



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Variabilidad genética y viabilidad de semillas de *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) conservadas *ex situ* y enterradas *in situ* en un matorral xerófilo en el Valle de Tehuacán

TESIS

Que para obtener el grado académico de Maestro en Biología

PRESENTA

Biól. David Alejandro Guzmán Hernández

Comité tutorial:

Dr. Francisco José Fernández Perrino (Co-Director)

Dra. Leticia Ponce de León García (Co-Directora)

Dra. Claudia Barbosa Martínez (Asesora)

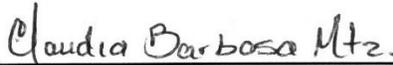
La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo financiero del mismo Consejo.

El jurado designado por la Comisión del Posgrado en Biología, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aprobaron la presente tesis que presentó:

Biól. David Alejandro Guzmán Hernández

El día 05 de enero del año 2018.

JURADO DE EXAMEN



Dra. Claudia Barbosa Martínez
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
(Presidente)



Dr. José Alejandro Zavala Hurtado
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
(Secretario)



Dr. Juan Manuel Villa Hernández
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
(Vocal)



Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia
Instituto de Ecología, UNAM
(Vocal)

DEDICATORIA

A mis padres

Martha Hernández y Armando Guzmán, gracias por su amor incondicional, comprensión y apoyo que me ha brindado a lo largo de mi vida. Sin sus esfuerzos, consejos y regaños no sería la persona que soy ahora.

A mis hermanos

Mario Alberto y Diego Armando, por ser mis compañeros de vida, travesuras y juegos.

A mi familia

Por siempre acompañarme en los buenos y malos momentos, recordándome siempre que cuento con su apoyo incondicional.

A mis profesores

Por todas sus enseñanzas y consejos que fortalecieron mi desarrollo académico y profesional.

A mis mejores amigos

Josías, kike y Billy, por su amistad y porque siempre es agradable pasar tiempo con ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante mis estudios en la Maestría en Biología y la realización del presente proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), por brindarme todas las herramientas necesarias durante mi formación académica y elaboración de la presente tesis.

Al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-I y a la Dra. Alejandra Serrato Díaz, por permitirme el acceso a sus instalaciones y facilitarme el uso de los equipos necesarios para realizar una investigación de calidad.

A mi Co-director de tesis, Dr. Francisco José Fernández Perrino, por sus consejos, apoyo y tiempo brindado desde el inicio de la maestría. Asimismo, por las correcciones y observaciones que realizó al presente escrito.

A mi Co-directora de tesis, Dra. Leticia Ponce de León García, por la confianza incondicional que me brindó para realizar este proyecto de investigación. Además, por los comentarios y sugerencias que realizó para mejorar el contenido de este trabajo.

A mi asesora de tesis, Dra. Claudia Barbosa Martínez, por su amistad, tiempo, apoyo y asesoría durante el proceso de investigación y la elaboración de la tesis, así como, por las correcciones que realizó para mejorar la calidad de este escrito.

Al Dr. José Alejandro Zavala Hurtado, por su apoyo en el análisis estadístico de los datos presentados en esta tesis. Asimismo, agradezco su disposición en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Villa Hernández, por el apoyo brindado en la parte experimental y de campo que se realizó durante este proyecto. También, por tomarse el tiempo de revisar el presente escrito para mejorar la redacción y contenido.

A la Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia por aceptar formar parte del jurado de examen de grado.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecofisiología Vegetal, María Sandra Arias Duran, Giovanni Fonseca Vélez, Marisol Coronel Ortiz, Andrea García, Joel Marín Ramírez e Ivonne Martínez, gracias por su ayuda en el trabajo de laboratorio y campo, pero sobre todo por su amistad.

A todas las personas, que de alguna u otra forma han contribuido al desarrollo de este trabajo de tesis.

RESUMEN

Los bancos de semillas *ex situ* y en el suelo (*in situ*) son fundamentales para el mantenimiento y regeneración de poblaciones de plantas y el estudio de éstos es básico para proponer estrategias de conservación y realizar estudios ecológicos. En especies de cactáceas, particularmente en *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus* existe una falta de conocimiento sobre el tiempo en el cual las semillas de estas especies pueden mantener la viabilidad cuando son almacenadas en condiciones *ex situ*, así como su potencial para formar bancos de semillas en el suelo. Por tal motivo, en el presente trabajo se estudió el efecto de la edad en la viabilidad de semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, conservadas *ex situ* y enterradas *in situ* en un matorral xerófilo, considerando los efectos de las condiciones ambientales, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la dinámica del banco de semillas en zonas áridas y semiáridas. Los resultados mostraron que las semillas de ambas especies permanecen viables al menos ocho años cuando son conservadas *ex situ*, mientras que en condiciones naturales se mantienen viables durante un período mayor a un año, pero menor a dos, lo que indica que tienen el potencial de formar bancos de semillas persistentes a corto plazo (independientemente de la edad de las semillas y del genotipo de las especies). Estos datos sugieren que la pérdida de viabilidad de las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* podría deberse a un efecto conjunto y acumulativo de factores bióticos y abióticos a través del tiempo.

ABSTRACT

Ex situ seed banks and soil seed banks (*in situ*) are fundamental for the maintenance and regeneration of plant populations and the study of these is basic to propose conservation strategies and ecological studies. In species of cacti, particularly in *Escontria chiotilla* and *Stenocereus pruinosus* there is a lack of knowledge about the time that the seeds of these species can maintain the viability when they are stored in *ex situ* conditions, as well as their potential to form soil seed banks. Therefore, in this work was studied the effect of the age on the viability of seeds of *E. chiotilla* and *S. pruinosus*, conserved *ex situ* and buried *in situ* in a xerophytic scrub, considering the effects of environmental conditions, with the purpose of contributing to the knowledge of the dynamics of the seed bank in arid and semiarid zones. The results showed that the seeds of both species remain viable for at least eight years when they are conserved *ex situ*, while in natural conditions they remain viable for a period of more than one year but less than two, indicating that they have the potential to establish banks of persistent seeds in short term (regardless of age of the seeds and species genotype). These data suggest that the viability loss of *E. chiotilla* and *S. pruinosus* seeds could be a combined and cumulative effects of biotic and abiotic factors over time.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	XI
-------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
-------------------------	-----

1. INTRODUCCIÓN.....	1
----------------------	---

2. ANTECEDENTES	4
-----------------------	---

2.1. Semilla	4
--------------------	---

2.1.1. Definición y formación.....	4
------------------------------------	---

2.1.2. Importancia	5
--------------------------	---

2.2. Germinación.....	5
-----------------------	---

2.3. Latencia.....	7
--------------------	---

2.3.1. Tipos de latencia en semillas	7
--	---

2.4. Viabilidad.....	8
----------------------	---

2.5. Longevidad.....	8
----------------------	---

2.5.1. Longevidad potencial	9
-----------------------------------	---

2.5.2. Longevidad ecológica	10
-----------------------------------	----

2.6. Banco de semillas en el suelo.....	11
---	----

2.6.1. Definición	11
-------------------------	----

2.6.2. Clasificación de los bancos de semillas.....	11
---	----

2.6.3. Dinámica del banco de semillas.....	12
--	----

2.6.4. Métodos para estudiar la persistencia de los bancos de semillas	13
--	----

2.7. Descripción de la familia Cactaceae	14
2.7.1. Características de las semillas de cactáceas	15
2.7.2. Germinación en semillas de cactáceas.....	15
2.7.3. Latencia en semillas de cactáceas	16
2.7.4. Viabilidad y longevidad potencial de semillas de cactáceas	16
2.7.5. Banco de semillas en cactáceas.....	16
2.8. Variabilidad genética.....	17
2.9.1. Marcadores de ADN	18
2.9.2. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs)	19
3. ESPECIES DE ESTUDIO.....	20
3.1. <i>Escontria chiotilla</i> (F.A.C. Weber) Rose.....	20
3.2. <i>Stenocereus pruinosus</i> (Otto) Buxbaum	21
4. SITIO DE ESTUDIO	22
4.1. Ubicación, extensión y límites	22
4.2. Topografía.....	22
4.3. Fisiografía	22
4.4. Clima.....	23
4.5. Suelo.....	24
4.6. Flora y fauna	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1. General	25

5.2. Específicos.....	25
6. HIPÓTESIS	26
7. MATERIAL Y MÉTODOS	27
7.1. Colecta, extracción y conservación de semillas <i>ex situ</i>	27
7.2. Viabilidad de semillas conservadas <i>ex situ</i>	27
7.3. Enterramiento in situ y exhumación de semillas	27
7.3.1. Viabilidad de semillas enterradas <i>in situ</i>	28
7.3.2. Efecto de las condiciones ambientales (periodo de secas y lluvias) en la viabilidad de semillas	29
7.4. Análisis de suelo	30
7.5. Determinación de la viabilidad de semillas.....	31
7.6. Siembra y germinación de semillas.....	31
7.7. Parámetros de germinación	32
7.8. Análisis estadísticos.....	32
7.9. Extracción y cuantificación de ADN	33
7.9.1. Extracción de ADN genómico	33
7.9.2. Concentración, pureza e integridad del ADN	33
7.10. Amplificación de ADN mediante marcadores moleculares AFLPs	34
7.10.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción	34
7.10.2. Ligación de adaptadores.....	35
7.10.3. Reacción de preamplificación	36
7.10.4. Amplificación selectiva	38

7.10.5. Combinaciones de primers	39
7.10.6. Secuenciación automática	41
7.10.7. Matriz binaria de presencia/ausencia.....	41
7.10.8. Matriz de similitud	42
7.10.9. Obtención de los dendrogramas	42
8. RESULTADOS.....	43
8.1. Viabilidad de semillas conservadas <i>ex situ</i>	43
8.1.1. <i>E. chiotilla</i>	43
8.1.2. <i>S. pruinosus</i>	43
8.2. Viabilidad de semillas enterradas <i>in situ</i>	46
8.2.1. <i>E. chiotilla</i>	46
8.2.2. <i>S. pruinosus</i>	49
8.3. Efecto de las condiciones ambientales (período de secas y lluvias) en la viabilidad de semillas	52
8.3.1. <i>E. chiotilla</i>	52
8.3.2. <i>S. pruinosus</i>	55
8.4. Análisis de suelo	58
8.5. Extracción, cuantificación e integridad del ADN.....	59
8.6. AFLPs	60
6.6.1. Restricción y ligación	60
8.6.2. Preamplificación.....	61
8.6.3. Amplificación selectiva.....	61
8.6.4. Matriz de presencia ausencia	62

8.6.5. Matriz binaria	63
8.6.6. Obtención de los dendrogramas	63
9. DISCUSIÓN	65
9.1. Viabilidad de semillas conservadas <i>ex situ</i>	65
9.2. Viabilidad de semillas enterradas <i>in situ</i>	68
9.3. Efecto de las condiciones ambientales (período de secas y lluvias) en la viabilidad de semillas	71
9.4. Análisis de suelo	73
9.5. Variabilidad genética	75
10. CONCLUSIONES.....	78
11. BIBLIOGRAFÍA.....	80
12. ANEXOS	89

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación y georreferenciación de los micrositios de estudio	28
Cuadro 2. Fecha de enterramiento y exhumación de los sobres con semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> para cada año de colecta (2007, 2010 y 2014) durante 24 meses.....	29
Cuadro 3. Fecha de enterramiento y exhumación de los sobres con semillas de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i> para cada año de colecta (2007, 2010 y 2015) en períodos de secas y de lluvias	30
Cuadro 4. Reacción de digestión de ADN con enzimas de restricción	34
Cuadro 5. Reacción de ligación de adaptadores al ADN digerido	36
Cuadro 6. Reacción de preamplificación de ADN mediante PCR	37
Cuadro 7. Reacción de amplificación selectiva de ADN mediante PCR.....	39
Cuadro 8. Intensidad relativa de los fluoróforos utilizados en la detección de polimorfismo de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i>	40
Cuadro 9. TMG de semillas de <i>E. chiotilla</i> de diferentes colectas conservadas <i>ex situ</i> en condiciones de oscuridad a 25 ± 5 °C durante 0, 1, 5 y 8 años.....	45
Cuadro 10. TMG de semillas de <i>S. pruinosus</i> de diferentes colectas conservadas <i>ex situ</i> en condiciones de oscuridad a 25 ± 5 °C durante 0, 1, 5 y 8 años	45
Cuadro 11. TMG de semillas de <i>E. chiotilla</i> colecta 2007 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.....	48

Cuadro 12. TMG de semillas de <i>E. chiotilla</i> colecta 2010 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.....	48
Cuadro 13. TMG de semillas de <i>E. chiotilla</i> colecta 2014 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.....	48
Cuadro 14. TMG de semillas de <i>S. pruinosus</i> colecta 2007 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.....	51
Cuadro 15. TMG de semillas de <i>S. pruinosus</i> colecta 2010 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) por 24 meses.....	51
Cuadro 16. TMG de semillas de <i>S. pruinosus</i> colecta 2014 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.....	51
Cuadro 17. TMG de semillas de <i>E. chiotilla</i> colecta 2007 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).....	54
Cuadro 18. TMG de semillas de <i>E. chiotilla</i> colecta 2014 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).....	54
Cuadro 19. TMG de semillas de <i>E. chiotilla</i> colecta 2015 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).....	54
Cuadro 20. TMG de semillas de <i>S. pruinosus</i> colecta 2007 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).....	57
Cuadro 21. TMG de semillas de <i>S. pruinosus</i> colecta 2014 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).....	57

Cuadro 22. TMG de semillas de <i>S. pruinosus</i> colecta 2015 enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias)	57
Cuadro 23. pH, materia orgánica (MO), fósforo (P) y magnesio (Mg), registrado en los micrositios de estudio	58
Cuadro 24. Porcentaje de arena, limo, arcilla y textura de suelo registrada en los micrositios de estudio	58
Cuadro 25. Contenido de humedad (%) registrado en los micrositios de estudio	58
Cuadro 26. Combinaciones de primers específicos que proporcionaron un mayor número de fragmentos polimórficos en <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i>	62
Cuadro 27. Bandas amplificadas y porcentaje de polimorfismo en <i>E. chiotilla</i>	62
Cuadro 28. Bandas amplificadas y porcentaje de polimorfismo en <i>S. pruinosus</i>	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una semilla madura de una cactácea	4
Figura 2. Eventos físicos y metabólicos que ocurren durante la germinación (Fase I y II) y crecimiento temprano de la plántula (Fase III)	6
Figura 3. Descripción metodológica de la amplificación de ADN mediante AFLPs ..	19
Figura 4. <i>E. chiotilla</i>	20
Figura 5. <i>S. pruinosus</i>	21
Figura 6. Distribución de la precipitación y temperatura en el municipio de Santiago Chazumba (Período 1961-2003).....	23
Figura 7. Programa del termociclador para la preamplificación de ADN	38
Figura 8. Programa del termociclador para la amplificación selectiva de ADN.....	41
Figura 9. Viabilidad de semillas de <i>E. chiotilla</i> de diferentes colectas conservadas <i>ex situ</i> en condiciones de oscuridad a 25 ± 5 °C durante 0, 1, 5 y 8 años	45
Figura 10. Viabilidad de semillas de <i>S. pruinosus</i> de diferentes colectas conservadas <i>ex situ</i> en condiciones de oscuridad a 25 ± 5 °C durante 0, 1, 5 y 8 años.	45
Figura 11. Viabilidad de semillas de <i>E. chiotilla</i> de diferentes colectas enterradas <i>in situ</i> en dos micrositos (M1 y M2) durante 24 meses.....	48
Figura 12. Viabilidad de semillas de <i>S. pruinosus</i> de diferentes colectas enterradas <i>in situ</i> en dos micrositos (M1 y M2) durante 24 meses.....	51

Figura 13. Viabilidad de semillas de <i>E. chiotilla</i> de diferentes colectas (A. 2007, B. 2014, C. 2015) enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) en diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias)	54
Figura 14. Viabilidad de semillas de <i>S. pruinosus</i> de diferentes colectas (A. 2007, B. 2014, C. 2015) enterradas <i>in situ</i> en dos micrositios (M1 y M2) en diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias)	57
Figura 15. Gel de electroforesis donde se verifica la integridad de ADN de las muestras de <i>E. chiotilla</i>	60
Figura 16. Gel de electroforesis donde se verifica la integridad de ADN de las muestras de <i>S. pruinosus</i>	60
Figura 17. Gel de electroforesis donde se verifica la digestión y ligación de las muestras de <i>E. chiotilla</i>	61
Figura 18. Gel de electroforesis donde se verifica la digestión y ligación de las muestras de <i>S. pruinosus</i>	61
Figura 19. Gel de electroforesis en donde se verifica la preamplificación de ADN de las muestras de <i>E. chiotilla</i> y <i>S. pruinosus</i>	62
Figura 20. Dendrograma obtenido de las muestras de <i>E. chiotilla</i> al realizar un bootstrap de 1000 repeticiones con el índice de Nei y Li con UPGMA	65
Figura 21. Dendrograma obtenido de las muestras de <i>S. pruinosus</i> al realizar un bootstrap de 1000 repeticiones con el índice de Nei y Li con UPGMA.	65

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los ecosistemas enfrentan el cambio climático, las fuertes presiones antropogénicas, la erosión genética y la pérdida de diversidad, por lo que, la conservación de los recursos genéticos debe considerarse una prioridad y un tema de investigación fundamental (Nascimento y Meiado, 2016).

En organismos vegetales, la conservación se ha agrupado tradicionalmente en dos categorías, la conservación *ex situ* e *in situ*, en donde se preservan poblaciones, especies y germoplasma (semillas), fuera o dentro de su lugar de origen (Draper *et al.*, 2004).

Los bancos de semillas *ex situ* y en el suelo (*in situ*) han mostrado ser eficientes en el mantenimiento y regeneración de poblaciones de plantas y el estudio de éstos es básico para proponer estrategias de conservación (Assis *et al.*, 2011).

Un banco de semillas *ex situ* tiene como objetivo preservar la calidad física y fisiológica de las semillas. Las semillas almacenadas pueden ser utilizadas con diferentes propósitos, tales como, estudios anatómicos, fisiológicos, bioquímicos, de diversidad genética y reforestación (Nascimento *et al.*, 2015). Por tal motivo, es deseable que las semillas mantengan su viabilidad por períodos prolongados. No obstante, ésta disminuye progresivamente, por lo que evaluar la viabilidad a través del tiempo es un aspecto esencial para determinar la longevidad de semillas bajo condiciones controladas de almacenamiento (Bradford y Nonogaki, 2007).

Por otra parte, la presencia de bancos de semillas viables en el suelo es uno de los principales indicadores del potencial de regeneración de un ecosistema. Este proceso natural de conservación *in situ* proporciona información sobre el tiempo en el cual las semillas se mantienen viables en condiciones naturales. Las especies que forman bancos en el suelo presentan diferentes períodos de longevidad y comportamientos de germinación (Nascimento y Meiado, 2016).

La formación de bancos de semillas es una estrategia reproductiva importante en las plantas, debido a que preservan la variabilidad genética y permiten que las poblaciones de plantas resistan períodos adversos y persistan en el tiempo y en el espacio (Cano-Salgado *et al.*, 2012), particularmente en ambientes impredecibles, como los que prevalecen en zonas áridas y semiáridas (Álvarez-Espino *et al.*, 2014).

En México, más del 50% del territorio comprende zonas áridas y semiáridas (Valiente-Baunet *et al.*, 1996). Entre ellas, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, ubicado en los estados de Puebla y Oaxaca es considerado un ecosistema semiárido importante por ser un centro de evolución de la flora semiárida con alrededor de 11% de especies endémicas, incluyendo numerosas cactáceas (86 especies, de las cuales 25% son endémicas) (Arias *et al.*, 2000). Pero, a pesar de su dominancia ecológica, el alto endemismo en la región, y aun sabiéndose que los bancos de semillas son importantes para entender la persistencia, dinámica y manejo de comunidades vegetales, la información acerca de si las cactáceas pueden formar bancos de semillas es insuficiente para comprender estos procesos (Bowers, 2000; Bowers, 2005; Cheib y

García, 2012; Ordoñez, 2008; Goodman *et al.*, 2012; Álvarez-Espino *et al.*, 2014; Nascimento y Meiado, 2016, Ordoñez-Salanueva *et al.*, 2017).

Escontria chiotilla (F. A. C. Weber) Rose, especie endémica y silvestre, y *Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxbaum, especie introducida y cultivada en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, son dos especies de cactáceas columnares que tienen importancia ecológica por sus interacciones con polinizadores y dispersores. Además, los frutos comestibles que producen son un recurso de alto valor nutricional, económico y cultural (Arellano y Casas, 2003). Sin embargo, a pesar de su importancia, no se ha estudiado el tiempo que las semillas de estas especies pueden mantener la viabilidad cuando son conservadas en condiciones *ex situ*, así como su potencial para formar bancos de semillas (*in situ*).

La longevidad de las semillas es una característica determinada genéticamente (Hong y Ellis, 1996), por lo que realizar estudios de variabilidad genética sería útil para explicar la pérdida de la viabilidad a través del tiempo. Por tal motivo, en el presente trabajo se determinó el efecto de la edad en la viabilidad de semillas conservadas *ex situ* y enterradas *in situ*, considerando las condiciones ambientales (períodos de secas y lluvias) y la variabilidad genética con la finalidad de aportar información a la dinámica del banco de semillas de dos cactáceas columnares.

2. ANTECEDENTES

2.1. Semilla

2.1.1. Definición y formación

La semilla es un óvulo fecundado, transformado y maduro, que dará origen a una nueva planta (Fenner y Thompson, 2005). Ésta presenta una estructura compleja que consiste generalmente en: I) El embrión (compuesto por la radícula, hipocótilo y cotiledones), que es el producto de la fusión entre la ovocélula con un núcleo espermático. II) El endospermo, que proporciona los nutrientes al embrión para el desarrollo y el crecimiento temprano de la plántula; y III) La testa, cubierta externa que está formada por los tegumentos que representan los tejidos maternos del óvulo (Figura 1) (Suárez y Melgarejo, 2010).

En angiospermas, la semilla se forma a partir del rudimento seminal, localizado en el ovario de las flores, tras producirse la fecundación o unión de los gametos masculino (polen) y femenino (óvulo). Esta singamia ocurre cuando los gametos están completamente maduros (Mauseth, 2009).

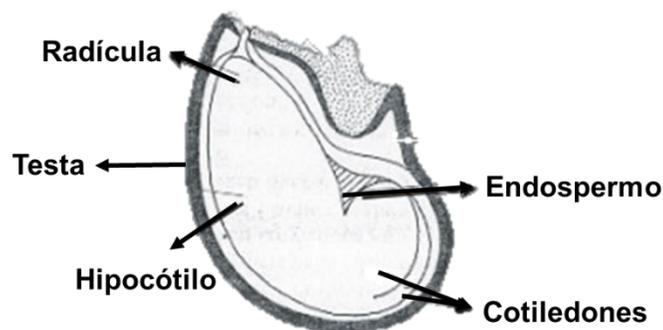


Figura 1. Esquema de una semilla madura de una cactácea.

2.1.2. Importancia

Las semillas contienen los recursos genéticos recombinados de sus progenitores y su principal función ecológica es la reproducción (Fenner y Thompson, 2005). Éstas desempeñan un papel fundamental en la dispersión, la persistencia de las poblaciones de plantas (mediante la formación de bancos de semillas en el suelo), la regeneración, la sucesión ecológica, la colonización y son fuente de alimento básico para muchos animales, incluido el ser humano (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). Asimismo, las semillas vivas se almacenan durante largos períodos de tiempo y pueden ser utilizadas con diferentes propósitos (Nascimento *et al.*, 2015).

2.2. Germinación

La germinación, desde el punto de vista fisiológico, comienza con la absorción de agua (imbibición) por parte de la semilla y finaliza con la protrusión de la radícula a través de las estructuras que rodean al embrión (Nonogaki *et al.*, 2010). Cabe mencionar que para que ocurra la germinación, las semillas no deben estar latentes y las condiciones ambientales (disponibilidad de agua, luz, temperatura y oxígeno) deben ser las apropiadas para la germinación (Baskin y Baskin, 1989).

El proceso de germinación inicia con una rápida imbibición y la reactivación del metabolismo celular, como la respiración y síntesis de proteínas a partir de ARNs mensajeros almacenados por la semilla seca quiescente (Fase I). Posteriormente, cuando las matrices y contenidos celulares están totalmente hidratados, se llega a una

meseta en la toma de agua (Fase II). Durante la Fase I y II de imbibición se reactiva la transcripción de *novo* y reparación de ADN (Nonogaki *et al.*, 2010).

En la fase III, hay un incremento ligero en la absorción de agua, el cual está asociado brevemente con la culminación de la germinación "*sensu stricto*" (alargamiento del embrión y ruptura de la testa a través de la cual se da la protrusión de la radícula) y con el inicio de los eventos post-germinativos, donde continúan los eventos relacionados con la movilización de reservas, división celular, síntesis de ADN, entre otros, para finalizar con el crecimiento de la plántula (Figura 2) (Nonogaki *et al.*, 2010; Taiz *et al.*, 2015).

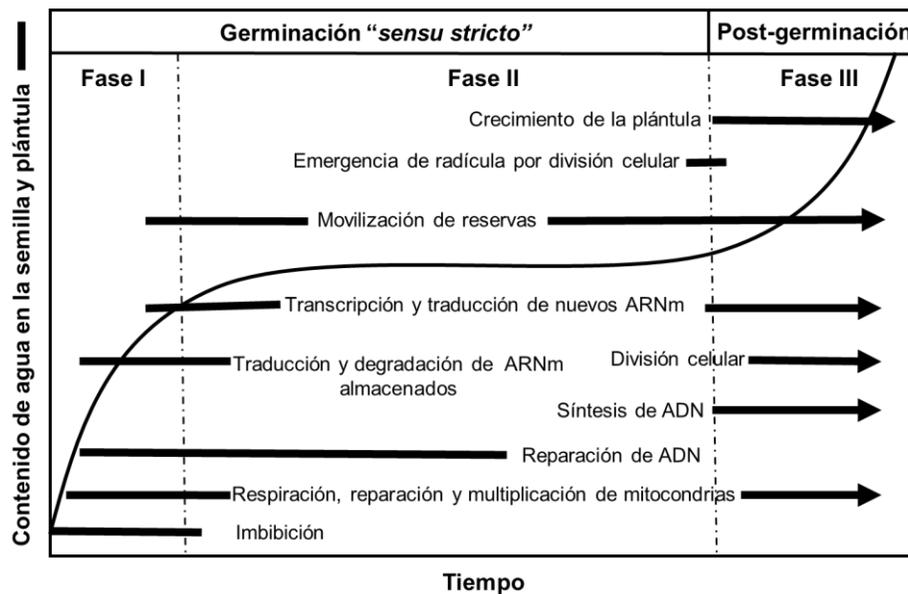


Figura. 2. Eventos físicos y metabólicos que ocurren durante la germinación (Fase I y II) y crecimiento temprano de la plántula (Fase III). El tiempo varía entre especies y está influenciado por las condiciones en las que sucede la germinación. (Tomado y modificado de Nonogaki *et al.*, 2010).

2.3. Latencia

Las semillas se encuentran en estado de latencia cuando no germinan a pesar de estar vivas y de que las condiciones ambientales sean favorables (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

La principal función de la latencia es prevenir que la semilla germine en períodos o lugares en los que la germinación y establecimiento son inadecuados, con el fin de asegurar la sobrevivencia y el crecimiento de las plántulas (Fenner y Thompson, 2005).

2.3.1. Tipos de latencia en semillas

Baskin y Baskin (2004) reconocen cinco tipos de latencia: física, fisiológica, morfológica o innata, morfofisiológica (combinación entre la morfológica y la fisiológica) y una combinación entre la física y la fisiológica. Las semillas con latencia física tienen una testa impermeable, por lo que el embrión se mantiene seco y no es capaz de intercambiar gases con el medio hasta que la cubierta de la semilla se rompa o debilite (por escarificación química, mecánica o física) para dar inicio el proceso de germinación. La latencia fisiológica previene que la semilla germine hasta que cambios químicos (en los niveles o producción de fitohormonas) ocurran en ésta, estos cambios pueden ser estimulados por la temperatura, la luz y el contenido de humedad. En la latencia morfológica, por su parte, el embrión se encuentra inmaduro cuando la semilla es dispersada o cae al suelo, por lo que es necesario un período de post maduración para que ocurra la germinación.

2.4. Viabilidad

La viabilidad se refiere al grado en el cual una semilla está viva (González, 2013). La determinación de la viabilidad puede realizarse a través de diferentes métodos, entre ellos, los más comunes y confiables son la prueba de germinación directa y la prueba de tetrazolio (2, 3, 5 cloruro de trifenil tetrazolio), aplicada mediante la metodología propuesta por la ISTA (International Seed Testing Association, 1966).

La prueba de tetrazolio se basa en la actividad de enzimas deshidrogenasas, las cuales participan en las reacciones de respiración que se producen en las mitocondrias. Estas enzimas están presentes en los tejidos vivos de las semillas, y reducen la solución incolora de 2, 3, 5-trifenil cloruro de tetrazolio a un color rojo, genéricamente llamado formazan. Cuando las semillas están en contacto con una solución de tetrazolio, las células vivas de los tejidos presentan una reacción química de óxido reducción donde están presentes las enzimas responsables de dicha reacción. La tinción de los diferentes tejidos de la semilla muestra la actividad respiratoria, reflejando la condición fisiológica de la semilla (Muschick, 2010).

2.5. Longevidad

La longevidad se define como el tiempo en que una semilla puede mantenerse viable en determinadas condiciones (controladas o naturales) (Taiz *et al.*, 2015). A la longevidad de semillas conservadas en condiciones controladas se le conoce como longevidad potencial, mientras que en condiciones naturales se le denomina longevidad ecológica (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

2.5.1. Longevidad potencial

La longevidad potencial se refiere al tiempo en que las semillas pierden la viabilidad en condiciones de conservación *ex situ*. Cabe mencionar que no todas las semillas responden a las condiciones de almacenamiento de la misma manera (Hong y Ellis, 1996). Por ello, de acuerdo al comportamiento de almacenamiento y la duración potencial de la longevidad, las semillas pueden ser clasificadas en tres categorías: ortodoxas, recalcitrantes e intermedias (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Las semillas ortodoxas o tolerantes a la desecación son capaces de mantener la viabilidad tras ser desecadas a menos de 5-10% de contenido en humedad. Por el contrario, las semillas recalcitrantes o sensibles a la desecación pierden la viabilidad cuando se desecan por debajo de un límite crítico, habitualmente entre 12-30% de contenido en humedad (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997). Mientras que, las semillas intermedias pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a los de las semillas ortodoxas; sin embargo, una vez desecadas, las semillas se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento (Ellis *et al.*, 1990). Por estos motivos, conocer el comportamiento de almacenamiento de las semillas de una especie constituye un aspecto fundamental para conservarlas de manera adecuada y permitir que se mantengan viables durante un largo período de tiempo.

2.5.2. Longevidad ecológica

La longevidad ecológica se refiere al tiempo en que una semilla puede permanecer viable en condiciones naturales y es muy variable entre las diferentes especies y ecosistemas (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

La longevidad ecológica está relacionada con varias características de las plantas que las producen, tales como: historia de vida de la planta madre; estacionalidad climática; distancia temporal entre el período de fructificación y diseminación, y el de germinación y establecimiento; grado de discontinuidad en el hábitat; agentes dispersores de semillas, y niveles de estrés ambiental (temperatura y humedad) y de presión de depredadores y microorganismos que sufre la semilla en el suelo, antes y durante la germinación (Vázquez-Yanes *et al.*, 1997).

Es importante mencionar que, además de una longevidad ecológica, las semillas deben tener características fisiológicas y morfológicas que les permitan mantenerse viables en el suelo durante un tiempo determinado y así tener el potencial de formar bancos de semillas (Bowers, 2000). Algunas de estas características son: I) el requerimiento de la luz para germinar; II) un tamaño pequeño; y III) algún tipo de latencia (Rojas-Aréchiga y Batis, 2001).

2.6. Banco de semillas en el suelo

2.6.1. Definición

El banco de semillas es el conjunto de semillas maduras viables, enterradas en el suelo durante períodos variables de tiempo en un hábitat determinado (Thompson y Grime, 1979; Roberts, 1981).

2.6.2. Clasificación de los bancos de semillas

Las semillas pueden formar diferentes tipos de bancos en el suelo dependiendo de su longevidad. Thompson y Grime (1979) clasificaron a los bancos de semillas en dos categorías; transitorios y persistentes. Un banco transitorio, es aquél en el cual ninguna de las semillas persiste viable durante más de un año y un banco persistente, es aquél que mantiene semillas viables durante más de un año. Thompson (1992), dividió posteriormente a los bancos persistentes en dos subcategorías, banco persistente a corto plazo (las semillas se mantienen viables durante más de un año, pero menos de cinco años) y persistente a largo plazo (las semillas se mantienen viables durante más de cinco años).

Las clasificaciones de los bancos de semillas son usadas como herramientas por los investigadores para reconocer las características de un sistema de estudio y así poder determinar la metodología adecuada e interpretar su dinámica (De Souza *et al.*, 2006).

2.6.3. Dinámica del banco de semillas

El banco de semillas en el suelo está en constante flujo. Recibe una entrada de semillas, con distribución heterogénea en el tiempo y en el espacio, en su mayor parte de las plantas próximas (aunque, también pueden provenir de plantas lejanas, por medio de agentes dispersores). Dentro del banco, una fracción de las semillas está en disposición de germinar en cuanto las condiciones externas sean favorables, mientras que otra fracción persiste latente, incapaz de germinar. Las semillas pueden pasar de un estadio a otro, a lo largo del tiempo que se mantienen viables (Marañón, 2001).

La salida de semillas desde el banco puede tener diferentes agentes y destinos. En general, sólo una pequeña porción de las semillas enterradas germina y emerge del suelo, dando lugar a plántulas que formarán parte del reclutamiento poblacional y eventualmente producirán nuevas semillas. También puede ocurrir que la semilla germine a bastante profundidad y muera, al no tener reservas suficientes para emerger (germinación letal). Una de las principales causas de la pérdida de semillas del banco es por mortalidad debido a la edad. La longevidad máxima que puede alcanzar una semilla en el suelo depende de las condiciones del medio (humedad, temperatura, e intercambio de gases) y de las características biológicas de la especie y del individuo. Por otro lado, las grandes perturbaciones debidas a agentes naturales que afectan a la capa superficial del suelo pueden destruir un número importante de la reserva de semillas de la comunidad (Baskin y Baskin, 1998).

En zonas áridas y semiáridas, por ejemplo, las lluvias torrenciales provocan la erosión y el arrastre del suelo, lo que podría ocasionar la pérdida de la reserva de semillas en el suelo (Marañón, 2001).

Las semillas del banco, especialmente las de mayor tamaño que se encuentran en la superficie, mueren en grandes cantidades debido a la depredación por parte de aves, roedores, e insectos. Las semillas más pequeñas se entierran con facilidad y presentan menores riesgos, aunque también pueden ser presas de otros animales en el suelo (lombrices y hormigas) (Thompson, 1992). Los hongos y bacterias del suelo pueden ocasionar una pérdida importante de semillas en el banco. Estos microorganismos secretan enzimas, como las celulasas, proteasas, nucleasas y toxinas que dañan las membranas, causan efectos irreversibles y la muerte de las semillas. La principal defensa de las semillas es su testa que funciona como una barrera mecánica frente al ataque de estos organismos, además puede tener compuestos antifúngicos y antimicrobianos como flavonoides, fenoles, taninos y fitoalexinas (Baskin y Baskin, 1998).

2.6.4. Métodos para estudiar la persistencia de los bancos de semillas

Existen varios métodos para estudiar la persistencia del banco de semillas en el suelo, los cuales se pueden clasificar en: I) determinación directa de la edad por Carbono 14 (^{14}C), B) experimentos de enterramiento de semillas *in situ* (bancos de semillas semi naturales en el suelo) y posterior prueba de germinación o viabilidad, C) determinación de la distribución en profundidad de semillas viables en el suelo, D) determinación de

bancos de semillas del suelo a lo largo de etapas de sucesión, y E) análisis comparativo de la dinámica estacional de la lluvia de semillas y banco de semillas (Saatkamp *et al.*, 2009).

Cabe destacar que, de los métodos mencionados, los experimentos de enterramiento de semillas *in situ* y posterior prueba de germinación o viabilidad han proporcionado información muy valiosa sobre la persistencia de los bancos de semillas.

Un banco de semillas semi natural en el suelo es un método en el cual las semillas son expuestas a condiciones cercanas a las naturales después de ser colocadas en bolsas de malla de nailon u otros materiales resistentes a la descomposición. Las bolsas son comúnmente enterradas entre 5-10 cm de profundidad y son recuperadas en diferentes tiempos para realizar pruebas de viabilidad. Estos estudios han contribuido a comprender la pérdida de la viabilidad de semillas de diferentes especies a través del tiempo en condiciones naturales (Forcella *et al.*, 2004).

2.7. Descripción de la familia Cactaceae

La familia Cactaceae presenta cerca de 2000 especies reconocidas (Barthlott y Hunt, 1993). Se distinguen entre otras características por la presencia de aréolas y la producción de betalaínas. Las cactáceas presentan una amplia distribución geográfica, desde el norte de Canadá hasta la Patagonia. Estas plantas forman parte de diferentes ecosistemas, desde el nivel del mar hasta los 5000 m de altitud (Rzedowski, 1973; Cota-Sánchez, 2002). Sin embargo, la mayor riqueza de especies se concentra principalmente en México (Bravo-Hollis 1978). Aun cuando las cactáceas viven en

diversos ecosistemas, incluyendo las selvas tropicales, donde se encuentran como epifitas (por ejemplo, *Rhipsalis baccifera*), la mayoría de ellas se desarrollan en ambientes áridos y semiáridos (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999). Entre estas regiones, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán es considerado un ecosistema semiárido muy importante por ser un centro de origen y evolución de la flora semiárida con alrededor de 11% de especies endémicas, entre ellas numerosas cactáceas.

2.7.1. Características de las semillas de cactáceas

Las semillas de las cactáceas presentan variaciones en la forma, tamaño, estructura, características del embrión y color de la testa. En general, las semillas maduras presentan testa, embrión, endospermo y perispermo (en los grupos más primitivos). El número de semillas producido por un solo fruto puede ser de sólo unas pocas (de 1 a 5 semillas por fruto en *Epithelantha* y *Pereskia aculeata*) o muy numerosas, a veces más de 1000 semillas por fruto (*Pilosocereus chrysacanthus*). Incluso dentro de una misma especie el número de semillas puede variar ampliamente entre individuos (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

2.7.2. Germinación en semillas de cactáceas

Diversos estudios han reportado que la luz, la temperatura y la humedad son factores claves para la germinación de semillas de cactáceas (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997; Rojas-Aréchiga *et al.*, 1998; Benítez-Rodríguez *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2006). Se ha demostrado que a temperaturas entre 25 y 30 °C las semillas presenta su máxima capacidad y velocidad de germinación, además de ser fotoblásticas positivas

(requerimiento absoluto de luz para germinar) (Baskin y Baskin, 1998; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

2.7.3. Latencia en semillas de cactáceas

Desde los trabajos pioneros de Alcorn y Krutz (1959) y McDonough (1964), se ha estudiado la latencia en semillas de cactáceas. Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes (2000), señalaron que, en semillas de cactus la latencia innata, morfológica y fisiológica han sido reportadas.

2.7.4. Viabilidad y longevidad potencial de semillas de cactáceas

En varias especies de cactáceas se han realizado trabajos sobre viabilidad de semillas en condiciones *ex situ* desde hace más de 40 años (Alcorn y Martin, 1974; Zimmer y Schultz, 1975; Fearn, 1977; Del Castillo, 1986; Trejo y Garza, 1993; Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Rojas- Aréchiga *et al.*, 2001; De la Barrera y Nobel, 2003; Guillen *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2015). Estos datos sugieren que la mayoría de las semillas tienen un comportamiento de almacenamiento ortodoxo, aunque las condiciones óptimas de almacenamiento a largo plazo son desconocidas para la mayoría de las cactáceas.

2.7.5. Banco de semillas en cactáceas

La información sobre bancos de semillas en cactáceas es escasa (Bowers, 2000; Bowers, 2005; Ordoñez, 2008; Cheib y García, 2012; Goodman *et al.*, 2012; Álvarez-Espino *et al.*, 2014; Nascimento y Meiado, 2016, Ordoñez-Salanueva *et al.*, 2017).

Estos estudios han demostrado una amplia variación en el comportamiento de germinación y longevidad de semillas de cactáceas enterradas *in situ*, así como del potencial de formar bancos de semillas.

2.8. Variabilidad genética

Los estudios de variabilidad genética son utilizados para precisar relaciones filogenéticas, complementar la descripción de las características de las poblaciones y de las especies, evaluar los riesgos de extinción, promover medidas de conservación y comparar el efecto de la domesticación en plantas (Nassar *et al.*, 2001; Castro-Félix *et al.*, 2013). En relación con el efecto de la domesticación de las plantas, por ejemplo, se ha evidenciado que en especies cultivadas hay una menor variabilidad genética con respecto a especies silvestres (Tinoco *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2008; Yañez-López *et al.*, 2016).

Casas *et al.* (2007) y Guillén *et al.*, (2013) reportaron que la domesticación en cactáceas ha causado divergencias morfológicas, fisiológicas y genéticas con respecto a las poblaciones silvestres. Sin embargo, no existen estudios de variabilidad genética enfocados a explicar la pérdida de viabilidad de semillas a través del tiempo.

La variabilidad genética se ha determinado a nivel de especies, e incluso en poblaciones de tamaño pequeño mediante marcadores moleculares (Saaed *et al.*, 2012).

2.9. Marcadores moleculares

En la década de los 80 del siglo pasado se comenzaron a usar diversas técnicas basadas en el uso de marcadores moleculares. Éstos generalmente se utilizan para la discriminación y clasificación de genotipos, debido a que detectan diferencias entre los organismos de una especie o poblaciones. Entre los marcadores moleculares se pueden mencionar los bioquímicos (isoenzimas) y los genéticos (ADN) (Valadez y Kahl, 2000).

2.9.1. Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Estas variaciones son consecuencia de eventos de mutación que se manifiestan en los genomas que se comparan. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Azofeifa-Delgado, 2006).

Entre los marcadores de ADN se encuentran los RFLPs (polimorfismo en longitud de fragmentos obtenidos por enzimas de restricción), RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar), ISSRs (Inter secuencias simples repetidas), SSR (microsatélites o secuencias simples repetidas de ADN) y AFLPs (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) (Cornejo-Romero *et al.*, 2014).

2.9.2. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs)

Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados son marcadores multi-locus que permiten analizar al azar regiones de ADN distribuidas en todo el genoma sin tener conocimiento previo de éste (Cornejo-Romero *et al.*, 2014). Los AFLPs consisten en la digestión completa del ADN genómico total con enzimas de restricción, seguida de la amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos para detectar polimorfismos debidos a mutaciones en la secuencia de ADN en, o cerca de, los sitios de restricción. Los polimorfismos se detectan por secuenciación automática o por electroforesis, como un patrón de fragmentos de ADN amplificados (bandas) que difieren en número y tamaño. Este patrón de bandas es altamente específico y debido a las restricciones de la técnica, ésta es altamente reproducible (Figura 3) (Vos *et al.*, 1995; Cornejo-Romero *et al.*, 2014).

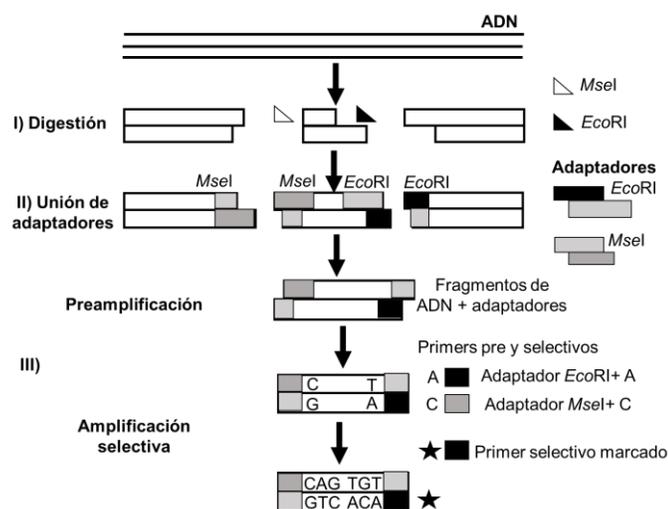


Figura 3. Descripción metodológica de la amplificación de ADN mediante AFLPs (Tomado de Cornejo-Romero *et al.*, 2014).

3. ESPECIES DE ESTUDIO

3.1. *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber) Rose

E. chiotilla es una cactácea columnar endémica y silvestre de México, comúnmente conocida como jiotilla. Esta especie se distribuye en el bosque tropical caducifolio y en el matorral xerófilo, principalmente en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Arias *et al.*, 1997). El árbol maduro, presenta de 3 a 7 m de alto, de tronco corto y grueso, con ramas dicotómicas, de 7 a 8 costillas prominentes, aréolas de 1 cm de longitud, de 10 a 15 espinas radiales y de 3 a 5 centrales, una de ellas más larga de 7 cm de longitud. Flores en la terminación de las ramas, infundiliformes de 3 cm de longitud, de color amarillo y con grandes escamas translúcidas. Sus frutos son globosos y escamosos, de color café rojizo de hasta 3.5 cm de diámetro, con semillas negras de 1.0 a 1.3 mm (Bravo-Hollis, 1978) (Figura 4). El período de fructificación es en dos períodos al año, de abril a mayo y de septiembre a noviembre (Arias *et al.*, 2000). Los frutos son comestibles y tienen importancia ecológica, cultural y económica en las localidades donde se desarrollan (Casas *et al.*, 1999; Arellano y Casas, 2003).

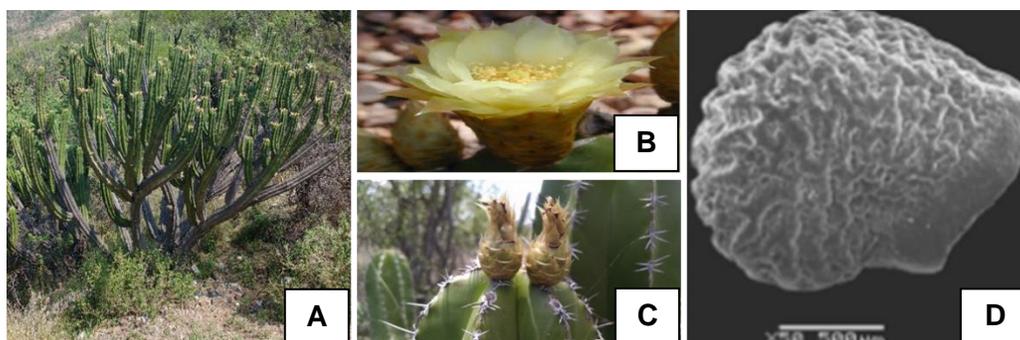


Figura 4. *E. chiotilla*. A. Árbol maduro; B. Flor; C. Fruto y D. Semilla (imagen D tomada de Franco-Estrada, 2013).

3.2. *Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxbaum

S. pruinosus es una cactácea columnar, cultivada e introducida, comúnmente conocida como pitaya de mayo. Esta especie se distribuye en zonas áridas y semiáridas de México, principalmente en la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Parra *et al.*, 2012). Ha pasado por un proceso de domesticación desde hace más de 8000 años, que ha generado más de 30 variedades (Yáñez-López *et al.*, 2016). En general, el árbol maduro presenta de 4 a 5 m de alto, con ramas que tienen una capa de cera blanca, de 5 a 6 costillas rectas, espinas de color gris con las puntas oscuras, de 5 a 7 radiales y de 1 a 4 centrales. Flores blanquecinas con tonos rosados, infundibuliformes y miden 9 cm de largo (Figura 5). Sus frutos miden 7 cm de diámetro, son globosos y varían en coloración según a variedad, desde rojo púrpura hasta anaranjado verdoso, con pulpa carnosa y jugosa, con semillas negras de 1.5 a 2 mm (Flores *et al.*, 2011*b*). El periodo de fructificación es de mayo a agosto (Arias *et al.*, 2000). Los frutos son comestibles y son recursos naturales de gran importancia biológica y cultural, ya que han contribuido a mejorar la situación económica de las regiones donde se colectan (casas *et al.*, 1999; Arellano y Casas, 2003; Luna, 2002).

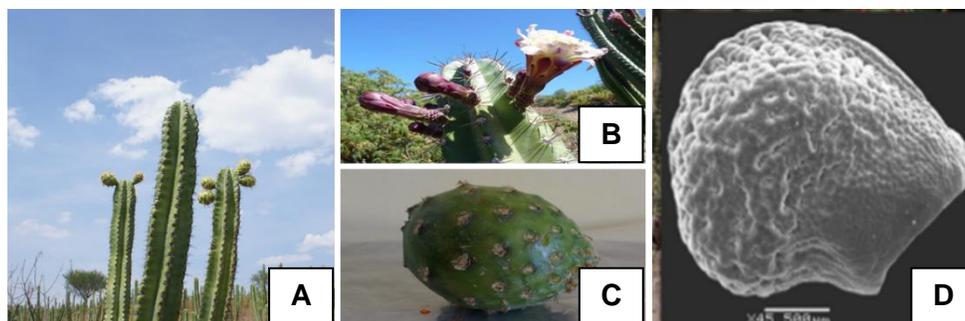


Figura 5. *S. pruinosus*. A. Árbol maduro; B. Flor; C. Fruto y D. semilla (imagen D tomada de Franco-Estrada, 2013).

4. SITIO DE ESTUDIO

4.1. Ubicación, extensión y límites

El municipio de Santiago Chazumba pertenece al distrito de Huajuapán de León y se localiza al noroeste del estado de Oaxaca (18° 11' 18.62" N y 97° 40' 43.99" O), en la región denominada Mixteca Baja y forma parte del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. La superficie del municipio es de 346.93 km² y limita al norte con el estado de Puebla; al este con el estado de Puebla y el municipio de San Pedro y San Pablo Tequixtepec; al sur con los municipios de San Pedro, San Pablo Tequixtepec y Cosoltepec; al oeste con el municipio de Cosoltepec y el estado de Puebla (INEGI, 2008).

4.2. Topografía

El municipio se caracteriza por estar ubicado entre cerros, una gran cantidad de barrancas con escorrentía intermitente (escurrimiento de agua en épocas de lluvia), pequeñas superficies planas de uso agrícola y también superficies significativas de montaña, con suelos profundos de textura media y gruesa (INEGI, 2008).

4.3. Fisiografía

El territorio municipal de Santiago Chazumba se encuentra en la discontinuidad de la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del Sur, entre el Eje Neo volcánico y las geoformas características de la región son cerros con alturas de hasta 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm) y pendientes que van desde < 5% hasta > 50% (INEGI, 2008).

4.4. Clima

El clima es cálido semidesértico (BSw) (de acuerdo con la clasificación de Köppen y modificada por García, 1973), con una temperatura media anual de 19.7 °C. El mes más cálido es mayo con 29.1 °C y el más frío es enero con 10 °C. La precipitación media anual es de 532 mm. Las lluvias se presentan en su mayoría durante el verano (junio) y otoño (septiembre), la época de secas inicia en noviembre y finaliza en primavera (Figura 6) (Serrano *et al.*, 2005).

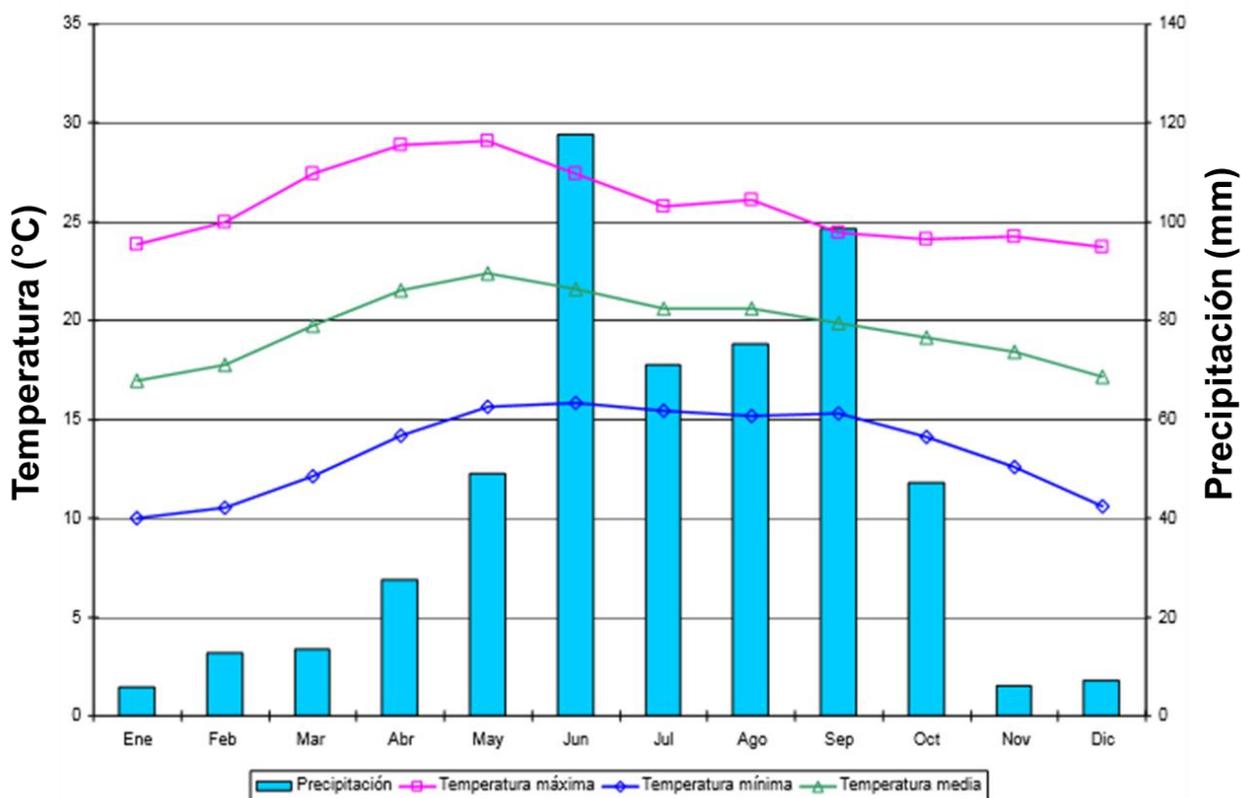


Figura 6. Distribución de la precipitación y temperatura en el municipio de Santiago Chazumba (Período 1961-2003), tomado y modificado de Serrano *et al.*, 2005.

4.5. Suelo

El tipo de suelo está formado por sedimentos arenosos, toba, limo arenoso y arena fina, con poca capacidad para almacenar agua, áreas muy pedregosas cubiertas uniformemente con suelo, que generalmente no llegan a los 20 cm de profundidad. Este tipo de suelo es común encontrarlo en pendientes suaves y en las partes altas con los paisajes ondulados. Presenta un drenaje superficial rápido, son susceptibles a la erosión por el agua; presentan coloraciones que van del rojo al café, dependiendo del contenido de materia orgánica (INEGI, 2008).

4.6. Flora y fauna

La región presenta gran variedad de plantas, entre las cuales se encuentran especies como el cacahuete (*Ipomoea* sp), cubata (*Acacia cochliacantha*), huizache (*Acacia farnesiana*), mezquite (*Prosopis laevigata* nopal (*Opuntia* sp), quelite (*Amaranthus hybridus*), hierbabuena (*Mentha spicata*), orégano (*Origanum vulgare*), pitayo (*Stenocereus* sp), pitahaya (*Hylocereus* sp), xoconoxtle dulce (*Stenocereus stellatus*), jiotilla (*Escontria chiotilla*) y garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) (INAFED, 2010).

Las especies de fauna silvestre en la región son, cenizotes (*Mimus polyglotto*), águilas (*Aquila chrysaetos*), zopilotes (*Coragyps atratus*), víboras de cascabel (*Crotalus* sp), coralillos (*Micruroides* sp), ratones (*peromyscus* sp), murciélagos (*Myotis* sp), liebres (*Lepus* sp), conejos (*Sylvilagus* sp), hormigas (*Pogonomyrmex* sp) y alacranes (*Centruroides fulvipes* y *C. nigrovatus*) (INAFED, 2010).

5. OBJETIVOS

5.1. General

Contribuir al conocimiento de la dinámica del banco de semillas de dos especies de cactáceas columnares mediante la detección de la variabilidad genética y la determinación de la viabilidad de semillas de diferentes años de colecta enterradas *in situ* en un matorral xerófilo en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

5.2. Específicos

1. Comparar la viabilidad de semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* de diferentes colectas (2007, 2010, 2014 y 2015) conservadas en condiciones de laboratorio (*ex situ*) durante 0, 1, 5 y 8 años.
2. Comparar la viabilidad de semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* de diferentes colectas (2007, 2010 y 2014) conservadas *ex situ* (1, 5 y 8 años) y posteriormente enterradas *in situ* en dos micrositios durante 24 meses.
3. Comparar la viabilidad de semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* de diferentes colectas (2007, 2014 y 2015) conservadas *ex situ* (0, 1 y 8 años) y posteriormente enterradas *in situ* en dos micrositios, en diferentes condiciones ambientales (período de secas y lluvias).

4. Determinar y comparar la variabilidad genética de plántulas obtenidas a partir de semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* mediante marcadores moleculares AFLP.

6. HIPÓTESIS

1. Si la viabilidad de semillas se mantiene en condiciones constantes de almacenamiento en laboratorio, entre 0 y 8 años, entonces las semillas de todas las colectas tendrán elevados porcentajes de germinación.
2. Si la viabilidad de las semillas está determinada por la edad, entonces en condiciones naturales, las semillas más longevas presentaran un menor porcentaje de germinación después de haber sido enterradas *in situ* durante 24 meses.
3. Si la viabilidad de las semillas se reduce de manera significativa en condiciones ambientales variables (período de secas y lluvias), entonces existirá un período del año en que la viabilidad de semillas resulte más afectada.
4. Si la variabilidad genética en plántulas de *E. chiotilla*, especie endémica y silvestre, es mayor que en *S. pruinosus*, especie cultivada, entonces la viabilidad de semillas *E. chiotilla* será mayor.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

237.1. Colecta, extracción y conservación de semillas *ex situ*

Se colectaron frutos de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* en la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán en el mes de mayo de los años 2007, 2010, 2014 y 2015. Los frutos se trasladaron al laboratorio de Ecofisiología Vegetal (AS-118) del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I). Las semillas se extrajeron del fruto, lavando con agua de la llave para eliminar los restos de pulpa, se secaron a temperatura ambiente (25 ± 5 °C) durante 48 h y se almacenaron en frascos de vidrio a 25 ± 5 °C, en condiciones de oscuridad durante 0, 1, 5 y 8 años.

7.2. Viabilidad de semillas conservadas *ex situ*

En mayo de 2015, previo a realizar el enterramiento *in situ*, se determinó la viabilidad de las semillas de los diferentes años de colecta (2007, 2010 y 2014) de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* almacenadas en laboratorio durante diferentes períodos (1, 5 y 8 años, respectivamente) y de colecta reciente (2015).

7.3. Enterramiento *in situ* y exhumación de semillas

Después de realizar las pruebas de viabilidad en las semillas conservadas *ex situ*, se seleccionaron al azar dos micrositios de estudio en el matorral xerófilo del municipio de Santiago Chazumba. Los micrositios se denominaron como Matorral 1 (M1) y Matorral 2 (M2) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ubicación y georreferenciación de los micrositios de estudio.

Sitio	Localidad	Georreferencia	Altitud (msnm)
M1	Mpio de Santiago Chazumba, Oax.	18°16'96"N 97°71'18"O	1805
M2		18°16'24"N 97°70'93"O	1794

En cada micrositio se realizaron dos experimentos, los cuales se describen a continuación:

7.3.1. Viabilidad de semillas enterradas *in situ*

Para determinar la viabilidad de semillas en condiciones naturales a través del tiempo, se estableció (de mayo de 2015 a mayo de 2017) un banco de semillas seminatural en cada uno de los micrositios de estudio.

En cada micrositio se enterraron semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* de las colectas 2007, 2010 y 2014. Las semillas se colocaron en sobres de malla de polietileno (6 cm x 4 cm) entre 5-10 cm de profundidad en el suelo del matorral xerófilo. Se enterraron ocho sobres con 200 semillas cada uno, para cada especie de estudio y diferentes años de colecta (24 sobres en total por especie). Las semillas permanecieron enterradas *in situ* por 24 meses y se realizaron ocho exhumaciones durante este período en intervalos de 3 meses (Cuadro 2).

En cada exhumación se recuperó un sobre de semillas de las especies y colectas de estudio para realizar pruebas de viabilidad en laboratorio.

Cuadro 2. Fecha de enterramiento y exhumación de los sobres con semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* para cada año de colecta (2007, 2010 y 2014) durante 24 meses.

Sobre	Enterramiento	Exhumación
1	14-mayo-2015	14-agosto-2015
2		14-noviembre-2015
3		14-febrero-2016
4		14-mayo-2016
5		14-agosto-2015
6		14-noviembre-2016
7		14-febrero-2017
8		14-mayo-2017

7.3.2. Efecto de las condiciones ambientales (periodo de secas y lluvias) en la viabilidad de semillas

Al igual que en el experimento anterior, en cada micrositio se estableció (de mayo de 2015 a mayo de 2016) un banco de semillas seminatural, en este caso con el propósito de evaluar el efecto de las condiciones ambientales (periodo de secas y lluvias) en la viabilidad de semillas.

Se consideraron cuatro períodos en el año de estudio, I) época de lluvias (de mayo a agosto), II) fin de lluvias e inicio de secas (de agosto a noviembre), III) época de secas (de noviembre a febrero) y IV) fin de secas e inicio de lluvias (de febrero a mayo), con base a los datos de precipitación y temperatura del municipio de Santiago Chazumba (período 1961-2003) publicados por Serrano *et al.* (2005).

En cada micrositio se enterraron semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* de las colectas 2007, 2014 y 2015. Las semillas se colocaron en sobres de malla de polietileno (6 cm

x 4 cm) entre 5-10 cm de profundidad en el suelo del matorral xerófilo. En este experimento se enterró un único sobre con 200 semillas, para cada especie y diferentes años de colecta. Las semillas permanecieron enterradas *in situ* durante tres meses, tiempo en el que se realizó la exhumación y simultáneamente se enterró un nuevo sobre con la misma cantidad de semilla de cada especie y colecta. Este procedimiento se realizó a lo largo de 12 meses (cuadro 3). En cada exhumación se recuperó un sobre de semillas de las especies y colectas de estudio para realizar pruebas de viabilidad en laboratorio.

Cuadro 3. Fecha de enterramiento y exhumación de los sobres con semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* para cada año de colecta (2007, 2010 y 2015) en períodos de secas y de lluvias.

Sobre	Enterramiento	Exhumación
1	14-mayo-2015	14-agosto-2015
2	14-agosto-2015	14-noviembre-2015
3	14-noviembre-2015	14-febrero-2016
4	14-febrero-2016	14-mayo-2016

7.4. Análisis de suelo

En cada micrositio se tomó una muestra de suelo (5 kg por sitio). Las muestras se enviaron al Laboratorio Central (Departamento de Suelos) de la Universidad Autónoma de Chapingo para analizar el pH (con potenciómetro, relación suelo-agua 1:2), materia orgánica (MO) (mediante el método de Walkley y Black, 1934), fósforo (P) asimilable (mediante el método de Olsen *et al.*, 1954), contenido de magnesio (Mg) (extraído con acetato de amonio, a pH 7, relación 1:20 y determinado por espectrofotometría de

absorción atómica), textura (mediante el método del hidrómetro de Bouyoucos (1962) y contenido de humedad (mediante membrana y olla de presión).

7.5. Determinación de la viabilidad de semillas

La viabilidad de semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* se evaluó mediante pruebas de germinación en laboratorio, como se describe a continuación.

7.6. Siembra y germinación de semillas

Antes de la siembra, las semillas se desinfectaron con una solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 0.03% (v/v) durante 5 min, se enjuagaron con agua purificada y se secaron a 25 ± 5 °C durante 24 h.

Posteriormente, se sembraron tres lotes de 50 semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* de los diferentes años de colecta, tanto de las semillas conservadas *ex situ*, como de las semillas enterradas *in situ*. La siembra se realizó en cajas de Petri con agar bacteriológico al 1% (p/v) y se incubaron en una germinadora (Precision®, Dual Program Illuminated Incubator), a temperatura de 25 ± 3 °C y fotoperiodo 12 h luz ($15.25 \mu\text{m m}^{-2} \text{S}^{-1}$) / 12 h oscuridad. La emergencia de la radícula fue el criterio para determinar la germinación.

El conteo y registro de las semillas germinadas se realizó diariamente durante 21 días. Este procedimiento se realizó previo al enterramiento *in situ* en las semillas conservadas *ex situ* y subsiguientemente en cada una de las exhumaciones correspondientes a los experimentos 1 y 2 (Cuadro 2 y 3, respectivamente).

7.7. Parámetros de germinación

Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en la viabilidad de semillas conservadas *ex situ* y enterradas *in situ* se determinó el porcentaje de germinación y el tiempo medio de germinación (TMG), con base a la siguiente ecuación (Ellis y Roberts, 1981; Flores *et al.*, 2011a):

$$TMG = \frac{\sum(Dn)}{\sum n}$$

Donde: n= número de semillas que germinan en el día D y D= es el número de días a partir de la fecha de siembra.

7.8. Análisis estadísticos

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de semillas respecto al tiempo de almacenamiento *ex situ*, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía. Mientras que, la viabilidad de semillas enterradas *in situ* se analizó mediante un Análisis de Varianza Multifactorial, considerando los efectos de la edad de las semillas, micrositio y tiempo de enterramiento, así como sus interacciones. En ambos análisis se realizó una prueba *post hoc* de Tukey para la comparación múltiple de medias. Todas las comparaciones fueron analizadas con valores transformados a arcoseno a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{arcoseno} \left(\sqrt{\frac{\% \text{ de germinación}}{100}} \right) \left(\frac{180}{\pi} \right)$$

La transformación a arcoseno se realizó con cada porcentaje de germinación obtenido con el fin de ajustar los datos a una distribución normal. Las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significancia del 5% ($P < 0.05$) utilizando el software estadístico SPSS® (ver.15.0).

7.9. Extracción y cuantificación de ADN

7.9.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó en 21 plántulas de *E. chiotilla* y 21 de *S. pruinosus* de seis meses de edad, provenientes de semillas de las diferentes cosechas de estudio. Se utilizó el Kit DNeasy Plant Mini® (QIAGEN®) y previo a la extracción, el protocolo se modificó en el Laboratorio de Ecofisiología Vegetal de la UAM-I para garantizar la pureza e integridad del ADN en plántulas de cactáceas (Anexo A).

7.9.2. Concentración, pureza e integridad del ADN

La concentración y pureza del ADN de cada muestra se cuantificó por medio de espectrofotometría (Nano Drop 2000, Thermo Scientific®) y la integridad se evaluó mediante electroforesis, para lo cual se tomaron 6 μL del ADN de cada una de las muestras con 4 μL de buffer de carga y 2.5 μL de marcador (100 pares de bases (pb)) para resolver en un gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE (tris-acetato EDTA) al 1x con 0.3 μL de Rojo Texas (85 volts, durante 45 min). El gel se visualizó en un fotodocumentador (DNR Bio-Imaging Systems®).

7.10. Amplificación de ADN mediante marcadores moleculares AFLPs

Para realizar las reacciones de digestión, ligación, preamplificación y amplificación selectiva de ADN que comprende la técnica de AFLPs, se preparó un volumen total de reacción para un determinado número de muestras y posteriormente se agregó por separado un volumen exacto para cada reacción (Cuadros 4 a 7). Esto se realizó con la finalidad de reducir el error de pipeteo.

7.10.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción

La digestión de ADN genómico se realizó con dos enzimas de restricción; *Msel* que reconoce y corta cada cuatro pb y *EcoRI* que reconoce y corta cada seis pb, lo que genera un gran número de fragmentos de ADN.

Para llevar a cabo la digestión, el ADN de cada muestra de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* se depositó en tubos Eppendorf de 500 µL y se agregó la mezcla de reacción a cada tubo (Cuadro 5).

Cuadro 4. Reacción de digestión de ADN con enzimas de restricción.

Concentración inicial Compuesto	Concentración final	Volumen (1x)
Agua Milli Q estéril		2.5 µL
10X Buffer Tango (con BSA)	1x	2.0 µL
10 U/µL <i>EcoRI</i>	4 U	0.4 µL
10 U/µL <i>Msel</i>	1 U	0.1 µL
ADN genómico	1 ng/µL	15 µL
		Volumen final = 20 µL

El ADN contenido en los tubos se mezcló con un vórtex y se dio un pulso en una picocentrífuga (Thermo Scientific®).

Las muestras se incubaron a 37 °C en un Eppendorf Thermomixer® durante 3 h y, posteriormente, las enzimas se inactivaron incubando a 65 °C en un Eppendorf Thermomixer® durante 15 min.

7.10.2. Ligación de adaptadores

Se unieron secuencias específicas (adaptadores) a los bordes de los fragmentos generados por restricción; éstas fueron reconocidas por primers que al unirse a los bordes de los fragmentos generados por la digestión generaron extremos con una secuencia conocida que permitió que el fragmento fuera amplificado mediante PCR.

Para realizar la ligación, a los tubos con el ADN digerido se les agregó la mezcla de reacción de ligación con los adaptadores (Cuadro 6). Se mezclaron con un vórtex y se les dio un pulso en una picocentrífuga (Thermo Scientific®). El ADN se incubó toda la noche a 25 ± 5 °C.

Posteriormente, se tomaron 8 µL del ADN digerido y ligado de cada una de las muestras con 4 µL de buffer de carga y 2.5 µL de marcador (100 pb) para resolver en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE (Tris-Borato EDTA) al 1x con 0.3 µL de Rojo Texas (76 volts, durante 30 min). El gel se visualizó en un fotodocumentador (DNR Bio-Imaging Systems®).

Cuadro 5. Reacción de ligación de adaptadores al ADN digerido.

Concentración inicial Compuesto	Concentración final	Mezcla de reacción (1x)
Agua Mili Q estéril		4.8 µL
10x ligasa buffer	1X	3 µL
Adaptador <i>EcoRI</i> 5 pmol*	1.66 pmol	1 µL
Adaptador <i>MseI</i> 50 pmol*	0.166 pmol	1 µL
5U/µL T4 ligasa	50 ng/µL	0.2 µL
ADN digerido		20 µL
Volumen final = 30 µL		

*Invitrogen © Adaptadores: *EcoRI*: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC- oligo 1 *EcoRI*
 -CAT CTG ACG CAT GGT TAA- 5' oligo 2 *EcoRI*
MseI: 5' -GAC GAT GAG TCC TGA G- oligo 1 *MseI*
 -TA CTC AGG ACT CAT- 5' oligo 2 *MseI*

7.10.3. Reacción de preamplificación

Después de la reacción de digestión de ADN y ligación de adaptadores, se realizaron dos reacciones de PCR. La primera, una amplificación preselectiva que se llevó a cabo con primers que corresponden a la secuencia específica del adaptador, éstos contienen una base extra en el extremo 3' dando como resultado un conjunto de fragmentos que llevan la secuencia complementaria al primer y complementan la base extra adicionada. Este proceso permitió discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman y amplificar sólo aquellos en los que los primers encontraron las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para la base adicional.

Para realizar la reacción, al producto resultante en el paso anterior se le agregó la mezcla de preamplificación (Cuadro 6).

Cuadro 6. Reacción de preamplificación de ADN mediante PCR.

Concentración inicial Compuesto	Concentración final	Mezcla de reacción (1x)
ADN cortado y ligado		10 µL
Agua Mili Q estéril		4.3 µL
10X Taq buffer (con KCl)	1X	2 µL
25 mM MgCl ₂	1.5 mM	1.2 µL
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.4 µL
Primers (20 pmol/µL) cada uno*	1 pmol cada uno	2 µL (1 µL de cada uno)
5U/µL Taq Polimerasa	0.5 U	0.1 µL
Volumen final = 20 µL		

*Sigma® Pream *EcoRI* 100 mM 5' -GAC TGC GTA CCA ATT (CA); C, nucleótido adicional; A, nucleótido selectivo.

*Sigma® Pream *MseI* 100 mM 5' -GAT GAG TCC TGA GTA AC

El programa del termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad®) para la preamplificación se realizó como se observa en la figura 7.

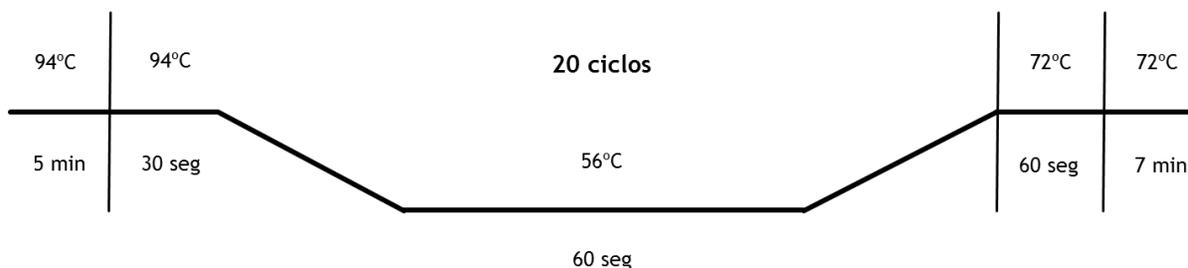


Figura 7. Programa del termociclador para la preamplificación de ADN.

Para verificar que la reacción se hubiera realizado correctamente, se aplicaron 5 μL del producto de la mezcla de preamplificación, 2 μL de buffer de carga, más 3 μL de agua Milli Q estéril y 2.5 μL de marcador (100 pb) en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) en buffer TBE 1x, a 86 volts durante 45 min. El gel se visualizó en un fotodocumentador (DNR Bio-Imaging Systems®).

7.10.4. Amplificación selectiva

Con los productos obtenidos de la amplificación preselección se realizó una segunda PCR (amplificación selectiva). Se utilizaron primers con la misma secuencia que los usados en la preamplificación más dos o tres bases adicionales, por lo que sólo se amplificó una porción del genoma fragmentado. El primer homólogo al sitio de restricción *Msel* se marcó con un fluoróforo para detectar el fragmento amplificado.

Antes de realizar la mezcla de reacción para la amplificación selectiva, se realizaron diluciones (1:50) en buffer TE para llevar todas las muestras a una concentración homogénea de 50 ng/ μL .

Posteriormente, se prepararon las mezclas de reacción de amplificación selectiva, por duplicado para cada muestra, con la finalidad de colocar en cada tubo dos combinaciones de primers con fluoróforo. Las mezclas de reacción se realizaron en hielo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Reacción de amplificación selectiva de ADN mediante PCR.

Concentración inicial Compuesto	Concentración final	Mezcla de reacción (1x)
Agua		0.35 μ L
10x PCR buffer	1x	1 μ L
50 mM MgCl ₂	1.5 mM	0.6 μ L
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.2 μ L
Primers <i>MseI</i> (6.7 ng/ μ L)	0.2 mM	2.25 μ L
Primers <i>EcoRI</i> (27.8 ng/ μ L)	1 pmol cada uno	0.5 μ L
5U/ μ L Taq Polimerasa	0.5 U	0.1 μ L
ADN preamplificado (dilución 1:50)		5 μ L
		Volumen final = 10 μL

7.10.5. Combinaciones de primers

Se probaron 40 combinaciones de primers para el análisis genético de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*. Se utilizaron ocho primers de *EcoRI* marcados con fluoróforo verde (**JOE™**), amarillo (**NED™**) y azul (**FAM™**), con cinco primers de *MseI*.

Cada combinación se probó por duplicado en las muestras de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, dado que primero sólo se buscaba encontrar las combinaciones que amplificaran un mayor número de bandas.

La intensidad relativa de los fluoróforos utilizados se observa en el cuadro 8.

Cuadro 8. Intensidad relativa de los fluoróforos utilizados en la detección de polimorfismo de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*.

Fluoróforo	Max A (nm)	Max E (nm)
JOE™	528	554
NED™	546	575
FAM™	494	530
ROX™	587	607

Rox™ se utilizó como marcador, detecta bandas de 60 a 500 pb.

El programa del termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad®) para la amplificación selectiva se realizó como se observa en la figura 8.

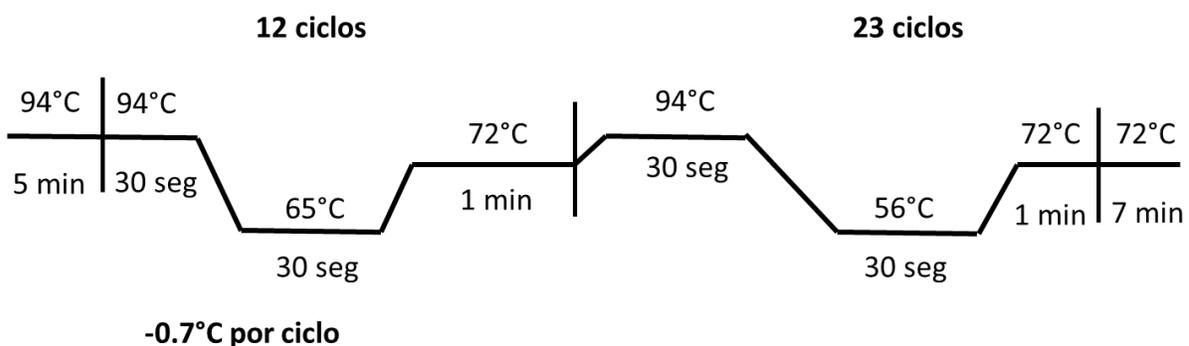


Figura 8. Programa del termociclador para la amplificación selectiva de ADN.

7.10.6. Secuenciación automática

Para evaluar los fragmentos presentes en la amplificación selectiva, se preparó una mezcla de reacción en un tubo de Eppendorf de 500 µL para cada muestra, con 10 µL de formamida, 0.4 ML de **ROX™** size Estándar Gene Scan™-500 (Invitrogen), 2 µL de la amplificación selectiva con los primers específicos marcados con los fluoróforos amarillo, azul y verde. De esta manera se analizaron las combinaciones simultáneamente.

El ADN se desnaturalizó en el termociclador a 94 °C durante 5 min. Los tubos con las muestras se colocaron en un recipiente con hielo o se almacenaron a -20 °C para posteriormente resolverlas por electroforesis en un secuenciador automático (ABI PRISM® 3100 Avant) con buffer EDTA 1x, para obtener un electroferograma por cada muestra.

7.10.7. Matriz binaria de presencia/ausencia

Los electroferogramas obtenidos en el secuenciador automático se analizaron visualmente con el programa Gene Marker® (The Biologist Friendly Software SoftGenetics), considerando los fragmentos con un nivel de intensidad que no fuera confuso. El rango de tamaño que se estableció fue de 60 a 500 pb, estimando con base en el marcador Gene Scan™ 500 **ROX™** Size Std. La presencia de bandas se marcó con 1 y la ausencia con 0, para obtener una matriz binaria y así poder cuantificar el número de bandas monomórficas y polimórficas para cada combinación.

7.10.8. Matriz de similitud

La matriz de presencia y ausencia de cada especie se exportó a un archivo de Microsoft Excel para depurarla, eliminando las bandas no informativas. Posteriormente, el análisis de estos datos se realizó con el programa FREE TREE para estimar los coeficientes de similitud para cada muestra mediante el índice de Nei y Li (1979), cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

En donde:

S_{ij} : similitud entre individuos i y j .

a : número de bandas presentes en los dos individuos i y j .

b : número de bandas presentes en i pero ausentes en j .

c : número de bandas presentes en j pero ausentes en i .

7.10.9. Obtención de los dendrogramas

A partir de la matriz de similitud generada para cada especie se construyeron los dendrogramas, usando el método de agrupación de pares no ponderados con media aritmética UPGMA (Método no Ponderado de Grupos de Pares con Media Aritmética) mediante la utilización del programa Tree View X.

8. RESULTADOS

8.1. Viabilidad de semillas conservadas *ex situ*

8.1.1. *E. chiotilla*

En semillas de *E. chiotilla* de las colectas 2007, 2010, 2014 y 2015 se obtuvieron porcentajes de germinación mayores a 94. La germinación de semillas almacenadas en laboratorio durante diferentes períodos de tiempo no mostró diferencias significativas respecto a las semillas de colecta reciente ($F = 0.1865$, $P = 0.905$) (Figura 9). El TMG de las semillas de las diferentes colectas varió de seis a siete días durante el tiempo de almacenamiento (Cuadro 9).

8.1.2. *S. pruinosus*

En semillas de *S. pruinosus* de las colectas 2007, 2010, 2014 y 2015 se obtuvieron porcentajes de germinación mayores a 89. La germinación de semillas almacenadas en laboratorio durante diferentes períodos de tiempo no mostró diferencias significativas respecto a las semillas recién colectadas ($F = 0.4843$, $P = 0.694$) (Figura 10). El TMG de las semillas de las diferentes colectas varió de cuatro a seis días durante el tiempo de almacenamiento (Cuadro 10).

El efecto del tiempo de almacenamiento en la viabilidad de semillas conservadas *ex situ* fue similar entre ambas especies ($F = 4.64$, $P = 0.52$).

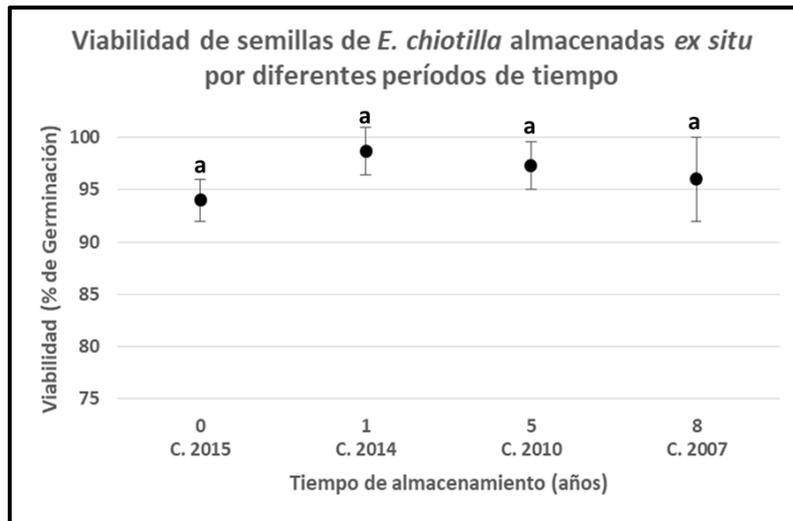


Figura 9. Viabilidad de semillas de *E. chiotilla* de diferentes colectas conservadas *ex situ* en condiciones de oscuridad a 25 ± 5 °C durante 0, 1, 5 y 8 años. Letras diferentes indicarían diferencias significativas.

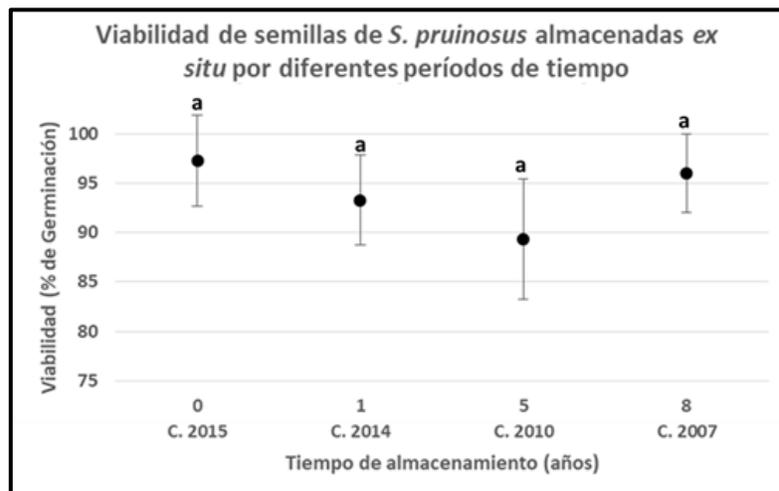


Figura 10. Viabilidad de semillas de *S. pruinosus* de diferentes colectas conservadas *ex situ* en condiciones de oscuridad a 25 ± 5 °C durante 0, 1, 5 y 8 años. Letras diferentes indicarían diferencias significativas.

Cuadro 9. TMG de semillas de *E. chiotilla* de diferentes colectas conservadas *ex situ* en condiciones de oscuridad a 25 ± 5 °C durante 0, 1, 5 y 8 años.

Especie	Colecta	Tiempo de almacenamiento (años)	TMG (días)
<i>E. chiotilla</i>	2007	8	7.7±0.2
	2010	5	6.7±0.2
	2014	1	6.2±0.3
	2015	0	6.4±0.3

Cuadro 10. TMG de semillas de *S. pruinosus* de diferentes colectas conservadas *ex situ* en condiciones de oscuridad a 25 ± 5 °C durante 0, 1, 5 y 8 años.

Especie	Colecta	Tiempo de almacenamiento (años)	TMG (días)
<i>S. pruinosus</i>	2007	8	6.03±0.7
	2010	5	5.3±0.4
	2014	1	4.7±0.3
	2015	0	4.4±0.3

8.2. Viabilidad de semillas enterradas *in situ*

8.2.1. *E. chiotilla*

La viabilidad de semillas de *E. chiotilla* varió significativamente dependiendo del año de colecta ($F = 4.36$, $P = 0.015$), micrositio ($F = 33.97$, $P < 0.0001$), tiempo de enterramiento ($F = 821.06$, $P < 0.0001$) y la interacción entre estos factores ($F = 10.11$, $P < 0.0001$).

En las colectas 2007, 2010 y 2014, la viabilidad de las semillas varió entre 0-96%, 0-97% y 0-97%, respectivamente, durante los 24 meses de enterramiento *in situ*. En la colecta 2007, la germinación de semillas fue similar entre micrositios a los cero y tres meses y se mantuvo elevada hasta los 12 ($> 66\%$). A los 15 meses, la viabilidad disminuyó drásticamente a 2 y 17%, en los micrositios M1 y M2, respectivamente. A los 24 meses, las semillas perdieron por completo la viabilidad en ambos sitios (Figura 11 A). El TMG varió de cinco a ocho días (Cuadro 11).

En semillas de la colecta 2010, la germinación se mantuvo similar entre micrositios hasta los seis meses de enterramiento. A los 15 meses, ésta disminuyó a más del 50%, tanto en M1, como en M2, y en ambos micrositios la viabilidad disminuyó a 0 a los 24 meses (Figura 11 B). El TMG, por su parte, varió de cinco a nueve días (Cuadro 12), en las diferentes condiciones experimentales. En semillas de la colecta 2014, a los 15 meses de enterramiento, la germinación en M1 y M2 se mantuvo en 62 y 40%, respectivamente. Sin embargo, a los 18 y 24 meses la viabilidad de las semillas se perdió totalmente (Figura 11 C). El TMG varió de cinco a ocho días (Cuadro 13).

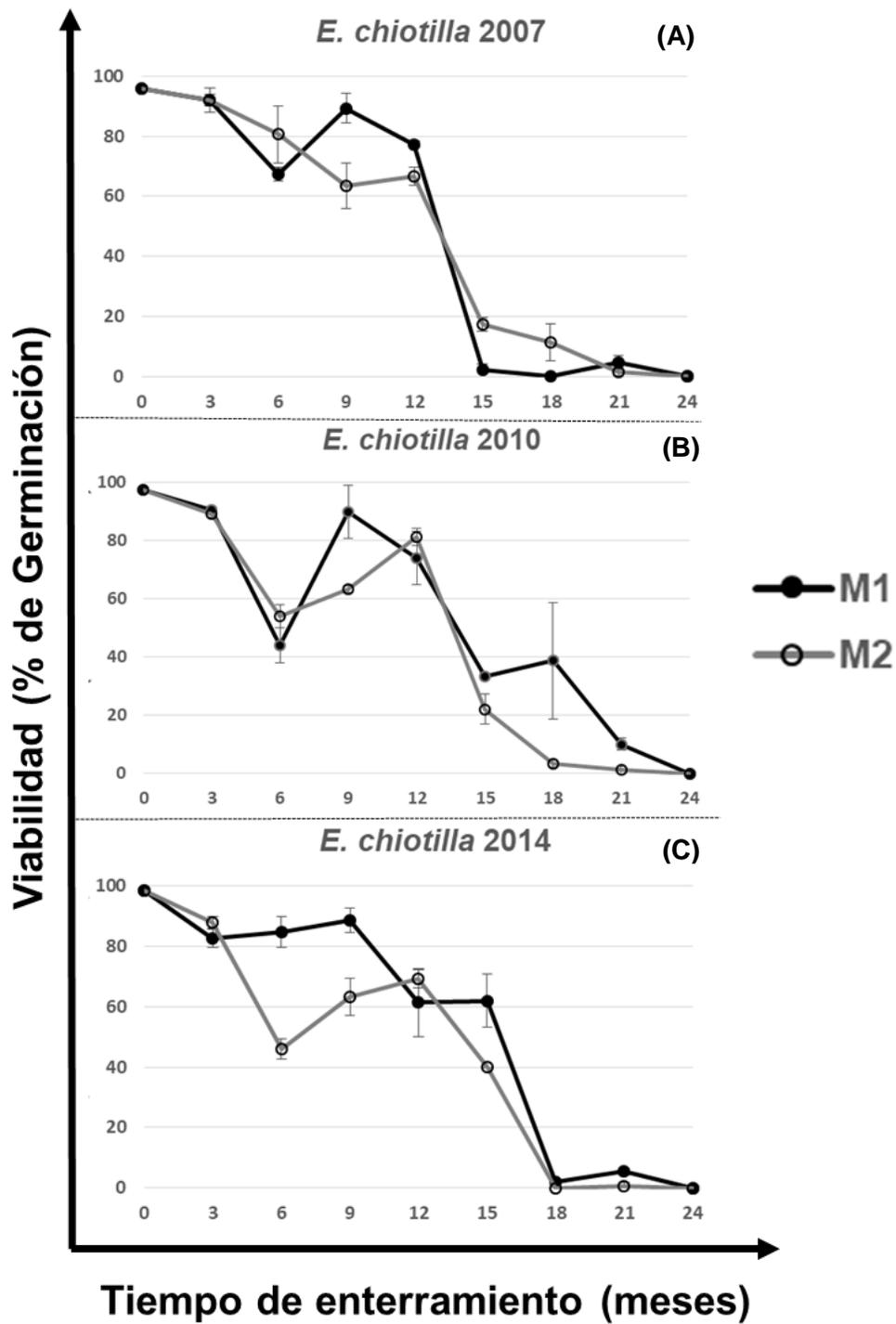


Figura 11. Viabilidad de semillas de *E. chiotilla* de diferentes colectas (A. 2007, B. 2010, C. 2014) enterradas *in situ* en dos micrositos (M1 y M2) durante 24 meses.

Cuadro 11. TMG de semillas de *E. chiotilla* colecta 2007 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.

	Tiempo de enterramiento (meses)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
M1	7.7±0.2	5.8±0.2	8.9±0.9	7.4±0.6	7±0.4	6.3±0.34*	S/G	7.3±0.6*	S/G
M2	7.7±0.2	6.1±0.5	7.7±0.6	6.8±0.2	7.1±0.4	7.8±0.5*	8.4±0.4*	S/G	S/G

S/G: sin germinación

*TMG obtenidos con menos del 50% de germinación

Cuadro 12. TMG de semillas de *E. chiotilla* colecta 2010 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.

	Tiempo de enterramiento (meses)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
M1	6.2±0.3	5.9±0.2	9.8±0.2*	8.0±0.3	7.4±0.2	8.5±0.7*	7.7±0.3*	7.3±0.7*	S/G
M2	6.2±0.3	6.2±0.1	8.2±0.5	7.9±0.1	7.4±0.4	8.7±0.4*	7.9±0.3*	S/G	S/G

S/G, sin germinación.

*TMG obtenidos con menos del 50% de germinación.

Cuadro 13. TMG de semillas de *E. chiotilla* colecta 2014 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.

	Tiempo de enterramiento (meses)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
M1	6.7±0.2	5.6±0.1	8.2±0.3	7.6±0.5	5.1±0.2	8.5±0.3	7.7±1.5*	6.7±1.1*	S/G
M2	6.7±0.2	6.3±0.1	8.6±0.2*	7.9±0.1	7.2±0.4	8.5±0.5*	S/G	S/G	S/G

S/G: sin germinación.

*TMG obtenidos con menos del 50% de germinación.

8.2.2. *S. pruinosus*

La viabilidad de semillas de *S. pruinosus* varió significativamente dependiendo del año de colecta ($F = 69.09$, $P < 0.0001$), micrositio ($F = 35.64$, $P < 0.0001$), tiempo de enterramiento ($F = 849.18$, $P < 0.0001$) y la interacción entre estos factores ($F = 12.23$, $P < 0.0001$).

En las colectas 2007, 2010 y 2014, la viabilidad de semillas varió entre 0-96%, 0-89.33% y 0-96%, durante los 24 meses de enterramiento *in situ*. La germinación de las semillas colecta 2007 fue similar entre micrositos hasta los nueve meses (>73%). A los 12 meses, la germinación en el sitio M1 se mantuvo elevada (87%). Sin embargo, en los siguientes tres meses disminuyó a 34% y se mantuvo en este porcentaje hasta los 24 meses de enterramiento. Mientras, las semillas enterradas en el sitio M2, disminuyeron su germinación al 48% a los 12 meses y perdieron su viabilidad a los 24 meses (Figura 12 A). El TMG varió de cuatro a seis días (Cuadro 14).

La viabilidad de semillas de la colecta 2010 se mantuvo elevada (> 69%) en los primeros nueve meses de enterramiento, en ambos micrositos. Sin embargo, a los 15 meses en el sitio M2 la viabilidad se redujo a 0%, mientras que, en M1 eso ocurrió hasta los 24 meses (Figura 12 B). El TMG varió de cuatro a siete días (Cuadro 15). La germinación de semillas de la colecta 2014 fue similar en ambos micrositos hasta los 15 meses, en los que disminuyó por debajo del 20%. En el sitio M2, la viabilidad se perdió totalmente a los 21 meses y en el sitio M1 disminuyó a 0% a los 24 meses (Figura 12 C). El TMG varió de tres a siete días (Cuadro 16).

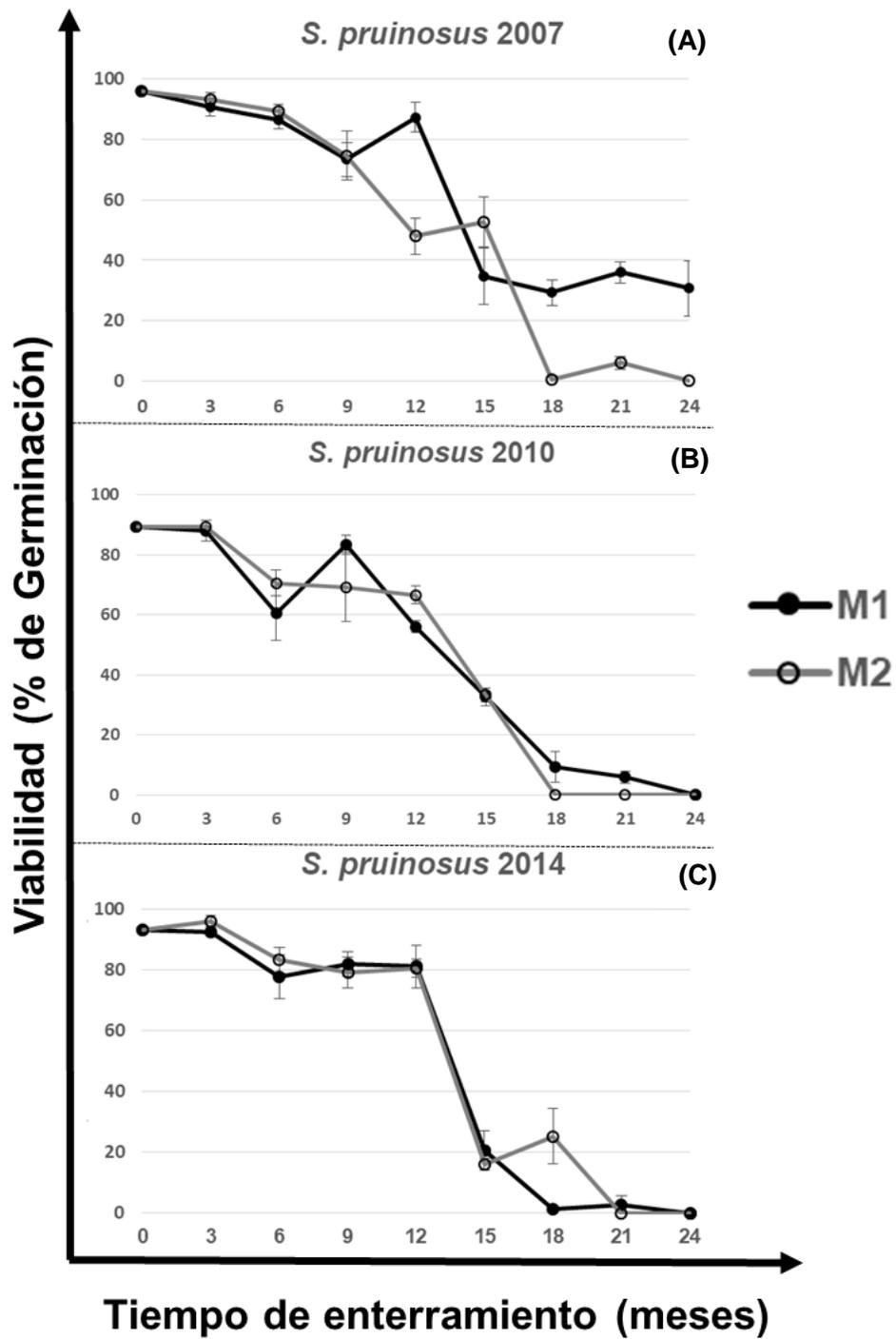


Figura 12. Viabilidad de semillas de *S. pruinosus* de diferentes colectas (A. 2007, B. 2010, C. 2014) enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.

Cuadro 14. TMG de semillas de *S. pruinosus* colecta 2007 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.

	Tiempo de enterramiento (meses)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
M1	6.1±0.7	5.1±0.2	5.5±0.3	4.9±0.3	4.9±0.2	5.6±0.8*	4.2±0.4*	4.8±0.2	5±0.4
M2	6.1±0.7	4.4±0.2	5.3±0.5	4.4±0.5	4±0.8*	5.4±0.3	S/G	6±0.9*	S/G

S/G: sin germinación.

*TMG obtenidos con menos del 50% de germinación.

Cuadro 15. TMG de semillas de *S. pruinosus* colecta 2010 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.

	Tiempo de enterramiento (meses)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
M1	5.3±0.4	5.2±0.1	6.6±0.4	4.7±0.1	4.9±0.2	5.7±0.5*	5.7±0.7*	5.8±1.3*	S/G
M2	5.3±0.4	4.9±0.43	7.4±0.9	4.7±0.1	4.1±0.5	7.8±0.6*	S/G	S/G	S/G

S/G: sin germinación.

*TMG obtenidos con menos del 50% de germinación.

Cuadro 16. TMG de semillas de *S. pruinosus* colecta 2014 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) durante 24 meses.

	Tiempo de enterramiento (meses)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
M1	4.7±0.3	5.5±0.2	6.9±1.2	7.8±0.9	4.8±0.4	7.7±0.7*	S/G	S/G	S/G
M2	4.7±0.3	4.9±0.14	6.4±0.4	3.7±0.9	4.5±0.1	6.2±0.6*	6.4±0.5*	S/G	S/G

S/G: sin germinación.

*TMG obtenidos con menos del 50% de germinación.

8.3. Efecto de las condiciones ambientales (período de secas y lluvias) en la viabilidad de semillas

8.3.1. *E. chiotilla*

La viabilidad de semillas de *E. chiotilla* varió entre el control (semillas conservadas *ex situ*, no enterradas) y las semillas enterradas ($F = 40.31$, $P < 0.0001$), pero fue similar ($P = 0.24$) en los cuatro períodos en los que se enterraron las semillas a lo largo de un año. Asimismo, no se encontraron diferencias entre los años de colecta ($F = 1.07$, $P = 0.35$), micrositios ($F = 3.20$, $P = 0.78$) y la interacción entre estos factores no resultó estadísticamente significativa ($F = 2.57$, $P = 0.977$).

En semillas de la colecta 2007, el mayor porcentaje de germinación (93.3%) se registró en el sitio M1, en el período de enterramiento de noviembre a febrero (época de secas) y el menor porcentaje (78.66%) fue el del período de febrero a mayo (fin de secas, inicio de lluvias), en el sitio M2 (Figura 13 A). El TMG varió de cinco a seis días (Cuadro 17).

En la colecta 2014, el mayor porcentaje de germinación (88.6%) se registró de agosto a noviembre (fin de lluvias, inicio de secas) en el sitio M2 y el más bajo (79.33%) de mayo a agosto (época de lluvias) en el sitio M1 (Figura 13 B). El TMG varió de cuatro a seis días (Cuadro 18). Mientras que, en la colecta 2015, el mayor porcentaje (90.6%) se registró de agosto a noviembre (fin de lluvias, inicio de secas) en el sitio M1 y el más bajo (83.3%) en el periodo de noviembre a febrero (época de secas) en el mismo sitio (Figura 13 C). El TMG varió de cinco a siete días (Cuadro 19).

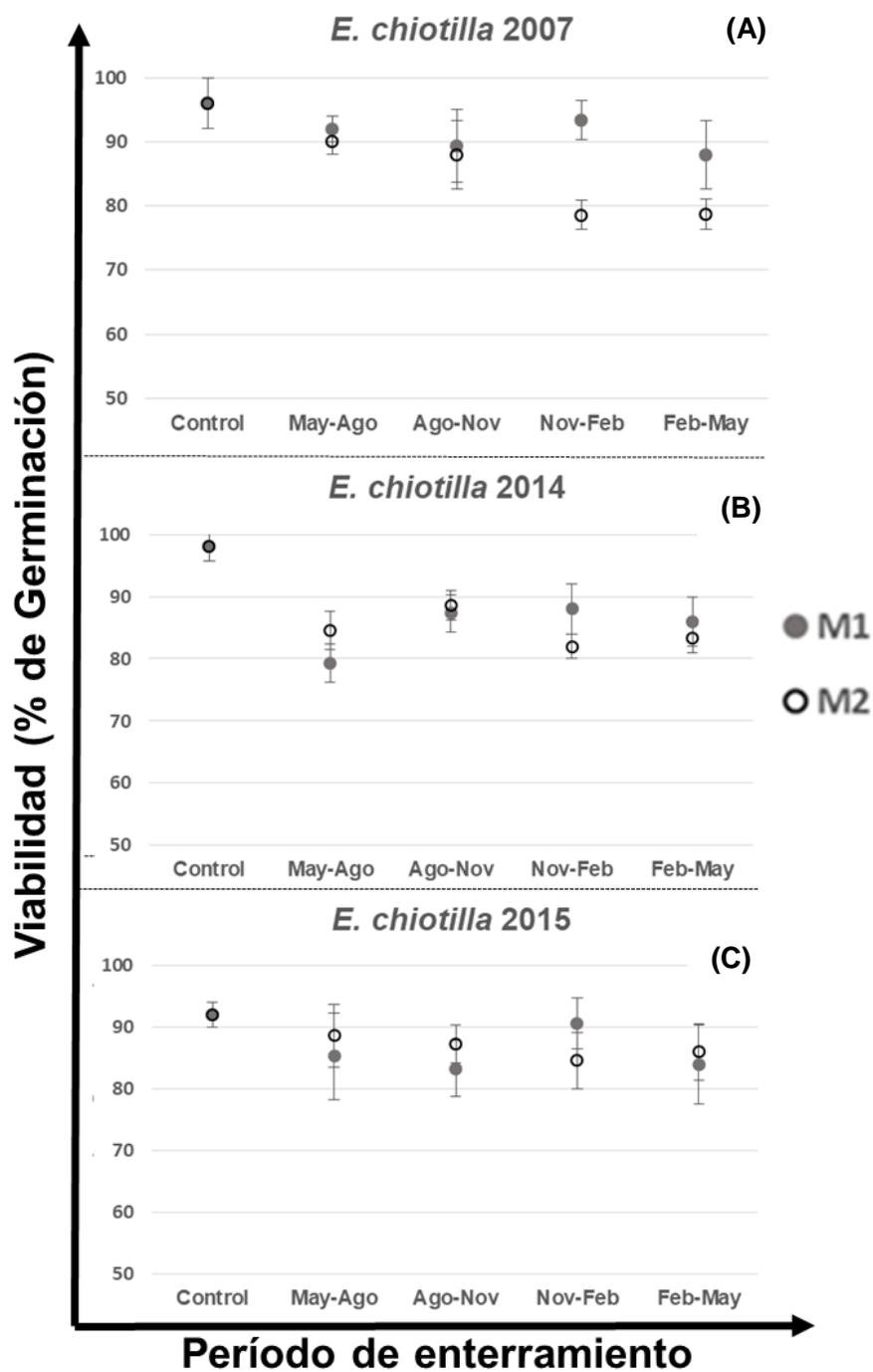


Figura 13. Viabilidad de semillas de *E. chiotilla* de diferentes colectas (A. 2007, B. 2014, C. 2015) enterradas *in situ* en dos micrositos (M1 y M2) en diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).

Cuadro 17. TMG de semillas de *E. chiotilla* colecta 2007 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).

Período de enterramiento					
	Control	May-Ago	Ago-Nov	Nov-Feb	Feb-May
M1	7.7±0.2	5.6±0.10	6.2±0.13	5.9±0.15	5.8±0.36
M2	7.7±0.2	5.6±0.22	5.5±0.44	6.3±0.32	6.4±0.15

Cuadro 18. TMG de semillas de *E. chiotilla* colecta 2014 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).

Período de enterramiento					
	Control	May-Ago	Ago-Nov	Nov-Feb	Feb-May
M1	6.2±0.3	5.4±0.12	5.7±0.18	5.4±0.17	5.4±0.19
M2	6.2±0.3	6.1±0.38	6.1±0.39	5.1±0.43	4.8±0.10

Cuadro 19. TMG de semillas de *E. chiotilla* colecta 2015 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).

Período de enterramiento					
	Control	May-Ago	Ago-Nov	Nov-Feb	Feb-May
M1	6.7±0.2	7.6±0.46	6.7±0.47	5.6±0.15	6.1±0.28
M2	6.7±0.2	7.8±0.41	7.2±0.59	6.1±0.70	5.9±0.45

8.3.2. *S. pruinosus*

La viabilidad de semillas de *S. pruinosus* varió entre el control (semillas conservadas *ex situ*, no enterradas) y las semillas enterradas ($F = 40.31$, $P < 0.0001$), así como en los períodos en los que se enterraron las semillas a lo largo del año ($P < 0.05$) y entre microsítios ($F=5.13$, $P= 0.027$), pero fue similar entre los años de colecta ($F = 0.193$, $P = 0.825$). La interacción entre estos factores resultó estadísticamente significativa ($F = 8.25$, $P < 0.0001$).

En la colecta 2007, el porcentaje de germinación más alto (96%) fue el correspondiente al período de enterramiento de febrero a mayo (fin de secas e inicio de lluvias) en el sitio M1 y el menor registrado (52.66%) de noviembre a febrero (período de secas) en el sitio M2 (Figura 14 A). El TMG varió de tres a seis días (Cuadro 20).

En semillas de la colecta 2014, el porcentaje mayor (96.6%) se registró en el sitio M1 entre mayo a agosto (época de lluvias) y el menor porcentaje (72%) fue el obtenido en el período de febrero a mayo (fin de secas e inicio de lluvias) en el sitio M2 (Figura 14 B). El TMG varió de tres a cinco días (Cuadro 21).

En semillas de la colecta 2015, el porcentaje más alto fue el obtenido en el mes de mayo a agosto (época de lluvias) en el sitio M1 (96%) y el porcentaje más bajo (57.33%) se obtuvo en el periodo de febrero a mayo (fin de secas e inicio de lluvias) en el sitio M2 (Figura 14 C). El TMG varió de tres a seis días (Cuadro 22).

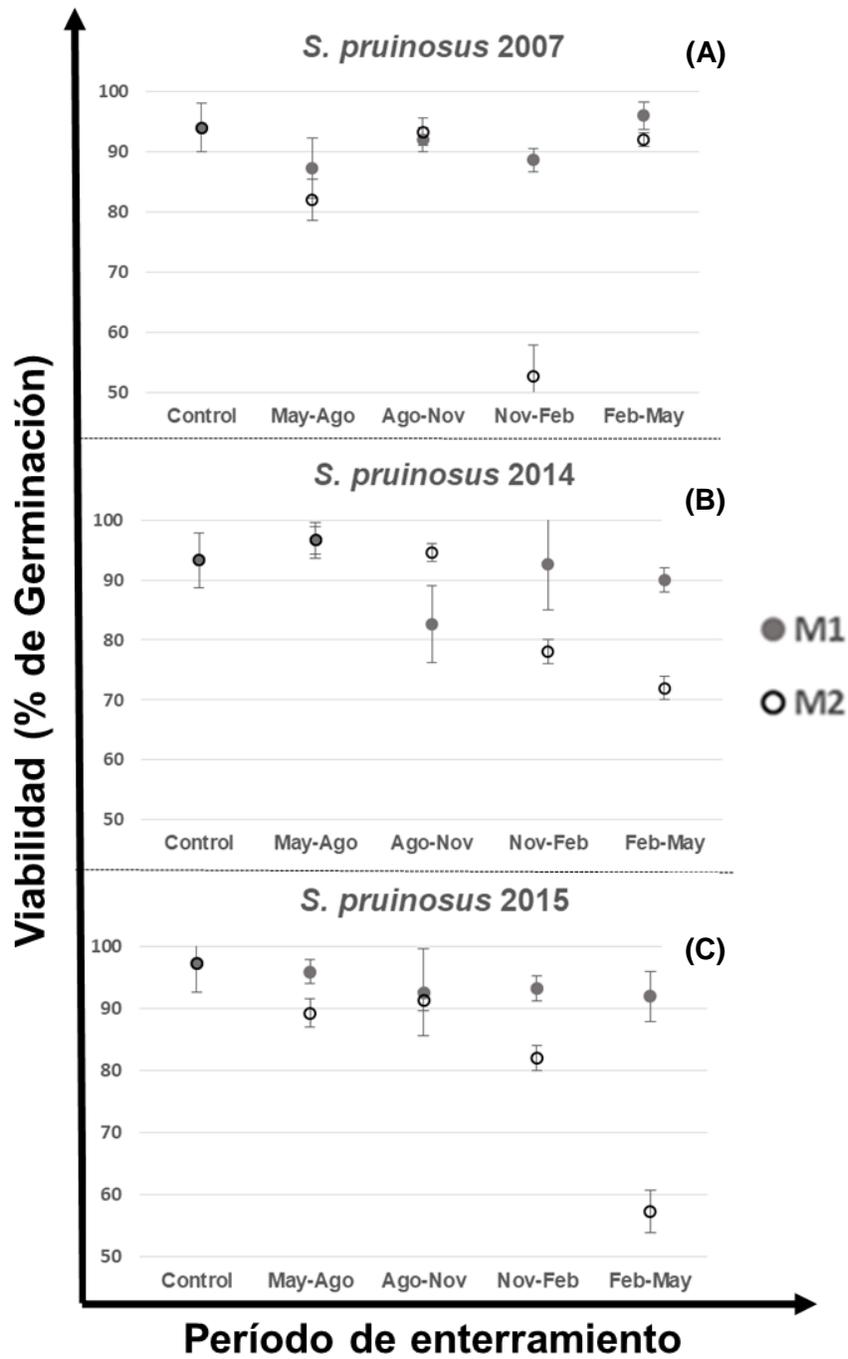


Figura 14. Viabilidad de semillas de *S. pruinosus* de diferentes colectas (A. 2007, B. 2014, C. 2015) enterradas *in situ* en dos micrositos (M1 y M2) en diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).

Cuadro 20. TMG de semillas de *S. pruinosus* colecta 2007 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).

Período de enterramiento				
	May-Ago	Ago-Nov	Nov-Feb	Feb-May
M1	4.7±0.27	5.1±0.49	6.3±0.2	2.9±0.09
M2	4.5±0.50	3.7±0.22	4.2±0.10	4.1±0.27

Cuadro 21. TMG de semillas de *S. pruinosus* colecta 2014 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).

Período de enterramiento				
	May-Ago	Ago-Nov	Nov-Feb	Feb-May
M1	5.5±0.51	4.9±0.63	3.2±0.04	3.1±0.2
M2	4.9±0.03	4.6±0.13	4.7±0.32	3.9±0.29

Cuadro 22. TMG de semillas de *S. pruinosus* colecta 2015 enterradas *in situ* en dos micrositios (M1 y M2) y diferentes períodos de tiempo (secas y lluvias).

Período de enterramiento				
	May-Ago	Ago-Nov	Nov-Feb	Feb-May
M1	6.1±0.09	5.3±0.24	4.2±0.49	3.5±0.26
M2	5.8±0.02	4.3±0.22	5.6±0.35	5.7±0.89

8.4. Análisis de suelo

En los Cuadros 23 a 25, se muestran los datos obtenidos de los análisis de suelo realizados para cada uno de los microsítios de estudio.

Cuadro 23. pH, materia orgánica (MO), fósforo (P) y magnesio (Mg), registrado en cada uno de los microsítios de estudio.

	Parámetros			
	pH	MO (%)	P (mg Kg ⁻¹)	Mg (mg Kg ⁻¹)
M1	5.75	3.03	6.42	97
M2	5.9	2.82	9.55	82

Cuadro 24. Porcentaje de arena, limo, arcilla y textura de suelo de cada uno de los microsítios de estudio.

	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura
M1	73.5	19.8	6.7	Franco-Arenoso
M2	77.5	9.8	17.7	Franco-Arenoso

Cuadro 25. Contenido de humedad (%) registrado en cada a uno de los microsítios de estudio.

	Contenido de humedad (%)								
	Atmosfera								
	0.3	0.5	1	3	5	7	10	13	15
M1	11.21	7.48	6.37	5.34	4.97	4.74	4.52	4.36	4.28
M2	12.85	8.67	7.29	6.02	5.56	5.28	5.01	4.82	4.72

8.5. Extracción, cuantificación e integridad del ADN

Se extrajo el ADN de 21 plántulas de *E. chiotilla* y 21 de *S. pruinosus*. La concentración de ADN obtenida en las muestras de *E. chiotilla* fue de 1.5 a 6.8 ng/μL. Mientras que, en plántulas de *S. pruinosus* la concentración fue de 1.4 a 6.5 ng/μL.

El ADN de todas las muestras se observó íntegro (Figura 15 y 16) y en cada una de ellas se obtuvo una pureza adecuada para continuar con la técnica de AFLPs.

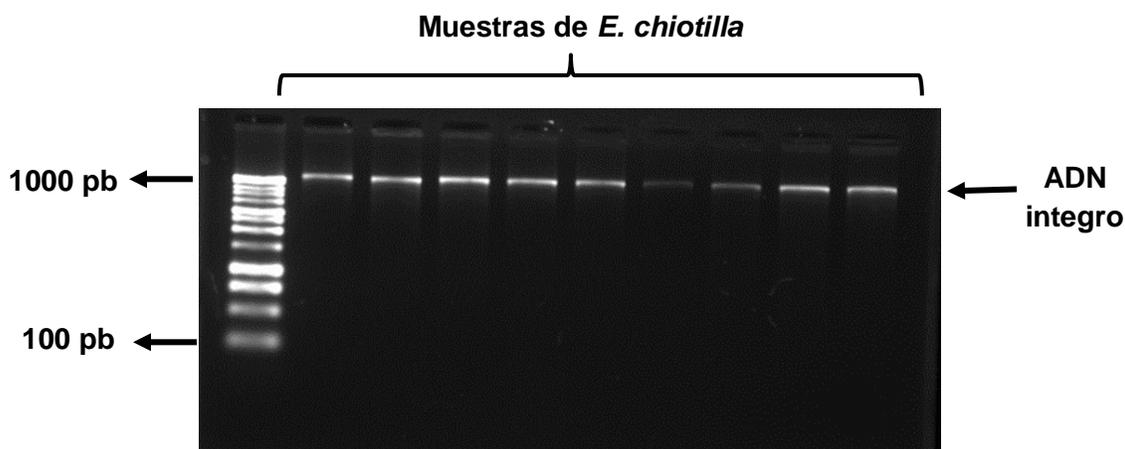


Figura 15. Gel de electroforesis donde se verifica la integridad de ADN de *E. chiotilla*.

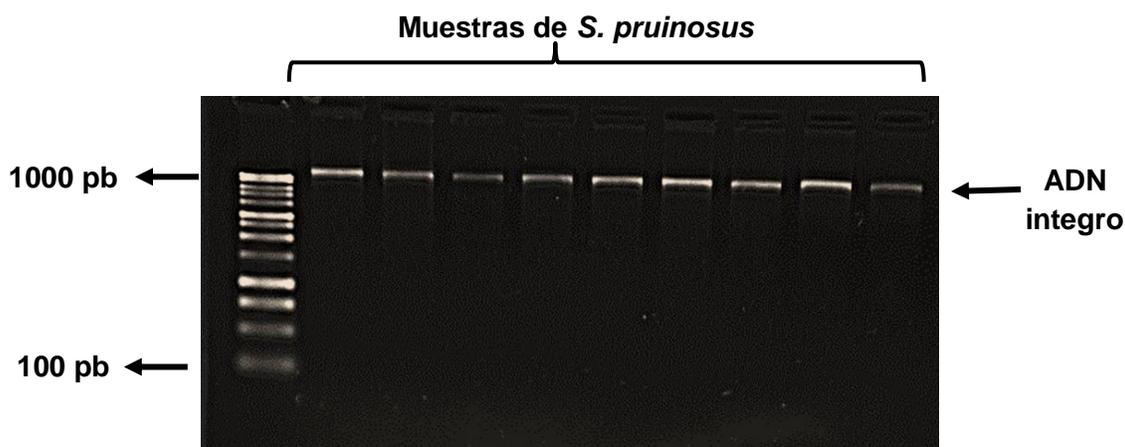


Figura 16. Gel de electroforesis donde se observa la integridad de ADN de *S. pruinosus*.

8.6. AFLPs

6.6.1. Restricción y ligación

Las muestras de ADN de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* se cortaron con las enzimas de restricción utilizadas (*EcoRI* y *MseI*) y los adaptadores se ligaron correctamente, dando como resultado fragmentos de ADN de diferente longitud, lo cual se observa como un ligero barrido (Figuras 17 y 18).

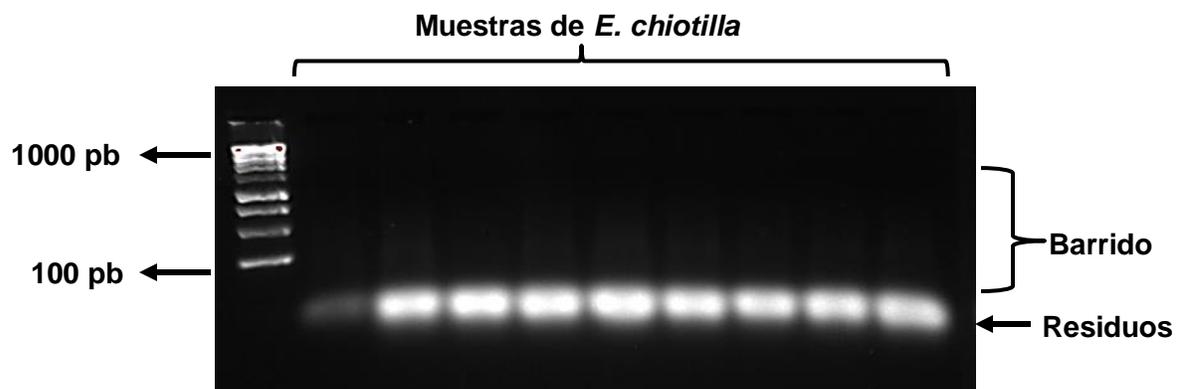


Figura 17. Gel de electroforesis donde se verifica la digestión y ligación de *E. chiotilla*.

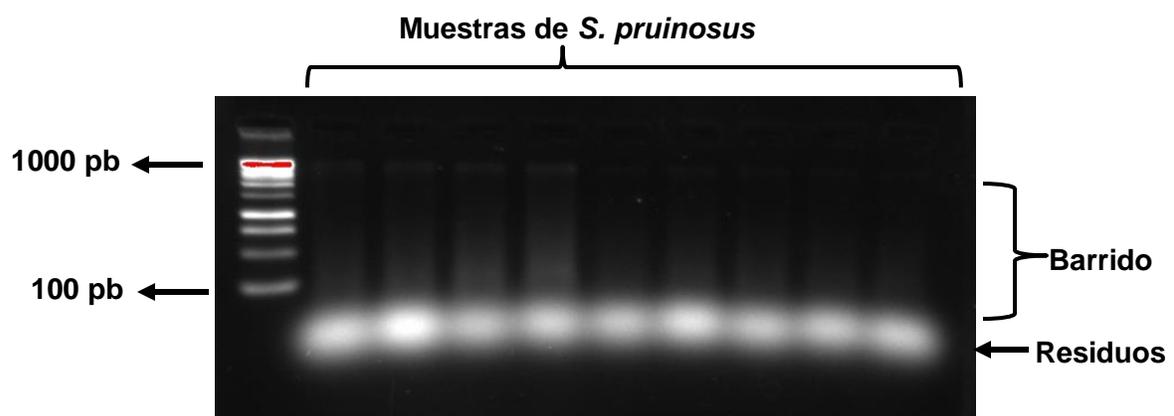


Figura 18. Gel de electroforesis donde se verifica la digestión y ligación de *S. pruinosus*.

8.6.2. Preamplificación

La reacción de preamplificación se realizó correctamente en las muestras de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, observándose como un barrido más intenso (Figura 19).

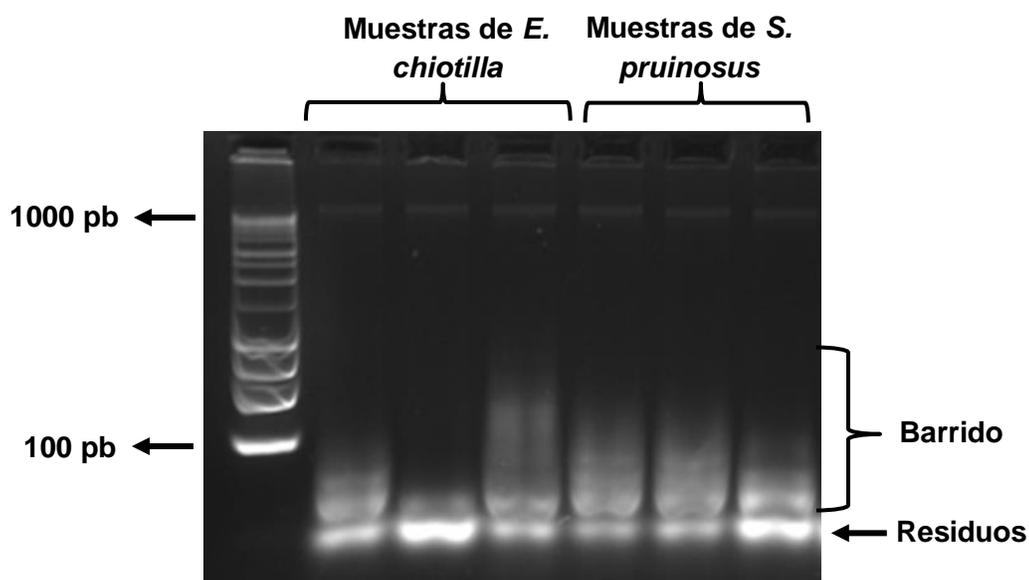


Figura 19. Gel de electroforesis en donde se verifica la preamplificación de ADN de las muestras de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*.

8.6.3. Amplificación selectiva

Los primers específicos marcados con fluoróforos que detectaron un mayor número de bandas polimórficas durante la amplificación selectiva fueron *EcoR1*-AAG, -AGG y -ACG con **JOE™**, *EcoR1*-AAC y -AGC con **NED™** y *EcoR1*-ACT y -ACA con **FAM™**, que producen una fluorescencia multicolor en el espectro del verde, amarillo y azul, respectivamente (Cuadro 26).

Cuadro 26. Combinaciones de primers específicos que proporcionaron un mayor número de fragmentos polimórficos en *E. chiotilla* y *S. pruinosus*.

Primers					
JOE™		NED™		FAM™	
<i>EcoR1</i>	<i>MSe1</i>	<i>EcoR1</i>	<i>MSe1</i>	<i>EcoR1</i>	<i>MSe1</i>
-AAG	-CAC	-AAC	-CAC	-ACT	-CAC
-ACG	-CAA	-AGC	-CAA	-ACA	-CAG
-AAG	-CAG	-AGC	-CAC	-ACA	-CAC
-AGG	-CAG	-AAC	-CAC	-ACT	-CAC
-AAG	-CAC	-ACC	-CAG		

8.6.4. Matriz de presencia ausencia

Para cada combinación de primers se obtuvo una matriz de presencia / ausencia con diferentes números de bandas monomórficas y polimórficas.

En los Cuadros 27 y 28 se muestra el total de bandas y porcentaje de polimorfismo que se obtuvieron en las 14 combinaciones utilizadas para la amplificación selectiva de las muestras de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*.

Cuadro 27. Bandas amplificadas y porcentaje de polimorfismo en *E. chiotilla*.

Total de bandas amplificadas	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo
976	844	132	13.52

Cuadro 28. Bandas amplificadas y porcentaje de polimorfismo en *S. pruinosus*.

Total de bandas amplificadas	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas	% de polimorfismo
704	632	72	10.22

8.6.5. Matriz binaria

Con el programa FREE TREE se obtuvo una matriz de similitud para las muestras de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* (Anexos B y C), donde se observa que el grado de similitud es alto (valores cercanos a uno), ya que están en rango de 0.90-0.96 y 0.88-0.94, respectivamente.

8.6.6. Obtención de los dendrogramas

Con el análisis UPGMA se obtuvieron los dendrogramas correspondientes a las muestras de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* (Figuras 20 y 21) Las muestras de ambas especies se separan claramente del grupo externo y se agruparon en un clado principal.

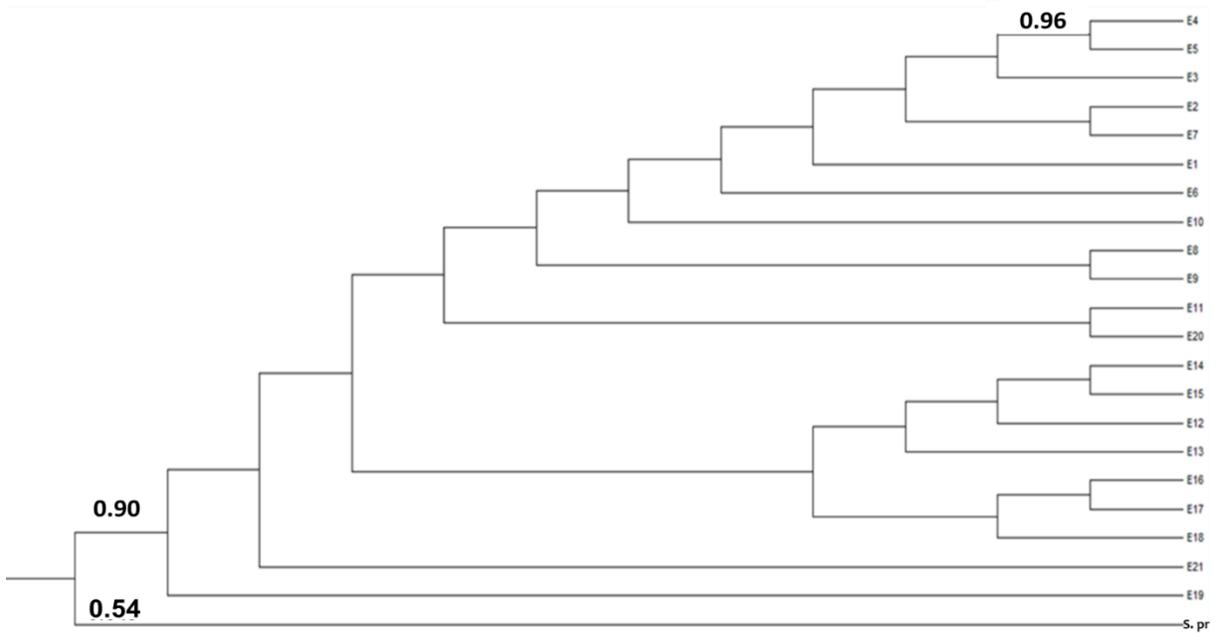


Figura 20. Dendrograma obtenido de las muestras de *E. chiotilla* al realizar un bootstrap de 1000 repeticiones con el índice de Nei y Li con UPGMA. El grupo externo que se utilizó fue una muestra de *S. pruinosus* (S. pr).

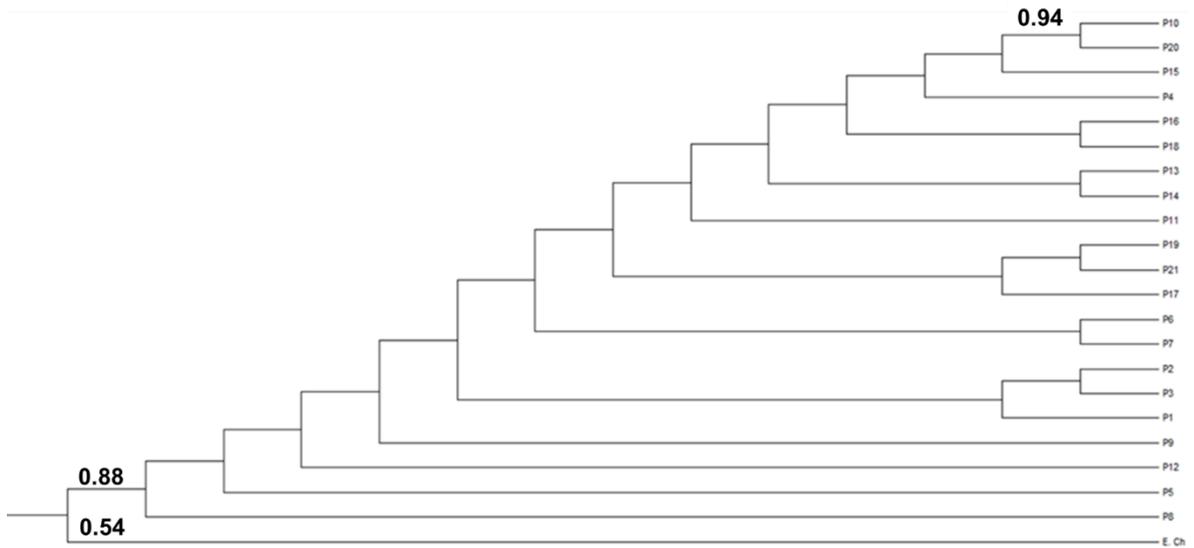


Figura 21. Dendrograma obtenido de las muestras de *S. pruinosus* al realizar un bootstrap de 1000 repeticiones con el índice de Nei y Li con UPGMA. El grupo externo que se utilizó fue una muestra de *E. chiotilla* (E. ch).

9. DISCUSIÓN

9.1. Viabilidad de semillas conservadas *ex situ*

Los resultados muestran que las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* almacenadas en laboratorio a 25 ± 5 °C en seco y oscuridad, mantienen su viabilidad (% de germinación > 85) durante al menos ocho años. Cabe mencionar que en estas especies no se han reportado estudios que evalúen la viabilidad de semillas conservadas en condiciones *ex situ*, por lo que, los datos presentados en este trabajo son de gran importancia para entender el efecto de la edad en la germinación de semillas de estas cactáceas bajo condiciones constantes de almacenamiento.

En otras especies de cactáceas, diversos autores han reportado resultados similares a los de este estudio. Por ejemplo, Alcorn y Martin (1974) demostraron que semillas de diferentes colectas de *Carnegiea gigantea* almacenadas a 25 ± 3 °C en seco, mantienen la viabilidad (% de germinación > 51) durante más de 10 años. Zimmer y Schultz (1975) encontraron que semillas de *Oreocereus erectocylindrica* almacenadas tres años entre 15 y 30 °C germinaron en 80%. Así mismo, semillas de *Eulychnia castanea* y *Neoporteria subgibbosa* de cuatro años de edad germinaron más del 70%, almacenadas en los mismos rangos de temperatura.

Por otra parte, Fearn (1977) reportó que semillas de *Ferocactus* sp y *Echinocereus* sp son viables durante más de cuatro años, semillas de *Coryphantha odorata* almacenadas siete años germinan al 100%, mientras que semillas de *Ferocactus herrerae* y *Ferocactus emoryi* de 10 años de edad, conservan 80 y 90% de viabilidad,

respectivamente. En contraste, el autor encontró que semillas de dos especies de *Brasilicactus* no permanecieron viables durante un período de almacenamiento mayor a tres años.

Del Castillo (1986) demostró que semillas de *Ferocactus histrix* mantienen una viabilidad alta (% de germinación > 90) después de dos años de almacenamiento. Posteriormente, Trejo y Garza (1993) reportaron que semillas de *Mammillaria heyderi* almacenadas durante tres años germinaron en 67.5%. Además, semillas de *Stenocereus stellatus* se mantienen viables (% de germinación > 80) durante más de tres años (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001) y semillas de *Stenocereus queretaroensis* obtuvieron porcentajes de germinación mayores a 60 después de ser almacenadas 40 meses a 25 °C en oscuridad (De la Barrera y Nobel, 2003).

En años más recientes, Guillen *et al.* (2014) reportaron que semillas de *Ferocactus townsendianus* de diferentes colectas almacenadas a 25 °C en bolsas de plástico, mostraron diferencias significativas ($P < 0.03$) en sus porcentajes de germinación variando entre 0 y 62%. Por su parte, Nascimento *et al.* (2015) estudiaron el efecto del almacenamiento a bajas temperaturas ($7\text{ °C} \pm 2$) en ocho especies de cactáceas durante un período de 24 a 30 meses y encontraron que todas las especies se mantuvieron viables (% de germinación > 50).

Estos ejemplos muestran que a pesar de las variaciones en las condiciones de almacenamiento (en algunos casos no mencionadas), las semillas de las cactáceas estudiadas, mantienen su viabilidad durante más de dos años, como ocurre en *E.*

chiotilla y *S. pruinosus*. Sin embargo, las condiciones óptimas de almacenamiento a largo plazo siguen siendo desconocidas para la mayoría de las semillas de cactáceas (Nascimento *et al.*, 2015). De acuerdo con Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes (2000), la mayoría de las semillas de cactus tienen un comportamiento de almacenamiento ortodoxo, lo que asegura que mantengan su viabilidad durante varios años cuando son desecadas y almacenadas.

Los TMG registrados en este trabajo para *E. chiotilla* y *S. pruinosus* son similares a los reportados en otras cactáceas (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001; De la Barrera y Nobel, 2003; Guillen *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2015; Nascimento y Meiado, 2016).

Es importante señalar que el tiempo que tardan las semillas en perder la viabilidad en condiciones controladas es variable según la especie y depende de varios factores, incluyendo el tipo de semilla, el estado de maduración, su viabilidad y el contenido de humedad cuando es almacenada, la temperatura, o el grado de infección por hongos y bacterias (Roberts, 1972; Fearn 1981; Hong y Ellis, 1996). Entre estos factores, la temperatura y la humedad han mostrado tener mayor influencia en la reducción de la viabilidad (Roberts, 1972).

Por otro lado, la mayoría de los estudios han evaluado la viabilidad *ex situ* de semillas de cactáceas en períodos que van desde siete meses (Goodman *et al.*, 2012), hasta más de 10 años (Alcorn y Martin, 1974; Fearn, 1977). Sin embargo, en la mayoría de los casos, este tiempo no es suficiente para determinar la longevidad de semillas bajo condiciones constantes de almacenamiento. Aun así, los estudios de longevidad de

semillas *ex situ* son fundamentales para proponer estrategias de conservación y realizar estudios de diversa índole, por lo que es necesario realizar estudios a corto, mediano y largo plazo, según sea el caso de cada especie.

9.2. Viabilidad de semillas enterradas *in situ*

En este estudio se demostró que semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* de diferentes edades, enterradas *in situ* en dos micrositios, mantienen la viabilidad durante más de un año, pero menos de dos; por lo que, de acuerdo a la clasificación propuesta por Thompson (1993), estas cactáceas poseen el potencial de formar un banco de semillas de tipo persistente a corto plazo.

En otras especies de cactáceas, existen trabajos que han inferido el potencial de las semillas para formar bancos en el suelo a través del análisis de rasgos morfológicos y fisiológicos, o mediante la germinación de semillas almacenadas en el laboratorio durante diferentes períodos de tiempo (Rojas-Aréchiga y Batis, 2001; De la Barrera y Nobel, 2003). Sin embargo, la diferencia entre la longevidad potencial y ecológica de las especies enfatiza la importancia de evaluar la viabilidad de semillas en condiciones naturales para determinar la presencia de un banco de semillas en el suelo (Álvarez-Espino *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se encontró que las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* permanecen viables al menos ocho años cuando son conservadas en condiciones *ex situ* (longevidad potencial), mientras que en condiciones naturales pueden mantenerse

viales por un período no mayor a los dos años (longevidad ecológica), independientemente del año de colecta de las semillas, lo que indica que la viabilidad no está determinada por la edad, sino por el efecto de las condiciones de conservación, ya sea de manera artificial o natural.

En condiciones naturales, los estudios que han determinado la viabilidad de semillas de cactáceas enterradas en el suelo son limitados, tal es el caso de *Ferocactus wislizenii* (Bowers, 2000), *Polaskia chende* (Ordoñez, 2008), *Arthrocerus glaziovii*, *Arthrocerus melanurus* (Cheib y García, 2012), *Harrisia fragrans* (Goodman *et al.*, 2012), *Stenocereus stellatus* (Álvarez-Espino *et al.*, 2014) y *Discocactus bahiensis* (Nascimento y Meiado, 2016). En estos estudios, se ha reportado que las semillas de estas especies se mantienen viables durante más de un año cuando son enterradas *in situ*, por lo que pueden formar bancos persistentes a corto plazo. *Mammillaria grahamii* (Bowers, 2005) y *Polaskia chende* (Ordoñez-Salanueva *et al.*, 2017), por su parte, tiene el potencial de formar bancos de semillas a largo plazo.

Como ya se mencionó anteriormente, además de una longevidad ecológica, las semillas deben tener características fisiológicas (latencia y requerimiento de la luz para germinar) y morfológicas (tamaño pequeño) que les permitan mantenerse viables e incorporarse al suelo y así tener el potencial de formar bancos de semillas (Bowers, 2000).

Las semillas de las especies estudiadas en este trabajo no presentaron ningún tipo de latencia, pero sí mostraron ser fotoblásticas positivas, un fenómeno común en las

cactáceas (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; De la Barrera y Nobel, 2003). El requerimiento de luz para la germinación asegura que las semillas enterradas no germinen y está relacionado con el tamaño pequeño de las semillas (< 2mm) (Milberg *et al.*, 2000). En el caso de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, las semillas miden de 1 a 1.5 mm y de 1.5 a 2 mm, respectivamente.

En semillas de tamaño pequeño, el movimiento a través el suelo está influenciado por factores bióticos (fauna y características morfológicas de las semillas) y abióticos (lluvia y características del suelo). Entre estos factores, la presencia de lluvias durante la dispersión de semillas y la alta porosidad del suelo han mostrado favorecer el enterramiento y la formación de bancos (Thompson *et al.* 1993). Por otro lado, el TMG particular de cada especie podría incrementar las probabilidades de que las semillas se entierren en el suelo antes de que éstas germinen, lo que incrementa su potencial de formar banco de semillas (Cheib y García, 2012).

Las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus*, además de una longevidad ecológica que les permite mantener la viabilidad durante períodos mayores a un año cuando son enterradas, poseen características morfológicas (tamaño pequeño) y fisiológicas (fotoblastismo positivo) que les facilitarían incorporarse al suelo, lo que demuestra el gran potencial de estas especies para formar bancos de semillas.

La formación de bancos de semillas constituye una estrategia importante para plantas de zonas áridas y semiáridas que experimentan largos períodos de condiciones climáticas severas, condiciones que pueden afectar el desarrollo y la supervivencia de

plántulas (Álvarez-Espino *et al.*, 2014). Por ello, generar más información sobre la dinámica del banco de semillas es básico para entender los patrones de reclutamiento y dinámica de poblaciones de plantas, manejo y conservación de especies de zonas áridas y semiáridas (particularmente en cactáceas, especies dominantes en este tipo de ambientes).

9.3. Efecto de las condiciones ambientales (período de secas y lluvias) en la viabilidad de semillas

Los resultados no mostraron una relación clara entre el efecto de las condiciones ambientales (período de secas y lluvias) y la reducción de la viabilidad en las semillas de las especies de estudio en una época determinada del año.

En *E. chiotilla* la viabilidad mostró diferencias ($P < 0.05$) entre las semillas que no fueron enterradas (conservadas *ex situ*) y las enterradas en dos micrositos en el matorral xerófilo, lo que indica que existe un efecto del enterramiento *in situ* en la reducción de la viabilidad. Pero, en los cuatro periodos que fueron enterradas las semillas de las diferentes colectas, la viabilidad fue similar ($P > 0.05$) (% de germinación mayores a 75), por lo que podría considerarse que los períodos de secas y de lluvias no son los principales factores que determinan la pérdida de viabilidad de estas semillas enterradas en el suelo. Sin embargo, en las semillas de *S. pruinosus* el período de enterramiento sí mostró tener efecto en la reducción de la viabilidad de las mismas, particularmente en la colecta 2007 en el período de noviembre a febrero (período de secas) y en la colecta 2015 de febrero a mayo (fin de secas e inicio de

lluvias) en las que la germinación se redujo a valores cercanos al 50% (en ambos casos en el sitio M2). Sin embargo, en las otras colectas de estudio y en ambos micrositios la germinación se mantuvo elevada y con valores similares a los de *E. chiotilla* (> 70%), por lo que no parece posible poder determinar si existe una época del año en la que la viabilidad de semillas resulta más afectada si sólo se consideran los efectos de los períodos de secas y de lluvias. No obstante, con los resultados obtenidos en este trabajo sí se podría inferir que la pérdida de viabilidad en las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* enterradas *in situ* se debe al efecto conjunto y acumulativo tanto de factores bióticos, como de abióticos a través del tiempo.

Galloway (2001), señaló que la viabilidad de las semillas de especies que habitan en ambientes áridos y semiáridos parece estar asociada con un alto grado de resistencia a condiciones de sequía, salinidad y temperaturas extremas. Esta resistencia sería adquirida durante la formación de la semilla y está determinada por las condiciones ambientales a la que estuvo expuesta la planta madre. Por otro lado, Fenner (2000) y Leishman *et al.* (2000) reportaron que la viabilidad de semillas está influenciada por factores ambientales, tales como la luz, temperatura, salinidad, pH y humedad del suelo, así como la profundidad a la cual las semillas se encuentran enterrada y de acuerdo a Cook (1980), la mayoría de las semillas en el suelo (hasta el 90%) mueren debido a una de estas causas.

En las últimas décadas el estudio de microorganismos (particularmente en hongos) ha mostrado que éstos tienen un papel fundamental en la mortalidad de semillas en el suelo. Se han descrito varios tipos que potencialmente afectan a las semillas, ya sean

hongos patógenos que se encuentren en el suelo y afecten a las semillas (directamente a través de la acción necrótica o indirectamente a través de la producción de desechos metabólicos tóxicos) o bien hongos de origen interno que pueden aumentar la actividad metabólica de las semillas y por lo tanto reducir su viabilidad a largo plazo (Leishman *et al.*, 2000)

Los factores más importantes que influyen en la distribución de hongos patógenos en el suelo son la temperatura y la humedad. Los altos niveles de precipitación dan como resultado una alta humedad atmosférica y en el suelo, junto con temperaturas cálidas, que favorecen el crecimiento y supervivencia de estos microorganismos (Mark *et al.*, 2009).

Cabe destacar que no hay trabajos en cactáceas que evalúen el efecto de las condiciones ambientales (periodo de secas y lluvias) en la viabilidad de semillas, por lo que este trabajo representa el primer esfuerzo para comprender estos procesos. Sin embargo, es necesario generar estudios que determinen cómo estos factores interactúan con otros agentes bióticos (depredadores y microorganismos) y abióticos (propiedades fisicoquímicas del suelo) para entender la dinámica de las semillas en el suelo.

9.4. Análisis de suelo

Los resultados mostraron que los suelos de los micrositios de estudio son similares. Ambos presentan una textura Franco-Arenosa, los cuales se caracterizan por tener un

mayor porcentaje de partículas de arena es su composición. Estos suelos son altamente porosos, por lo que retienen escasos porcentajes de agua (< 10%) (Thompson y Troeh, 1998). Thompson *et al* (1993) señalaron que suelos con estas características favorecen que las semillas de tamaño pequeño se entierren con ayuda de las lluvias para formar bancos. Tal podría ser el caso de *E. chiotilla* y *S pruinosus*, que presentan semillas < 2 mm y son dispersadas en la época de lluvias (Arias *et al.*, 2000). Además, estas especies se desarrollan principalmente en suelos de zonas semiáridas, los cuales presentan una profundidad variable, con texturas principalmente arenosas.

La materia orgánica registrada en los sitios de estudio es escasa (< 4%), lo cual es común en suelos de zonas áridas y semiáridas (Celaya-Michel y Castellanos-Villegas, 2011). La materia orgánica es uno de principales factores que determinan el pH en el suelo, el cual influye en la persistencia de semillas (Fenner, 2000; Leishman *et al.*, 2000).

El pH que se registró en ambos sitios fue cercano a seis, lo que indica suelos ligeramente ácidos (pH de 5.6-6.0) de acuerdo con la clasificación propuesta por la USDA en 1951. Pakeman *et al.* (2012) reportaron que los suelos ácidos (pH < 7) mantienen la viabilidad de semillas durante mayor tiempo, en comparación con los suelos neutros (pH = 7) o alcalinos (pH > 7). Sin embargo, Basto *et al.* (2015) obtuvieron resultados opuestos, por lo que el efecto del pH sobre la reducción de la viabilidad de semillas en el suelo sigue siendo poco entendido. Probablemente, la disponibilidad de nutrientes (macro y micro) en el suelo dificulta la identificación de la

relación directa entre el pH y la persistencia de las semillas en el suelo (Fernández-Calviño *et al.*, 2011). Los factores climáticos (temperatura y precipitación) también pueden modificar el pH (Basto *et al.*, 2015) y afectar al crecimiento, como a la composición de las comunidades de microorganismos, lo que también influye en la persistencia de las semillas en el suelo (Fenner, 2000).

En cactáceas, los estudios sobre suelo se han enfocado sobre todo en la germinación de semillas, como *Carnegiea gigantea* y *Stenocereus thurberi* (McDonough, 1964), *Ferocactus histrix* (Del Castillo, 1986), *Mammillaria heyderi* (Trejo y Garza, 1993), *Turbinicarpus polaskii* y *Echinocereus morricallii* (Jolly y Lockert, 1996), *Coryphantha durangensis*, *Peniocereus greggii* y *Echinocereus longisetus* (Muro-Pérez *et al.*, 2015). Sin embargo, no existen trabajos que reporten la influencia de las características fisicoquímicas y biológicas del suelo en la persistencia de semillas, los cuales son fundamentales para entender la dinámica del banco en zonas áridas y semiáridas.

9.5. Variabilidad genética

Los resultados obtenidos mostraron que la variabilidad genética de *E. chiotilla*, es mayor a la de *S. pruinosus*. Esto podría deberse a que *S. pruinosus* es una especie altamente cultivada en huertos, donde es reproducida de manera vegetativa, lo que origina plantas de un tallo común, por lo que los árboles producidos podrían considerarse réplicas genéticas (Rosales-Bustamante *et al.*, 2009; Carrillo-Ángeles y Mandujano, 2011; Yáñez-López *et al.*, 2016). Por su parte, *E. chiotilla* es una especie que no se cultiva, debido a la dificultad de propagarla vegetativamente y por el lento

crecimiento que presentan los individuos de esta especie (Arellano y Casas, 2003). Sin embargo, en ambas especies se ha reportado un manejo *in situ* en el Valle de Tehuacán. En *E. chiotilla* este proceso ha sido en menor escala y es menos frecuente que en *S. pruinosus* (Arellano y Casas, 2003). Lo anterior ha ocasionado que, a través del tiempo, las poblaciones silvestres de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* difieran en características morfológicas, principalmente en las características del fruto (tamaño, color, textura) con respecto a las poblaciones manejadas *in situ* (Luna-Morales y Aguirre, 2001; Arellano y Casas, 2003; Casas *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2010).

El efecto del manejo *in situ* sobre la variabilidad genética en poblaciones de *E. chiotilla* ha sido reportada por Tinoco *et al.* (2005), mediante el uso de aloenzimas. El porcentaje de polimorfismos reportado por estos autores mediante esta técnica (35.9%), fue mayor que el encontrado en el presente estudio, mediante el uso de AFLPs (13.52%). Mientras que en *S. pruinosus*, la variabilidad genética se ha determinado mediante aloenzimas (Parra *et al.*, 2008) y AFLPs (Yáñez-López *et al.*, 2016). Con esta última técnica se obtuvieron 538 bandas polimórficas, mientras que en este estudio sólo se obtuvieron 72.

En este trabajo los análisis de variabilidad genética se realizaron partiendo de la hipótesis de que si la variabilidad genética en plántulas de *E. chiotilla*, especie endémica y silvestre, resultaba mayor que la de *S. pruinosus*, especie cultivada, la viabilidad de semillas *E. chiotilla* sería mayor. Está hipótesis no se cumplió, si bien la variabilidad de *E. chiotilla* fue mayor que en *S. pruinosus*, la viabilidad de las semillas de ambas especies fue similar, tanto conservadas *ex situ* (longevidad potencial), como

en las enterradas *in situ* (longevidad ecológica). Por lo que la variabilidad genética por sí misma no determina la viabilidad de las semillas, sino que ésta parece estar influenciada por múltiples factores, como los expuestos a lo largo de este trabajo.

10. CONCLUSIONES

1. Las semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* se mantienen viables después de ser almacenadas en laboratorio (25 ± 5 °C, en condiciones de oscuridad y en seco), durante un período de hasta ocho años. Todas las colectas de estudio (2007, 2010, 2014 y 2015) tuvieron porcentajes de germinación mayores a 85 y no hubo diferencias significativas en la germinación con respecto a la edad de las semillas, lo que indica que el tiempo de almacenamiento no disminuyó la viabilidad. Por ello, las condiciones de conservación *ex situ* empleadas podrían considerarse adecuadas para mantener la viabilidad de semillas de estas dos especies de cactáceas.
2. La viabilidad de semillas de *E. chiotilla* y *S. pruinosus* conservadas en un banco semi natural en un matorral xerófilo no está determinada por la edad, dado que las semillas de ambas especies que fueron enterradas *in situ* persisten viables durante más de un año, independientemente del año de colecta. Por otro lado, el tiempo que las semillas pueden permanecer viables en el suelo, así como el tamaño pequeño y fotoblastismo que presentan las semillas de estas cactáceas indican que tienen el potencial de formar un banco de tipo persistente a corto plazo.
3. En las semillas de *E. chiotilla*, las condiciones ambientales (período de secas y lluvias) no mostraron tener un efecto sobre la reducción de la viabilidad en una

época determinada del año. Sin embargo, en las semillas de *S. pruinosus* sí se observó tal efecto, por lo que estudiar la pérdida de viabilidad de semillas enterradas *in situ* sólo considerando los períodos de secas y lluvias es insuficiente para comprender este proceso. Aun así, los resultados obtenidos en este trabajo podrían indicar que la persistencia de las semillas en condiciones naturales depende del efecto acumulativo de factores bióticos y abióticos a través del tiempo.

4. La variabilidad genética de *E. chiotilla*, especie endémica y silvestre, es mayor que la de *S. pruinosus*, especie cultivada. Sin embargo, las semillas de ambas especies se comportan de manera similar cuando son conservadas *ex situ* (longevidad potencial) o enterradas *in situ* (longevidad ecológica), por lo que la variabilidad genotípica de las especies, por sí misma, no es un factor que determine la viabilidad de las semillas de las cactáceas de estudio.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alcorn, S. M. y Krutz, E. B. (1959). Some factors affecting the germination of seed of the saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). *American Journal of Botany*, 46:526-529.

Alcorn, S. M. y Martin, S. C. (1974). *Cereus giganteus* Engelm. En: Seeds of Woody Plants in the United States. Washington, D.C. Forest Service U. S. Department of Agriculture. 883 pp.

Álvarez-Espino, R., Godínez-Álvarez, H. y De la Torre-Almaráz, R. (2014). Seed banking in the columnar cactus *Stenocereus stellatus*: distribution, density y longevity of seeds. *Seed Science Research*, 24: 315:320.

Arellano, E. y Casas, A. (2003). Morphological variation and domestication of *Escontria chiotilla* (Cactaceae) under silvicultural management in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 439–453.

Arias, M. S., Gama, S., Guzmán, L.U. (1997). Cactaceae, Fascículo 14 de la flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). D.F., México. 146 pp.

Arias, T. A. A., Valverde, V. M. T. y Reyes, S. J. (2000). Las Plantas de la Región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). D.F., México. 80 pp.

Assis, J. G. A., Resende, S. V., Bellintani, M. C., Coelho, P. J. A., Correia, D., Marchi, M. N. G., Cruz, B. M., Nahoum, P. I. V., Menezes, M. O. T. y Meiado, M. V. (2011). Conservação *ex situ*. En: Ribeiro-Silva, S., Zappi, D. C., Taylor, N. P. y Machado, M. C. (eds). Plano de Ação Nacional para a Conservação das Cactáceas. Série Espécies Ameaçadas, no. 24. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, 44–54 pp.

Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17: 221-242.

Barthlott, W. y Hunt, D. R. (1993). Cactaceae. En: Kubitzki K, (ed.) The families and genera of vascular plants. Springer-Verlag. Berlin. 161-197 pp.

Baskin, C. C. y Baskin, J. M. (1998). Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press (ed). San Diego, E.U.A. 666 pp.

Baskin, J. M. y Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14: 1–16.

Baskin, J. M. y Baskin, C.C. (1989). Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. En: Leck, M. A.; Parker, V. T., Simpson, R. L. (Eds.) Ecology of soil seed banks. San Diego, Academic Press. 53–66 pp.

- Basto, S., Thompson, K. y Rees, M. (2015). The effect of soil pH on persistence of seeds of grassland species in soil. *Plant Ecology*, 216:1163–1175.
- Benítez-Rodríguez, J. L., Orozco-Segovia, A. y Rojas-Aréchiga, M. (2004). Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 49: 11-17.
- Bouyoucos, G. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal*, 54: 464-465.
- Bowers, J. E. (2000). Does *Ferocactus wislizeni* (Cactaceae) have a between-year seed bank? *Journal of Arid Environments*, 45:197-205.
- Bowers, J. E. (2005). New evidence for persistent or transient seed banks in three Sonoran Desert cacti. *The Southwestern Naturalist*, 50:482-487.
- Bradford, K. J. y Nonogaki, H. (2007). Seed Development, Dormancy and Germination. Blackwell publishing, Oxford, UK. 307 pp.
- Bravo-Hollis, H. (1978). Las Cactáceas de México. Vol 1. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). D. F., México. 755 pp.
- Bravo-Hollis, H. y Scheinvar, L. (1999). El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). D.F. México. 233 pp.
- Cano-Salgado, A., Zavala-Hurtado, J. A., Orozco-Segovia, A., Valverde-Valdés, M. T. y Pérez-Rodríguez, P. (2012). Composición y abundancia del banco de semillas en una región semiárida del trópico mexicano: patrones de variación espacial y temporal. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83: 437-446.
- Carrillo-Ángeles, I. G., y Mandujano, M. del C. (2011). Patrones de distribución espacial en plantas clonales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 89: 1-18.
- Casas, A., Otero-Arnaiz, A., Pérez-Negrón E. y Valiente-Baunet, A. (2007). *In situ* Management and Domestication of Plants in Mesoamerica. *Annals of Botany*, 100: 1101-1115.
- Casas, A.; Caballero, J.; Valiente-Baunet, A. (1999). Use, Management and Domestication of columnar cacti in south-central Mexico: a historic perspective. *Journal of Ethnobiology*, 19: 71-95.
- Castro-Félix, P., Rosas-Espinoza, V. C., Díaz-Cárdenas, B., Pérez-Valencia, L.I., Huerta, M. F. M. y Santerre, A. (2013). Genetic diversity within a declining natural population of *Ferocactus histrix* (DC) Lindsay. *Plant Species Biology*, 29: 1-10.
- Celaya-Michel, H., y Castellanos-Villegas, A. E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29: 343-356.

- Cheib, L. A. y García, S. Q. (2012). Longevity and germination ecology of seeds of endemic Cactaceae species from high-altitude sites in south-eastern Brazil. *Seed Science Research*, 22: 45-53.
- Cook, R. (1980). The biology of seeds. En: The soil. Demography and natural selection. Demography and Evolution in Plant Populations. Botanical Monographs. Solbrig (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. 107–129 pp.
- Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B. y Rocha-Munive, M. G. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. INECC-SEMARNAT. D.F., México. 256 pp.
- Cota-Sánchez, J. H. (2002). Taxonomy, distribution, rarity status, and uses of Canadian cacti. *Haseltonia*, 9: 17-25.
- De la Barrera, E. y Nobel, P. S. (2003). Physiological ecology of seed germination for the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. *Journal of Arid Environments*, 53: 297-306.
- De Souza M., Maia, F. C. y Pérez M. A. (2006). Bancos de semillas en el suelo. *Agriscientia*, 23: 33-44.
- Del Castillo, R. F. (1986). Semillas, germinación y establecimiento de *Ferocactus histrix*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 31: 5–11.
- Draper, D., Marques, I., Graell, A. R. y Martins-Loução, F. C. (2004). Conservação de Recursos Genéticos: O banco de sementes de “António Luís Belo Correia”. *Museu Nacional de História Natural, Lisboa*, 4: 3-7.
- Ellis R. H. y Roberts E. H. (1981). *The quantification of ageing and survival in orthodox seeds*. *Seed Science and Technology*, 9: 373-409.
- Ellis, R. H., Hong, T. D. y Roberts, E. H., (1990). An intermediate category of seed behaviour? *Journal of Experimental Botany*, 41: 1167-1174.
- Fearn, B. (1977). An investigation into the effect of age on the germination potential of seeds of 600 species of cacti, together with a note on the viability of Lithops of seeds. *Excelsa*, 7: 103-108.
- Fearn, B. (1981). Seed germination: the modern approach. *Cactus and Succulent Journal*, 43: 13-16.
- Fenner, M. (2000). *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. Wallingford, UK: CABI Publishing. 375 pp.
- Fenner, M. y Thompson, K. (2005). *The ecology of seeds*. Cambridge, U.K. Cambridge: University Press. 250 pp.

Fernández-Calviño, D., Rousk, J., Brookes, P. C. y Baath, E. (2011). Bacterial pH-optima for growth track soil pH, but are higher than expected at low pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 43:1569–1575.

Flores, J., Jurado, E. y Arredondo, A. (2006). Effect of light on germination of seeds of Cactaceae from the Chihuahuan Desert, Mexico. *Seed Science Research*, 16: 149-155.

Flores, J., Jurado, E., Chapa-Vargas, L., Ceroni-Stuve, A., Davila-Aranda, P., Galíndez, G., Gurvich, D., León-Lóbos, P., Ordoñez, C., Ortega-Báez, P., Ramírez-Bullón, N., Sandoval A., Seal, C. E., Ullian, T. y Pritchard, H. W. (2011a). Seeds photoblastism and its relationship with some plant traits in 136 cacti taxa. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 79-88.

Flores, Y., Reyna, T., Cervantes, M. y Luna, C. (2011b). Distribución geográfica y potencial de *Stenocereus pruinosus* y *Stenocereus stellatus*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 56: 4-20.

Forcella, F., Webster, T. y Cardina, J. (2004). Protocolos para la determinación de bancos de semillas de malezas en los agrosistemas. En: Manejo de malezas para países en desarrollo. FAO. Labrada, R. (ed.). 3-21 pp.

Franco-Estrada, D. (2013). Catálogo ilustrado de cactáceas columnares del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Tesis). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México, D.F. 137 pp.

Galloway, F. L. (2001). The effect of maternal and paternal environments on seed characters in the herbaceous plant *Campanula americana* (Campanulaceae). *American Journal of Botany*, 88:832-40.

García M. E. (1973). Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. México, D.F., UNAM. 146 pp.

González, H. O. (2013). Germinación y longevidad de semillas de genotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp.) y pitaya (*Stenocereus* spp). Tesis. Colegio de posgraduados. México. 94 pp.

Goodman, J., Walters, D., Bradley, K., Maschinski, J. y Salazar, A. (2012). Seeds of endangered *Harrisia fragrans* from persistent soil seed Banks withstand orthodox storage conditions. *Haseltonia*, 18: 85-94.

Guillén, S., Casas, A., Terrazas, T., Vega, E. y Martínez-Palacios, A. (2013). Differential survival and growth of wild and cultivated seedlings of columnar cacti: Consequences of domestication. *American Journal of Botany*, 100: 2364-2379.

Guillen, T. A., Espinoza, J. L., Ortega, P. R., Ávila, S., N. y Palacios, E. A. (2014). Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en la germinación y sobrevivencia de *Ferocactus townsendianus* Britt & Rose. *Interciencia*, 39: 732-735.

Hong, T. D. y Ellis, R. H. (1996). A protocol to determine seed storage behavior. International Plant Genetic Resources Institute (IPGR). Rome, Italy. 62 pp.

INAFED (Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal). (2010). Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México, Santiago Chuazumba. En línea. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM20oaxaca/municipios/20459a.html>. Fecha de consulta: 22/08/2017.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2008). Prontuario de información geográfica municipal de Santiago Chazumba, Oaxaca. En línea. Disponible en: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/20/20459.pdf. Fecha de consulta: 20/09/2017.

ISTA (International Seed Testing Association). (1966). International Rules for Seed Testing. *International Seed Testing Association*, 32: 565-589.

Jolly, J. y Lockert, X. (1996). Sowing: germination and substrates. *Cactus Aventures International*, 31: 22–25.

Leishman, M. R., Masters, G. J., Clarke, I. P. y Brown, V. K. (2000). Seed bank dynamics: the role of fungal pathogens and climate change. *Functional Ecology*, 14:293–299.

Luna, C. (2002). La Mixteca Baja y las cactáceas columnares (*Too/Tnu Dichi*). *Revista de Geografía Agrícola*, 32:25-42.

Luna-Morales, C. C. y Aguirre, J. R. (2001). Variación morfológica del fruto y domesticación de *Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxb. y *S. stellatus* (Pfeiff.). Riccob. (Cactaceae) en la Mixteca Baja, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24:213-221.

Marañón, T. (2001). Ecología del banco de semillas y dinámica de comunidades mediterráneas. En: Zamora-Rodríguez, R. y Pugnaire-Iraola, F. I. (eds.), Ecosistemas mediterráneos. Análisis funcional. 153-181 pp.

Mark, K. J. O., Auld, D. T. y Denham, A. (2009). Climate change and bet-hedging: interactions between increased soil temperatures and seed bank persistence. *Global Change Biology*, 15: 2375–2386.

Mauseth, D. J. (2009). Botany. An introduction to Plant Biology. 4th edition. Jones and Bartlett Publishers (ed). E.U.A. 672 pp.

McDonough, W. (1964). Germination responses of *Carnegiea gigantea* and *Lemiarocereus thurberi*. *Ecology*, 45:155-159.

Milberg, P., Andersson, L. y Thompson, K. (2000). Large seeded species are less dependent on light for germination than small seeded ones. *Seed Science Research*, 10: 99-104.

- Muro-Pérez, G., Jurado E., Flores J. y Sánchez-Salas, J. (2015). Effect of seed burial in different soils on the germination of three specially protected cactus species. *The Southwestern Naturalist*, 59:344-348.
- Muschick, M. (2010). The evolution of seed testing. *Seed Testing International*, 138: 3-8.
- Nascimento, B. J. P. y Meiado, V. M. (2016). *In situ* or *ex situ* seed conservation: which is more effective way to maintain seed longevity of an endangered cactus? *Plant Species Biology*, 32: 115-120.
- Nascimento, B. J. P., Vieira, M. D. C. y Meiado, V. M. (2015). *Ex situ* seed conservation of Brazilian Cacti. *Gaia Scientia*, 9: 111-116.
- Nassar, J. M., Hamrick, J. L. y Fleming, T. H. (2001) Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). *Heredity*, 87: 69–79.
- Nei, M. y Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269–5273.
- Nonogaki, H., Bassel, W. G. y Bewley, J. D. (2010). Germination, still a mystery. *Plant Science*, 179: 574-581.
- Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. y Dean, L. A. (1954). Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. Department of Agriculture. Circular 939. U.S. Washington, D. C.
- Ordoñez, C. (2008). Características ecológicas y fisiológicas del banco de semillas de *Polaskia chende*. Tesis. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México, D.F. 126 pp.
- Ordoñez-Salanueva, C. A., Orozco-Segovia, A., Canales-Martínez, M., Seal, C. E., Pritchard, H. W. y Flores-Ortiz, C. M. (2017). Ecological longevity of *Polaskia chende* (Cactaceae) seeds in the soil bank, seedling emergence and survival. *Plant Biology*, 19: 973-982.
- Pakeman, R. J., Small, J. L. y Torvell, L. (2012). Edaphic factors influence the longevity of seeds in the soil. *Plant Ecology*, 213: 57–65.
- Parra, F., Blancas, J. J. y Casas, A. (2012). Landscape management and domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley: human guided selection and gene flow. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8: 32-38.
- Parra, F., Casas, A., Peñaloza-Ramírez, J. M., Cortés-Palomec, A. C., Rocha-Ramírez, V., y González-Rodríguez, A. (2010). Evolution under domestication: ongoing artificial selection and divergence of wild and managed *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) populations in the Tehuacán Valley, México. *Annals of Botany*, 106: 483-496.

- Parra, F., Pérez-Nasser, N., Lira, R., Pérez-Salicrup, D., y Casas, A. (2008). Population genetics and process of domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Arid Environments*, 72: 1997-2010.
- Roberts, H.A. (1981) Seed banks in soils. *Advances in Applied Biology*, 6: 1–55.
- Rojas-Aréchiga, M. y Batis, A. (2001). Las semillas de cactáceas ¿forman bancos en el suelo? *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 46: 76-82.
- Rojas-Aréchiga, M. y Vázquez-Yanes, C. (2000). Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*, 44: 85-104.
- Rojas-Aréchiga, M., Casas, A. y Vázquez-Yañes, C. (2001). Seed germination on wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico. *Journal of Arid Environments*, 49: 279-287.
- Rojas-Aréchiga, M., Orozco-Segovia, A. y Vázquez-Yanes, C. (1997). Effect of light on the germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla Mexico. *Journal of Arid Environments*, 36: 571-578.
- Rojas-Aréchiga, M., Vázquez-Yanes, C. y Orozco-Segovia, A. (1998). Seed response to temperature of two life forms of Mexican cacti species: an ecophysiological interpretation. *Plant Ecology*, 135: 207-214.
- Rosales-Bustamante, E. P., Luna-Morales, C. C. y Cruz-León, A. (2009). Clasificación y selección tradicional de pitaya (*Stenocereus pruinosus* Otto Buxb.) en Tianguistengo, Oaxaca y variación morfológica de cultivares. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15: 75-82.
- Rzedowski, J. (1973). Geographical relationships of the flora of the Mexican dry regions. En: *Vegetation and Vegetational History of Northern Latin America*, A. Graham. (ed.), 61-72 pp.
- Saaed, S., Younas, M. y Barozai, K. (2012) A review of genetic diversity of wild plants using different genetic markers. *Pure and Applied Biology*, 1: 68-71.
- Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T., y Poschlod, P. (2009). The seed bank longevity index revisited: Limited reliability evident from a burial experiment and database analyses. *Annals of Botany*, 104: 715-724.
- Serrano, A., Silva, S. M. M., Cano, G. M. A., Medina, G. G. y Ruiz, C. A. (2005). Estadísticas climatológicas básicas del estado de Oaxaca (período 1961-2003). INIFAP (Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias). Centro de Investigación Regional Pacifico Sur. Campo experimental Valles centrales de Oaxaca. 282 pp.
- Suárez, D. y Melgarejo, L. M. (2010). Biología y germinación de las semillas. En: Melgarejo, L. M. (ed.), *Experimentos en Fisiología Vegetal*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 13-24 pp.

- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M. y Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development*. 6th edition. University of Maryland, USA. 761 pp.
- Thompson, K. (1992). The functional ecology of seed banks. En: Fenner, M. (ed.) *The ecology of regeneration in plant communities*. Wallingford, CAB International. 231–258 pp.
- Thompson, K. (1993). Persistence in soil. En: Hendry, G.A.F.; Grime, J.P. (eds.) *Methods in comparative plant ecology: A laboratory manual*. London, Chapman & Hall. 199–202 pp.
- Thompson, K. y Grime, J. P. (1979). Seasonal variations in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *Journal of Ecology*, 67:893-921.
- Thompson, K., Band, S. R., Hodgson, J. G. (1993). Seed size and shape predict persistence in the soil. *Functional Ecology*, 7: 236–241.
- Thompson, M. L. y Troeh, R. F. (1998). *Los suelos y su fertilidad*. Reverte (ed.). Barcelona, España. 661 pp.
- Tinoco, A., Casas, A., Luna, R. y Oyama, K. (2005). Population genetics of *Escontria chiotilla* in wild and silvicultural managed populations in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 525–538.
- Trejo, L. y Garza, M. (1993). Efecto del tiempo de almacenamiento en la germinación de semillas de *Mammillaria heyderi* Muchl, en 4 sustratos. *Biotam*, 5: 19-24.
- USDA (Soil Survey Staff, Soil conservation service). (1951). *Soil survey manual*, USDA, Handbook No.18. U.S. Govt. Printing Office, Washington, D. C. 47 pp.
- Valadez, M. C. y Kahl, G. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio)*. Mundi Prensa, S. A., Universidad Autónoma de Chapingo. México. 147 pp.
- Valiente-Baunet, A., Arizmendi, M. C., Rojas-Martínez, A. y Domínguez-Canseco, L. (1996). Ecological relationship between columnar cacti and nectar-feeding bats in México. *Journal of Tropical Ecology*, 12: 1-17.
- Vázquez Yanes, C., Orozco, S. A., Rojas, A. M. y Sánchez, C. M. (1997). *La reproducción de las plantas: semillas y meristemas*. Fondo de Cultura Económica. D.F., México. 167 pp.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 23: 4407-4414.
- Walkley, A. y Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37: 29-38.

Yáñez-López M. L., Barbosa-Martínez, C. Serrato-Díaz A. Balderas-Morales, A., Campos-Muñiz, C., Fernández, F. J. y Armella-Villalpando, M. A. (2016). Relaciones genéticas entre variedades de *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) en los estados de Puebla y Oaxaca, México, con madores AFLP. *Agrociencia*, 50: 595-601.

Zimmer, K. y Schultz, K. (1975). Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Keimung von Kakteensaatgut. IX. Zur Veränderung des Temperaturbereichs für die Keimung in Abhängigkeit vom Samenalter. *Gartenbauwissenschaft*, 40: 120-125.

12. ANEXOS

Anexo A. Protocolo de extracción de ADN (Tomado de QIAGEN® y modificado para la extracción en plántulas de cactáceas).

1. Desinfectar las plántulas con tres lavados. El primero en hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 6%, el segundo en agua inyectable y el tercero en etanol al 70%.
2. Colocar cada una de las plántulas desinfectadas en un tubo Eppendorf. Rotular cada tubo de acuerdo al número de muestra.
3. Colocar nitrógeno líquido en cada muestra y macerar con ayuda de un micro pistilo.

Nota: Usar un micro pistilo para cada muestra para evitar contaminación de muestras.

4. Añadir 400 µL de buffer AP1 y de inmediato, colocar 4 µL de RNasa A.

Nota: No mezclar Buffer AP1 y RNasa A antes de usar.

Recomendación: Realizar el paso 3 y 4 lo más rápido posible para evitar que el tejido de la muestra se oxide.

5. Colocar la muestra en un Vórtex durante 1s, repetir de 2 a 3 veces.
6. Incubar la muestra en un Eppendorf Thermomixer® a 65 °C / 30 min. Invertir el tubo cada 10 min.
7. Añadir 130 µL de buffer P3. Pipetear de 3 a 5 veces e incubar en hielo durante 5 min.
8. Centrifugar la muestra a 14,000 rpm / 5 min.
9. Pipetear el lisado a una columna "QIAshredder spin". Centrifugar a 14,000 rpm / 2 min.
10. Transferir con cuidado el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf para no arrastrar el pellet que se formó en la columna "QIAshredder spin".
11. Añadir 1.5 volúmenes de buffer AW1 (600 µL) y mezclar por pipeteo.
12. Trasferir 500 µL de la mezcla en una columna "DNeasy Mini Spin". Centrifugar a 8000 rpm / 1 min. Desechar el sobrenadante y repetir este paso con el sobrante de la mezcla.
13. Poner la columna en un nuevo tubo colector y añadir 500 µL del buffer AW2. Centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
14. Añadir otros 500 µL de buffer AW2. Centrifugar a 14,000 rpm / 2 min.
15. Quitar la columna y colocarla en un nuevo tubo Eppendorf.
16. Añadir 50 µL de buffer AE para elución. Incubar a temperatura ambiente (15-25 °C) / 30 min. Centrifugar a 8000 rpm / 1 min.
17. Repetir el paso anterior.

Nota: Mantener las muestras en refrigeración (4 °C).

Anexo B. Matriz de similitud correspondiente a las muestras de *E. chiotilla*.

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21
E1		0.94	0.94	0.93	0.94	0.92	0.94	0.92	0.91	0.92	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.92	0.91	0.92	0.90	0.92	0.91
E2	0.94		0.94	0.94	0.94	0.93	0.94	0.93	0.91	0.94	0.92	0.91	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91	0.93	0.91	0.93	0.91
E3	0.94	0.94		0.95	0.95	0.93	0.93	0.93	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.91
E4	0.93	0.94	0.95		0.96	0.94	0.93	0.94	0.93	0.93	0.92	0.91	0.93	0.93	0.92	0.92	0.93	0.93	0.91	0.93	0.92
E5	0.94	0.94	0.95	0.96		0.94	0.94	0.93	0.93	0.93	0.92	0.93	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.91	0.93	0.91
E6	0.92	0.93	0.93	0.94	0.94		0.93	0.93	0.92	0.92	0.92	0.91	0.93	0.92	0.91	0.92	0.91	0.92	0.90	0.91	0.91
E7	0.94	0.94	0.93	0.93	0.94	0.93		0.94	0.93	0.93	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.91
E8	0.92	0.93	0.93	0.94	0.93	0.93	0.94		0.94	0.93	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
E9	0.91	0.91	0.92	0.93	0.93	0.92	0.93	0.94		0.93	0.93	0.92	0.93	0.92	0.92	0.91	0.93	0.91	0.91	0.92	0.92
E10	0.92	0.94	0.92	0.93	0.93	0.92	0.93	0.93	0.93		0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.92	0.91
E11	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.92	0.92	0.92	0.93	0.92		0.93	0.93	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93
E12	0.91	0.91	0.92	0.91	0.92	0.91	0.92	0.91	0.92	0.92	0.93		0.92	0.94	0.93	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.91
E13	0.91	0.92	0.92	0.93	0.93	0.93	0.92	0.92	0.93	0.92	0.93	0.92		0.93	0.93	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91
E14	0.92	0.92	0.93	0.93	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.94	0.93		0.95	0.93	0.93	0.92	0.92	0.92	0.92
E15	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.93	0.95		0.93	0.93	0.92	0.91	0.92	0.91
E16	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.93	0.93		0.94	0.93	0.92	0.92	0.91
E17	0.91	0.91	0.92	0.93	0.92	0.91	0.92	0.92	0.93	0.91	0.92	0.92	0.92	0.93	0.93	0.94		0.93	0.93	0.92	0.92
E18	0.92	0.93	0.92	0.93	0.93	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.93		0.91	0.92	0.91
E19	0.90	0.91	0.92	0.91	0.91	0.90	0.91	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.92	0.93	0.91		0.92	0.91
E20	0.92	0.93	0.93	0.93	0.93	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.93	0.92	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92		0.92
E21	0.91	0.91	0.91	0.92	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.91	0.92

Anexo C. Matriz de similitud correspondiente a las muestras de *S. pruinosus*.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21
P1		0.91	0.92	0.91	0.89	0.89	0.90	0.89	0.90	0.92	0.90	0.90	0.90	0.90	0.92	0.89	0.90	0.90	0.90	0.91	0.89
P2	0.91		0.93	0.91	0.91	0.90	0.91	0.91	0.90	0.92	0.90	0.90	0.91	0.90	0.93	0.90	0.91	0.91	0.90	0.92	0.89
P3	0.92	0.93		0.92	0.91	0.90	0.91	0.90	0.92	0.91	0.89	0.91	0.91	0.91	0.92	0.91	0.91	0.92	0.91	0.92	0.90
P4	0.91	0.91	0.92		0.90	0.91	0.91	0.90	0.91	0.93	0.92	0.90	0.93	0.92	0.93	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.90
P5	0.89	0.91	0.91	0.90		0.90	0.91	0.89	0.90	0.91	0.88	0.89	0.90	0.89	0.91	0.90	0.89	0.90	0.90	0.91	0.90
P6	0.89	0.90	0.90	0.91	0.90		0.91	0.88	0.91	0.91	0.91	0.90	0.92	0.90	0.91	0.92	0.90	0.91	0.90	0.92	0.90
P7	0.90	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91		0.89	0.90	0.91	0.91	0.91	0.91	0.90	0.93	0.91	0.90	0.90	0.92	0.91	0.91
P8	0.89	0.91	0.90	0.90	0.89	0.88	0.89		0.89	0.90	0.90	0.89	0.89	0.89	0.90	0.88	0.89	0.89	0.89	0.90	0.89
P9	0.90	0.90	0.92	0.91	0.90	0.91	0.90	0.89		0.91	0.90	0.90	0.91	0.90	0.91	0.90	0.91	0.91	0.90	0.92	0.90
P10	0.92	0.92	0.91	0.93	0.91	0.91	0.91	0.90	0.91		0.92	0.90	0.92	0.91	0.93	0.93	0.91	0.92	0.92	0.94	0.92
P11	0.90	0.90	0.89	0.92	0.88	0.91	0.91	0.90	0.90	0.92		0.90	0.92	0.90	0.92	0.91	0.90	0.91	0.92	0.92	0.90
P12	0.90	0.90	0.91	0.90	0.89	0.90	0.91	0.89	0.90	0.90	0.90		0.92	0.91	0.92	0.91	0.88	0.91	0.90	0.92	0.90
P13	0.90	0.91	0.91	0.93	0.90	0.92	0.91	0.89	0.91	0.92	0.92	0.92		0.93	0.93	0.92	0.90	0.92	0.92	0.93	0.91
P14	0.90	0.90	0.91	0.92	0.89	0.90	0.90	0.89	0.90	0.91	0.90	0.91	0.93		0.92	0.92	0.90	0.92	0.91	0.92	0.91
P15	0.92	0.93	0.92	0.93	0.91	0.91	0.93	0.90	0.91	0.93	0.92	0.92	0.93	0.92		0.93	0.92	0.92	0.92	0.93	0.93
P16	0.89	0.90	0.91	0.91	0.90	0.92	0.91	0.88	0.90	0.93	0.91	0.91	0.92	0.92	0.93		0.90	0.93	0.91	0.93	0.91
P17	0.90	0.91	0.91	0.91	0.89	0.90	0.90	0.89	0.91	0.91	0.90	0.88	0.90	0.90	0.92	0.90		0.91	0.92	0.93	0.91
P18	0.90	0.91	0.92	0.92	0.90	0.91	0.90	0.89	0.91	0.92	0.91	0.91	0.92	0.92	0.92	0.93	0.91		0.92	0.92	0.91
P19	0.90	0.90	0.91	0.92	0.90	0.90	0.92	0.89	0.90	0.92	0.92	0.90	0.92	0.91	0.92	0.91	0.92	0.92		0.92	0.92
P20	0.91	0.92	0.92	0.92	0.91	0.92	0.91	0.90	0.92	0.94	0.92	0.92	0.93	0.92	0.93	0.93	0.93	0.92	0.92		0.92
P21	0.89	0.89	0.90	0.90	0.90	0.90	0.91	0.89	0.90	0.92	0.90	0.90	0.91	0.91	0.93	0.91	0.91	0.91	0.92	0.92	



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00165

Matrícula: 2153803959

Variabilidad genética y viabilidad de semillas de *Escontria chiotilla* y *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) conservadas *ex situ* y enterradas *in situ* en un matorral xerófilo en el Valle de Tehuacán.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 5 del mes de enero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ
DRA. ALMA DELFINA LUCIA OROZCO SEGOVIA
DR. JUAN MANUEL VILLA HERNANDEZ
DR. JOSE ALEJANDRO ZAVALA HURTADO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA

DE: DAVID ALEJANDRO GUZMAN HERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

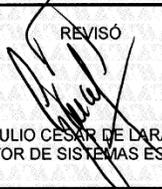
APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



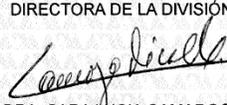
DAVID ALEJANDRO GUZMAN HERNANDEZ
ALUMNO

REVISÓ



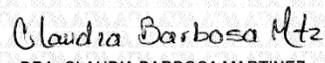
LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



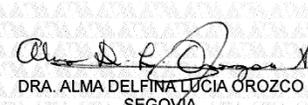
DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



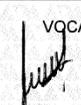
DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ

VOCAL



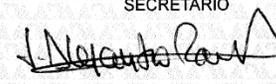
DRA. ALMA DELFINA LUCÍA OROZCO SEGOVIA

VOCAL



DR. JUAN MANUEL VILLA HERNANDEZ

SECRETARIO



DR. JOSE ALEJANDRO ZAVALA HURTADO