

**MICROPROPAGACIÓN, VALORACIÓN HORMONAL Y CÓDIGO  
DE BARRAS DE LA VIDA EN *Epithelantha micromeris* Y  
*Obregonia dengrii* PARA SU CONSERVACIÓN**

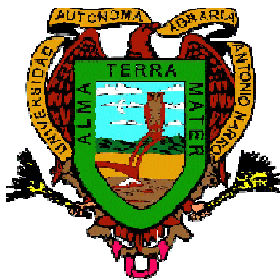
**MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES**

**T E S I S**

**Presentada como requisito parcial  
para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO**

**Universidad Autónoma Agraria  
Antonio Narro**



**Saltillo, Coahuila, México. Mayo de 2013.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**Micropropagación, Valoración Hormonal y Código de Barras de la Vida en**  
***E. micromeris* y *O. denegrii* para su Conservación**

**TESIS**

**POR:**

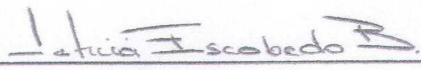
**MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES**

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y  
aprobada como requisito parcial para obtener al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN**  
**FITOMEJORAMIENTO**

Comité Particular de Asesoría


Asesor principal :

  
M.C. Leticia Escobedo Bocardo


Asesor :


  
Dr. M. Humberto Reyes Valdés

Asesor:

  
M.C. Alejandra Torres Tapia

Asesor:

  
Dr. Octavio Martínez de la Vega

  
Dr. Fernando Ruiz Zárate  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Mayo de 2013.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme la vida y ponerme buenas personas en mi camino, quienes colaboraron con material, ideas y sobre todo con acciones para realizar este trabajo de tesis.

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, por abrirme las puertas y darme la oportunidad no solo de realizar un posgrado a nivel maestría, sino además de conocer otro mundo, porque eso es la Narro “otro mundo”. Con un clima que la mayoría de las veces contrarresta con el resto de Saltillo, pero sobre todo con personas tan diversas, con una gran calidad humana a las que cuesta dejar de procurar y que no se pueden olvidar.

Al CONACYT por la oportunidad y el apoyo financiero aportado para la realización de un postgrado en la UAAAN.

A la M.C. Leticia Escobedo Bocardo, por permitirme trabajar en este proyecto de investigación, por su paciencia y su respeto, así como su disponibilidad y atención durante mi estancia en la Universidad, muchas gracias Maestra.

Al Dr. Humberto Reyes Valdés, por su apoyo y su interés en la realización de este trabajo, por su disponibilidad, su paciencia y sobre todo sus conocimientos aportados a lo largo de mi estancia, gracias Doctor.

A la M.C. Alejandra Torres Tapia por facilitar la realización de este trabajo, al permitirme el acceso a material y equipo de laboratorio, así como su disponibilidad y sus aportaciones a este trabajo, sin las cuales no podría haberse realizado, gracias Maestra.

Al Dr. Octavio Martínez, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en LANGEBIO y así concretar uno de los objetivos principales de este trabajo, gracias Doctor.

A Ana María Ochoa del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales por todo el apoyo recibido para la realización de este proyecto, así como su paciencia, su tiempo y su confianza, gracias Anita.

Al Biol. Fernando Hernández, por su apoyo continuo con el trabajo de laboratorio para el desarrollo de Código de Barras de la Vida en cactáceas, y por sus enseñanzas tan valiosas derivadas de su gran experiencia, además de su gran disponibilidad durante la estancia en LANGEBIO y sobre todo por su gran calidez humana.

A la M.C. Martha Gómez por sus aportaciones en la realización de este trabajo, que fueron claves para obtener buenos resultados. Gracias Martita por tu disponibilidad y por tu amistad.

A la Dra. Hermila y a la Q.F.B. Julia Medrano por su trabajo constante, su apoyo y sobre todo su gran paciencia en la obtención de resultados por LC.

A la Dra. Sonia Yesenia Silva Belmares de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A. de C, por su invaluable colaboración en la realización de este trabajo, pero sobre todo por ser una persona tan abierta y tan amable.

A mis compañeras de generación: Magalidia Arévalo Madrigal y Ana Osorio, con quienes compartí no solo clases sino un parte de mi vida, gracias por su amistad.

A mi compañera y amiga Erika Natalia Ríos Herrera, de quien estoy segura Dios la puso en mi camino, gracias por tu amistad, tu paciencia, tu confianza y por ser como eres. Me alegra haber compartido contigo esta experiencia gracias por brindarme siempre una palabra de aliento y sobre todo por estar.

A mis amigos: Yzmary Martínez Reséndiz, Cirilo Cahuare Ramos, Francisco Gordillo, María Luisa, Reina Rojas, Rosendo Hernández, Eva Arenas, con quienes compartí muchas experiencias de esas que se quedan grabadas en el corazón y de quienes siempre obtuve apoyo incondicional, aliento, y sobre todo su cariño, gracias amigos.

De forma muy especial a un gran amigo, Lizardo Rodríguez a quien tengo un entrañable cariño y un profundo respeto.

A todos aquellos que pertenecen al departamento de Fitomejoramiento, maestros, alumnos, personal administrativo y laboratoristas que aportaron pequeños detalles a este trabajo y sin los cuales no estaría completo, por todo muchas gracias.

## DEDICATORIA

A mis padres tan amados **Armando Orozco Escobedo y Martha Leticia Sifuentes Hernández**, de quienes siempre he recibido un gran apoyo y todo su amor incondicional.

A mis hermanos **Armando, Tomás, Erubiel, Roberto, Ana, César, Leticia**, a mis cuñadas **Ely, Laura, Lety** y cuñado **Francisco**, por brindarme todo su apoyo e infundirme ánimos en cada momento.

A mis sobrinos **Israel, Yuvisela, Ángel, Axel, Fátima, Mélni, Fco. Gabriel y María Fernanda** por su cariño y por las muchas alegrías vividas en el transcurso de este trabajo.

## COMPENDIO

**Micropropagación, Valoración Hormonal y Código de Barras de la Vida en  
*E. micromeris* y *O. denegrii* para su Conservación**

**POR:**

**MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**EN FITOMEJORAMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Mayo 2013.**

**M.C. Leticia Escobedo Bocardo -- Asesor**

**Palabras clave:** *Epithelantha micromeris*, *Obregonia denegrii*, hormonas, micropropagación, código de barras de la vida.

En el presente estudio se persiguen los siguientes objetivos i) Evaluar la efectividad de tratamientos hormonales en la micropropagación de brotes de vitroplantas de *Epithelantha micromeris* y *Obregonia denegrii*. ii) Determinar la concentración hormonal endógena en vitroplantas de *E. micromeris* y *O. denegrii* por espectrofotometría y cromatografía líquida (LC). iii) Describir el código de barras de la vida de *E. micromeris* y *O. denegrii* en base a las secuencias de dos genes (*matK* y *rbcL*). La micropropagación de ambas especies se realizó a partir de brotes de vitroplantas de un cm de altura de aspecto uniforme. Los explantes se colocaron en medio MS, adicionado con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en cuatro tratamientos diferentes (T1= Sin reguladores, T2= Kinetina 1 mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetina 1 mg L<sup>-1</sup> + AIA 1 mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetina 1 mg L<sup>-1</sup> + AIA 0.5 mg L<sup>-1</sup> + AG 1 mg L<sup>-1</sup>, T5 = Kinetina 1 mg L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> + AIA 1 mg L<sup>-1</sup> + AG 1 mg L<sup>-1</sup>). Se utilizó un diseño completamente al azar con seis repeticiones, cada repetición formada de cuatro plantas. Los brotes se mantuvieron en condiciones controladas con fotoperiodo de 16 hrs luz y temperatura de 26 °C. A los 30, 60 y 90 días se evaluó la altura, el diámetro, el peso fresco y el peso seco de las vitroplantas. Se determinó la concentración endógena de los RCV empleando; reactivo de Salkowsky, para auxinas y cromatografía líquida (CL) para determinar giberelinas. Para la obtención de código de barras de la vida se secuenciaron los genes matK y rbcL y posteriormente fueron comparados con la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). De acuerdo a los resultados obtenidos, los tratamientos T1, T2 y T3 producen vitroplantas de buena calidad en cuanto a diámetro, altura y peso, pero el T3 promueve además la formación de brotes en *E. micromeris*, por lo que podemos considerarlo como el mejor tratamiento. En *O. denegrii* los tratamientos no produjeron efectos significativos. En cuanto a la determinación de RCV se encontraron concentraciones de auxinas que van desde 0.12 a 0.28 ppm en *E. micromeris*, con tendencia descendente con respecto al tiempo de tratamiento. El T3 generó la mayor concentración (0.28 ppm) de AIA a los 30 días. Mientras que las concentraciones de ácido giberélico presentaron un comportamiento ascendente con respecto al tiempo de tratamiento de 0.2 a 4.5 ppm. En *O. denegrii* se encontraron concentraciones de AIA de 0.13 a 0.17 ppm. El testigo, T1 presentó la mayor concentración con 0.17 y 0.15 ppm a los 30 y 60 días, seguido del T3 y el T5, con 0.15 y 0.14 respectivamente a los 30 días. Con respecto al código de barras de la vida, las especies con mayor similitud a *E. micromeris* de acuerdo a las secuencias matK es *E. micromeris*, mientras que para rbcL la especie es *Maihuenia poeppigi*. Para *O. denegrii* la especie con mayor similitud de acuerdo a matK es *Lophophora williamsii*, mientras que por rbcL es *Weingartia kargliana*. La falta de precisión en la obtención del código de barras de la vida, se debió a que no existe información del gen rbcL, en la base de datos para *E. micromeris*, ni de rbcL y matK para *O. denegrii*, no obstante a lo anterior se logró obtener sus árboles filogenéticos, los cuales complementaron los análisis de identidad y



facilitaron la ubicación de las secuencias problema dentro de un grupo de especímenes emparentados genéticamente.

## ABSTRACT

### Micropropagation, Hormone Valuation and Barcode of Life *E. micromeris* and *O. denegrii* for Conservation

By:

MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES

MASTER OF SCIENCE IN PLANT BREEDING

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Mayo 2013.

M.C. Leticia Escobedo Bocardo -- Asesor

**Keywords:** *Epithelantha micromeris*, *Obregonia denegrii*, hormones, micropropagation, barcode of life.

In the present study, we pursue the following objectives i) Evaluate the effectiveness of hormonal treatments in micropropagated of *E. micromeris* and *O. denegrii*. ii) Determine the endogenous hormone concentration in vitroplants of *E. micromeris* and *O. denegrii* by spectrophotometry and liquid chromatography (LC) iii) Describe the barcode of life of *E. micromeris* and *O. denegrii* on the basis of the sequence of two genes (matK and rbcL). The micropropagation of both species was made from outbreaks of vitroplants of one centimeter height and uniform aspect. The explants were placed in MS medium, added with plant growth regulators (PGR) in four different treatments The explants were placed in four different treatments (T1= without regulators, T2= Kinetin 1mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetin 1mg L<sup>-1</sup> + IAA 1mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetin 1mg L<sup>-1</sup> + IAA 0.5mg L<sup>-1</sup> + GA 1mg L<sup>-1</sup>, T5= Kinetin 1mg L<sup>-1</sup> + IAA 1mg L<sup>-1</sup> + GA 1mg L<sup>-1</sup>). We used a completely randomized design with six repetitions, each one consisting

of four plants. The outbreaks remained under controlled conditions with a photoperiod of 16 hours of light and a temperature of 26 °C. In the day 30, 60 and 90 height, diameter, fresh weight and dry weight of the vitroplants were evaluated. The endogenous concentration of the PGRs was measured employing: the reagent of Salkowsky, for auxins and liquid chromatography for gibberellins. For obtaining barcode of life, the genes *matK* and *rbcL* were sequenced and they were subsequently compared with the database of NCBI (National Center for Biotechnology Information). According to the results obtained, the treatments T1, T2 y T3 produce vitroplants of good quality in terms of the diameter, height and weight, but the T3 also promotes the formation of outbreaks of *E. micromeris*, so we can consider it as the best treatment. The treatments produce no significant effects in *O. denegrii*. In regard to PGR is found of auxin ranging from 0.12 to 0.28 ppm in *E. micromeris*, with declining levels along the time of treatment. The T3 generated the largest concentration (0.28 ppm) of IAA at day 30. While concentrations of gibberellic acid showed increasing levels along the time of treatment going from 0.2 to 4.5 ppm. In concentrations of AIA found in *O. denegrii* were from 0.13 to 0.17 ppm. The witness, T1 showed the highest concentration with 0.17 ppm in the day 30 and 0.15 ppm in the day 60 followed by the T3 and T5, with 0.15 and 0.14 respectively in the day 30. With regard to the barcode of life, species with greatest similarity to *E. micromeris* based on the sequence *matK* is *E. micromeris*, while according to the sequence *rbcL* the species is *Maihuenia poeppigi*. For *O. denegrii* the species with the highest similarity according to *matK* is *Lophophora williamsii*, and based on *rbcL* is *Weingartia kargliana*. The lack of precision in obtaining the barcode of life was due to the fact that there is no information of the *rbcL* gene, in the database, for *E. micromeris*, nor *rbcL* and *matK* for *O. denegrii*, regardless of the exposed limitations, it was possible to obtain their phylogenetic trees, which complemented the analysis of identity and facilitated the location of the problem sequences within a group of genetically related specimens.

<b>INDICE DE CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
INDICE DE CUADROS.....	xv
INDICE DE FIGURAS.....	xvi
<b>I.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo General.....	3
1.2 Objetivos específicos.....	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Importancia de las cactáceas.....	4
2.2 Cactáceas de México.....	6
2.3 Legislación sobre cactáceas en peligro de extinción.....	8
2.3.1 Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.....	8
2.3.1.1 Probablemente extinta en el medio silvestre.....	9
2.3.1.2 En peligro de extinción.....	9
2.3.1.3 Amenazadas.....	9
2.3.1.4 Sujetas a protección especial.....	9
2.3.1.5 Especie endémica.....	10
2.3.2 Categorías utilizadas por la CITES y la IUCN.....	10
2.4 Clasificación taxonómica y descripción botánica de <i>E. micromeris</i> y <i>O. denegrii</i> .....	11
2.4.1 <i>Epithelantha micromeris</i> .....	11
2.4.1.1 Clasificación taxonómica.....	11
2.4.1.2 Distribución geográfica.....	12
2.4.1.3 Propagación.....	12
2.4.1.4 Situación ecológica.....	12
2.4.2 <i>Obregonia denegrii</i> .....	13
2.4.2.1 Clasificación taxonómica.....	13
2.4.2.2 Distribución geográfica.....	14
2.4.2.3 Propagación.....	15
2.4.2.4 Situación ecológica.....	15

2.5 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	17
2.5.1 Etapas de la micropropagación.....	19
2.5.2 Micropropagación de cactáceas.....	21
2.6 Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV).....	23
2.6.1 Auxinas.....	23
2.6.2 Giberelinas.....	25
2.6.3 Citocininas.....	26
2.7 Determinación Cualitativa y Cuantitativa de RCV.....	27
2.7.1 Métodos Cualitativos.....	28
2.7.2 Métodos Cuantitativos.....	29
2.7.3 Determinación de RCV en especies vegetales.....	32
2.8 Código de barras de la vida (ADN barcode).....	34
2.8.1 Código de barras de la vida en plantas.....	35
2.8.2 Metodologías de Análisis de Secuencias de código de barras de la vida.....	36
2.8.3 Código de barras de la vida en cactáceas.....	37
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Propagación in vitro de <i>E. micromeris</i> y <i>O. denegrii</i> .....	39
3.2 Establecimiento de los tratamientos.....	39
3.3 Determinación auxinas.....	40
3.3.1 Preparación de la muestras.....	40
3.3.2 Reactivo de Salkowsky.....	41
3.4 Determinación de giberelinas.....	42
3.4.1 Preparación de la muestra.....	42
3.4.2 Purificación de extractos vegetales por SPE.....	43
3.4.3 Curva de calibración de ácido giberélico (AG).....	43
3.4.4 Identificación y cuantificación de AG por LC.....	44
3.5 Código de barras de la vida.....	44
3.5.1 Preparación de la muestra.....	45
3.5.2 Extracción de ADN.....	45

3.5.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	46
3.5.4 Cuantificación de ADN por espectrofotómetro.....	46
3.5.5 Cuantificación de ADN por nanodrop.....	47
3.5.6 PCR.....	48
3.5.7 Secuenciación.....	50
3.5.8 Análisis de las secuencias matK y rbcL por MEGA.....	51
3.5.9 Análisis de las secuencias matK y rbcL por BLAST.....	54
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
4.1 Evaluación de los Tratamientos con RCV.....	56
4.1.1 <i>E. micromeris</i> .....	56
4.1.2 <i>O. denegrii</i> .....	62
4.2 Determinación de hormonas (auxinas y giberelinas).....	65
4.2.1 <i>E. micromeris</i> .....	65
4.2.2 <i>O. denegrii</i> .....	69
4.3 Código de barras de la vida.....	70
4.3.1 <i>E. micromeris</i> .....	70
4.3.2 <i>O. denegrii</i> .....	76
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>VI. RESUMEN.....</b>	<b>85</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>87</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
2.1	Categorías asignadas a especies en riesgo (Arias, 2005)	10
2.2	Género más comunes de cactáceas mexicanas que son anunciadas para venta en internet (Benítez, 2002)	17
2.3	Trabajos realizados en cactáceas utilizando la técnica de cultivo de tejidos <i>in vitro</i> (datos tomados de Trejo <i>et al.</i> , 2005)	22
3.1	Fracciones obtenidas por SPE	43
3.2	Coctel para amplificar el gen <i>rbcL</i>	48
3.3	Coctel para amplificar el gen <i>matK</i>	49
3.4	Secuencias de los iniciadores utilizados en la amplificación de ADN de <i>E. micromeris</i> y <i>O. denegrii</i>	50
4.1	Concentración de medias de cuatro variables para los 4 tratamientos.	57
4.2	Concentración de medias de cuatro variables para los 4 tratamientos.	63
4.3	Distancias genéticas entre secuencias de <i>E. micromeris</i>	71
4.4	Distancias genéticas en secuencias de <i>E. micromeris</i>	77

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
2.1	Abundancia de cactáceas mexicanas amenazadas por estado (Hernández y Godínez, 1994)	7
2.2	<i>Epithelantha micromeris</i> (Bravo y Sánchez – Mejorada, 1991)	11
2.3	<i>Obregonia denegrii</i> (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1991)	13
2.4	Distribución de <i>Obregonia denegrii</i>	14
2.5	Ácido indol-3-acético	24
2.6	Triptófano	24
2.7	Ácido Giberélico	26
2.8	Zeatina	27
2.9	Identificación de especímenes mediante árboles filogenéticos	37
3.1	Vitroplantas de <i>E. micromeris</i> y <i>O. denegrii</i>	40
3.2	Liofilización de vitroplantas	41
3.3	Extractos vegetales y SPE (extracción en fase solida)	42
3.4	Curva de calibración de concentraciones de AG	44
3.5	Alineamiento de secuencias de ADN por MEGA	51
3.6	Menú para correr el alineamiento de secuencias	52
3.7	Menú de datos	52
3.8	Selección de formato para almacenar resultados	52
3.9	Menú principal para análisis de distancias	53
3.10	Menú de parámetros para distancias.	53
3.11	Cuadro de resultado de distancias	54
4.1	Vitroplantas de <i>E. micromeris</i> a los 90 días de tratamiento	59
4.2	Vitroplantas de <i>O. denegrii</i> a los 30 días de tratamiento	64
4.3	Concentración de AIA en vitroplantas de <i>E. micromeris</i>	66
4.4	Concentración de AG en vitroplantas de <i>E. micromeris</i>	68
4.5	Concentración de AIA en vitroplantas de <i>O. denegrii</i>	69
4.6	(a) y (b) Amplificación de matK y rbcL en <i>E. micromeris</i>	70
4.7	Dendrograma de <i>E. micromeris</i> (E1matKF, Query ID: lcl 10213)	74



4.8	Dendrograma de <i>E. micromeris</i> (E2matKF, Query ID: lcl 64319)	75
4.9	Dendrograma de <i>E. micromeris</i> (E1rbcLR, Query ID: lcl 48641)	75
4.10	Dendrograma de <i>E. micromeris</i> (E2rbcLR, Query ID: lcl 29317)	76
4.11	Amplificación del gen matK en <i>O. denegrii</i>	76
4.12	Dendrograma de <i>O. denegrii</i> (O1matKF, Query ID: lcl 47077)	80
4.13	Dendrograma de <i>O. denegrii</i> (O2matKF, Query ID: lcl 21503)	80
4.14	Dendrograma de <i>O. denegrii</i> (O1rbcLR, Query ID: lcl 12929)	81
4.15	Dendrograma de <i>O. denegrii</i> (O2rbcLR, Query ID: lcl 57233)	81

## I. INTRODUCCIÓN

México es el más importante centro de concentración de cactáceas en el mundo, con un alto índice de endemismo a nivel genérico (73%), y específico (78%). La mayor parte de las especies habitan en las regiones áridas y semiáridas del país, particularmente en la porción sureste del Desierto Chihuahuense, incluyendo la Zona Árida Querétaro- Hidalguense (Hernández, 1994) y han sido motivo de atención en nuestro país desde tiempos prehispánicos (Bravo, 1978).

A través de la historia y aun en nuestros días las cactáceas han sido empleadas como alimento, un gran número de ellas tienen aplicaciones medicinales, son poseedoras de sustancias químicas de interés farmacológico, también son utilizadas como barreras físicas para delimitar territorio, como los órganos y algunas de ellas hasta llegaron a tener un significado divino (Bravo, 1978) y fueron utilizadas en ritos o ceremonias religiosas, como el caso del peyote.

Por todo lo anterior un número importante de estas cactáceas, sujetas a presiones de colecta y destrucción de su hábitat, están consideradas como especies en vías de exterminio. *Epithelantha micromeris* y *Obregonia denegrii* son catalogadas como especie con protección especial y especie amenazada respectivamente según la NOM-059-ECOL-2001. *E. micromeris* se distribuye desde el sur de Texas hasta el sur de Coahuila, Nuevo León y Zacatecas, mientras *O. denegrii* es endémica del Valle de Jaumave Tamaulipas. Estas peculiares plantas son muy apreciadas y buscadas pues son consideradas especies raras y muy bellas, y constantemente están sujetas a presiones de colecta por parte de coleccionistas nacionales y extranjeros.

A pesar de ser especies protegidas, el saqueo para su comercio ilegal así como la perturbación de su hábitat no ha cesado en nuestros días y es necesario encontrar alternativas que nos permitan propagarlas eficientemente.

Una opción de vital importancia que permite la propagación y preservación de especies de cactáceas en vía de exterminio es la tecnología de cultivo *in vitro*. Herramienta que permite generar todas las plántulas deseadas a partir de una sola. Malda et al., (1999) recomiendan su uso para asegurar la permanencia de las especies, ya que no solo permite romper el letargo que presentan las semillas, sino que además acelera el proceso de propagación tanto en tiempo como en número de plántulas generadas.

El éxito en el proceso de micropropagación de especies vegetales no solo depende de la aplicación de la técnica, sino de la correcta aplicación de los nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal (RCV). A pesar de ser especies que pertenecen a una misma familia sus requerimientos son diferentes, por lo tanto es imprescindible establecer procesos efectivos de micropropagación que aseguren la conservación de las mismas.

Pero no solo es a través de la micropropagación que se contribuye a la conservación de las cactáceas, existen además otras herramientas de tipo molecular que permiten identificar especies, determinar su parentesco y localizar poblaciones (Morse y Henifin, 1981; Soulé, 1986; Falk y Holsinger, 1991). Una de ellas mejor conocida como código de barras de la vida (barcode); es una iniciativa que propone la secuenciación de fragmentos cortos de ADN de una misma región génica encaminada a la generación de acervo de información básica que agilice la identificación de especies en peligro, evitando de esta forma el tráfico ilegal de especies. En este trabajo se busca establecer el proceso de micropropagación para *E. micromeris* y *O.denegrii*, así como la obtención de su código de barras de la vida, contribuyendo de esta forma a la generación de información dirigida a su conservación.

### **1.1 Objetivo General**

Micropropagar, realizar la valoración hormonal endógena y determinar el código de barras de la vida de *E. micromeris* y *O. denegrii* para su conservación

### **1.2 Objetivos específicos**

Evaluar la efectividad de tratamientos hormonales en la micropropagación de brotes de vitroplantas de *E. micromeris* y *O. denegrii*

Determinar la concentración hormonal endógena en vitroplantas de *E. micromeris* y *O. denegrii* por espectrofotometría y cromatografía líquida (LC).

Describir el Código de barras de la vida de *E. micromeris* y *O. denegrii* en base a las secuencias de dos genes (matK y rbcL).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia de las cactáceas

La familia Cactaceae está constituida por plantas llamadas comúnmente cactus o cactos, es originaria y endémica del continente americano y se distribuye desde Canadá hasta el sur de Argentina (Ríha, 1991) predominando en zonas áridas y semiáridas, siendo México el centro de concentración más importante del continente.

Son plantas perennes, cuyo ciclo de vida dura más de dos años y hasta por tiempo indefinido, están formadas de tallos columnares, esféricos o aplanados que están engrosados debido a que los tejidos de almacenamiento (parénquima) están muy desarrollados. Lo que les permiten almacenar nutrientes como agua y sales minerales. Las hojas están modificadas en espinas o en hojas muy pequeñas que reducen la pérdida de agua, sobre todo en tiempos de sequía (Bravo, 1995), sirven como protección ante depredadores, ayudan a la dispersión cuando se adhieren a la piel de algún animal, producen sombra y dan protección al tallo reflejando los rayos del sol (Arreola, 1997).

La mayoría de las cactáceas son hermafroditas, poseen flores de vistosos colores, y su tipo de reproducción puede ser sexual o asexual (multiplicación vegetativa) (Paniagua, 1980; Bravo, 1995). Sus frutos son descritos como bayas carnosas y en algunas especies son comestibles como por ejemplo; las tunas. Este tipo de plantas son poseedoras de un metabolismo fotosintético de tipo ácido crasuláceo (CAM), donde la entrada de CO<sub>2</sub> ocurre exclusivamente de noche, este gas al no ser utilizado inmediatamente por la falta de luz solar, es transformado en un ácido orgánico, en un malato, el cual

permanece en este estado durante toda la noche y al iniciar el día continua el proceso de fotosíntesis (Bravo, 1995).

Las cactáceas han sido motivo de atención desde tiempos prehispánicos, donde los tallos y frutos desde entonces ya eran utilizados como fuente de alimento humano, tal es el caso del nopal y probablemente el uso más común hasta nuestros días. Un gran número de ellas eran utilizadas por sus aplicaciones medicinales, poseedoras de sustancias químicas de interés farmacológico, o como barreras físicas para delimitar territorio, como los órganos, algunas hasta llegaron a tener un significado divino (Bravo, 1978) y fueron utilizadas en ritos o ceremonias religiosas, como el caso del peyote (*Lophopora williamsii*), un pequeño cacto con propiedades alucinantes, que hasta la fecha forma parte de tradiciones costumbristas de varios grupos étnicos, como los huicholes, tarahumaras, coras y tepehuanes (Alanís y Velasco, 2008).

Representan un valioso recurso natural por su capacidad de fijar el suelo evitando la erosión, son fuente inmejorable de forraje sobre todo en tiempos de sequía en zonas áridas, son fuente de mucilagos, de gomas, de pectinas y por la belleza de sus flores y por lo peculiar de la anatomía de sus estructuras son utilizadas como ornamentales. Siendo este último uso el que las ha llevado a un intenso saqueo con fines de comercialización ilegal (Alanís y Velasco, 2008).

Por todo lo anterior, la familia de las cactáceas, es uno de los grupos más amenazados del reino vegetal. Las poblaciones naturales de muchas de las especies han sido afectadas por las presiones del desarrollo humano, debido a la conversión del terreno para usos agrícolas o pecuarios y las actividades de extracción de las plantas con fines de comercio nacional e internacional. Como consecuencia la familia completa está incluida en el apéndice I y II de la Convención sobre el Tráfico internacional de Especies de Flora y Fauna Amenazadas (CITES), así como en el listado de la Unión

Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN) (Hernández y Godínez, 1994), ambos organismos internacionales están destinados a proteger las especies silvestres que tienen algún nivel de riesgo.

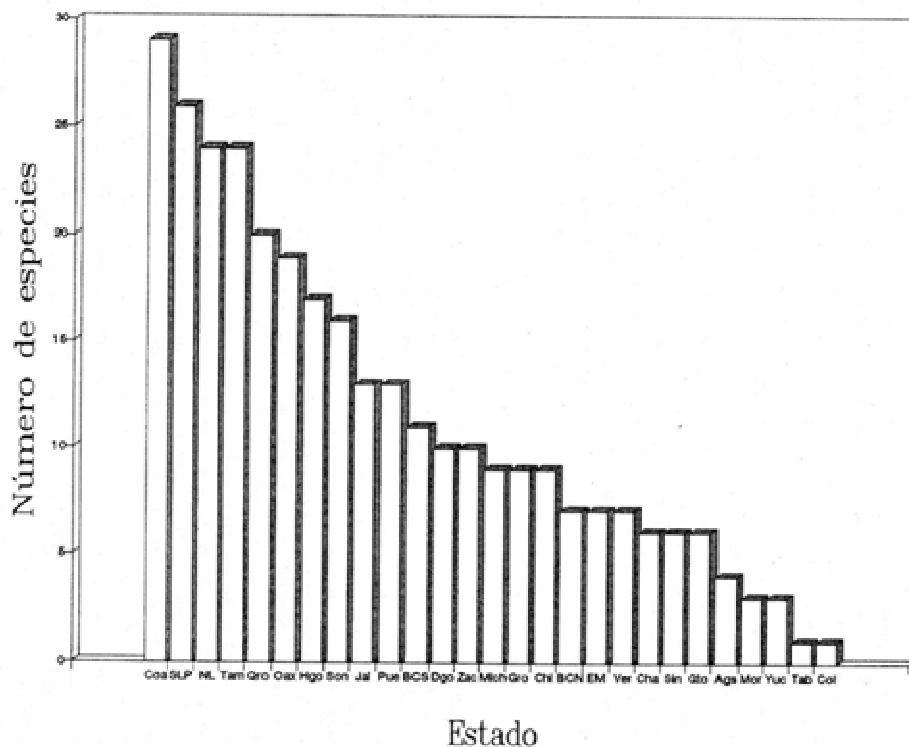
## **2.2 Cactáceas de México**

México es el país que concentra la mayor cantidad de cactáceas en el mundo. Posee un alto porcentaje de endemismo tanto a nivel genérico (73%) como específico (78%). La mayor parte de las plantas se encuentran distribuidas a lo largo y ancho del desierto Chihuahuense, zona comprendida entre los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí.

Hasta el día de hoy existen diferencias en cuanto al número exacto de especies propuesto por diferentes investigadores. Hunt (1992) reconoce 563 especies para México, mientras que Bravo (1978) y Bravo y Sanchez-Mejorada (1991a y 1991b) consideran la existencia de 744. Sin embargo el porcentaje de endemismo para cada una de estas estimaciones es muy similar: 77.9% y 78.9% respectivamente, lo cual es evidencia del carácter autóctono de las cactáceas mexicanas.

Es importante mencionar que las zonas con mayor concentración de cactáceas, en este caso las áridas y semiáridas, no solo se caracterizan por poseer una gran riqueza en especies, sino que además, son regiones con el mayor número de especies de cactáceas amenazadas.

Hernández y Godínez (1994), presentan a los estados con el mayor número de especies amenazadas, basándose en el listado de especies de cactáceas mexicanas amenazadas propuesto por Hunt (1992), entre los que se encuentran Coahuila (29 spp.), San Luis Potosí (26 spp.), Nuevo León (24 spp.) y Tamaulipas (25 spp.) justamente estados que comprenden el Desierto Chihuahuense (Figura 2.1).



**Figura 2.1 Abundancia de cactáceas mexicanas amenazadas por estado.** Estados: Aga=Aguascalientes, BCN=Baja California Norte, BCS=Baja California Sur, Cha= Chiapas, Chi= Chihuahua, Coa= Coahuila, Col=Colima, Dgo= Durango, EM= Estado de México, Gro= Guerrero, Gto= Guanajuato, Hgo= Hidalgo, Jal= Jalisco, Mich= Michoacán, Mor= Morelos, NL= Nuevo León, Oax= Oaxaca, Pue= Puebla, Qro= Querétaro, SLP= San Luis Potosi, Sin= Sinaloa, Son= Sonora, Tab= Tabasco, Tam= Tamaulipas, Ver= Veracruz, Yuc= Yucatán, Zac=Zacatecas (Hernández y Godínez, 1994).

De igual forma también hay un gran número de especies en peligro en la Zona Queretano-Hidalgense, donde Querétaro presenta 20 spp amenazadas e Hidalgo 18 spp, mientras que en el Desierto Sonorense: Sonora (17 spp), Baja California Sur (12 spp) y Baja California Norte (7 spp).

Hernández y Godínez (1994) calcularon además el número de cactáceas amenazadas por regiones y obtuvieron: 89 cactáceas amenazadas en el Desierto Chihuahuense; 35 para el Desierto Sonorense y 31 para la Zona Árida Queretano-Hidalgense. El resto de las especies se reparten principalmente en los Valles de Tehuacán-Cuicatlan y regiones con clima altamente estacional en Oaxaca, Jalisco y estados del sureste.



México se coloca como el país con el mayor número de especies en riesgo, en total 285, número publicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 (Semarnat, 2002), la cual tiene por objeto reconocer las especies o poblaciones de flora y fauna silvestre en riesgo en el país. En cuanto a organismos internacionales la lista roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) incluye 66 especies, mientras que la CITES (Convención sobre el Tráfico Internacional de Especies Silvestres de Flora y Fauna Amenazadas, Apéndice I y II) incluye un total de 44 especies solo en el Apéndice I (Arias et al., 2005).

### **2.3 Legislación sobre cactáceas en peligro de extinción**

La protección oficial de la familia cactaceae como recurso natural en México según Bárcenas (2006) tiene un poco más de medio siglo. En el proceso han intervenido instancias de tipo federal, estatales, municipales, organizaciones no gubernamentales, académicos y amantes de las cactáceas, quienes a través de sus aportaciones generan un marco teórico y práctico dirigido a la conservación y aprovechamiento de estos recursos.

#### **2.3.1 Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.**

Disposición legal para la protección, aprovechamiento y comercio de especies Nativas de México, de flora y fauna silvestre; categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo (publicada el 06 de Marzo de 2002 en el Diario Oficial de la Federación). Para reconocer dichas especies se basa en un método de evaluación de riesgo de extinción (MER) y su clasificación en cuatro categorías.

- \* **E.**- Probablemente extinta en el medio silvestre
- \* **P.**- En peligro de extinción
- \* **A.**- Amenazadas
- \* **Pr.**- Sujeta a protección especial

### **2.3.1.1 Probablemente extinta en el medio silvestre**

Aquella especie nativa de México cuyos ejemplares en la vida libre dentro del territorio nacional han desaparecido, hasta donde la documentación y los estudios realizados lo prueban, y de la cual se conoce la existencia de ejemplares vivos, en confinamiento o fuera del territorio mexicano.

### **2.3.1.2 En peligro de extinción**

Aquellas especies cuyas áreas de distribución o tamaño de sus poblaciones en el territorio nacional han disminuido drásticamente poniendo en riesgo su viabilidad biológica en todo su hábitat natural, debido a factores tales como la destrucción o modificación drástica del hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros. (Esta categoría coincide parcialmente con las categorías en peligro crítico y en peligro de extinción de la clasificación de la UICN).

### **2.3.1.3 Amenazadas**

Aquellas especies, o poblaciones de las mismas, que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto plazo, si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones. (Esta categoría coincide parcialmente con la categoría vulnerable de la clasificación de la UICN).

### **2.3.1.4 Sujetas a protección especial**

Aquellas especies o poblaciones que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que coinciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación o la recuperación y conservación de poblaciones de especies asociadas. (Esta categoría puede incluir a las categorías de menor riesgo de la clasificación de la UICN).

### 2.3.1.5 Especie endémica

Aquella cuyo ámbito de distribución natural se encuentra circunscrito únicamente al territorio nacional y las zonas donde la Nación ejerce su soberanía y jurisdicción.

### 2.3.2 Categorías utilizadas por la CITES y la UICN

A nivel mundial la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN por sus siglas en inglés IUCN) compila información sobre el estado de conservación de las especies amenazadas y en peligro, que pueden ser utilizadas por agencias internacionales como la CITES o por gobiernos de países específicos. Los criterios utilizados por la UICN (IUCN 2004) se presentan en nueve categorías (Cuadro 2.1). La CITES por su parte ayuda a establecer un marco de referencia legal internacional para la prevención del comercio de especies amenazadas y su regulación (Rosser et al., 2004). Las especies se incluyen en tres apéndices de acuerdo a diferentes niveles de amenaza que resultan de su comercio internacional.

**Cuadro 2.1.** Categorías designadas a especies en riesgo (Arias, 2005).

NOM-059-ECOL-2001	UICN	CITES
E - Probablemente extinta en el medio silvestre	EX - Extinto	
	EW - Extinto en estado silvestre	
P - En peligro de extinción	CR - En peligro crítico	Apéndice I
	EN - En peligro	
A - Amenazadas	VU-Vulnerable	Apéndice II
	NT - Casi amenazado	
Pr - Sujeta a protección especial	LC - Preocupación menor	Apéndice III
	DD - Datos insuficientes	Apéndice III
	NE - No evaluado	

## 2.4 Clasificación taxonómica y descripción botánica de *E. micromeris* y *O. denegrii*

### 2.4.1 *Epithelantha micromeris*

Nombrada comúnmente botón o biznaga blanca chilona (NOM- 059-ECOL-2001); es una planta globular que llega a medir hasta 6 cm de diámetro, frecuentemente forma macollos con más de 10 miembros. Su tallo está compuesto de filas de pequeños tubérculos. En la punta de cada tubérculo hay areolas cubiertas de lana blanca, de las que emergen espinas blancas curvadas hacia el tallo, produce flores de color rosa pálido con vetas blancas. Los frutos son cilíndricos, de color rojo brillante, de 3 cm de largo, el cual contiene semillas de color negro en forma de cazuela de aprox. 2 mm de largo (Flores, 2005). Es una especie muy apreciada y muy buscada pues es considerada como una cactácea de ornato (Figura 2.2).

#### 2.4.1.1 Clasificación taxonómica

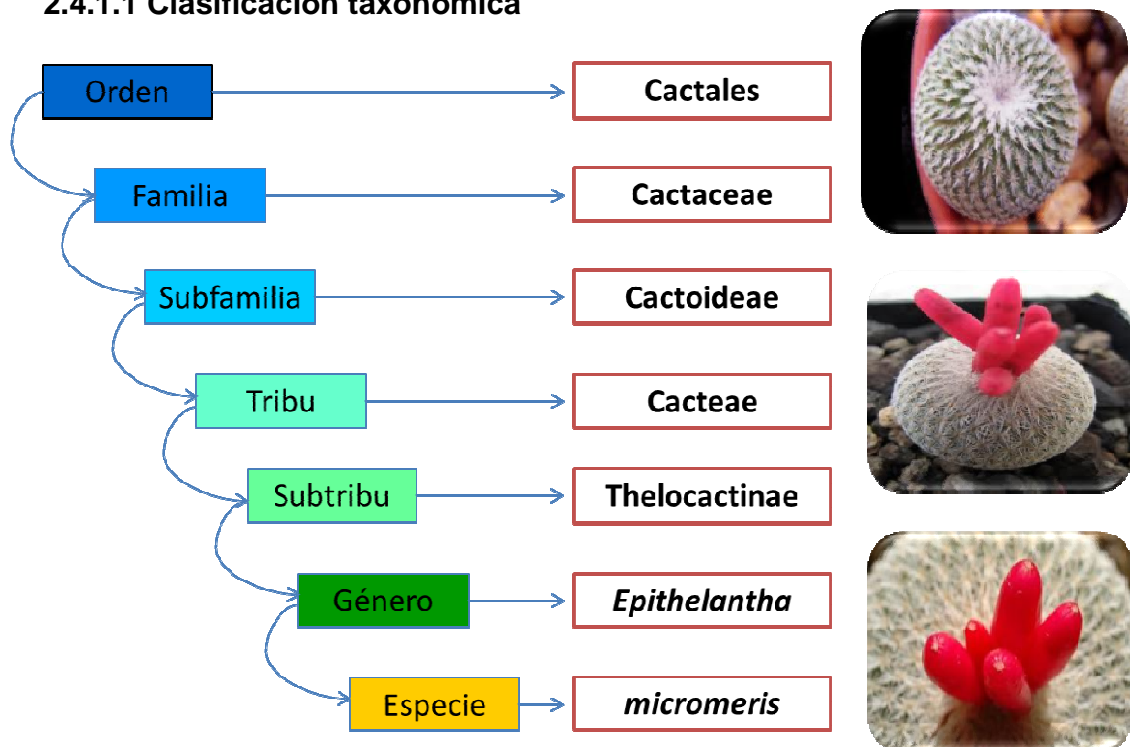


Figura 2.2 *Epithelantha micromeris* (Bravo y Sánchez – Mejorada, 1991)

#### **2.4.1.2 Distribución geográfica**

*E. micromeris* es común del Desierto Chihuahuense, donde se localiza en todo tipo de terreno; desde planicies arenosas de escasa vegetación xerófila, hasta paredes rocosas de altas montañas, en alturas comprendidas entre 600 a 1800 msnm, desde el sur de Texas hasta el Sur de Coahuila, Nuevo León y Zacatecas (Flores, 2005).

#### **2.4.1.3 Propagación**

Generalmente se cultiva por semilla y por micropropagación, requiere de sombra ligera cuando jóvenes, requiere de mucha agua debido a la morfología de su raíz.

#### **2.4.1.4 Situación ecológica**

*Epithelantha micromeris* está considerada actualmente como especie con protección especial según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.

## 2.4.2 *Obregonia denegrii*

Nombrada comúnmente biznaga de Obregón (NOM- 059-ECOL-2001); es una planta simple globosa-aplastada, que crece al ras del suelo, con el ápice hundido y lanoso, de color verde grisáceo o verde castaño, de hasta 15 cm de diámetro. La raíz es napiforme y posee tubérculos dispuestos en espiral, largos y triangulares. Florece durante el día en verano; las flores crecen entre la lana del ápice, en el centro del tallo, con forma de embudo y son de color blanco. Los frutos son desnudos y carnosos, en forma de clavo, de color blanco, secos cuando maduros (Figura 2.3). Las semillas son piriformes, con la testa negra, de 1 a 1.4 mm de largo.

### 2.4.2.1 Clasificación taxonómica

Sinónimos: *Ariocarpus denegrii* (Fric) W.T. Marshall, 1946.

*Strombocactus denegrii* (Fric) G.D. Rowley, 1974

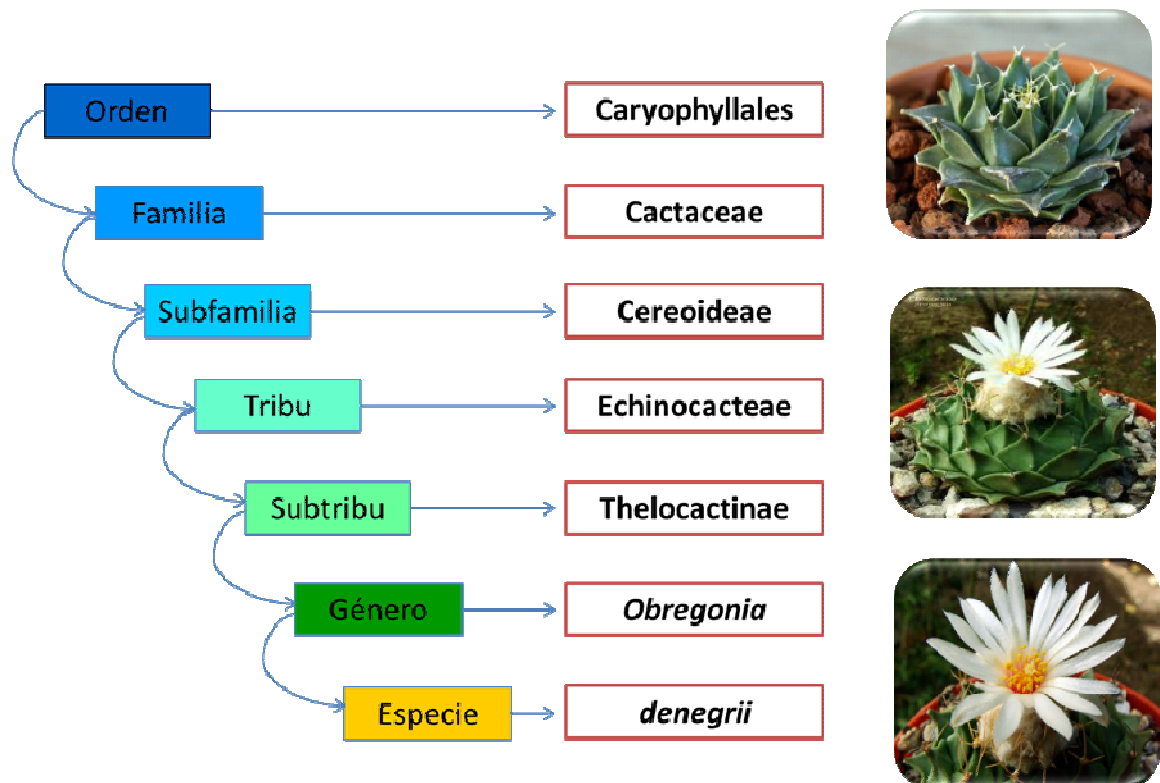


Figura 2.3 *Obregonia denegrii* (Bravo y Sánchez – Mejorada, 1991)

### 2.4.2.2 Distribución geográfica

Bravo (1937), menciona que *Obregonia denegrii* fue descubierta por Alberto V. Fric en el año de 1923. Le dio el nombre de *Obregonia denegrii* en honor del presidente de México Álvaro Obregón y de su secretario de Agricultura, el Sr. Denegrí.

Bravo y Sánchez Mejorada (1991) mencionan que *O. denegrii* es endémica del Valle de Jaumave, Tamaulipas (Figura 2.4) y según un estudio realizado en 1993 ocupa una superficie aproximada de 6.5 Km<sup>2</sup> (Anderson et al., 1994), tiene densidades variables que dependen del impacto provocado por los lugareños y el número poblacional es superior a 1, 500,000.



Figura 2.4 Distribución de *Obregonia denegrii*.

### **2.4.2.3 Propagación**

La reproducción en *O. denegrii* como en las demás plantas superiores tiene lugar por multiplicación vegetativa o reproducción sexual. Su propagación es por medio de semilla

Rowley (1978) citado por Farré (2001) menciona que la reproducción sexual generalmente en las cactáceas es en primavera, las flores maduran se abren y entran en anthesis; están llenas de abundante jugo azucarado que producen los nectarios y por la intensa brillantez de los colores de las flores o por el olor que atrae a los insectos, chupamirtos, murciélagos y/o mariposas nocturnas para aprovechar el néctar y es así como a través de éstos se lleva a cabo la polinización cruzada.

### **2.4.2.4 Situación ecológica**

Actualmente *O. denegrii* se encuentra catalogada como especie amenazada según la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) e incluida en el Apéndice I de la CITES, listado en el cual se incluyen todas las especies en peligro de extinción que están sometidas a comercio internacional; su comercio está prácticamente prohibido salvo en casos excepcionales, tales como intercambio científico o ejemplares propagados artificialmente en viveros registrados ante la secretaría de la CITES (Benítez y Dávila, 2002).

Para importar especies incluidas en este Apéndice se requiere tanto de un permiso de exportación expedido por la autoridad administrativa del país de origen, como de un permiso de importación expedido por la autoridad administrativa del Estado de importación, que solo se dará para fines no comerciales y si no es perjudicial para la supervivencia de la especie.

Según Glass (1997) citado por la CITES (2001), confirma que a pesar de ser muy apreciada por los coleccionistas, las poblaciones de *Obregonia denegrii* parecen relativamente estables, y la planta abunda mucho localmente y



tampoco informa de grandes amenazas. De hecho, Anderson et al., (1994) afirman que en la actualidad, la especie no está gravemente amenazada, sino más bien parece extendida y abundante en el Valle de Jaumave, y su futuro parece estar asegurado.

Por lo anterior, la autoridad administrativa de Suiza propuso que *O. denegrii* entre otras especies de cactáceas mexicanas fueran transferidas al Apéndice II basada en la inexistencia de comercio internacional importante de ellas, en que sus poblaciones no están amenazadas y en que no existen indicios de saqueo ilegal de la mismas. La propuesta fue rechazada por la autoridad mexicana y mostró al Comité de Flora de la CITES que existen argumentos ecológicos y de sobreexplotación, incluyendo saqueos ilegales por los cuales no pueden ser transferidas al Apéndice II. En este sentido el Comité de Flora decidió posponer la propuesta hasta validar la información y contar con más elementos para elaborar una nueva (Benítez y Dávila, 2002), es por ello que la autoridad científica mexicana se dio a la tarea de realizar una investigación vía internet, donde se comprobó la existencia de 19 proveedores internacionales provenientes de 8 países que anuncian la venta de cactáceas mexicanas, donde por lo menos 531 especies están en venta. Las especies más comercializadas en la red se presentan en la Cuadro 2.2. *O. denegrii* y *E. micromeris* se encuentran incluidas en esta la lista.

**Cuadro 2.2** Géneros más comunes de las especies de cactáceas mexicanas anunciadas para venta en internet (Benítez y Dávila, 2002).

<i>Acanthocereus</i>	<i>Epithelantha</i>	<i>Neoevansia</i>
<i>Acharagma</i>	<i>Escobaria</i>	<i>Neolloydia</i>
<i>Ancistrocactus</i>	<i>Escontria</i>	<i>Obregonia</i>
<i>Aporocactus</i>	<i>Ferocactus</i>	<i>Opuntia</i>
<i>Ariocarpus</i>	<i>Geohintonia</i>	<i>Ortegocactus</i>
<i>Astrophytum</i>	<i>Glandulicactus</i>	<i>Pachycereus</i>
<i>Aztekium</i>	<i>Grusonia</i>	<i>Pelecyphora</i>
<i>Bartschella</i>	<i>Hylocereus</i>	<i>Peniocereus</i>
<i>Carnegiea</i>	<i>Leuchtenbergia</i>	<i>Peresklopsis</i>
<i>Cephalocereus</i>	<i>Lophocereus</i>	<i>Pilosocereus</i>
<i>Coryphantha</i>	<i>Lophophora</i>	<i>Polaskia</i>
<i>Cylindropuntia</i>	<i>Mammillaria</i>	<i>Rhipsalis</i>
<i>Disocactus</i>	<i>Mammilloidia</i>	<i>Selenicereus</i>
<i>Echinocactus</i>	<i>Marginatocereus</i>	<i>Stenocactus</i>
<i>Echinocereus</i>	<i>Melocactus</i>	<i>Stenocereus</i>
<i>Echinomastus</i>	<i>Mitrocereus</i>	<i>Strombocactus</i>
<i>Encephalocarpus</i>	<i>Myrtillocactus</i>	<i>Thelocactus</i>
<i>Epiphyllum</i>	<i>Neobuxbaumia</i>	<i>Turbinicarpus</i>
		<i>Wilcoxia</i>

## 2.5 Cultivo de tejidos *in vitro*

Dentro de la biotecnología vegetal el “cultivo de tejidos *in vitro*” es una técnica que permite generar una gran cantidad de individuos en un período de tiempo corto. El procedimiento consiste en aislar y cultivar ciertas partes de una planta (explante) como células, tejidos y órganos en medios nutritivos adecuados (Ordóñez, 2003), bajo condiciones de asepsia y en condiciones ambientales controladas con la finalidad de generar una o varias plantas.

El cultivo se puede iniciar de cualquier parte de la planta: ápice de raíz y tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, semillas, frutos inmaduro, embriones maduros o inmaduros, segmentos de hojas y tallos, y algunas veces de ovarios, óvulos, anteras, polen y protoplastos (células desprovistas de pared celular) (Acebedo, 2009; Escobedo, 2000).

La obtención de un nuevo individuo por medio de cultivo de tejidos *in vitro* es posible gracias a la propiedad de las células vegetales denominada totipotencia celular; la cual consiste en que toda célula viviente que posea un

núcleo es capaz de reproducir fielmente la planta entera de la que procede. Cada célula posee por lo tanto la totalidad del patrimonio genético de la planta (Boutherin y Bron, 2002).

Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos las realizó Haberlandt en 1898, quien aisló células y tejidos de plantas superiores y las colocó en soluciones nutritivas para su crecimiento y estudio. Posteriormente y en base a los resultados obtenidos establece el término totipotencia celular en 1902, término ratificado más adelante por Skoog y Miller en 1957, al demostrar el requerimiento de un adecuado balance de auxinas y citoquininas para determinar el tipo de crecimiento o morfogénesis *in vitro* del material vegetal (Hewstone y Reyes, 1999)

En la actualidad existe una variedad de medios que se emplean en el cultivo de tejidos vegetales. Un medio básico es generalmente referido como aquel que no contiene reguladores de crecimiento y se le denomina con frecuencia con el apellido de la persona o personas que lo elaboraron por primera vez; uno de los medio más utilizados en la actualidad es el de Murashige y Skoog (MS, 1962).

El medio MS contiene macronutrientes (sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre), micronutrientes (sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto), vitaminas y carbohidratos como la sacarosa; la cual reemplaza el carbono que la planta fija normalmente de la atmósfera por medio de la fotosíntesis. (Rosell, 1990). Mientras que los medios a los que se agrega reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones se les conoce como modificados y dependen de los requerimientos de los explantes en forma específica (Amador, 1999).

Entre los reguladores más utilizados en el cultivo de tejidos se encuentran las auxinas (AIA-ácido indolacético, ANA-ácido naftalen acético),

citocininas (KIN- cinetina, 2iP- 6 y-y-dimetilalilamino purina) y giberelinas (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>7</sub>).

Existen tres formas diferentes de regeneración vegetal *in vitro*: organogénesis, embriogénesis y morfogénesis (proliferación de brotes axilares). Aunque la tasa de regeneración vegetal es generalmente mayor mediante organogénesis o embriogénesis, el cultivo de meristemos y ápices de brote que permite la proliferación de brotes mediante yemas axilares está todavía considerado como un método seleccionado para la propagación masiva *in vitro*.

### **2.5.1 Etapas de la micropropagación**

El proceso de micropropagación incluye cinco fases diferentes (Clemente, 1999), las cuales abarcan desde el estado de explante hasta la transferencia de una planta a condiciones de campo:

**Fase 0:** Selección y preparación de las plantas madre donadoras de los explantes, las cuales deben encontrarse en condiciones fisiológicas y sanitarias ópticas

**Fase 1:** Establecimiento del cultivo, se introducen los explantes iniciales bajo condiciones de asepsia en el medio de cultivo, estos son previamente sometidos a una desinfección.

**Fase 2:** Multiplicación, a partir de las yemas axilares de los tallos en desarrollo o mediante la inducción de yemas adventicias. Tiene como objetivo conseguir el número de plantas deseadas de acuerdo con el material obtenido en la fase I.

**Fase 3:** Elongación de los tallos y enraizamiento. Se procede a una individualización o a una última micropropagación. Una vez obtenido el número de plantas deseadas el trasplante se realiza en un tubo o en frascos, con un medio diferente con el fin de provocar el crecimiento y el enraizamiento. El

medio utilizado difiere del anterior en cuanto al equilibrio de los reguladores de crecimiento, auxinas y citocininas.

**Fase 4:** Aclimatización a condiciones *ex vitro*, mediante la exposición progresiva de las plantas a condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

Esta etapa es muy delicada, las raíces nacidas *in vitro* son extremadamente frágiles hasta el punto de que en contacto con otro sustrato puede morir por lo que es necesario esperar la formación y el crecimiento de nuevas raíces para que la planta pueda alimentarse. Las plántulas jóvenes presenta un comportamiento semejante al de los esquejes durante esta fase y requieren los mismos cuidados: higrometría elevada, temperatura alrededor de 20°C, posible necesidad de sombra y un control concienzudo de las posibles enfermedades. Las plantas se adaptan progresivamente al medio del invernadero tras esta fase delicada (que dura de dos a tres semanas).

La planta toma casi toda su energía del medio de cultivo cuando todavía se encuentra en la fase de aclimatización. La buena calidad del sistema radicular es especialmente importante en el caso de los árboles.

El sustrato utilizado debe ser sano y ofrecer una buena capacidad de drenaje. Se debe controlar la temperatura del ambiente y la del sustrato para evitar que exista una diferencia importante entre ambas. Resulta importante manipular la luminosidad para eliminar el riesgo de quemaduras. La protección sanitaria preventiva también es imprescindible y el empleo de CO<sub>2</sub> actualmente es un proceso de estudio para ofrecer buenos resultados entre ellos un mejor crecimiento de las plántulas. Debemos recordar finalmente que el control de todos los factores del medio es indispensable. La ausencia del control de uno de estos factores podría echar a perder todos los esfuerzos realizados para dominar los demás (Hurtado y Merino, 2000; Boutherin y Bron, 2002; Barba et al., 2001).

## 2.5.2 Micropropagación de cactáceas

La reproducción en las cactáceas es por medio de semillas o por multiplicación vegetativa y a pesar de que los frutos producen gran cantidad de semillas, solo algunas llegan a germinar y alcanzar la madurez, otras sirven como alimento de animales o son diseminadas y no quedan en un lugar apto para su crecimiento, esto sin mencionar el constante saqueo al que están expuestas con fines de comercialización o el crecimiento de áreas urbanas dentro de su hábitat que reduce notablemente la propagación de forma convencional, por lo cual, la tecnología de cultivo *in vitro* es de gran valor en la preservación y propagación de especies en general y de vital importancia para el caso de cactáceas en vías de extirpación.

Malda et al., (1999), indican que el cultivo *in vitro* asegura la permanencia de las especies, ya que primero permite romper el letargo que presentan sus semillas para luego acelerar el proceso de propagación tanto en tiempo como en número de plántulas generadas. Por su parte Santos et al., 2003, Malda et al., 1999 y Medeiros et al., 2006 coinciden en que la técnica de cultivo de tejidos es de gran importancia en la propagación de especies raras o en peligro de extinción que poseen un metabolismo ácido crasuláceo (plantas MAC), las cuales se caracterizan por poseer tasas de lento crecimiento, lo que influye no solo en que algunas plantas alcancen su madurez hasta una edad muy avanzada, sino que además presentan capacidad reproductiva limitada. Al comparar tasas de crecimiento de cultivo *in vitro* y *ex vitro* encontraron que *in vitro* se acelera notablemente la velocidad de crecimiento.

Algunos estudios sobre cactáceas empleando el cultivo de tejidos *in vitro* (Cuadro 2.3) tienen objetivos muy específicos, tales como: la biosíntesis de alcaloides, obtención de metabolitos de uso farmacéutico, estudios sobre morfogénesis (Clayton *et al.*, 1990; Moncousin, 1991a; Rodríguez y Rubluo, 1992; Velázquez y Soltero, 2001; Rodríguez, 2006), optimización del crecimiento de callo, entre otras.

**Cuadro 2.3** Trabajos realizados en cactáceas utilizando la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* (datos tomados de Trejo et al., 2005).

Autor (es)	Año	Especies	Aplicación
King	1957	<i>Nopalea</i> , <i>Willcoxia</i> , <i>Cereus</i> , <i>Pereskia</i> y <i>Echinocereus</i>	Inducción de callo
Sachar e Iyer	1959	<i>Opuntia dillenii</i>	Probaron efectos de AIA, KIN y Gas
Colomas	1971	<i>Pachycereus pringlei</i>	Cultivo <i>in vitro</i>
Minocha y Mehra	1974	<i>Neomammillaria prolifera</i>	Inducción de callo
Mauseth y Halperin	1975	<i>Opuntia polyacantha</i>	Organogénesis (hojas, espinas y brotes)
Kolar et al	1976	<i>Mammillaria woodsii</i>	Organogénesis y enraizamiento en sustrato de perlita
Mauseth	1977	<i>Opuntia polyacantha</i>	Estimulación de meristemos o areolas
Johnson y Emino	1979	<i>Mammillaria elongata</i>	Multiplicación de brotes
Vizkot y Jara	1984	<i>Mammillaria carmenae</i> , <i>M. prolifera</i> , <i>Astrophytum myriostigma</i> y <i>Tichocereus spachianus</i>	Multiplicación de brotes
Starling	1985	<i>Leuchtenbergia principis</i>	Multiplicación de brotes
Escobar et al	1986	<i>Opuntia amyclaea</i> y <i>Agave atrovirens</i>	Enraizamiento de explantes
Ault y Blackmon	1987	<i>Ferocactus acanthodes</i>	Enraizamiento de explantes
Martínez- Velázquez y Rubluo	1989	<i>Mammillaria san-angelensis</i>	Enraizamiento de explantes
Clayton et al	1990	Subtribu <i>Cactinae</i>	Enraizamiento de plántulas sin reguladores
Infante	1992	<i>Mediocactus coccineus</i>	Multiplicación de brotes
Hernández et al	1993	<i>Melocactus bellavistensis</i>	Multiplicación de brotes
Ortiz-Montiel y Vargas Figueroa	1995	<i>Heliocereus elegantissimus</i> var. <i>Elegantissimus</i>	Multiplicación de brotes
Soltero- Quintana	1996	<i>Strombocactus disciformis</i> y <i>Turbinicarpus pseudomacrochele</i>	Adaptación de brotes a invernadero
Velasquez-Enciso y Soltero Quintana	2001	<i>Epithelantha micromeris</i>	Adaptación de brotes a invernadero
Arias Azcona	2001	<i>Turbinicarpus schmiedickeanus</i>	Adaptación de brotes a invernadero
Arias Azcona	2002	<i>Pelecifora strombiliformis</i>	Adaptación de brotes a invernadero
Arenas et al	2003	<i>Turbinicarpus pseudopectinatus</i>	Inducción de brotes
Montalvo	2004	<i>Pilosocereus</i> sp	Enraizamiento de plántulas sin reguladores
Alvarado- Rodríguez et al	2008	<i>Peniosereus greggi</i>	Inducción de brotes
Ramos- Parra et al	2010	<i>Strombocactus disciformis</i>	Estimación del volumen de tejido vegetal <i>in vitro</i>

## **2.6 Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)**

El término de Regulador de Crecimiento Vegetal puede emplearse para designar a cualquier sustancia de tipo orgánico, que en muy pequeñas concentraciones provoca inhibición o estímulo de algún proceso fisiológico en las plantas (Salisbury y Ross, 1992). Su origen puede ser natural o sintético. A los de origen natural se le conoce comúnmente como hormonas o fitohormonas y son sustancias orgánicas de bajo peso molecular sintetizadas por las plantas en muy bajas concentraciones, actúan en sitios distantes del lugar de donde se producen e intervienen en procesos fisiológicos como el crecimiento del tallo, el desarrollo de tejidos, la caída de hojas entre otras. (Purves et al., 2002; Castillo et al., 2007).

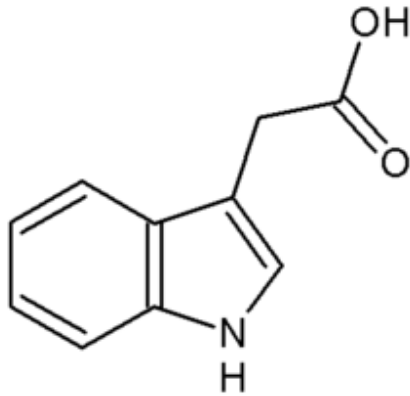
Existen cinco grupos de hormonas las cuales incluyen: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno.

### **2.6.1 Auxinas**

Son las primeras hormonas descubiertas en plantas y el grupo más conocido. Se caracterizan principalmente por su capacidad para inducir la elongación de las células, promueven la formación de raíces laterales y adventicias así como dominancia apical (Woodward y Bartel, 2005). Se sintetizan en regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí a otras partes de la planta, generalmente hacia la base (basípeta), estableciendo así un gradiente de concentración.

La actividad de las auxinas (del griego auxe = crecer) fue definida por Went en 1926, utilizando sistemas biológicos para ensayar efectos como el crecimiento y la curvatura del tallo en plántulas de avena, bioensayos que condujeron a la determinación de la estructura química del ácido indol-3-acético (Figura 2.5) con fórmula molecular  $C_{10}H_9NO_2$  y masa molecular 175.9 Da, siendo ésta la hormona más representativa del grupo, así como la auxina más activa (Koshiba, 1993).

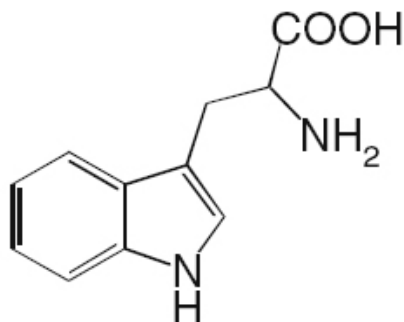




**Figura 2.5 Ácido Indol-3-acético o ácido indolacético (AIA)**

El AIA ha sido identificado como constituyente endógeno de un gran número de plantas superiores, es el compuesto del tipo de las auxinas más conocido, sin embargo las plantas contienen otros tres compuestos estructuralmente similares al AIA, (ácido 4-cloroindolacético, ácido fenilacético (APA) y ácido indolbutírico (IBA)) que provocan algunos efectos similares a éste. (Bandurski et al., 1993; Salisbury y Ross, 1992).

Se piensa que el ácido indol 3-acético proviene de la síntesis del aminoácido triptófano, debido a que su estructura tiene gran parecido con éste. El mecanismo para la síntesis de AIA involucra la remoción del grupo aminoácido y del grupo carboxilo terminal de la molécula de triptófano (Figura 2.6).



**Figura 2.6 Triptófano (Trp)**

Los efectos principales de las auxinas son:

- Crecimiento y elongación celular
- Incremento de la longitud del tallo
- Desarrollo del fruto en ausencia de polinización
- Producción de raíces adventicias

Los efectos de las auxinas más importantes para el cultivo de tejidos son el crecimiento celular y la elongación celular, sin embargo se tiene referencia de que algunos tejidos forman callos en respuesta a una auxina en particular, siendo a veces necesario utilizar altas concentraciones de auxina para la iniciación del callo. El 2,4-D (Ácido 2,4- diclorofenoxiacético) es la auxina más utilizada en la obtención de callos en *Arabidopsis thaliana* en diferentes explantes (Morris y Altoona, 1994).

### **2.6.2 Giberelinas (GAs)**

Las giberelinas pertenecen a un grupo de compuestos naturales llamados terpenoides. Los terpenoides están formados de unidades de isopreno de cinco carbonos, el precursor inmediato de las giberelinas es un diterpeno que contiene cuatro unidades de isopreno, (Arteca, 1996) específicamente compuestos cuyo esqueleto está constituido por un anillo de 20 a 19 carbonos.

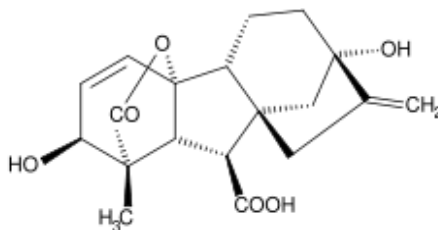
Se sintetizan en frutos y semillas en desarrollo y en regiones apicales. Influyen en diversos procesos como: germinación de semillas, división y elongación celular, floración y espigamiento, cuajado de los frutos y comportamiento poscosecha de los mismos (Castillo, 2007).

Este grupo de hormonas fue descubierto por fitopatólogos japoneses que estudiaban una enfermedad conocida como Bakane (planta loca) en arroz, causada por el hongo *Gibberella fujikuroi* en el año de 1809, en donde se

observaba un crecimiento excesivo en los tallos y brotes. Pero fue hasta 1955 donde se aisló el compuesto inductor del sobrecrecimiento del tallo, al que se denominó ácido giberélico.

Existen más de 90 GAs descubiertas, todas son llamadas ácido giberélicos, pero con un diferente subíndice para distinguirlas entre ellas. Algunos autores mencionan más de 121, sin embargo a nivel fisiológico solamente se pueden distinguir unos pocos miembros con capacidad para influir en el crecimiento vegetal o giberelinas activas (Arteca, 1996).

La GA<sub>3</sub> o ácido giberélico es la primer giberelina descubierta, la más activa y desde hace mucho tiempo disponible comercialmente. En general, las giberelinas que contienen 19 átomos de carbono son más activas que las que contienen 20, La estructura general de las giberelinas se muestra en la figura 2.7.



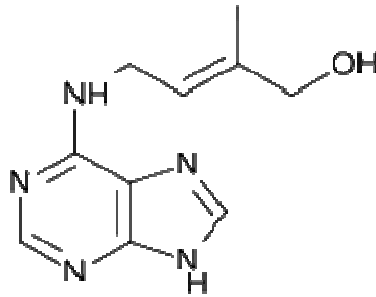
**Figura 2.7 Ácido Giberélico**

### 2.6.3 Citocininas

Las citocininas son compuestos sustituidos de adenina (con un anillo de purina) que promueven la división celular (citocinesis) en tejidos vasculares. Se encuentran en altas concentraciones en los meristemos y en tejidos en crecimiento, hasta donde es translocado por el xilema desde las raíces, donde es sintetizado por la ruta bioquímica de la adenina. Entre sus efectos en las plantas se pueden mencionar; la promoción de la división celular, la formación

de brotes, la germinación de semillas, el crecimiento de yemas laterales y supresión de la dominancia apical así como la inhibición del proceso de senescencia entre otros (Purves et al., 2002; Salisbury, 1994).

Entre las citocininas más frecuentes se encuentran la Kinetina, Benciladenina o Bencilamino purina (sintéticas) y la zeatina (natural). La Kinetina también conocida como cinetina o 6-furfuril amino purina, fue el primer activador de la división celular caracterizado por Skoog y Miller en 1955, mientras que la zeatina es la citocinina más común en las plantas (Figura 2.8).



**Figura 2.8 Zeatina**

## **2.7 Determinación Cualitativa y Cuantitativa de RCV**

Los RCV producidos en las plantas generalmente se encuentran, sobre bases de peso fresco, a niveles de 1 a 100 ng/g para AIA, de 1 a 1000 ng/g para giberelinas y de 1 a 100 ng/g para citocininas, por lo cual se requiere de procedimientos de análisis para la correcta detección, identificación y cuantificación de cantidades traza. Para el análisis cualitativo y cuantitativo de estos compuestos existen diferentes métodos, entre los que podemos mencionar; la cromatografía, la espectrofotometría, los bioensayos e inmunoensayos.

### **2.7.1 Métodos Cualitativos**

Entre los métodos utilizados para la identificación química de los RCV se encuentran los bioensayos, los cuales se pueden definir como una prueba sobre organismos vivos para detectar moléculas biológicamente activas que provocan algún efecto sobre estos.

A través de los bioensayos es posible medir la respuesta de una planta a una cantidad conocida de un RCV o a extractos de tejido. Se basan en las respuestas fisiológicas manifestadas en alguna parte de la planta y estas pueden tanto estimular el crecimiento como inhibirlo, dependiendo de la concentración.

Un ejemplo de bioensayo es la tan conocida prueba de curvatura de coleoptilos, utilizada para determinar la presencia de auxinas. Es la prueba más usada por los fisiólogos vegetales y continua teniendo gran importancia hasta la fecha. Se basa en el efecto que provocan las auxinas sobre las respuestas de curvatura a un estímulo direccional (tropísmos). La respuesta observada es que al aumentar la concentración de la auxina, aumenta la curvatura del coleoptilo.

Existen algunas otras entre las que se encuentran las pruebas de crecimiento de segmentos rectos, donde se mide el incremento total en la tasa de crecimiento de pequeños cilindros cortados del coleoptilo; la prueba de curvatura con órganos abiertos, que usa el efecto de curvatura en porciones de tallos jóvenes de chícharo que han crecido en la obscuridad por una semana y la prueba de crecimiento de raíces, donde se observa el efecto de las auxinas sobre la elongación de las raíces. Concentraciones de auxina capaces de estimular el crecimiento de coleoptilos, inhiben el crecimiento de raíces.

Entre los bioensayos para determinar giberelinas podemos mencionar la prueba en semillas, donde una aplicación de giberelinas a semillas germinadas provoca una elongación del hipocotíleo, la respuesta observada generalmente

es proporcional al logaritmo de la concentración de giberelinas; la prueba de endospermos en cebada, la cual consiste en cortar transversalmente los granos de cebada y colocarlos en la superficie de la solución que contiene giberelinas, después de dos días de incubación, la cantidad de azúcares reductores liberados del endospermo hacia la solución resulta proporcional a la concentración de giberelinas en el medio, y la prueba de senescencia de hojas, donde a bajas concentraciones el ácido giberélico retarda la senescencia y posterior pérdida de clorofila en discos aislados.(Audus, 1972; Volke, 1995)

### **2.7.2 Métodos Cuantitativos**

En la actualidad existe una variedad de técnicas que no solo ayudan a determinar la presencia de hormonas vegetales, sino que además ayudan a semicuantificar o cuantificar su concentración.

Una de las técnicas más utilizadas para la detección de AIA es mediante la reacción colorimétrica de Salkowsky, por medio de la cual se establece la presencia de grupos indol en solución a partir de tejidos vegetales. El método se basa en la oxidación que produce el ácido perclórico a las moléculas de indol, generando una coloración que va de la gama de los rosados a los fucsia, evidenciando la presencia de moléculas con grupo indol presumibles como compuestos auxínicos (Glickman & Desaux, 1995; Salkowsky, 1889)

De igual forma existen técnicas colorimétricas para la detección de ácido giberélico, una de ellas la reacción a base del reactivo Folling-Wu (ácido fosfomolibdico), un método sencillo y práctico, basado en la reacción de reducción que presenta el ácido molibdico frente a soluciones de ácido giberélico a diferentes pH. La reacción de reducción ocasiona un cambio de color del reactivo a azul mostrando la reducción ocasionada por la presencia de giberelina en solución (Graham & Henderson, 1960).

Ambas pruebas son llevadas a lectura en espectrofotómetro y en base a una curva de calibración se determina la cantidad de RCV en la muestra problema.

Por su parte la cromatografía ofrece una variedad de técnicas por medio de las cuales se puede detectar y cuantificar RCV en cantidades traza. El principio de la cromatografía se basa en la separación de mezclas y sustancias por adsorción selectiva. Una de las técnicas incorporadas es la convencional cromatografía en columna, cuyo objetivo es eliminar compuestos fenólicos y pigmentos. Entre los principales empaques empleados en la columna se encuentran la Polyvinilpyrrolidona (PVP), Sephadex LH-20, Celulosa y Absorbex RP-18. En esta técnica los extractos (vegetales) son eluidos con mezclas de disolventes a través de la columna empacada, provocando un gradiente de polaridad por medio del cual es posible eliminar la fracción correspondiente a pigmentos y recuperar un extracto exento de algunos compuestos que interfieran con su purificación y posterior identificación (García, 1997).

Existe un amplio rango de técnicas cromatográficas de acuerdo a los adsorbentes utilizados. En la cromatografía de capa fina (TLC) el adsorbente se encuentra sobre un vidrio o una película plástica, mientras que la cromatografía en papel, una muestra líquida fluye sobre el papel adsorbente.

La TLC se ha utilizado en la separación y análisis de muchos compuestos y es de acuerdo a éstos que se utilizan solventes específicos, siendo particularmente útil cuando se trata de sustancias no volátiles. La separación se produce con base en distintos procesos, adsorción, reparto, intercambio iónico y diferencias en el tamaño de las moléculas, lo que confiere ventaja sobre otras técnicas, ya que es rápida y sensible. La muestra se difunde menos y puede separar cantidades pequeñas, el revelado se lleva a cabo con ácido sulfúrico y ácido clorosulfónico (Jork, 1991).

Otras técnicas son: la cromatografía gas – líquido, que permite la separación de sustancias que pueden ser volatilizadas; la cromatografía iónica, donde un gas puede ser descompuesto en iones que interactúan con el adsorbente; la cromatografía de permeación de gel, la cual usa un adsorbente con poros de tamaño uniforme y por último la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), muy adecuada para el análisis de RCV. Para esta técnica existe una gran disponibilidad de soportes y columnas con diferentes selectividades y altas eficiencias que permiten rápidas velocidades de análisis a temperatura ambiente. Cuenta con una variedad de detectores altamente sensitivos, los cuales particularmente usados en combinación aumentan la sensibilidad y la selectividad de la técnica (Linskens y Jackson, 1987).

El material de empaque de columnas HPLC más popular es el octadecil silano (ODS o C<sub>18</sub>) que consiste en una cadena de octadecil carbono unida a macropartículas de silica, mientras que la radiación UV es uno de los detectores más usados. Por medio de éste se pueden detectar moléculas que absorben luz UV a ciertas longitudes de onda. Cantidades tan pequeñas como 4 ng de citocininas pueden detectarse a 254 nm, el límite reportado para AIA a 280 nm es de 5 ng a 20 ng mientras que las giberelinas absorben radiación UV solo debajo de 220 nm (Brenner, 1981).

HPLC bidimensional, técnica que permite la pre-separación de los componentes de una mezcla en una columna primaria (fase reversa), facilitando la selección de la fracción polar de interés para una posterior separación en una fase estacionaria polar selectiva.

Por último la cromatografía de gases acoplada a la espectroscopía de masas (GCMS) es considerada la mejor técnica para el análisis de RCV. A diferencia de técnicas como HPLC donde se usan detectores los cuales son destruidos y no permiten recobrar los niveles de radioactividad, mientras que



este método mide diluciones isotópicas que no presentan inconvenientes de este tipo (Arteca, 1996). Por medio de este método se han identificado giberelinas, que a pesar de que existe un gran número de ellas y son de estructura química similar, se pueden diferenciar por la sustitución de átomos, la cual se refleja en el espectro de masas, lo que permite una identificación exacta no solo del grupo (giberelinas) sino de la molécula en si con lo cual se determina si es biológicamente activa o no, al igual que se observan diferencias en los derivados que producen (Davis, 1988)

### **2.7.3 Determinación de RCV en especies vegetales**

Ramírez et al., (2001) determinaron la actividad biológica de giberelinas en extractos de pétalos y saco embrionario de flores de manzano. Para fraccionar los extractos utilizaron TLC en sílica gel, y para probar su acción, bioensayos de hipocotilo de lechuga. Encontraron que la actividad de giberelinas está presente tanto en pétalos como en saco embrionario en diferentes cantidades. En los cultivares Golden Delicious, Rome Beauty y Red Delicious el nivel de giberelinas en pétalos es de 0.78, 14.47 y 1.8  $\mu\text{g/g}$  de peso seco respectivamente, mientras que en saco embrionario es de 0.4, 0.18 y 10.8  $\mu\text{g/g}$  de peso seco.

Hernández et al., (2003) monitorearon la variación hormonal endógena provocada por el efecto del fotoperíodo y la temperatura en dos genotipos de cilantro (Marroquí y Sun Master), con el objeto de evitar el “punteo prematuro” en periodos de primavera-verano. Para la determinación utilizaron hojas liofilizadas (1 gr) en metanol al 80 %, cuyos extractos fueron purificados en cápsula de sílica gel y posteriormente sometidos a TLC. A partir de las zonas longitudinales formadas (Rf) recuperaron las hormonas (Auxinas, Giberelinas y Citocininas) y posteriormente probadas en bioensayos con segmentos de hipocotíleo de trigo, hipocotíleo de lechuga y con hojas cotiledonales de amaranto. La cuantificación la realizaron en base a curvas de calibración. Sus resultados mostraron que al incrementar la temperatura se incrementa también

la concentración de giberelinas y citocininas y se adelanta el punteamiento, mientras que con la reducción del fotoperiodo se incrementan las auxinas y se retrasa el punteamiento.

Ortiz et al., (2008) realizaron comparaciones en base a cuantificaciones de Citocininas y ABA en especies precoces y tardías de papa utilizando HPLC, con el objetivo de comprender su acción reguladora hormonal durante el proceso de tuberización. Las comparaciones fueron realizadas en extractos vegetales obtenidos de plantas en 3 diferentes estadios (1- tubérculos en final de latencia con brotes de 2-3mm de longitud, 2- expansión foliar de las primeras hojas y 3-al inicio de la tuberización). La cuantificación de Citocininas y ABA por HPLC indican que la precocidad de la tuberización está relacionada con la ausencia de ABA y los periodos de mayor latencia con su presencia, mientras que altas concentraciones de citoquininas son evidentes en variedades de mayor precocidad.

Dobrev et al., (2005) desarrollaron un método para purificar y determinar fitohormonas (AIA y ABA) en trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Jara) utilizando dos técnicas acopladas; la extracción en fase solida (SPE) y HPLC bidimensional (2D-HPLC). Colectaron granos de trigo entre 3 y 43 días después de la antesis, analizaron sus extractos y encontraron bajas concentraciones de AIA en etapas iniciales del desarrollo del grano, seguido por incrementos en los 20 días siguientes y una disminución al finalizar la etapa de maduración, mientras que las concentraciones de ABA se incrementaron de forma paralela al aumento de masa por grano. La eficacia del método se determinó al comparar los resultados obtenidos con las mediciones realizadas en 2D-HPLC acoplado a GC-MS y encontraron que la capacidad de detección por el método implementado es estadísticamente idéntico (95% confianza) a la detección por 2D-HPLC acoplado a CG-MS.

Olivella et al., (2001) desarrollaron dos métodos para determinar ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (AIA) y zeatina (Z) más ribósido de zeatina (RZ) en hojas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus. Ambos procedimientos

consistieron en una etapa inicial de extracción líquido-líquido con una solución extractante a base de acetona ó MeOH: ácido acético CH<sub>3</sub>COOH, BHT (2,6, di-t-butil 4-metil fenol) y ascorbato de sodio, una etapa de extracción en fase sólida (SPE) en minicolumna C18, una de purificación por medio de HPLC con una columna Tracer con fase estacionaria de octadecilsilil (ODS-2) y una de cuantificación por medio de ELISA por medio de anticuerpos monoclonales de ratón. Observaron que ambos métodos permiten la determinación de hormonas y que no hay diferencia significativas en las concentraciones de ABA y de AIA según la edad de las hojas. Mientras que para Z+ZR encontraron diferencias entre las hojas jóvenes (7 días de edad) y las adultas (21 días), pero no entre las adultas y las viejas.

## **2.8 Código de barras de la vida (ADN barcode)**

El Código de barras de ADN es uno de los métodos más innovadores utilizados en la tecnología genética, está basado en la secuenciación de fragmentos cortos de ADN para identificar organismos vivos y su objetivo es brindar soporte a programas de investigación sobre biodiversidad. Esta iniciativa propone emplear información dentro de una misma región génica en todas las especies vivientes en condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas, no pretende sustituir la taxonomía alfa y la filogenia sino facilitar la tarea de identificación de especies, revitalizar las colecciones biológicas y acelerar el inventario de la biodiversidad (Gregory, 2005; Hebert & Gregory, 2005; Schindel & Miller, 2005).

Con el propósito de establecer marcadores moleculares útiles en taxonomía, un grupo de científicos de la University of Guelph, Canadá, propuso una secuencia de 500 nucleótidos del gen mitocondrial de la Citocromo c Oxidasa I (COI) para identificación de especies animales en analogía a los "códigos de barras" de uso comercial (Hebert et al., 2003 a, b). Para poner en marcha la iniciativa se creó en el 2004 la secretaría del Barcode of Life (Código de barras de la vida) en el National Museum of Natural History, Washington DC,

USA y el Consortium for the Barcode of Life (CBOL), cuya función es igual a la de una librería universal, que relaciona cada barcode o “secuencia de ADN diagnóstica” con especies de referencia o «vouchers» asignados a nombres de la clasificación linneana, depositados en instituciones científicas (Lanteri, 2007).

Entre los megaproyectos internacionales, que proponen emplear el código de barras de la vida para identificar especies de grandes grupos taxonómicos, cabe citar el FISH-BOL ([www.fishbol.org](http://www.fishbol.org)) cuyo objetivo es obtener el código de barras de la vida de todas las especies de peces, el ABBI ([www.barcodingbirds.org](http://www.barcodingbirds.org)) referido a aves y el All Lep Barcode of life ([www.lepbarcoding.org](http://www.lepbarcoding.org)) cuya finalidad es obtener el código de barras de las 180.000 especies conocidas de Lepidoptera. En lo que respecta a la identificación de especies invasoras y plagas, cabe citar el INBIPS o Internacional Network for Barcoding Invasive and Pest species ([www.barcoding.si.edu/INBIPS.htm](http://www.barcoding.si.edu/INBIPS.htm)) (Lanteri et al., 2007).

### **2.8.1 Código de barras de la vida en plantas**

La secuencia del gen COI como código de barras ha sido de gran utilidad en la identificación de especies animales, sin embargo no es apropiada para la mayoría de las especies de plantas, debido a que la tasa de sustitución en la región COI es muy baja, lo que se traduce en ausencia de variación en ese fragmento para poder distinguir entre plantas que son muy cercanas genéticamente.

Para encontrar secuencias útiles en la obtención de código de barras en plantas, los investigadores se enfocaron al estudio de ADN plastídico y eligieron 7 regiones de ADN como posibles candidatos para determinar código de barras de la vida en plantas superiores. En base a los resultados obtenidos se propuso la combinación de dos regiones plastídicas; *rbcl* y *matK* (< 800 pb), las cuales proveen la universalidad y discriminación necesaria en la identificación de especímenes estrechamente relacionados con las plantas terrestres

(*Consortium for the Barcode of Life, Plant Working Group et al., 2009*). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que estos marcadores aun combinados no presentan variación suficiente en algunas familias de angiospermas por lo cual se ha propuesto la utilización de otros marcadores como la región espaciadora intergénica *trnH-psbA*, el intrón *trnL* y la región nucleolar *ITS* para estos casos (Kress et al., 2005; Taberlet et al., 2007; Gonzalez et al., 2009; Yao et al., 2010).

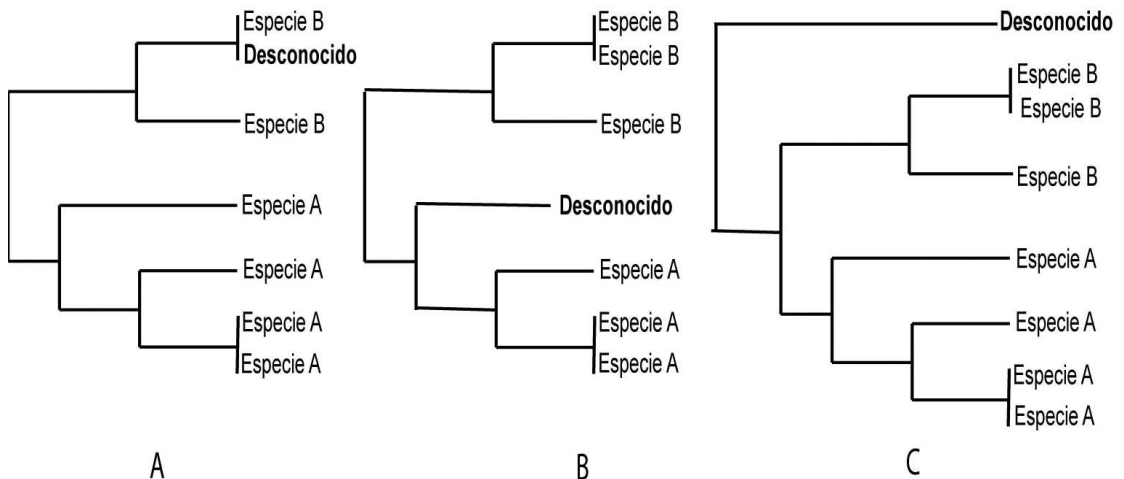
### **2.8.2 Metodologías de Análisis de Secuencias de código de barras de la vida**

Existen varios métodos para analizar los datos provenientes de un proyecto de código de barras de la vida. Entre estos podemos mencionar los métodos de distancia o de divergencia genética, la cual está determinada por el porcentaje de sitios nucleotídicos que varían entre una secuencia desconocida y las secuencias que se encuentran en la base de datos de referencia, corregida con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980). Por medio de éste método se establecen valores máximos de variación intraespecífica con lo que se puede sugerir si una secuencia nueva proviene de una especie distinta (Hebert et al., 2004a). Una de las ventajas de estos métodos es que consumen menos tiempo que aquéllos que están basados en parsimonia.

Una segunda herramienta de análisis son los árboles filogenéticos, en donde la identificación está dada por la posición de la secuencia desconocida en una filogenia, basada en su cercanía evolutiva con las otras secuencias de ese grupo monofilético. (Figura 2.9)

Otra herramienta que también es utilizada en el análisis de secuencias de ADN es conocida como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y permite identificar el vecino más próximo a la secuencia problema, calcular

divergencias entre la secuencia problema y las conocidas, además de construir árboles de distancia como el Neighbor Joining (NJ) (Lanteri, 2007).



**Figura 2.9 Identificación de especímenes mediante árboles filogenéticos.** A. La identificación es clara, el desconocido pertenece a la especie B, dado la alta similitud genética y su posición dentro de clado formado por otras muestras de la especie B. B. No está claro si se trata de una especie no representada en la base de datos (por ej., una especie nueva) o de un espécimen muy divergente de la especie A, un problema común en estudios filogenéticos. C. La muestra desconocida no es de la especie A ni de la especie B, dado que las especies A y B están más relacionadas una a la otra que cualquier está con el desconocido (Paz, 2011).

### 2.8.3 Código de barras de la vida en cactáceas

La CCMA (Certificación de cactáceas mexicanas amenazadas) en conjunto con la Iniciativa Darwin del gobierno del Reino Unido han desarrollado un proyecto binacional, el cual consiste en la utilización de herramientas moleculares tales como; la genotipificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y las huellas génicas de ADN con microsatélites, que permitan identificar especies de cactáceas de gran demanda en el comercio ilegal. Este proyecto basado en la determinación de código de barras contribuirá además a su bioconservación y su uso sustentable. Bárcenas y Hawkins, (2011) investigadores en este tratado determinaron código de barras y huella genética en 93 especies de cactáceas, de éstas, 79 pudieron ser identificadas con matK, para discriminar entre el resto utilizaron huella genética ya que algunos casos como *Turbincarpus* (perteneciente a la subfamilia Cactoideae ) y *Opuntia*

*rastrera* ( perteneciente a la subfamilia Opuntioideae) dos especies fácilmente de discriminar con una cuantas características morfológicas no fue posible diferenciarlas por medio de secuencias de matK. Este inconveniente también se presentó en forma viceversa, por lo cual los investigadores recomiendan complementar los estudios de código de barras o barcode con proyectos de huellas génicas.

Yesson et al., (2011) analizaron 528 barcode de especies de cactáceas, de las cuales 75% son especies mexicanas y probaron la utilidad de la región matK para identificar a nivel de especie. Sus resultados muestran que por medio de código de barras de la vida por matK únicamente identificaron 77% de las especies de la muestra total y de estas 79-87% de ellas son de importancia particular. Probaron además otra región nucleolar ITS para cactus de la subfamilia Opuntioidea y para el género Ariocarpus, observaron altas tasas de variación (86%) pero solo para Opuntioideae, por lo cual concluyen que matK provee información útil como código de barras de la vida en cactáceas, pero solo no es suficientemente variable en la identificación a nivel de especie.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Propagación *in vitro* de *E. micromeris* y *O. denegrii*

Se llevó a cabo la propagación de *E. micromeris* y *O. denegrii* a partir de brotes y plántulas establecidos con anterioridad en el laboratorio. Se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS) al 50% (MS50), es decir, con la cantidad de macro y micronutrientes reducida a la mitad, sin RCV y complementado con myo-inositol ( $100 \text{ mgL}^{-1}$ ), Ac. nicotínico ( $0.5 \text{ mgL}^{-1}$ ), piridoxina-HCl ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiamina-HCl ( $0.4 \text{ mgL}^{-1}$ ), glicina ( $2 \text{ mgL}^{-1}$ ), sacarosa (30 g) y agar (9 g) (Ver Anexo A). El pH se ajustó a 5.7 y se vació en frascos de vidrio, aproximadamente 20 ml en cada uno, por último se esterilizó a  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

Las vitroplantas fueron trasvasadas al nuevo medio (MS50), buscando depurarlas de hormonas que pudieran estar presentes por tratamientos anteriores y de esta forma iniciar el establecimiento de los nuevos tratamientos.

#### 3.2 Establecimiento de los tratamientos

Se seleccionaron brotes (*E. micromeris*) y vitroplantas (*O. denegrii*) de aproximadamente 1 cm de largo con aspecto y tamaño uniforme provenientes de cultivos sin RCV (Figura 3.1) Se colocaron en medio nutritivo MS al 100% complementado con myo-inositol ( $100 \text{ mgL}^{-1}$ ), Ac. nicotínico ( $0.5 \text{ mgL}^{-1}$ ), piridoxina-HCl ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiamina-HCl ( $0.4 \text{ mgL}^{-1}$ ), glicina ( $2 \text{ mgL}^{-1}$ ), sacarosa (30 g), agar (9 g) y diferentes concentraciones de RCV (AIA, AG y Citocininas). El pH se ajustó a 5.7 y se vació en frascos de vidrio, aproximadamente 20 ml en cada uno, por último se esterilizó a  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.



## Concentraciones de RCV

T1 = Sin reguladores (Testigo)

T2 = Kinetina ( $1\text{mg L}^{-1}$ )

T3= Kinetina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ) + AIA ( $1\text{mg L}^{-1}$ )

T4= Kinetina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ) + AIA ( $0.5\text{mg L}^{-1}$ ) + AG ( $1\text{mg L}^{-1}$ )

T5 = Kinetina ( $1\text{mg L}^{-1}$ ) + AIA ( $1\text{mg L}^{-1}$ ) + AG ( $1\text{mg L}^{-1}$ )

Se utilizó un diseño completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento. Se colocaron 4 brotes por frasco y se consideró a cada frasco como una repetición.



**Figura 3.1** Vitroplantas de *E. micromeris* y *O. denegrii*

Los brotes y las vitroplantas fueron incubados bajo condiciones ambientales controladas de fotoperíodo (16 horas luz) y temperatura ( $26^{\circ}\text{C}$ ) durante 30, 60 y 90 días. Al término de cada período se evaluaron la altura, el diámetro, el peso y el porcentaje de rendimiento en peso.

### 3.3 Determinación de auxinas

**3.3.1 Preparación de la muestra.** Los brotes y vitroplantas se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente fueron liofilizadas (24 hrs). Con la ayuda de un mortero se pulverizaron, se recolectaron en tubos eppendorf (1.5 ml) y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Liofilización de vitroplantas

**3.3.2 Reactivo de Salkowsky.** Con el objetivo de comprobar la sensibilidad del reactivo de Salkowsky se realizó una curva de calibración. Se preparó un patrón a diferentes concentraciones (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ppm) de ácido indolacético comercial (AIA) y se sometió a reacción en proporción de 2 ml de reactivo de Salkowsky por 1 ml del patrón de AIA, posteriormente se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia con la ayuda de un espectrofotómetro (Thermo) a 530 nm.

Una vez verificada la sensibilidad del reactivo, se procesó el tejido vegetal liofilizado. Para establecer los mg de tejido a utilizar en la detección de AIA, se realizaron una serie de mediciones en diferentes cantidades (15, 25, 50, 75 y 100 mg). Todas las mediciones realizadas presentaron concentraciones medibles por lo cual se eligió la mínima cantidad (15 mg).

Se colocaron 15 mg de tejido vegetal liofilizado en tubos eppendorf, se agregaron 1.5 ml de agua destilada, se agitó vigorosamente y se dejó en

refrigeración (4°C) por 1hr. Al término se centrifugó por 5 min a 10 000 rpm, se extrajo 1 ml de sobrenadante, se llevó a reacción en 2 ml de reactivo de Salkowsky, se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se leyeron en espectrofotómetro (Thermo) a 530 nm.

### 3.4 Determinación de giberelinas

**3.4.1 Preparación de la muestra.** Se colocaron 50 mg de tejido vegetal liofilizado en tubos eppendorf, se agregó 1.5 ml de metanol al 80% (4°C), se dejó en refrigeración toda la noche, se ultrasonicó durante 5 min y se centrifugó a 10, 000 rpm por 5 min. Se separó el sobrenadante en un tubo de ensaye limpio y se agregó nuevamente metanol al 80% (4°C), se dejó en refrigeración durante 4 hrs, se extrajo el segundo sobrenadante y se juntó con el primero. Posteriormente se pasó a través de un filtro pirinola de 45  $\mu$  y se llevó a separación por medio de SPE (Extracción en fase sólida), acoplado a una bomba de vacío (18 in.Hg) (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Extractos vegetales y SPE (extracción en fase solida)

### 3.4.2 Purificación de extractos vegetales por SPE

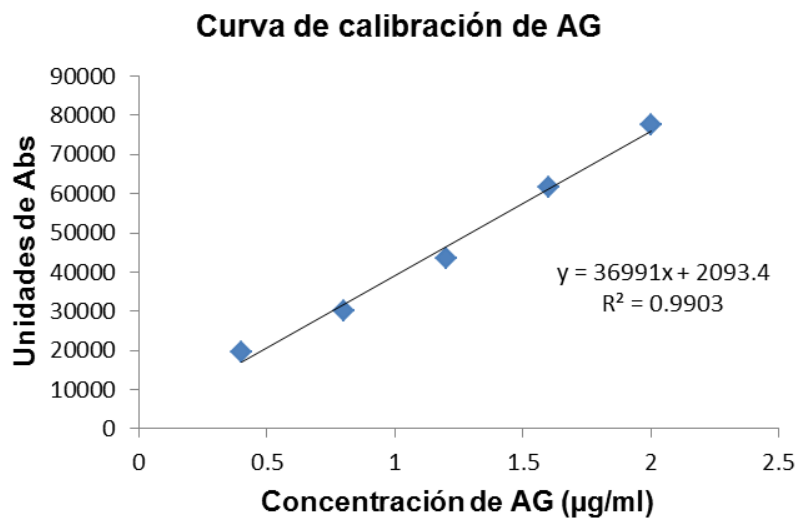
Se acondicionó la columna del SPE con metanol al 100% y posteriormente con agua destilada. Se realizó la purificación de giberelinas a partir de los extractos vegetales utilizando como referencia la metodología descrita por Dobrev et al., (2005) a la cual se le hicieron algunas modificaciones. Para obtener la primera fracción, se colocó 1 ml de extracto vegetal en la columna acondicionada, se agregó la fase móvil (acetonitrilo), se encendió la bomba de vacío y se reguló el flujo de salida de la muestra por medio de la llave de la columna. Para obtener diferentes fracciones se utilizaron diferentes soluciones como fase móvil, los cuales se muestran en el Cuadro 3.1.

**Cuadro 3.1.** Fracciones obtenidas por SPE

<b>Fracciones</b>	<b>Fase móvil</b>
F1	1 ml de extracto vegetal + 1 ml acetonitrilo
F2	1 ml acetonitrilo
F3	1 ml acetonitrilo:metanol 1:1
F4	1 ml acetonitrilo:metanol 1:1
F5	1 ml de metanol
F6	1 ml de metanol

### 3.4.3 Curva de calibración de ácido giberélico (AG)

Para la detección y cuantificación de ácido giberélico (AG) en el tejido vegetal liofilizado, se realizó una curva patrón con de AG comercial (0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 µg/ml) en metanol grado HPLC (Figura 3.4), se determinó la ecuación de la recta y el valor de  $R^2$ .



**Figura 3.4** Curva de calibración de concentraciones de AG.

#### **3.4.4 Identificación y cuantificación de AG por LC**

Las fracciones purificadas por medio de SPE fueron inyectadas al sistema del cromatógrafo, Agilent Technologies 1120 Compact LC, con columna Agilent Eclipse plus C18, 150 x 4.6 mm 5µ, utilizando como fase móvil A: ácido fórmico (HCOOH) 40 mM pH 3 y B: acetonitrilo: metanol (1:1), con un gradiente de 50%A y 50%B. Se encontró AG en la fracción 6, con un tiempo de retención de 2.27 minutos y en base a la ecuación de la recta se determinó la concentración de AG en extractos vegetales a los 30, 60 y 90 días de incubación.

#### **3.5 Código de barras de la vida**

Para obtener el código de barras de la vida se partió de plantas donadas por el museo del desierto de Saltillo, Coahuila (*E. micromeris*) y vitroplantas (*O. denegrii*) provenientes del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la UAAAN.

### 3.5.1 Preparación de la muestra

A las plantas no provenientes de cultivo de tejidos (*E. micromeris*) se les retiró la lana blanca que cubre el tallo, se fraccionaron, se pesaron (0.5 gr) y se sometieron a un proceso de lavado, el cual consistió introducir los fragmentos en alcohol al 70% por espacio de 2 minutos, seguida de una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y por último con agua destilada estéril por 1 min. Después de dejarlos secar sobre papel absorbente se colocaron en morteros limpios y estériles cubiertos con papel aluminio y se llevaron a ultracongelación por 30 minutos. Para el caso de los tejidos provenientes de cultivo de tejidos se siguió el mismo procedimiento, excepto los lavados, ya que al provenir de condiciones de esterilidad no es necesario realizarlos.

### 3.5.2 Extracción de ADN

Se utilizó el método de Doyle & Doyle (1990) para la extracción de ADN de *E. micromeris* y *O. denegrii*, el cual consiste en lo siguiente:

- Macerar las muestras vegetales previamente congeladas en los morteros y colocarlas en tubos Eppendorf.
- Agregar 800 µl de buffer de extracción (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8, Tris HCl 100mM pH 8, β-mercaptoetanol 0.2% y Agua ultra pura) previamente calentado a 65°C por 10 min (agitar vigorosamente).
- Incubar a 65 °C por 30 min con agitación ocasional y enfriara a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos y separar el sobrenadante en un tubo nuevo.
- Añadir 600 µl de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) invirtiendo el tubo para formar emulsión.
- Centrifugar nuevamente a 10000 rpm por 10 min.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

- Añadir el volumen de RNAsa apropiado para tener una solución de 10 µg (30 µl de RNAsa por cada 100 µl de ADN) e incubar a 37 °C por 40 minutos.
- Agregar, dependiendo del volumen de la muestra, 800 o 1000 µl de etanol absoluto a -20°C (puede usar isopropanol).
- Dejar que el ADN precipite en refrigeración por un periodo de 24 horas.
- Centrifugar a 10 000 rpm por 5 min, decantar el exceso y dejar secar la pastilla de ADN invirtiendo el tubo eppendorf en papel absorbente por 1 hora.
- Agregar T.E (40 a 60 µl) y conservar a 4 °C.

### **3.5.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa después de la extracción de ADN es necesario analizar su calidad. El gel de agarosa al 1% se preparó con 1 gr de agarosa en 100 ml de TBE 0.5 X (108 g de Tris-HCl, 55 g de ácido bórico y 160 ml de EDTA). Se vació a la cuba del aparato de electroforesis y se colocó el peine. Se dejó enfriar por 10 minutos y se retiró. Se cargaron las muestras de ADN (5 µl) con 1 µl de buffer de carga (0.025 g de Xileno-cianol, 0.025 g de Azul de Bromofenol, 3 mL de Glicerol y completando a 10 mL con TBE 0.5X). El gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg·mL<sup>-1</sup>), se lavó con agua estéril por 15 min y se observó a través de un transiluminador.

### **3.5.4 Cuantificación de ADN por espectrofotómetro**

Uno de los métodos más utilizados para la cuantificación del ADN es el análisis de la absorción UV. Este método proporciona una estimación simple de la concentración de ADN en una muestra, pero solo si ésta se encuentra pura, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorban longitudes de onda cercanas a la de los nucleótidos. Para evaluar la pureza de la muestra se determina la proporción OD 260 nm /OD 280 nm. Si la relación es

mayor a 1,6 puede deducirse que la muestra es lo bastante pura para confiar en la cuantificación espectrofotométrica.

Se realizaron diluciones del ADN en T.E 1X relación 1:100 (10 µl ADN en 990 µl de T.E 1X). Se llevaron al espectrofotómetro donde se midió la densidad óptica (OD) a 260 nm y a 280 nm y se obtuvo el ratio (OD 260 nm/OD 280 nm) para cada muestra.

### **3.5.5 Cuantificación de ADN por nanodrop**

El NanoDrop™ Espectrofotómetro 1000 tiene la capacidad de medir muestras de ADN concentradas, sin la necesidad de diluir, en cantidades mínimas de hasta 1 µl utilizando una longitud de onda de entre 220 nm a 750nm. Funciona a través de un software (ND-1000 V3 3.0), el cual realiza las lecturas y proporciona además valores de ratio de la muestra. En este trabajo se determinó la concentración y se obtuvo el valor de ratio en muestras de ADN de 1.5 µl.

A partir de los datos obtenidos en nanodrop se prepararon diluciones de ADN ajustadas a una concentración final de 40 µg/µl en un volumen de 50 µl, utilizando la fórmula:

$$C1 \cdot V1 = Cf \cdot Vf$$

Dónde:

C1 = Concentración de ADN obtenida por nanodrop

Cf = 40 µg/µl

Vf = 50 µl

V1 =? Volumen de ADN total necesario

Para la dilución se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas.



### 3.5.6 PCR

Para la amplificación de los genes matK y rbcL se prepararon dos cocteles, uno para cada gen en tubos eppendorf. Cuyo contenido se presenta en los cuadros 3.2 y 3.3.

**Cuadro 3.2** Coctel para amplificar el gen rbcL

<b>Componente</b>	<b>µl para 1 muestra de ADN</b>	<b>µl para 9 muestras de ADN</b>
Trehalosa 10%	25	225
H <sub>2</sub> O destilada esteril	12	108
Buffer 10 x PCR (Roche)	5	45
Mg Cl <sub>2</sub> 2.5 mM	2.25	20.25
dNTPs 10 mM	0.25	2.25
Primer rbcL F 10 µM	0.5	4.5
Primer rbcL R 10 µM	0.5	4.5
Taq polimerasa 1.25 U	0.5	4.5
<b>Total =</b>	<b>46</b>	<b>414 µl</b>

**414 / 9 = 46 µl por muestra**

**+ 4 µl de ADN [40 µg/ µl] templado**

**50 µl por tubo PCR**

**Cuadro 3.3** Coctel para amplificar el gen matK

<b>Componente</b>	<b>µl para 1 muestra de ADN</b>	<b>µl para 9 muestras de ADN</b>
Trehalosa 10%	25	225
H <sub>2</sub> O destilada esteril	12	108
Buffer 10 x PCR (Roche)	5	45
Mg Cl <sub>2</sub> 2.5 mM	2.25	20.25
dNTPs 10 mM	0.25	2.25
Primer matK F 10 µM	0.5	4.5
Primer matK R 10 µM	0.5	4.5
Taq polimerasa 1.25 U	0.5	4.5
<b>Total =</b>	<b>46</b>	<b>414 µl</b>

**414 / 9 = 46 µl** por muestra

**+ 4 µl** de ADN [40 µg/ µl] templado

**50 µl** por tubo PCR

Para llevar a cabo el proceso de amplificación se utilizaron dos termocicladores, uno con temperatura homogénea y uno de gradiente. El proceso se llevó bajo las siguientes condiciones.

- **Condiciones de Termociclador para amplificar rbcL**

1 ciclo	94°C	4 minutos
40 ciclos	$\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \\ 61^{\circ}\text{C} \\ 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$	30 seg
		35 seg
		35 seg
	72°C	10 min
	4°C	∞

- **Condiciones de termociclador de gradiente para amplificar matK**

1 ciclo	94°C	4 minutos
30 ciclos	94°C	30 seg
	55°C	35 seg
	72°C	35 seg
	72°C	10 min
	4°C	10 min

Para verificar la amplificación de los fragmentos matK y rbcL se corrió una electroforesis en gel para ADN [40 µg/ µl] templado, para matK y para rbcL de forma simultánea.

### 3.5.7 Secuenciación

El proceso de secuenciación de ADN de *E. micromeris* y *O. denegrii* se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO). Se utilizaron dos iniciadores, matK y rbcL, cuyas secuencias se muestran en el Cuadro 3.4. En sentido directo (F = Forward) y en sentido reversa (R = Reverse).

**Cuadro 3.4** Secuencias de los iniciadores utilizados en la amplificación de ADN de *E. micromeris* y *O. denegrii*.

Gen	Secuencia del iniciador	Sentido	Referencia
mat-K	cgtacagtacttttggtttacgag	Forward	rbcL and matK Earn Two Thumbs Up as the Core DNA Barcode for Ferns Fay-Wei Li, Li-Yaung Kuo, Carl J. Rothfels, Atsushi Ebihara, Wen-Liang Chiou, Michael D. Windham, Kathleen M. Pryer PLoS One. 2011; 6(10): e26597. Published online 2011 October 20. doi: 10.1371/journal.pone.0026597 PMCID: PMC3197659
mat-K	accagtcctctggaatcttggttc	Reversa	
rbc-L	atgtcaccacaaacagagactaaagc	Forward	
rbc-L	gtaaatcaagtcaccrcg	Reversa	

*Forward: secuencia directa*

### 3.5.8 Análisis de las secuencias matK y rbcL por MEGA

El software MEGA es de libre acceso y puede ser descargado de la página <http://www.megasoftware.net/>. Para realizar alineamientos y determinar distancias genéticas entre secuencias es necesario que el archivo que las contienen esté en formato MEGA (\*.meg) o FASTA (\*.fas).

**Alineamientos.** Para realizar alineamientos se abre el archivo desde el programa MEGA y se seleccionan las secuencias que se desean alinear. En la barra de herramientas buscamos "Alignment" y elegimos W Align by ClustalW (Figura 3.5), aparece una ventana de confirmación de alineamiento, se da click en OK y en una segunda ventana se presentan parámetros, los cuales no modificamos (Figura 3.6) y damos nuevamente click en OK.

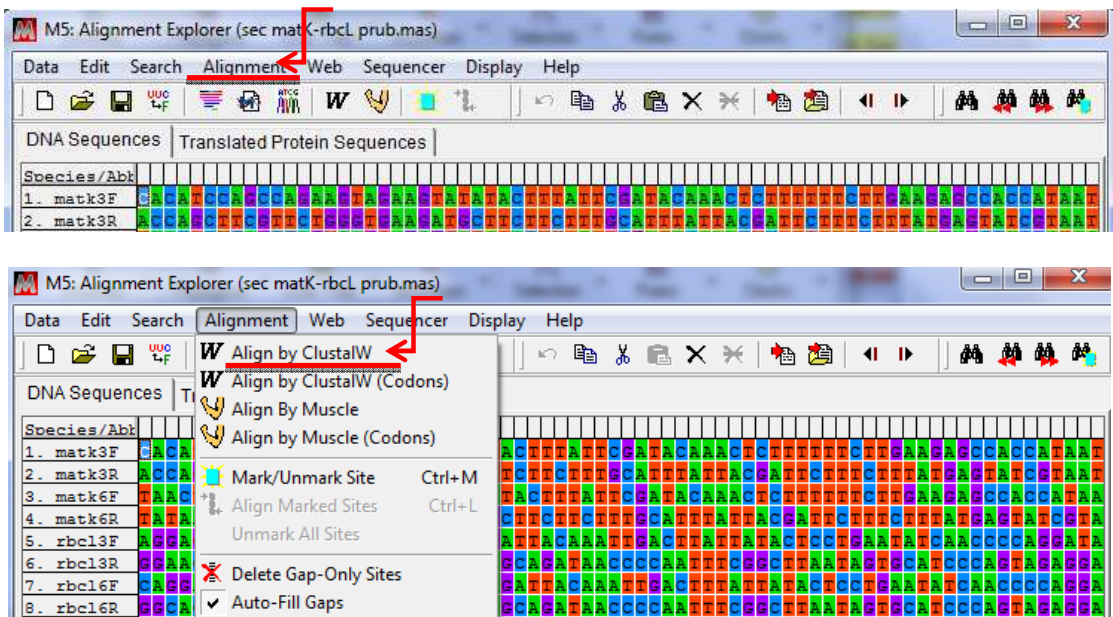
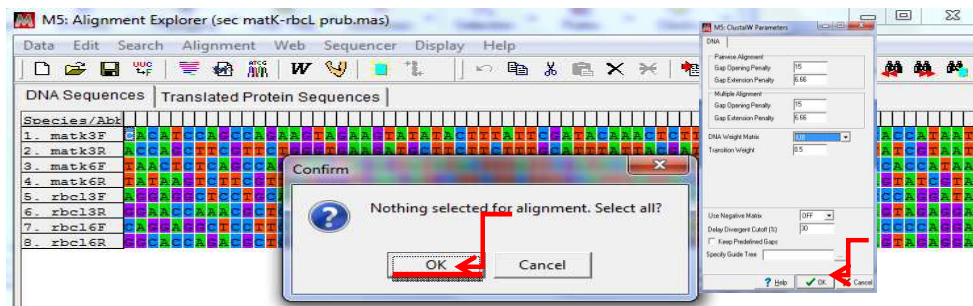
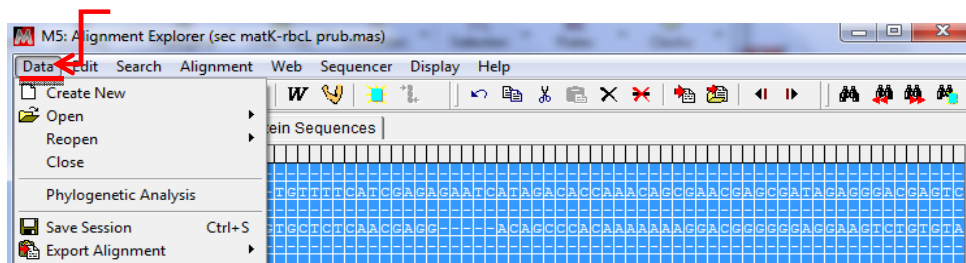


Figura 3.5 Alineamiento de secuencias de ADN por MEGA.

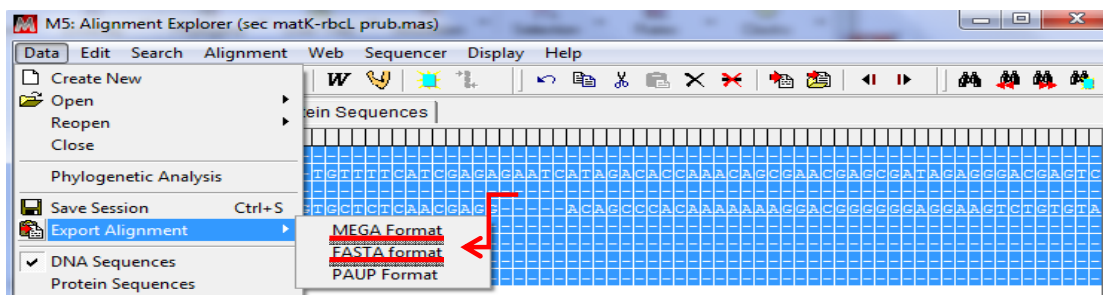


**Figura 3.6** Menú para correr el alineamiento de secuencias.

Las secuencias alineadas aparecerán automáticamente como resultado (Figura 3.7). Para guardar el archivo obtenido se utiliza la opción Data del menú principal y se elige la opción Export Alignment, se elige el formato que se requiera para almacenar los datos, el cual puede ser FASTA o si requieren las distancias o divergencias genéticas se debe elegir el formato MEGA (Figura 3.8).

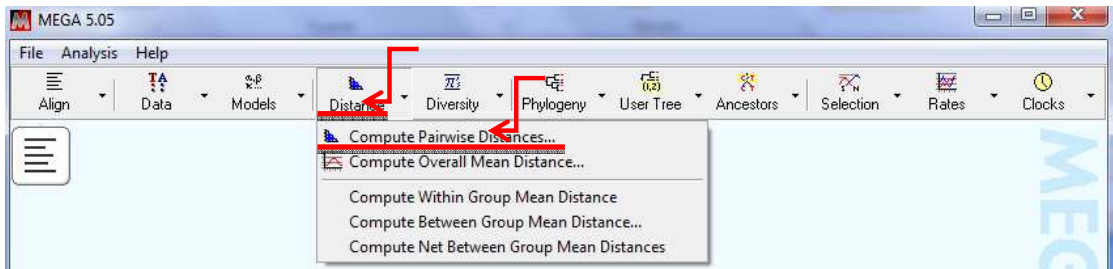


**Figura 3.7** Menú de datos.



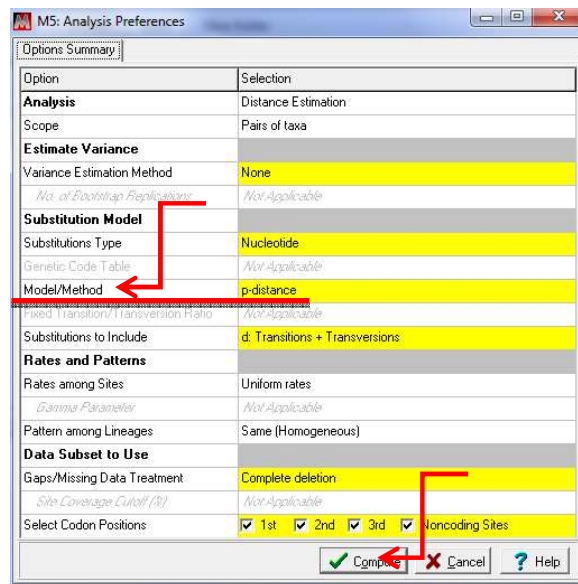
**Figura 3.8** Selección de formato para almacenar resultados.

**Distancias o divergencias genéticas:** Para calcular distancias genéticas entre secuencias es necesario que el archivo que contenga los datos a analizar tenga formato MEGA. Si nuestro archivo tiene el formato solo se selecciona “Distance” en el menú principal de MEGA y al desplegar el menú elegir la opción “Compute Pairwise Distances”.



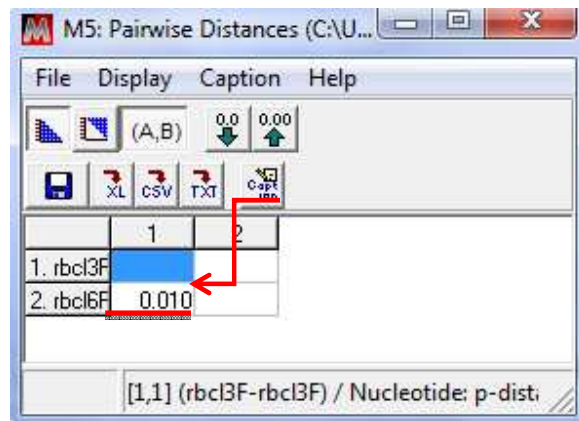
**Figura 3.9** Menú principal para análisis de distancias.

Aparece el menú de parámetros, en la posición de Model/Method, se cambia a la opción p-distance y se selecciona Compute.



**Figura 3.10** Menú de parámetros para distancias.

De forma automática aparece una ventana que proporciona los valores calculados de la distancia genética entre las secuencias analizadas (Figura 3.11), el valor obtenido se transforma a porcentaje y es ésta la cantidad de bases que difieren entre una secuencia y otra.



**Figura 3.11** Cuadro de resultado de distancias.

Se analizaron ocho secuencias para cada especie, 4 matK (F y R) y 4 rbcL (F y R). Se eligieron aquellas con menor distancia o con mayor similitud y se realizó un análisis BLAST a cada una. Para el gen matK se eligieron las secuencias directas y para el gen rbcL las secuencias reversas (Ver Anexo B)

### 3.5.9 Análisis de las secuencias matK y rbcL por BLAST

**Preparación de la secuencia a buscar:** Se requiere que las secuencias “código de barras” para comparar con la base de datos estén en formato FASTA.

**Análisis por BLAST disponible en NCBI:** Los análisis se realizaron de forma directa en la página de NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. En la página principal de NCBI se hace una búsqueda de la especie que se desea analizar. Se elige la opción Nucleotide y se da click en RUN BLAST.

La página que aparece muestra una ventana con la leyenda “Enter Query Sequence” en la cual se pega la secuencia del archivo FASTA, se agrega un título para identificar la secuencia, se selecciona en la ventana de organismo el taxa Cactaceae (taxid: 3593) y se dan clic en la opción BLAST al final de la página.

**Comparación con la base de datos:** El archivo resultante contiene una breve descripción de la secuencia problema y proporciona los alineamientos con las secuencias más similares registradas en la base de datos. Estas pueden ordenarse de forma decreciente de acuerdo a los valores de Máximo Score, Score Total, Cobertura de la secuencia Blanco, Valor E y Máxima identidad.

Se tiene también la opción de crear arboles filogenéticos dentro de la misma página a través de la ventana “Distance tree of results”, que presenta de forma gráfica un árbol filogenético, así como el archivo en formato Newick, el cual contiene las distancias entre los brazos del árbol y nombres detallados de los elementos que lo componen.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación de Tratamientos con RCV

Se evaluó el diámetro, la altura, el peso fresco y el peso seco de las vitroplantas de *E. micromeris* y *O. denegrii* a los 30, 60 y 90 días de tratamiento. Se realizaron análisis de varianza y pruebas de medias (Tukey  $P < 0.05$ ) por medio del software SAS, los resultados se presentan a continuación.

#### 4.1.1 *E. micromeris*

En el Cuadro 4.1 se presenta de forma resumida los valores de  $P$  ( $P < 0.05$ ), obtenidos por ANVA y prueba de medias de Tukey para cada variable evaluada, los datos resaltados en negritas representan a los mejores resultados y por consiguiente los mejores tratamientos en un periodo de tiempo determinado.

No existen diferencias significativas entre tratamientos a los 30 días para las variables diámetro ( $P = 0.3349$ ), peso fresco ( $P = 0.1860$ ) y peso seco ( $P = 0.9248$ ), mientras que para la altura ( $P = 0.0004$ ) si existen diferencias significativas, sobresaliendo el T5 y T4 con una altura media de 1.65417 cm y 1.61667 cm respectivamente.

A los 60 días existen diferencias significativas entre tratamientos para el diámetro ( $P = 0.0025$ ) destacando el T3 (0.89167 cm) y la altura ( $P = 0.0012$ ) donde los mejores tratamientos fueron el T4 (2.02500 cm) y el T5 (1.89375 cm). Mientras que para las variables peso fresco y peso seco, no existen diferencias

A los 90 días no existen diferencias significativas entre tratamientos para el diámetro ( $P= 0.0146$ ) y la altura ( $P= 0.0204$ ), mientras que para el peso fresco ( $P= 0.0048$ ) y el peso seco ( $P= 0.0011$ ) si existen diferencias significativas. Los mejores tratamientos para el peso fresco fueron el T2 (6.5350 g) y T4 (5.0250 g) y para el peso seco fueron el T2 (0.46215 g), T1 (0.40985 g) y T3 (0.39995 g).

**Cuadro 4.1** ANVA y prueba de medias de Tukey en cada variable evaluada para los 4 tratamientos de RCV a los 30, 60 y 90 días de desarrollo de vitroplantas de *E. micromeris*.

Variable	P > F	C.V.%	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Diámetro (cm)</b>	0.3349	8.79	0.75000a	0.75833a	0.77917a	0.72500a	0.70417a
	0.0025*	7.63	0.80000abc	0.85000ab	<b>0.89167a</b>	0.71250c	0.71875bc
	0.0146*	4.15	0.86250abc	<b>0.97500a</b>	<b>0.92500ab</b>	0.77500c	0.82500bc
<b>Altura (cm)</b>	0.0004*	7.93	1.40000b	1.37917b	1.40417b	<b>1.61667a</b>	<b>1.65417a</b>
	0.0012*	8	1.53750c	1.76250abc	1.61250bc	<b>2.02500a</b>	<b>1.89375ab</b>
	0.0204*	6.83	1.9125ab	<b>2.3500a</b>	1.6375b	<b>2.2375a</b>	2.0125ab
<b>Peso fresco (g)</b>	0.186	13.02	3.0200a	2.6200a	2.3450a	3.3100a	3.2250a
	0.2801	16.87	3.5400a	5.3350a	4.2200a	4.1050a	3.9950a
	0.0048*	9.06	4.1700b	<b>6.5350a</b>	4.1050b	<b>5.0250ab</b>	3.4500b
<b>Peso seco (g)</b>	0.9248	29.16	0.11490a	0.13105a	0.10300a	0.11595a	0.10745a
	0.715	20.12	0.18150a	0.23600a	0.20300a	0.20450a	0.18150a
	0.0011*	5.08	<b>0.40985a</b>	<b>0.46215a</b>	<b>0.39995ab</b>	0.32520bc	0.27760c
<b>% rend</b>	0.571	25.5	3.814a	4.93a	4.4a	3.575a	3.329a
	0.954	26.9	5.426a	4.503a	4.819a	4.961a	4.607a
	0.0015*	5.02	<b>9.829a</b>	7.067b	<b>9.749a</b>	6.54b	8.048b

\*= significancia al 0.05, C.V.= coeficiente de variación, T1= Sin reguladores, T2= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup> + AIA 0.5mg L<sup>-1</sup> + AG 1mg L<sup>-1</sup>, T5 = Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>+ AG 1mg L<sup>-1</sup>, %rend= porcentaje de rendimiento.

De los tratamientos evaluados podemos observar que el T2 basado en kinetina, promotora de la división celular (Purves et al., 2002 y Salisbury, 1994),

presenta la mayor cantidad de valores de medias sobresalientes, por lo que podemos considerarlo como el tratamiento que favorece en mayor grado a las variables evaluadas, en este caso diámetro, altura y peso, variables relacionadas con la talla o tamaño de las vitroplantas.

A pesar de que los resultados muestran claramente la acción del T2 en vitroplantas de *E. micromeris*, se recurrió a una evaluación visual así como a la obtención del porcentaje de rendimiento en peso para determinar el mejor tratamiento.

- **Porcentaje de rendimiento**

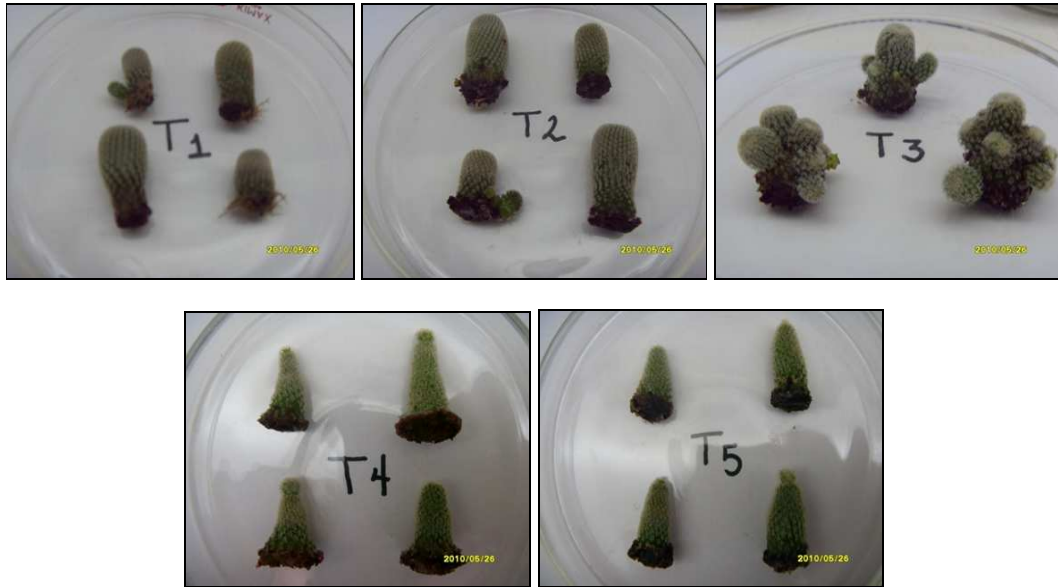
Se determinó el porcentaje de rendimiento en peso con el objetivo de detectar diferencias en la producción de biomasa a partir de la aplicación de tratamientos, para esto se utilizó el cálculo  $\%rend = 100 * \text{peso seco} / \text{peso fresco}$ . El peso fresco se obtuvo pesando las vitroplantas en balanza analítica al término de cada periodo y el peso seco después de someterlas a un proceso de liofilización por 24 hr (peso por repetición, cada repetición consta de 4 vitroplantas). Los resultados se muestran en el Cuadro 4.1

Los valores de P>F muestran que no existen diferencias significativas entre los tratamientos a los 30 y 60 días, mientras que existe diferencia significativa a los 90 días, el T1 y el T3 son los mejores tratamientos con valores de 9.8 y 9.71 respectivamente. Podemos observar que el % de rendimiento se incrementa en todos los tratamientos con respecto al tiempo (30, 60 y 90 días). En los primeros 30 días se mantiene en un rango de 3.3 a 4.9; a los 60 días el rendimiento se ubica entre 4.4 y 5.3; y a los 90 días entre 6.54 a 9.82.

- **Evaluación visual**

Se recurrió a una evaluación visual como complemento de los análisis antes realizados para elegir el o los mejores tratamientos en la micropropagación de *E. micromeris*. En la Figura 4.1 se presentan fotografías

de vitroplantas de *E. micromeris* a los 90 días de tratamiento, como se puede observar existen diferencias en cuanto a la forma, altura, presencia de raíz y número de brotes.



**Figura 4.1.** Vitroplantas de *E. micromeris* a los 90 días de tratamiento. T1= Sin reguladores, T2= Kinetina  $1\text{ mg L}^{-1}$ , T3= Kinetina  $1\text{ mg L}^{-1}$  + AIA  $1\text{ mg L}^{-1}$ , T4= Kinetina  $1\text{ mg L}^{-1}$  + AIA  $0.5\text{ mg L}^{-1}$  + AG  $1\text{ mg L}^{-1}$ , T5 = Kinetina  $1\text{ mg L}^{-1}$  + AIA  $1\text{ mg L}^{-1}$  + AG  $1\text{ mg L}^{-1}$ .

El T1 o testigo, sin reguladores de crecimiento, presenta vitroplantas de forma cilíndrica, de 1.9 cm de altura, con presencia de raíz, escasez de brotes y no presenta problemas de hiperhidricidad. En medios no adicionados con reguladores de crecimiento es normal la formación de raíces, Clayton et al., (1990) y Choreño et al., (2002) mencionan la generación de raíces de forma espontánea en cactáceas en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, mientras que Velázquez y Soltero (2001) reportan que en medios adicionados con AIA la producción de raíces en *E. micromeris* fue de escasa a nula y dedujeron que este regulador es inhibitorio para la producción de raíces en esta especie. Ambos resultados coinciden con los encontrados en este trabajo, ya que no hubo formación de raíces en los tratamientos con RCV (T2, T3, T4 y T5) y sin embargo sí se generaron raíces en el T1 o testigo.

El T2 provee vitroplantas de buena forma y altura (2.35 cm) pero no promueve la formación de brotes. Mauseth y Halperin (1975) mencionan que cuando el explante contiene areolas y es expuesto a concentraciones apropiadas de citocininas, los meristemos axilares se activan produciendo brotes.

Velázquez y Soltero (2001) mencionan que las fuente de citocininas (Kinetina y 2- isopentiladenina -2iP) presentan efectos altamente significativos sobre la producción de brotes en *E. micromeris*, obteniendo una media máxima de 17 brotes por explante utilizando solo concentraciones de  $8 \text{ mgL}^{-1}$  de Kinetina, concentración relativamente alta en comparación con la utilizada en el T2 ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ) razón probable por la cual se podría explicar la ausencia de brotes.

Por otra parte algunos resultados reportados por Flores et al., (2011) contrastan con los obtenidos. En éstos se reporta una media de 6.4 brotes al utilizar concentraciones de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de Kinetina en *E. micromeris* cultivada *in vitro*, una explicación a esto puede estar dirigida a los criterios tomados en cuenta a la hora de elegir los explantes para establecer los experimentos, así como aspectos relacionados con la preparación de medios.

El T3, basado en la combinación de Kinetina y AIA no solo presenta vitroplantas de buena calidad en cuanto a forma y altura, sino que además promueve la formación de brotes, con una media máxima de 8 brotes por explante. Ésta respuesta coincide con Johnson y Emino (1979a) y Echenique et al., (2004) que afirman que la existencia de un balance favorable entre auxinas y citocininas es particular para la inducción de brotes para cada especie.

Por su parte Malda et al., (1999 b) señalan que en distintas especies de cactáceas, concentraciones altas de citocininas y bajas de auxinas inducen la brotación. Choreño et al., (2002) realizaron propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* a partir de areolas sembradas en medio MS

complementado con ANA solo y en combinación con BA (6-benzyladenina) o Kin (Kinetina) en concentraciones de 0.0, 0.3, 1.0 y 3.0 mgL<sup>-1</sup>. La activación de areolas se inició en todos los tratamientos a los 21 días. A los 61 días las plántulas fueron subcultivadas y 40 días después las combinaciones con mayor concentración de citocininas (ANA 0.3: BA 3.0 y ANA 0.3: KIN 3.0) produjeron la formación de brotes, siendo más eficiente BA con un promedio de 11 brotes de apariencia sana y vigorosa.

Velázquez y Soltero (2001) manejando una concentración alta de 2iP (4.0 mgL<sup>-1</sup>) y una baja de ANA (0.2 mgL<sup>-1</sup>) obtuvieron una media de 14 brotes por explante en vitroplantas de *E. micromeris*

Existen algunos otros reguladores que combinados con citocininas son efectivos en la inducción de brotes en vitroplantas de *E. micromeris*. Flores et al., (2011) probaron diferentes concentraciones de Kinetina sola y combinada con otros reguladores como ancymidol y prohexadiona de calcio en vitroplantas de *E. micromeris*. Las mejores respuestas las obtuvieron con los tratamientos combinados, en éste caso específico con prohexadiona de calcio generando hasta 16 brotes por explante a los 60 días.

El T4 y T5 basados en combinaciones de Kinetina, auxina y giberelina presentan las vitroplantas de mayor altura con 2.2 y 2.0 cm respectivamente, sin embargo la forma de éstas es alargada o cónica, lo que difieren de la forma original de la planta (globosa), presentando además ausencia de brotes, y ausencia de raíces y un ligero cambio en la coloración, observándose un verde más claro que en los tratamientos anteriores.

Raven et al., (1992) mencionan que los tratamientos en base a giberelinas y auxinas estimulan el crecimiento posibilitando brotes y elongación celular, aumentando la talla de manera rápida.

Estas características también fueron observadas por Navarro y Demeneghi (2007) en *Mammillaria pectinifera* al someterla a diferentes concentraciones de Agromil-plus (Citocinina-giberelina-auxina), el cual ocasionó variación en las alturas de las plántulas, con tamaños aproximados a 1 cm, sin embargo las plántulas con mayores alturas también presentaron cambios en cuanto a la forma, la coloración y número de espinas, lo cual sugiere a esta combinación como no factible para acelerar su crecimiento.

De acuerdo a lo observado podemos deducir que los T1, T2 y T3 producen vitroplantas de buena calidad, mientras que el T4 y T5 carecen de ésta.

#### **4.1.1 *O. denegrii***

Se realizaron las mismas evaluaciones que en *E. micromeris*, tomándose en cuenta solo dos períodos de tiempo, 30 y 60 días. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de ANVA en SAS y se obtuvieron las pruebas de medias correspondientes (Tukey  $P < 0.05$ ).

En el Cuadro 4.2 se presentan los resultados de forma resumida. Los valores obtenidos de  $P > F$  muestran que no existe diferencias significativas entre los tratamientos para las variables evaluadas a los 30 y 60 días, excepto en la variable diámetro a los 30 días ( $P = 0.0020^*$ ), donde se pueden observar dos grupos de significancia, el grupo “a” formado por el T4, T5 y T3; los primeros poseen el mismo valor de media con 1.025 cm y el T3 con 0.97500 cm.

En el caso del rendimiento en peso se observa un incremento en todos los tratamientos a través de los dos períodos de tiempo. En los primeros 30 días se mantiene en un rango de 7 a 8%, y a los 60 días se ubica entre 11 y 15%.

**Cuadro 4.2.** ANVA y prueba de medias de Tukey en cada variable evaluada para los 4 tratamientos de RCV a los 30 y 60 días de desarrollo de vitroplantas de *O. denegrii*.

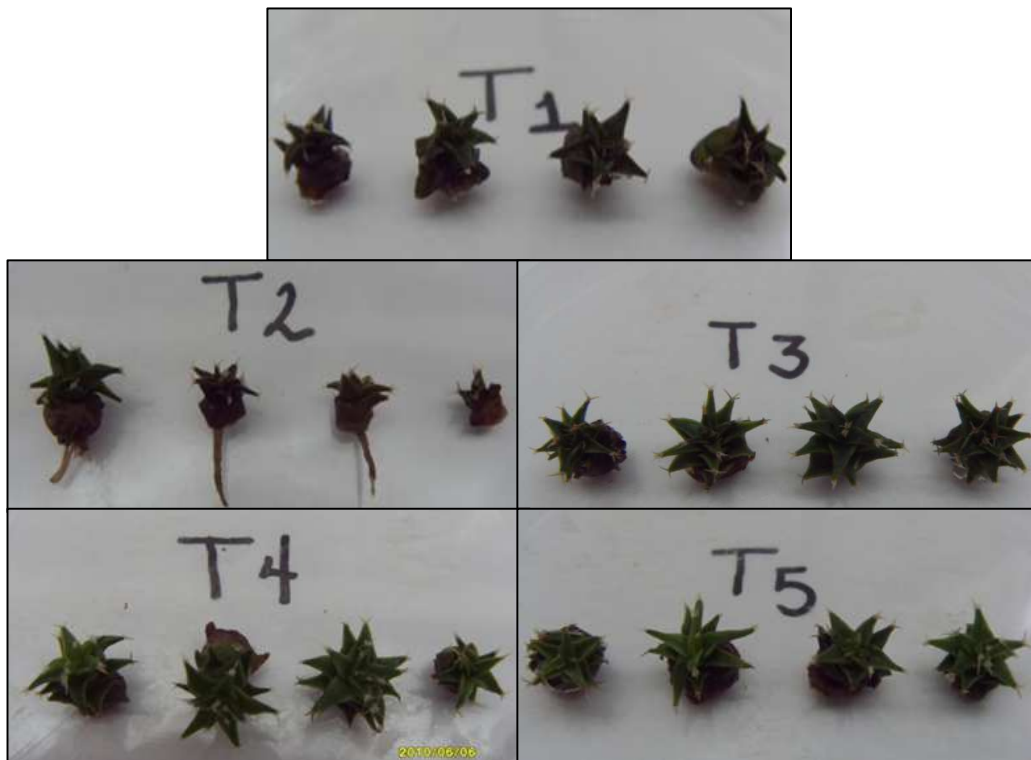
Variable	P > F	C.V.	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Diámetro (cm)</b>	0.0022*	11.34	0.75000b	0.77500b	<b>0.97500ab</b>	<b>1.02500a</b>	<b>1.02500a</b>
	0.1036	5.65	0.97000a	0.94500a	1.03500a	1.11000a	1.11000a
<b>Altura (cm)</b>	0.6334	29.76	0.8000a	0.6250a	0.7000a	0.8500a	0.8000a
	0.4033	12.77	0.72000a	0.72500a	0.72500a	0.79500a	0.90000a
<b>Peso fresco (g)</b>	0.7639	35.94	0.7300a	0.7250a	0.7500a	1.0350a	0.9500a
	0.3059	23.5	0.3800a	0.4550a	0.5450a	0.5500a	0.6700a
<b>Peso seco (g)</b>	0.4991	40.57	0.05350a	0.04500a	0.04950a	0.08550a	0.0735a
	0.8683	40.72	0.06050a	0.05300a	0.07850a	0.06950a	0.07550a
<b>%rend</b>	0.8184	23.94	7.090 <sup>a</sup>	6.632a	6.536a	8.129a	8.022a
	0.9258	34.82	15.452a	11.683a	13.915a	12.598a	12.549a

\*= significancia al 0.05, C.V= coeficiente de variación, T1= Sin reguladores, T2= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup> + AIA 0.5mg L<sup>-1</sup> + AG 1mg L<sup>-1</sup>, T5 = Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>+ AG 1mg L<sup>-1</sup>, %rend= porciento de rendimiento.



- **Evaluación visual**

Se realizó la evaluación visual con el objetivo de observar si existen algunas diferencias físicas entre los tratamientos y complementar el análisis estadístico. En la Figura 4.2 se presentan fotografías de vitroplantas de *O. denegrii*.



**Figura 4.2.** Vitroplantas de *O. denegrii* a los 30 días de tratamiento. T1= Sin reguladores, T2= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$ , T3= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$  + AIA  $1\text{mg L}^{-1}$ , T4= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$  + AIA  $0.5\text{mg L}^{-1}$  + AG  $1\text{mg L}^{-1}$ , T5 = Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$  + AIA  $1\text{mg L}^{-1}$  + AG  $1\text{mg L}^{-1}$ .

En el T1 se pueden observar vitroplantas uniformes de 7 a 8 tubérculos triangulares, con diámetro y altura de 0.8 cm, y con ausencia de raíces, caso contrario a lo encontrado en *E. micromeris* (Velázquez y Soltero, 2001) en medios sin reguladores de crecimiento y a lo mencionado por Clayton et al., (1990) y Choreño et al., (2002) con respecto a la formación espontánea de

raíces en brotes de cactáceas colocados en medios sin reguladores. Esto podría ser resultado de una insuficiente cantidad de reguladores endógenos, como las auxinas, responsables de la formación de raíces adventicias (Woodward y Bartel, 2005).

Por el contrario en el T2 en el cual se muestran vitroplantas no tan uniformes, con diámetros de 0.6 a 1.1 cm, alturas de 0.6 a 1.4 cm y con 5 a 10 tubérculos, la formación de raíces se presentó sin ningún problema, con longitudes aproximadas a 1cm.

El T3 presenta vitroplantas uniformes con diámetros de 0.9 cm, alturas de 0.7cm, con ausencia de raíces y con 12 a 16 tubérculos.

El T4 presenta vitroplantas de un poco más de 1 cm de diámetro, alturas de 0.9 cm, con ausencia de raíces y con 10 a 19 tubérculos.

En el T5 se observan vitroplantas de apariencia uniforme, de 1 cm de diámetro, alturas de 0.8 cm, ausencia de raíces y con 10 a 12 tubérculos.

A pesar de que no existen diferencias significativas como las encontradas en *E. micromeris*, los tratamientos en *O. denegrii* presentan vitroplantas de buena calidad y se puede observar que el T3 y T4 benefician la formación de un mayor número de tubérculos haciéndolas más compactas y favoreciendo su crecimiento. Al respecto Johnson y Emimo (1979 a) señalan que cada especie de cactus podría requerir una combinación única de reguladores de crecimiento vegetal para eficientar su micropropagación.

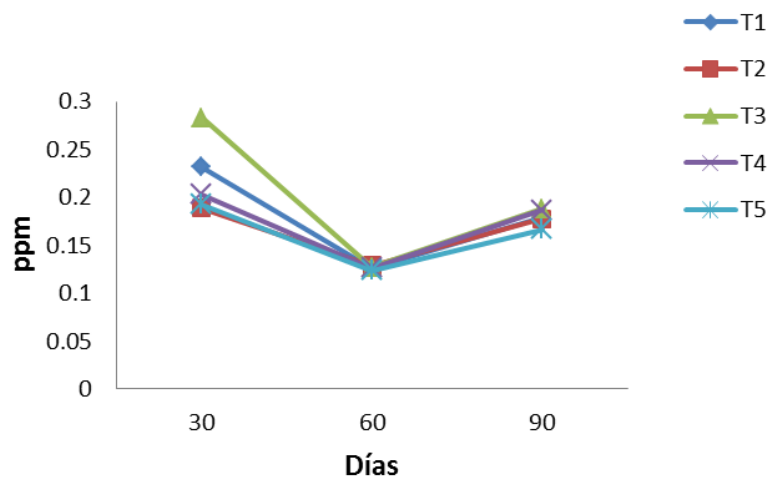
## **4.2 Determinación de hormonas (auxinas y giberelinas)**

### **4.2.1 *E. micromeris***

- **Cuantificación de auxinas (AIA)**

Para conocer el comportamiento hormonal endógeno en vitroplantas de *E. micromeris* sometidas a tratamientos con RCV, se llevó a cabo la cuantificación de AIA (Ver Cuadro 1 Anexo C), a los primeros 30 días se

encontraron concentraciones que van desde 0.18 a 0.28 ppm, donde el T3 presenta el valor más alto (0.28ppm). A los 60 días las concentraciones de AIA disminuyen en todos los tratamientos, con valores muy semejantes entre ellos de alrededor de 0.12 ppm. A los 90 días las concentraciones de AIA se incrementan de forma paralela en todos los tratamientos sin llegar a superar las concentraciones obtenidas en los primeros 30 días de tratamiento (Figura 4.3)



**Figura 4.3 Concentración de AIA en vitroplantas de *E. micromeris* sometidas a tratamientos hormonales en tres períodos de tiempo.** T1= Sin reguladores, T2= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$ , T3= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$ + AIA  $1\text{mg L}^{-1}$ , T4= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$  + AIA  $0.5\text{mg L}^{-1}$  + AG  $1\text{mg L}^{-1}$ , T5 = Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$ + AIA  $1\text{mg L}^{-1}$ + AG  $1\text{mg L}^{-1}$ .

Un comportamiento semejante de niveles altos de auxina seguidos de disminución gradual de la hormona, fue encontrado por Flores et al., (2009), al determinar concentraciones endógenas de AIA en *Vigna radiata* L. Wilczek (soja verde) tratada con AIA, AIB y IAP (indol-3 acetil-p-nitrofenil ester). Ellos encontraron un aumento de AIA endógeno durante la iniciación del enraizamiento (hasta el tercer día) en todos los tratamientos y una disminución gradual hacia el sexto día. El tratamiento con mayor concentración de AIA fue el grupo tratado con AIB con aproximadamente  $50\ \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso fresco, mientras que la mayor inducción de raíces se dio con el IAP con 83 raíces por esqueje.

Olivella et al., (2001) por su parte encontraron concentraciones de AIA en hojas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus en diferentes estadios; jóvenes (7 días), adultas (20 días) y maduras (60 días) en rangos de 39-52, 36-48 y 43-48 nmols.g<sup>-1</sup> de peso seco respectivamente, no encontrando diferencias significativas entre éstas. Mientras que en la determinación de citocininas (Zeatina +ZR) si encontraron diferencias entre las jóvenes y las maduras con 395-634 y 112-215 pmols.g<sup>-1</sup> de peso seco respectivamente.

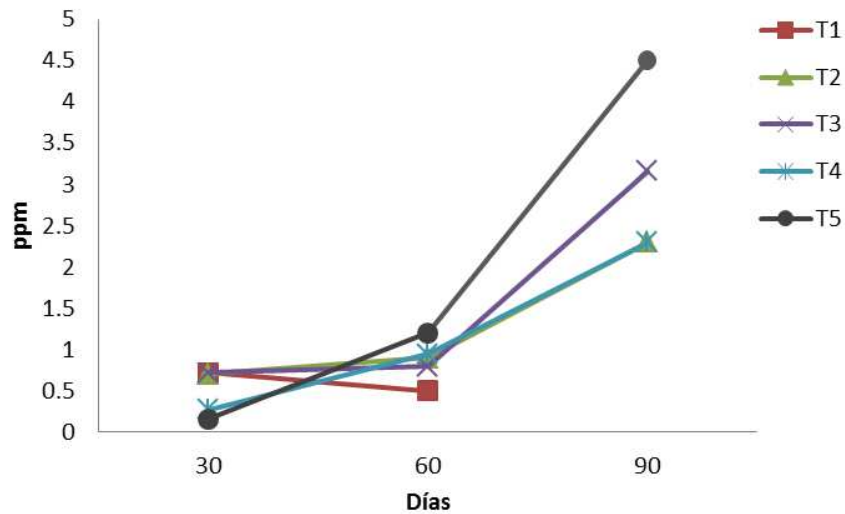
Laskowski et al., (2008) determinaron contenidos de AIA en pedicelo y fruto de *Citrus sinensis* var. Salustina. Encontraron concentraciones máximas de 500 ng.g<sup>-1</sup> de materia seca con disminución lenta después de la anthesis (118 días) hasta 77 ng.g<sup>-1</sup> de ms en pedicelo, mientras que por unidad, la concentración fue de 4 ng por pedicelo (48 días) con disminución hasta los 2 ng/pedicelo. Para el caso del fruto las concentraciones oscilaron entre 53 y 77 ng.g<sup>-1</sup> de ms disminuyendo hasta los 20 ng .g<sup>-1</sup> de ms a los 62 días después de la anthesis.

- **Cuantificación de giberelinas (AG)**

Se encontraron concentraciones de AG de entre 0.16 a 0.7 ppm en vitroplantas de *E. micromeris* a los primeros 30 días de tratamiento (Ver Cuadro 2 Anexo C), donde el T1 y el T3 presentan la concentración más alta (0.72 ppm). A los 60 días las concentraciones de AG aumentan en los tratamientos, con valores de alrededor de 0.5 a 1.2 ppm, siendo el T4 y T5 los que presentan las mayores concentraciones. A los 90 días las concentraciones de AG se incrementan de forma paralela en todos los tratamientos con valores de entre 2 y 4.5 ppm, donde el T5 y el T3 presentan las concentraciones más altas (Figura 4.4).

Comparando los resultados obtenidos, se observa que las concentraciones de AG (0.2 - 4.5 ppm) se encuentran en mayor proporción a las de AIA (0.1 - 0.28 ppm) y su comportamiento en el gráfico es de forma creciente con respecto al tiempo de tratamiento. Esto concuerda con Hernández

*et al.*, (2003) quienes encontraron concentraciones endógenas ascendentes de giberelinas (2.69 y 2.29  $\text{ng.g}^{-1}\text{ms}$ ) y descendentes de auxinas (1.26 y 1.79  $\text{ng.g}^{-1}\text{ms}$ ) en variedades de cilantro sometidas a periodos largos de luz y aumento de temperatura (40 días), la tendencia fue la misma en testigo y tratamientos.



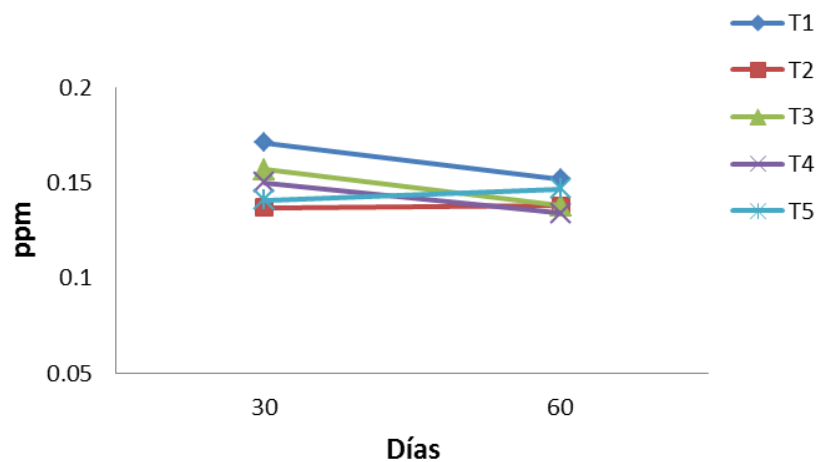
**Figura 4.4** Concentración de AG en vitroplantas de *E. micromeris* sometidas a tratamientos hormonales en tres períodos de tiempo. T1= Sin reguladores, T2= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$ , T3= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$ + AIA  $1\text{mg L}^{-1}$ , T4= Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$  + AIA  $0.5\text{mg L}^{-1}$  + AG  $1\text{mg L}^{-1}$ , T5 = Kinetina  $1\text{mg L}^{-1}$ + AIA  $1\text{mg L}^{-1}$ + AG  $1\text{mg L}^{-1}$ .

Existen algunos otros cultivos donde se han cuantificado giberelinas, Ramírez *et al.*, (2001) encontraron diferentes niveles en tejido floral de manzano, Golden Delicious, Rome Beauty y Red Delicious con 0.78, 14.47 y  $1.8\ \mu\text{g.g}^{-1}$  de peso seco respectivamente, mientras que en saco embrionario los valores fueron de 0.4, 0.18 y  $10.8\ \mu\text{g.g}^{-1}$  en el mismo orden.

#### 4.2.2 *O. denegrii*

- Auxinas

Para conocer el comportamiento hormonal endógeno en vitroplantas de *O. denegrii* sometidas a tratamientos con RCV, se llevó a cabo la cuantificación de AIA (Cuadro 3 Anexo C), a los primeros 30 días se encontraron concentraciones de 0.13 a 0.17 ppm, donde el T1 presentó el valor más alto (0.17ppm), seguido por el T3 con 0.15 ppm (Figura 4.5). Esta tendencia es similar a la que se presentó en *E. micromeris* donde el T3 presenta la mayor concentración de AIA a los 30 días de tratamiento. A los 60 días las concentraciones de AIA fueron muy semejantes con valores entre 0.13 y 0.15 ppm, pero es el T1 el que mantiene una concentración mayor a los tratamientos restantes con 0.152 ppm.

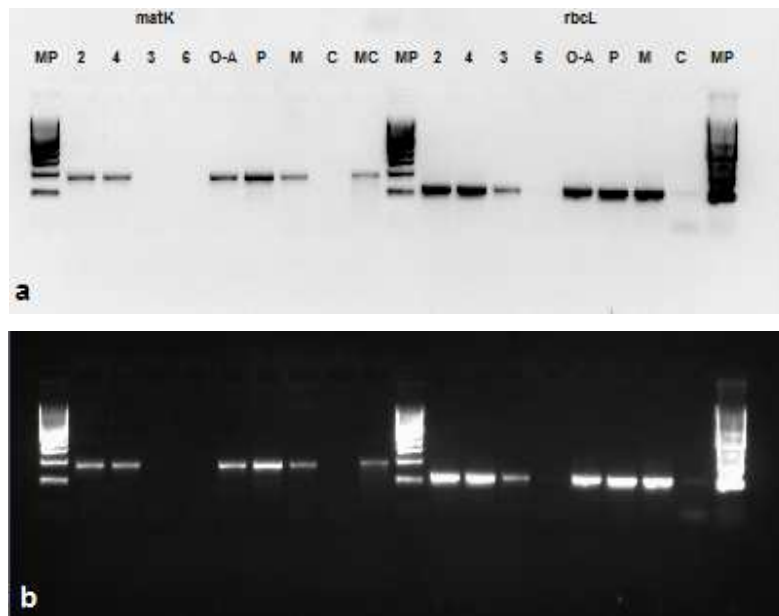


**Figura 4.5 Concentración de AIA en vitroplantas de *O. denegrii* sometidas a tratamientos hormonales en tres períodos de tiempo.** T1= Sin reguladores, T2= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup> + AIA 0.5mg L<sup>-1</sup> + AG 1mg L<sup>-1</sup>, T5 = Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>+ AG 1mg L<sup>-1</sup>.

### 4.3 Código de barras de la vida

#### 4.3.1 *E. micromeris*

En la Figura 4.6 se presenta el resultado de la amplificación de los fragmentos *matK* y *rbcL* de *E. micromeris* (2, 4, 3 y 6). Las bandas reveladas en el gel están bien definidas y evidencian una correcta amplificación de los fragmentos de ADN. El marcador de peso molecular (MP) que se utilizó: O'Gene Ruler 1Kb Plus DNA ladder #SM1343. El gel se leyó en Bio-Rad (LANGEBIO).



**Figura 4.6 (a) y (b)** Amplificación de *matK* y *rbcL* en *E. micromeris*. MP = Marcador de peso molecular; 2, 4, 3, 6= *E. micromeris*; O-A, P, M y MC= otras especies, C = Control negativo.

- **Análisis de las secuencias *matK* y *rbcL* por MEGA**

Se alinearon ocho secuencias de *E. micromeris* (Muestra 2 y 4, renombradas 1 y 2 respectivamente), utilizando el software MEGA versión 5 (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, and Kumar 2011) y se determinaron distancias genéticas entre secuencias de individuos diferentes, los

resultados se presentan en el Cuadro 4.6. Se obtuvieron valores de 0.6 y 0.7% que indican la cantidad de bases que son diferentes entre ambas secuencias. Entre más pequeño sea el valor, la distancia es menor por lo tanto existe mayor similitud entre las secuencias. En el caso del gen matK las secuencias presentan la misma distancia, tanto para las secuencias F, como para las R, con una distancia genética de 0.6%, valor pequeño que refleja gran similitud entre las secuencias, el mismo caso se presenta para el gen rbcL con una distancia genética del 0.7%.

**Cuadro 4.3** Distancias genéticas entre secuencias de matK y rbcL por MEGA para *E. micromeris*

Espece	Secuencias	Distancia genética	Distancia genética (%)
<i>E. micromeris</i>	E1matKF	0.006	<b>0.6</b>
	E2matKF		
<i>E. micromeris</i>	E1matKR	0.006	0.6
	E2matKR		
<i>E. micromeris</i>	E1rbcLF	0.007	0.7
	E2rbcLF		
<i>E. micromeris</i>	E1rbcLR	0.007	<b>0.7</b>
	E2rbcLR		

E = *Epithelantha micromeris*, 1= individuo 1, 2= individuo 2, matK= gen maturasa K, rbcL= gen ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa.

- **Análisis de las secuencias matK y rbcL con BLAST**

Para el análisis BLAST se eligieron cuatro de las ocho secuencias obtenidas del análisis con MEGA, en el caso del gen matK se eligieron; E1matKF y E2matKF y para el gen rbcL; E1rbcLR y E2rbcLR. El análisis por medio de BLAST nos presenta un listado de alineamientos significativos, es decir, las secuencias en la base de datos (NCBI) que son similares o iguales a la desconocida (en este caso secuencias de *E. micromeris*).



Los resultados se presentan en orden de significancia de mayor a menor proporcionando el puntaje o calificación (Total Score), el cual se refiere al número de bases en común con la secuencia problema, puntajes altos indican mayor similitud, así como su respectivo valor de E (Expectation values) el cual es un indicador de la probabilidad de obtener este resultado al azar. Entre más bajo sea el valor de E más significativo es, es decir, el valor obtenido es muy poco probable que haya ocurrido al azar.

A continuación se presentan los primeros cinco organismos de máxima similitud con las secuencias problema, las cuales se indican en negrillas.

**1. - E1matKF, Query ID: Icl|10213**

Query length: 573

Total score: 942

HM041691.1 *Epithelantha micromeris* 942 0.0  
FN997195.1 *Epithelantha bokei* 939 0.0  
FN997516.1 *Epithelantha micromeris* 926 0.0  
FN997512.1 *Epithelantha micromeris* 926 0.0  
FN997510.1 *Epithelantha micromeris* 920 0.0

**2. - E2matKF, Query ID: Icl|64319**

Query Length: 511

Total score: 913

HM041691.1 *Epithelantha micromeris* 913 0.0  
FN997195.1 *Epithelantha bokei* 909 0.0  
FN997516.1 *Epithelantha micromeris* 869 0.0  
FN997512.1 *Epithelantha micromeris* 869 0.0  
FN997510.1 *Epithelantha micromeris* 863 0.0

### 3.- E1rbcLR, Query ID: Icl|48641

Query Length: 548

Total score 968

HQ621336.1 *Maihuenia poeppigii* 968 0.0

HQ621341.1 *Weingartia kargliana* 955 0.0

AF206805.1 *Pereskia aculeate* 952 0.0

M97888.1 *Pereskia aculeata* 952 0.0

HQ621339.1 *Pereskiopsis diguetii* 946 0.0

### 4. - E2rbcLR, Query ID: Icl|29317

Query Length: 548

Total Score: 963

HQ621336.1 *Maihuenia poeppigii* 963 0.0

HQ621341.1 *Weingartia kargliana* 950 0.0

HQ621339.1 *Pereskiopsis diguetii* 946 0.0

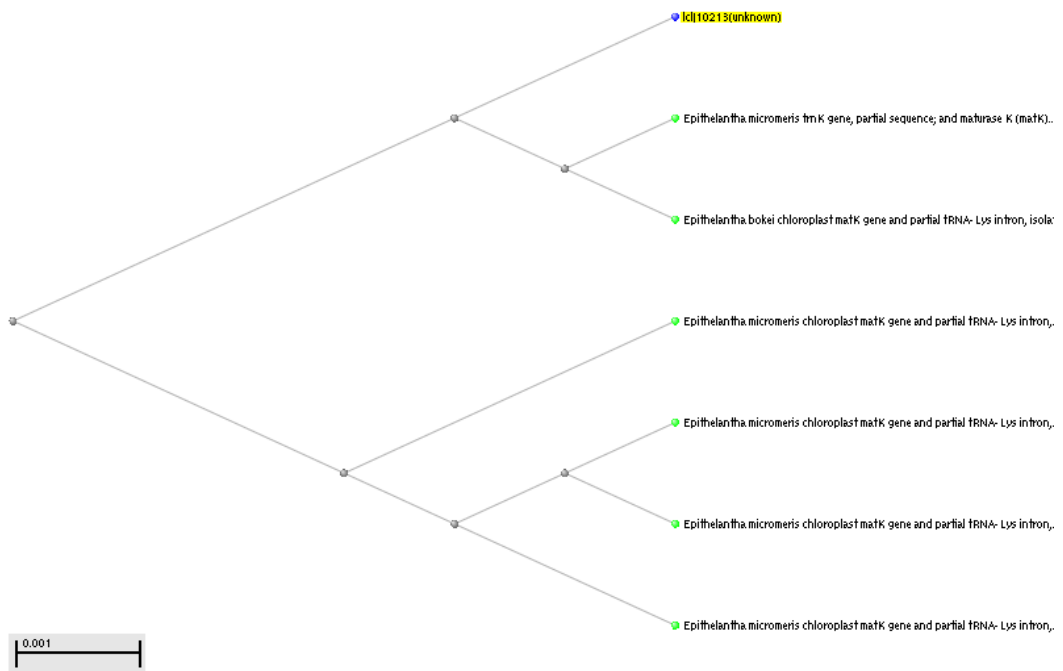
AF206805.1 *Pereskia aculeate* 946 0.0

M97888.1 *Pereskia aculeata* 946 0.0

- **Árboles filogenéticos con BLAST**

Se obtuvieron los dendrogramas de las cuatro secuencias analizadas, su ubicación se indica en color amarillo y el resto de las secuencias representan a las especies más emparentadas genéticamente con respecto al gen matK y rbcL. En las Figuras 4.7 y 4.8 se muestran los dendrogramas para las secuencias matK y en las Figuras 4.9 y 4.10 para las secuencias rbcL. En las primeras dos figuras se observa claramente que las secuencias problema están ubicadas dentro del clado perteneciente a *Epithelantha micromeris*, lo que indica que pertenecen a dicha especie, mientras que en las segundas, las secuencias problema se encuentran totalmente apartadas de los clados restantes, lo que significa que no pertenecen a ninguna de las especies del dendrograma, más sin embargo existe una relación de parentesco, ya que las

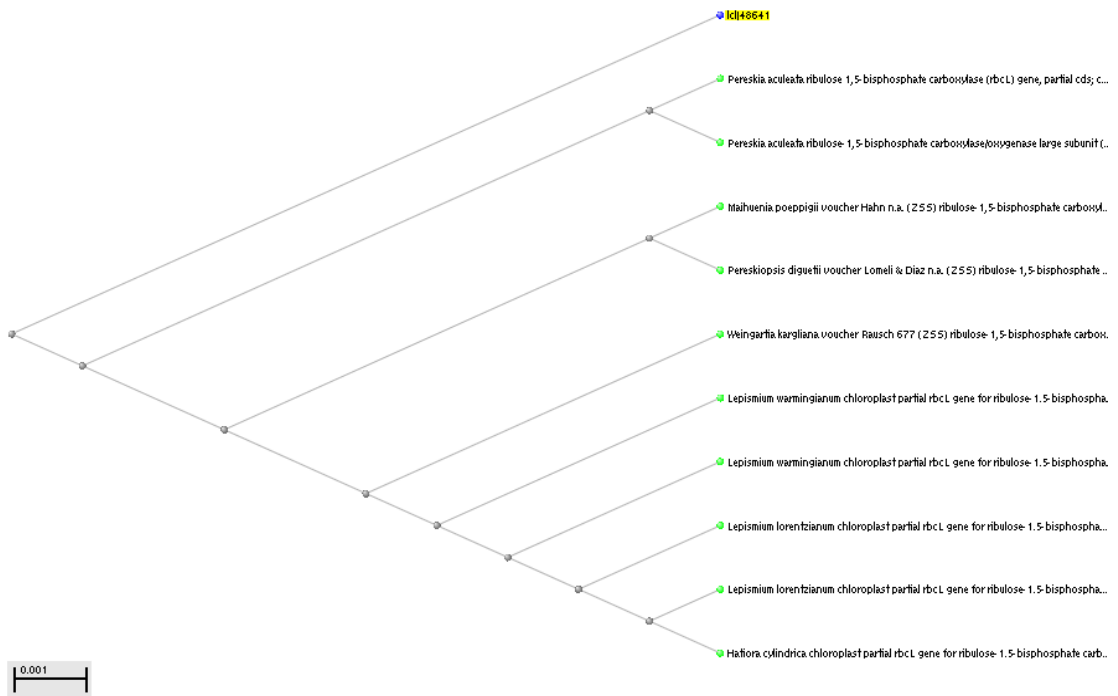
especies restantes pertenecen a la familia Cactaceae. Este resultado es consecuencia de la falta de información necesaria para llevar a cabo la comparación, es decir, que no existen secuencias del gen *rbcl* correspondientes a *E. micromeris* representadas en la base de datos NCBI, lo cual impide una adecuada comparación con nuestras secuencias problema.



**Figura 4.7** Dendrograma de *E. micromeris* (E1matKF, Query ID: Icl|10213)



**Figura 4.8.** Dendrograma de *E. micromeris* (E2matK F, Query ID: Icl|64319)



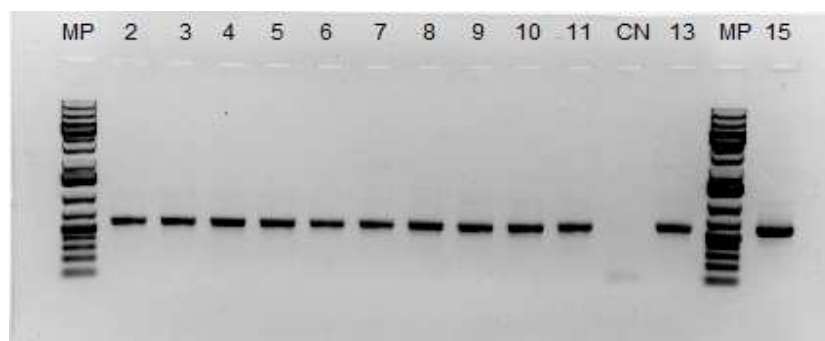
**Figura 4.9.** Dendrograma de *E. micromeris* (E1rbcLR, Query ID: Icl|48641)



**Figura 4.10** Dendrograma de *E. micromeris* (E2rbcLR, Query ID: Icl|29317)

#### 4.4.2 *O. denegrii*

En la Figura 4.11 se presenta el resultado de la amplificación de los fragmentos matK de *O. denegrii*. Las bandas reveladas en el gel están bien definidas y son evidencia de una correcta amplificación de los fragmentos de ADN. El marcador de peso molecular que se utilizó: Gene Ruler 1Kb Plus DNA ladder # SM1331/2/3 Marca Fermentas. El gel se leyó en Bio-Rad (LANGEBIO).



**Figura 4.11** Amplificación del gen matK en *O. denegrii*. MP = Marcador de peso molecular, 2-7, 10, 11 y 13= otras especies, 8, 9 y 15 = *O. denegrii*, CN= Control negativo.

- **Análisis de las secuencias matK y rbcL por MEGA**

Se alinearon ocho secuencias de *O. denegrii* (Muestras 8 y 9, renombradas 1 y 2 respectivamente) utilizando el software MEGA versión 5 (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, and Kumar 2011) y se determinaron distancias genéticas, los resultados se presentan en el Cuadro 4.7. Como ya hemos mencionado entre más pequeño es el valor de la distancia genética existe mayor similitud entre las secuencias. En el caso del gen matK las secuencias que resultaron con mayor similitud fueron las F (directas) y para rbcL las R (reversas).

**Cuadro 4.4.** Distancias genéticas en secuencias de matK y rbcL por MEGA para *O. denegrii*

Espece	Secuencias	Distancia genética	Distancia genética (%)
<i>O. denegrii</i>	O1matKF	0.033	<b>3.3</b>
	O2matKF		
<i>O. denegrii</i>	O1matKR	0.128	12.8
	O2matKR		
<i>O. denegrii</i>	O1rbcLF	0.028	2.8
	O2rbcLF		
<i>O. denegrii</i>	O1rbcLR	0.016	<b>1.6</b>
	O2rbcLR		

O = Obregonia dengrii, 1= individuo 1, 2= individuo 2, matK= gen maturasa K, rbcL= gen ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa.

- **Análisis de las secuencias matK y rbcL con BLAST**

Para el análisis BLAST de secuencias de *O. denegrii* se eligieron las secuencias con mayor similitud, para el gen matK; O1matKF y O2matKF y para el gen rbcL; O1rbcLR y O2rbcLR. Los resultados se presentan en orden de significancia de mayor a menor proporcionando la máxima calificación (Total

Score), así como su respectivo valor de E (Expectation values). A continuación se presentan los primeros cinco organismos de máxima similitud con las secuencias problema, las cuales se indican en negrillas.

**1.- O1matKF, Query ID: Icl|47077**

Query Length: 844

Total score: 1299

FN997091.1 *Thelocactus tulensis* 1299 0.0

FN997129.1 *Mammillaria albicoma* 1290 0.0

FN997257.1 *Stenocactus coptonogonus* 1284 0.0

FN997502.1 *Mammillaria polyedra* 1280 0.0

FN997410.1 *Mammillaria wrightii* 1269 0.0

**2. - O2matKF, Query ID: Icl|21503**

Query Length: 867

Total score: 1491

HM041711.1 *Lophophora williamsii* 1491 0.0

FN997576.1 *Mammillaria standleyi* 1469 0.0

FN997441.1 *Mammillaria hahniana* 1469 0.0

FN997438.1 *Mammillaria compressa* 1469 0.0

FN997317.1 *Mammillaria flavicentra* 1469 0.0

**3. - O1rbcLR, Query ID: Icl|12929**

Query Length: 579

Total score: 948

HQ621341.1 *Weingartia kargliana* 948 0.0

HQ621336.1 *Maihuenia poeppigii* 946 0.0

FR853386.1 *Lepismium lumbricoides* 933 0.0

FR853385.1 *Lepismium lumbricoides* 933 0.0

FR853351.1 *Lepismium lumbricoides* 933 0.0

#### 4. - O2rbcLR, Query ID: lcl|57233

Query Length: 574

Total score: 946

HQ621341.1 *Weingartia kargliana* 946 0.0

HQ621336.1 *Maihuenia poeppigii* 946 0.0

FR853386.1 *Lepismium lumbricoides* 935 0.0

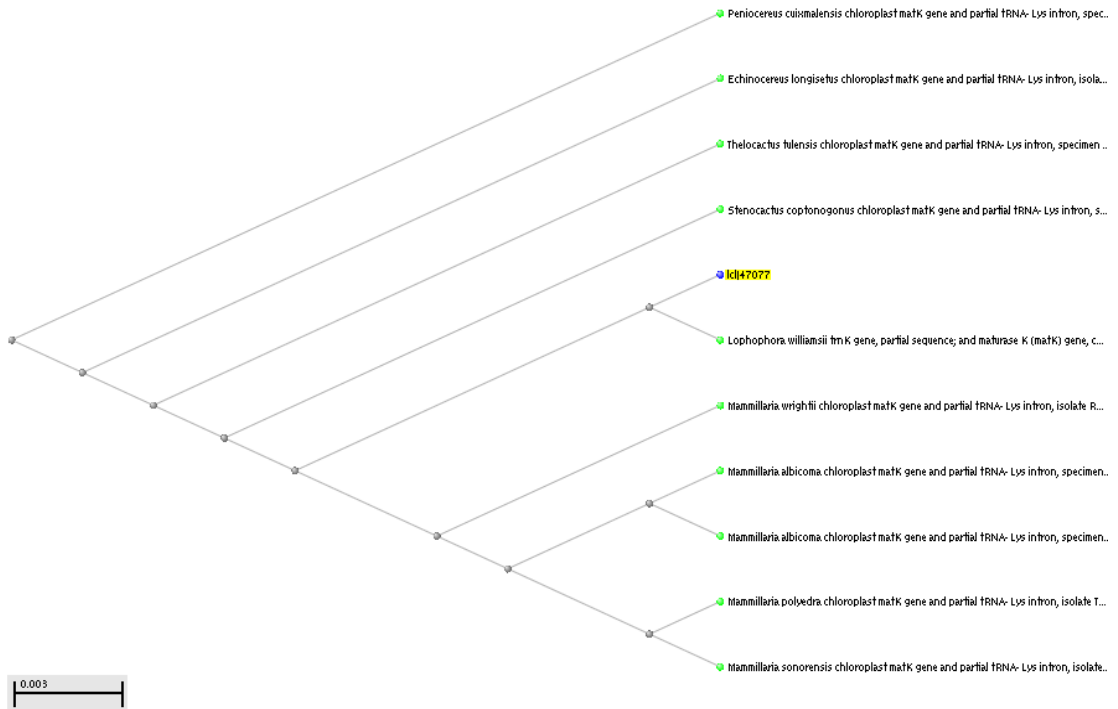
FR853385.1 *Lepismium lumbricoides* 935 0.0

FR853351.1 *Lepismium lumbricoides* 935 0.0

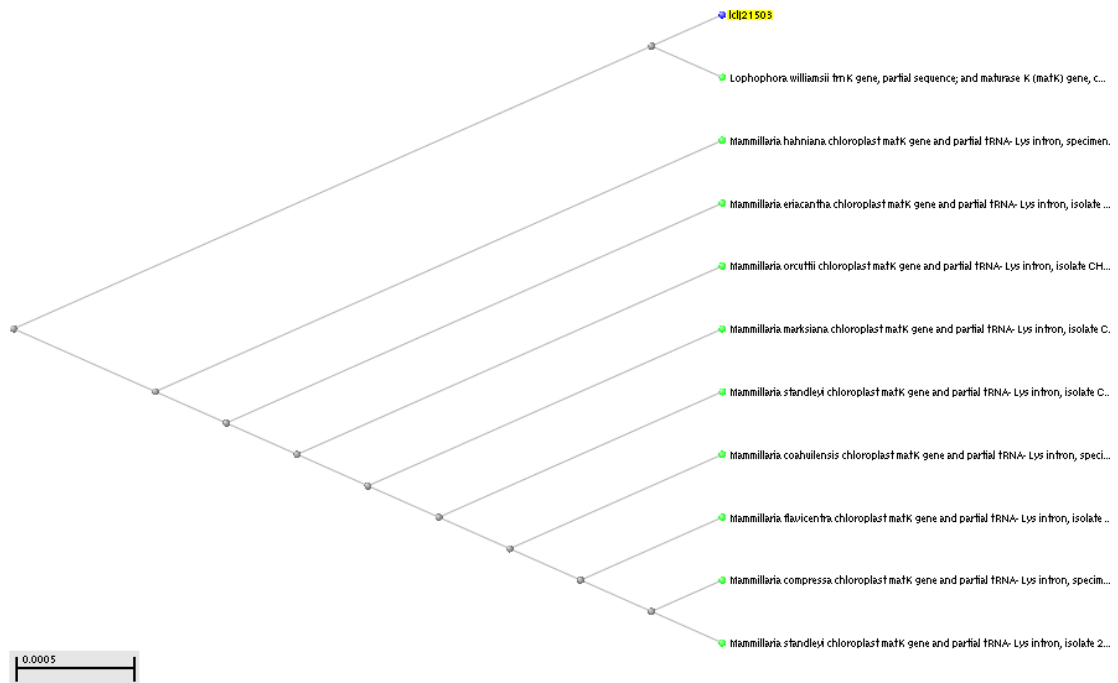
- **Árboles filogenéticos con BLAST**

En las Figuras 4.12 y 4.13 se muestran los dendrogramas de las secuencias matK y en las Figuras 4.14 y 4.15 los de las secuencias rbcL. En las primeras dos se muestra a las secuencias problema ubicadas en el clado correspondiente a *Lophophora williamsii* (peyote), indicando su pertenencia a dicha especie, mientras que en las siguientes dos figuras, las secuencias problema se encuentran totalmente apartadas de los clados restantes, lo que significa que no pertenece a ninguna de las especies incluidas. Ambos resultados, son consecuencia de la falta de información con respecto a los genes matK y rbcL para *O. denegrii*, es decir, no existen tales secuencias en la base de datos NCBI, por lo cual solo se logró obtener dendrogramas que ubican a las secuencias problema entre especies emparentadas, entre las cuales destaca claramente *Lophophora williamsii* ubicando a la secuencia problema dentro del clado y no de forma separada como en los dendrogramas restantes.





**Figura 4.12** Dendrograma de *O.denegrii* (O1matKF, Query ID: Icl|47077)



**Figura 4.13** Dendrograma de *O.denegrii* (O2matKF, Query ID: Icl|21503)

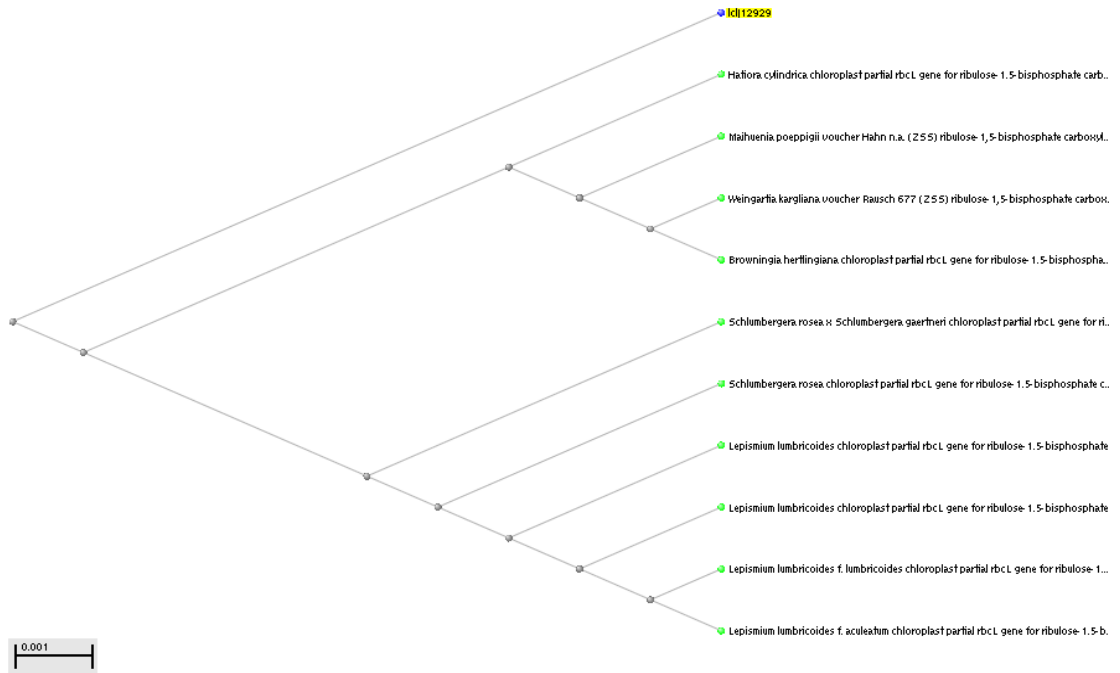


Figura 4.14 Dendrograma de *O. denegrii* (O1rbcLR, Query ID: Icl|12929)

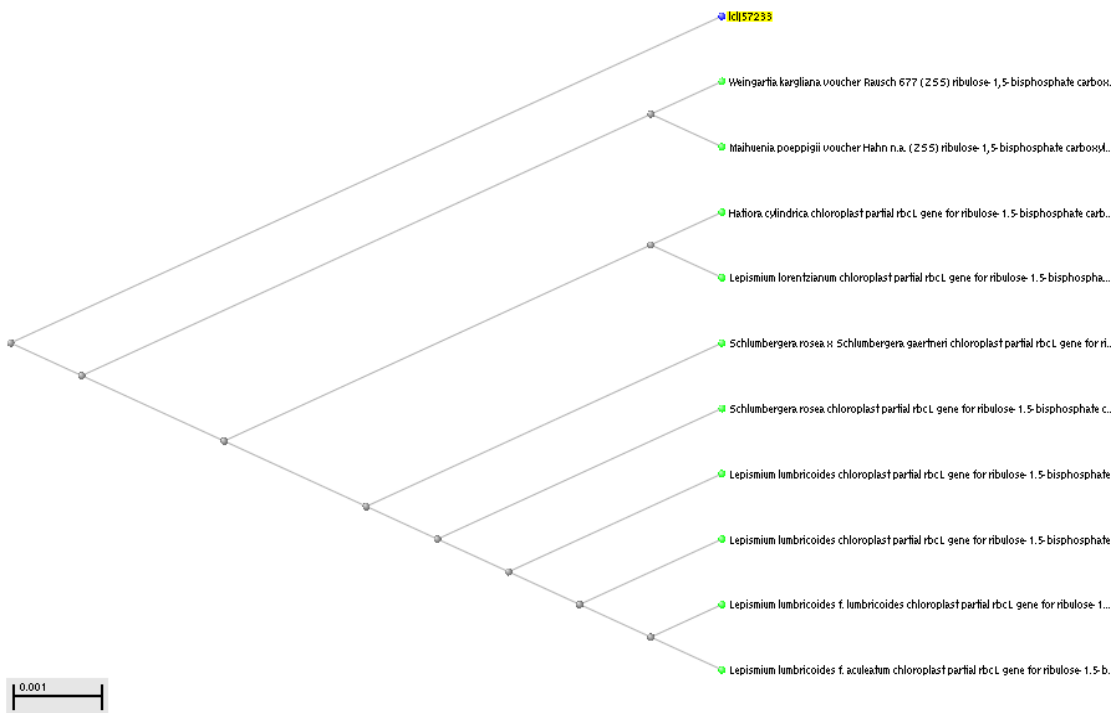


Figura 4.15 Dendrograma de *O. denegrii* (O2rbcLR, Query ID: Icl|57233)

## V. CONCLUSIONES

- **Tratamientos con RCV**

Los tratamientos T2 y el T3 generaron vitroplantas de *E. micromeris* de mayor diámetro a los 90 días, de aproximadamente 1cm.

El tratamiento T2 formó vitroplantas de buena altura (2.3 cm) y por ende con el mayor peso fresco a los 90 días de tratamiento, manteniendo la forma globosa original de *E. micromeris*.

Los tratamientos T1, T2 y el T3 produjeron los mayores valores de peso seco a los 90 días, y el T1 y T3 registraron los porcentajes de rendimiento más altos de 9.82 y 9.74% respectivamente.

Los tratamientos T1, T2 y T3 generaron vitroplantas de buena calidad en cuanto al diámetro, altura y peso, pero el T3 (Kinetina 1mg L<sup>-1</sup> + AIA 1mg L<sup>-1</sup>) promovió la formación de brotes en *E. micromeris*, considerándose como el mejor tratamiento para la micropropagación.

- **Determinación de la concentración de Auxinas y Giberelinas en vitroplantas de *E. micromeris* y *O. denegrii***

La concentración de AIA en *E. micromeris* fue alta los primeros 30 días de tratamiento, disminuyó a los 60 y aumentó sin llegar a los valores iniciales los 90 días posteriores. El T3 generó la mayor concentración de AIA en las vitroplantas de *E. micromeris* con 0.28 ppm, seguido del T1 con 0.23 ppm a los 30 días de tratamiento.

Las concentraciones de AIA en vitroplantas de *O. denegrii* fueron muy similares a los 30 y 60 días de tratamiento, de 0.13-0.17ppm y de 0.13-0.15 ppm. El T1 generó la mayor concentración de AIA en vitroplantas con 0.17 ppm seguido por el T3 con 0.15 ppm a los 30 días de tratamiento.

La concentración de AG presentó un comportamiento ascendente en vitroplantas de *E. micromeris* con respecto al tiempo de tratamiento. Existió mayor concentración de AG en vitroplantas a los 90 días de tratamiento y el T5 generó la mayor concentración con 4.5 ppm, seguido del T3 con 3.16 ppm.

- **Código de barras de la vida**

La determinación de distancias genéticas por MEGA, permite seleccionar las secuencias adecuadas para la posterior identificación de especímenes por BLAST.

El análisis BLAST proporcionó resultados rápidos y confiables en la identificación de la especie *E. micromeris*, a través de matK.

Las especies con mayor similitud a *E. micromeris* de acuerdo a las secuencias matK fue *E. micromeris*

La falta de información en la base de datos de NCBI no permitió la correcta identificación de *O. denegrii* a través de los genes matK y rbcL, sin embargo se obtuvo el espécimen con mayor identidad que de acuerdo a matK fue *Lophophora williamsii*, mientras que para rbcL fue *Weingartia kargliana*.

La obtención de árboles filogenéticos o dendrogramas, facilitan el estudio en la identificación de secuencias de procedencia conocida y desconocida, al ubicarlas de forma gráfica entre secuencias emparentadas, de las cuales exista información en la base de datos NCBI.

La generación de acervo genético encaminado a la protección de las especies no es tarea fácil, es necesario incrementar el interés científico por la

aportación de secuencias que faciliten el proceso de identificación, lo anterior no solo con el objetivo de evitar situaciones de riesgo como el tráfico ilegal, sino como aportación para el propio estudio de las especies.

## VI. RESUMEN

México es el país que alberga la mayor cantidad de especies de cactáceas en el mundo. *Epithelantha micromeris* está considerada como especie con protección especial y *Obregonia denegrii* como especie amenazada según la NOM-059-ECOL-2001 y la lista roja del CITES. Uno de los grandes desafíos que enfrentan los investigadores dedicados al estudio de cactáceas y su conservación es generar un acervo de información con aspectos genéticos, ecológicos, reproductivos y fitogeográficos de las especies, por lo anterior los objetivos del presente estudio son: i) probar cuatro tratamientos con RCV para la obtención vitroplantas de *E. micromeris* y *O. denegrii* de buena calidad, ii) determinar la concentración endógena de auxinas y giberelinas en las vitroplantas obtenidas y iii) obtener código de barras de la vida de las especies mencionadas. Este trabajo inició con la micropropagación de ambas especies. Se tomaron brotes de vitroplantas generadas *in vitro*, se colocaron en medio nutritivo Murashige-Skoog (MS) adicionado con auxinas, giberelinas y citocininas (T1= Sin reguladores, T2= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup> + AIA 1mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup> + AIA 0.5mg L<sup>-1</sup> + AG 1mg L<sup>-1</sup>, T5 = Kinetina 1mg L<sup>-1</sup> + AIA 1mg L<sup>-1</sup> + AG 1mg L<sup>-1</sup>), se mantuvieron en condiciones controladas con fotoperiodo de 16 horas luz y temperatura de 26<sup>o</sup>. Se evaluó la altura, el diámetro, el peso fresco y el peso seco de las vitroplantas. Se determinó la concentración endógena de los RCV empleando reactivo de Salkowsky, para auxinas y LC para determinar giberelinas. Para la obtención de código de barras de la vida se secuenciaron los genes *matK* y *rbcL* y posteriormente fueron comparados con la bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los resultados obtenidos, los tratamientos T1, T2 y T3 producen vitroplantas de buena calidad en cuanto a

diámetro altura y peso, pero el T3 promueve además la formación de brotes en *E. micromeris*, por lo que podemos considerarlo como el mejor tratamiento. Los tratamientos T4 y T5 fueron los que dieron mejores resultados en la micropropagación de *O. denegrii*. Se registraron concentraciones de auxina de 0.12 a 0.28 ppm en vitroplantas de *E. micromeris*. Las concentraciones más altas de AIA se presentan a los 30 días, el T3 correspondió al valor mayor (0.28 ppm). Las concentraciones de ácido giberélico fluctuaron entre 0.2 y 4.5 ppm y las más altas se registraron en vitroplantas plantas de 90 días, el T5 generó la mayor concentración con 4.5 ppm seguido del T3 con 3.26 ppm. En vitroplantas de *O. denegrii* se encontraron concentraciones de AIA de 0.13 a 0.17 ppm, el testigo T1, presentó la mayor concentración con 0.17 y 0.15 ppm a los 30 y 60 días, seguido del T3 y el T5, con 0.15 y 0.14 ppm respectivamente. Con respecto al código de barras de la vida, las especies con mayor similitud a *E. micromeris* de acuerdo a las secuencias matK fue *E. micromeris*, mientras que para rbcL la especie fue *Maihuenia poeppigii*. En el caso de *O. denegrii* las especies con mayor similitud de acuerdo a matK fue *Lophophora williamsii*, mientras que por rbcL fue *Weingartia kargliana*. La falta de precisión en la obtención del código de barras de la vida, se debió a que no existe información del gen rbcL, en la base de datos, para *E. micromeris*, ni de rbcL y matK para *O. denegrii*, no obstante lo anterior se logró obtener sus árboles filogenéticos, que complementaron los análisis de identidad y facilitaron la ubicación de las secuencias problema dentro de un grupo de especímenes emparentados genéticamente.

## VII. LITERATURA CITADA

- Acevedo, C. M. A. 2009. Enraizamiento *in vitro* y aclimatización de *Mammillaria haageana* subsp. *san-angelensis* y *Obregonia denegrii*. Tesis. Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Coahuila, México. 61 p.
- Alanís, F. G. J. y Velasco M. C. G. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el Noreste de México. Ciencia UANL. 11(1): 5-11.
- Amador, D. 1999. Curso de técnicas de cultivo de tejidos Vegetales. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía, Programa de postgrado, Maestría en biotecnología de plantas. 38 p.
- Anderson, E. F., S. Arias M. and N. P. Taylor. 1994. Threatened cacti of Mexico. Royal Botanical Gardens. Kew, United Kingdom. 135 p.
- Arias, S., U. Guzmán., M.C. Mandujano., M. Soto G., J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción I. Cactáceas y Suculentas mexicanas. 50(4): 101-124.
- Arreola, N. H. J. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. Cactáceas y Suculentas mexicanas. CVS Publicaciones. México. 27-31.
- Arteca, R. N. 1996. Plant growth substances principles and applications. Chapman & Hall. New York. 332 p.
- Audus, L. J. 1972. Plant growth substances. Vol. 1 Chemistry and Physiology. Leonard Hill, Gran Britain.
- Bandurski, R. S., J. P. Slovin., J. D. Cohen. 1993. Auxinas. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal; Azcon-Bieto, J. y M. Talon. (Ed). Mc Graw-Hill Interamericana. España.
- Barba, A. A., R. B. S. Luna., A. J. Romero. 2001. Micropropagación de plantas. Trillas. México D.F.



- Bárceñas, R. T. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. CONABIO. Biodiversitas. 68: 11-15.
- Bárceñas, R. T. y Hawkins J. A. 2011. "Barcoding cacti: a tool in the battle against illegal trade". Taiwan.
- Benítez, H. y P. Dávila. 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES. CONABIO. Biodiversitas 40: 8-11
- Boutherin, D. y G. Bron. 2002. Reproducción de las plantas hortícolas. Omega. Barcelona España. 246 p.
- Bravo, H. 1937. Las Cactáceas de México. Segunda parte. UNAM, México. p. 386-388.
- Bravo, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. 1. Universidad Autónoma de México. México, D.F. 743 p.
- Bravo, H. y H. Sánchez- Mejorada. 1991. Las cactáceas de México. Vol. 3. Universidad Nacional Autónoma de México. 404 p.
- Bravo, H. y L. Scheinvar. 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. México. Fondo de Cultura Económica. 233 p.
- Brenner, M. L. 1981. Modern methods for plant growth substance analysis. Annual Review of Plant Physiology. 32: 511-538.
- Castillo, G., G. Ortega., V. Carabeo., G. Delgado., G. Michelena. 2007. Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina. ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 41(1): 12-17.
- Choreño, T. J., R. H. González., S. T. Terrazas y L. A. Hernandez. 2002. Propagación in vitro de *Cephalocereus senilis* Haworth pfeiffer a partir de areólas. Revista Chapingo Serie Horticultura. 8(2): 183-196.
- Clayton, P. W., J. F. Hubstenberger. and G. C. Phillips. 1990. Micropropagation of members of the *Cactaceae* subtribe Cactinae. J. Am. Soc. Hort. Sci. 115: 337-343.
- Clemente, M. 1999. *In Vitro* Culture (IVC) and Plant Conservation. En: Bowes, B. G. (Ed.). A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation. Manson Publishing, London. 77-86.

- Davis, P. J. 1988. Plant hormones and their role in plant growth and development. 2 ed. Editorial Kluwer Academic Publishers. New York. 681 p.
- Dobrev, P. I., L. Havlíček., M. Vágner., J. Malbeck., M. Kamínek . 2005. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075: 159-166.
- Echenique, V., C. Rubinstein y L. Mroginski. 2004. *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. 448 p.
- Escobedo, B. L. 2000. El cultivo de tejidos vegetales en la agricultura. Memorias de la primera semana de agronomía. UAAAN Unidad Laguna. Torreón, Coahuila, México.
- Farré, A. C. 2001. El gran libro de los cactus y otras plantas crasas. Editorial de Vecchi Barcelona, España. 19-79.
- Flores, A. 2005. Guía de Cactáceas del Estado de Coahuila. Instituto Coahuilense de Ecología. Gob. del Estado de Coahuila. 105 p.
- Flores, O. C. M., A. Cabañas C., I. Peñalosa C., R. E. Quintanar Z., J. Vázquez M. y M. A. Urzúa M. 2009. Auxinas endógenas, AIA-oxidasas y enraizamiento en *Vigna radiata* L. Wilczek inducido por auxina endógena libre y conjugada. *Rev. Fitotec. Mex.* 32(1): 61-66.
- Flores, P. M. G. 2011. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* Engelman para la generación de brotes. Tesis de Licenciatura. UAAAN, Saltillo, México. 62 p.
- García, M. I. 1997. Evaluación de la presencia de sustancias probables reguladores del crecimiento vegetal en una composta. Tesis. Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. CBS. 95 p.
- Glass, C. 1997. Guía para la Identificación de Cactáceas amenazadas de México. Vol. 1. CONABIO. Cante. México, D. F. 52 p.
- Glickman, E. & Y. Dessaux. 1995. A Critical Examination of the Specificity of the Salkowsky Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2): 793-796.
- González, M. A., C. Baraloto., J. Engel., S.A. Mori., P. Pétronelli., B. Riéra. *et al.* 2009. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS One*. 4(10): e7483.

- Graham, H. D & Henderson, J. H. M. 1960. Plant Physiology. 405-408.
- Gregory, T. R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. Nature 434(7037): 1067.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. de Waard. 2003a. Biological identification through DNA bar codes. Proc. R. Soc. B 270: 313-321.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham & J. R de Waard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. R. Soc. B 270 (Suppl. 1): S96-S99.
- Hebert, P. D. N. & T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Systematic Biology. 54: 852-859.
- Hernández, H. M. y H. Godinez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. Acta Botánica Mexicana. 26: 33-52.
- Hernández, D. J., F. Zavala G., C. Valdés L., G. Salinas G., V. Robledo T. y A. Benavides M. 2003. Variación hormonal endógena en dos genotipos de cilantro por efecto del fotoperíodo y la temperatura. Agrofaz. 3(1): 221-229.
- Hewstone, N. y M. Reyes. 1999. Cultivo de tejidos en la agricultura. Tierra Adentro. Chile. 24: 30-33.
- Hunt, D. 1992. CITES cactaceae checklist. Royal Botanic Gardens, Kew. Surrey. 190 p.
- Hurtado, M. D. V y M. E. Merino. 2000. Cultivo de Tejidos Vegetales, Editorial trillas. Mexico. D.F. 232 p.
- Janzen, D. 2009. A DNA barcode for land plants. PNAS. 106(31): 12794-12797.
- Johnson, J.L. and E.R. Emino. 1979a. Tissue culture propagation in the cactaceae. Cact. Succ. J. (US) 51: 275-277.
- Koshiya, T. & H. Matsuyama. 1993. An *in vitro* system of indole-3-acetic acid formation from tryptophan in maize (*Zea mays*) coleoptile extracts. Plant Physiol. 102: 1319-1324.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack., E. A. Zimmer., L.A. Weigt., D.H. Janzen. 2005. Use of DNA Barcodes to Identify Flowering Plants. Proc Natl Acad Sci USA. 102(23): 8369-8374.

- Lanteri, A. 2007. DNA barcoding and its possible applications to the field of Entomology. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 66(3-4): 15-25.
- Linskens, H. F. and Jackson J. F. 1987. High Performance Liquid Chromatography in plant sciences. Vol 5. Germany. 248 p.
- Laskowski, L. E., C. Monerri., A. García y J. L. Guardiola. 2008. Vascularización del pedicelo y crecimiento del fruto de *Citrus sinensis* var. Salustiana y su relación con el contenido de ácido indolacético. *Bioagro.* 20(1): 11-20.
- Malda, G., H. Suzan., R. Backhaus.1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae.* 81: 71-87.
- Malda, G., R. Backhaus y C. Martin.1999 b. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plan Cell Tissue and Organ Culture* 58: 1-9.
- Mauseth, J.D., Halperin W. (1975). Hormonal control of organogénesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae) 62(8): 869-877.
- Medeiros, L.A., R. C. Ribeiro., L. A. Gallo., E. T. Oliveira and M.E. Payao. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 84(2): 147-151.
- Moncousin, Ch. 1991a. Rooting of microcuttings; general aspects. *Acta Hort.* 289: 301-310.
- Morris, P y T. Altoona. 1994. Tissue culture and transformation. En *Arabidopsis*. Meyerowitz, E. M and C. R. Somerville (Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Portland Or.
- Morse, L., M. Henifin (Ed.). 1981. Rare plant conservation: geographical data organization. The New York Botanical Garden, Nueva York. 377 p.
- Murashige, T & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Navarro, M. C y A. P. Demeneghi. 2007. Germinación de semillas y efecto de la hormonas en el crecimiento de *Mammillaria pectinifera*. Universidad Autónoma de Puebla. *Zonas Áridas.* 11(1): 233-239.
- Olivella, C., M. Vendrell and R. Savé. 2001. Determinación de ácido abscísico, ácido indolacético, zeatina y ribósido de zeatina en hojas

- desarrolladas de *Gerbera jamesonii* cv Bolus y su variación con la edad. *Invest. Agr: Prod. Prot. Veg.* 16(3): 333-342.
- Ordóñez, M. A. 2003. Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae). Guatemala. Tesis. Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 70 p.
- Ortiz, L.Y. y V. J. Flórez. 2008. Comparación cuantitativa de ácido abscísico y citoquininas en la tuberización de *Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. et Buk. *Agron. Colomb.* 26(1): 32-39.
- Paniagua, G. H. 1980. Contribución al estudio de las cactáceas del departamento de El Progreso, Guatemala. Tesis. Licenciada. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 146 p.
- Paz, A., M. González., J. A. Crawford. 2011. Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biol. Colomb.* 16(3): 161-176.
- Purves, W., D. Sadova., G. Orians., C. Heller. 2002. *Vida La Ciencia De La Vida*. 6 ed. Médica Panamericana. New York. 1133 p.
- Ramírez, R. H., A. Benavides M., M. Galván E., E. A. Rangel L. 2001. Giberelinas biológicamente activas en tejido floral de manzano (*Malus domestica* Borkh). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 7(2): 197-207.
- Raven, H., R. Evert & S. Eichhorn. 1992. *Biología de las plantas*. Editorial Reverté, S. A. Tomo II. España. 773 p.
- Ríha, J. y R. Subik, R. 1991. *Enciclopedia de los Cactus*. Checoslovaquia. SUSAETA. Spektrum, Brno. 350 p.
- Rodríguez, C. 2006. Morfogénesis *in vitro* de nueve especies de interés botánico y ornamental pertenecientes a la familia *Cactaceae*. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 96 p.
- Rodríguez. G. B y A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal (U.S.)*. 64: 116-119.
- Rosell, C. H. y V. M. Villalobos. 1990. *Fundamento teórico-prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 113 pp.
- Rosser, A., M. Haywood., D. Harris & P. Crofton (Ed.). 2004. *CITES: a conservation tool*. IUCN Species Survival Commission, Taiwan.

- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1992. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica, México.
- Salisbury, F. 1994. Fisiología Vegetal. Editorial Iberoamericana. México. 759 p.
- Salkowsky, E. 1889. Ueber die Bildung von flüchtigen Fettsäuren bei der ammoniakalischen Harngährung. Zeitschrift für Physiologische Chemie 13: 264-274.
- Santos, D., O.R. Méndez., A.G. Arredondo., D.L. Santos. 2003. "In vitro organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae)". *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*: 39(5): 480-484.
- Semarnat (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental- Especies nativa 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 México, D.F.
- Schindel, D. E. & S. E. Miller. 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*. 435: 17.
- Tamura, K., D. Peterson., N. Peterson., G. Stecher., M. Nei., and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Trejo, O. C. K., C. Ramírez S., R. Soltero Q. 2005. Micropropagación de Cactáceas. Departamento de Botánica y Zoología, Avances de Investigación Científica en el CUCBA. Universidad de Guadalajara. XVI Semana de la Investigación Científica. 542-546.
- Taberlet, P., E. Coissac, F.O. Pompanon., L. Gielly., C. Miquel., A. Valentinl, *et al.* 2007. Power and Limitations of the Chloroplast trnL (UAA) Intron for Plant DNA Barcoding. *Nucleic Acids Res.* 35(3):e14-14.
- Velázquez, E.L.E y R. Soltero Q. 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, *Cactaceae* 46(3): 56-62.
- Volke, S. T. L . 1995. Fisiología de hongos productores de reguladores de crecimiento vegetal. Tesis. Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. Dto de Biotecnología. 115 pp.
- Woodward, A. W., B. Bartel. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95:707-735.

- Yao, H., J. Song., C. Liu., K. Luo., J. Han., Y. Li, *et al.* 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PloS One*. 5(10): e13102.
- Yesson, C., R. T. Bárcenas., H. M. Hernández , Ruiz-Maqueda, M de L., A. Prado., V. M. Rodríguez., J. A. Hawkins. 2011. DNA barcodes for Mexican Cactaceae, plants under pressure from wild collecting. *Molecular Ecology Resources*. ISSN. 11(5): 1755-0998.

## VIII. ANEXOS

- Anexo A

**Cuadro 1. Medio nutritivo Murashige y Skoog 1962**

COMPUESTO	mg L <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>
<b>Macronutrientes</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1.65	16.5
KNO <sub>3</sub>	1900	1.9	19
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	332.23	0.332	3.322
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	0.17	1.7
Mg SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	0.37	3.7
<b>Micronutrientes</b>			
KI	830	0.00083	0.0083
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	0.0062	0.062
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	12.88	0.01288	0.1288
ZnSO <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6	0.0086	0.086
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	250	0.00025	0.0025
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	25	0.000025	0.00025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	25	0.000025	0.00025
<b>Sol. de Fierro</b>			
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	0.0373	0.373
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8	0.0278	0.278
<b>Vitaminas</b>			
Inositol	100	0.1	1
Ac. Nicotínico	0.5	0.0005	0.005
Piridoxina- HCl	0.5	0.0005	0.005
Tiamina- HCl	0.1	0.0001	0.001
Glicina	2	0.002	0.02
<b>Carbohidratos</b>			
Sacarosa		30	
<b>Solidificante</b>			
Agar		9	
pH		5.7	



- **Anexo B**

**\*Secuencias matK y rbcL de *E. micromeris***

**MUESTRA: 532. *Epithelanta.1* matk-F**

ACACTTGAAAAAAAAACCCATAAAGTCGAGAGAATGCTTTGATAACCGATTGAT  
TATAGATTCTTCTTGGTTGAGACCACAGGGAAAAATGACATTGCCAAAAATT  
GAGAAGATAATATTTCCATTTATGCATCAGAAGAGATGTCCCTTTTGAAGCC  
AGAATTGATTTTCTCGATACCTAACATAATGCAGGAAAGGGTCTTTGAAAA  
GCCATAAGATAACGCAAAAATCCTTAGTCAAAGTTCAAGACTTTTACTAGAG  
ATTCTAGCTTTCCATAAAAATAATTTGTTCAAGAAGGGCTCCAAAAGATGT  
TGATCGTAAATGAGAGGATTGGTTACAGAGAAAAAAGAAAATGGATTGTA  
TTCACATACATGGAAATTTATATAGGAACAAGAATAATCGTTGATTCCTTTT  
GAAAAATCGAATTGGATTTTTGGGAAGTAATAAGACTATTCCAATTACGAT  
ACTCATAAAGAAAGAATCGTAATAAATGCAAAGAAGAAGCATCTTTCACCCA  
GTAACGAGAGTT

**MUESTRA: 511. *Epithelanta.2* matk-F**

ACTTGAAAAAAAAACCCATAAAGTCGAGAGAATGCTTTGATAACCGATTGATA  
TAGATTCTTCTTGGTTGAGACCACAGGGAAAAATGACATTGCCAAAAATTGA  
GAAGATAATATTTCCATTTATGCATCAGAAGAGATGTCCCTTTTGAAGCCAT  
AATTGATTTCTCGATACCTAACATAATGCAGGAAAGGGTCTTTGAAAAGCC  
ATAAGATAACGCAAAAATCCTTAGTCAAAGTCAAACCTTTTACTAGAGATTC  
TAGCTTTCCATAAAAATAATTTGTTCAAGAAGGGCTCCAAAAGATGTTGAT  
CGTAAATGAGAGGATTGGTTACAGAGAAAAAAGAAAATGGATTGTAATTCA  
CATACATGGAAATTATATAGGAACAAGAATAATCGTTGATTCCTTTTTGAAAA  
ATCGAATTGGATTTTTGGGAAGTAATAAGACTATTCCAATTACGATATTCATA  
AAGAAAGAATCGTAATAAATGCAAAGAAGAAGCATCTTTCACC

**MUESTRA: 548. *Epithelanta.1* rbcL-R**

CTCGACCATAGTTTTTAGCGGATAAGCCCAATTTGGCTTAATAGTGCATCC  
CAGTAGAGGACGGCCATACTTGTTCAATTTATCCCTCTCAACTTGGATACC  
GTGAGGCGGGCCTTGGAAAGTTTTTATATAAGCAACAGGGATTTCGCAAATC  
CTCCAACCGTAAAGCACGCAGGGCTTTGAACCCAAATACATTACCCACAAT  
GGAAGTAAACATATTAGTAACAGAACCTTCTTCAAAAAGGTCTAAGGGGTAA  
GCTACATAACAAATATATTGATTGTCTTTTCCAGGAACGGCATCGATGTGGT  
AGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGTCCGTCGGTCCATACAG  
TTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTCGGCAGCTACTGCGGCTCCTGCTTCTT  
CTGACGGAACTCCAGGTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTGCCAAGATATCG

GTATCCTGGGGTTGATATTCAGGAGTATAATAAGTCAGTTTGTAACTTTAA  
CACCTGCTTTAAATCCAACACTTGCTTTAGTCTCT

**MUESTRA: 548. *Epithelanta.2* rbcl-R**

CTCGACCATAGTTTTTAGCGGATAAGCCCAATTTGGGCTTAATAGTGCATCC  
CAGTAGAGGACGGCCATACTTGTTCAATTTATCCCTCTCAACTTGGATACC  
GTGAGGCGGGCCTTGAAAGTTTTTATATAAGCAACAGGGATTTCGCAAATC  
CTCCAATCGTAAAGCACGCAGGGCTTTGAACCCAAATACATTACCCACAAT  
GGAAGTAAACATATTAGTAACAGAACCTTCTTCAAAAAGGTCTAAGGGGTAA  
GCTACATAACAAATATATTGATTGTCTTTCCAGGAACGGCATCGATGTGGT  
AGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGTCCGTCGGTCCATACAG  
TTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTTCGGCAGCTACTGCGGCTCCTGCTTCTT  
CTGACGGAACCTCAGGTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTGCCAAGATATCG  
GTATCCTGGGGTTGATATTCGGAGTATAATAAGTCAATTTGTAACTTTGAA  
CACCTGCTTTAAATCCAACACTTGCTTTAGTCTCT

- **Secuencias matK y rbcl de *O. denegrii***

**MUESTRA: 844. *Obregonia.1(8)*matk-F**

CCGGACATAGCACAGACAGTAGAAGTATATTACTTTATTTCGATACAAACTCT  
TTTTTCTTGAAGAGCCACCATAATAATGAGAAAGATTTCTGCATATGCGCCC  
AAACCGATCAATAATATCAGAATCTAATAAATCGGTCCAGACCGACTTACTA  
ATGGGATGTCCTAATACGTTACAAAATTTTCGCTTTAGCCAACGATCCAACCA  
GAGGAATAATTCGAACACTACGGTATCGAATTTCTTAATACGATTATCTATTAG  
AAAAGAATTTGCTACCATTTGACTCCGTACCACTGAAGAATTGAGTCGAACA  
CTTGAAAAAAAACCCATAAAGTCGAGAGAATGCTTTGATAACCGATTGATAT  
AGATTCTTCTTGGTTGAGACCACAGGGAAAAATGACATTGCCAAAAATTGA  
GAAGATAATATTTCCATTTATGCATCAGAAGAGATGTCCCCTTTGAAGCCAG  
AATTGATTTTCTCGATACCTAACATAATGCAGGGAAAGGGTCTTTGAAAGG  
GCCATAAGATAAGGCAAAAATCCCTTAGTAAAAGTTTTGACTTTTACTAGAT  
ATTCTAGCTTTCCATAAAAATTAATTTTCGTTCAAGAAGGGCTCCAAAAGATG  
TTGATCGTAAATGAGAAGGATTGGTTACAGGAGAAAAAAGAAAATGGATTT  
CGTATTCACATACATAGAAATTATAGAGGAACAAGAATTATCGGTTGATTT  
TTTTTTGAAAAACAATTACGATACTCATAAAGAAAGAATCGTAATAAATGCAA  
AGAAGAAGCATCTTTCACCCAGTAACGAAGAGTTTGAACAGTCACAGGGGG  
GGGGGGAAAAAAA

**MUESTRA: 867. *Obregonia.2(9)*matk-F**

CCGGTCCAGCAAGAAGTAGAAGTATATACTTTATTTCGATACAAACTCTTTTT  
TCTTGAAGAGCCACCATAATAATGAGAAAGATTTCTGCATATGCGCCCAA  
CCGATCAATAATATCAGAATCTAATAAATCGGTCCAGACCGACTTACTAATG  
GGATGTCTAATACGTTACAAAATTTTCGCTTTAGCCAACGATCCAACCAGA  
GGAATAATTCGAACACTACGGTATCGAATTTCTTAATACGATTATCTATTAGAAA  
AGAATTTGCTACCATTTGACTCCGTACCACTGAAGAATTGAGTCGAACACTT  
GAAAAAAACCATAAAGTCGAGAGAATGCTTTGATAACCGATTGATATAGA  
TTCTTCTTGGTTGAGACCACAGGGAAAAATGACATTGCCAAAAATTGAGAA  
GATAATATTTCCATTTATGCATCAGAAGAGATGTCCCCTTTGAAGCCAGAAT  
TGATTTTCCTCGATACCTAACATAATGCAGGAAAGGGTCTTTGAAAGGCCAT  
AAGATAAGGCCAAAAATCCTTAGTAAAAGTTTTGACTTTTACTAGATATTCTAG  
CTTCCATAAAAATAATTTTCGTTCAAGAAGGGCTCCAAAAGATGTTGATCGT  
AATGAGAGGATTGGTTACAGAGAAAAAAGAAAATGGATTCGTATTCACATA  
CATAGAAATTATAGAGGAACAAGAATAATCGTTGATTCCTTTTTGAAAAATC  
GAATTGGATTTTTGGGGAGTAATAAGACTATTCCCAATTACGATACTCATAA  
AGAAAGAATCGTAATAATGCAAAGAAGAAGCATCTTCACCCAGTAACGAAG  
AGTTGAACAGATCATCCACCCGGCAAGAAAAGAGAAA

**MUESTRA: 579. *Obregonia.1(8)*.rbcl-R**

TCCGGGTCACACGCTCGACATAGTTTTTAGCAGATAACCCCAATTTCCGGCT  
TAATAGTGCATCCCAGTAGAGGACGGCCATACTTGTTCAATTTATCCCTCTC  
AACTTGGATACCGTGAGGCGGGCCTTGGAAGTTTTTATATAAGCAACAGG  
GATTCGCAAATCCTCCAACCGTAAAGCACGCAGGGCTTTGAATCCAAATAC  
ATTACCCACAATGGAAGTAAACATATTAGTAACAGAACCTTCTTCAAAAAGG  
TCTAAGGGGTAAGCTACATAACAAATGTATTGATTGTCTTTTCCAGGAACGG  
CATCGATGTGGTAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGTCCGT  
CGGTCCATACAGTTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTCGGCAGCTACTGCGG  
CTCCTGCTTCTTCTGACGGAACCTCCGGGTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTG  
CCAAGATGTCCGTATCCTGGGGTTGATATTCAGGAGTATAATAAGTCAATTT  
GTAATCTTTAACACCTGCTTGAAATCCAACACTTGCTTTAGTCTCTGTTGGG  
GGGAGAACATATA

**MUESTRA: 574. *Obregonia.2(9)*rbcl-R**

TAACCAACGCTCGACATAGTTTTTAGCAGATAACCCCAATTTCCGGCTTAATA  
GTGCATCCCAGTAGAGGACGGCCATACTTGTTCAATTTATCCCTCTCAACTT

GGATACCGTGAGGCGGGCCTTGGAAAGTTTTTATATAAGCAACAGGGATT  
GCAAATCCTCCAACCGTAAAGCACGCAGGGCTTTGAATCCAAATACATTAC  
CCACAATGGAAGTAAACATATTAGTAACAGAACCTTCTTCAAAAAGGTCTAA  
GGGGTAAGCTACATAACAAATGTATTGATTGTCTTTTCCAGGAACGGCATC  
GATGTGGTAGCATCGTCCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGTCCGTCCGT  
CCATACAGTTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTCGGCAGCTACTGCGGCTCC  
TGCTTCTTCTGACGGAACTCCGGGTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTGCCAA  
GATGTCGGTATCCTGGGGTTGATATTCAGGAGTATAATAAGTCAATTTGTAA  
TCTTTAACACCTGCTTGAAATCCAACACTTGCTTTAGTCTCTGTGGGGGAG  
CCCTTAGGG

- Anexo C

**Cuadro 1.** Concentración de AIA en vitroplantas de *E. micromeris*

T	AIA (ppm)		
	30 D	60 D	90 D
<b>T1</b>	<b>0.232</b>	0.126	0.179
<b>T2</b>	0.189	0.129	0.178
<b>T3</b>	<b>0.283</b>	0.127	<b>0.188</b>
<b>T4</b>	0.203	0.126	0.187
<b>T5</b>	0.193	0.124	0.167

AIA= Acido indo acético, D=días; T= tratamientos; T1= Sin reguladores, T2= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+AIA 0.5mg L<sup>-1</sup> + AG 1mg L<sup>-1</sup>, T5 = Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>+ AG 1mg L<sup>-1</sup>

**Cuadro 2.** Concentración de AG en vitroplantas de *E. micromeris*

T	AG (ppm)		
	30 D	60 D	90 D
<b>T1</b>	<b>0.72</b>	0.5	-
<b>T2</b>	0.7	0.9	2.3
<b>T3</b>	<b>0.72</b>	0.79	<b>3.16</b>
<b>T4</b>	0.27	<b>0.94</b>	2.3
<b>T5</b>	0.16	<b>1.2</b>	<b>4.5</b>

AG= Acido giberélico, D=días; T= tratamientos; T1= Sin reguladores, T2= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+AIA 0.5mg L<sup>-1</sup> + AG 1mg L<sup>-1</sup>, T5 = Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>+ AG 1mg L<sup>-1</sup>

**Cuadro 3.** Concentración de AIA en vitroplantas de *O. denegrii*

T	AIA(ppm)	
	30 D	60 D
<b>T1</b>	<b>0.171</b>	<b>0.152</b>
<b>T2</b>	0.137	0.138
<b>T3</b>	<b>0.157</b>	0.138
<b>T4</b>	0.150	0.134
<b>T5</b>	0.141	<b>0.147</b>

AIA= Acido indol acético, D=días; T= tratamientos; T1= Sin reguladores, T2= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>, T3= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>, T4= Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 0.5 mg L<sup>-1</sup>+ AG 1mg L<sup>-1</sup>, T5 = Kinetina 1mg L<sup>-1</sup>+ AIA 1mg L<sup>-1</sup>+ AG 1mg L<sup>-1</sup>