cantidad muy grande de métodos descritos en la literatura sobre genética de poblaciones para estimar la variación y la estructura genéticas. Las distintas medidas de estructura genética están relacionadas entre sí, y se basan en analizar las diferencias en las frecuencias alélicas, las pruebas más sencillas simplemente comparan estadísticamente estas últimas. Otros métodos se basan en estimar la proporción de variación genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones, usualmente empleando el estadístico F_{ST} o sus análogos, que permiten comparar de manera

clara y cuantitativa la diferenciación existente entre poblaciones de distintas especies. Estos estimadores tienen en principio la ventaja adicional de que nos pueden dar el estimado conjunto de la importancia de la deriva génica y el flujo génico, es decir, el número efectivo de migrantes por generación, o Nm . Por último, hay diferentes posibles medidas de “distancia genética” entre pares de poblaciones, la más conocida es la distancia de Nei, que refleja el número de sustituciones nucleotídicas en el ADN, y que como se ha usado en diferentes grupos de organismos, permite comparaciones a distintos niveles (entre poblaciones, entre variedades o subespecies, entre especies) (Piñero *et al.*, 2008). También, se pueden utilizar las distancias genéticas entre pares de poblaciones para reconstruir las genealogías de poblaciones, ya sea mediante métodos de agrupamiento como el *Unweighted Pair-Groups Method with Arithmetic Averages* (UPGMA) o Neighbor-joining, o utilizar estas distancias en análisis de aislamiento por distancia, graficando las distancias genéticas pareadas como función de la distancia geográfica que separa a las poblaciones, bajo el supuesto de que las diferencias se incrementan con la distancia que las separa (Piñero *et al.*, 2008).

Las fuentes de variación en la población pueden deberse a diferencias en el genotipo (en el ADN y son heredables), diferencias en el ambiente (afectadas por condiciones ambientales actuales o recientes y estos pueden cambiar o persistir a lo largo de la vida del organismo) y efectos maternos (determinados por el estado fisiológico y comportamiento de la madre durante la gestación y/o crianza). Un polimorfismo genético se refiere a la presencia de dos o más fenotipos (alelos) en una población (Azofeita-Delgado, 2006).

2.10. Marcadores Genéticos y Marcadores Moleculares

Los marcadores genéticos son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología tales como la evolución, ecología, biomedicina, estudios de diversidad son utilizados para localizar y aislar genes de interés (Rentería-Alcántara, 2007). En sentido estricto, un marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física identificable y cuya herencia se puede rastrear, los marcadores genéticos pueden ser tanto genes como secciones del ADN sin función conocida (Azofeita-Delgado, 2006).

La utilidad de los marcadores genéticos es conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como puede ser en los análisis de proteínas o de manera directa como se hace en los estudios de ADN (Simpson *et al.*, 1997).

Los marcadores genéticos se pueden categorizar en tres grupos: los basados en características visibles (morfológicos y agronómicos), los basados en productos génicos (marcadores bioquímicos) y los que se basan en un ensayo de ADN (los marcadores moleculares). Hay gran cantidad de técnicas de marcadores moleculares, para citar algunos ejemplos se encuentran los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) y RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) por citar solo algunos de los más utilizados que se clasifican de acuerdo al modo de transmisión (biparental, nuclear-materno, herencia de organelos, paterna) por su acción génica (marcadores dominantes o codominantes) o por su método de análisis (basados en hibridación o basados en PCR) (Semagn *et al.*, 1997).

2.10.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que se basa en la propiedad que tiene el ADN de autoreplicarse, es una técnica molecular para replicar enzimáticamente (amplificar) pequeñas cantidades de ADN sin utilizar un organismo vivo (Semagn *et al.*, 1997), por lo tanto es un proceso *in vitro* que permite amplificar secuencias de ADN de manera exponencial (Valadez y Kahl, 2005). Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadores llamadas “primers”, cebadores o iniciadores, una enzima Taq-ADN polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), un amortiguador apropiado y un equipo llamado termociclador que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado (Valadez y Kahl, 2000).

La PCR se realiza en tres pasos (Figura 7): el primero es una desnaturalización que sirve para separar la cadena doble de ADN en dos sencillas a alta temperatura (94° C); en el segundo, la temperatura se reduce para permitir el alineamiento de las moléculas iniciadoras o “primers” a la secuencia blanco o secuencia original del ADN; en el tercer paso se lleva a cabo la elongación o extensión (polimerización) de la molécula iniciadora, momento donde interviene la enzima Taq ADN polimerasa que anexa a esta molécula los desoxirribonucleótidos necesarios para formar la nueva cadena de ADN; esta enzima tolera hasta 72 °C de temperatura. Al término de dichos pasos se realiza un ciclo de amplificación. La reacción se realiza en un termociclador, el cual es un incubador pre-programado que cicla automáticamente (Valadez y Kahl, 2005).

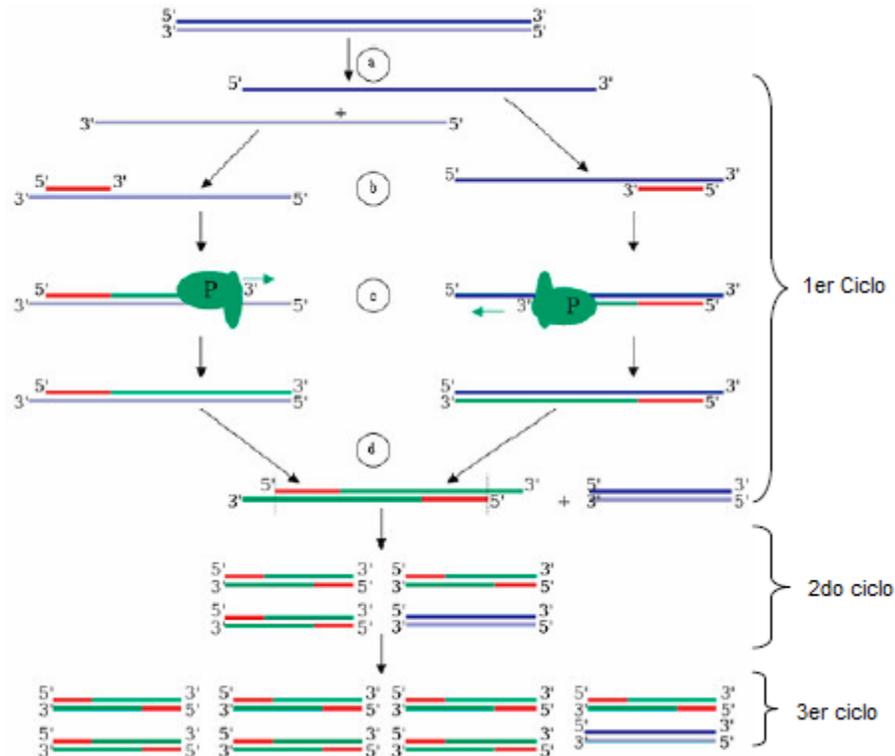


Figura 7. Esquema mostrando los diferentes pasos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): a) paso de desnaturalización a 92-95 ° C, b) alineación de iniciador (37-38 ° C dependiendo de la técnica), c) Paso de extensión a 72 ° C (P= Taq-ADN Polimerasa) y d) final del fragmento de ADN. Los dos fragmentos resultantes proporcionan el molde de ADN para el siguiente ciclo, doblando la cantidad de ADN duplicada en cada ciclo (Semagn *et al.*, 1997).

Según la técnica, se usan uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia de nucleótidos de los extremos del ADN o diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Valadez y Kahl, 2000), llegándose a obtener millones de copias que por cantidad es posible

visualizar aun cuando la secuencia que se busca se encuentre en concentración muy baja (Saiki *et al.*, 1988). La cadena se duplica con respecto al ciclo previo; de esta manera, la concentración de moléculas de ADN de cadena doble colocadas inicialmente en el termociclador serán 2^n moléculas, donde n = al número de ciclos realizados (Valadez y Kahl, 2005).

2.10.2. Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSRs)

Las Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSRs) son un tipo de marcador genético que permite evaluar los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como $(CT)_n$ o $(CA)_n$, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte (Figura 8). Los motivos repetidos, también llamados SSRs (Simple Sequence Repeats; Repeticiones Simples Repetidas) pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos, su longitud tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el ADN se replica durante la meiosis, la DNA polimerasa puede “tartamudear” hacia adelante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden presentar, entonces, menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000).

de ambas podría tener repeticiones de 12 y 15. En el tiempo, a medida que ocurren los cruces sexuales entre los individuos, los microsatélites se recombinarán y la población mantendrá una variabilidad de microsatélites que es característica para esa población particular y que la distingue de otras poblaciones con las cuales ella no se cruza (Morgante y Oliveri, 1993; Zane *et al.*, 2002).

Estos marcadores han demostrado ser rápidos, simples, reproducibles, poderosos y baratos en el estudio de la diversidad genética y en la identificación de relaciones estrechas entre cultivares de varias especies. Son utilizados ampliamente en aplicaciones de taxonomía molecular, conservación, mejoramiento genético y análisis de diversidad genética. Estos marcadores moleculares se consideran dominantes y proveen alta variabilidad y una alta densidad de mapeo (Kumar *et al.*, 2008).

Los ISSRs se consideran marcadores semi-arbitrarios amplificados por la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido, cebador o “primer” complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto). Los iniciadores de ISSRs consisten en un motivo repetido de di- o trinucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite. En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios (Figura 8) en el extremo 3' o 5', que jugarán el papel de “anclas” asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o 3' del microsatélite, respectivamente (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bernet y Branchard, 2001; Pradeep, 2002).

Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR y no son necesarias altas concentraciones de ADN. Para diseñar los iniciadores no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida y son más sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos (Pradeep *et al.*, 2002). En cuanto a las desventajas, la homología de las bandas es incierta y dado que son marcadores dominantes, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterocigotos de los homocigotos dominantes (Wright, 1965). Para estimar la heterocigosis poblacional es necesario asumir *a priori* que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que las estimaciones de heterocigosis y estructuración genética pueden sesgarse un poco, aunque existen correcciones estadísticas (Lynch y Milligan, 1994).

Los ISSRs pueden ser utilizados como marcadores en la resolución de múltiples problemas biológicos. Los polimorfismos que presentan, además de su heredabilidad, permiten aplicarlos en la identificación de individuos, distinción de variedades intra-específicas (particularmente en especies con importancia económica), identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de la diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, introgresión e hibridación, así como distinción de individuos con origen clonal y sexual (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000; Pradeep *et al.*, 2002).

2.11. Investigaciones previas en Caracterización Genética de la Familia Cactaceae.

Dada la reorganización del género *Opuntia* por Wallace y Dickie (2002) en un número separado de géneros, el género *Mammillaria* ha tomado lugar como el más abundante en términos de especies dentro de la familia Cactaceae. Los estimados recientes del número de especies varían mucho dependiendo de la circunscripción tanto a nivel de especie como de género. Actualmente hay 181 especies reconocidas por Pilbeam (1999) y 141 especies aceptadas por Hunt (1999).

Butterworth y Wallace (2004) realizaron estudios filogenéticos del género *Mammillaria* utilizando variación en secuencia de cloroplastos ya que se sabe que este género es muy variable y se tenía como objetivo analizar si es mono filético. Se utilizaron secuencias de ADN de cloroplastos del intrón rp/16 y del espaciador intra-genético psbA/trnH para 125 taxones (113 de *Mammillaria*, 10 de *Coryphanta*, *Escobaria*, *Neollodya*, *Pellecyphora*, *Ortegocactus*, y *Ferocactus* y *Stenocactus* como grupos externos, realizaron análisis de parsimonia, y sus resultados mostraron que el género *Mammillaria* no es monofilético y que el género *Mammilloidya* se encuentra incluido en un grupo núcleo dentro de las especies de *Mammillaria*.

En una serie de experimentos por El-Kazzaz y colaboradores (1999) anteriormente citada en este trabajo, se utilizaron plantas propagadas *in vitro* para analizar variantes mediante SDS-PAGE de extractos de proteínas solubles y analizaron la huella genómica de estas variantes utilizando amplificación aleatoria de ADN

polimórfico (RAPDs), los cuales revelaron polimorfismo entre los individuos evaluados utilizando dos iniciadores, esto con el fin de poder identificar plantas generadas *in vitro* o provenientes de poblaciones naturales. En el año 2008 Hardesty y colaboradores utilizaron microsatélites para caracterizar a *E. grusonii* a partir de una biblioteca no enriquecida utilizando 57 secuencias que contenían arreglos de microsatélite, de las cuales 12 resultaron ser polimórficas entre 30 individuos de una población natural amenazada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Las semillas de las tres poblaciones de *Mammillaria mathildae* fueron donadas por el Dr. Óscar García Rubio, de la Universidad Autónoma de Querétaro campus Aeropuerto, las cápsulas indehiscentes de *Echinocactus grusonii* se obtuvieron como una donación del M. en C. Mario Alberto Robledo Mejía y el Jardín Botánico Regional de Cadereyta de Montes “Ing. Manuel González de Cosío” y se mantuvieron almacenadas en frío hasta su uso.

3.2. Desinfestación de Semillas

Para llevar a cabo este proceso se pesaron 0.375 mg de semillas y se procedió de la manera siguiente: a) con la ayuda de una pipeta serológica se midió 1.25 mL de hipoclorito de sodio al 5 % (v/v) y se aforó en agua destilada a 25 mL en una probeta graduada; b) se agregaron las semillas a la solución de hipoclorito de sodio y se le añadieron dos gotas de Tween 20 cubriendo con papel parafilm y agitando durante 15 seg o hasta que las semillas se tornaron de color amarillo; finalmente, c) se colocaron en la campana de flujo laminar, y se esperó 5 min para llevar a cabo la siembra.

3.3. Medios de Cultivo

Para llevar a cabo la germinación de semillas se siguió el método descrito por García y Malda (2010), en el que se utilizó medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con 15 g·L⁻¹ de sacarosa, 0.05 g·L⁻¹ de myo-inositol, 0.5 mg·L⁻¹ de hidrocloreuro de tiamina, 0.25 mg·L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.25 mg·L⁻¹ de

hidrocloruro de piridoxina y $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar como agente gelificante, el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 . Una vez preparado, el medio se esterilizó en una autoclave durante 15 minutos a 103 KPa de presión y $121 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura, este fue el medio utilizado en todos los ensayos de germinación realizados en este estudio (medio basal). Después de un mes, las semillas se transfirieron a medio MS completo, suplementado con $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de myo-inositol, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidrocloruro de tiamina, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidrocloruro de piridoxina y $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar (Medio MS Completo). Las semillas se mantuvieron a $26\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ bajo un flujo total de iluminación fotónica de $120\text{-}130 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mediante el uso de lámparas fluorescentes, en un fotoperiodo de 16 h. Las semillas fueron transferidas cada 4 semanas a medio fresco completo.

3.4. Siembra de Semillas

Después de la desinfección, se decantaron las semillas en un embudo con papel filtro estéril, y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril; una vez hecho esto la siembra se realizó de la manera siguiente: a) con la ayuda de pinzas estériles se tomó el papel filtro con las semillas y se depositó en una caja Petri para exponer las semillas, b) con una micro espátula estéril se tomaron las semillas y se distribuyeron uniformemente sobre cajas Petri conteniendo 20 mL de medio de cultivo gelificado para su germinación.

3.5. Germinación de Semillas

Se calculó el porcentaje de germinación considerando a las semillas como germinadas cuando se observó que los embriones rompían la testa. Se cuantificó el número de semillas germinadas por frasco, de un total de 10 semillas por frasco con tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos evaluados para ambas especies fueron:

- Control (sin escarificación).
- Escarificadas mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado por diferentes tiempos (1, 1.5, 3, 6 y 12 minutos) previo a la siembra.
- Escarificadas mediante la adición de peróxido de hidrógeno al 9% (agua oxigenada) por diferentes tiempos (3, 6 y 12 minutos y 12 y 24 horas) previo a la siembra.

3.6. Callo Génesis

Una vez germinadas las semillas, se seleccionaron plántulas sanas y vigorosas para proceder con esta fase de experimentación. Las plántulas seleccionadas fueron segmentadas longitudinalmente (Figura 9) con ayuda de un bisturí estéril, dejando rodajas que contenían tanto tejido medular, haces vasculares, tejido parenquimatoso, epidermis y mamilas.

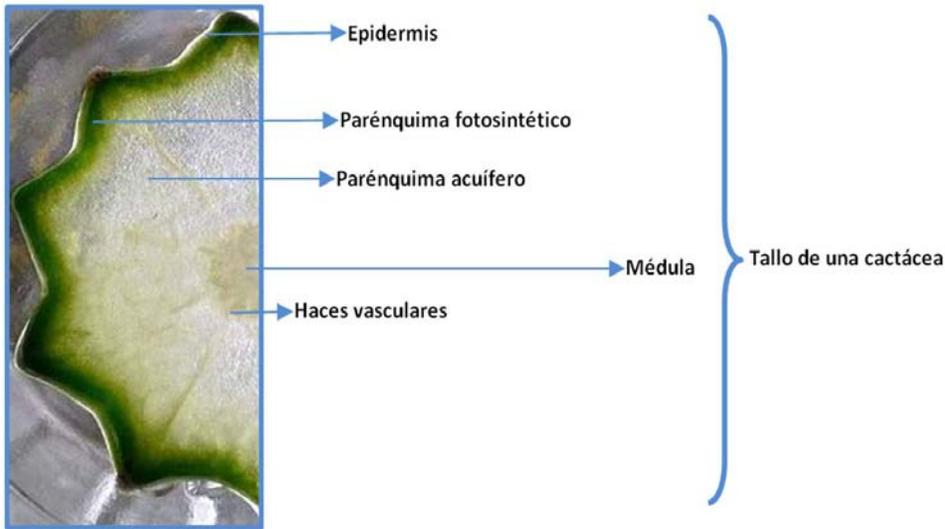


Figura 9. Segmentos longitudinales de cactáceas utilizados para inducir callogénesis en plantas provenientes de cultivo *in vitro* de *M. mathildae* y *E. grusonii*.

Se sembraron 5 rodajas por frasco en tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- Control (Sin adición de fitohormonas).
- Ácido Naftalénacético (ANA) en dos concentraciones (0.25 y 0.5 mg·L⁻¹).
- Benciladenina (BA) en dos concentraciones (0.25 y 0.5 mg·L⁻¹).
- Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en dos concentraciones (0.25 y 0.5 mg·L⁻¹).
- Cuatro combinaciones de ANA : BA (0.25:0.25; 0.25 : 0.5; 0.5; 0.25 y 0.5 : 0.5 mg·L⁻¹).
- Cuatro combinaciones de BA : 2,4-D (0.25 : 0.25; 0.25 : 0.5; 0.5; 0.25 y 0.5 : 0.5 mg·L⁻¹).

3.7. Morfogénesis Indirecta

Utilizando los callos obtenidos en la etapa anterior, se procedió a fragmentar los callos de dos meses de desarrollo provenientes de los tratamientos de callogénesis de ANA, 2,4-D y BA utilizados en ambas concentraciones (0.25 y 0.5

mg·L⁻¹) y se trataron con tres concentraciones de zeatina (ZEA: 0.3, 0.7 y 1.0 mg·L⁻¹). Se sembraron 5 explantes provenientes de fragmentación de callo por frasco en al menos tres repeticiones por tratamiento.

3.8. Enraizamiento de Brotes Obtenidos a partir de Callo (Morfogénesis Indirecta)

Los brotes obtenidos de ambas especies a partir de los tratamientos con zeatina fueron separados de los callos que los formaron y fueron transplantados a nuevos tratamientos para inducir enraizamiento utilizando dos tratamientos de Ácido Indol Butírico (AIB) en concentraciones de 0.5 y 1.0 mg·L⁻¹ y un tratamiento adicional utilizando carbón activado (CA) en una concentración de 8 g·L⁻¹. Se sembraron tres brotes por frasco en al menos tres repeticiones por tratamiento. En este experimento se evaluó el número de brotes que mostraban respuesta (formación de raíz), se cuantificó el número total de raíces por brote y se midió la raíz más larga en centímetros de cada uno de los brotes que mostraron respuesta al tratamiento con zeatina utilizando un vernier.

3.9. Morfogénesis Directa

En otra serie de experimentos, se utilizaron plantas provenientes de cultivo *in vitro* para asegurar la asepsia de los explantes y con la ayuda de un bisturí se seccionaron mamilas de plántulas de ambas especies (*E. grusonii* y *M. mathildae*) y se sometieron a tratamientos con AIB en concentraciones de 0.5 y 1.0 mg·L⁻¹ y CA en una concentración de 8 g·L⁻¹ para inducir el desarrollo de plántulas completas. En estos experimentos se evaluó el desarrollo de la planta (aumento

de la altura, del número de mamilas, considerando que todas las plantas comenzaron con una sola mamila, la formación de raíces, el número de raíces de cada explante y la longitud de la raíz más larga de cada explante que mostró respuesta a los tratamientos.

3.10. Análisis Estadístico de Metodología de Cultivo *in vitro*

Para analizar los datos en los experimentos de cultivo *in vitro* (germinación, tratamientos de germinación, callogénesis, morfogénesis indirecta, enraizamiento de brotes obtenidos a partir de callos (morfogénesis indirecta) y morfogénesis directa) se vaciaron los datos a hojas de cálculo de Microsoft Excel®, y se realizó el análisis estadístico con el programa Statgraphics Centurion XVI (Versión 16.1.18 [32 bits]) de StatPoint Technologies, Inc. (1982-2012). Se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor y Pruebas de Medias de Tukey, y a partir de estos datos, se graficaron los resultados.

3.11. Extracción y purificación de ADN genómico

Para extraer y purificar el ADN genómico, se utilizó el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983), combinado con el de Doyle y Doyle (1987) y adaptado con algunas modificaciones en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad Autónoma Chapingo.

El ADN se purificó de plantas jóvenes provenientes de cultivo *in vitro* que fueron maceradas con la ayuda de nitrógeno líquido y mezcladas con 2.5 mL de amortiguador de extracción CTAB al 3 % (3 % CTAB; 150 mM Tris-HCl; 30 mM EDTA, pH 7.5; 2.2 mM NaCl, 1.5 PVP) y 4 µL de β-Mercaptoetanol. Las muestras

se incubaron en baño maría a 65 °C por 30 min y posteriormente se centrifugaron por 5 min a 14,000 rpm. Después de la centrifugación, se aisló el sobrenadante y se le añadió 1.5 volúmenes de isopropanol, seguidos por una incubación a -20 °C por 30 min. Al terminar la incubación las muestras se sometieron nuevamente a centrifugación por 5 min a 14,000 rpm y el sobrenadante se descartó. El precipitado resultante se lavó dos veces con etanol al 70 %, se resuspendió en 0.1 mL de amortiguador TE (Tris-HCl 1 mM; EDTA 0.1 mM, pH 8.0) y se le añadió 1 µL de proteinasa K (10 mg·µL⁻¹). Después de una incubación por una hora a 37 °C, se le añadió un volumen de acetato de amonio 3 M y las muestras se incubaron en hielo por 30 min. Después de este periodo, se le añadió el mismo volumen de isopropanol seguido de una incubación de al menos 20 min a 20 °C. El ADN se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm por 5 minutos, se lavó en alcohol al 70 % y se disolvió en 100 µL de amortiguador TE.

3.12. Concentración y Calidad de ADN

El ADN obtenido se cuantificó usando un espectrofotómetro GENESYS 10 UV-vis de Thermo Scientific, calibrado a 260 nm. Con los datos obtenidos se calculó la cantidad de agua que se debía agregar para obtener una concentración de trabajo de 10 µg·µL⁻¹.

La calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v). Se colocó una mezcla compuesta de 3 µg de ADN y 1.5 µL de amortiguador de carga (0.1 % azul de bromofenol, 0.1 % xilen cianol, 30 % de Ficoll y 1 % de SDS).

El amortiguador de corrida utilizado fue TAE 10X (40 mM tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na₂-EDTA), diluido a una proporción de 0.5 X; la electroforesis se realizó a 80 voltios por un periodo de 2 h; transcurrido este tiempo, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 mg·mL⁻¹). Las imágenes se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta KODAK EDAS-290. La calidad del ADN se definió como aceptable al obtener una banda íntegra y uniforme por arriba de aproximadamente 12,000 pb, de las cuatro poblaciones evaluadas utilizando el marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder Plus (GeneRuler).

3.13. Selección de Iniciadores

Se probó un total de 25 iniciadores ISSR de las series P, IAH y A y se seleccionaron aquellos que mostraron polimorfismo y patrones de bandas nítidos.

3.14. Condiciones de la PCR

La amplificación del ADN se realizó mediante la técnica de PCR, con la finalidad de detectar los polimorfismos dentro y entre las poblaciones de *M. mathildae* y la población de *E. grusonii*. Para ello, se utilizó el termociclador Techne TC-512. La mezcla de reacción se realizó en un tubo Eppendorf con un volumen total de 25 µL, contemplando los siguientes componentes: 3.2 µL de agua estéril, 10 µL de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) a 500 µM, 2.5 µL de amortiguador 10X, 2.0 µL de MgCl₂ (25 mM), 3.0 µL de iniciador (10 pM), 0.3 µL de Taq ADN polimerasa (5U·µL⁻¹) termoestable cuya temperatura óptima es de 72 °C, y 4.0 µL de ADN genómico (10 ng·µL⁻¹) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Componentes y volúmenes utilizados en las reacciones de PCR.

Componente	Volumen (μL)
H₂O bidestilada	2.2
dNTPs (500 μM)	10
Amortiguador (10X)	2.5
MgCl₂ (25 mM)	2.0
Iniciador (10 pM/μL)	3.0
Enzima <i>Taq</i> ADN Polimerasa (5U·μL^{-1})	0.3
ADN genómico (10 ng /μL)	5.0
Volumen Total	25.0

Se empleó la programación siguiente: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 ° C; 30 ciclos (comprendiendo la desnaturalización, alineamiento y extensión) de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C, 2 min a 72 °C, respectivamente; y al final 1 ciclo de extensión de 10 min a 72 °C.

3.15. Elaboración de Geles

Una vez completada la reacción, se procedió a realizar la electroforesis de las muestras en geles de agarosa al 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na₂EDTA) durante 1 h a 120 V, en una unidad electroforética horizontal. La cantidad de muestra de reacción que se colocó en el gel fue de 12 μL con una gota de colorante de carga (2 μL). Finalmente, los geles

se tiñeron con bromuro de etidio ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se documentaron bajo luz UV, utilizando un documentador Kodak EDAS 290.

3.16. Análisis Estadístico de Marcadores Moleculares

Con el patrón de bandeo obtenido en los geles, se elaboró una Matriz Básica de Datos (MBD), considerando los iniciadores y transformando los datos a binarios, con valores de 0 y 1 para la ausencia y presencia de bandas, respectivamente.

Con la MBD se calculó una matriz de similitud usando el coeficiente de Jaccard y mediante el empleo del software estadístico NTSYS (Numerical Taxonomic Analysis System), Versión 2.2. Con los datos resultantes se hizo un análisis de conglomerados por el método de medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average) y los resultados se representaron en un dendrograma que consideró el índice de similitud de Jaccard, además de tomar cada accesión como una Unidad Taxonómica Operacional (OTU).

Además, para evaluar la variación genética dentro de las poblaciones se realizó un análisis mediante el programa PopGene32 (Yeh, *et al.*, 1997), con el cual se realizó un análisis intra e inter poblacional y se generó un dendrograma usando las distancias de Nei. Finalmente, se elaboraron gráficas mediante escalado multidimensional y análisis de componentes principales para determinar el ordenamiento de las poblaciones.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Germinación.

Una primera serie de experimentos de germinación fue necesaria y crucial para poder realizar experimentos posteriores, dado que con las plantas obtenidas mediante germinación *in vitro* fue posible llevar a cabo los experimentos de callo génesis, morfogénesis indirecta, enraizamiento de brotes y morfogénesis directa, así como los experimentos de biología molecular, ya que el ADN fue extraído a partir de las plantas producidas en este punto (Figura 10). Todos los tratamientos de este apartado se establecieron en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 8 % de carbón activado para prevenir la oxidación de las plantas recién germinadas.

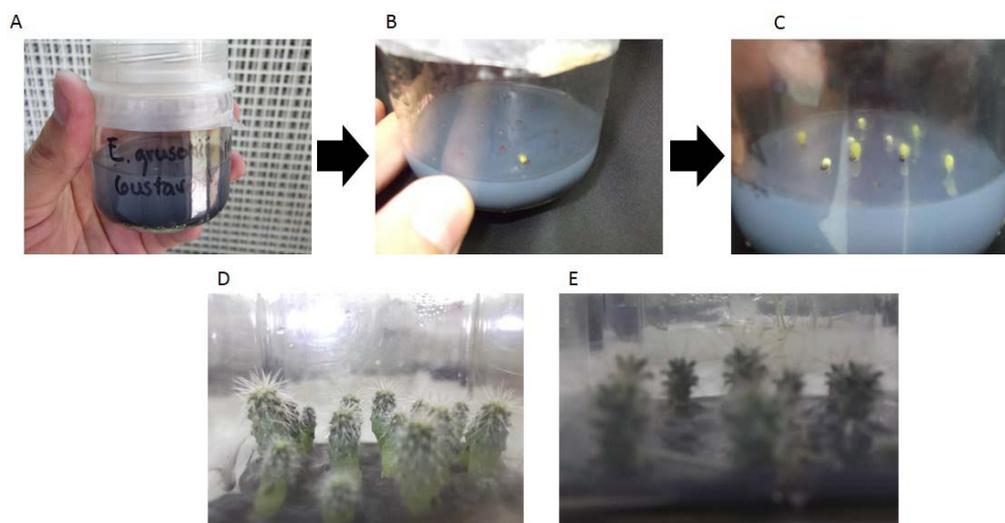


Figura 10. Proceso de siembra de semillas *in vitro* de *E. grusonii* y *M. mathildae*. (A) Las semillas se sembraron en frascos “gerber” estériles bajo condiciones

asépticas. (B) inicio de la germinación; (C) semillas totalmente germinadas y comenzando a desarrollarse; (D) plantas de 6 meses de edad de *E. grusonii*; (E) Plantas de 6 meses de edad de *M. mathildae*.

En un primer experimento de germinación de las semillas de *E. grusonii* y *M. mathildae* (Figura 11) se observó que en condiciones de medio basal (MS suplementado con carbón activado al 8 %), las semillas de *M. mathildae* alcanzaron un porcentaje de germinación de 51.66 para las semillas de la población de Cañada de Juriquilla, 60 % para las semillas de la población de Hércules y 93.55 para la población de Los Cajones en la tercera semana después de la siembra, mientras que para la sexta semana, las tres poblaciones alcanzaron promedios altos de semillas germinadas y desarrollándose: 96.66 % para la población de Hércules, 98.33 % para la población de Cañada de Juriquilla y 95 % para la población de Los Cajones. En el caso de *E. grusonii*, las semillas en medio basal germinaron solo un 13.33 % para la tercera semana después de la siembra y al final de la sexta semana, solo habían germinado el 66.67 % de las semillas sembradas (Figura 11).

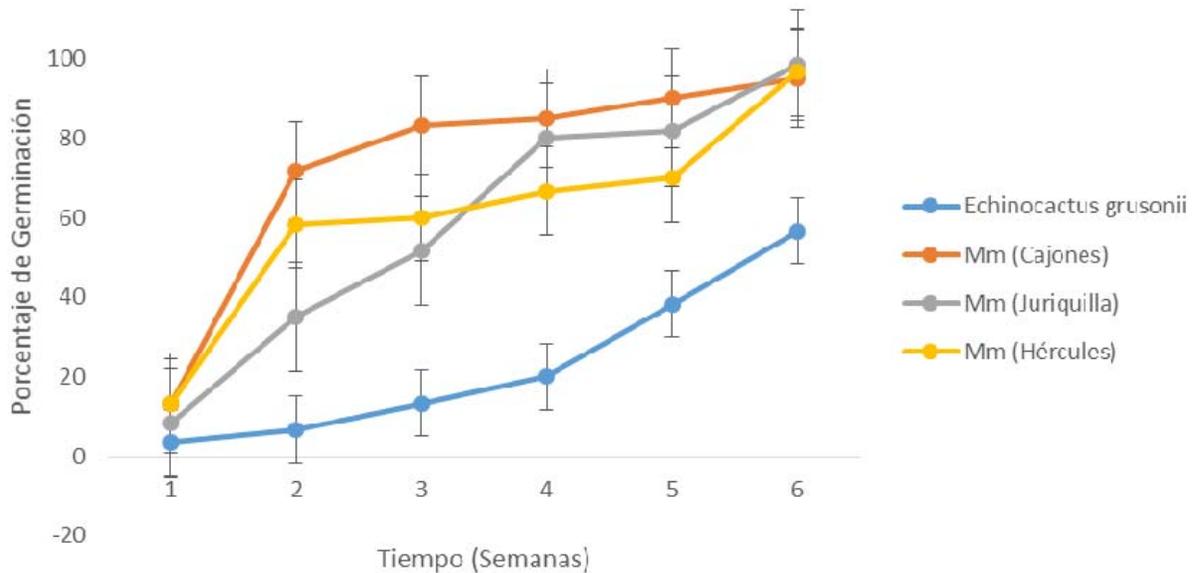


Figura 11. Pruebas de germinación en medio basal (MS complementado con carbón activado al 8 %) de semillas de *E. grusonii* y de tres poblaciones de *M. mathildae* (J= Cañada de Juriquilla, C= Los Cajones y H= Cañada de Hércules), los datos se muestran en semanas transcurridas después de la siembra de semillas.

La germinación de *M. mathildae* en condiciones naturales es de aproximadamente 40 %. En contraste, bajo condiciones *in vitro* se ha reportado que se alcanza el 91 % de germinación (García-Rubio y Malda-Barrera, 2009). Para *E. grusonii* también se han reportado niveles bajos de germinación en condiciones naturales (Rodríguez-González, 2009) y niveles de germinación *in vitro* con distintos tratamientos hasta del 90 % (Fay *et al.*, 1995).

Luego del experimento preliminar se llevó a cabo una serie de experimentos donde se evaluó el número de semillas germinadas en medio MS basal adicionado con 8% de carbón activado y sometidas previamente a tratamientos químicos con ácido clorhídrico concentrado y agua oxigenada (H₂O₂) al 9 % a diferentes tiempos. Se evaluó cada población de *M. mathildae* (Cañada de Juriquilla, Los Cajones y Cañada de Hércules) y *E. grusonii* por separado, esto con el fin de

obtener datos de cada uno de los lotes de semillas y por otro lado, mantener a las plántulas obtenidas en poblaciones separadas, que serían utilizadas en los experimentos posteriores de este trabajo. Para las semillas de las poblaciones de *M. mathildae* se evaluaron menos tratamientos que para las evaluadas de *E. grusonii* debido a la carencia de material vegetal de las poblaciones de la primera y se utilizaron solamente un tratamiento con exposición a ácido clorhídrico (6 min) y dos tratamientos con agua oxigenada (12 y 24 h) previos a la siembra de semillas.

4.1.1. Porcentaje de Germinación de semillas de *M. mathildae* con varios tratamientos de escarificación química

Los niveles de germinación para la tercera semana después de la siembra de semillas de *M. mathildae* mostraron que, como ya había reportado García Rubio y Malda-Barrera en el 2009, las semillas de *M. mathildae* no requieren de un tratamiento de escarificación previo cuando se germinan en un medio basal MS adicionado con 8 % de carbón activado, como se muestra para el tratamiento control (Figura 12).

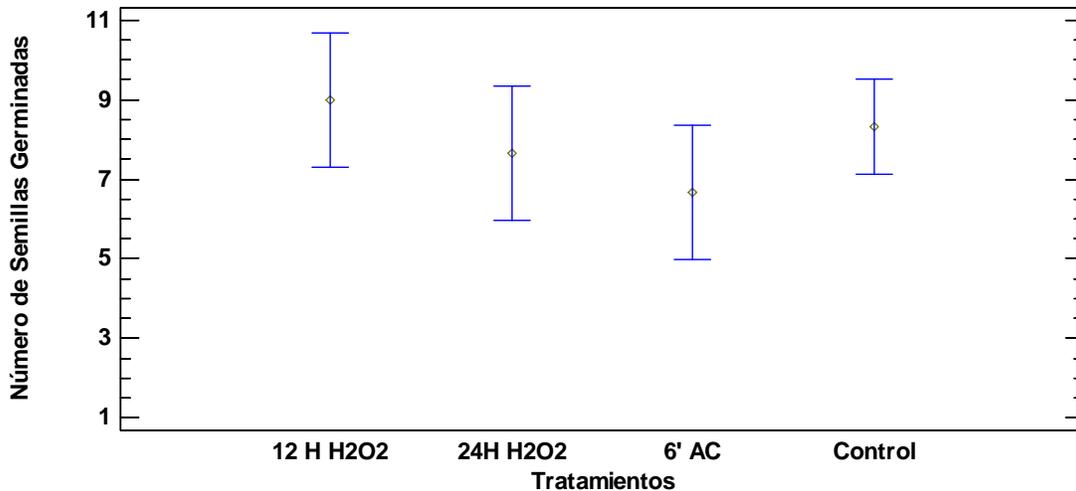


Figura 12. Número de semillas germinadas de *M. mathildae* cuantificadas a la tercera semana después de la siembra con diferentes tratamientos de escarificación química con ácido clorhídrico concentrado y agua oxigenada al 9% a diferentes tiempos.

El análisis de varianza para los valores de semillas germinadas en la tercera semana después de la siembra entre grupos y dentro de grupos mostró que a un nivel de significancia de 0.05 no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza para germinación de semillas de *M. mathildae* en la tercera semana después de la siembra en diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.33333	3	3.11111	1.66	0.2334
Intra grupos	20.6667	11	1.87879		
Total	30.0	14			

Los resultados de la comparación de medias que se muestran en el Cuadro 7 para estos experimentos mostraron que no existe diferencia significativa entre cualquier par de medias de estos datos, con un nivel de 95 % de confianza, por lo que el porcentaje de germinación no se ve afectada por estos tratamientos (ácido clorhídrico concentrado y agua oxigenada al 9 %).

Cuadro 7. Comparación de medias para germinación de semillas de *M. mathildae* a la tercera semana después de la siembra entre diferentes tratamientos.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - 6' AC	ns	1.66667	2.13325
Control - 12 H H ₂ O ₂	ns	-0.66667	2.13325
Control - 24H H ₂ O ₂	ns	0.66667	2.13325
6' AC - 12 H H ₂ O ₂	ns	-2.33333	2.46327
6' AC - 24H H ₂ O ₂	ns	-1.0	2.46327
12 H H ₂ O ₂ - 24H H ₂ O ₂	ns	1.33333	2.46327

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

De la misma manera, para *M. mathildae* se cuantificó el número de semillas germinadas al final de la semana 6 después de la siembra y los datos muestran que solo se presentó un ligero decremento en la cantidad total de semillas que germinan en el tratamiento de exposición a agua oxigenada por 24 horas previas a la siembra (Figura 13).

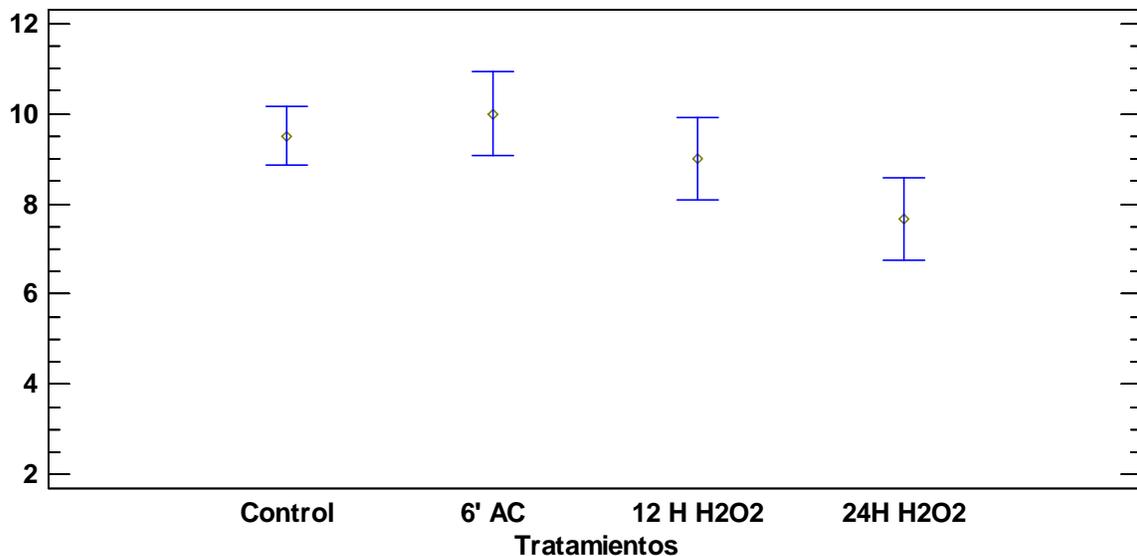


Figura 13. Número de semillas germinadas para la sexta semana de cultivo con diferentes tratamientos de escarificación para *M. mathildae*.

El análisis de varianza para los valores de semillas germinadas en la tercera semana después de la siembra entre grupos muestra que a un nivel de

significancia del 5 % si hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de varianza para germinación de semillas de *M. mathildae* a la sexta semana después de la siembra en diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.56667	3	3.18889	5.69	0.0134
Intra grupos	6.16667	1	0.560606		
Total	15.7333	4			

Los resultados de la comparación de medias que se muestran en el Cuadro 9 para estos experimentos mostró que hubo diferencias estadísticamente significativas solo entre los tratamientos control y 24 h en agua oxigenada y entre los tratamientos de 6 min en ácido clorhídrico y 24 h en agua oxigenada.

Cuadro 9. Comparación de medias de germinación de semillas de *M. mathildae* a la sexta semana después de la siembra entre diferentes tratamientos.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - 6' AC	ns	-0.5	1.16528
Control - 12 H H ₂ O ₂	ns	0.5	1.16528
Control - 24H H ₂ O ₂	*	1.83333	1.16528
6' AC - 12 H H ₂ O ₂	ns	1.0	1.34555
6' AC - 24H H ₂ O ₂	*	2.33333	1.34555
12 H H ₂ O ₂ - 24H H ₂ O ₂	ns	1.33333	1.34555

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

Estos resultados en conjunto para ambos rangos de tiempo (tres y seis semanas después de la siembra) muestran que para *M. mathildae* la mayoría de los tratamientos probados no aumentan considerablemente el porcentaje de semillas germinadas. Según los estudios de García-Rubio y Malda-Barrera (2009), la sola

germinación en condiciones control (medio MS y adición de carbón activado al 8 % como antioxidante), puede generar un incremento en la germinación en comparación con los porcentajes que se obtienen en condiciones naturales. Los datos obtenidos en la prueba múltiple de rangos solo muestran diferencia significativa entre el tratamiento control y 24 horas de exposición previa a agua oxigenada y entre el tratamiento de 6 minutos de exposición a ácido clorhídrico concentrado y el de 24 horas de exposición a agua oxigenada, lo cual sugiere que el tratamiento menos efectivo es el de tratamiento con agua oxigenada por más tiempo, esto se puede deber a que el agua oxigenada puede actuar como un radical libre, dañar tejidos e influir sobre la viabilidad de los embriones en las semillas.

4.1.2. Porcentaje de germinación de semillas de *E. grusonii* bajo tratamientos de escarificación química

En el caso de *E. grusonii*, los experimentos revelaron que se alcanzó un porcentaje de germinación de 90 % para la tercera semana de cultivo, con el tratamiento de 3 minutos de exposición previa a la siembra con agua oxigenada (H_2O_2), que fue el mejor tratamiento para esta planta, aunque los tratamientos de 6 y 12 minutos también promovieron un incremento en el porcentaje de germinación. Los tiempos más prolongados (24 horas con agua oxigenada al 9 %) no incrementan el porcentaje de germinación. Los tratamientos con ácido clorhídrico concentrado de 1, 1.5 y 3 minutos de exposición no tienen efecto en el porcentaje de germinación y a tiempos de exposición más altos (6 y 12 minutos) se comienza a tener efectos adversos sobre el porcentaje de germinación (Figura 14).

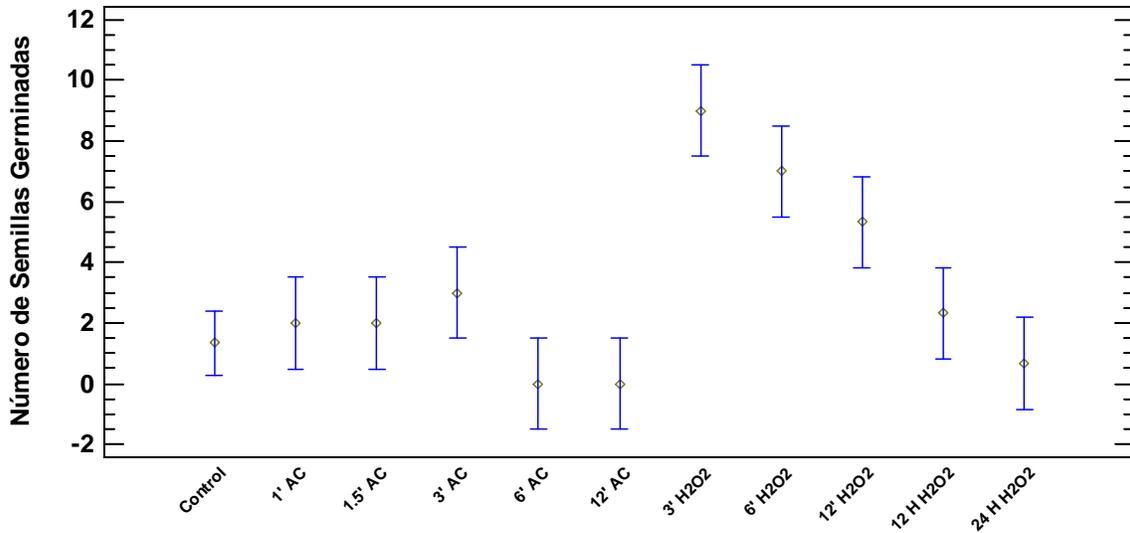


Figura 14. Número de semillas germinadas para la tercera semana de cultivo con diferentes tratamientos de escarificación para *E. grusonii*.

El análisis de varianza (Cuadro 10) mostró que la razón F para este grupo de experimentos es igual a 24.30, que resulta de dividir el cuadrado medio estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Dado que el valor P de la prueba F es menor que 0.05 (en este caso es 0), existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias del número de semillas germinadas de *E. grusonii* a la semana 3 después de la siembra entre los tratamientos evaluados con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro 10. Análisis de varianza para germinación de semillas de *E. grusonii* a la tercera semana después de la siembra con diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	265.667	10	26.5667	24.30	0.0000
Intra grupos	27.3333	25	1.09333		
Total	293.0	35			

Para determinar qué tratamientos son estadísticamente significativos en comparación con el control se llevó a cabo una comparación de medias (Cuadro

11) y los resultados indican que existe una diferencia significativa entre el control y el tratamiento de tres minutos de exposición a ácido clorhídrico concentrado, donde este último incrementa ligeramente el número de semillas germinadas. Los otros tratamientos con ácido clorhídrico concentrado no mostraron diferencia significativa con respecto al control. Los tratamientos con agua oxigenada al 9 % son más efectivos a tiempos cortos de exposición (3, 6 y 12 minutos), pero los tratamientos con tiempos más prolongados (12 y 24 horas) ya no muestran diferencia significativa con respecto al control.

Cuadro 11. Comparación de las medias de germinación de semillas de *E. grusonii* a la tercera semana después de la siembra.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - 1' AC	ns	-0.666667	1.52276
Control - 1.5' AC	ns	-0.666667	1.52276
Control - 3' AC	*	-1.66667	1.52276
Control - 6' AC	ns	1.33333	1.52276
Control - 12' AC	ns	1.33333	1.52276
Control - 3' H ₂ O ₂	*	-7.66667	1.52276
Control - 6' H ₂ O ₂	*	-5.66667	1.52276
Control - 12' H ₂ O ₂	*	-4.0	1.52276
Control - 12 H H ₂ O ₂	ns	-1.0	1.52276
Control - 24 H H ₂ O ₂	ns	0.666667	1.52276

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

Se evaluó, de la misma manera el número de semillas germinadas por semana al final de la semana seis después de la siembra. En este caso se obtuvo que los tratamientos de escarificación con tiempos de exposición bajos a agua oxigenada previos a la siembra (3 y 6 minutos) muestran diferencias significativas. También los tratamientos con tiempos bajos de exposición (3 minutos) previo a la siembra con ácido clorhídrico concentrado mostraron diferencias significativas con respecto al control, pero entre los tratamientos que mostraron aumento en el número de

semillas germinadas (1, 1.5 y 3 minutos de exposición previa a ácido clorhídrico concentrado) y a agua oxigenada (3 y 6 minutos) no existen diferencias significativas (Figura 15).

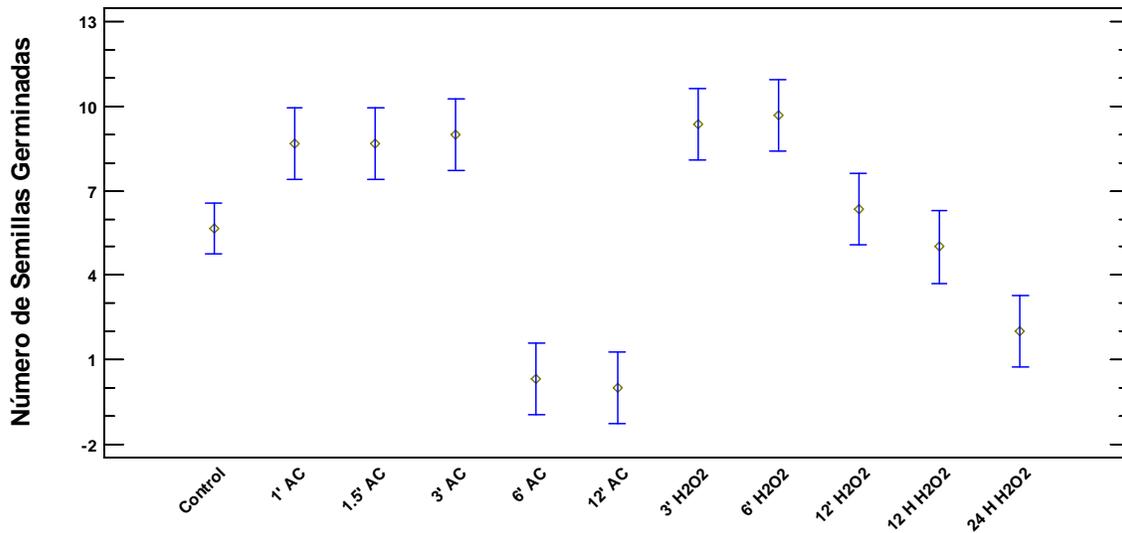


Figura 15. Número de semillas germinadas para la sexta semana de cultivo con diferentes tratamientos de escarificación para *E. grusonii*.

El análisis de varianza para este grupo de experimentos mostró que la razón F tiene un valor igual a 51.59 y el valor P de la prueba F es menor a 0.05, lo que sugiere la existencia de diferencias estadísticamente significativas para las medias del número de semillas germinadas en la semana 6 entre tratamientos, con un nivel de confianza de 95 % (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de varianza para germinación de semillas de *E. grusonii* a la tercera semana después de la siembra con diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	398.972	10	39.8972	51.59	0.0000
Intra grupos	19.3333	25	0.773333		
Total	418.306	35			

Se llevó a cabo luego una prueba de comparación de medias y este análisis mostró que existe diferencia significativa entre el control y todos los tratamientos con ácido clorhídrico concentrado y entre el control y los tratamientos de 3 y 6 minutos y 24 horas de exposición a agua oxigenada, pero no para los tratamientos de 12 minutos y 12 horas con este químico (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de las medias de germinación de semillas de *E. grusonii* a la sexta semana después de la siembra.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - 1' AC	*	-3.0	2.19571
Control - 1.5' AC	*	-3.0	2.19571
Control - 3' AC	*	-3.33333	2.19571
Control - 6' AC	*	5.33333	2.19571
Control - 12' AC	*	5.66667	2.19571
Control - 3' H ₂ O ₂	*	-3.66667	2.19571
Control - 6' H ₂ O ₂	*	-4.0	2.19571
Control - 12' H ₂ O ₂	ns	-0.66667	2.19571
Control - 12 H H ₂ O ₂	ns	0.66667	2.19571
Control - 24 H H ₂ O ₂	*	3.66667	2.19571

* = diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha= 0.05$.

Los tratamientos con 3 y 6 minutos con agua oxigenada, así como los tratamientos de 1, 1.5 y 3 minutos con ácido clorhídrico concentrado aumentan el número de semillas germinadas en comparación al control, mientras que los tratamientos más agresivos (a tiempos más altos) tales como 6 y 12 minutos de exposición a ácido clorhídrico y 24 horas con agua oxigenada al 9 % reducen el porcentaje de germinación, lo que puede deberse a que estos tratamientos dañan a los embriones de las semillas, lo que reduce su viabilidad.

4.2. Aclimatación.

Las características anatómicas y fisiológicas de las plantas propagadas hacen necesaria para su supervivencia en condiciones *ex vitro* una gradual adaptación o

aclimatación a las condiciones medioambientales del invernadero o del campo al cual son transferidas. Grout y Aston (1977) observaron cómo tras la micropropagación *in vitro* de sus plantas, la zona de transición entre la raíz y el tallo era anormal, observando conexiones vasculares débiles y malformadas, lo que producía problemas en la absorción y circulación del agua desde las raíces al tallo. En otras ocasiones, el problema estriba en que las raíces que crecen en agar son defectuosas, carecen de pelos radicales y suelen necrosarse durante el trasplante, lo que provoca que el crecimiento de la planta se detenga momentáneamente (Deberg y Maene, 1981). En la fase de aclimatación se pretende que las plantas que han crecido *in vitro* en un microambiente sin estrés y condiciones cuasi óptimas, se adapten luego a condiciones *ex vitro* donde las condiciones no son asépticas, donde ni la luz, ni la temperatura y humedad están controladas, el crecimiento en esta nueva etapa de las plantas es autotrófico y no heterotrófico como en condiciones *in vitro*, para completar el proceso de micropropagación.

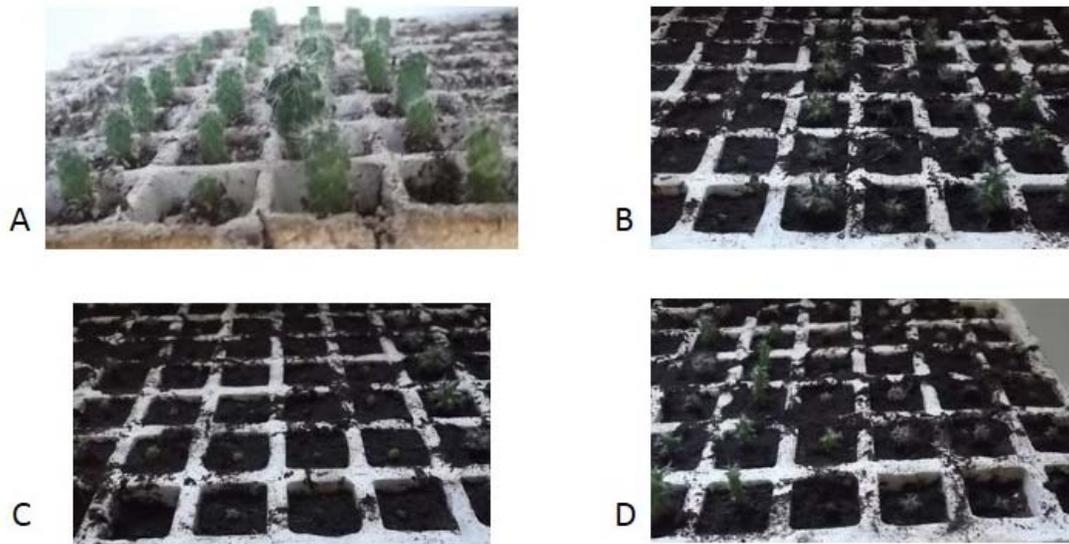


Figura 16. Plantas provenientes de micropropagación *in vitro* transferidas a sustrato “peat moss” para aclimatación. (A) *Echinocactus grusonii*; (B) *Mammillaria mathildae* (Los Cajones); (C) *Mammillaria mathildae* (Cañada de Juriquilla) y (D) *Mammillaria mathildae* (Cañada de Hércules).

Las plantas obtenidas del cultivo *in vitro* fueron transferidas a suelo (Figura 16) (condiciones *ex vitro*) utilizando el sustrato “peat moss” en condiciones controladas de invernadero. De estas plantas se obtuvo que para las 2 especies estudiadas, el promedio general de plantas aclimatadas, sanas y en crecimiento fue de 93.50 a 98.74 % (Cuadro 14), lo cual representa un valor bastante aceptable dada la gran capacidad de las cactáceas para sobrevivir y adaptarse de un medio a otro.

Cuadro 14. Promedio general en por ciento y desviación estándar de las plantas de *E. grusonii* y *M. mathildae*. El promedio general corresponde a tres repeticiones de al menos 30 individuos cada una.

Especie	(%) Prom.	Desv. Estándar
<i>E. grusonii</i>	98.17	0.76
<i>M. mathildae</i> (Cajones)	93.50	1.39
<i>M. mathildae</i> (Juriquilla)	98.41	1.50
<i>M. mathildae</i> (Hércules)	98.74	0.44

4.3. Callogénesis

A partir de las plantas obtenidas por germinación de semillas en cultivo *in vitro*, como se señaló en el apartado de Materiales y Métodos, se seleccionaron plantas de *E. grusonii* y *M. mathildae* para inducir la formación de callos utilizando concentraciones diferentes de ANA, BA y 2,4-D en concentraciones de 0.25 y 0.5 mg·L⁻¹, así como combinaciones diferentes de las distintas concentraciones de la manera siguiente: ANA/BA (0.25/0.25; 0.25/0.5; 0.5/0.25 y 0.5/0.5) y las combinaciones de 2,4-D:BA (0.25/0.25; 0.25/0.5; 0.5/0.25 y 0.5/0.5). Los callos obtenidos fueron todos de consistencia friable y de color verde en todas las concentraciones (Figura 17).

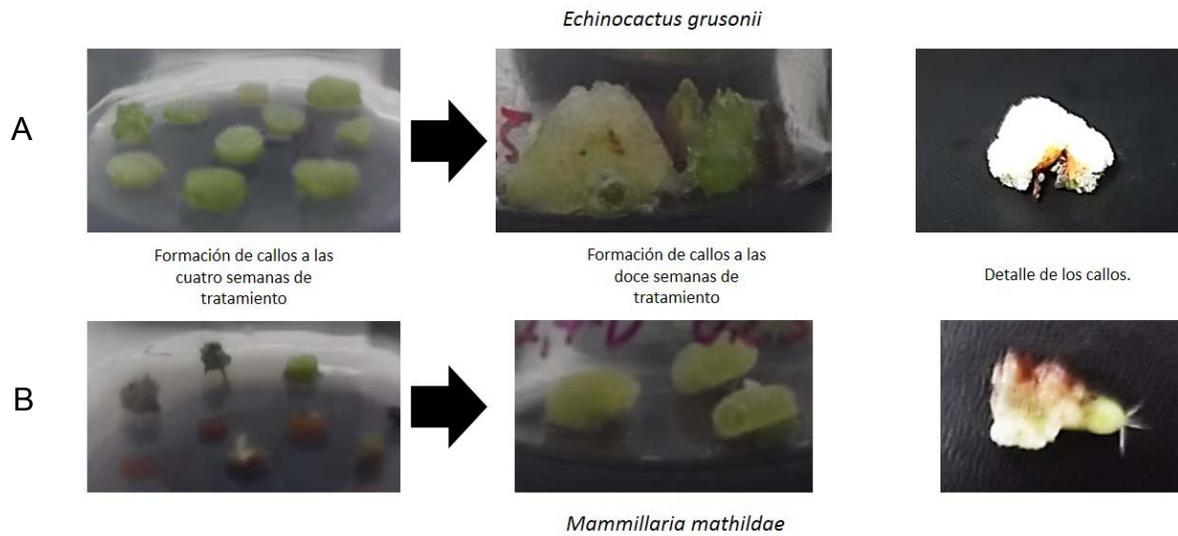


Figura 17. Formación de callos a partir de explantes provenientes de plantas sembradas *in vitro* de (A) *E. grusonii* y (B) *M. mathildae* después de cuatro y doce semanas posterior al cultivo.

Para conocer cual o cuales eran los mejores tratamientos se contabilizó el número de callos por repetición (tres repeticiones de cada uno de los tratamientos) y para explantes de *E. grusonii*, los resultados se muestran en la Figura 18.

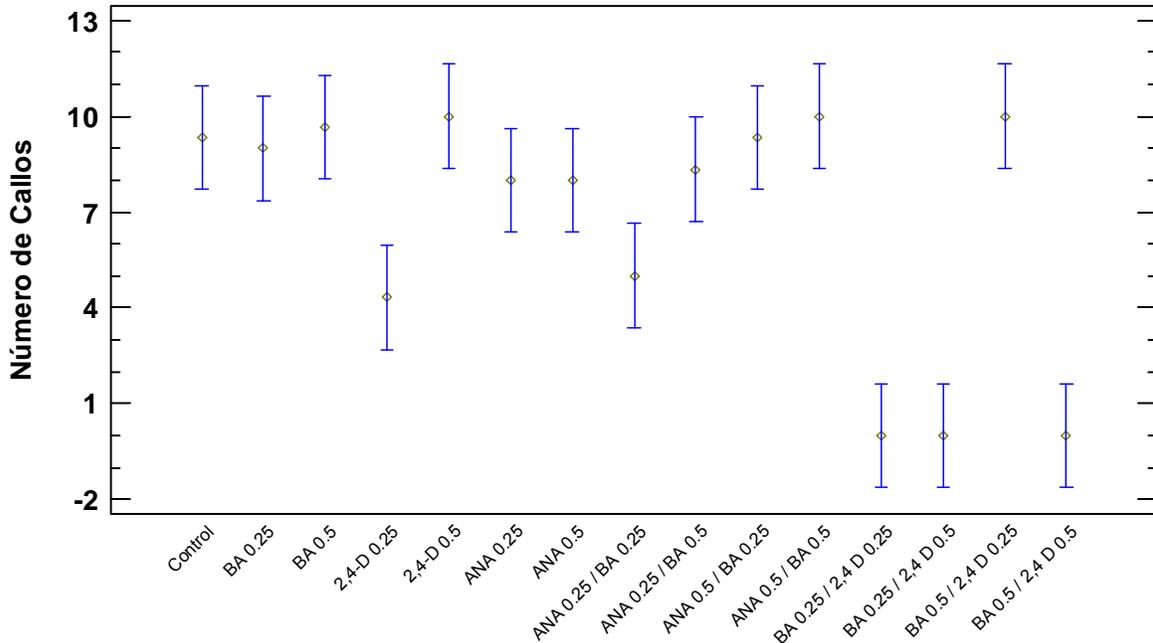


Figura 18. Número de callos por tratamiento para formación de callos *en E. grusonii*.

En el Cuadro de análisis de varianza (Cuadro 15) se descompone la varianza de número de callos entre grupos y dentro de los grupos, la razón F, que en este caso es igual a 38.1752, es el cociente del estimado entre grupos y el estimado dentro de los grupos. Puesto que el valor P de la prueba es menor que 0.05, existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias del número de callos entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel de 95 % de confianza.

Cuadro 15. Análisis de varianza para número de callos por explante de *E. grusonii*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	629.467	14	44.9619	38.18	0.0000
Intra grupos	35.3333	30	1.17778		
Total	664.8	44			

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó una comparación de medias (Cuadro 16), en la que se observan diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos y combinaciones de tratamientos que no mostraron efecto, lo cual sugiere que la respuesta de formación de callos en *E. grusonii* es independiente de los tratamientos utilizados en estos experimentos. En otras palabras, para la inducción de callo génesis en *E. grusonii* no se requiere la adición de reguladores de crecimiento pues se forman de manera espontánea en el medio basal.

Cuadro 16. Comparación de las medias de control contra los tratamientos utilizados para inducir callo génesis en *E. grusonii*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ANA 0.25	ns	1.33333	3.26568
Control - ANA 0.5	ns	1.33333	3.26568
Control - 2,4-D 0.25	*	5.0	3.26568
Control - 2,4-D 0.5	ns	-0.666667	3.26568
Control - BA 0.25	ns	0.333333	3.26568
Control - BA 0.5	ns	-0.333333	3.26568
Control - ANA 0.25 / BA 0.25	*	4.33333	3.26568
Control - ANA 0.25 / BA 0.5	ns	1.0	3.26568
Control - ANA 0.5 / BA 0.25	ns	0	3.26568
Control - ANA 0.5 / BA 0.5	ns	-0.666667	3.26568
Control - BA 0.25 / 2,4 D 0.25	*	9.33333	3.26568
Control - BA 0.25 / 2,4 D 0.5	*	9.33333	3.26568
Control - BA 0.5 / 2,4 D 0.25	ns	-0.666667	3.26568
Control - BA 0.5 / 2,4 D 0.5	*	9.33333	3.26568

* = diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha = 0.05$.

En el caso de *M. mathildae*, los datos se comportaron despuntando algunos tratamientos de manera similar a *E. grusonii* (Figura 19), en la cual casi todos los tratamientos tuvieron respuesta de callogénesis, a excepción de uno con 0.25 mg·L⁻¹ de BA y 0.25 mg·L⁻¹ de 2,4-D, lo cual demuestra que al igual que para *E. grusonii*, no existe una correlación entre los tratamientos utilizados y la formación

de callos ya que el control generó la misma cantidad de callos que los tratamientos con hormonas.

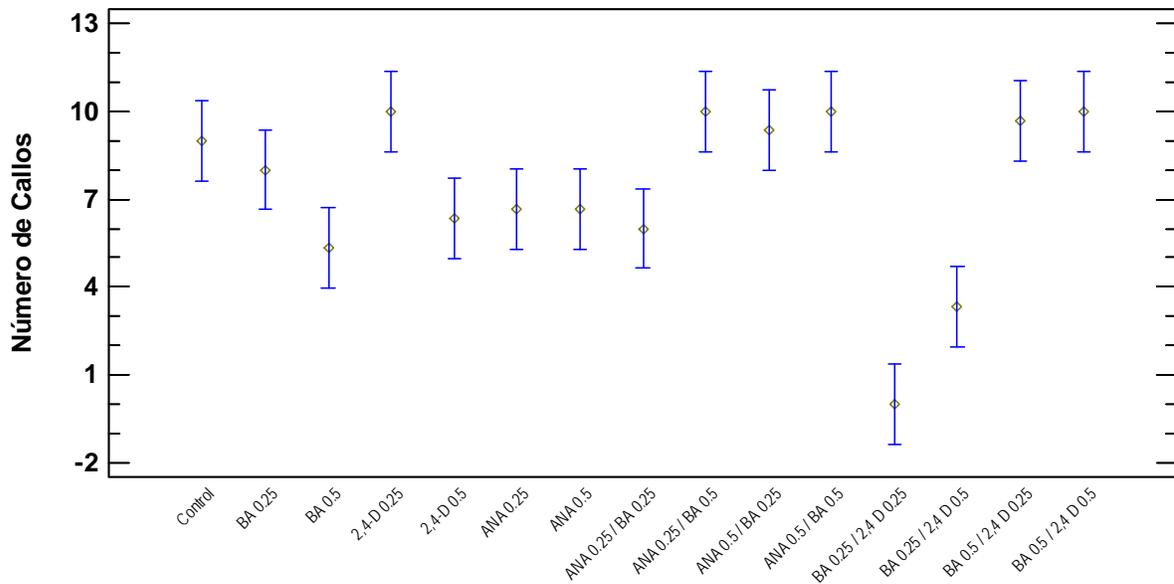


Figura 19. Número de callos por tratamiento para formación de callos en *M. mathildae*.

Dado que hubo varios tratamientos con un número elevado de formación de callos, se llevó a cabo una prueba múltiple de rangos para los dos grupos de datos (*E. grusonii* y *M. mathildae*) y los resultados muestran que no hubo diferencias significativas que marque de manera concluyente una tendencia para señalar el mejor tratamiento, aunque de manera cualitativa, los callos generados por tratamientos (BA, ANA y 2,4-D solos) resultaron ser más saludables y con mayor diámetro (de 3 a 4 cm) mientras que los callos en combinaciones (ANA:BA y BA:2,4-D) fueron los más pequeños (0.3 a 1 cm) y menos saludables, por lo que posteriormente se seleccionó a los callos provenientes de las concentraciones de tratamientos solos para inducir morfogénesis indirecta. El cuadro de análisis de varianza mostró que existe una diferencia significativa entre la media de número

de callos entre un nivel de tratamientos para *M. mathildae* y otro, con un nivel de 95 % de confianza (Cuadro 17).

Cuadro 17. Análisis de varianza para formación de callos a partir de explantes de *M. mathildae* con varios tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	355.644	14	25.4032	30.90	0.0000
Intra grupos	24.6667	30	0.822222		
Total	380.311	44			

Para determinar entre qué medias había diferencias estadísticamente significativas, se llevó a cabo una comparación de medias, y encontró que entre los tratamientos analizados que generaron respuesta y el control no existen diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 18. Comparación de medias para formación de callos en *M. mathildae* de los tratamientos contra el control.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - BA 0.25	ns	1.0	2.72858
Control - BA 0.5	*	3.66667	2.72858
Control - 2,4-D 0.25	ns	-1.0	2.72858
Control - ANA 0.25	ns	2.33333	2.72858
Control - ANA 0.5	ns	2.33333	2.72858
Control - 2,4-D 0.5	ns	2.66667	2.72858
Control - ANA 0.25 / BA 0.25	*	3.0	2.72858
Control - ANA 0.25 / BA 0.5	ns	-1.0	2.72858
Control - ANA 0.5 / BA 0.25	ns	-0.333333	2.72858
Control - ANA 0.5 / BA 0.5	ns	-1.0	2.72858
Control - BA 0.25 / 2,4 D 0.25	*	9.0	2.72858
Control - BA 0.25 / 2,4 D 0.5	*	5.66667	2.72858
Control - BA 0.5 / 2,4 D 0.25	ns	-0.666667	2.72858
Control - BA 0.5 / 2,4 D 0.5	ns	-1.0	2.72858

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.0$

Es importante recalcar que se observó formación de callos espontáneos, es decir, en algunos casos, los explantes generaron callos sin ningún tratamiento hormonal

específico. En esta serie de experimentos se observó que con el tratamiento control hubo formación de callos, así como en los tratamientos con hormonas, lo cual sugiere que la formación de callos en estas dos cactáceas es independiente de la adición de fitohormonas y sucede cuando las condiciones ambientales son aptas para la formación de estos, ya sea por cultivo de areolas, cultivo de segmentos longitudinales de tejidos, o en algunos casos, de manera espontánea durante el cultivo *in vitro*, lo anterior ya había sido notado por otro grupo de trabajo de esta Universidad (Rodríguez de la O, comunicación personal) en las que en condiciones control, explantes de cactáceas generaban callos de manera espontánea.

4.4. Morfogénesis indirecta

Los callos obtenidos a partir del paso anterior con los tratamientos de 0.25 y 0.5 mg·L⁻¹ de ANA, BA y 2,4-D sin combinaciones de hormonas fueron resembrados en tratamientos con zeatina en concentraciones de 0.3, 0.7 y 1.0 mg·L⁻¹, los callos generados mediante tratamientos de combinaciones de hormonas (ANA:BA y 2,4-D:BA) fueron descartados ya que mostraron menor tamaño y calidad. Los brotes obtenidos a partir de los tratamientos fueron contabilizados.

4.4.1. Morfogénesis indirecta en explantes de *Echinocactus grusonii*

Para el caso de *E. grusonii* la mayor cantidad de brotes se obtuvo con los callos provenientes de los tratamientos con 0.25 mg·L⁻¹ de BA, tratados con 1.0 mg·L⁻¹ de zeatina con un promedio de 2.8 brotes por explante (Figura 20).

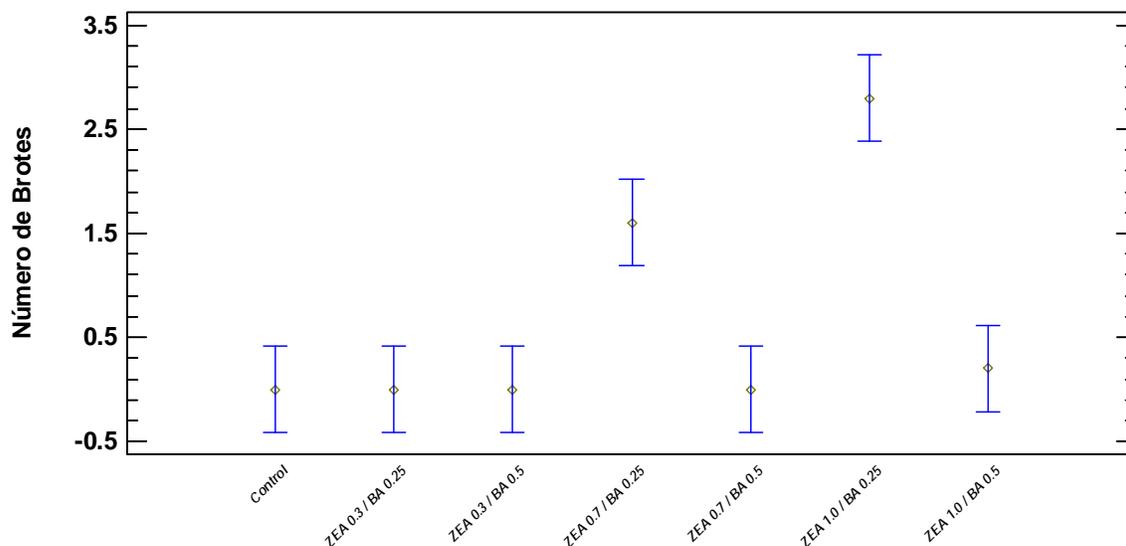


Figura 20. Número de brotes obtenidos con callos de *E. grusonii* provenientes de los tratamientos con BA y posteriormente transferidos a medio MS suplementado con Zeatina.

Se llevó a cabo un análisis de varianza para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias y dado que el valor P de la prueba F es menor que 0.05, concluimos que sí existen diferencias entre las medias de número de brotes entre los tratamientos, con un nivel de confianza del 95% (Cuadro 19).

Cuadro 19. Análisis de varianza para formación de brotes con diferentes tratamientos de Zeatina a partir de callos generados con BA de *E. grusonii*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	37.0857	6	6.18095	36.06	0.0000
Intra grupos	4.8	28	0.171429		
Total	41.8857	34			

La comparación de medias mostró que entre los tratamientos y el control existe diferencia estadísticamente significativa. Hubo diferencias entre el control y el

tratamiento de callos provenientes de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y transferidos a medio MS con 0.7 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina (Cuadro 20), siendo el mejor tratamiento el segundo con un promedio de 2.8 brotes generados por callo.

Cuadro 20. Comparación de medias entre el control y los diferentes tratamientos de callos de *E. grusonii* provenientes de BA y tratados con diferentes concentraciones de zeatina.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ZEA 0.3 / BA 0.25	ns	0	0.830792
Control - ZEA 0.3 / BA 0.5	ns	0	0.830792
Control - ZEA 0.7 / BA 0.25	*	-1.6	0.830792
Control - ZEA 0.7 / BA 0.5	ns	0	0.830792
Control - ZEA 1.0 / BA 0.25	*	-2.8	0.830792
Control - ZEA 1.0 / BA 0.5	ns	-0.2	0.830792

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

En el caso de callos de *E. grusonii* provenientes de tratamientos con ANA, se observa que el mejor resultado se obtuvo con callos obtenidos con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA y transferidos a medio MS adicionado con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina, que dio un promedio de 4.0 brotes por callo (Figura 21).

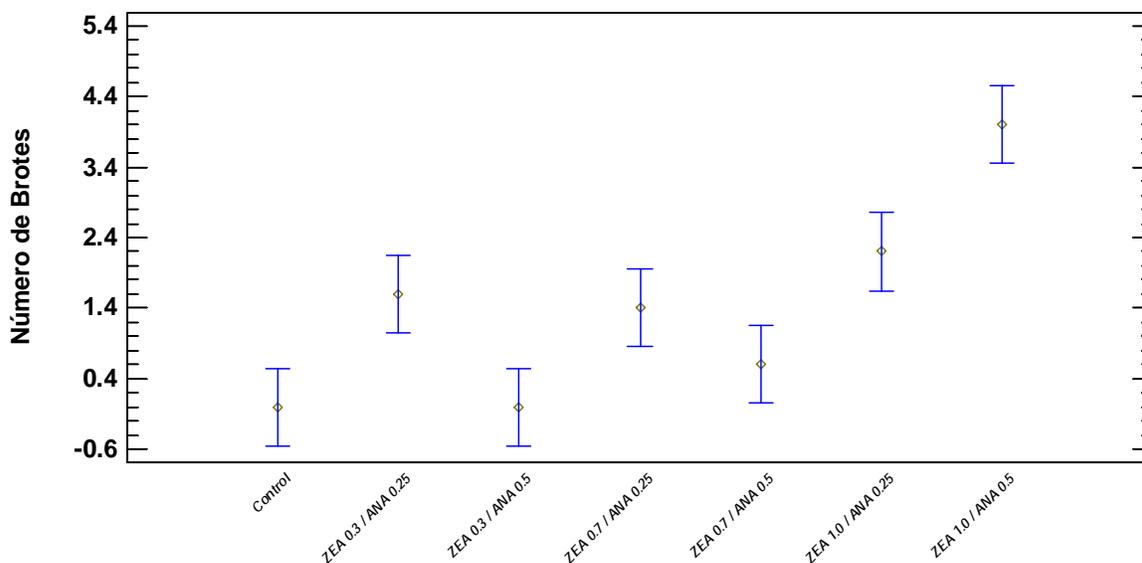


Figura 21. Número de brotes obtenidos con callos de *E. grusonii* provenientes de tratamiento con ANA, y transferidos a medio MS con diferentes concentraciones de Zeatina.

Para comprobar lo anterior, se llevó a cabo un análisis de varianza (Cuadro 21), en el cual se muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de número de brotes entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro 21. Análisis de varianza para formación de brotes con diferentes concentraciones de zeatina a partir de callos de *E. grusonii* provenientes de tratamientos con ANA.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	60.0	6	10.0	33.33	0.0000
Intra grupos	8.4	28	0.3		
Total	68.4	34			

Para determinar entre que tratamiento de zeatina y el control existe diferencia significativa se realizó una comparación de medias (Cuadro 22). En la que se

muestra que el mejor tratamiento fue cuando se usaron callos provenientes del tratamiento con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA y luego cultivados en $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina.

Cuadro 22. Comparación de medias para formación de brotes con diferentes concentraciones de zeatina a partir de callos de *e. grusonii* provenientes de tratamiento con ANA.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ZEA 0.3 / ANA 0.25	*	-1.6	0.709591
Control - ZEA 0.3 / ANA 0.5	ns	0	0.709591
Control - ZEA 0.7 / ANA 0.25	*	-1.4	0.709591
Control - ZEA 0.7 / ANA 0.5	ns	-0.6	0.709591
Control - ZEA 1.0 / ANA 0.25	*	-2.2	0.709591
Control - ZEA 1.0 / ANA 0.5	*	-4.0	0.709591

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

En el caso de callos de *E. grusonii* provenientes del tratamiento con 2,4-D, se observó que el mejor resultado se obtuvo usando callos provenientes de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA y transferidos a medio MS adicionado con $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina, que generó un promedio de 2.6 callos por callo (Figura 22).

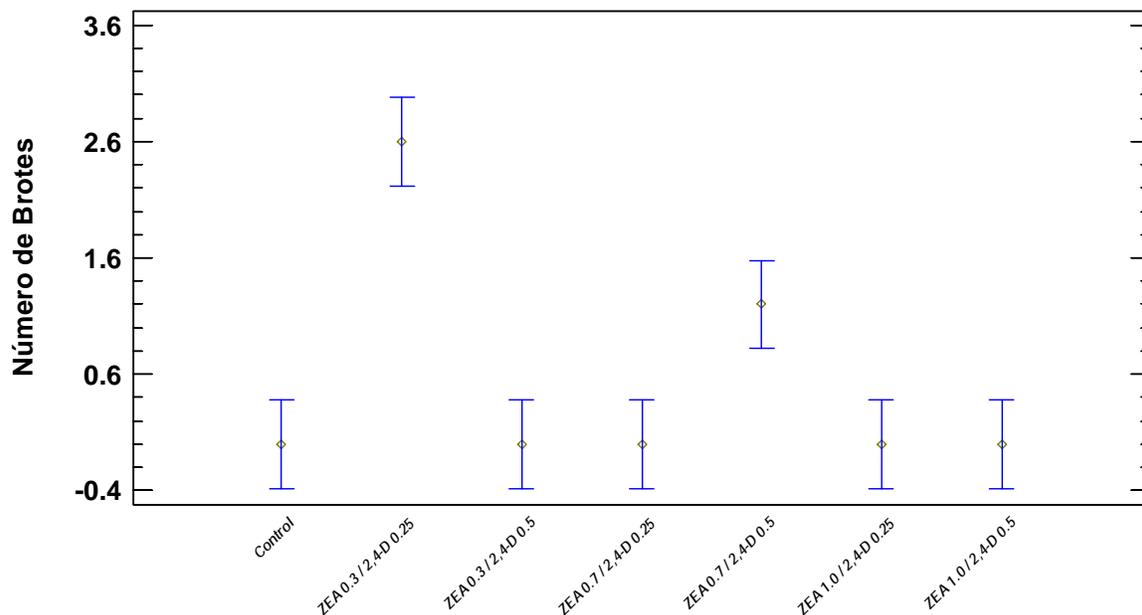


Figura 22. Número de brotes obtenidos con callos de *E. grusonii* provenientes de tratamiento con 2,4-D y transferidos a medio MS con diferentes concentraciones de zeatina.

El análisis de varianza (Cuadro 23) para estos resultados mostró que dado que el valor P de la prueba F es menor que 0.05, existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de número de brotes entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel de confianza de 95 %.

Cuadro 23. Análisis de varianza para brotes obtenidos de callos de *E. grusonii* obtenidos a partir de tratamientos con 2,4-D y tratados con diferentes concentraciones de zeatina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	30.6857	6	5.11429	35.80	0.0000
Intra grupos	4.0	28	0.142857		
Total	34.6857	34			

Para determinar que medias son significativamente diferentes se llevó a cabo una comparación de medias, en la cual se muestra que dos tratamientos son estadísticamente diferentes: el de brotes obtenidos con callos generados en medio con $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y tratados con $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina, así como el de brotes obtenidos con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y tratados con $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina, siendo el mejor tratamiento el primero (Cuadro 24).

Cuadro 24. Comparación de medias entre el control y los diferentes tratamientos de callos de *E. grusonii* provenientes de 2,4-D y tratados con diferentes concentraciones de zeatina.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ZEA 0.3 / 2,4-D 0.25	*	-2.6	0.758406
Control - ZEA 0.3 / 2,4-D 0.5	ns	0	0.758406
Control - ZEA 0.7 / 2,4-D 0.25	ns	0	0.758406
Control - ZEA 0.7 / 2,4-D 0.5	*	-1.2	0.758406
Control - ZEA 1.0 / 2,4-D 0.25	ns	0	0.758406
Control - ZEA 1.0 / 2,4-D 0.5	ns	0	0.758406

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

De los resultados anteriores se consideraron los mejores tratamientos para generar brotes y en la Figura 23 se observa que de tres mejores tratamientos, ninguno mostró ser mejor que el otro, aunque el número promedio de brotes obtenidos con callos formados en $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y tratados luego con $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina fue mayor.

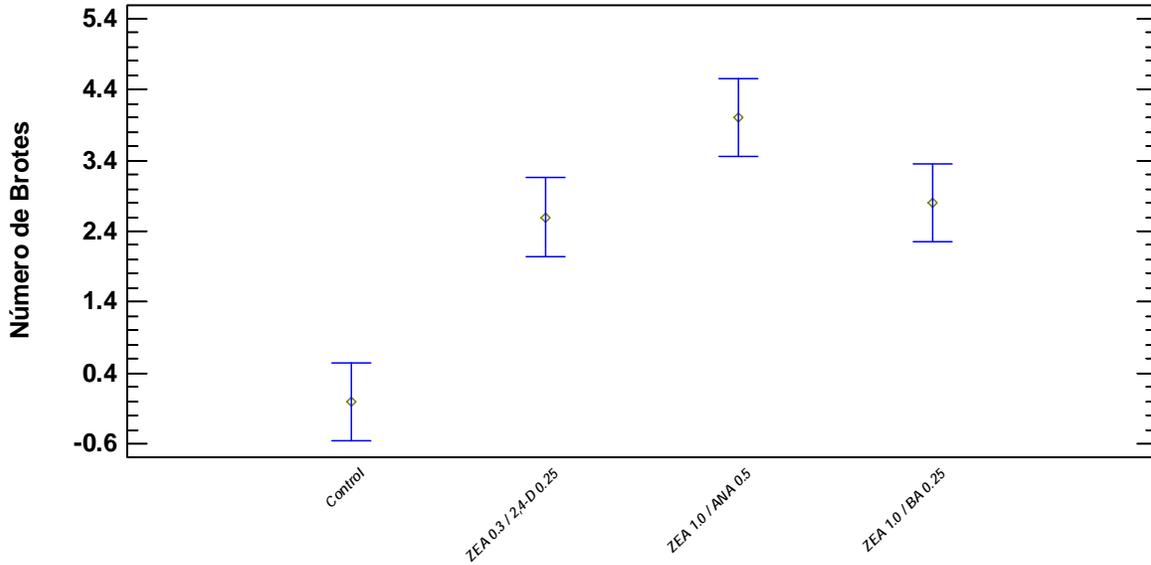


Figura 23. Mejores tratamientos para formar brotes a partir de callos de *E. grusonii*.

El análisis de varianza para estos datos (Cuadro 25) mostró que hay diferencias significativas entre las medias de número de brotes entre tratamientos, con un nivel de confianza de 95 %.

Cuadro 25. Análisis de varianza para los mejores tratamientos para formación de brotes a partir de callos de *E. grusonii*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	42.55	3	14.1833	37.82	0.0000
Intra grupos	6.0	16	0.375		
Total	48.55	19			

Para corroborar lo anterior, se llevó a cabo una comparación de medias y esta indicó diferencias significativas entre los tratamientos, el análisis mostró que existe diferencia significativa entre los tres mejores tratamientos y el control, pero el mejor tratamiento para *E. grusonii* consiste en usar callos provenientes del

tratamiento con ANA 0.5 mg·L⁻¹ y tratados con 1.0 mg·L⁻¹ de zeatina, con 4 brotes por explante en promedio (Cuadro 26).

Cuadro 26. Comparación de medias para número de brotes en los tres mejores tratamientos para *E. grusonii*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ZEA 0.3 / 2,4-D 0.25	*	-2.6	1.10858
Control - ZEA 1.0 / ANA 0.5	*	-4.0	1.10858
Control - ZEA 1.0 / BA 0.25	*	-2.8	1.10858
ZEA 0.3 / 2,4-D 0.25 - ZEA 1.0 / ANA 0.5	*	-1.4	1.10858
ZEA 0.3 / 2,4-D 0.25 - ZEA 1.0 / BA 0.25	ns	-0.2	1.10858
ZEA 1.0 / ANA 0.5 - ZEA 1.0 / BA 0.25	*	1.2	1.10858

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

4.4.2. Morfogénesis indirecta en explantes de *Mammillaria mathildae*

De la misma manera que para *E. grusonii*, para *M. mathildae* primero se analizaron los datos de formación de brotes a partir de callos generados con diferentes tratamientos de BA. Se observó que el mejor tratamiento fue el de callos provenientes de 0.25 mg·L⁻¹ de BA y transferidos a medio MS con 0.7 mg·L⁻¹ de zeatina ya que se generaron 3.4 brotes en promedio (Figura 24).

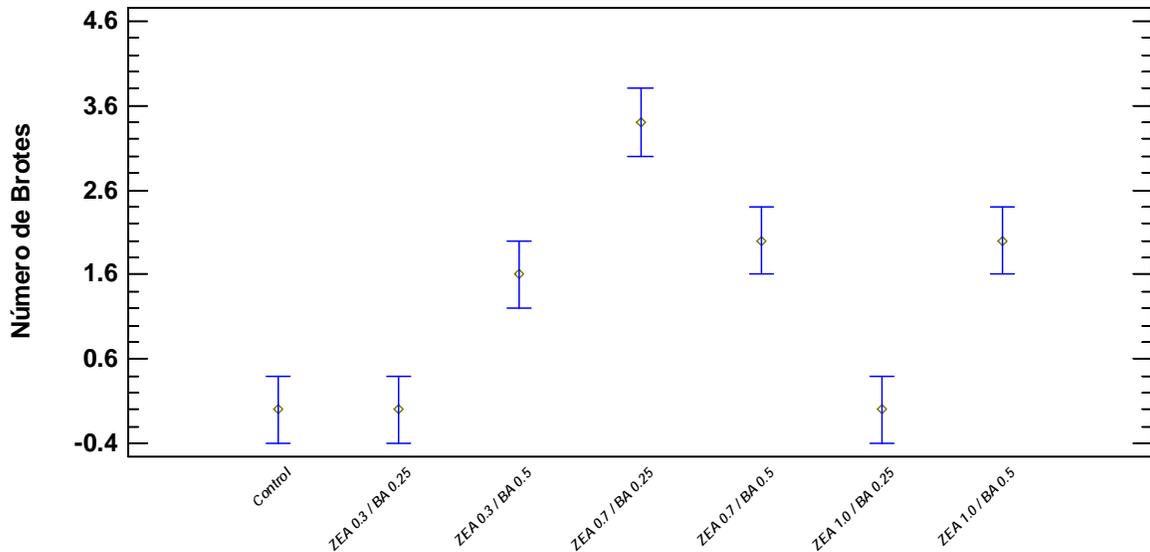


Figura 24. Número de brotes obtenidos con callos de *M. mathildae* provenientes de los tratamientos con BA y posteriormente transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina.

El análisis de varianza mostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de número de brotes entre un nivel de tratamiento y otro con un nivel de 95 % de confianza (Cuadro 27)

Cuadro 27. Análisis de varianza para callos de *M. mathildae* provenientes de tratamientos con BA y transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	52.7429	6	8.79048	55.94	0.0000
Intra grupos	4.4	28	0.157143		
Total	57.1429	34			

Para establecer entre qué grupos de medias existen diferencias se realizó una comparación de medias, misma que mostró que hay cuatro tratamientos que

muestran diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (Cuadro 28).

Cuadro 28. Comparación de medias para para número de brotes en *M. mathildae* con callos obtenidos con tratamiento de BA y transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ZEA 0.3 / BA 0.25		0	0.795423
Control - ZEA 0.3 / BA 0.5	*	-1.6	0.795423
Control - ZEA 0.7 / BA 0.25	*	-3.4	0.795423
Control - ZEA 0.7 / BA 0.5	*	-2.0	0.795423
Control - ZEA 1.0 / BA 0.25	ns	0	0.795423
Control - ZEA 1.0 / BA 0.5	*	-2.0	0.795423

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

Los callos generados a partir del tratamiento con ANA mostraron que solo un tratamiento fue efectivo para esta especie: callos provenientes de tratamiento con 0.25 mg·L⁻¹ de ANA y transferido a medio MS suplementado con 1.0 mg·L⁻¹ de zeatina generando en promedio 1.4 callos por explante (Figura 25).

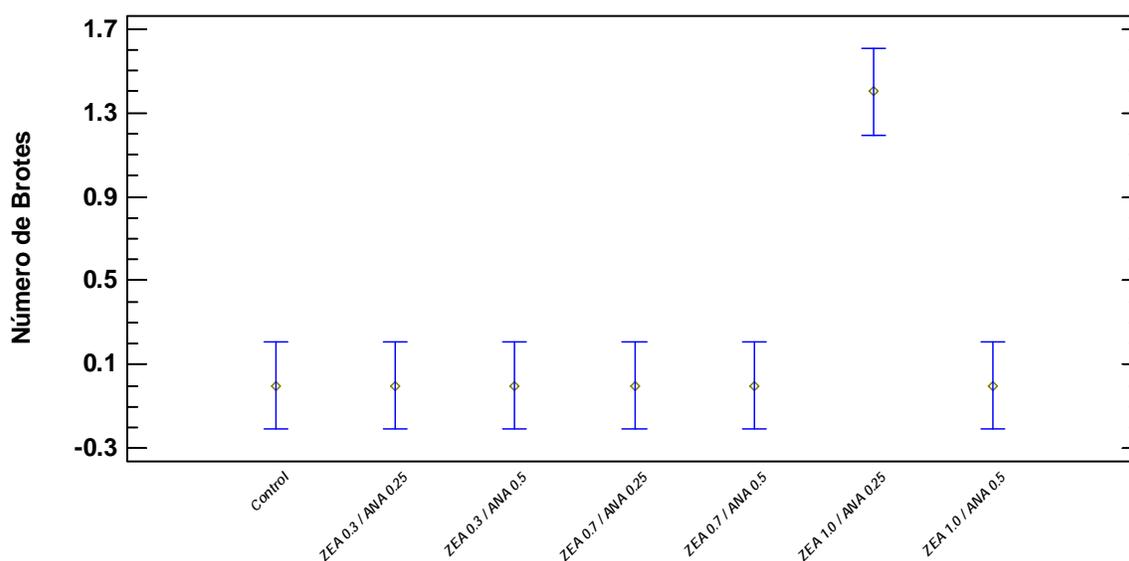


Figura 25. Número de brotes obtenidos con callos de *M. mathildae* provenientes de los tratamientos con ANA y posteriormente transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina.

El análisis de varianza (Cuadro 29) mostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de número de brotes entre un nivel de tratamiento y otro con un nivel de 95 % de confianza.

Cuadro 29. Análisis de varianza para callos de *M. mathildae* provenientes de tratamientos con ANA y transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.4	6	1.4	32.67	0.0000
Intra grupos	1.2	28	0.0428571		
Total	9.6	34			

La comparación de medias para estos datos mostró que existe diferencia significativa entre el tratamiento que mostró efecto y el control (Cuadro 30).

Cuadro 30. Comparación de medias para número de brotes en *M. mathildae* con callos obtenidos con tratamiento de ANA y transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ZEA 0.3 / ANA 0.25	ns	0	0.415396
Control - ZEA 0.3 / ANA 0.5	ns	0	0.415396
Control - ZEA 0.7 / ANA 0.25	ns	0	0.415396
Control - ZEA 0.7 / ANA 0.5	ns	0	0.415396
Control - ZEA 1.0 / ANA 0.25	*	-1.4	0.415396
Control - ZEA 1.0 / ANA 0.5	ns	0	0.415396

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

Los callos provenientes de tratamientos con 2,4-D mostraron que el mejor tratamiento fue el de brotes provenientes de callos generados con el tratamiento con $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y transferidos a medio MS suplementado con $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina, produciendo en promedio 2.8 brotes por callo (Figura 31).

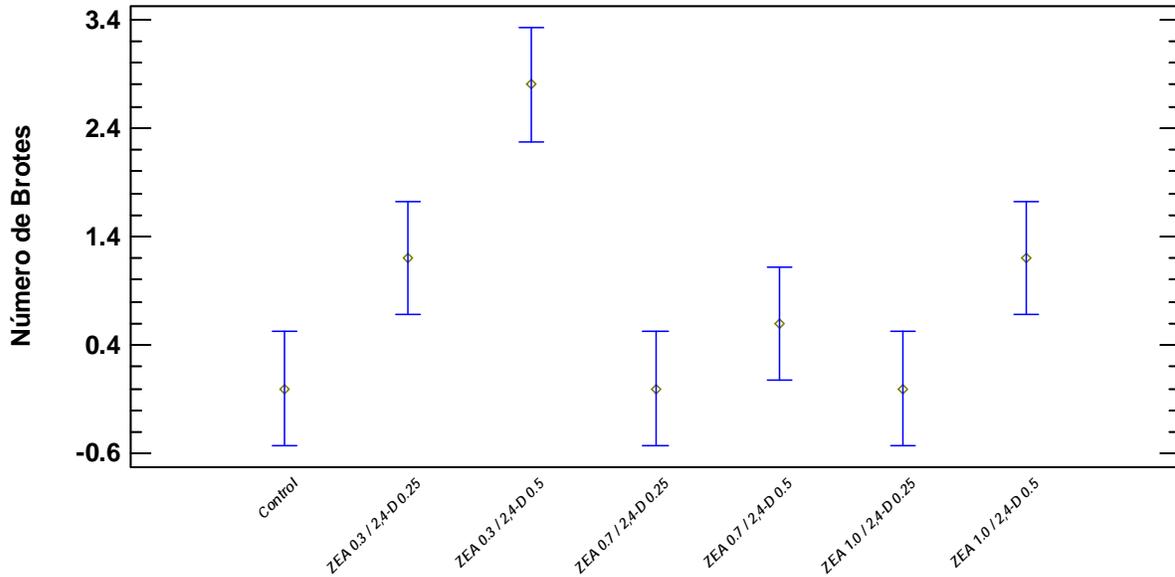


Figura 26. Número de brotes obtenidos con callos de *M. mathildae* provenientes de los tratamientos con 2,4-D y posteriormente transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina.

El análisis de varianza para este grupo de datos mostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre el número de brotes entre un nivel de tratamiento y otro con un nivel de confianza de 95 % (Cuadro 31).

Cuadro 31. Análisis de varianza para callos de *M. mathildae* provenientes de tratamientos con 2,4-D y transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	31.3714	6	5.22857	19.26	0.0000
Intra grupos	7.6	28	0.271429		
Total	38.9714	34			

Para discriminar entre qué grupo de medias y otro existe diferencia se realizó una comparación de medias, la cual mostró diferencias estadísticamente significativas

entre tres grupos de medias y el control, y que este grupo de medias incluye al mejor tratamiento (Cuadro 32).

Cuadro 32. Comparación de medias para número de brotes en *M. mathildae* con callos obtenidos con tratamiento de 2,4-D y transferidos a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de zeatina.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ZEA 0.3 / 2,4-D 0.25	*	-1.2	1.04539
Control - ZEA 0.3 / 2,4-D 0.5	*	-2.8	1.04539
Control - ZEA 0.7 / 2,4-D 0.25	ns	0	1.04539
Control - ZEA 0.7 / 2,4-D 0.5	ns	-0.6	1.04539
Control - ZEA 1.0 / 2,4-D 0.25	ns	0	1.04539
Control - ZEA 1.0 / 2,4-D 0.5	*	-1.2	1.04539

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

Se compararon los mejores resultados de cada tratamiento analizado para generar brotes en *M. mathildae* y se observó que dos tratamientos fueron los mejores: callos provenientes de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D transferidos a medio MS suplementado con $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina y callos provenientes de $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA transferidos a medio MS suplementado con $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina, generando en promedio 2.8 y 3.4 brotes por callo respectivamente (Figura 27)

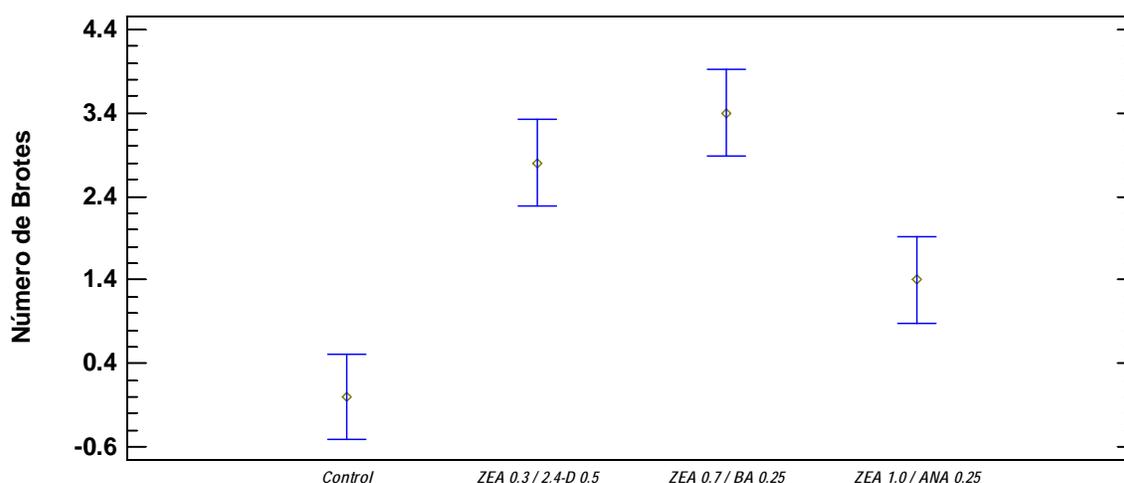


Figura 27. Mejores tratamientos para inducir brotes en callos de *M. mathildae*.

El análisis de varianza para estos datos mostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre número de brotes de un nivel de tratamiento y otro con un nivel de confianza de 95 % (Cuadro 33).

Cuadro 33. Análisis de varianza para los mejores tratamientos para formación de brotes a partir de callos de *M. mathildae*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	34.6	3	11.5333	35.49	0.0000
Intra grupos	5.2	16	0.325		
Total	39.8	19			

Se realizó una comparación de medias para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras en la cual se observó que existe diferencia significativa entre los mejores tratamientos y el control (Cuadro 34).

Cuadro 34. Comparación de medias para los mejores tratamientos para formación de brotes a partir de callos de *M. mathildae*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - ZEA 0.3 / 2,4-D 0.5	*	-2.8	1.03203
Control - ZEA 0.7 / BA 0.25	*	-3.4	1.03203
Control - ZEA 1.0 / ANA 0.25	*	-1.4	1.03203

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

La información generada sugiere que es posible propagar a las especies *E. grusonii* y *M. mathildae* mediante órgano génesis directa ò indirecta a fin de repoblar las poblaciones amenazadas.

4.5. Enraizamiento de los brotes obtenidos a partir de callo (Morfogénesis indirecta)

Para llevar a cabo estos experimentos, se tomaron los brotes producidos por los callos obtenidos con Zeatina, tanto para *E. grusonii* como para *M. mathildae* y se sembraron en medio MS y en medio MS adicionado con 0.5 mg·L⁻¹ y 1.0 mg·L⁻¹ de AIB, así como medio MS adicionado con 8% de carbón activado (Figura 24).

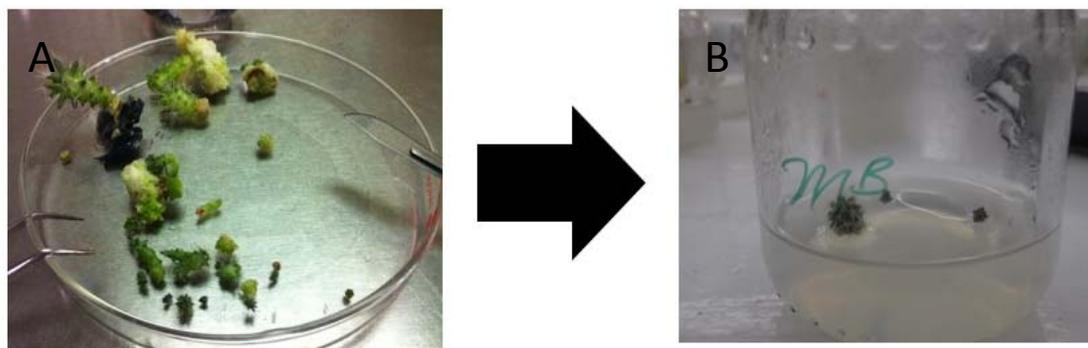


Figura 28. Técnica utilizada para inducir enraizamiento en brotes obtenidos a partir de callos tratados con zeatina (0.3, 0.7 y 1.0 mg·L⁻¹). En la figura se muestran brotes de *M. mathildae* (A), los cuales fueron transferidos a medio MS con diferentes tratamientos (B).

Para *E. grusonii*, el tratamiento control (MS) no mostró efecto para la formación de raíces, aunque los brotes permanecieron viables, es decir no se oxidaron ni clorotizaron (no tuvieron la coloración normal verde, sino un color verde pálido, amarillo o amarillo blanquecino dada la incapacidad de formar carbohidratos ya que producen clorofila insuficiente), pero no desarrollaron raíz (Figura 29). Los brotes tratados con Ácido Indolbutírico (AIB) y carbón activado desarrollaron raíces, para el caso de los tratamientos con AIB las raíces fueron de entre 2 y 3 cm de largo y en los brotes sembrados en medio con carbón activado las raíces fueron más pequeñas (entre 1.0 y 1.2 cm de largo).



Figura 29. Inducción de la formación de raíces en brotes obtenidos a partir de callo en plantas de *Echinocactus grusonii* en distintos tratamientos: A) Control; B) $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB; C) $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB y D) Carbón activado al 8 %.

Para evaluar el número de raíces se llevó a cabo un ANOVA simple que demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del número de raíces entre un nivel de tratamiento y otro con un nivel de 95 % de confianza (Figura 30). Los dos tratamientos con ácido indolbutírico ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mostraron mayor desarrollo de raíces de entre 2 y 3 cm de largo, mientras que el tratamiento con carbón activado al 8 % promovió el desarrollo de raíces más pequeñas (entre 1.0 y 1.2 cm de largo).

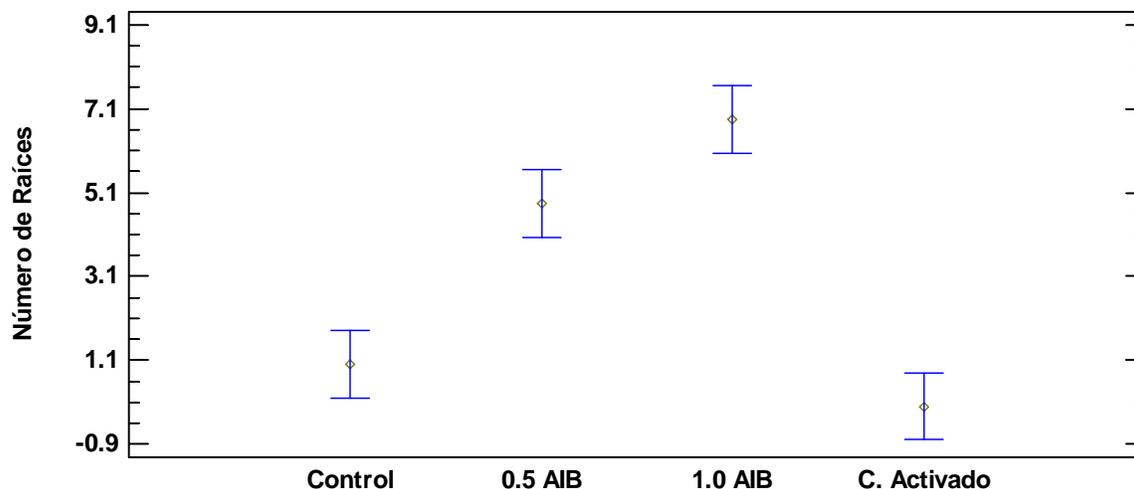


Figura 30. Número de raíces en distintos tratamientos de brotes obtenidos a partir de callos de *E. grusonii*.

El Cuadro 35 muestra los resultados del análisis de varianza, donde se observa que existe diferencia estadísticamente significativa para el número de raíces entre tratamientos para *E. grusonii*.

Cuadro 35. Análisis de varianza para número de raíces en brotes de *E. grusonii* en diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	185.667	3	61.8889	62.94	0.0000
Intra grupos	19.6667	20	0.983333		
Total	205.333	23			

Para corroborar estos datos, se llevó a cabo una prueba comparación de medias (Cuadro 36). Hubo diferencia significativa entre el control y los dos tratamientos con AIB y entre el tratamiento de 0.5 g/L⁻¹ y el de 1.0 g/L⁻¹, siendo el tratamiento más efectivo el de 1.0 mg/L⁻¹ de AIB con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro 36. Comparación de medias para el número de raíces por tratamiento en *E. grusonii*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - 0.5 AIB	*	-3.83333	1.60298
Control - 1.0 AIB	*	-5.83333	1.60298
Control - C. Activado	ns	1.0	1.60298
0.5 AIB - 1.0 AIB	*	-2.0	1.60298
0.5 AIB - C. Activado	*	4.83333	1.60298
1.0 AIB - C. Activado	*	6.83333	1.60298

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

Al evaluar los datos de longitud de la raíz más larga se encontró que, al igual que para el número de raíces, el mejor tratamiento fue el de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIB (Figura 31). Para *E. grusonii*, el tratamiento de carbón activado para inducir formación de raíces en brotes obtenidos a partir de callogénesis no es eficiente.

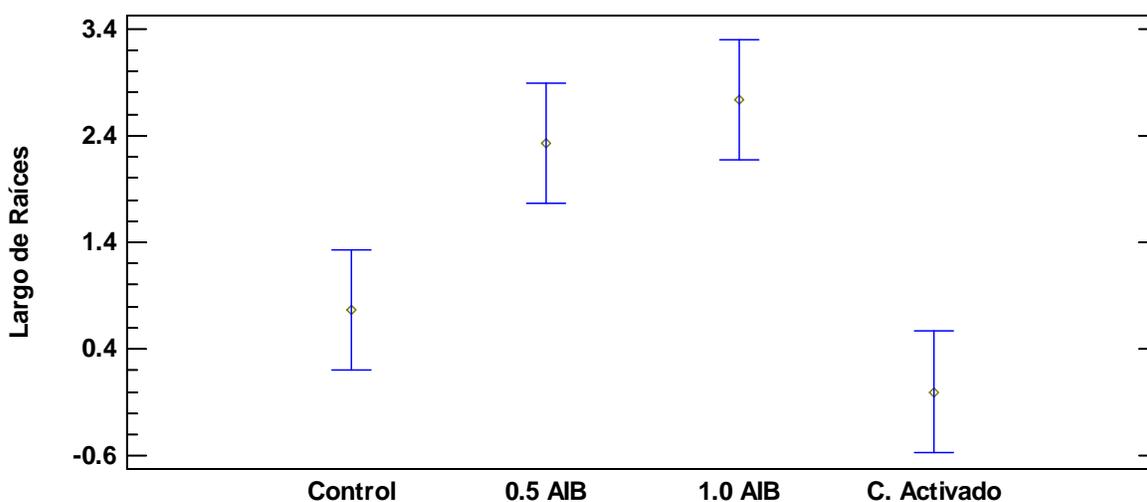


Figura 31. Longitud de la raíz más larga (en cm) de brotes de *E. grusonii* obtenidos a partir de callos bajo distintos tratamientos.

El análisis de varianza para estos datos mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa para este grupo de medias con un nivel de confianza de 95 % (Cuadro 37).

Cuadro 37. Análisis de varianza para longitud de raíz en brotes de *E. grusonii* con diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	29.9783	3	9.99278	20.56	0.0000
Intra grupos	9.72	20	0.486		
Total	39.6983	23			

De la misma manera, al realizar la comparación de medias el análisis estadístico arrojó resultados en los que no existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos con AIB pero si entre el del carbón activado contra los tratamientos de AIB, lo que indica que los tratamientos con AIB no influyen sobre el crecimiento de la raíz para el caso de *E. grusonii* (Cuadro 38).

Cuadro 38. Comparación de medias para longitud de raíz más larga (en cm) para *E. grusonii*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - 0.5 AIB	*	-1.56667	1.12693
Control - 1.0 AIB	*	-1.96667	1.12693
Control - C. Activado	ns	0.766667	1.12693
0.5 AIB - 1.0 AIB	ns	-0.4	1.12693
0.5 AIB - C. Activado	*	2.33333	1.12693
1.0 AIB - C. Activado	*	2.73333	1.12693

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

En el caso de *M. mathildae*, el control y el tratamiento con carbón activado no promovieron respuesta, pero en los tratamientos con AIB si hubo crecimiento de raíces de entre 2.5 y 4 cm de largo y el número promedio de raíces, osciló entre 4 y 5 por brote (Figura 32).



Figura 32. Resultados de la inducción de raíces en brotes obtenidos a partir de callo en *Mammillaria mathildae*, en los que se muestra A) Control; B) 0.5 mg·L⁻¹ AIB; C) 1.0 mg·L⁻¹ AIB y D) Carbón activado al 8 %.

Al hacer el análisis estadístico se demuestra que el mejor tratamiento es 1.0 mg·L⁻¹ de AIB, esto haciendo comparación entre la media del número de raíces entre un nivel de tratamiento y otro con un nivel de 95 % de confianza (Figura 33).

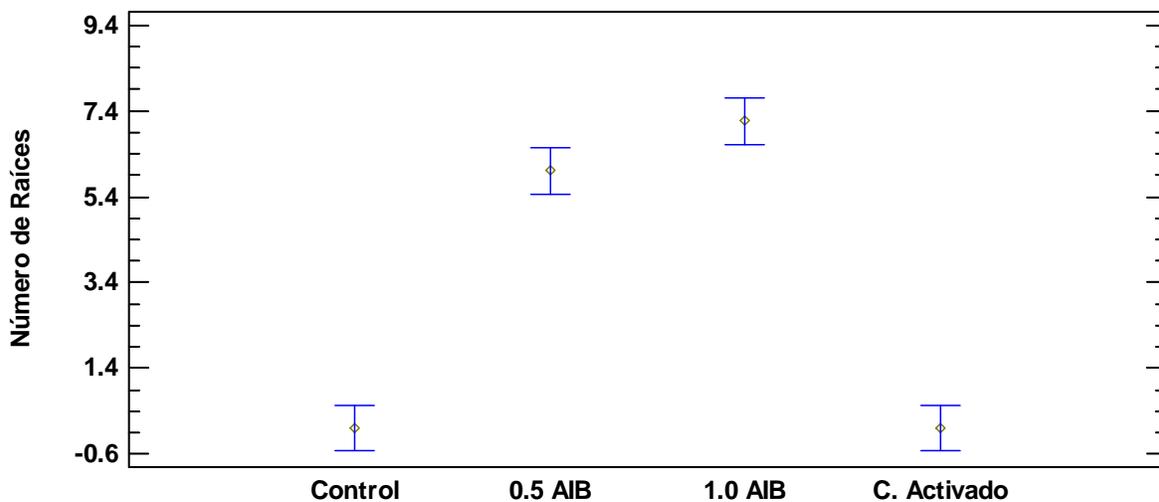


Figura 33. Número de raíces en distintos tratamientos de brotes obtenidos a partir de callos de *M. mathildae*.

El análisis de varianza mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa para este grupo de medias con un nivel de confianza de 95 % (Cuadro 39).

Cuadro 39. Análisis de varianza para número de raíces en brotes de *M. mathildae* con diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	264.125	3	88.0417	199.34	0.0000
Intra grupos	8.83333	20	0.441667		
Total	272.958	23			

Para corroborar estos datos, se llevó a cabo una comparación de medias, en la que se muestra que existe diferencia significativa entre el control y los tratamientos de AIB, así como entre los tratamientos con AIB, lo que demostró que el mejor tratamiento efectivamente es 1.0 mg·L⁻¹ de AIB para el caso de *M. mathildae* (Cuadro 40). Hubo diferencia significativa entre el control y los dos tratamientos con AIB y entre el tratamiento de 0.5 mg·L⁻¹ y el de 1.0 mg·L⁻¹, siendo el tratamiento más efectivo el de 1.0 mg·L⁻¹ con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro 40. Comparación de medias para número de raíces de *M. mathildae*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - 0.5 AIB	*	-6.0	1.0743
Control - 1.0 AIB	*	-7.16667	1.0743
Control - C. Activado	ns	0	1.0743
0.5 AIB - 1.0 AIB	*	-1.16667	1.0743
0.5 AIB - C. Activado	*	6.0	1.0743
1.0 AIB - C. Activado	*	7.16667	1.0743

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

Al igual que con *E. grusonii*, se midió la raíz más larga (en cm) para *M. mathildae*, pero a diferencia del primero, para *M. mathildae* el tratamiento de AIB 1.0 mg·L⁻¹ promovió mayor crecimiento de raíz, como se muestra en la Figura 34.

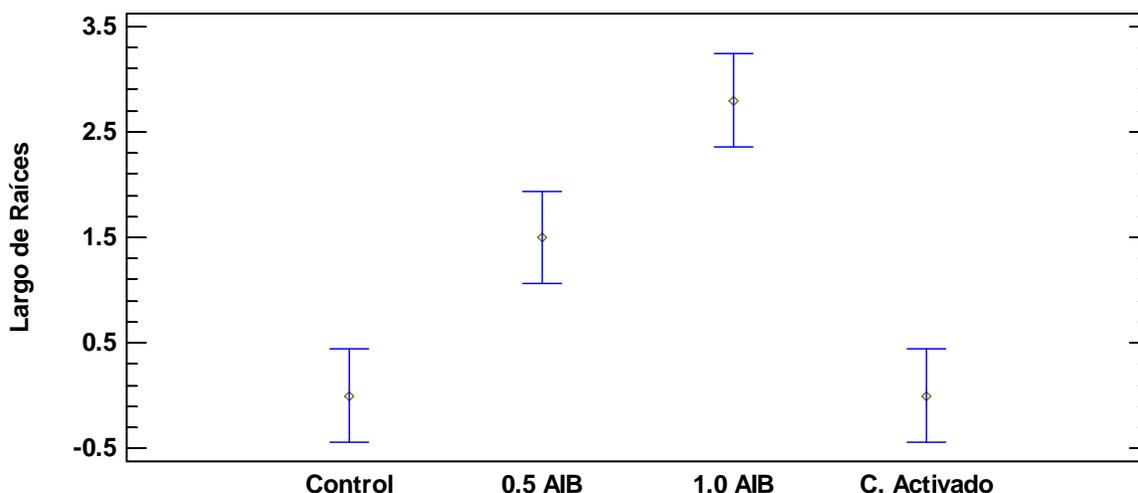


Figura 34. Número de raíces en distintos tratamientos de brotes obtenidos a partir de callos de *M. mathildae*. En la figura se muestran los tratamientos con concentraciones de 0.5 y 1.0 g·L⁻¹ de AIB y carbón activado (CA).

El análisis de varianza mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa para este grupo de medias con un nivel de confianza de 95 % (Cuadro 41).

Cuadro 41. Análisis de varianza para largo de raíz en brotes de *M. mathildae* con diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	32.805	3	10.935	36.45	0.0000
Intra grupos	6.0	20	0.3		
Total	38.805	23			

La comparación de medias (Cuadro 42) de los datos mostró diferencia significativa entre el control y los dos tratamientos con AIB y entre el tratamiento de 0.5 mg·L⁻¹

y el de 1.0 mg·L⁻¹, siendo el tratamiento más efectivo el de 1.0 mg·L⁻¹ con un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro 42. Comparación de medias para longitud de raíz más larga en *M. mathildae*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - 0.5 AIB	*	-1.5	0.885397
Control - 1.0 AIB	*	-2.8	0.885397
Control - C. Activado	ns	0	0.885397
0.5 AIB - 1.0 AIB	*	-1.3	0.885397
0.5 AIB - C. Activado	*	1.5	0.885397
1.0 AIB - C. Activado	*	2.8	0.885397

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

4.6. Morfogénesis Directa.

Para evaluar la morfogénesis directa se sembraron areolas de *E. grusonii* y *M. mathildae* en tratamientos control, 0.5 mg·L⁻¹ y 1.0 mg·L⁻¹ de AIB así como en medio MS suplementado con carbón activado al 8 % (Figura 35).

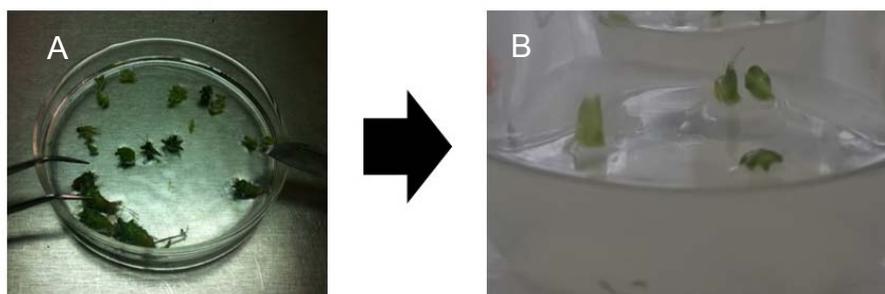


Figura 35. Técnica utilizada para inducir morfogénesis directa. Se disectaron mamilas de plantas provenientes de cultivo in vitro de *E. grusonii* y *M. mathildae* (A) para posteriormente transferirse a medio MS con diferentes tratamientos (B).

En el caso de *E. grusonii*, se mostró que los tratamientos de 1.0 y 2.0 mg·L⁻¹ de AIB fueron eficaces de manera similar, para inducir la formación de raíces, ambos produciendo entre 1.8 y 2.0 raíces por areola. Los tratamientos control, 4.0 mg·L⁻¹

de AIB y Carbón Activado (CA) no tuvieron efecto (Figura 36). Al efectuar la prueba de rangos múltiples se observó que existe diferencia significativa entre el control y los dos tratamientos que resultaron positivos, pero no entre estos dos últimos tratamientos. El método empleado para discriminar entre las medias fue el de diferencia mínima significativa de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron con un nivel de confianza del 95 %.

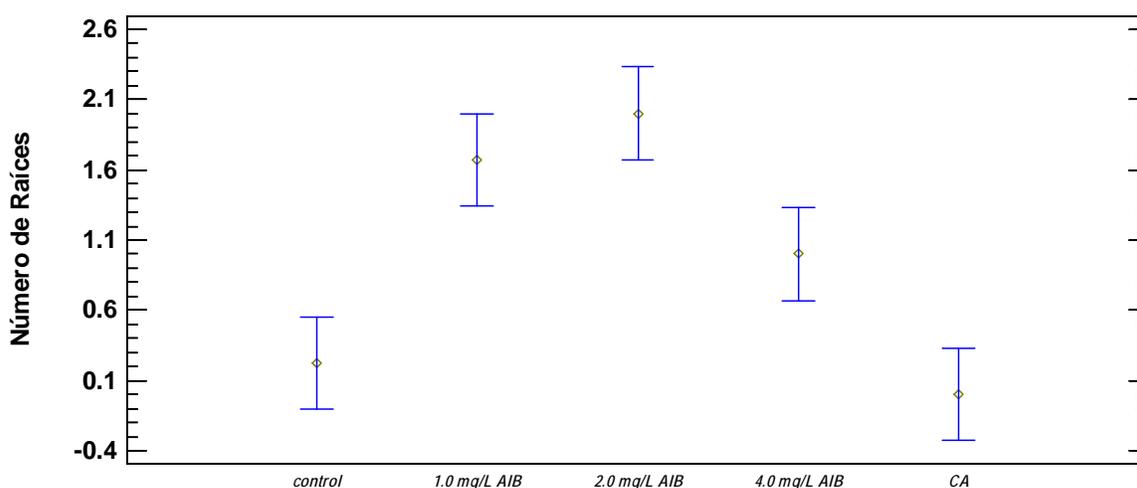


Figura 36. Número de raíces formadas por cultivo de areolas en diferentes tratamientos de AIB y Carbón Activado (CA) en *Echinocactus grusonii*.

El análisis de varianza mostró que existe diferencia estadísticamente significativa para el el número de raíces entre tratamientos un nivel de confianza del 95 % (Cuadro 43).

Cuadro 43. Análisis de varianza para número de raíces en diferentes tratamientos de explantes de *E. grusonii*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27.4222	4	6.85556	28.70	0.0000
Intra grupos	9.55556	40	0.238889		
Total	36.9778	44			

Se realizó una comparación de medias, la cual mostró que existe diferencia significativa entre el control y los tres tratamientos con AIB, pero no existe diferencia significativa entre el control y el tratamiento con carbón activado al 8 % (Cuadro 44).

Cuadro 44. Comparación de medias para número de raíces en explantes directos de *E. grusonii*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - 1.0 mg/L AIB	*	-1.44444	0.658115
control - 2.0 mg/L AIB	*	-1.77778	0.658115
control - 4.0 mg/L AIB	*	-0.777778	0.658115
control - CA	ns	0.222222	0.658115

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

Para corroborar estos datos, se midió la raíz más larga de los tratamientos para demostrar la eficacia de cada uno de ellos y se obtuvo que el tratamiento de 1.0 mg·L⁻¹ de AIB es el más eficaz, ya que genera raíces más largas lo cual podría dar ventaja al momento de la aclimatación a condiciones de invernadero (Figura 37).

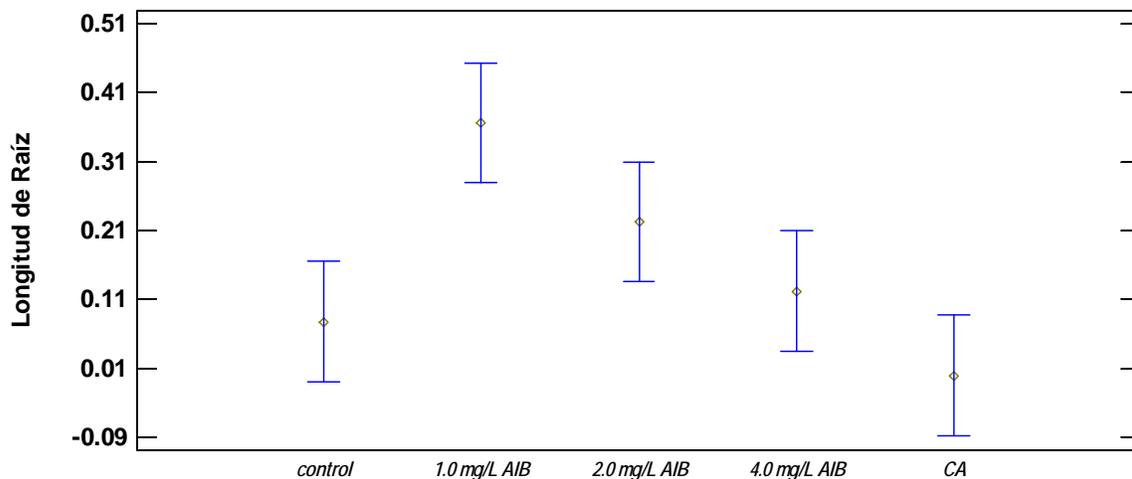


Figura 37. Longitud de la raíz más larga de mamilas de *E. grusonii* sembradas para inducir morfogénesis directa.

El análisis de varianza mostró que existe diferencia estadísticamente significativa con un rango de confianza de 95 % entre los tratamientos para la longitud de raíz (Cuadro 45).

Cuadro 45. Análisis de varianza para morfogénesis directa en explantes de *E. grusonii* para longitud de raíz.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.723111	4	0.180778	10.85	0.0000
Intra grupos	0.666667	40	0.0166667		
Total	1.38978	44			

De acuerdo a la comparación de medias, hay diferencia significativa solo entre el control y la adición de 1.0 mg·L⁻¹ de AIB. Los demás tratamientos, incluida la adición de carbón activado al 8 % no mostraron efecto en la longitud de raíz para esta especie (Cuadro 46).

Cuadro 46. Comparación de medias para longitud de raíz en explantes de *E. grusonii* en diferentes tratamientos para inducir morfogénesis directa a partir de cultivo de mamilas.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - 1.0 mg/L AIB	*	-0.288889	0.173831
control - 2.0 mg/L AIB	ns	-0.144444	0.173831
control - 4.0 mg/L AIB	ns	-0.0444444	0.173831
control - CA	ns	0.0777778	0.173831

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

En el caso de *M. mathildae*, los resultados obtenidos para la inducción de raíces a partir de mamilas mostró que el mejor tratamiento es el de AIB 2.0 mg·L⁻¹ (Figura 38).

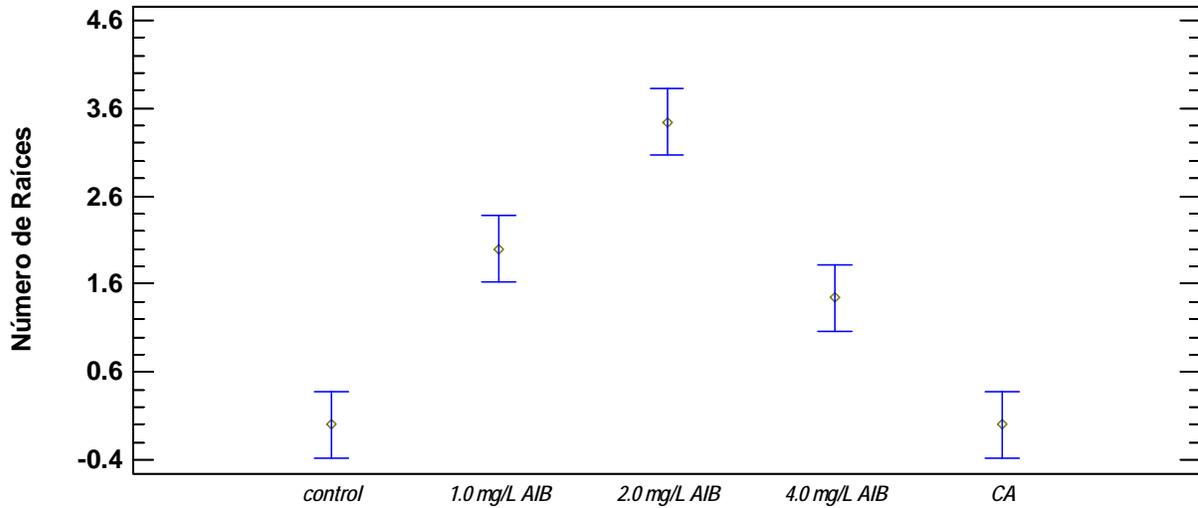


Figura 38. Número de raíces por explante de *M. mathildae* en explantes de mamilas para inducir morfogénesis directa.

El análisis de varianza mostró que hay diferencia significativa entre los tratamientos con un nivel de confianza de 95 % (Cuadro 47).

Cuadro 47. Análisis de varianza para explantes de *M. mathildae* en número de raíces por explante en diferentes tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	76.1333	4	19.0333	61.18	0.0000
Intra grupos	12.4444	40	0.311111		
Total	88.5778	44			

La comparación de medias mostró que hay diferencia significativa para casi todos los tratamientos excepto para el tratamiento con carbón activado al 8 %, pero el mejor tratamiento es la adición de 2.0 mg·L⁻¹ de AIB (Cuadro 48).

Cuadro 48. Comparación de medias para las medias de número de raíces por explantes de *M. mathildae*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - 1.0 mg/L AIB	*	-2.0	0.751038
control - 2.0 mg/L AIB	*	-3.44444	0.751038
control - 4.0 mg/L AIB	*	-1.44444	0.751038
control - CA	ns	0	0.751038

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

También, se midió la raíz más larga de los tratamientos que resultaron positivos para la inducción de morfogénesis directa, encontrando que al igual que con el número de raíces, el mejor tratamiento para desarrollo de raíces fue el de 2.0 mg·L⁻¹ de AIB. La prueba de rangos múltiple (LSD de Fisher) mostró que hay diferencia estadísticamente significativa entre todas las medias con una confianza del 95 % (Figura 39).

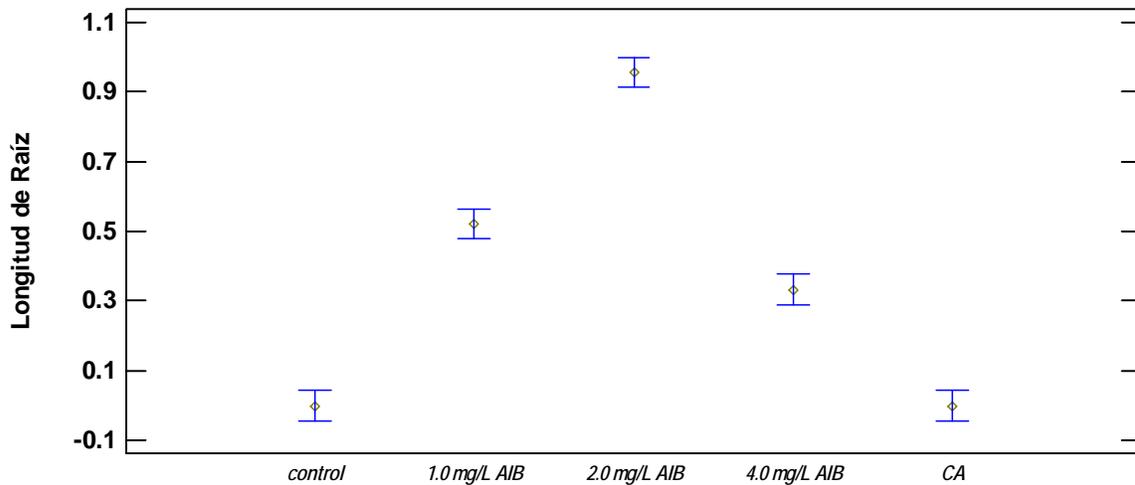


Figura 39. Longitud de la raíz más larga para explantes de *M. mathildae*.

El análisis de varianza mostró que existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza de 95 % como lo muestra el Cuadro 49.

Cuadro 49. Análisis de varianza para longitud de raíz en explantes de *M. mathildae* inducidos con varios tratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5.768	4	1.442	365.58	0.0000
Intra grupos	0.157778	40	0.00394444		
Total	5.92578	44			

La comparación de medias mostró que al igual que para *E. grusonii*, los tratamientos con AIB son efectivos para inducir formación de raíces durante la siembra de mamilas de *M. mathildae*. El carbón activado al 8 % no generó respuesta en esta especie y el mejor tratamiento fue el de 2.0 mg·L⁻¹ de AIB (Cuadro 50).

Cuadro 50. Comparación de medias para longitud de raíces en explantes de *M. mathildae* con diferentes tratamientos para inducir morfogénesis directa.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - 1.0 mg/L AIB	*	-0.522222	0.0845662
control - 2.0 mg/L AIB	*	-0.955556	0.0845662
control - 4.0 mg/L AIB	*	-0.333333	0.0845662
control - CA	ns	0	0.0845662

*= diferencias significativas, ns= diferencias no significativas, $\alpha=0.05$.

4.7. Caracterización Molecular

Para la caracterización molecular y el análisis de diversidad genética intrapoblacional se realizó una prueba de calidad de ADN seleccionando al azar algunos individuos, esto para demostrar que el ADN se encontraba íntegro y que el protocolo utilizado para la extracción de ADN de individuos de las dos especies evaluadas fue aceptable, el gel de agarosa resultante de la electroforesis mostró la

presencia de una banda bien definida y de alto peso molecular para las muestras elegidas (Figura 40).

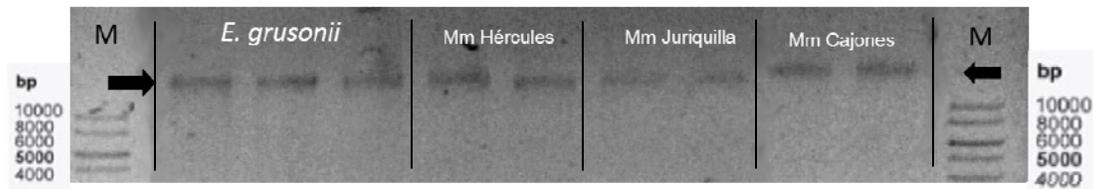


Figura 40. Electroforesis de ADN en gel de agarosa para tres muestras de *E. grusonii* y dos muestras de cada una de las poblaciones de *M. mathildae*. bp= pares de bases; M= marcador de peso molecular.

A continuación, se realizaron mezclas de ADN de individuos (16 individuos de *E. grusonii*, y 16 de cada una de las poblaciones de *M. mathildae* [Cañada de Hércules, Cañada de Juriquilla y Los Cajones]) y con la mezcla de ADN de *E. grusonii* y una de *M. mathildae* se realizaron pruebas para cada uno de los 25 iniciadores, un ejemplo de los patrones de bandas obtenidos se muestra en la figura 41.

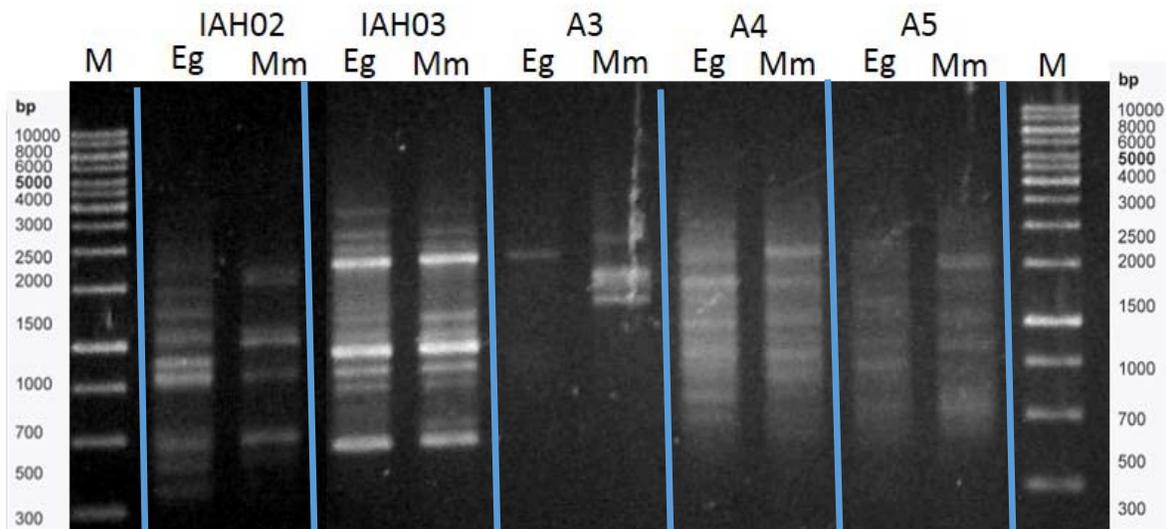


Figura 41. Patrones de bandeo para *Echinocactus grusonii* (Eg) y *Mammillaria mathildae* (Mm) para los iniciadores ISSR IAH02, IAH03, A3, A4 y A5 utilizados para el análisis de especies y el análisis de poblaciones y el análisis intrapoblacional (M=Marcador molecular; bp= pares de bases).

4.7.1. Análisis de especies y sus poblaciones

Una vez terminadas las pruebas de iniciadores ISSR, se seleccionaron aquellos que mostraron productos amplificados para las dos especies (Cuadro 51), se observó que los iniciadores presentaron desde 3 (IAH01 y A2) hasta 13 (P1) productos amplificados y que el porcentaje de polimorfismo para los mismos fue desde 33.33 para A2 hasta el 100 por ciento para A4.

Cuadro 51. Iniciadores seleccionados para la caracterización de *Echinocactus grusonii* y las tres poblaciones de *Mammillaria mathildae*.

Marcador	Secuencia	PA	NBM	NBP	Porcentaje de Polimorfismo
IAH01	5'-ACACACACACACA-3'	3	1	2	66.67
IAH02	5'-GTGTGTGTGTGTGG-3'	9	3	6	66.67
IAH03	5'-GAGAGAGAGAGACC-3'	10	4	6	60.00
A2	5'-CCGCGCCCGCGCCCGCGC-3'	3	2	1	33.33
A3	5'-CTCCTCCTCCTCCTC-3'	9	2	7	77.78
A4	5'CACACACACACACAAG-3'	8	0	8	100.00
A5	5'-CACACACACACACAGG-3'	9	2	7	77.78
A7	5'CACACACACACACAAC-3'	8	1	7	87.50
A8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'	9	3	6	66.67
A9	5'-CACACACACACACA-3'	8	7	1	12.50
A10	5'GAGAGAGAGAGACC-3'	7	3	4	57.14
P1	5'-GAGCAACAACAACAACA-3'	13	3	10	76.92
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG-3'	11	8	3	27.27
P3	5'-ATGATGATGATGATG-3'	11	5	6	54.55
P4	5'-ATGATGATGATGATG-3'	7	3	4	57.14
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG-3'	8	3	5	62.50

PA= Productos amplificados; NBM= Número de Bandas Monomórficas; NBP= Número de Bandas Polimórficas.

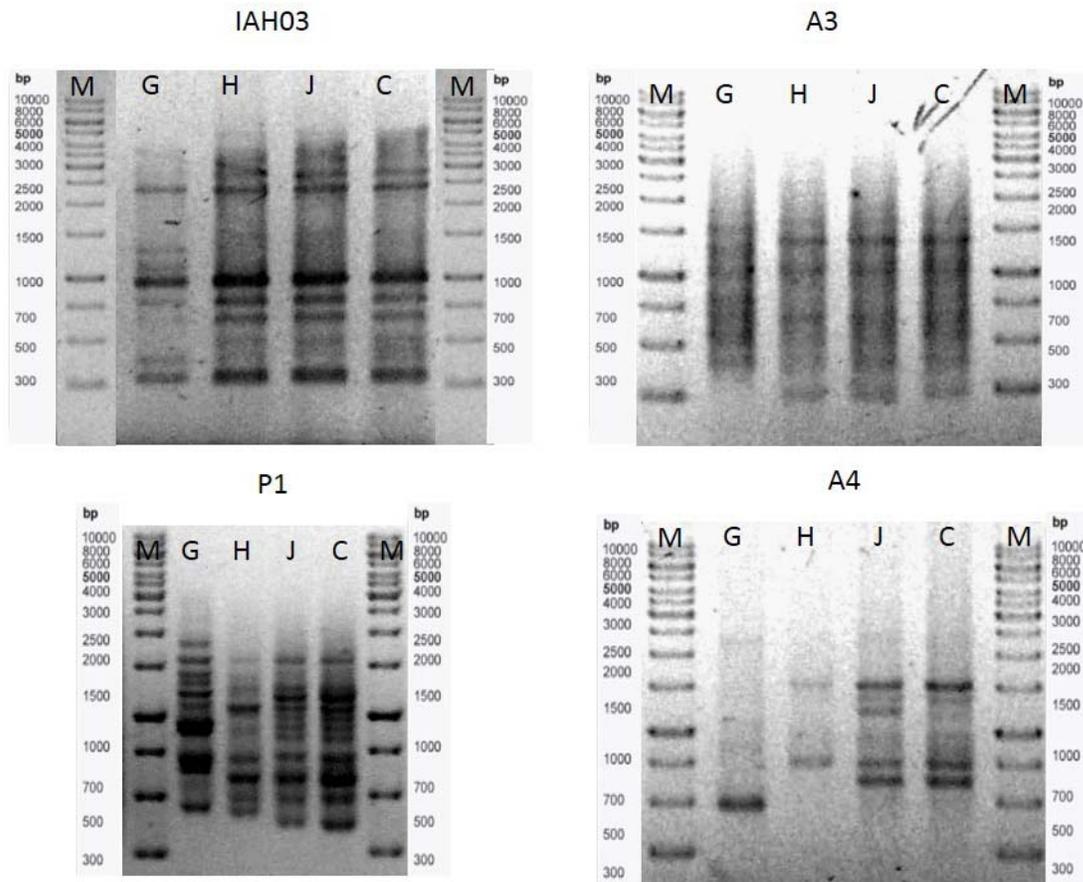


Figura 42. Patrones de bandeo para ISSR de las poblaciones evaluadas, Se utilizó los iniciadores IAH03, A3, P1 y A4. (M= marcador; bp=pares de bases; G= *Echinocactus grusonii*; H= *Mammillaria mathildae*, población Cañada de Hércules; J= *M. mathildae*, población Cañada de Juriquilla; C= *M. mathildae*, población Los Cajones).

Los patrones de bandas obtenidos con los iniciadores seleccionados mostraron polimorfismo y fueron nítidos (Figura 42). A partir de los mismos se obtuvo una Matriz Básica de Datos (MBD) con la cual se realizó un dendrograma utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard (Figura 43). En la misma figura se observa la formación de dos grupos a un coeficiente de similitud de 0.68. El grupo 1 lo constituyó *Mammillaria mathildae* y sus tres poblaciones, como corresponde a la filogenia.

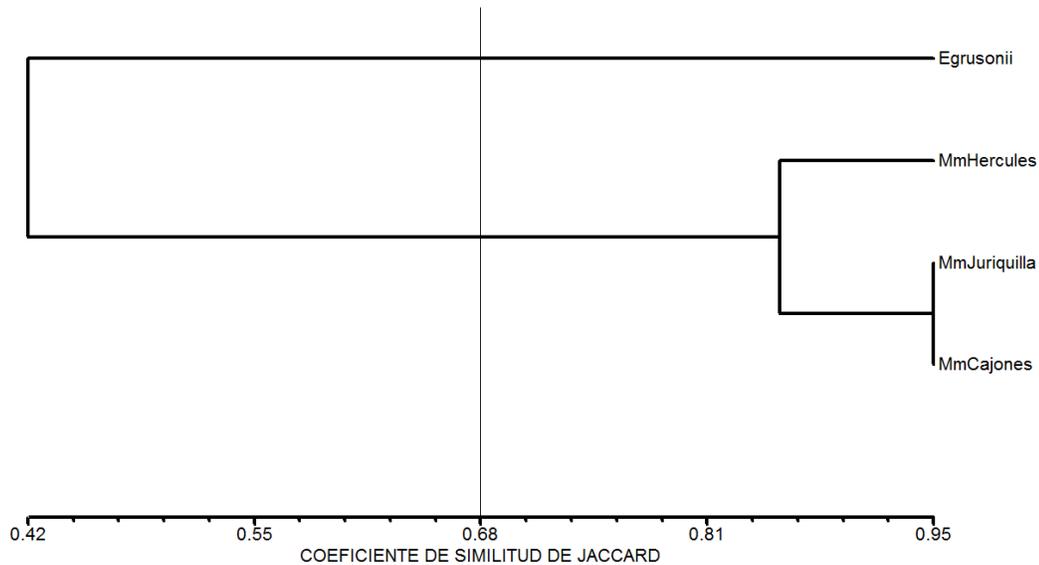


Figura 43. Dendrograma molecular obtenido a partir de 16 iniciadores ISSR de las series IAH, A y P, utilizando el coeficiente de Jaccard.

La formación de estos grupos era esperada debido a que los dos grupos formados corresponden a dos especies diferentes, pero se puede apreciar que en el caso del grupo dos (*Mammillaria mathildae*) se forman dos subgrupos, uno que contiene a la población de Cañada de Hércules y otro que integra a las poblaciones de Cañada de Juriquilla y Los Cajones, esto sugiere que estas dos últimas poblaciones, al estar geográficamente más cercanas, en comparación a la población de Hércules podrían interactuar más, ya sea por transporte de polen por el viento o con ayuda de polinizadores y, por lo tanto, comparten más información genética a pesar de que el terreno donde se encuentran estas poblaciones es accidentado y presenta algunas barreras naturales.

4.7.2. Análisis de Poblaciones y sus individuos

Para caracterizar molecularmente a los individuos dentro de las poblaciones, se eligieron 7 individuos representativos, y se procedió a utilizar los marcadores que

generaron el patrón de bandeo más claro de los análisis de mezcla de individuos, mismos que se muestran en la Figura 44.

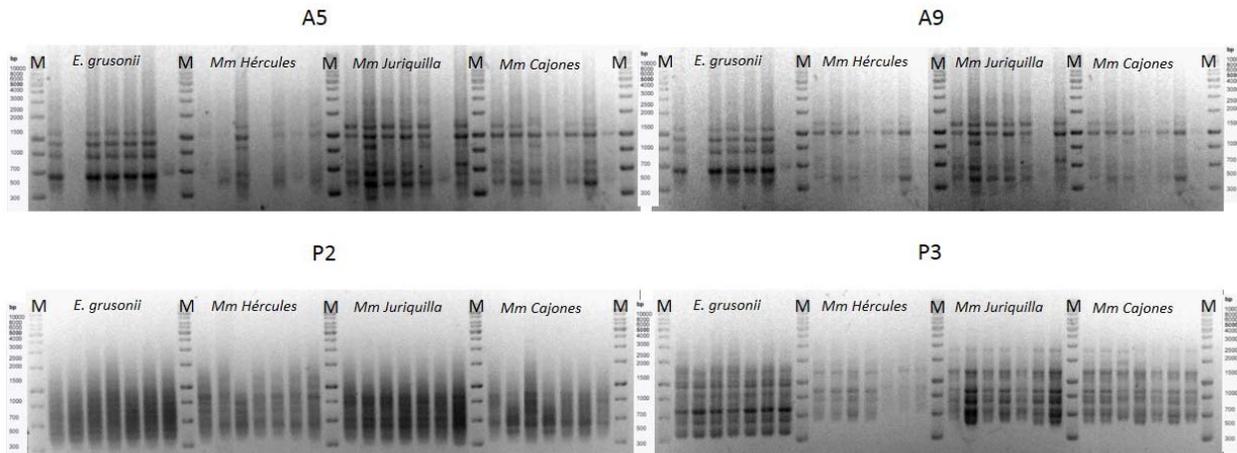


Figura 44. Patrones de bandeo de ISSR de individuos dentro de las especies, Los patrones se obtuvieron con los iniciadores A5, A9, P2 y P3. (M= marcador; bp=pares de bases).

Los marcadores seleccionados se muestran en el Cuadro 52, en la que se muestra también el número de bandas amplificadas por cada uno de los iniciadores utilizados durante los análisis de poblaciones con ADN de individuos, analizándose 7 individuos de cada población por cada uno de los marcadores utilizados. En la misma Cuadro se observa que el número de bandas amplificadas fue de 5 para el iniciador A5 hasta 19 para el iniciador P3, lo que muestra que los iniciadores utilizados son una buena alternativa para evaluar estas poblaciones.

Cuadro 52. Marcadores utilizados para el análisis de poblaciones de *E. grusonii* y *M. mathildae*. Se muestra también en el Cuadro el número de bandas amplificadas por cada uno de los iniciadores utilizados.

Iniciadores	Secuencia	PA
IAH02	5'-GTGTGTGTGTGTGG-3'	6
IAH03	5'-GAGAGAGAGAGACC-3'	11
A3	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC-3'	7
A5	5'-CACACACACACACAGG-3'	5
A8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'	9
A9	5'-CACACACACACACA-3'	8
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG-3'	15
P3	5'-ATGATGATGATGATG-3'	19
P4	5'-ATGATGATGATGATG-3'	8
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG-3'	6
PA= Productos amplificados		

Con los datos obtenidos se realizó una Matriz Básica de Datos (MBD) con la cual se realizó un dendrograma utilizando el coeficiente de Jaccard y analizando los datos mediante UPGMA, los resultados obtenidos fueron semejantes al del análisis de especies, los individuos se separaron en dos grupos principales que diferencian a los individuos de las dos especies (*E. grusonii* y *M. mathildae*). *M. Mathildae* a su vez está subdividida en dos grupos, uno integrado por los individuos de la población de Cañada de Hércules y otro grupo que abarca los individuos de las poblaciones de Cañada de Juriquilla y Los Cajones (Figura 45).

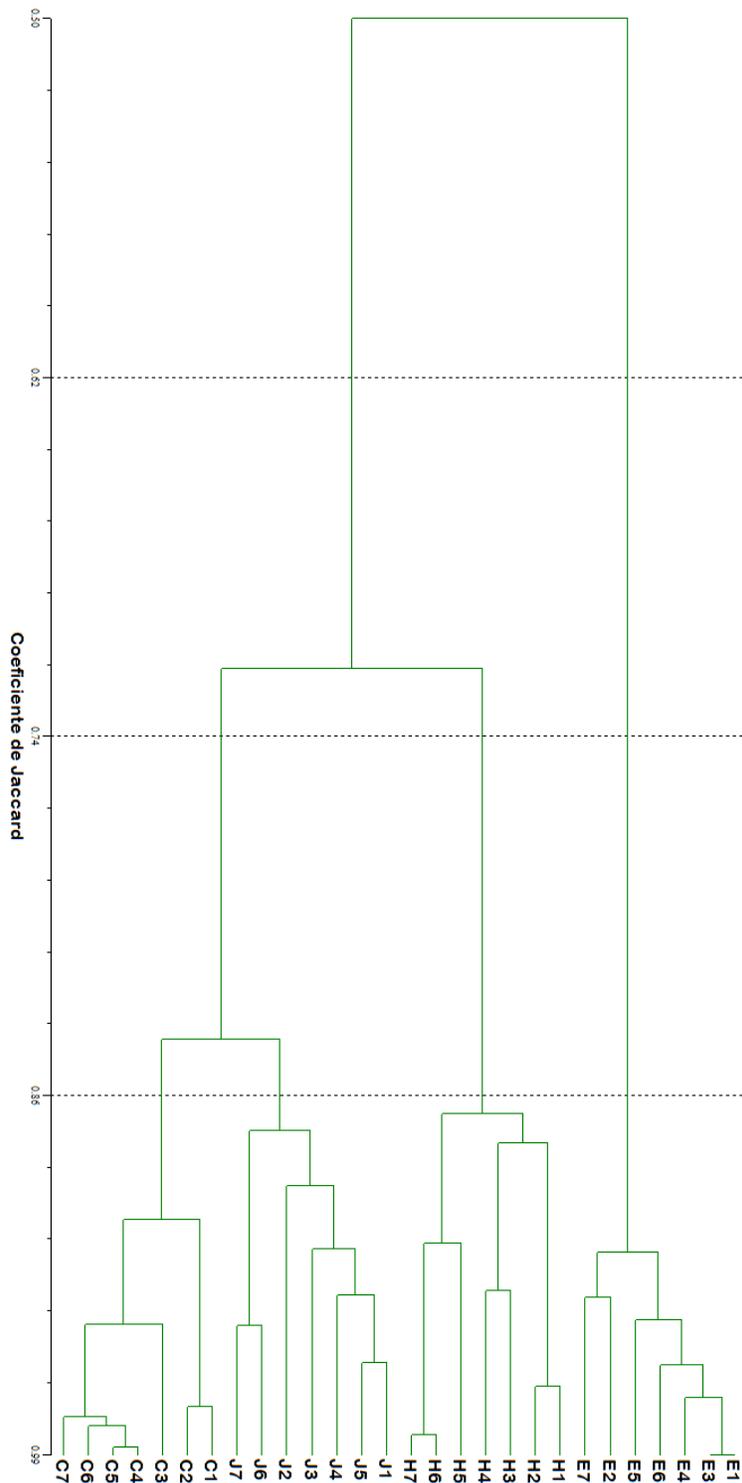


Figura 45. Dendrograma de individuos de poblaciones de *E. grusonii* y *M. mathildae* utilizando el coeficiente de Jaccard y analizando los datos mediante UPGMA. E= *Echinocactus grusonii*, H= *Mammillaria mathildae*, población de Cañada de Hércules, J= *Mammillaria mathildae*, población de Cañada de Juriquilla y C= *Mammillaria mathildae*, población de Los Cajones.

El análisis de los datos genotípicos de distintos *loci* es un método importante para describir los patrones de variación genética entre especies y, de esta manera, inferir sobre los procesos evolutivos que generan esos patrones. Los datos genotípicos son multivariados: la frecuencia de cada alelo en cada locus generalmente es diferente en cada población. Las distancias genéticas son medidas que sintetizan las diferencias entre la diferenciación de un par de poblaciones analizadas. Se han generado muchos índices de distancia genética, de los cuales solo algunos son utilizados de manera regular en la actualidad (Nei, 1987).

La descripción de la variación en las poblaciones es de gran importancia para los fitomejoradores e investigadores de bancos de germoplasma. La distancia genética es una medida de la diferencia del material genético entre distintas poblaciones o entre individuos de la misma especie.

Se efectuó un análisis genético de poblaciones utilizando el programa PopGene 32, con este se obtuvo información sobre los estadísticos de variación genética (Cuadro 53) para todos los *loci* evaluados dentro de las poblaciones (de un total de 94). Las cuatro poblaciones estudiadas presentan un número semejante de alelos observados por locus (1.06 a 1.18). El número efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964) se refiere a los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación, que para las poblaciones estudiadas también es similar, fluctuando de 1.05 a 1.1 alelos efectivos por población. El porcentaje de locus polimórficos da cuenta del índice de polimorfismo (número de *loci* polimórficos frente a *loci* totales) que en general es bajo para las 4 poblaciones, ya que el mayor nivel de polimorfismo lo mostró la población de *M. mathildae* de Cañada de Juriquilla

(18.09 %) seguido por la población de Cañada de Hércules (15.96) y finalmente la población de Los Cajones con 11.70. *E. grusonii* tuvo el porcentaje de polimorfismo más bajo (6.38 %) así como el índice de diversidad genética de Nei más bajo (0.0282). Estos datos sugieren que el número de especies y abundancia relativa de las mismas en sus respectivas comunidades es bajo por lo que las condiciones de las comunidades, a decir, muy explotadas y bajo condiciones ambientales precarias y muy fluctuantes por el paso del hombre sobre las mismas ha influido drásticamente sobre este valor.

La heterocigosidad esperada (heterocigosidad media o diversidad genética media expresada mediante el índice de Nei (1973) da la idea de la heterocigosidad esperada en el locus medio si el apareamiento fuese al azar, tiene un valor máximo (diversidad máxima) de 0.5 y un valor mínimo (diversidad mínima) de 0, con este valor se puede estimar la diversidad genética. Para la población de *E. grusonii* este valor fue bajo (0.023) y ligeramente más alto para las poblaciones de *M. mathildae* (de 0.04 a 0.06). El índice de Shannon de diversidad de una población (Shannon y Weaver, 1949) que se basa en la teoría de la información y por lo tanto, en encontrar un determinado individuo en un ecosistema, el valor máximo de este índice es 5, y para las especies estudiadas en este trabajo fue bajo (0.04 para *E. grusonii* y entre 0.06 y 0.09 para las poblaciones de *M. mathildae*) por lo que hay poca diversidad genética dentro de las poblaciones (Cuadro 53).

Cuadro 53. Resumen de estadísticos de variación genética para todos los *loci* dentro de las poblaciones.

Población	NOA	NEA	IDN	IIS	NLP	PLP
<i>Echinocactus grusonii</i>	1.0630 ±0.2458	1.0525 ±0.2096	0.0282 ±0.1105	0.0402 ±0.1567	6	6.38%
<i>M. mathildae</i> (Hércules)	1.1596 ±0.3682	1.1065 ±0.2739	0.0600 ±0.1485	0.0909 ±0.2047	15	15.96%
<i>M. mathildae</i> (Juriquilla)	1.1809 ±0.3870	1.0991 ±0.2462	0.0597 ±0.1338	0.0883 ±0.2136	17	18.09%
<i>M. mathildae</i> (Cajones)	1.1170 ±0.3232	1.0766 ±0.2312	0.0442 ±0.1280	0.0654 ±0.1859	11	11.70%

NOA= Número Observado de Alelos; NEA= Número Efectivo de Alelos; IDN= Índice de Diversidad de Nei; IIS= Índice de información de Shannon; NAP= Número de Loci Polimórficos; PLP = Porcentaje de Loci Polimórficos. Para los valores de NOA, NEA, IDN e ISS se muestran los valores obtenidos ± la desviación estándar.

Los resultados dentro de las poblaciones se presentan en el Cuadro 54, en donde se evaluó la diversidad genética en poblaciones subdivididas según Nei (1987). En la misma Cuadro se indica el valor de heterocigosidad en los *loci* polimórficos (67 en total) entre las 4 poblaciones estudiadas, que dan un porcentaje de 71.28, este valor se obtiene mediante la fórmula $H_t = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del $i^{\text{ésimo}}$ alelo en la población. El valor medio de heterocigosidad observada en los individuos de las cuatro poblaciones fue de 0.2710 y el valor medio de la heterocigosidad promedio fue de 0.4080. El coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones fue alto ($G_{ST} = 0.82$), lo que sugiere que aproximadamente el 82 % de la variación genética detectada puede atribuirse a diferencias entre las poblaciones. El resto (18 %) representa diversidad genética dentro de poblaciones. En base al coeficiente de diferenciación genética total entre los cultivares (G_{ST}) el nivel de flujo génico estimado (N_m) fue de 0.11. Esto indica que hay menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones, lo que también explica el alto nivel de diferenciación. El N_m se calculó con la suposición

de que todos los individuos en el estudio siguen el modelo de “inland” el cual predice relaciones simples entre el número de migrantes que una población recibe por generación.

Cuadro 54. Resumen de estadísticos de variación genética para todos los *loci* entre las poblaciones.

	H_T	H_S	G_{ST}	Nm	NLP	PLP
Entre poblaciones	0.2710 ±0.0339	0.0480 ±0.0070	0.8227	0.1077	67	71.28%

H_T = Heterocigosidad en los *loci* polimórficos; H_S = Heterocigosidad promedio; G_{ST} = Grado de diferenciación genética; Nm= Estimado de flujo genético a partir de G_{ST} [$Nm=0.5 (1-G_{ST})/G_{ST}$]; NLP= Número de *loci* Polimórficos; PLP = Porcentaje de *loci* Polimórficos.

En el Cuadro 55 se muestran la identidad genética y la distancia genética de Nei (1987), la distancia genética es la cantidad de diferencias genéticas entre dos o más poblaciones o especies y ha sido formulada a partir de los siguientes supuestos: tasa de mutación constante e igual para todos los *loci*; poblaciones con tamaños efectivos iguales y constantes a través de las generaciones y que las poblaciones se encuentren en equilibrio mutación-deriva (Nei, 1972). Los datos revelan que para las poblaciones de *M. mathildae* la identidad genética mayor es entre las poblaciones de Los Cajones y Cañada de Juriquilla (0.92), mientras que entre Cañada de Hércules y Los Cajones es la menor (0.81). La mayor distancia genética entre las poblaciones de *M. mathildae* es entre Los Cajones y Cañada de Hércules, seguida por Cañada de Hércules y Cañada de Juriquilla (0.17) mientras que la menor es entre Cañada de Juriquilla y Los Cajones (0.07) Estos datos evidencian lo mostrado por análisis anteriores en lo concerniente a que hay mayor relación genética entre las poblaciones geográficamente más cercanas (Los

Cajones y Cañada de Juriquilla) que con la población geográfica más distante (Cañada de Hércules). *Echinocactus grusonii* comparada con este método se encuentra muy alejada, esto se debe primordialmente a que se trata de otra especie, pero los valores no son tan altos ya que pertenecen a la misma familia, además que *E. grusonii* se encuentra geográficamente más separada de las poblaciones de *M. mathildae*. *E. grusonii* tiene valores de identidad genética de entre 0.45 a 0.55 con las poblaciones de *M. mathildae*.

Cuadro 55. Medidas de Identidad Genética y Distancia Genética de Nei.

Población	<i>E. grusonii</i>	<i>Mm</i> (Hércules)	<i>Mm</i> (Juriquilla)	<i>Mm</i> (Cajones)
<i>E. grusonii</i>	****	0.4524	0.5521	0.5494
<i>Mm</i> (Hércules)	0.7932	****	0.8399	0.8147
<i>Mm</i> (Juriquilla)	0.594	0.1745	****	0.9244
<i>Mm</i> (Cajones)	0.5989	0.205	0.0787	****

Identidad Genética de Nei (Arriba de la diagonal) y Distancia genética (debajo de la diagonal).

Las relaciones entre las especies y poblaciones fueron establecidas mediante un dendrograma basado en la distancia genética de Nei (1972) utilizando el método UPGMA (Figura 46), el cual muestra la formación de dos grandes grupos. Un primer grupo contiene a la especie *E. grusonii* y otro grupo comprende a las tres poblaciones de *M. mathildae*, el factor interesante es que dentro de este grupo se forman dos subgrupos, uno conteniendo a la población de La Cañada de Hércules y otro a las poblaciones que se encuentran más cercanas geográficamente (Cañada de Juriquilla y Los Cajones).

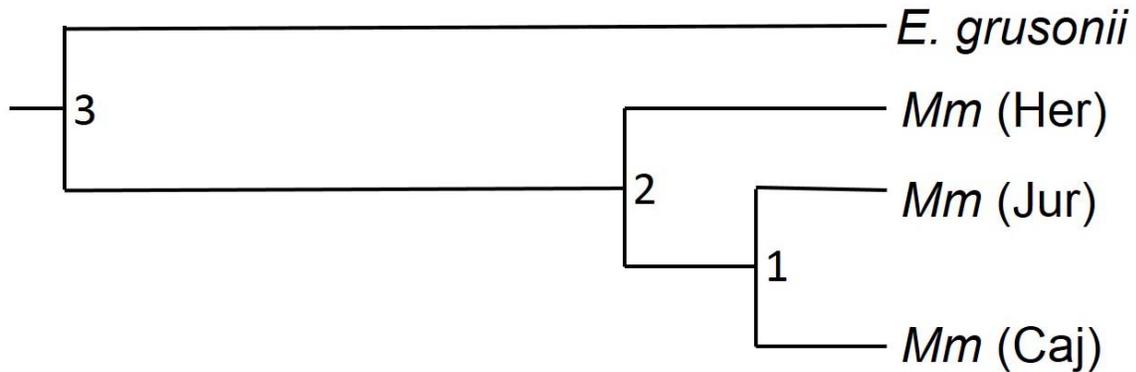


Figura 46. Dendrograma de poblaciones basado en la distancia genética de Nei utilizando el método UPGMA.

4.7.2.1. Escalado Multidimensional No-Métrico (MD Scale)

Se realizó un análisis por escalado multidimensional no métrico con los datos obtenidos de la matriz en el programa NTSYS en dos y tres dimensiones. Los resultados muestran que los individuos analizados en este trabajo se agrupan de la misma manera que en análisis anteriores, un grupo alejado que contiene a los individuos de *E. grusonii* y dos grupos que se encuentran interactuando y podrían llegar a comportarse como uno solo, que incluyen a los individuos de las poblaciones de *M. mathildae* de Cañada de Juriquilla y Los Cajones y otro que integra a los individuos de *M. mathildae* de la población de Cañada de Hércules (Figura 47).

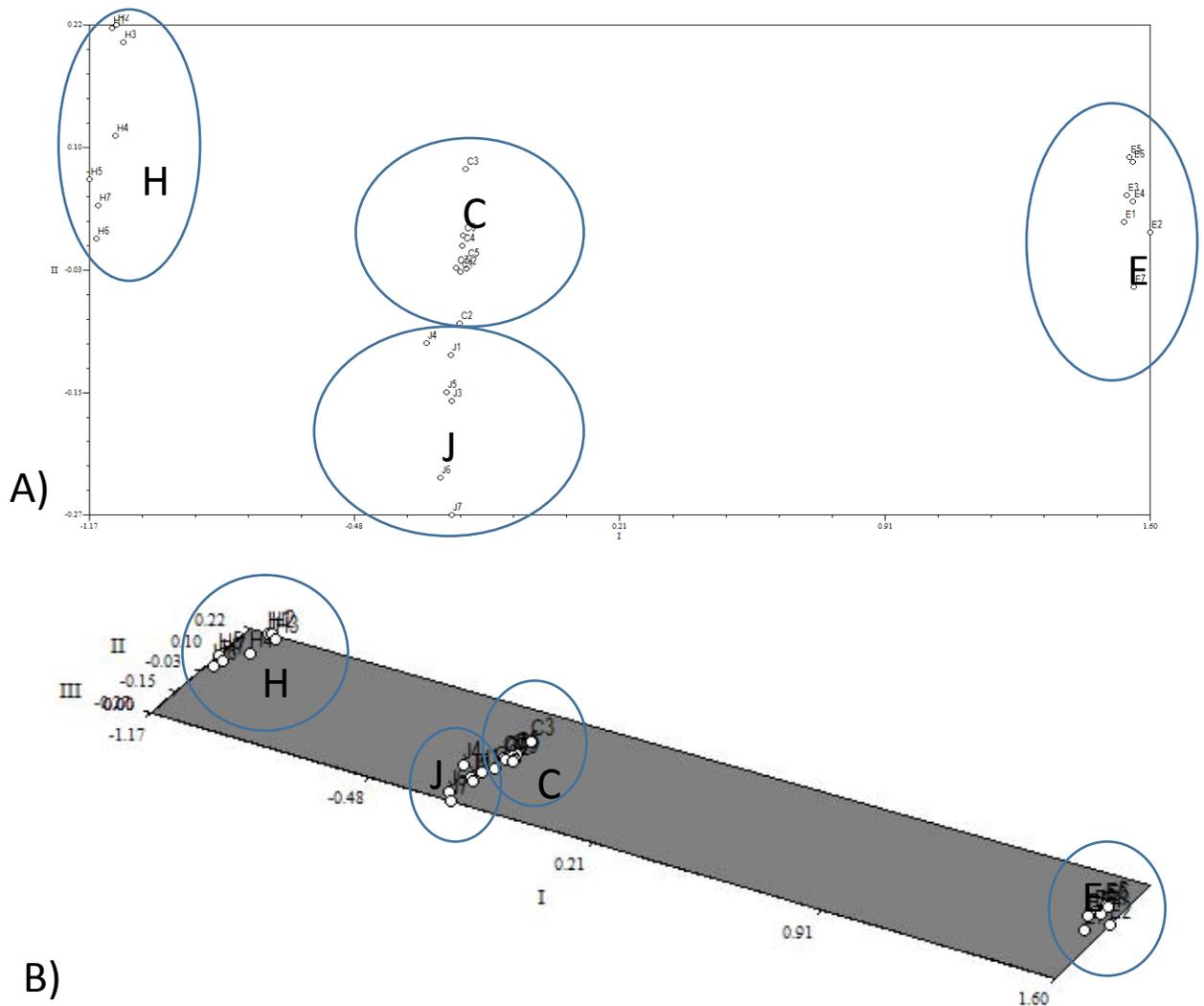


Figura 47. Escalado multidimensional no métrico en: A) dos dimensiones y B) tres dimensiones, en las que se muestra el agrupamiento de los individuos analizados en este estudio. H= *M. mathildae*, población Cañada de Hércules; C= *M. mathildae*, población Los Cajones; J= *M. mathildae*, población Cañada de Juriquilla y E= *Echinocactus grusonii*.

4.7.2.2. Análisis de Componentes Principales

Se realizó un análisis de componentes principales de los datos obtenidos para los iniciadores de ISSR evaluados para las 4 poblaciones mostrándose los resultados en un gráfico en tres dimensiones (Figura 48).

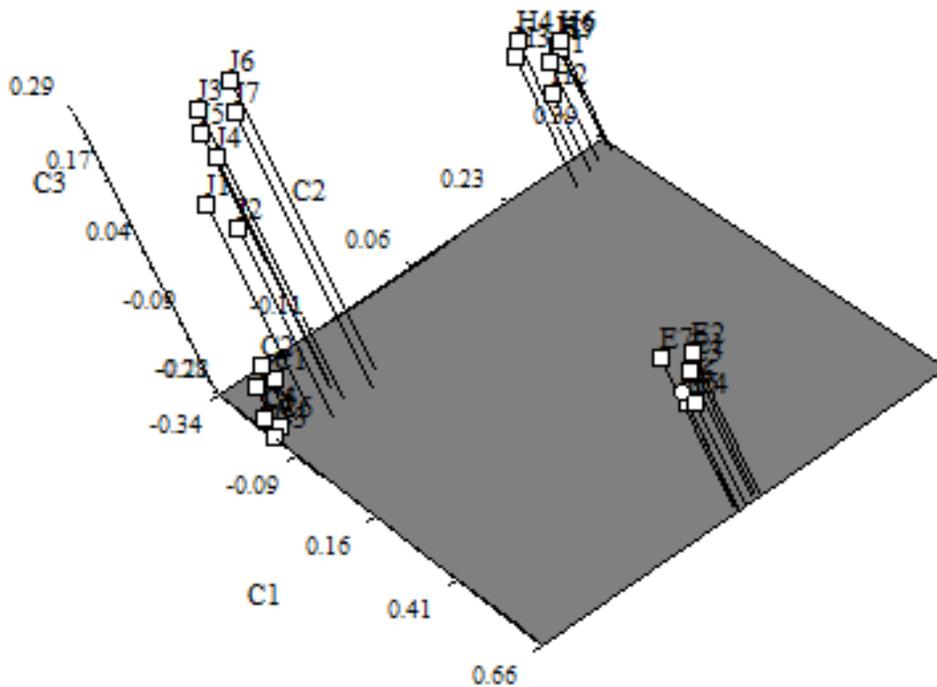


Figura 48. Análisis de Componentes Principales para los individuos de las 4 poblaciones estudiadas, en esta figura se muestra la distribución de los genotipos en tres grupos, uno comprendiendo las poblaciones de *M. mathildae* de La cañada de Juriquilla y Los Cajones, otro conteniendo solamente a la población de *M. mathildae* de Cañada de Hércules y un último grupo conteniendo los individuos de *E. grusonii* (E= *Echinocactus grusonii*; *Mammillaria mathildae* H= Hércules; J= Juriquilla, C=Cajones).

En el gráfico se observa la formación de tres grupos, el grupo 1 se encuentra formado por los catorce individuos de las poblaciones de *M. mathildae* de La Cañada de Juriquilla y de Los Cajones, un segundo grupo formado por los siete individuos analizados de la población de La Cañada de Hércules y un tercer grupo conteniendo a los siete individuos de la población estudiada de *E. grusonii*.

Según los análisis, las poblaciones de *M. mathildae* se encuentran muy relacionadas, pero considerando las distancias geográficas, las poblaciones que más interactúan son las más cercanas y las semillas pueden ser transportadas entre ellas con mayor facilidad. Dado que la ciudad de Santiago de Querétaro está

creciendo a velocidades alarmantes, ello puede aislar a las poblaciones y dejarlas sin la posibilidad de comunicarse una con la otra, lo que reduciría el flujo de genes y por ende la variabilidad genética. Las colectas clandestinas y la destrucción del hábitat también pueden ser factores que amenazan a las poblaciones de cactáceas. Por todo lo expuesto, se hace necesario el generar estrategias que mantengan la diversidad e identidad genética de las especies estudiadas de cactáceas.

V. CONCLUSIONES

En *E. grusonii* los tratamientos de escarificación química con exposiciones cortas a ácido clorhídrico concentrado y agua oxigenada al 9 %, permitieron aumentar la velocidad de germinación y el porcentaje total de germinación, siendo el mejor tratamiento exponer las semillas por 3 minutos en agua oxigenada al 9 %.

Para *M. Mathildae*, los tratamientos de escarificación química no mostraron aumentar o disminuir la eficiencia de la velocidad de germinación de las semillas, pero el tratamiento más alto de agua oxigenada al 9 % (34 horas de exposición) mostró que puede afectar el número final de plántulas obtenidas.

Los tratamientos de escarificación química con exposición a tiempos largos afectan de manera negativa a la germinación en ambas especies.

Las técnicas de micropropagación, a saber, la escarificación química para aumentar la velocidad y el porcentaje de germinación, así como las técnicas de morfogénesis indirecta y directa descritos en este trabajo son una excelente alternativa para aumentar el número de individuos en las poblaciones naturales tanto de *E. grusonii* como de *M. mathildae*, ya que se pueden obtener individuos a gran escala ya sea a partir de semilla o a partir de explantes de una planta madre.

Las técnicas evaluadas en este estudio generan una excelente alternativa para producir las plantas necesarias para disminuir los factores de riesgo que actualmente afectan a estas especies.

El análisis molecular mostró que las poblaciones de *M. mathildae* se encuentran genéticamente muy emparentadas y que existe una relación muy estrecha entre la distancia genética y la distancia geográfica.

Las poblaciones de *E. grusonii* y *M. mathildae* mostraron un bajo nivel de polimorfismo genético, lo que implica que estén amenazadas o en riesgo de extinción.

Las poblaciones estudiadas están genéticamente muy diferenciadas y la mayor parte de la variación genética detectada puede atribuirse a diferencias entre las mismas.

Se estimó que hay menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones, lo que explica también el alto nivel de diferenciación.

Los valores de diversidad genética bajos obtenidos para *Echinocactus grusonii* y *M. mathildae* dan cuenta del efecto que genera la fragmentación y destrucción del hábitat en una especie endémica, así como la necesidad de evaluar mejor el impacto biológico que genera el desarrollo humano sobre las especies.

Estos estudios demuestran la gran fragilidad de estas poblaciones y la urgencia de generar información similar para otras cactáceas del país, así como estrategias de propagación para su conservación.

VI. LITERATURA CITADA

- Aceves, J.; Hernández, J. (2000). Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. Revista Ciencia Administrativa del Colegio Profesional de Biólogos del Estado de Veracruz. pp: 64-69.
- Ault, J.R.; Blackmon, W.J. (1985). *In vitro* propagation of selected native cacti species. HortScience 20:541.
- Ault, J.R.; Blackmon, W.J. (1987). *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience 22:126-127.
- Anderson, E.F. (2001). The cactus family. 1a Edición. Timber Press, Portland, Oregon. 776 p.
- Ángulo-Bejarano, P.I.; Paredes-López, O. (2011). Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). Scientia Horticulturae 128:283-288.
- Arias, S. (1993). Cactáceas: conservación y diversidad en México. En: Diversidad Biológica en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. Volumen Especial XLIV. México, D.F. pp: 109-115.
- Azofeifa-Delgado A (2006). Uso de Marcadores Moleculares en Plantas: Aplicaciones en Frutales del Trópico. Agronomía Mesoamericana 17(2):221-242.
- Barbet, T. (2006). La multiplicación de las plantas. Viveros II Extra. pp: 33-38.
- Bauxbaum, F. (1958). The phylogenetic division of the subfamily Cereocidae, Cactaceae. Madroño 14:177-216.

- Becerra, R. (2000). Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas* 6(32):2-5.
- Behnke, R.H. (2008). The drivers of fragmentation in arid and semiarid landscapes. En: Galván, K.A.; Reid, R.S.; Behnke Jr, R.H.; Hoobs, N.T. (Eds.), *Fragmentation in Semi-Arid Landscapes*. Springer. The Netherlands. Pp: 305-40.
- Bornet, B.; Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215.
- Bravo-Hollis, H. (1978). *Las Cactáceas de México*. UNAM. México. 743p.
- Butterworth, C.A.; Wallace, R.S. (2004). Phylogenetic studies of *Mammillaria* (Cactaceae) – insights from chloroplast sequence variation and hypothesis testing using the parametric bootstrap. *Am. J. Bot.* 91(7):1086-1098.
- Butterworth, C.A.; Cota-Sánchez, J.H.; Wallace R.S. (2002). Molecular systematics of Tribe Cactaceae (Cactaceae: Cactoideae): A phylogeny based on rp116 intron sequence variation. *Systematic Botany* 27(2):257-70.
- 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. http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf
- Chávez-Martínez, R.J.; Hernández-Oria, J.G.; Sánchez-Martínez E. (2007). Documentación de factores de amenaza para la flora cactológica del Semidesierto Queretano. *Bol. Nakari* 18(3):89-95.

- Cházaro, M.; Hernández, M.P.; Cortés, J. (2001). Las cactáceas: Joyas de la Flora Mexicana. *Biodiversitas* 11(10):9-23.
- Clayton, P.W.; Hubstenberger, J.F.; Phillips, G.C. (1990). Micropropagation of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115 (2):337-343.
- Coombes, A.J.; Barreiro-Zamorano, S.; Rodríguez-Acosta, M. (2003). Lista de Plantas en los Jardines Botánicos de México. Asociación Mexicana de Jardines Botánicos, A.C., México. 58: 10-14.
- Collin, H.A.; Edwards, G.S. (1998). *Plant cell culture*. Bio Scientific Publishers. Inglaterra, 157p.
- Cota, H.; Wallace, R. (1996). La citología y sistemática molecular en la familia Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 2:27-44.
- Çalışkan, M. (2012). *Genetic Diversity in Plants*. InTech Publishers.498p.
- Debergh, P.C. (1987). Improving micropropagation. *Newsletter IAPTC* 51:2-10.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- El-Kazzaz, A.A; Saker, M.M; Mona, H.H. (1999). *In vitro* propagation and genetic molecular analysis of cactus (*Echinocactus grusonii*) variants using SDS-PAGE and RAPD fingerprinting. *Arb. J. biotech*, 2:79-88.
- Escobar, H.A.; Villalobos, V.M.; Villegas, A. (1986). *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Tissue Organ Cult.* 7:269-277.
- Estopà, M. (2005). El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Revista Extra* 2005. Consultado en 2010-04-19.

- Evans, N.E. (1990). Micropropagation, axillary bud multiplication. En: Pollard, J.W; Walker, J.M. (eds.). *Methods in Molecular Biology*, v 6, Plant Cell and Tissue Culture. Human Press. New Jersey. pp. 93-103.
- Fitz, M.W.A.; Anderson, E.F. (1997). México. En: Oldfield, S. (ed.). *Status Survey and Conservation Action Plan. Cactus and Succulent Plants*. UICN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. pp: 89-99.
- FIQMA, Fideicomiso Queretano para el Medio Ambiente (2010). <http://www.fiqma.org/index.php/que-hacemos/educacion-ambiental>
- Flores-Escobar, G; Gil-Vázquez, I.; Colinas-León, M.T.; Mata-Rosas, M. (2011). Propagación *in vitro* de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman Ex. Lindl. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(1):5-8.
- Fuller, D.; Fitzgerald, S. (1987). Conservation and commerce of cacti and other succulents. World Wildlife Fund. Traffic, U.S.A. 264p.
- García-Rubio, O. y Malda-Barrera, G.X. (2010). Predicted and confirmed distribution of the endangered endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) using niche prediction and spatial analysis. (Sometido para su publicación).
- García-Rubio, O. y Malda-Barrera, G.X. (2010a). Phenological changes in *Mammillaria mathildae* in a deciduous tropical forest associated to climate change. En: Dallmeier, F.; Fenech, A.; Maciver, D.; Szaro, R. (Eds.). *Climate Change, biodiversity, and Sustainability in the Americas*. Smithsonian Institution Scholarly Press. 183p.
- García-Rubio, O. y Malda-Barrera, G.X. (2010b). Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its natural habitat. *HortScience* 45(6):934-38.

- García-Rubio, O. y Malda-Barrera, G.X. (2010c) Rapide floraison de *Mammillaria mathildae* inoculé avec AM en culture aéroponique. (Sometido para su publicación).
- García, R.O. y Malda, B.G. (2010d) Field re-introduction of *Mammillaria mathildae* plantlets inoculated with native AMF consortium. (Sometido para su publicación).
- García-Rubio, O. y Malda-Barrera, G.X. (2009). Conservación *in situ* y *ex situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la ciudad de Querétaro. CIENCIA@UAQ 2:3-16.
- George, E.F.; Debergh, P.C. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. En: George, E.F.; Hall, M.; De Klerk.; G. Plant propagation by tissue culture, 3a edición. Vol 1. The Background. Springer, pp. 29-64.
- George, E.F.; Hall, M.A.; De kierk, G.J. (2008). Plant propagation by tissue culture. 3ª Ed., Vol. 1. The background. Springer Verlag. Dordrecht, Países Bajos. 501p.
- George, E.F.; Sherrington, P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Limited. Inglaterra. 690p.
- Hardesty, B.D.; Hughes, S.L.; Rodríguez, V.M.; Hawkins, J.A. (2008). Characterization of microsatellite *loci* for the endangered cactus *Echinocactus grusonii*, and their cross-species. Molecular Ecology Resources 8(1):164-67.
- Havel, L.; Kolar, Z. (1983). Microexplant isolation from Cactaceae. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2:349-353.

- Hernández, H.M. (2006). La vida en los desiertos mexicanos. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 188p.
- Hernández, H.M.; Godínez, A.H. (1994). Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- Hernández, J.G.; Chávez, R.J.; Sánchez, E. (2007). Diversidad y estrategias para la conservación de estrategias en el Semidesierto Queretano. *CONABIO. Biodiversitas* 70:6-9.
- Hernández-Hernández, T.; Hernández, H.M.; De-Nova, J.A.; Puente, R.; Eguiarte, L.E.; Magallón, S. (2011). Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98(1):1-18.
- Hernández, H.M.; Bárcenas, R.T. (1995). Endangered Cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns. *Conservation Biology* 9(5):1176-1188.
- Hernández, H.M.; Bárcenas, R.T. (1996). Endangered Cacti in the Chihuahuan Desert: II. Biogeography and conservation. *Conservation Biology* 10(4):1200-1209.
- Hernández, H.M.; Gómez-Hinostrosa, C.; Goettsch, B. (2004). Checklist of Chihuahuan Desert Cactaceae. *Harvard Papers in Botany* 9 (1):51-68.
- Hernández-Oria, J.G.; Chávez, R.; Galindo, M.; Hernández, G.; Lagunas, M.; Martínez, S.; Mendoza, R.; Sánchez, A.; Sánchez, M. (2003). Evaluación de aspectos ecológicos de una nueva población de *Mammillaria mathildae* Kraehenbuehl & Krainz en Querétaro. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 47:4-10.

- Hernández-Oria, J.G.; Chávez-Martínez, R.; Sánchez-Martínez, E. (2007). Factores de riesgo en las Cactaceae amenazadas de una región semiárida en el sur del desierto Chihuahuense, México. *Interciencia* 32(11):728-734.
- Hernández-Martínez, M.M. y Sánchez, E. (2002). Informe de una nueva localidad de *Mammillaria mathildae* y una propuesta para modificar su categoría legal de conservación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 1:4-10.
- Hudstenberg, J.F.; Clayton, P.W.; Phillips, G.C. (1992). Micropropagation of cacti (Cactaceae), *Biotechnology in agriculture and forestry. High-tech and micropropagation IV*. Springer-Verlag. Berlín, Alemania. 397p.
- Hu, C.Y.; Wang, P.J. (1983). Meristem, shoot tip, and bud cultures. En: Evans, D.F.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. (eds.) *Basic techniques of plant cell culture. Vol. 1. Techniques for propagation and breeding*. pp: 177-227.
- Hunt, D. (1999). *CITES Cactaceae Checklist*. 2ª edición. Kew: Royal Botanic Gardens. 315p.
- Jiménez-Sierra, C.L. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria UNAM* 12(1):3-23.
- Johnson, J.L.; Emimo, E.R. (1979). *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience* 14:605-6.
- Kalnay, E. y Cai, M. (2003). Impact of urbanization and land use change on climate. *Nature* 423:528-31.
- Kimura, M.; Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-38.

- King, M.R. (1957). Studies in the tissue culture of cacti. *Cact. Succ. J. (U.S.)* 29:102-104.
- Kolar, Z.J.; Bartek, J.; Vyskot, B. (1976). Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* through tissue cultures. *Experientia* 32:668-669.
- Kumar, A.; Parthiban, T.; Rao, G. (2008). Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Biol. Rep.* 36:1951-1956.
- Landrum, J.M. (2002). Four succulent families and 40 million years of evolution and adaptation to xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? *Taxon* 51:463-473.
- Lascuráin, M.; List, R.; Barraza, L.; Díaz-Pardo, E.; Gual-Sill, F.; Maunder, M; Dorantes, J.; Luna, V.E. (2009). Conservación de Especies *ex situ*, en capital Natural de México, vol. II: Estado de Conservación y Tendencias de Cambio. CONABIO, México. pp: 517-544.
- Lowe, D. G. (2004). Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *International Journal of Computer Vision* 60(2):91-110.
- Lynch, M.; Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPDs markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
- Mauseth, J.D. (1979). A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. Succ. J. (U.S.)* 51:186-187.
- Mauseth, J.D.; Halperin, W. (1975). Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polycantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 62:869-877.

- Minocha, S.C., Mehra, P.N. (1974). Nutritional and morphogenetic investigations of callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61:168-173.
- Montoya, L. (1991). Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. www.udec.cl/pasantias pp: 59-54.
- Mora, C. (2012). Manejo *in vitro* y caracterización molecular de Ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten.). Tesis Profesional de Maestría. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México.
- Morgante, M.; Oliveri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3:175-182.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A Revised Medium of Rapid Growth and bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106:283-292.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512p.
- Olmos, S.; Luciani, G.; Galdeano, E. (2010). Parte V, Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y mejoramiento vegetal. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. 643p.
- Oonsivilai, R.; Chaijareonudomrourng, N.; Huantanom, Y.; Oonsivilai, A. (2010). Extraction condition of *Echinocactus grusonii*. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 46:77-80.

- Ortega-Varela, R. (2004). Rescate y caracterización ecológica de especies vegetales en estado crítico de conservación, en el área del Proyecto Hidroeléctrico Zimapán, México. Tesis (licenciatura). Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Pérez, E. (2009). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 185p.
- Pierik, R.L.M.; (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. España. 326p.
- Pilbeam, J. (1999). *Mammillaria*. Nuffield Press, Oxford, UK. 376p.
- Piñero, D. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, En: Capital Natural de México, Vol 1: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. pp: 437-494.
- Piñero, D.; Baharona, A.; Eguiarte, L.; Rocha-Olivares, A.; Salas-Lizana, R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas. En: Capital Natural de México, Vol 1: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. pp:415-435.
- PNUMA-SEDESU-CONCYTEQ (2008). Perspectivas del Medio Ambiente Urbano: GEO Zona Metropolitana Querétaro. PNUMA, SEDESU, CONCYTEQ. Querétaro, México.
- Pradeep, R.; Sarla, N.; Diddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1):9-17.
- Quiala, E.; Matos, J.; Montalvo, G.; de Feria, M.; Chávez, M.; Capote, A.; Pérez, N.; Barbón, R.; Kowalski, B. (2009). *In Vitro* propagation of *Pilosocereus*

- robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. Journal of the Professional Association for cactus Development 11:18-25.
- Quiala, E.; Montalvo, G.; Matos, J. (2004). Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal* 4:195-199.
- Rentería-Alcántara M (2007). Breve Revisión de los Marcadores Moleculares. En Eguiarte L, Souza V y Aguirre X *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México, DF. pp: 541-566.
- Rodríguez-González, M. (2006). Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* HILD., (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca de Soto, Hidalgo, México.
- Rubluo, A.; Chávez, V.; Martínez, O.; Martínez, A. (1986). The recovery of endangered Mexican plant population through tissue culture, p. 428 En Somers, D.A.; Gengenbach, B.G.; Biesboer, D.D.; Hackett, W.P.; Green, C.E. (Eds.). VI Intl. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr. Univ. Of Minnesota, Minneapolis. 474 p.
- Saiki, R.K.; Gelfand, R.H. S. Stoffel, S.;Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sánchez, E.; Chávez, R.; Hernández-Oria, J.G.; Hernández, M.M. (2006). Especies de cactáceas prioritarias para la conservación de la zona árida Queretano-Hidalguense. Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro. 97p.

- Scheinvar, L. (2004). Flora Cactológica del Estado de Querétaro, Diversidad y Riqueza. Fondo de Cultura Económica, México. 389p.
- Shannon, C. E.; Weaver, W. (1963). The mathematical theory of communication. Uni. Of Illinois Press. Estados Unidos, 117p.
- Semagn, K.; Bjornstad, A.; Ndjiondjop, M.N. (2006). An Overview of Molecular Marker Methods for Plants. African Journal of Biotechnology 5(25):2540-2568.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres – Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio – Lista de Especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010.
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010.
- Simpson J (1997). Amplified Fragment Length Polymorphisms. Boletín de la Sociedad Botánica de México 60:73-76.
- Skoog, F.; Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118-131.
- Starling, R.J. (1985). *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cact. Succ. J. (U.S.) 57:114-115.
- Smith, R.H.; Burdick, P.J.; Anthony, J.; Reilley, A. (1991). *In vitro* propagation of *Coryphanta macromeris*. HortScience 26(3):315.
- Tellez-Román, J. (2012). Morfogénesis *in vitro* de cactáceas. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias. Colegio de Postgraduados Campus

- Montecillo. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad. Montecillo, Texcoco, estado de México, México.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.
- The Rice Genome Sequencing Project (2005). The Map-Based Sequence of the Rice Genome. *Nature* 436:793-800.
- Valadez, M.E.; Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas, teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa. D.F., México. 147p.
- Valadez, M.E.; Kahl, G. (2005). Huellas de ADN en genomas de plantas (Teorías y protocolos de laboratorio) Editorial Mundi-prensa, México, D.F. 147p.
- Vera-Alfaro, P.; Salas-Rodríguez, J.; Manduchi, R.; Sánchez-Martínez, E. (2010). Detección automática de la apertura y el cierre de las flores de *Mammillaria mathildae* Kraehenb & Krainz. *PACD* 12:89-87.
- Vyskot, B.; Jara, Z. (1984). Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 59:449-452.
- Wallace, R.S.; Dickie, S.L. (2002). Systematic implications of chloroplast DNA sequence variation in subfamily Opuntioideae (Cactaceae). *Succulent Plant Research* 6:9-24.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.
- Wolfe, A. (2000). ISSR Resource Website. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>
- Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-6.

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.

Yeh, F. C.; Boyle, T. J. B. (1997). Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129:157.