



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CULTIVO *in vitro* DE YOLOXÓCHITL
(*Magnolia mexicana* DC.)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS ARGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

LILIA DANAÉ ARTEAGA RÍOS

COMITÉ DE TUTORES:

Dr. Jaime Mejía Carranza. Tutor académico.

Dr. José Luis Piña Escutia. Tutor adjunto.

Dr. Justino Gerardo González Díaz. Tutor adjunto.

Centro Universitario Tenancingo, Estado de México. Mayo 2019



RESÚMEN

La *Magnolia mexicana*, es una especie de importancia ecológica, medicinal e histórica, amenazada de extinción de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido a la pérdida de su hábitat, la tala clandestina y la dificultad reportada para propagarla por semilla; sumado a esto, la reciente reclasificación a nuevas especies a partir de lo que se consideraba una sola, ha significado la reducción de su área de distribución a Veracruz, Oaxaca y Puebla, con interrogantes a los límites de su distribución debido a la presencia de ejemplares posiblemente de la misma especie en el Estado de México, que tendrían relación además por sus antecedentes históricos. Así, a fin de ayudar a dar claridad sobre los alcances de su ámbito de ocurrencia, y contribuir a la resolución de sus problemas de propagación, este estudio tuvo como objetivos: 1) establecer las relaciones moleculares existentes entre dos individuos de *Magnolia* sp. presentes en Malinalco y Zumpahuacán, Estado de México, con individuos de poblaciones de *M. mexicana* en Zongolica, Veracruz con el empleo de RAPDs; y 2) probar diferentes explantes y medios de cultivo para la propagación *in vitro* de la especie. En el análisis molecular se utilizó el método CTAB para la extracción de ADN, que se amplificó mediante PCR con 14 cebadores RAPD; las relaciones moleculares entre las muestras se evaluaron estadísticamente con el método de agrupación Neighbour Joining, índice de similitud Dice y remuestreo de 1,000 corridas, esta metodología permitió discriminar entre las muestras de *Magnolia* spp. analizadas, con un PIC promedio de 0.30 que lo catalogaría como altamente informativo, con los cebadores OPA7, OPA8 y E18 con la mayor capacidad discriminante; las evidencias moleculares, contrastadas con datos morfológicos permitieron determinar que los ejemplares de Yoloxóchitl de Veracruz, Zumpahuacán y Malinalco, pertenecen al género *Magnolia* sección *Talauma*; pero no fueron suficientes para asegurar que se tratara de la misma especie. En cuanto al cultivo *in vitro* se probaron siete diferentes métodos de desinfección en yemas axilares, se evaluó la efectividad de agentes inhibidores de fenoles (AIF), y la respuesta de yemas axilares a cuatro diferentes medios de cultivo, y se analizó la respuesta de distintos tejidos (vegetativos, florales y seminales) a diferentes combinaciones hormonales. Así, se encontró que el tratamiento con NaClO 20% (v/v), plata ionizada y 5 g/l de Terbinafina logró controlar la contaminación del 76% de explantes ($p < 0.05$); sin embargo, no se logró determinar un AIF adecuado para tratar los explantes de *M. mexicana* en cultivo *in vitro*. También, se observó que una concentración de 0.5 mg/l de bencilaminopurina (BAP) en medio Murashigue-Skoog (MS) fue suficiente para la formación de brotes a partir de yemas axilares de Yoloxóchitl y la presencia de ácido naftalén acético (ANA) en el medio de cultivo a una concentración de 0.25 g/l promovió la formación de callo en este mismo tipo de explante; de la misma forma, la auxina sintética 2.4-D a una concentración de 3 mg/l adicionada con 1 mg/l de BAP, mostró ser útil en la inducción de callo en distintos tipos de explantes. Con este estudio, se dan avances hacia la creación de un protocolo para la micropropagación de *M. mexicana*, y queda abierta la posibilidad de que las magnolias de Malinalco y Zumpahuacán sean especies diferentes a *M. mexicana*.

ABSTRACT

The *Magnolia mexicana* is a species of ecological, medicinal and historical importance, threatened with extinction in accordance with NOM-059-SEMARNAT-2010, due to the loss of its habitat, clandestine logging and the reported difficulty in propagating it by seed; added to this, the recent reclassification to new species from what was considered a single, has involved the reduction of its area of distribution to Veracruz, Oaxaca and Puebla, with questions to the limits of its distribution due to the presence of specimens possibly of the same species in the State of Mexico, which would also be related to their historical background. Thus, in order to help to clarify the scope of its occurrence, and contribute to the resolution of its propagation problems, this study had as objectives: 1) to establish the molecular relationships between two individuals of *Magnolia* sp. present in Malinalco and Zumpahuacán, State of Mexico, with individuals from populations of *M. mexicana* in Zongolica, Veracruz with the use of RAPDs; and 2) test different explants and culture media for the *in vitro* propagation of the species. In the molecular analysis the CTAB method was used for DNA extraction, which was amplified by PCR with 14 RAPD primers; the molecular relationships between the samples were statistically evaluated with the Neighbor Joining method, similarity index Dice and resampling of 1,000 runs, this methodology allowed to discriminate between the samples of *Magnolia* spp. analyzed, with an average PIC of 0.30 that would classify it as highly informative, with the primers OPA7, OPA8 and E18 with the highest discriminant capacity; the molecular evidences, contrasted with morphological data allowed to determine that the Yoloxóchitl of Veracruz, Zumpahuacán and Malinalco, belong to the genus *Magnolia*, Talauma section; but they were not enough to ensure that it was the same species. Regarding *in vitro* culture, seven different disinfection methods were tested in axillary buds, the effectiveness of phenol inhibitors (AIF) was evaluated, and the response of axillary buds to four different culture media, and the response of different tissues (vegetative, floral and seminal) to different hormonal combinations. Thus, it was found that the treatment with NaClO 20% (v/v), ionized silver 3.5 ml/l and 5 g/l of Terbinafina managed to control the contamination of 76% of explants ($p < 0.05$); however, it was not possible to determine an adequate AIF to treat explants of *M. mexicana* in *in vitro* culture. Also, it was observed that a concentration of 0.5 mg/l of bencilaminopurine (BAP) in Murashigue-Skoog medium (MS) was sufficient for the formation of shoots from Yoloxóchitl axillary buds and the presence of naftalen acetic adic (NAA) in the culture medium at a concentration of 0.25 g/l promoted callus formation in this same type of explant; in the same way, the synthetic auxin 2.4-D at a concentration of 3 mg/l added with 1mg/l of BAP, proved to be useful in the induction of callus in different types of explants. With this study, advances are made towards the creation of a protocol for the micropropagation of *M. mexicana*, and the possibility remains that the magnolias of Malinalco and Zumpahuacán are different species from *M. mexicana*.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESÚMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	XII
ÍNDICE DE ANEXOS	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. EL YOLOXÓCHITL.....	3
2.1.1. <i>Descripción de la especie.</i>	4
2.1.2. <i>Distribución.</i>	9
2.1.3. <i>Hábitat y ecología.</i>	12
2.1.4. <i>Importancia.</i>	13
2.1.4.1. <i>Importancia medicinal.</i>	13
2.1.4.2. <i>Importancia por su aprovechamiento maderable.</i>	15
2.1.4.3. <i>Importancia por su uso potencial.</i>	15
2.1.4.4. <i>Importancia histórica.</i>	16
2.1.5. <i>Estatus de conservación.</i>	22
2.1.6. <i>Propagación.</i>	23
2.1.6.1. <i>Propagación por semilla.</i>	23
2.1.6.2. <i>Micropropagación.</i>	25
2.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.	25
2.2.1. <i>Tipos de marcadores moleculares.</i>	27
2.2.1.1. <i>Marcadores de ADN.</i>	27
2.2.2. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</i>	28
2.2.3. <i>Polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD).</i>	32
2.2.3.1. <i>Ventajas, desventajas y uso de los marcadores RAPD.</i>	33
2.2.4. <i>Estudios moleculares en Magnolias.</i>	34
2.3. CULTIVO IN VITRO.	38
2.3.1. <i>Etapas del proceso de micropropagación.</i>	39
2.3.2. <i>El explante.</i>	41
2.3.3. <i>Asepsia.</i>	42
2.3.4. <i>Control de oxidación y oscurecimiento de explantes.</i>	43
2.3.5. <i>Control de condiciones ambientales.</i>	45
2.3.5. <i>Medios de cultivo.</i>	45
2.3.6. <i>Reguladores de crecimiento (RCs).</i>	46
2.3.7. <i>Respuestas morfogénicas.</i>	47

2.3.7.1. Organogénesis.	47
2.3.7.1. Embriogénesis somática.....	48
2.3.9. Ventajas del cultivo <i>in vitro</i>	48
2.3.10. La micropropagación de magnolias.	49
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	55
4. JUSTIFICACIÓN.	56
5. HIPÓTESIS.	57
6. OBJETIVOS GENERALES.....	57
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	57
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
8.1. LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE EXPERIMENTACIÓN.	58
8.2. SITIOS DE COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL.	59
8.3. REGISTRO DE DATOS MORFOLÓGICOS DE LOS EJEMPLARES.	62
8.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.	62
8.4.1. Extracción y análisis de integridad de ADN.	62
8.4.2. Reacción de PCR.....	63
8.4.3. Separación de los productos de PCR.	63
8.4.4. Análisis estadístico.....	65
8.4.4.1. Análisis de la eficiencia de los cebadores RAPD.....	65
8.4.4.2. Construcción de dendrogramas.....	67
8.5. CULTIVO <i>IN VITRO</i>.	68
8.5.1. Colecta del material vegetal.....	68
8.5.2. Montaje de los experimentos.	70
8.5.2.1. Etapa 1: establecimiento de estacas y germinación de semillas.	70
8.5.2.2. Etapas 2 y 3: micropropagación.	72
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
9.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.	82
9.1.1. Efectividad de los cebadores RAPD.	82
9.1.2. Relaciones genéticas entre las muestras de <i>Magnolia</i> sp.	85
9.1.3. Datos morfológicos de los árboles de Yoloxóchitl.	90
9.2. CULTIVO <i>IN VITRO</i>.	98
9.2.1. Etapa 1: establecimiento de estacas y germinación de semillas.	98
9.2.1.1. Establecimiento de varetas.....	98
9.2.1.2. Germinación de semillas.....	103
9.2.2. Etapa 2: Establecimiento del método de desinfección para <i>M. mexicana</i> ...	110
9.2.3. Etapa 3: Ensayos para la micropropagación de <i>M. mexicana</i>	116
9.2.3.1. Experimento 1. Efectividad de agentes inhibidores de fenoles (AIFs)..	116
9.2.3.2. Experimento 2. Inducción de organogénesis en yemas apicales.	120
9.2.3.3. Ensayos exploratorios.....	131
9.3. ENVÍO DE MANUSCRITO.	136

10. CONCLUSIONES.....	136
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
12. ANEXOS.....	158

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Vista general de un árbol de Yoloxóchitl (<i>Magnolia mexicana</i>), en Zongolica, Veracruz: a) acercamiento del fuste y copa, b) vista panorámica del fuste y copa.	5
Figura 2. Hojas y partes florales de <i>M. mexicana</i> : a) dos hojas, se aprecia forma oblonga-elíptica, b) flor, c) botón floral, d) detalle de coloración púrpura en fragmento de pétalo, e) gineceo estipitado, los estambres ya se han desprendido de la base, f) estambres laminados, alargados, ditécicos.	6
Figura 3. Fruto y semillas de <i>M. mexicana</i> : a) fruto leñoso multifolículo, b) detalle de los carpelos del multifolículo, c) fruto abierto con semillas al interior, d) racimo de semillas, e) aspecto de las semillas luego de retirarse la sarcotesta roja, se observa la testa dura color negro, f) embrión extraído, en vista lateral, y g) embrión extraído en vista dorsal.	8
Figura 4. Distribución más actualizada de <i>Magnolia mexicana</i> , tomado de Vázquez-García, et al. (2013a), con modificaciones.	9
Figura 5. Árboles de Yoloxóchitl, a) en el atrio de la iglesia de Zumpahuacán, b) en un predio particular en Malinalco y en el convento agustino del siglo XVI en mural (c) con detalle (d), los círculos rojos delimitan la representación de la flor y el fruto.	11
Figura 6. Yoloxóchitl representado en los códices a) de la Cruz-Badiano (1552), folio 54 (planta con flores blancas a la izquierda) y b) en el Códice Florentino (1577) página 340 del libro XI “De las cosas naturales”, folio 188 (recuadro superior izquierdo).	17
Figura 7. Yoloxóchitl como está representado en la Historia natural de la Nueva España (Tomo III, capítulo XX, página 40).	18
Figura 8. Ilustración del Yoloxóchitl de principios del s. XIX, del trabajo de Sessé y Mociño.	19
Figura 9. Detalle del libro <i>Regni vegetabilis systema naturale</i> , a) portada y b) página 451 en donde aparece por primera vez el Yoloxóchitl con su nombre botánico en latín.	20
Figura 10. Detalle del Códice Durán, donde se relata la creación del primer jardín botánico de América (Tomo 1, capítulo XXXI), en rojo párrafo donde se menciona el Yoloxóchitl.	21
Figura 11. Mapa de ubicación de los sitios de colecta las comunidades Acontla, La Quinta y Atempa, pertenecientes al Municipio de Zongolica en Veracruz (con imágenes de INEGI © y Google Earth©, 2018).	60

- Figura 12.** Mapa de ubicación los sitios de colecta en los municipios de Malinalco, Zumpahuacán y Tenancingo, en el Estado de México (con imágenes de INEGI © y Google Earth©, 2018). 61
- Figura 13.** Colecta de varetas: a) corte de ramas de madera semi-dura con tijeras de poda convencionales, b) resguardo de las varetas durante las labores de colecta, c) aspecto de la vareta una vez colectada. 69
- Figura 14.** Obtención de semillas de *M. mexicana*: a) frutos maduros recién colectados, b) aspecto de los frutos en el momento de apertura y c) aspecto de las semillas aún adheridas al eje del fruto. 69
- Figura 15.** Montaje del ensayo con varetas: a) aspecto exterior del invernadero donde se estableció el experimento, y b) acomodo de varetas al interior del invernadero. 71
- Figura 16.** Dendrograma de 18 muestras de *Magnolia* spp., obtenido a partir del análisis con 14 cebadores RAPD por el método Neighbour Joining, con 1000 remuestreos y distancia genética de Dice. 87
- Figura 17.** Dendrograma radial de 18 muestras de *Magnolia* spp., obtenido a partir del análisis con 14 cebadores RAPD por el método Neighbour Joining, con 1000 remuestreos y distancia genética de Dice. 88
- Figura 18.** Dendrograma de 10 muestras de *M. mexicana* de Veracruz y 2 muestras de *Magnolia* sp., obtenido a partir del análisis con 14 cebadores RAPD por el método Neighbour Joining, con 1000 remuestreos y distancia genética de Dice. 89
- Figura 19.** Comparación de algunas características morfológicas de los árboles de Yoloxóchitl de Zongolica, Zumpahuacán y Malinalco: a) haz y envés de hojas b) flor y c) fruto. 95
- Figura 20.** Frutos de un árbol de Yoloxóchitl en Malinalco, a) fruto inmaduro y b) maduro, en donde se observan las semillas que no variaron en tamaño y c) semillas extraídas del fruto inmaduro en donde se observa la sarcotesta y testa bien formadas. 97
- Figura 21.** Aspecto de las varetas después de casi 40 días de experimentación: a) última sobreviviente del tratamiento AIB 0.15 y b) estacas que fueron extraídas y dadas por muertas, todas muestran tejido necrótico en la base. En ninguna se observó la formación de callo. 99
- Figura 22.** Supervivencia a través del tiempo de las varetas de *M. mexicana*. 100
- Figura 23.** Tasa de germinación de las semillas de *M. mexicana* sembradas sin sarcotesta, la línea roja punteada señala el 50 % de germinación. 104

- Figura 24.** a) Después de dos meses emergió la primera plántula de *M. mexicana*; b) diez meses después de la siembra se transfirieron las plántulas a macetas individuales. 105
- Figura 25.** Comparación de ocho tratamientos de desinfección para *M. mexicana*: a) el porcentaje de explantes contaminados con el tratamiento Erbitrax-T fue significativamente diferente; b) el tratamiento con NCIO al 5% mostró la menor oxidación y c) el tratamiento con Aponistan V tuvo la mayor mortalidad de explantes. Barras de error son desviación estándar; letras distintas son significativamente diferentes con $p < 0.05$. 111
- Figura 26.** Respuesta de yemas apicales de *M. mexicana* a cuatro distintos medios de cultivo: a) oxidación de los explantes, b) viabilidad del tejido para proporcionar una posible respuesta, c) contaminación, y d) respuesta visible del explante al tratamiento. 122
- Figura 27.** Respuesta de yemas apicales de *M. mexicana* al medio de cultivo: a) yema establecida en el tratamiento M3 (0.5 BAP) a los 67 días, y b) a los 103 días, se observó la presencia evidente de brotes ya formados. 124
- Figura 28.** Formación de callo como respuesta de una yema apical de *M. mexicana* al medio de cultivo con el tratamiento M2 (0.25 BAP + 0.25 ANA) a los 136 días. 126
- Figura 29.** Respuesta de yemas apicales de *M. mexicana* al tratamiento M4 (0.5 BAP + 0.25 ANA): a) el círculo rojo encierra un callo formado en la base del explante, b) corte histológico longitudinal del callo formado (2.5x), en rojo centro meristemoide, c) acercamiento a centro meristemoide (20x, contraste de fases) y, d) presencia de taninos en el tejido del explante (20x). 128
- Figura 30.** Respuesta de yemas apicales de *M. mexicana* al tratamiento M4 (0.5 BAP + 0.25 ANA): a) el círculo rojo encierra un par de protuberancias formadas en la base de la yema, b y c) corte histológico transversal de las protuberancias formadas (10x), y d) centro meristemoide en la base de la protuberancia (rodeado en rojo) (20x). 130
- Figura 31.** Oxidación en diferentes tipos de explantes de *M. mexicana*, a) yema axilar, b) yema apical, c) sección de ovario y d) tallo. 132
- Figura 32.** Respuesta de diferentes explantes de *M. mexicana* a la acción del medio nutritivo adicionado con 3 mg/l 2.4 D + 1mg/l BAP: a) semilla inadura, b) embrión, c) hoja, d-g) tallo, h) yema apical, e i) raíz. 134

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación botánica del Yoloxóchitl.	4
Cuadro 2. Características de los marcadores de ADN de uso más común.	29
Cuadro 3. Estudios moleculares realizados en especies de la familia Magnoliaceae.	36
Cuadro 4. Estudios realizados sobre la micropropagación de diversas especies de magnolias.	51
Cuadro 5. Secuencias de los iniciadores RAPD utilizados en la amplificación del ADN de 18 muestras de <i>Magnolia</i> spp.	64
Cuadro 6. Clave, especie y origen de muestras de ADN de <i>Magnolia</i> spp., utilizadas en el estudio.	64
Cuadro 7. Métodos de desinfección probados para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. mexicana</i> .	74
Cuadro 8. Tratamientos con tres agentes inhibidores de fenoles y condiciones de oscuridad probados en el establecimiento <i>in vitro</i> de yemas apicales de <i>M. mexicana</i> .	75
Cuadro 9. Composición de cuatro diferentes medios de cultivo para la activación de yemas axilares de <i>M. mexicana</i> .	77
Cuadro 10. Listado de los ensayos exploratorios realizados sobre la respuesta de diversos tipos de explantes de <i>Magnolia mexicana</i> a diferentes medios de cultivo.	79
Cuadro 11. Análisis general de 14 cebadores RAPD utilizados en 18 accesiones de <i>Magnolia</i> spp.	82
Cuadro 12. Características descriptivas de los cebadores RAPD utilizados.	83
Cuadro 13. Caracteres morfológicos observados de los ejemplares de Yoloxóchitl del Estado de México y Veracruz.	94

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Relación de las especies del género <i>Magnolia</i> presentes en México, con énfasis en la sección a la que pertenecen, distribución, estatus de conservación y referencia de donde se obtuvo la información.	159
ANEXO 2. Mapa de distribución de las especies del género <i>Magnolia</i> de la sección Talauma descritas para México.	
ANEXO 3. Caracteres morfológicos de las tres especies de magnolia utilizadas en la caracterización molecular del Yoloxóchitl.	163
ANEXO 4. Protocolo para la extracción de ADN en plantas con alto contenido de fenoles (Silva-Rojas et al., 2015).	164
ANEXO 5. Geles de electroforesis obtenidos con cebadores RAPD en 18 muestras de ADN de <i>Magnolia spp.</i>	166
Anexo 5.1. Gel de electroforesis del cebador OPA6 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	166
Anexo 5.2. Gel de electroforesis del cebador OPA7 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	167
Anexo 5.3. Gel de electroforesis del cebador OPA8 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	168
Anexo 5.4. Gel de electroforesis del cebador OPA10 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	169
Anexo 5.5. Gel de electroforesis del cebador OPA13 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	170
Anexo 5.6. Gel de electroforesis del cebador OPA15 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	171
Anexo 5.7. Gel de electroforesis del cebador OPA16 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	172
Anexo 5.8. Gel de electroforesis del cebador OPB1 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	173
Anexo 5.9. Gel de electroforesis del cebador OPB3 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	174
Anexo 5.10. Gel de electroforesis del cebador OPB10 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	175

Anexo 5.11. Gel de electroforesis del cebador OPB17 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	176
Anexo 5.12. Gel de electroforesis del cebador OPB19 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	177
Anexo 5.13. Gel de electroforesis del cebador E18 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	178
Anexo 5.14. Gel de electroforesis del cebador C08 en 18 muestras de <i>Magnolia spp.</i>	179
ANEXO 6. Manuscrito enviado para su revisión y posible publicación en la revista POLIBOTÁNICA	180

1. INTRODUCCIÓN.

Las magnolias son un grupo de árboles y arbustos apreciados por la belleza de sus flores, calidad de su madera y atributos fármaco-químicos, del que existe divergencia de opiniones respecto a su taxonomía, filogenia e historia evolutiva (Callaway, 1994; Vazquez-García et al., 2012a; Vazquez-García et al., 2013a). Representan uno de los grupos de plantas con flores más primitivos, con numerosos registros fósiles y representantes en América, Europa y Asia, que han sido de interés para estudios evolutivos, biogeográficos y paleoclimáticos (Hebda e Irving, 2004; Figlar y Nootboom, 2004; Nie et al., 2008) así como genéticos, poblacionales, de propagación, , calidad maderable, farmacológicos, alimenticios, entre otros (Kim y Suh, 2013; Wojtania, Skrzypek y Gabryszewska, 2015; Jacobo-Pereira, Romo-Campos y Flores, 2016; Sánchez-Velásquez, Pineda-López, Vázquez-Morales y Avendaño-Yáñez, 2016).

En México, el estudio de las magnolias ha dado como resultado la descripción de nuevas especies en los últimos 20 años, al pasar de diez en 1994 a más de 40 en la actualidad, la mayoría de ellas endémicas y con serias amenazas a su permanencia (Vázquez-García, 1994; Vázquez-García, De Castro-Arce, Pérez-Farrera, Véliz-Pérez y Muñiz-Castro, 2014; Rivers, Beech, Murphy y Oldfield, 2016a); para muchas de las cuales no existe aún información suficiente que permita delimitar de forma precisa su área de distribución, su biología y ecología (Rivers et al., 2016a) por lo que se requiere de un esfuerzo investigativo importante que permita salvaguardar los elementos que constituyen la enorme riqueza biológica de nuestro país sobre la cual se amalgama su historia, cultura y actividades económicas.

El presente trabajo pretende sumar al estudio de las magnolias de México, a través del acercamiento al Yoloxóchitl ó *Magnolia mexicana*, que es una de las especies más enigmáticas del grupo, en el sentido de su relevancia y vacíos históricos, de sus potenciales usos y sobre todo, del enmascaramiento de especies a causa del uso extendido de su nombre común (Wayzel, 2002) y de fallas en la identificación taxonómica precisa a través de caracteres morfológicos; esto último evidenciado en las más de 10 especies de magnolias mesoamericanas que se han descrito en la última década, que se consideraban esta especie, que se creía con amplia distribución (Vazquez-García, Castro-Arce, Muñiz-Castro y Cházaro-Basañez, 2012b; Vazquez-García et al., 2013b), para resolver esta problemática, se ha discutido que los marcadores moleculares podrían ofrecer más y mejor información sobre los caracteres morfológicos para el estudio de relaciones filogenéticas entre organismos, variación dentro de poblaciones, así como de adaptaciones ecológicas (Rentarúa, 2007).

Por otra parte, existen reportes sobre la dificultad de la especie para ser propagada por semilla (Osuna; 1997; Osuna, Juárez, Brechú y Laguna, 2000), condición que es común al género *Magnolia* (Vásquez-Morales y Sánchez Velásquez, 2011; Jacobo-Pereira et al., 2016), dificultad que se ha superado a través del uso de la tecnología de cultivo *in vitro* (Parris, Touchell, Ranney y Adelberg, 2012; Sokolov, Atanassova e Iakimova, 2014), que se basa en el principio de totipotencia de las células vegetales (Calva y Pérez, 2005) para la producción masiva de plantas a partir de partes seccionadas muy pequeñas, tejidos ó células, establecidos de forma aséptica y con control estricto de las condiciones ambientales y de nutrición (Hartmann y Kester, 1995); que además es útil en estudios de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines, para la bioconversión y producción de

compuestos, inducir variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos, conservación e intercambio de germoplasma, entre otras posibilidades (Mroginski y Roca, 1991).

Así, en el presente estudio se emplearon herramientas moleculares enfocadas a esclarecer la identidad de algunos ejemplares que suponen interrogantes en cuanto a la distribución e historia de *M. mexicana*; al mismo tiempo que, auxiliados de la biotecnología *in vitro* y desde una perspectiva conservacionista, se incursionó en su propagación como pequeña aportación al futuro incremento de sus poblaciones.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. El Yoloxóchitl.

De acuerdo con la ficha técnica emitida por la Union Internacional para la Conservación de la Naturaleza UICN (Rivers, Martínez-Salas y Samain, 2016b), complementada con datos de Figlar y Nootboom (2004), el Yoloxóchitl se clasifica como se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación botánica del Yoloxóchitl.

Categoría	Nombre
Reino:	Plantae
Phylum	Tracheophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden:	Magolinae Takht.
Orden:	Magnoliales Juss. ex Bercht. & J. Presl.
Familia:	Magnoliaceae Juss.
Subfamilia:	Magnolioideae
Género:	<i>Magnolia</i> L. (1753)
Sección:	Talauma Baill. (1866)
Subsección:	Talauma Juss. (1789)
Especie:	<i>Magnolia mexicana</i> (DC.) Sin. <i>Talauma mexicana</i> (DC.) G. Don.

2.1.1. Descripción de la especie.

Se trata de árboles de hoja perene, con una altura que ronda los 30 m y un diámetro de tronco a la altura del pecho de hasta 1.30 m; sus hojas (12 - 22.4 cm de largo x 4 - 12.7 cm de ancho) de peciolo largo (5.2 - 7.8 cm) se acomodan de forma alterna, tienen borde simple, forma oblonga o elíptica con la base aguda y la punta aguda u obtusa, son glabras y lustrosas con venación reticulada y prominente (Stanley y Steyermark, 1946; Hernández-Cerda, 1980; Vázquez-García et al., 2012b) (Figuras 1 y 2).

Es una especie monoica, sus flores poseen una esencia dulce, son actinomorfas, solitarias, pediceladas, terminales o axilares; el perianto con sépalos (tres) y pétalos (seis, abruptamente estrechados en la base) apenas diferenciados, de color cremoso y

consistencia coriácea, algunas veces teñidos de púrpura (Figura 2). Los estambres numerosos (120 - 178), libres, de forma laminar alargada (1.3 - 1.5 cm), hipogíneos, dispuestos en espiral sobre el eje floral; con el filamento muy poco diferenciado de las anteras ditécicas, introrsas, con dehiscencia longitudinal. El gineceo es estipitado, aparentemente sésil previo a la fase de antesis ya que está contiguo a los estambres que se agrupan apretadamente debajo; posee numerosos pistilos pubescentes o glabros, con acomodo espiral sobre el eje floral; los ovarios son unicarpelares, uniloculares con dos óvulos anátropos y de placentación parietal (Hernández-Cerda, 1980; Vázquez-García et al., 2012a; Vázquez-García et al., 2013b; Vázquez-García, Pérez-Farrera, Martínez-Camilo, Muñiz-Castro y Martínez-Meléndez, 2013c).

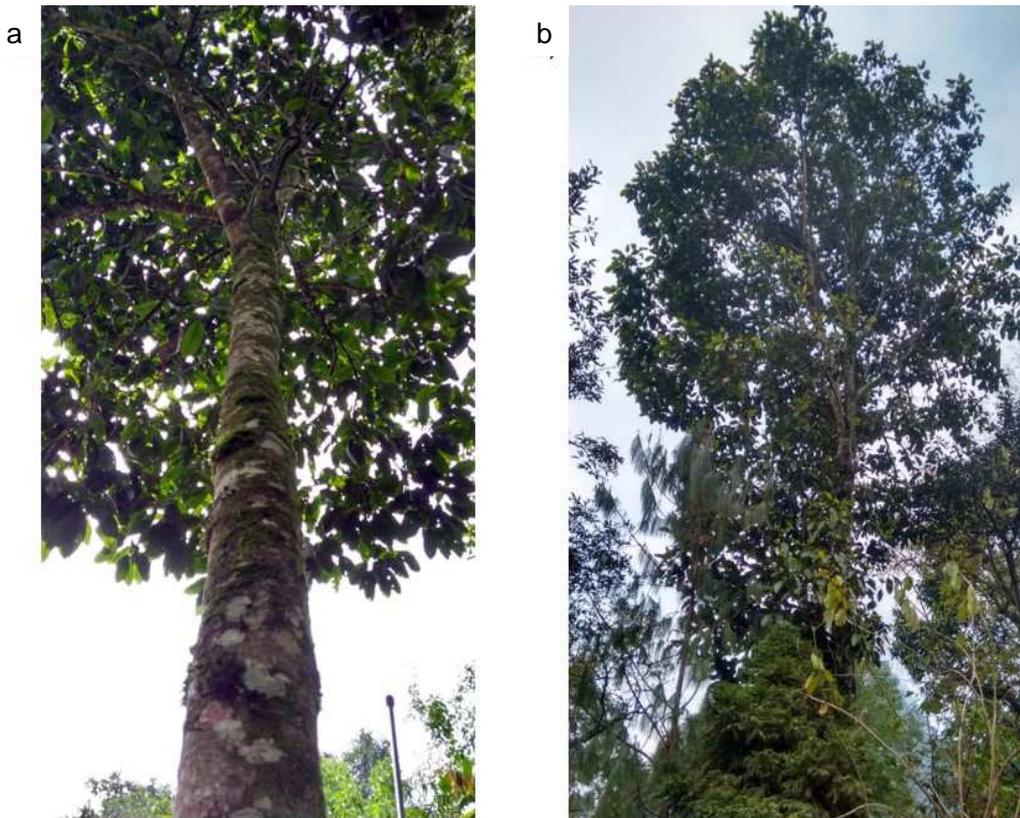


Figura 1. Vista general de un árbol de Yoloxóchitl (*Magnolia mexicana*), en Zongolica, Veracruz: a) acercamiento del fuste y copa, b) vista panorámica del fuste y copa.



Figura 2. Hojas y partes florales de *M. mexicana*: a) dos hojas, se aprecia forma oblongo-elíptica, b) flor, c) botón floral, d) detalle de coloración púrpura en fragmento de pétalo, e) gineceo estipitado, los estambres ya se han desprendido de la base, f) estambres laminados, alargados, ditécicos.

El fruto, un multifolículo (38 - 40 carpelos con la base dorsal jorobada y ápice hundido), es de forma ovoide-elipsoidal (10 a 15 cm de largo), leñoso, ligeramente pubescente. Las semillas (0.7 - 1.2 cm de largo) son péndulas al permanecer brevemente suspendidas del rafe a través de fibrillas de lignina, de funículo corto, cubiertas por una testa dura de color pardo o negro, cubierta a su vez por una sarcotesta carnosa color rojo escarlata. El endospermo es oleoso y ocupa casi la totalidad de la semilla (Osuna, 1997; Vázquez-García et al., 2012a). El embrión está ubicado en el extremo micropilar, es recto, rudimentario (en estadio torpedo al momento de abrirse el fruto), con dos cotiledones (Alcántara-Flores, 2002) (Figura 3). Florece de abril a junio y fructifica de febrero a junio del año siguiente (Penington y Sarukhán, 1998; Waizel, 2002).

Se le conoce con varios nombres comunes, el más conocido es Yoloxóchitl que viene del náhuatl (yollotl: corazón y xóchitl: flor), también se la denomina flor de atole (relacionado con su uso), flor o árbol de corazón (relacionado con sus propiedades), magnolia, aynacol o monacoy, súchil, yolo (Elizondo-Salas, 2015), aguacote, flor de huevito, yolosóchil; ita ndix (mixteco), yoloshanat o kuwisana (totonaco: kuwi xa'nat) (UNAM, 2009).



Figura 3. Fruto y semillas de *M. mexicana*: a) fruto leñoso multifolículo, b) detalle de los carpelos del multifolículo, c) fruto abierto con semillas al interior, d) racimo de semillas, e) aspecto de las semillas luego de retirarse la sarcotesta roja, se observa la testa dura color negro, f) embrión extraído, en vista lateral, y g) embrión extraído en vista dorsal.

2.1.2. Distribución.

De acuerdo con Rivers et al. (2016a), *M. mexicana* se encuentra restringido al centro de México con subpoblaciones relictuales en los estados de Oaxaca, Puebla y Veracruz; desde los 450 hasta los 1,500 msm (Palacios, 2006) (Figura 4).

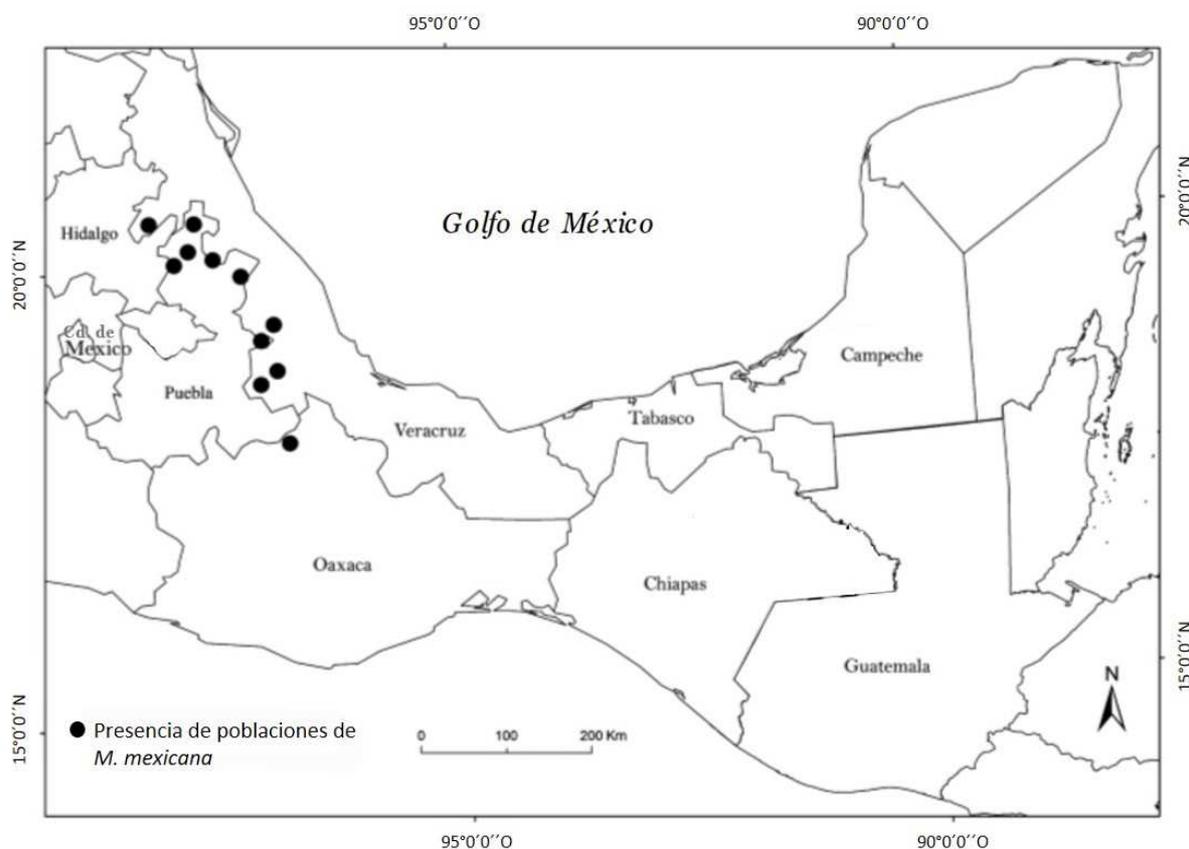


Figura 4. Distribución más actualizada de *Magnolia mexicana*, tomado de Vázquez-García, et al. (2013b), con modificaciones.

Todavía en 2006, según la ficha técnica de la especie realizada por Palacios y publicada por la CONABIO en ese año, se consideraba que *M. mexicana* tenía una distribución más amplia, pasando por Chiapas y hasta Guatemala, pero recientes reclasificaciones a más especies como *Magnolia zoquepopolucae* (Vázquez-García et al., 2012b), *M.*

sinacacolinii, *M. jaliscana* (Vázquez-García *et al.*, 2012a), *M. perezfarrerae* (Vázquez-García *et al.*, 2013b), *M. lacandonica* (Vázquez-García *et al.*, 2013c), *M. lopezobradori*, *M. macrocarpa*, *M. wendtii*, *M. ofeliae* y *M. decastroi* (Vázquez-García *et al.*, 2013a), han reducido su área de distribución.

Existen ejemplares de magnolia que se considera pudieran pertenecer a la especie *M. mexicana*, fuera de lo que se ha establecido como su área de distribución natural; por ejemplo, en el Estado de México se encuentra un ejemplar en el atrio de la parroquia de la “Natividad y Purificación de María” en el municipio de Zumpahuacán (Figura 5a); otro en el municipio de Malinalco, en el barrio de Santa Mónica dentro de un predio particular (Figura 5b) y quizá otros más en el municipio de Mexicaltzingo, reportados hace más de 20 años por Victoria (1993).

En los dos primeros casos, los ejemplares son considerados de importancia dentro de la historia y cultura de la población local, por ejemplo, en Zumpahuacán se le llama “árbol del corazón de María” y más allá de su uso medicinal, la gente le atribuye otras propiedades, como la de afectar el destino de los pobladores (*com. pers.* con pobladores¹). En el caso de Malinalco, la población no tiene acceso directo al ejemplar, pero es bien conocido por la comunidad por sus propiedades medicinales (Mora-Rocha y Cerón-Reyes, 2006; White-Olascoaga, Juan-Pérez, Chávez-Mejía y Gutiérrez-Cedillo, 2013) y por encontrarse representado en los frescos del Convento Agustino de la Transfiguración, perteneciente a la parroquia de “El Divino Salvador” del siglo XVI (White y Zepeda, 2008) (Figuras 5c y 5d).

¹ Párroco y sacristán de la parroquia de la “Natividad y Purificación de María” en el municipio de Zumpahuacán, Agosto 2017.

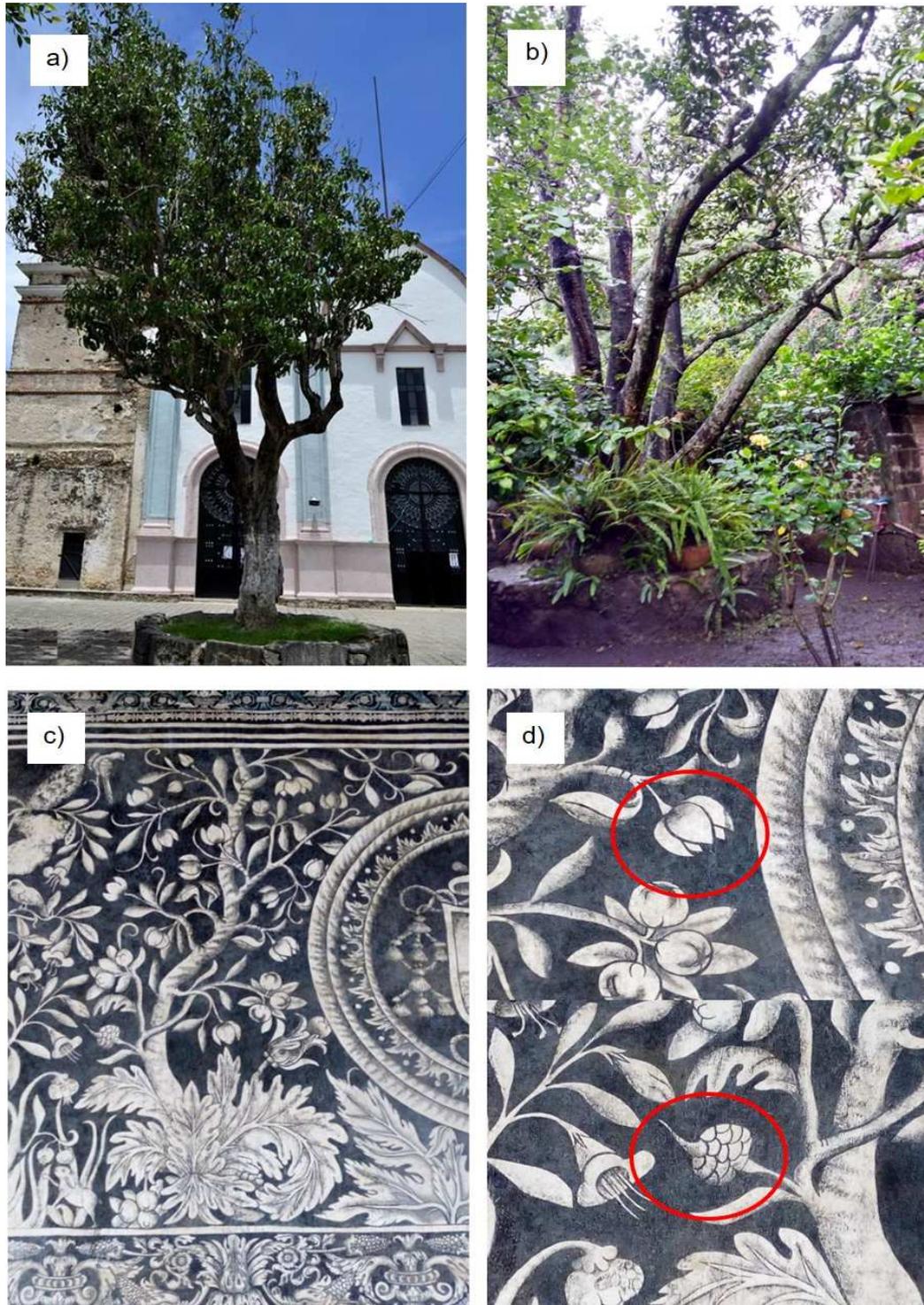


Figura 5. Árboles de Yoloxóchitl, a) en el atrio de la iglesia de Zumpahuacán, b) en un predio particular en Malinalco y en el convento agustino del siglo XVI en mural (c) con detalle (d), los círculos rojos delimitan la representación de la flor y el fruto.

También, en la Ciudad de México, Cárdenas (2004) reporta la existencia de un árbol en los jardines del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, como símbolo de la institución creada en 1944; y menciona que a los costados de un pequeño puente que da al jardín del Alcázar de Sevilla, España, se encuentran ejemplares asegura son *M. mexicana* y que fueron plantados allí, a partir de semillas llevadas por Francisco Hernández.

2.1.3. Hábitat y ecología.

El Yoloxóchitl se desarrolla en climas cálido y subcálido húmedos, en selvas altas perennifolias (asociada con las especies *Terminalia amazonia*, *Dialium guianense*, *Swartzia cubensis*, *Guatteria anomala*) o bosque mesófilo de montaña (asociada con *Ulmus mexicana*, *Trapirira macrophylla*, *Pseudolmedia oxziphullaria* y varias especies de Lauraceas), sobre suelos derivados de materiales metamórficos o quellos de origen calizo relativamente antiguos (Palacios, 2006).

También, para el bosque mesófilo, Sánchez-Cuahua, Jimeno-Sevilla y Elizondo-Salas (2017), reportan las siguientes especies como presentes en el hábitat del Yoloxóchitl: *Musa paradisiaca*, *Coffea arabica*, *Cordia alliodora*, *Persea schiedeana*, *Chamaedorea tepejilote*, *Ficus aurea*, *Cupania sp.*, *Inga vera*, *Diospyros digyna*, *Heliocarpus donnellsmithii*, *Myriocarpa bifurca*, *Casimiroa edulis*, *Syzygium jambos*, *Juglans pyriformis*, *Citrus sinensis* y *Licania platypus*.

Por otra parte, Gutiérrez-Zúñiga y Jimeno-Sevilla (2017), registraron 21 especies de aves dispersoras de las semillas de *M. mexicana*, siete de ellas en la NOM-059-SEMARNAT-2010, de las cuales las siguientes fueron las de mayor presencia: *Myadestes occidentalis*,

Catharus guttatus, *Turdus assimilis*, *Campylorhynchus rufinucha*, *Turdus grayi*, *Geotrygon montana* y *Ramphocelus passerinii*.

No existen estudios sobre los polinizadores que actúan sobre el Yoloxóchitl, pero muy probablemente sean escarabajos del género *Cyclocephala*, que han sido asociados con otras especies de magnolias en México, tal es el caso de *Magnolia schiediana* cuyo polinizador es *Cyclocephala jalapensis* (Dieringer y Espinosa, 1994; Dieringer, Cabrera, Lara, Loya y Reyes-Castillo, 1999; Morón, Lugo-García y Aragón-García, 2014), *M. Tamaulipana* con el escarabajo *C. caelestis* (Dieringer, Reyes-Castillo, Lara, Cabrera y Loya, 1998) ó reportes de insectos de éste mismo género para *M. lacandonica* (Vazquez-García et al., 2013c) y *M. zoquepopolucae* (Vazquez-García et al., 2012b).

2.1.4. Importancia.

2.1.4.1. Importancia medicinal.

En México, país con alto consumo de productos herbolarios (se estima que cerca del 90 % de los mexicanos usa o ha usado alguna vez hierbas como remedio curativo) (Estrada, 2009), esta especie de magnolia es apreciada principalmente por sus propiedades medicinales, útiles para curar afecciones cardiacas (dolor o inflamación del corazón así como para regular la presión arterial), atribuyéndosele además capacidades para curar “desmayos”, “susto”, “nervios”, para bajar la fiebre, dolor de estómago, diarrea, contra parásitos intestinales e incluso contra la esterilidad, la epilepsia y el retraso mental; con uso en distintas preparaciones, sola (corteza, semillas o partes florales) o mezclada con otras hierbas (Lozoya, 1999; Wayzel, 2002; Mora-Rocha y Cerón-Reyes, 2006; White y Zepeda, 2008).

Sin embargo, lejos de las propiedades que el conocimiento tradicional le atribuye, científicamente la planta ha sido sometida a escasos estudios químicos y farmacológicos, los primeros a partir de la década de 1890, con la intención de encontrar una planta mexicana que tuviera el mismo o mejor efecto que la famosa yerba europea “Digital” (*Digitalis purpurea*) base de la terapéutica digitalica (Micheli-Serra, 1998; Micheli-Serra, 2004; Cárdenas, 2004).

De acuerdo con Waizel (2002), el Yoloxóchitl contiene químicamente el flavonoide quercetina, taninos, una resina y un aceite esencial; de las semillas se reportó un glucósido y el alcaloide talaumina y de las hojas los investigadores Guerra (1938) y Escobar (1941) reportaron la obtención también de talaumina y de un segundo alcaloide, la aztequina; esta última no se pudo aislar nuevamente en intentos reportados desde hace más de seis décadas (Sodi-Pallares y Martínez-Garza 1947; Kametani, Terasawa, Ihara e Iriarte, 1975) en su lugar, Kametani et al. (1957), aislaron la liriodenina. Lozoya (1999), reseña que los estudios sobre los compuestos químicos de esta especie quedaron en suspenso y que el Yoloxóchitl no logró superar a la *D. purpurea* como la principal fuente de glucósidos cardiacos.

En la actualidad no se tiene registro de nuevos estudios químicos en *M. mexicana* para avalar la presencia de aztequina ni para buscar otros compuestos que pudieran ser útiles a la medicina.

Los estudios farmacológicos han sido más abundantes, algunos realizados directamente en humanos y la mayoría en animales; de acuerdo con Waizel (2002) en los primeros se demostró su utilidad para tratar la epilepsia, estimulación del ritmo cardiaco (con similitud a los efectos de la adrenalina), regulación de arritmias cardiacas e incluso como estímulo

de la fertilidad femenina; mientras que en animales (perros, gatos, ranas, conejos y ratas) se observó principalmente su efecto vasoconstrictor, estimulante del músculo cardíaco y esquelético así como inhibidor de las contracciones del yeyuno (Victoria, 1993), éste último avalaría la propiedad que se le atribuye como antidiarreico. En un estudio reciente (Sánchez-Recillas et al., 2014) realizado con yoloxóchitl colectado en Jalapa, Veracruz, se encontró que la especie induce un efecto relajante en traquea de rata, lo que supondría su potencial uso como agente antiasmático.

2.1.4.2. Importancia por su aprovechamiento maderable.

Esta especie arbórea no se considera comercialmente maderable a gran escala, en el Catálogo 2010 de productos maderables certificados de la CONAFOR, sólo se considera a *Magnolia schedianae*; sin embargo, ha sido utilizada para este propósito de forma local, en las zonas donde se distribuye (Rivers et al., 2016a), lo que representa una de las causas del declive de sus poblaciones; así mismo, en el estudio realizado por Elizondo-Salas (2015) en Zongolica, Veracruz, municipalidad con una de las poblaciones relictuales de *M. mexicana* más grandes, se reafirma que la población local identifica la especie como maderable y en el trabajo de Martínez-Pinillos y Martínez-Castillo (1996), en donde se analizan las cualidades de la madera de distintas especies, se le considera como de excelente calidad para el cepillado y de calidad regular en el lijado.

2.1.4.3. Importancia por su uso potencial.

De acuerdo con Avendaño y Acosta (2000) esta especie se usa como cerca viva en los sitios donde se distribuye, aunque no de forma frecuente; este aspecto quizás esté más relacionado con que sea considerada una especie tolerada por las poblaciones humanas

que habitan las áreas donde se distribuye, es decir, que crece naturalmente y no es retirada de los predios por su valor intrínseco (Elizondo-Salas, 2015).

Así mismo, Rivers et al. (2016a) mencionan que por la belleza de sus flores está valorada como ornamental y aromática; mientras que Sánchez-Cuahua et al. (2017), reportan su uso en Zongolica, Ver., como árbol de sombra, implemento ritual y como planta comestible por el uso de los pétalos para preparar bebidas como té y atole.

2.1.4.4. *Importancia histórica.*

La referencia más antigua que se tiene del Yoloxóchitl está en el código De la Cruz-Badiano (1552), en donde se menciona su uso como remedio contra las enfermedades mentales haciendo una cocción de su corteza y raíz junto con cacao (*Cacauaxóchitl*) (Figura 6a).

Una segunda mención se encuentra en el código Florentino (1577) (Figura 6b), conocido también como “Historia general de las cosas de la Nueva España” escrito por Fray Bernardino de Sahagún, en donde se refiere que las flores de este árbol son “preciosas” y de muy buen olor, con forma de corazón y color blanco, las cuales son medicinales y se beben con cacao o solas en agua, a la que dan un sabor agradable. Es interesante señalar que en ese documento se mencionan dos tipos de flores, el *Tlacayolloxóchitl* que usaban sólo los “señores” y el *Itzcuinyolloxóchitl* para uso de la “gente baja”, éstas últimas de tamaño mediano y poco aroma.



Figura 6. Yoloxóchitl representado en los códices a) de la Cruz-Badiano (1552), folio 54 (planta con flores blancas a la izquierda) y b) en el Códice Florentino (1577) página 340 del libro XI “De las cosas naturales”, folio 188 (recuadro superior izquierdo).

Así mismo, Francisco Hernández (1577) hace una breve descripción del árbol en donde destaca la flor “...de figura de corazón colmada de hojas blancas, rojizas por dentro, gruesas, lisas, firmes, glutinosas, astringentes, de agradable sabor...”, y hace mención de su uso para “fortalecer” el corazón, mezcladas con cacao, también para “estreñir el vientre suelto” y, mezclado con otras yerbas y cola de tlacuache, como remedio para la esterilidad, además de ser “muy apreciado por los indígenas” por sus propiedades medicinales y la belleza de sus flores (Figura 7).

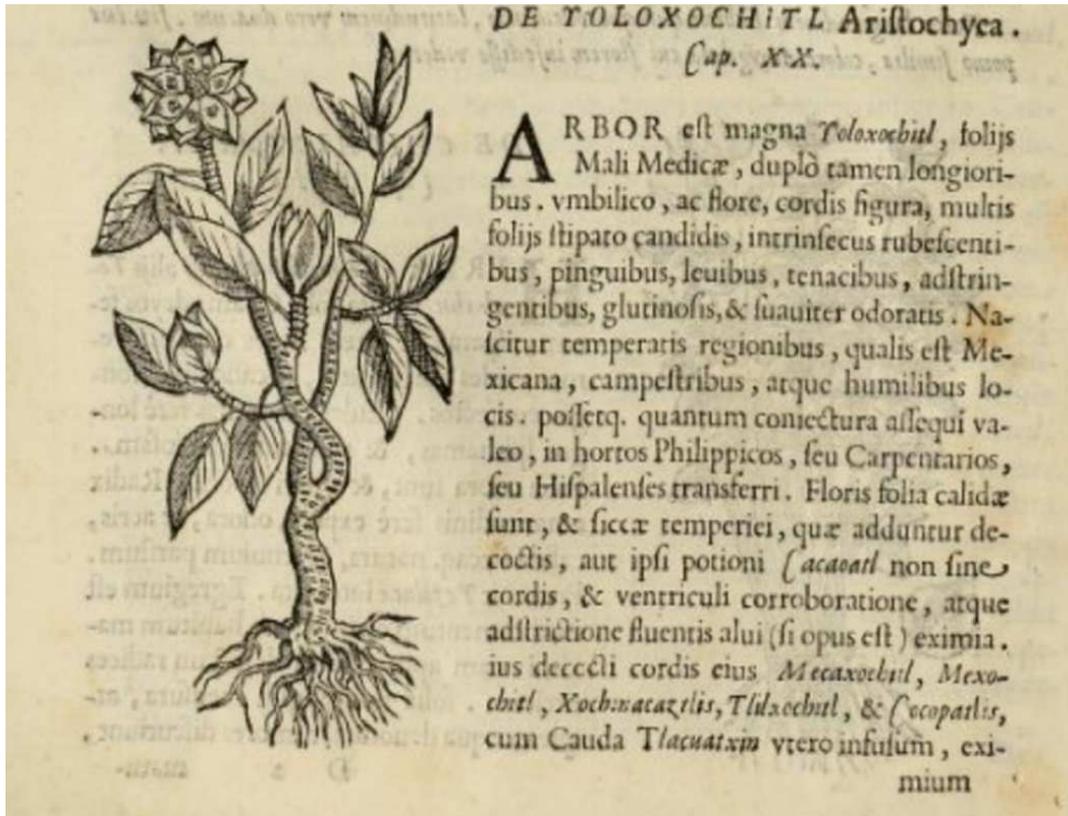


Figura 7. YOLOXÓCHITL como está representado en la Historia natural de la Nueva España (Tomo III, capítulo XX, página 40).

Francisco Ximenez (1615) amplía la descripción del árbol hecha por Hernández y añade que la semilla parece un frijol “colorado” y que al madurar el fruto, las semillas caen lejos del árbol dentro de unos “panales”, y añade, sobre su propagación, que luego de germinar las semillas, cuando la plántula medía “un palmo” la gente las sacaba del suelo y las cambiaban de un lugar a otro durante dos meses, aquellas plántulas que no se secaban se consideraban “amansadas” y entonces se llevaban a vender desde su lugar de origen en “Yzhuatlán camino de la Veracruz”; Yzhuatlán es probablemente el actual municipio de Ixhuatlán del Café, ya que de los tres actuales municipios veracruzanos con éste nombre es el único en la ruta del antiguo camino colonial desde el centro de México

hacia Veracruz (Vargas, 2012), además de encontrarse dentro de lo que históricamente abarcó el señorío de Cuetlaxtla (García, 2015).

Después, durante la Real Expedición Botánica a la Nueva España que abarcó de 1787 a 1803 (Maldonado, 2000), se hace una descripción botánica del Yoloxóchitl con una ilustración muy detallada de la especie, por parte de los botánicos Martín de Sessé y José Mariano Mociño, quienes la catalogaron como *Magnolia glauca* (Sessé y Mociño, 1894), y apuntan que se distribuye naturalmente en Chapultepec y Cuernavaca, con época de floración en mayo (Figura 8a).



Figura 8. Ilustración del Yoloxóchitl de principios del s. XIX, del trabajo de Sessé y Mociño.

Es hasta 1818 que Augustin Pyramus De Candolle, con base en datos de la obra de Francisco Hernández y sus propias exploraciones, que hace una descripción botánica (aunque breve) de la especie y la incluye en la familia Magnoliaceae con el nombre científico con el que la conocemos hoy y reitera al antiguo bosque de Chapultepec y Cuernavaca como los lugares donde se distribuye (Figura 9).

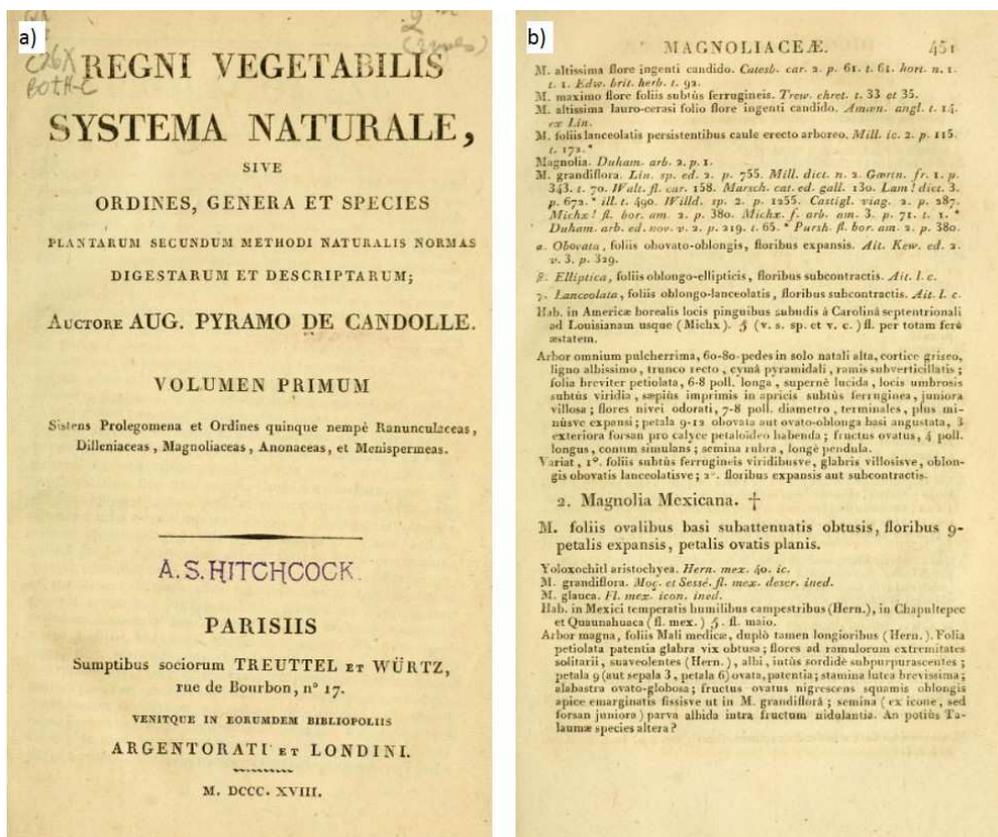


Figura 9. Detalle del libro *Regni vegetabilis systema naturale*, a) portada y b) página 451 en donde aparece por primera vez el Yoloxóchitl con su nombre botánico en latín.

Otra importante referencia al árbol es la que hace fray Diego de Durán en su *Historia de las Indias de la Nueva España y Islas de Tierra Firme* (1581) (Figura 10), también conocido como Códice Durán, escrita cerca de 50 años después de la conquista, en

donde se describe cómo fue creado el primer jardín botánico de América, cuando el entonces emperador de los mexica, Moctezuma Ilhuicamina, por consejo de su hermano Tlacaélel, se propuso la construcción de un jardín botánico en lo que hoy es Oaxtepec, perteneciente al municipio de Yautepec en el Estado de Morelos, para lo cual se ordenó que fueran traídos grandes árboles de Yoloxóchitl (en conjunto con otras especies) desde la provincia de Cuextlaxtla (en el actual estado de Veracruz); donde se construyó el jardín en un periodo de tres años.

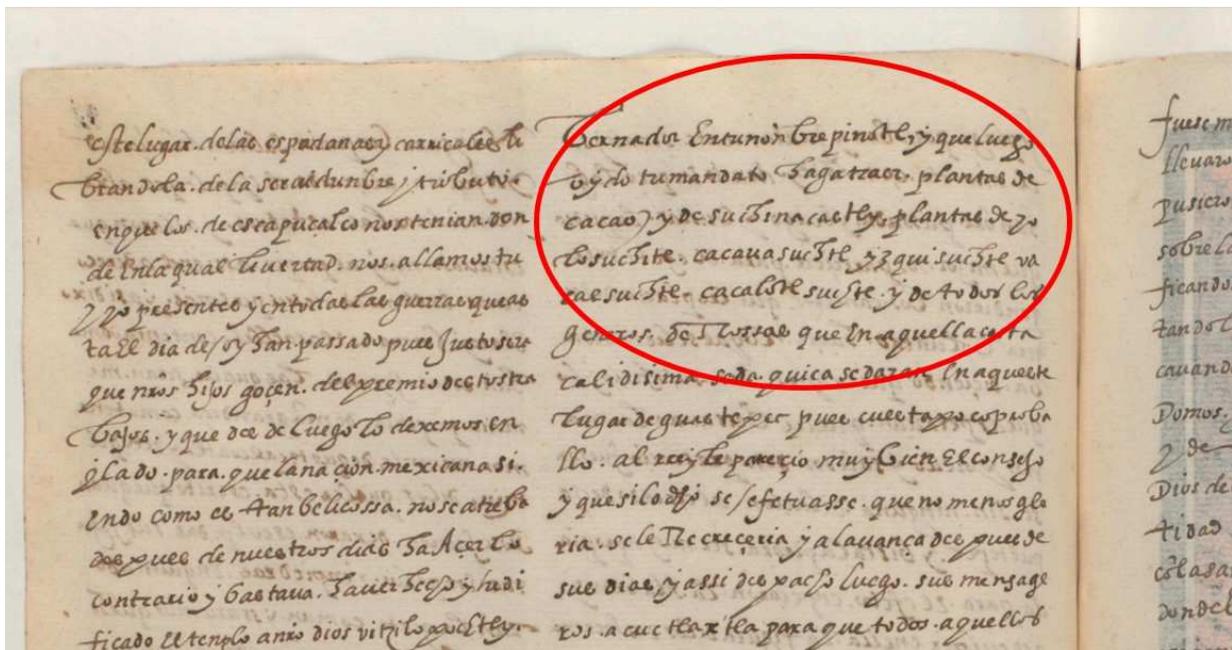


Figura 10. Detalle del Códice Durán, donde se relata la creación del primer jardín botánico de América (Tomo 1, capítulo XXXI), en rojo párrafo donde se menciona el Yoloxóchitl.

De acuerdo con Vovides, Linares y Bye (2010), el llamado protomédico Francisco Hernández, visitó Texcoco y Oaxtepec en 1574; para ese entonces el jardín ya no funcionaba como tal, sino como un reservorio de plantas medicinales para el hospital de La Santa Cruz que fue fundado en 1556 y que dejó de funcionar a mediados de 1600.

2.1.5. Estatus de conservación.

Esta especie está catalogada como amenazada de extinción de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, lo que significa que, en el corto o mediano plazo, podría encontrarse en peligro de desaparecer a menos que se modifiquen los factores que inciden negativamente en su hábitat o poblaciones; en esta norma también se incluye a *M. dealbata*, *M. iltisana* y *M. schediana*.

Así mismo, en los listados de la UICN para la familia Magnoliaceae, la especie se cataloga como Vulnerable B1ab(iii,v) (Rivers, *et al.* 2016a), lo que significa que enfrenta un riesgo de extinción alto en estado de vida silvestre, con una “extensión de presencia” menor a 20,000 Km², con poblaciones severamente fragmentadas o que se sabe que no existe en más de 10 localidades, con una disminución en la cantidad de individuos maduros y en la calidad, área o extensión de su hábitat (UICN, 2012).

La deforestación y el cambio de uso de suelo en las zonas donde se distribuye, así como la tala para aprovechamiento de la madera de esta especie, son los principales causantes de la degradación de su hábitat y poblaciones (Rivers, 2016a), encontrándose, por ejemplo, que los sitios donde se han colectado especímenes de *M. mexicana*, depositados en diferentes herbarios de México, se encuentran en zonas que presentan alteraciones en su composición, estructura y dinámica funcional, debidas a un proceso gradual y constante de transformación antrópica pero cuya recuperación es posible (Medina-Abreo y Soto, 2003).

No se tienen datos sobre la dinámica de las poblaciones del Yoloxóchitl en la mayoría de las áreas donde se reporta su presencia, sin embargo, pueden servir como muestra un

par de estudios poblacionales en Zongolica, en el primero, realizado por Medrano-Hernández, Rodríguez, Reyes-Trejo y Peña-Ortega (2017), con 10 marcadores ISSR en muestras de ADN de semillas de Yoloxóchitl colectadas en las comunidades Amatitla y Zapotla, encontraron un 86 % de polimorfismos y una variabilidad intrapoblacional de 90.88%, que interpretaron como evidencia de que no existían alteraciones ocasionadas por la reducción de sus poblaciones o fragmentación del hábitat; en el segundo estudio, realizado por Sánchez-Cuahua et al. (2017), únicamente para la comunidad de Zapotla, se registraron 122 individuos de *M. mexicana*, de los cuales sólo 18 comprendían alturas entre los 15 y 34 m, mientras que el mayor número de individuos estaba en rangos de altura menores a 9 metros, es decir, individuos jóvenes; concluyendo también que la población mostraba una tendencia estable.

2.1.6. Propagación.

2.1.6.1. Propagación por semilla.

Existen pocos estudios al respecto para las especies del género *Magnolia* en los cuales se han probado muchos tipos de tratamientos tales como la imbibición en agua y fitohormonas, maceración, escarificación mecánica y en agua caliente, escarificación a través del tracto digestivo de aves y estratificación fría, esto con el fin de favorecer la germinación (Saldaña, Zuloaga y Jardel, 2001; Ishida, Yoshimaru e Ito, 2003; Corral-Aguirre y Sánchez-Velázquez, 2006; Vásquez-Morales, Sánchez-Velásquez y Pineda-López, 2010; Vásquez-Morales y Sánchez-Velásquez 2011; Jacobo-Pereira et al., 2016; García, Romo-Campos, Pereira y Gómez-Rubio, 2018).

En el caso de *M. mexicana*, uno de los factores que influye en la lenta recuperación de sus poblaciones, más allá de los antropogénicos, es la baja tasa de germinación de sus semillas, que se ha reportado en unos cuantos estudios hechos al respecto; por ejemplo, Osuna (1997), quien realizó el primer estudio sobre germinación de semillas de esta especie, encontró que el proceso de imbibición dura dos horas y comprobó que la testa de la semilla es permeable pero que podría constituir una barrera mecánica para el crecimiento del embrión y para la germinación, ya que no logró la germinación de las semillas en sus experimentos. En la misma línea de investigación, Osuna et al. (2000), caracterizaron las semillas de esta especie como *intermedias*, al demostrar que, aunque pueden resistir la deshidratación en porcentajes menores al 10 %, pierden viabilidad a los 20 días y no resisten ser almacenadas a bajas temperaturas, características que las hacen inviables para permanecer dentro de un banco de semillas.

Posteriormente, Hernández-Najarro (2009) y Becerra-Vázquez (2010) también realizaron pruebas de germinación de la especie, con un 16.8 % de germinación bajo condiciones de invernadero en el primer caso; contra un 80.8% en el segundo, en un experimento *in situ* donde sólo se utilizó malla sombra. En ambos casos se recomendó la remoción de la sarcotesta como medida para favorecer la germinación.

Así mismo, Gómez (2011), realizó pruebas de germinación bajo invernadero con un 11.8% de germinación total y observó que la deshidratación de las semillas por 10 días favorecía la germinación ya que después de transcurrido este tiempo, pudo detectar a nivel tisular la aparición del procámbium, que es el meristema primario que origina los tejidos vasculares xilema y floema; sin embargo, después de transcurridos 15 días observó la degeneración de los tejidos del embrión y el endospermo. También encontró

que el embrión se encuentra en estado torpedo, es decir, inmaduro aún después de que la semilla se ha desprendido del fruto, lo que es congruente con una forma de latencia de las semillas común en la familia Magnoliaceae. Esta característica morfofisiológica, de embrión inmaduro es considerada primitiva y requiere de un cambio químico para que la germinación ocurra (Baskin y Baskin, 1998).

2.1.6.2. Micropropagación.

Reyes y Vázquez (2011), establecieron yemas apicales y segmentos de hoja de plantas de un año de *M. mexicana*, en dos medios nutritivos: a) medio MS (Murashige y Skoog, 1967) al 50% con 0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de kinetina (KIN) + 0.5 mg/L de ácido indolacético (AIA) y b) medio MS al 50% + 1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + 1 mg/l de KIN, y registraron la formación de células *de novo* en el 72 % de los segmentos de hoja, así como la formación de brotes en las yemas con los dos tratamientos; sin embargo, problemas de contaminación y oxidación por fenoles provocaron la muerte de todos los explantes.

2.2. Caracterización molecular.

Uno de los argumentos más fuertes que respaldan el uso de marcadores moleculares sobre morfológicos es que los primeros, al trabajar directamente con la base genética de la variación, son universales y son independientes del estadio del ciclo de vida de los organismos de la población a analizar o de su estado físico, así como también de las condiciones ambientales al momento del muestreo, es decir, son fenotípicamente neutros y además están libres de efectos epistáticos (Azofeifá-Delgado, 2006; Rentarúa, 2007). Además, son más polimórficos y suelen ser más fáciles de obtener que los morfológicos

ya que se pueden analizar a partir de cualquier tipo de célula que contenga núcleo y pueden abarcar cientos o miles de marcadores en comparación con los morfológicos que muchas veces no alcanzan la centena (Azofeifá-Delgado, 2006; FAO, 2010).

Concretamente, los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético y son característicos de un organismo o proceso (Valadez y Kahl, 2000; Azofeifá-Delgado, 2006).

De acuerdo con Weising, Nybom, Wolff y Kahl (2005) las propiedades con las que debería de contar un marcador molecular para ser considerado altamente eficiente son:

1. Ser moderada a altamente polimórfico.
2. De herencia codominante, lo que permitiría la discriminación de estados homocigóticos y heterocigóticos en organismos diploides.
3. Asignación inequívoca de alelos.
4. Ocurrencia frecuente en el genoma.
5. Distribución equitativa a lo largo del genoma.
6. Comportamiento selectivamente neutral, por ejemplo, sin efectos pleiotrópicos.
7. De fácil acceso, es decir, que pueda ser adquirido o realizado con procedimientos rápidos.
8. De fácil y rápido ensayo, por ejemplo, mediante procesos automatizados.
9. Altamente reproducible.
10. De fácil intercambio de datos entre laboratorios.
11. De bajo costo tanto para el desarrollo de marcadores como para su ensayo.

Hasta ahora ningún marcador molecular cubre la totalidad de los preceptos anteriores.

2.2.1. Tipos de marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares pueden ser dominantes o codominantes, con diferente capacidad para detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples (Rentarías, 2007) y se distinguen dos tipos: los marcadores de ADN y las proteínas, principalmente isoenzimas. Con las últimas se asume que diferentes individuos en una misma población pueden tener distintas formas moleculares de la misma proteína debido a factores genéticos o epigenéticos (Azofeifa-Delgado, 2006) y su ventaja principal es que los individuos homocigóticos y heterocigóticos pueden distinguirse fácilmente (Weising et al., 2005).

2.2.1.1. Marcadores de ADN.

Se basan en el análisis de pequeñas diferencias en secuencias moleculares entre individuos; para lograr este propósito se usan diversas técnicas que dan nombre a los distintos tipos de marcadores de ADN (Rentarías, 2007). De acuerdo con Karp, Kresovich, Bhat, Ayad y Hodgkin (1997), dentro de este grupo se incluyen tres categorías (las abreviaciones de los nombres de las técnicas corresponden a sus siglas en inglés):

- *Categoría 1.* Métodos que no se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como RFLP's (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y VNTR's (número variable de repeticiones en tándem).
- *Categoría 2.* Técnicas basadas en la PCR que utilizan iniciadores, también llamados cebadores o *primers*, ya sean arbitrarios o semiarbitrarios, tales como los AFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados), RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar), RAMPO (Polimorfismo de microsatélites amplificados al azar), SSR ó ISSR (inter secuencias simples

repetidas), DAMD (región minisatélite del DNA), DAF (amplificación de la huella de ADN), SPARS (reacción de amplificación de un solo cebador), SAMPL (cebadores microsatélite en combinación con AFLP), entre otras. Al conjunto de estas técnicas también se les conoce MAAP (perfiles múltiples arbitrarios de amplicones).

- *Categoría 3.* Técnicas basadas en la PCR con sitio “objetivo específico”, es decir, son técnicas en donde se diseñan cebadores para amplificar regiones específicas del genoma. Por ejemplo, CAPS (secuencia polimórfica amplificada escindida), SSCP (polimorfismo conformacional de cadena simple), STMS (microsatélites de secuencia etiquetada), entre otras.

Todas las técnicas anteriores pueden diferir en cuanto a su carácter, ya sea dominante o codominante, así como presentar ventajas y desventajas tanto analíticas como operacionales. En el Cuadro 2, se resumen las características generales de los sistemas de marcadores de ADN que se usan con mayor frecuencia.

Es necesario señalar que, la elección de un tipo de marcador dependerá de los objetivos del estudio que se desee realizar, así como de las posibilidades materiales y de equipamiento con que cuente el laboratorio en cuestión.

2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Dado que muchos de los marcadores de ADN utilizan la metodología PCR es necesario hacer una breve revisión de esta, se trata de una técnica molecular desarrollada por el bioquímico estadounidense Kary B. Mullis en 1983, por la cual recibió el premio novel de química, y que permite generar billones de moléculas de ADN a partir de una sola en unas horas (Mullis, 1990).

Cuadro 2. Características de los marcadores de ADN de uso más común.

	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
Principio técnico	ADN molde, digestión con enzimas de restricción, separación por electroforesis, transferencia de ADN, hibridación, marcaje de sonda, detección de bandas.	ADN molde, amplificación con un cebador arbitrario, electroforesis, visualización	ADN molde, digestión con dos enzimas de restricción, amplificación con uso de adaptadores y ligasas, electroforesis y visualización.	ADN molde, amplificación con cebadores específicos para la región repetitiva, electroforesis y visualización.
Desarrollador	Grodzicker et al. (1974) y Botstein et al. (1982)	Welsh y McClelland (1990) y Williams et al. (1990)	Zabeau y Vos (1993) y Vos et al. (1995)	Litt y Luty (1989) y Tautz (1989)
Uso de PCR	No	Sí	Sí	Sí
Naturaleza	Codominantes	Dominantes	Dominantes	Codominantes
Detección de polimorfismos	Medio	Medio	Bajo	Alto
Conocimiento previo de las secuencias	No requerido	No requerido	No requerido	Requerido
Complejidad técnica	Alta	Media	Media	Alta
Costo	Alto	Bajo	Medio	Alto
Cantidad de ADN requerida	µg (alta)	ng (baja)	ng (baja)	ng (baja)
Repetibilidad	Alta	baja	Alta	Alta
Abundancia en el genoma	Media	Muy alta	Alta	Alta
Uso	Mapas genéticos, resolución de problemas taxonómicos o filogenéticos.	Mapas genéticos, estudios de parentesco, diversidad y estructura poblacional	Estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes, monitoreo de flujo genético, análisis de paternidad.	Mapeo genético, estudios de variación entre especies o variedades muy relacionadas, estudios poblacionales
Desventajas principales	Costo y complejidad técnica	Presencia de artefactos (bandas erróneas), baja repetibilidad	Costo y complejidad técnica	Costo y complejidad técnica

Nota: Con base en Pérez (1996), modificado con información de Karp et al. (1997), García et al. (2004), Azofeifa-Delgado (2006) y Rentarúa (2007).

El método consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización, hibridación y extensión mediante una polimerasa; que multiplican exponencialmente un fragmento de ADN (Mullis, Faloona, Scharf, Saiki, Horn y Erlich, 1986). La enzima empleada para este proceso recibe el nombre comercial de *Taq polimerasa* y puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* que vive en la proximidad de manantiales de agua caliente (Espinosa, 2007).

La reacción de PCR imita artificialmente lo que sucede al interior de una célula cuando se sintetiza el ADN, para ello se hace una mezcla que incluye el ADN del organismo que se desea estudiar, un par de cebadores necesarios para que se inicie la transcripción; dinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citocina y timina que son los bloques básicos para la construcción de la nueva cadena, una ADN polimerasa termoestable y las condiciones para que esta enzima trabaje adecuadamente: pH, magnesio en forma de $MgCl_2$ y KCl, entre otras sales o reactivos (Espinosa, 2007). Aunque naturalmente existen varias proteínas involucradas en la replicación de material genético, la más importante es la ADN polimerasa que se encarga de incorporar nucleótidos para formar una nueva cadena y es la única que se usa en la replicación *in vitro* (Serrato-Díaz, Flores-Rentería, Aportela-Cortez y Sierra-Palacios, 2014).

Los tres pasos principales involucrados en esta técnica ocurren a diferentes temperaturas, en cambios bruscos de varios grados centígrados que sólo pueden realizarse mediante el uso de un termociclador; así, el primer paso que involucra la desnaturalización de la doble cadena de ADN ocurre entre 90-97 °C, el segundo paso, llamado de alineación, en el que los cebadores pueden hibridar con su cadena complementaria, ocurre entre 40-60 °C; finalmente durante la fase de extensión cuando

la polimerasa alcanza su etapa de máxima actividad, la temperatura sube a 72 °C (Espinosa, 2007; Joshi y Deshpande, 2010). Antes de iniciar todo el proceso se programan entre 5 y 10 minutos a 95 °C para comenzar la desnaturalización y al final de los ciclos un último periodo de extensión a 72 °C por cinco minutos que permitirá que todos los fragmentos formados terminen de sintetizarse correctamente (Serrato et al. 2014).

En un tiempo aproximado de 6 horas se pueden realizar 30 ciclos que significan la realización de millones de copias de la muestra; incrementar el número de ciclos más allá de 35 no es útil, ya que la cantidad de reactivos en la mezcla estarían prácticamente agotados (Joshi y Deshpande, 2010).

Actualmente, la tecnología de la PCR tiene una gran cantidad de aplicaciones, es muy común y prácticamente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica (Joshi y Deshpande, 2010). Dependiendo de los objetivos del estudio que se quiera realizar se puede escoger el o los tipos de cebadores a utilizar, lo que hace a esta técnica tan versátil (Weising et al. 2005); así, de acuerdo con Espinosa (2007), existen dos funciones principales de la PCR: a) para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma (locus) para lo cual se requiere conocer la secuencia que se trabaja, por ejemplo cuando se amplifica un gen específico; y b) cuando no es necesario conocer la región que se está amplificando y no se sabe el tamaño del fragmento o fragmentos que se esperan, aquí se observan varios loci simultáneamente y la información de los polimorfismos observados proporciona datos para el análisis de genética de poblaciones o para estudios de huella genética.

2.2.3. Polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD).

Dentro de los marcadores de ADN que se basan en el uso de la PCR destacan los marcadores RAPD, que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies (Rentarúa, 2007). Este análisis fue descrito simultáneamente por Williams et al. y Welsh y McClelland en 1990; en esencia es la misma metodología PCR, aunque en ésta última, los iniciadores son usados para amplificar una secuencia específica del genoma, y en el análisis RAPD se usa un solo iniciador de composición arbitraria que amplifica secuencias al azar de un patrón complejo de ADN (Phillips, Rodríguez y Fritz, 1995).

La técnica se basa en la probabilidad de que se presenten sitios complementarios al cebador de 10 pares de bases a lo largo del genoma a analizar (Rentarúa, 2007); para obtener un producto de amplificación con un solo iniciador, debe haber dos secuencias blanco en el genoma que sean idénticas o muy similares en posiciones muy cercanas y en orientación opuesta (Weising et al. 2005). Los polimorfismos producidos pueden ser resultado de la pérdida de un fragmento por errores en la inserción del cebador debidos a una deleción o substitución de un fragmento en la cadena de ADN (Williams, Kubelik, Livak, Rafalski y Tingey, 1990); la cantidad de fragmentos amplificados por cebador no depende de la ploidía ni de la complejidad del genoma (Weising et al., 2005).

Como se vió en el Cuadro 1, estos marcadores son dominantes, lo que significa que tanto los homócigos dominantes como los heterócigos estarán señalados por la presencia de una banda, cuya ausencia significaría la existencia subyacente de un homócigo recesivo (Weising et al., 2005), por lo que la estimación de las frecuencias alélicas se debe hacer de manera indirecta, asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg (Rentarúa, 2007) que

establece que las frecuencias genotípicas, determinadas por las frecuencias alélicas de la población, permanecen estables de generación en generación, si la población es grande, se encuentra aislada y los cruzamientos ocurren al azar (Arrunategui, Villegas, Ocampo, Rodríguez y Badih, 2013); otro aspecto importante al analizar datos obtenidos con este tipo de marcadores es que los alelos marcados para diferentes loci no migran a la misma posición en el gel (Lynch y Milligan, 1994).

2.2.3.1. Ventajas, desventajas y uso de los marcadores RAPD.

Una de las principales ventajas de los marcadores RAPD y que ha mantenido vigente su uso, es su simplicidad técnica y que no es necesario tener información previa del genoma a analizar (Weising et al., 2005), el número de polimorfismos que se pueden estudiar es muy vasto debido a la alta cantidad de iniciadores disponibles incluso si se consideran sólo los producidos por Operon Technologies®; usa fluorescencia en lugar de radioactividad, sólo se requieren nanogramos de ADN que no necesita ser de alta calidad, y es posible la automatización (Casarrubias et al., 2013; Mondragón-Jacobo, 2003); otra ventaja radica en que amplifican regiones codificantes y no codificantes de ADN por lo que revelan niveles de variación más altos que los RFLPs e isoenzimas (Williams et al. 1990); además, se pueden usar en numerosos tipos de estudios y la técnica se considera de bajo costo (Pérez, 1996).

Sin embargo, su principal desventaja es que no es posible la identificación de heterocigotos (Mondragón-Jacobo, 2003) y se puede incurrir en errores de interpretación cuando secuencias no relacionadas, pero de igual longitud, migran a la misma velocidad en los geles (Pérez, 1996) y, como muchos de los marcadores de ADN, un sólo marcador RAPD no puede proporcionar información suficiente y deben analizarse varios de ellos

en conjunto (Williams et al., 1990). También tienen algunas desventajas técnicas, ya que se pueden presentar bandas erróneas, llamadas artefactos y la reproducibilidad de los resultados es baja entre experimentos y laboratorios porque la técnica es sensible a cambios pequeños en las condiciones de reacción y muchos alelos raros presentes en las poblaciones estudiadas con RAPDs no son detectados o pueden ser fácilmente malinterpretados (Weising et al., 2005; Rentaria, 2007).

De acuerdo con Phillips et al. (1995), la eficacia de este tipo de marcadores depende de cuatro factores: el número de ciclos de amplificación, la longitud y cantidad de ADN inicial (las muestras con bajas concentraciones producen mayores rendimientos), así como la temperatura.

Los RAPDs son útiles para comparar poblaciones y especies, pero pueden no serlo para comparar entre niveles taxonómicos superiores (Pérez, 1996), también son útiles para realizar análisis poblacionales, mapeo genético, captura de genes específicos para clonación (Phillips et al., 1995; Valadez y Kahl, 2000), así como identificación genética de individuos, muy útil en casos de clones, híbridos somáticos y mutantes (Rentaría, 2007).

2.2.4. Estudios moleculares en Magnolias.

De acuerdo con Rivers, Beech, Murphy y Oldfield (2016b) la conservación de las especies pertenecientes a la familia Magnoliaceae se ha convertido en una preocupación mundial, ya que entre el 48 y 80% se encuentran amenazadas; esto, sumado a las 93 nuevas especies que se han descrito desde 2007, ha fomentado el desarrollo de numerosas investigaciones, muchas de ellas en torno a aspectos genéticos y moleculares de la

variación genética, que es un aspecto crítico en la permanencia de las poblaciones de cualquier especie y sobre todo en aquellas que son raras o están en peligro de extinción (Antonovics, 1984; Hogbin y Peakall, 1999).

En el Cuadro 3, se presenta una relación de estudios moleculares que se han realizado con magnolias de 2001 a la fecha, la mayoría de ellos se enfocaron al estudio de la variabilidad genética intra e inter poblacional de diversas especies de magnolias en peligro de extinción al buscar estrategias para su conservación, para ello, se utilizaron principalmente microsatélites, en segundo lugar AFLPs, en tercero RAPDs y por último las Isoenzimas y los RFLPs; esta tendencia es similar a la reportada por Cires et al. (2013) quienes hicieron una relación de estudios moleculares en magnolias con enfoque conservacionista de 1994 a 2012.

Aunque, en 2005, Weising et al., mencionaban una tendencia a la reducción en el uso de marcadores RAPD por otros más robustos como los AFLPS y microsatélites, es un hecho que el uso de este tipo de marcadores sigue vigente.

Cuadro 3. Estudios moleculares realizados en especies de la familia Magnoliaceae.

Autor	Especie	Objetivo	Técnica molecular	Resultados/Notas relevantes
Azuma et al. (2001)	Familia Magnoliaceae	Estimar los tiempos de divergencia (calibrados con semillas fósiles) de disyunciones tropicales y templadas de la familia.	Secuenciación y análisis de regiones de DNA cloroplástico	Se encontró que la sección Talauma divergió primero hace 42 millones de años seguido del clado asiático y el clado del oeste de la India hace 36 millones de años.
*Kikuchi y Isagi (2002)	<i>M. sieboldii</i> ssp. <i>Japonica</i>	Estudiar la variación de microsatélites dentro y entre poblaciones de la especie, para verificar su utilidad en la evaluación de poblaciones pequeñas y aisladas.	SSR	La especie mostró una baja variación genética intrapoblacional y una alta diferenciación entre poblaciones, lo que sugirió la existencia de barreras genéticas entre regiones geográficas.
*Setsuko et al. (2004)	<i>M. tomentosa</i>	Estudiar la estructura genética y distribución dentro de una población de la especie. Evaluar el efecto de crecimiento clonal en la estructura genética	SSR	Se obtuvo evidencia de la pérdida de estructura genética y depresión del entrecruzamiento, encontrándose un exceso de individuos homocigóticos.
*Ueno et al. (2005)	<i>M. stellata</i>	Estudiar la diversidad genética y diferenciación de la especie en 11 poblaciones	SSR en ADN nuclear y cloroplástico	Fueron desarrollados tres marcadores SSR cloroplásticos y se usaron tres SSR nucleares probados previamente en <i>M. ovata</i> . De las 11 poblaciones analizadas se formaron 3 grupos, uno de ellos divergió de los otros dos.
*López et al. (2008)	<i>M. espinalii</i>	Caracterizar molecularmente individuos adultos para estudiar variabilidad genética	AFLP	La diversidad genética fue alta (0.98), pero la distancia genética no tuvo relación con las distancias geográficas. Se obtuvo evidencia de fragmentación de las poblaciones.
*Newton et al. (2008)	<i>M. sharpii</i> y <i>M. schiediana</i>	Analizar los patrones de variación genética en dos especies endémicas mexicanas	RFLP, ISSR en ADN cloroplástico e Isoenzimas	Se encontró una variabilidad entre poblaciones más grande en <i>M. Schiedeana</i> que en <i>M. sharpii</i> . Se diferenciaron dos tipos de cloroplastos
*He et al. (2009)	<i>M. officinalis</i> ssp. <i>Biloba</i>	Cuantificar y comparar la variabilidad genética entre poblaciones naturales y cultivadas de la especie.	AFLP	Los alelos las poblaciones en vida silvestre se mantienen en las cultivadas, con niveles de variación intrapoblacional similares
*Zhang et al. (2010)	<i>M. cathcartii</i>	Evaluar la variación genética y distribución geográfica dentro y entre poblaciones de la especie.	AFLP	Se encontró un índice de diversidad genética muy bajo (0.122). El índice de diferenciación genética fue alto entre las poblaciones (0.247). La fragmentación del hábitat restringe el flujo genético.
Kuang et al. (2011)	<i>M. kwangsiensis</i>	Identificar regiones en el ADN que permitan identificar rápidamente las especies de la familia Magnoliaceae. Estudiar aspectos de la evolución molecular del plastoma en magnolias	SSR y secuenciación	Se realizó la secuencia completa del plastoma de la especie (159 667 pb), se proponen 86 SSR para el estudio de las magnolias.

Cuadro 3. Continuación.

Autor	Especie	Objetivo	Técnica molecular	Resultados/Notas relevantes
*Yu et al. (2011)	<i>M. officinalis</i>	Estudiar la diversidad y variación genética inter e intra poblacional en 28 poblaciones de la especie.	ISSR	El índice de diversidad interpoblacional fue alto y bajo intrapoblacionalmente. La fragmentación y aislamiento se atribuyó a la historia evolutiva de la especie y factores antropogénicos.
Radomir et al. (2012)	<i>M. x soulangiana</i> y <i>M. stellata</i>	Confirmar la estabilidad genética de plantas regeneradas <i>in vitro</i>	RAPD	Los primers OPA11, OPB03, OPC19, OPW04 y OPW09 generaron bandas (3.8 en promedio para <i>M. x soulangeana</i> y 4.2 para <i>M. stellata</i>). No se encontraron variaciones genéticas entre las plantas madre y las regeneradas <i>in vitro</i> .
Kim y Suh (2013)	Familia Magnoliaceae	Proveer una filogenia de las Magnolias bien soportada, capaz de resolver las controversias alrededor de grupos infra-familiares.	Secuenciación de regiones de DNA cloroplástico	Se encontraron diferencias considerables entre el sistema de clasificación actual para esta familia, se reconocieron 11 clados mayores en la subfamilia Magnolioideae con valores de máxima parsimonia de 80% y valores de probabilidad máxima de 0.98.
*Chen et al. (2014)	<i>M. wufengensis</i>	Evaluar la diversidad y estructura genética en 10 poblaciones de la especie, así como la utilidad, similitudes y diferencias entre los marcadores empleados.	ISSR y SRAP	Se encontró una variabilidad genética alta entre poblaciones (87.7 % con ISSR y 88% con SRAP) e intrapoblacional (74.9 % con ISSR y 74.6% con SRAP) no se encontró divergencia entre las poblaciones estudiadas y no se considera que las estén en riesgo, aunque la especie es rara.
*Budd et al. (2015)	<i>M. acuminata</i>	Estudiar la diversidad genética entre poblaciones conservadas y fragmentadas.	SSR en ADN nuclear y cloroplástico	Las poblaciones fragmentadas presentaron una ligera disminución en diversidad genética respecto a las conservadas
Kelleher y Diskin (2017)	<i>M. delavayi</i>	Establecer si un grupo de especímenes de la especie pertenecen a un solo genotipo.	RAPD y secuenciación de fragmentos	Se encontró que los especímenes contienen dos distintos genotipos, la evidencia genética sugiere que los dos linajes tienen orígenes distintos.
*Medrano-Hernández et al. (2017)	<i>M. mexicana</i>	Evaluar la variabilidad genética en dos poblaciones de la especie.	ISSR	Se encontró un 86 % de polimorfismos y una variabilidad intrapoblacional del 90.88 %. Se separaron las colectas por su origen geográfico.
* Muñiz-Castro (2017)	<i>M. pacifica</i> , <i>M. pugana</i> y <i>M. vallartensis</i>	Analizar los límites de cada especie dentro del "complejo <i>M. pacifica</i> " y evaluar diversidad genética entre poblaciones.	ISSR	Se pudo diferenciar entre <i>M. pacifica</i> y <i>M. pugana</i> , mientras que <i>M. vallartensis</i> muestra una divergencia incipiente de <i>M. pacifica</i> . Se encontró una alta variación genética intra (83%)
*Kohn et al. (2018)	<i>M. ashei</i>	Evaluar la diversidad genética en 11 poblaciones de la especie, 14 fuentes cultivadas, cinco accesiones y tres híbridos.	SSR	Se encontró un alto nivel de heterocigocidad dentro de las poblaciones y una clara distinción entre poblaciones por su origen geográfico

Notas: * Trabajos con enfoque a la conservación de las especies. ISSR (intersecuencias simples repetidas), SSR (secuencias simples repetidas), SRAP (polimorfismos amplificados de secuencia relacionada), RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar) y AFLP (polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados).

2.3. Cultivo *in vitro*.

La micropropagación o cultivo *in vitro*, se basa en el principio de totipotencia de las células vegetales, que asume que cualquiera de ellas contiene toda la información genética de la planta a la que pertenece, por lo que es potencialmente capaz de regenerarla por completo (Calva y Pérez, 2005).

Esta biotecnología, consiste en la producción de plantas a partir de partes seccionadas muy pequeñas, tejidos ó células, establecidos de forma aséptica en un recipiente en el que puedan controlarse estrictamente las condiciones ambientales y de nutrición (Hartmann y Kester, 1995); y puede ser aplicable en estudios de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines, para la bioconversión y producción de compuestos, inducir variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos, propagación masiva de plantas, conservación e intercambio de germoplasma, entre otras posibilidades (Mroginski y Roca, 1991).

Las primeras experiencias en micropropagación se remontan a 1902 con el fisiólogo alemán Gottlieb Haverlandt, quien se considera el padre del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Calva y Pérez, 2005), pero fue hasta casi treinta años después que los investigadores pioneros en estas técnicas, Nobecourt, Gautheret y White, reportaron definitivamente la posibilidad de cultivar células vegetales al mantener callo regenerado en un medio sintético (Hartmann y Kester, 1995; Calva y Pérez, 2005).

Otro hito en la materia, lo marcaron tanto el descubrimiento de las fitohormonas en la década de 1950, como el desarrollo de medios de cultivo base a partir de la década de

1960, lo que promovió grandemente el cultivo *in vitro* de muchas especies de interés comercial (González, 2008; Thorpe, 2007).

Hoy, el cultivo de tejidos, junto con la biología molecular, es una herramienta básica en el estudio de las plantas y sus áreas de aplicación, que sin duda ha estimulado el progreso científico en biotecnología vegetal y posiblemente dirigirá el rumbo no sólo hacia una agricultura sustentable y ambientalmente estable (Thorpe, 2007) sino hacia la recuperación de especies vegetales que actualmente se encuentran en riesgo de desaparecer.

2.3.1. Etapas del proceso de micropropagación.

La micropropagación de plantas incluye cuatro etapas principales:

1) Establecimiento del cultivo: consiste en asentar asépticamente un explante en un medio de cultivo adecuado y lograr que prospere; generalmente es la fase más complicada del proceso y depende de muchos factores, que incluyen la selección apropiada del explante y lograr mantenerlo libre de contaminantes, así como la elección y mantenimiento de factores abióticos como temperatura, luz, humedad y pH óptimos para la especie que se desea propagar. La correcta elección del tipo y consistencia del sustrato nutritivo y su preparación adecuada son críticos en esta etapa; y en algunos casos, es muy importante considerar incluso una etapa previa, etapa 0, que involucra la selección y preparación de la planta madre, así como el acondicionamiento de los explantes previo al establecimiento (Hartmann y Kester, 1995; Cruz, 2012). Como una especie de regla general, aunque no estricta, Hartmann y Kester (1995) mencionan que, en esta etapa, si se desean obtener brotes axilares

y poca formación de callo, se necesita una alta proporción de citocinina contra auxina en relación 100:1; mientras que si se desean brotes adventicios se usan cantidades similares de ambos tipos hormonales, pero en concentraciones bajas.

2) Proliferación: esta etapa implica el desarrollo y multiplicación de vástagos o brotes para su posterior enraizamiento y lograr mantener e incluso aumentar, una tasa de proliferación adecuada y constante de brotes adventicios, con fines de propagación masiva. El éxito de esta etapa es la producción de brotes de tamaño adecuado, características homogéneas y con alta capacidad de recuperación una vez que son transferidos para subcultivos de proliferación o enraizamiento (Hartmann y Kester, 1995; Cruz, 2012).

En esta etapa, el medio generalmente es rico en citocininas y no es importante la generación de raíces; como fuente de energía se suministra sacarosa ya que en esta fase las microplantas son heterótrofas a pesar de poseer pigmentos fotosintéticos. También, es importante determinar la masa crítica de tejido que es necesario para multiplicar, así como la técnica adecuada para dividir la masa proliferante y colocar las secciones resultantes en una posición y medio adecuados para que prosperen, además de cuidar la frecuencia de las transferencias a medio fresco para evitar su deterioro (Hartmann y Kester, 1995).

En la fase de multiplicación, sin importar la vía de regeneración empleada, es deseable evitar la formación de callo como forma indirecta de producción de brotes, a fin de evitar los riesgos de variación somaclonal (Cruz, 2012).

3) Enraizamiento: esta etapa prepara las microplantas producidas para su establecimiento fuera de la protección artificial; el primer cambio que ocurre es la variación hormonal para favorecer el desarrollo de raíces y el alargamiento caulinar, a través del aumento de las auxinas y la reducción tanto de citocininas como de la concentración de sales inorgánicas. Aquí se busca que la microplanta regenerada permanezca en estado de crecimiento activo e inicie la formación de nuevas hojas (Hartmann y Kester, 1995).

4) Aclimatación: aquí se transfiere la microplanta ya enraizada desde el medio aséptico a un medio adecuado para su crecimiento en invernadero y luego a un lugar definitivo fuera de él. En esta etapa se fomenta que el nuevo organismo regenerado se vuelva autótrofo, al desarrollar un buen entramado radical y brotes funcionales; así como que aumente su resistencia a la desecación y ataque de patógenos; por lo que al inicio de esta etapa se debe elevar la humedad relativa, tener un sustrato bien aireado y drenado que permita que las raíces se desarrollen rápidamente y mantener un buen control de organismos patógenos hasta que la microplanta adquiera cierto grado de resistencia (Hartmann y Kester, 1995).

2.3.2. *El explante.*

Un explante es un fragmento de un órgano o tejido vegetal, que se desea hacer prosperar y proliferar con fines diversos; la elección adecuada de éste depende de la especie que se desea propagar y del objetivo que se persiga. Casi cualquier parte de una planta, si contiene células nucleadas vivas, es susceptible de ser utilizada como explante y la mejor fuente de ellos son plantas jóvenes o en desarrollo, con crecimiento vegetativo vigoroso (Mroginski y Roca, 1991; Calva y Pérez, 2005; Cruz, 2012).

En la práctica se han utilizado células obtenidas a partir de callos o suspensiones líquidas, semillas, cotiledones, embriones, puntas meristemáticas, puntas de tallo, brotes adventicios, hojas, entrenudos, raíces, anteras, ovarios, pétalos e incluso tejidos altamente diferenciados provenientes de frutos (Hartmann y Kester, 1995; Mroginski y Roca, 1991).

2.3.3. Asepsia.

Antes de poder obtener una respuesta de los tejidos cultivados *in vitro*, se debe lograr la asepsia total del sistema de cultivo, ya que el ambiente que se crea para el establecimiento de un determinado tejido vegetal, también es propicio para la proliferación de bacterias y hongos, que pueden alterar el medio de cultivo, competir con el explante por los nutrimentos o destruirlo directamente; la contención de la contaminación es un aspecto que debe cuidarse durante todas las etapas del cultivo (Mroginski y Roca, 1991) porque acarrea pérdidas económicas y retraso en los tiempos de investigación o producción (Hernández y González, 2010).

Los contaminantes más comunes en micropropagación son los hongos y bacterias, aunque también se pueden presentar virus y microartrópodos. Dentro de las principales fuentes de contaminación están los propios explantes, sobre todo si no se tuvo control previo sobre la planta donante; así como el ambiente de trabajo y el personal que realiza las tareas de micropropagación, estos problemas se asentúan por el uso de técnicas deficientes de esterilización (Hernández y González, 2010; Cruz, 2012).

La desinfección lleva necesariamente un paso previo de lavado con diferentes tipos de detergentes o agentes tensoactivos, entre los cuales, el Tween 20, Tween 89, Triton y

Teepol, son de uso corriente a una concentración de 0.01%; además, existe una amplia gama de compuestos y sustancias químicas que se utilizan como desinfectantes en micropropagación: sin embargo, los más comunes son el etanol y el cloro comercial (NaOCl), por ser económicos y fáciles de conseguir; también, aunque con menos frecuencia, se usan el hipoclorito de calcio (Ca(OCl₂)) y el cloruro de mercurio (HgCl₂), entre otros; estas sustancias se utilizan solas o en combinación y tanto los tiempos como las concentraciones varían, de acuerdo a la especie, edad y consistencia del tejido sobre el que se apliquen (Hernández y González, 2010; Cruz, 2012).

El uso de sustancias microbidas es una estrategia complementaria en el proceso de desinfección, pero existe divergencia de opiniones respecto a su empleo por el posible desarrollo de resistencia de los patógenos; en este sentido, para que un microbida pueda ser utilizado en micropropagación, debería ser de amplio espectro, soluble, estable, no afectar el pH, no ser fitotóxico y preferentemente no ser utilizado en medicina clínica (Falkiner, 1990).

Los microbidas pueden ser generales o específicos como los fungicidas y antibióticos (Bogado, Bravo, Ayala, Sansberro y Luna, 2015). Dentro de los fungicidas son muchos los tipos de sustancias que se utilizan en micropropagación, como el procloraz, Imazalil, trifumizol, placobutrazol, Mancozeb, Benomil, entre otros (Ruzic, Vujovic, Milenkovic, Cerovic y Miletic, 2008; Hernández y González, 2010).

2.3.4. Control de oxidación y oscurecimiento de explantes.

Los problemas de oxidación fenólica se relacionan con frecuencia con problemas de contaminación, ya que ante la presencia de un patógeno, las plantas liberan diversas

defensas químicas, entre las que destacan los compuestos fenólicos, ya que están dispersos en toda la planta y tienen diferentes grados de toxicidad para las células de los patógenos, sin embargo un desequilibrio de estas sustancias puede desencadenar estrés oxidativo y ser letal para los propios tejidos de las plantas (Shalaby y Horwitz, 2015).

Sin embargo, la presencia de contaminantes no es el único factor desencadenante de respuestas oxidativas, factores mecánicos como las heridas, cortes ó abrasiones y factores como la intensidad lumínica, presencia de metales pesados ó químicos fuertes en el medio de cultivo, pueden desencadenar estrés oxidativo y nitrosativo que derive en el ennegrecimiento de los explantes, y se ha observado que los tejidos vegetales de plantas leñosas son más susceptibles que los tejidos herbáceos o de plantas jóvenes. (Azofeifa-Delgado, 2009).

También, se ha visto que el daño producido por exudados fenólicos es mucho más severo durante las primeras fases de cultivo y tiende a cesar cuando el explante ya se ha adaptado e inicia su crecimiento (Azofeifa, 2009; Hernández y González, 2010).

El control del ennegrecimiento, derivado del estrés oxidativo de los explantes se puede realizar desde el manejo de la planta donante al mantenerla en sombra y, durante el establecimiento *in vitro*, al conservar los explantes en condiciones de oscuridad o mediante la realización de transferencias frecuentes a medio fresco; otras estrategias incluyen la poda de tejido necrosado, uso de sellos de parafina, elección de medios de cultivo líquidos y el uso de diferentes agentes inhibidores de fenoles (AIFs) como carbón activado (CA), polivinilirrolidona (PVP), polivinil polipirrolidona (PVPP), ácido ascórbico (AA), cisteína (CIS), ditiotreitól, mercaptoetanol y tiosulfato de sodio (Azofeifa-Delgado, 2009).

2.3.5. Control de condiciones ambientales.

Las condiciones ambientales para trabajos de micropropagación deben controlarse de forma estricta, de manera que se permita el desarrollo uniforme de los explantes y puedan apreciarse las respuestas inducidas por el medio de cultivo. La luz y la temperatura son los factores más importantes que deben considerarse porque muchas enzimas involucradas en el desarrollo y metabolismo secundario son influenciadas por ellas y pueden modificar las respuestas morfogénicas (Mroginski y Roca, 1991; Azofeifa-Delgado, 2009). Mroginski y Roca (1991) y Marín (1997), mencionan que la mayoría de los cultivos se desarrollan entre 1000 a 5000 lux, de luz blanca con longitudes de onda larga, en un régimen habitual de 16/8 horas luz/oscuridad; con temperaturas entre 22 y 28 °C, con el aumento de entre 1 y 2 °C en el interior de los frascos debido a un efecto invernadero.

2.3.5. Medios de cultivo.

Existen innumerables formulaciones de medios de cultivos para diversas especies vegetales y todos contienen seis elementos constitutivos: a) una fuente de carbono, b) nutrimentos minerales, c) vitaminas, d) un agente gelificante, para el caso de medios semisólidos, e) reguladores de crecimiento y f) compuestos coadyuvantes, tales como AIFs, o fuentes nutritivas extra como el agua de coco, caseína hidrolizada, extractos de levadura o malta, entre otros (Krikorian, 1991; Mroginski y Roca, 1991).

Hay una gran variedad de mezclas de sales basales y vitaminas, formuladas para la micropropagación específica de distintas especies, por ejemplo, la mezcla para cultivo de rododendro (RM), mezcla para soya (B5), mezcla para vides (VM), mezcla para plantas leñosas (WPM), mezcla para olivo (OM), entre muchas otras, que luego han probado ser

útiles para propagar especies para las que no fueron formuladas; sin embargo, la mezcla propuesta por Murashige y Skoog (1962) es sin duda la más utilizada para la propagación *in vitro* de todo tipo de especies (Hartman y Kester, 1995, Sokolov et al., 2014).

2.3.6. Reguladores de crecimiento (RCs).

Se trata de moléculas orgánicas difusibles que, como indica su nombre, regulan procesos de crecimiento y desarrollo vegetal; el tipo de respuesta que producen depende de la especie, el tipo y grado de desarrollo del órgano o tejido vegetal sobre el que actúen, las concentraciones endógenas de estos compuestos en el explante y las interacciones de estos compuestos con los distintos factores del ambiente artificial (Llorente, 2000). Jordán y Casaretto (2006), mencionan que el término “regulador de crecimiento” hace referencia a sustancias sintéticas que actúan como fitohormonas, pero son de naturaleza diferente y son desconocidas o nunca codificadas por el metabolismo celular, pero que pueden ser reconocidas por receptores específicos de hormonas naturales, aunque de manera general, la literatura maneja ambos términos como sinónimos.

Algunas veces el explante es capaz de responder con su dotación endógena de reguladores, pero en la mayoría de los casos éstos deben ser agregados al medio de cultivo. Existen tres grupos principales: auxinas, citocininas y giberelinas (Mroginski y Roca, 1991; Cruz, 2012).

- a) Auxinas: estas sustancias químicas son capaces de regular el crecimiento y división celular, así como promover la diferenciación de raíces en los tejidos bajo cultivo; pero de forma natural intervienen en el tropismo a la luz y gravedad, la dormancia apical, crecimiento de partes florales y diferenciación de tejidos

vasculares. Las más utilizadas son el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido α -naftalenacético (ANA), el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2.4-D) (Llorente, 2000; Cruz, 2012).

- b) Citocininas: tanto las naturales como las sintéticas tienen como base la adenina y actúan promoviendo la división celular, iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis, demoran la senescencia y activan yemas laterales en dormancia (Jordán y Casaretto; 2006). Las de uso común son la bencil adenina (BA), kinetina (KIN), zeatina (ZEA), n-isopentil adenina (2iP), bencil amino purina (BAP) y thidiazuron (TDZ) (Llorente, 2000; Jordán y Casareto, 2006).
- c) Giberelinas (GAs): estas hormonas inducen el crecimiento en altura, promueven el desarrollo súbito de inflorescencias y la floración, inducen la germinación de semillas en dormancia, están involucradas en la movilización de reservas en granos de cereales, promueven el desarrollo de los frutos e inducen partenocarpia (Jordán y Casareto, 2006). El ácido giberélico (GA₃) es el más utilizado en cultivo *in vitro*, aunque en general, en menor medida que la citocininas y auxinas (Llorente, 2000).

2.3.7. Respuestas morfogénéticas.

2.3.7.1. Organogénesis.

Es la inducción a la formación de yemas o meristemas radicales a partir de hojas, escamas de bulbos, tallos, raíces u otros órganos. Se forma un primordio unipolar, meristemo, a partir del cual se desarrolla un brote vegetativo que mantiene una conexión con el tejido materno; los brotes obtenidos son luego enraizados. Se llama organogénesis directa cuando el nuevo brote se forma inmediato al tejido madre; en cambio, es indirecta

cuando la formación del brote se produce a partir de una masa de células indiferenciadas llamada callo que se produjo primero en el explante, es decir, ocurrió un proceso de dediferenciación y multiplicación, seguido de una rediferenciación celular (Litz y Jarret, 1991; Hartmann y Kester, 1995).

2.3.7.1. Embriogénesis somática.

Embriogénesis somática: se induce la formación de embriones somáticos o adventicios, llamados así porque que no resultan de la fusión de gametos; estos poseen una estructura bipolar, es decir, con un eje radical-apical capaz de crecer y formar una planta entera. La embriogénesis somática se puede inducir en cualquier tipo de explante, a partir de células aisladas o callos, y a diferencia de la organogénesis, los embriones producidos no tienen conexión vascular con el tejido materno. Normalmente se utilizan medios con altas concentraciones de sales y sacarosa y la presencia de una auxina, aunque la de uso más extendido es el 2.4-D; la posterior maduración y germinación de los embriones se induce en un medio con una concentración reducida o nula de auxina y presencia reducida de nitrógeno (Litz y Jarret, 1991).

2.3.9. Ventajas del cultivo in vitro.

La capacidad de producir plantas en masa mediante técnicas de micropropagación, tiene obvias ventajas económicas cuando se trata de especies de interés comercial, pero también tiene ventajas ambientales cuando se trata de especies en peligro de extinción o que presentan dificultades para ser propagadas por otros medios; también brinda la posibilidad de conservar germoplasma de especies que por las características de sus

semillas no pueden ser almacenadas en bancos de semillas tradicionales (Hartmann y Kester, 1995; Segretín, 2006).

Con esta tecnología también es posible el mejoramiento vegetal a través de la producción de híbridos o la clonación de individuos con características agronómicas deseables, así como la obtención de plantas libres de patógenos y la producción masiva de metabolitos secundarios (Segretín, 2006).

2.3.10. La micropropagación de magnolias.

Las magnolias poseen bajas tasas de germinación de semillas y dificultades para el enraizamiento de varetas (Callaway, 1994), por lo que la micropropagación clonal ha cobrado fuerza como opción para la obtención de material vegetal en gran cantidad, libre de patógenos y con las características deseadas, que satisfagan la necesidad de contar con ejemplares que por la belleza de sus flores son altamente demandados con fines ornamentales (Parris et al., 2012; Sokolov et al., 2014) o bien para la conservación de especies de magnolias en peligro de extinción o de aquellas que poseen propiedades químico-farmacológicas de utilidad para el hombre (Merkle y Wiecko, 1990; Mata-Rosas y Jiménez-Rodríguez, 2006; Borah, Kumaria y Choudhury, 2017).

La primer planta de este género en ser micropropagada fue *M. x soulangiana* por Maene y Debergh (1985) y Kamenika (1996) y desde entonces se han realizado varios trabajos con diferentes especies; aunque Kim, Park, Park y Moon (2007) mencionan que el cultivo *in vitro* de magnolias aún no es lo suficientemente exitoso, ya que de acuerdo con Kamenika y Lanakova (2000), los tejidos de las magnolias son difíciles de desinfectar

además de presentar severos problemas de oxidación debidos a la presencia abundante de sustancias fenólicas (Parris et al., 2012).

Se han usado diferentes tipos de explantes en el establecimiento de cultivos de magnolia, tales como brotes juveniles, yemas axilares y apicales, tallos, hojas y embriones (Merkle y Watson-Pauley, 1993; Kamenika y Lanakova, 2000), aunque Wojtania, Skrzypek y Gabryszewska (2016) mencionan que las plantas de este género se propagan habitualmente por la activación de yemas axilares porque así se garantiza una alta estabilidad genética del material vegetal obtenido.

También, se ha visto que la mejor época para establecer explantes primarios de magnolias es el periodo de dormancia (Biederman, 1987; Sokolov et al., 2014; Kamenika y Lanakova, 2000) y que el éxito en la regeneración depende de la correcta elección del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento, porque existe evidencia de que la respuesta es de tipo genotipo-específica (Sokolov et al. 2014).

En el Cuadro 4 se enlistan algunos de los trabajos que se han realizado con la micropropagación de este grupo de plantas, y como se puede apreciar, las sales y vitaminas MS son las más utilizadas en magnoliáceas, aunque también se han probado las sales WPM, VM, B5, entre otras, en algunos casos con mejores resultados respecto al medio tradicional (Sokolov et al., 2014; Parris et al., 2012), así mismo, se aprecia el uso de una amplia variedad de explantes con tiempos de respuesta también diversos, que tienen en común problemas de contaminación para los que se han empleado métodos muy diversos de desinfección, así como problemas de oxidación.

Cuadro 4. Estudios realizados sobre la micropropagación de diversas especies de magnolias.

Autor	Especie	Metodología empleada	Resultados/Notas relevantes
Merkle y Watson-Pauley (1993)	<i>M. macrophylla</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Desinfección:</u> Etanol 70 % 20" + ®Roccal 10% por 1' + Cloro comercial 100% por 5'+ enjuague con H₂O destilada estéril por 3' + HCl 0.01 M por 3' + 3 enjuagues con H₂O destilada estéril - <u>Explante:</u> semillas inmaduras bisectadas longitudinalmente. - <u>Medios:</u> sólido pH <ul style="list-style-type: none"> a) Inducción en MS + 9.0 µmol/l 2.4 D + 1.1 µmol/l BAP + 1 g/l de hidrolizado de caseína + 40 g sacarosa/l. b) Proliferación: MS +1 g/l de hidrolizado de caseína + 40 g sacarosa/l. c) Germinación: MS + 40 g sacarosa/l. - <u>Incubación:</u> 22 °C, en oscuridad y luego 16/8 horas luz. 	<ul style="list-style-type: none"> - La contaminación excedió el 50 %. - Los explantes sobrevivientes produjeron un bajo crecimiento de callo compuesto por células vacuoladas. - Aunque se produjeron muchos embriones, no se desarrollaron más allá de la etapa globular. - Se pudo incrementó el número de embriones con el medio basal en estado líquido en un agitador giratorio en condiciones de oscuridad, transfiriendo a medio nuevo cada 3 semanas, aunque estos tuvieron muchas malformaciones.
Merkle y Watson-Pauley (1994)	<i>M. pyramidata</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Desinfección:</u> Etanol 70 % 20" + ®Roccal 10% 1' + Cloro comercial 100% 5'+ 3 enjuagues con H₂O destilada estéril + HCl 0.01 M 3' + 3 con H₂O destilada estéril - <u>Explante:</u> Semillas inmaduras bisectadas longitudinalmente. - <u>Medios:</u> sólido pH <ul style="list-style-type: none"> a) Inducción en MS + 9.0 µmol/l 2.4 D + 1.1 µmol/l BAP + 1 g/l de hidrolizado de caseína + 40 g sacarosa/l (mantenidos en oscuridad a 22°C, transferidos cada mes). b) Proliferación: MS +1 g/l de hidrolizado de caseína + 40 g sacarosa/l. c) Germinación: MS + 40 g sacarosa/l. d) Aclimatación: en ®Peat-lite en contenedores, con HR 100%, y fertilizante ®Hoagland suplementado con hierro y sales menores MS. - <u>Incubación:</u> 21 °C, en oscuridad y luego 16/8 horas luz. 	<ul style="list-style-type: none"> - Producción de embriones somáticos siete semanas después de iniciado el cultivo. - Un promedio de 35% de los explantes produjo callos embriogénicos - Los embriones en estado cotiledonar no germinaron en medio con caseína hidrolizada. - La tasa de conversión de germinantes en plántulas fue dos veces más rápida en maceta que <i>in vitro</i>. - Las plantas en maceta fueron más vigorosas que las de la misma edad mantenidas <i>in vitro</i>.

Cuadro 4. Continuación.

Autor	Especie	Metodología empleada	Resultados/Notas relevantes
Kamenika y Lanakova (2000)	<i>M. x soulangeana</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Desinfección</u>: HgCl₂ (0.1 a 0.3 %) + 3 gotas Tween 20 (0.03 a 0.05 %) por 5-7', + Etanol 70 % por 20" + 3 enjuagues en H₂O destilada estéril. - <u>Explante</u>: brotes apicales de 7 a 10 cm. - <u>Medios</u>: sólido. <ul style="list-style-type: none"> a) Establecimiento: medio S* 50 y 100 % ó WPM 50 + 1.33 µmol/l BAP + 0.54 µmol/l ANA + 20 g/l azúcar. b) Enraizamiento: S + 4.9, 9.8, 14.7 ó 19.6 µmol/l IBA + 3 % de CA + 20 g/l azúcar. - <u>Incubación</u>: 20-24 °C, 16/8 horas luz. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se produjo respuesta en todos los tratamientos. - En el medio S al 100%, se obtuvo el mayor número de brotes y cantidad de biomasa. - Se observó que el pH incrementó conforme transcurría el tiempo. Un pH de 5.6 a 6.7 se considera óptimo para el cultivo de magnolias ya que prefieren suelo fértil con reacción alcalina.
Mata-Rosas et al. (2006)	<i>M. dealbata</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Desinfección</u>: Cloro comercial 30% v/v por 30' + 3 enjuagues con H₂O destilada estéril + eliminación sarcotesta + lavado con detergente por 20'+ Etanol 70 % por 2' + Cloro 30 % v/v por 20' + 3 enjuagues con H₂O destilada estéril * - - <u>Explante</u>: Semillas inmaduras bisectadas longitudinalmente. - <u>Medios</u>: sólido, pH 5.7. <ul style="list-style-type: none"> a) Inducción en *WPM ó *BM + Hierro MS + Hidrolizado de caseína (1g/l) + (0, 4.4, 8.9, 13.3 ó 22.2 µmol/l) BAP + (0, 0.5, 2.3 ó 4.5 µmol/l) 2.4-D b) Proliferación: WPM + 1 g/l PVP ó 1 g/l CA. c) Germinación: WPM + 1g/l CA. d) Aclimatación: en hojarasca + arcilla + perlita (1:1:1), en invernadero 30°C y 80-90% HR. - <u>Incubación</u>: 25 °C, en obscuridad y luego 16/8 horas luz. 	<ul style="list-style-type: none"> - La tasa más alta de formación de brotes en el medio WPM + 13.3 ó 22.2 µmol/l BAP + 2.26 µmol/l o en ausencia de 2.4-D. - Subcultivos en WPM + PVP evitaron la necrosis de los explantes. - 85 % de los explantes formaron embriones somáticos, cultivados en WPM con 2.3 ó 4.5 µmol/l de 2.4-D, 20% indujeron embriogénesis indirecta y 65% formaron embriogénesis directa. - La conversión de los embriones a plántulas se obtuvo con WPM sin reguladores. - Los cultivos expuestos a luz mostraron necrosis, no mostraron morfogénesis.
Reyes y Vázquez (2011)	<i>M. mexicana</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Desinfección</u>: lavado con detergente y fungicida, seguido de Ca(ClO)₂ al 4% y Rifampicin 200 mg/l. En campana se usó OH grado absoluto al 70%, NaClO al 10% y Tween 80. - <u>Explante</u>: yemas apicales de plantas de 1 año, yemas axilares y segmentos de hoja. - <u>Medio</u>: sólido con pH 5.7. 	<ul style="list-style-type: none"> - Eliminación del 90% de contaminantes en hojas y 66% en yemas. - Brotación en todos los tratamientos. - El medio b) estimuló la formación de células <i>de novo</i> en explantes de hojas.

Cuadro 4. Continuación.

Autor	Especie	Metodología empleada	Resultados/Notas relevantes
Radomir et al. (2012)	<i>M. stellata</i> y <i>M. x soulangeana</i>	<p>a) MS ½ + 0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l KIN + 0.5 mg/l AIA. b) MS ½ + 2,4-D 1 mg/l + 1 mg/l KIN - <u>Incubación:</u> 25 ± 2 °C, 35% HR, 16/8 horas luz.</p> <p>- <u>Desinfección:</u> Etanol 94 % 10' + Ca(ClO)2 6% por 20'. - <u>Explante:</u> yemas apicales o axilares en dormancia. - <u>Medios:</u> sólido, pH 5.6-5.8. a) Establecimiento: MS + vitaminas MS, **JQ ó ***LS 100% + distintas concentraciones de BAP (0.25 a 1 mg/l) + 0.25 mg/l ANA. b) Proliferación: MS + vitaminas MS ó ****M + 0.25 ó 5 mg/l de BAP, 2ip, TDZ ó KIN. c) Enraizamiento: MS ½ + Vit LS + IBA (0 a 14 mg/l) + 0.1 mg/l GA₃ <u>Incubación:</u> 22-24 °C, 16/8 horas luz.</p>	<p>- La respuesta a las diferentes concentraciones de KIN no pudo evaluarse por problemas de oxidación de los explantes.</p> <p>- Mayor número de explantes iniciados, en el medio con vitaminas LS + 0.7 ó 0.5 mg/l BAP + 1 mg/l ANA + 0.1 mg/l GA₃ + 5 mg/l ácido ascórbico. - Mayor proliferación en MS 100% + vitaminas M + 0.5 mg/l BAP ó 0.5 mg/l KIN. - TDZ y 2ip no sirvieron para multiplicación. - El mejor medio paara enraizamiento fue con MS ½ + vitaminas LS + 4mg/l de IBA + 0.1 m/l GA₃.</p>
Sokolov et al. (2014)	<i>M. x soulangeana</i> , <i>M. liliflora</i>	<p>- <u>Desinfección:</u> lavado en agua corriente + 0.1 % HgCl₂ (3') + enjuague en H₂O destilada estéril. - <u>Explante:</u> yemas axilares en dormancia. - <u>Medios:</u> sólido con pH 5.8. a) Establecimiento: MS y vitaminas 100% con distintas concentraciones de BAP (0.25 a 1 mg/l) y 0.25 mg/l ANA. b) Proliferación: MS, RM, VM, B5, DKW ó WV3 + 0.5 mg/l BAP + 0.25 mg/l ANA. c) Enraizamiento: MS + 2 mg/l ANA. - <u>Incubación:</u> 25 ± 2 °C, 16/8 horas luz.</p>	<p>- Todos los tratamientos indujeron regeneración. - Regeneración más alta (60-75%) con 0.25 g/l BAP. - En la fase de multiplicación el medio VM produjo los mejores resultados. - Se infiere respuesta de tipo genotipo-específica. - BAP causó ennegrecimiento. - ANA causó ennegrecimiento y formación de callo.</p>
Wojtania et al. (2015)	<i>M. x soulangeana</i>	<p>- <u>Explante:</u> Yemas axilares y apicales. - <u>Medios:</u> sólido con pH 5.6. a) Establecimiento: MS y vitaminas 100 % + 1-1.5 mg/l BAP.</p>	<p>- Tasa más alta de multiplicación (4.8 brotes/explante) en el medio con 0.2 mg/l BAP y 20 g/l sacarosa. - En 20 g/l sacarosa y 1 mg/l BAP se tiene baja respuesta o efecto inhibitorio de los brotes, en de-</p>

Cuadro 4. Continuación.

Autor	Especie	Metodología empleada	Resultados/Notas relevantes
Wojtania et al. (2016)	<i>M. x</i> "Spectrum"	b) Proliferación: tratamientos con KNO ₃ :NH ₄ NO ₃ (100/100 y 75/50) + sacarosa 20 ó 30 g/l + BAP (0.0, 0.2, 0.5 y 1.0mg/l). - <u>Incubación:</u> 23 °C, 16/8 horas luz. - Se evaluó contenido de fenoles.	pendencia de la concentración de sales nitrogenadas. - A bajas concentraciones de azúcar y sales nitrogenadas, incrementar BAP produce ennegrecimiento de hojas. - Mayor inhibición de brotes en medio conteniendo 30 g/l sacarosa, sales nitrogenadas reducidas y 1.0 mg/l BAP. - Medio con una alta proporción azúcar/nitrógeno estimula la producción de fenoles.
		- <u>Explante:</u> yemas axilares en dormancia. - <u>Medios:</u> sólido con pH 5.6. a) Establecimiento: MS y vitaminas 100% + 1.0 – 1.5 mg/l BAP. b) Proliferación: MS y vitaminas 100% + 0.3 mg/l BAP + 0.1 a 1 mg/l GA ₃ + sacarosa 20 o 30 g/l + KNO ₃ /NH ₄ NO ₃ 100/100% ó 75/50%. c) Enraizamiento: MS + 2 mg/l ANA. - <u>Incubación:</u> 23 ± 2 °C, 16/8 horas luz. - Se analizaron enzimas solubles y actividad de enzimas antioxidantes.	- El tratamiento con 0.1 y 0.5 mg/l de GA ₃ en un medio con BAP, 20 g/l de sacarosa y niveles reducidos de sales nitrogenadas produjo los niveles más altos de proliferación. - Importante interacción entre GA ₃ , sacarosa y nitrógeno en la respuesta morfológica y bioquímica. - El GA ₃ incrementó la formación de brotes en coincidencia con el incremento de azúcar soluble y la actividad de enzimas antioxidantes. - La formación de brotes en respuesta al GA ₃ podría estar relacionada con el tipo de azúcar.

*WPM = medio para plantas leñosas de Loyd y McCown (1980)

*BM = medio Blaydes (1966)

*S= medio de Standardi y Catalano (1985).

**JQ= vitaminas Jaquoit (1956).

***LS= vitaminas Linsmaier y Skoog (1965).

****M= vitaminas Miller et al. (1982).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La *Magnolia mexicana* es una especie de importancia ecológica, medicinal e histórica, con potencial de aprovechamiento económico debido a la calidad de su madera y belleza de sus flores; sin embargo, su continuidad como especie se encuentra en riesgo por la pérdida de su hábitat, así como por la depredación de sus partes y derivados. Se suma al problema la escasez de información actualizada que permita delimitar de forma precisa su área de distribución, información necesaria para definir zonas de acción para su protección; esto debido a confusiones a nivel taxonómico de la especie con otras de su mismo género recientemente agregadas al inventario de las magnolias nacionales (Vázquez-García et al., 2012b; Vázquez-García et al., 2012a; Vázquez-García et al., 2013b y Vázquez-García et al., 2013c) así como a causa del uso del término *Yoloxóchitl*, que se relacionó con *M. mexicana*, para nombrar a otros miembros de la familia Magnoliaceae en México (Waizel, 2002). En este sentido, un caso de estudio se establece por la presencia de dos ejemplares, posiblemente de la misma especie, en el Estado de México, que plantean interrogantes sobre su correcta identificación morfológica que incidiría en su historia e incluso distribución, esto último al tenerse los primeros registros sobre el origen y permanencia de *M. mexicana* tanto en Veracruz como en lo que hoy son regiones de Morelos y la Ciudad de México (Hernández, 1577; Ximénez, 1615; De Candolle, 1818).

Otro factor que impide la recuperación de las poblaciones de esta especie, es la dificultad reportada para germinar sus semillas (Osuna, 1997; Hernández-Nájjarro, 2009; Becerra-Vazquez, 2010 y Gómez, 2011) y la falta de estudios para su propagación por otros métodos, lo que constituiría un obstáculo grave para futuros programas de conservación,

ya que a parte de los esfuerzos enfocados a la caracterización y recuperación del hábitat en sí mismo, del apoyo y orientación a las comunidades humanas en donde este recurso forestal se distribuye, del establecimiento de escudos legislativos, entre otros, cualquier programa de recuperación de las poblaciones del Yoloxóchitl estaría sujeto a la posibilidad de propagarlo de forma exitosa.

4. JUSTIFICACIÓN.

Se plantean dos disyuntivas asociadas con *M. mexicana*, por una parte la presencia de individuos que se ha asumido son de esta especie, sin haberse confirmado y que, de ser así, estarían fuera de su área de distribución natural, lo que se explicaría por sus antecedentes históricos; y, por otro lado, dificultades para su propagación exitosa.

En el primer caso, la comparación mediante estudios moleculares de los individuos de Yoloxóchitl presentes en el Estado de México con ejemplares de una población de *M. mexicana* conservada de Veracruz, daría claridad en cuanto a su identificación precisa; además aportaría información valiosa sobre la distribución e historia de esta especie.

Por otra parte, es urgente la búsqueda de alternativas que permitan su multiplicación acelerada en comparación con el procedimiento con semillas, que está limitado al periodo de fructificación natural de la especie y se complica por la condición intermedia de las semillas, que impide su almacenamiento en bancos de germoplasma. En este sentido, el cultivo de tejidos *in vitro* permitiría no sólo obtener una mayor cantidad de individuos en un tiempo reducido sino establecerse como una estrategia para la conservación de material genético de forma indefinida.

5. HIPÓTESIS.

1. Los ejemplares de Yoloxóchitl ubicados en dos municipios del Estado de México pertenecen a la especie *Magnolia mexicana*.
2. Basados en el principio de totipotencia de las células vegetales, es posible el establecimiento *in vitro* de *M. mexicana*.

6. OBJETIVOS GENERALES.

1. Establecer las relaciones moleculares existentes entre dos individuos de *Magnolia* sp. presentes en Malinalco y Zumpahuacán, Estado de México, con individuos de poblaciones de *M. mexicana* en Zongolica, Veracruz con el empleo de RAPDs.
2. Probar diferentes explantes y medios de cultivo para la propagación *in vitro* de *M. mexicana*.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Detectar polimorfismos presentes entre las distintas muestras de magnolias de las zonas en estudio con marcadores RAPDs.
2. Interpretar, a partir del análisis estadístico de los polimorfismos detectados, las relaciones genéticas de las muestras analizadas.

3. Evaluar en invernadero las respuestas germinativas de semillas con y sin sarcotesta, así como el enraizamiento de estacas de *M. mexicana* con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB).
4. Determinar un método de desinfección adecuado para los explantes de *M. mexicana*.
5. Evaluar el efecto de la bencilaminopurina (BAP), ácido naftalén acético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2.4-D) en la diferenciación celular de explantes de *M. mexicana*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Localización de los sitios de experimentación.

Los trabajos de caracterización molecular se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario Tenancingo de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicado en Tenancingo, Estado de México (18° 58'6.22''N, 99° 36'45.84''O; a 2,053 msnm).

Los ensayos de germinación de semillas y establecimiento de varetas se realizaron en las instalaciones del Centro Regional para la Conservación Biológica "Lauro Arteaga", ubicado en el municipio de Malinalco, Estado de México (18° 56'28.74''N, 99° 29'53.48''O; a 1,709 msnm),

Los experimentos con cultivo *in vitro* se realizaron tanto en el laboratorio de cultivo de tejidos de la empresa Servicios Integrales en Horticultura Ornamental (SIHO), en el

municipio de Villa Guerrero (18° 54'59.01''N, 99° 38'36.02''O; a 1,958 msnm); como en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM; ubicado en el Campus Universitario "El Cerrillo", Toluca, Estado de México (19° 24'33.85''N, 99° 41'25.35''O; a 2,607 msnm).

8.2. Sitios de colecta del material vegetal.

Se realizaron dos viajes al municipio de Zongolica, Veracruz, en los meses de febrero y agosto de 2017, donde se colectaron botones florales, flores, frutos, varetas, yemas axilares y hojas tiernas de árboles maduros de *M. mexicana* en relictos de selva en las comunidades de Acontla (18°31'27.1''N, 96°59'5.57''O; a 1,317 msnm) y La Quinta (18°39'6.72''N, 96°59'47.86''O; a 1,227msnm) pertenecientes al municipio de Zongolica en Veracruz (Figura 11).

También se colectaron hojas, frutos y flores de árboles de Yoloxóchitl, entre julio y agosto, en un predio particular en el municipio de Malinalco (18°57'7.21''N, 99°57'2.1''O; a 1,737 msnm) y en el átrio de la iglesia principal de Zumpahuacán (18°50'24.7''N, 99°35'15.3''O; a 1,667 msnm).

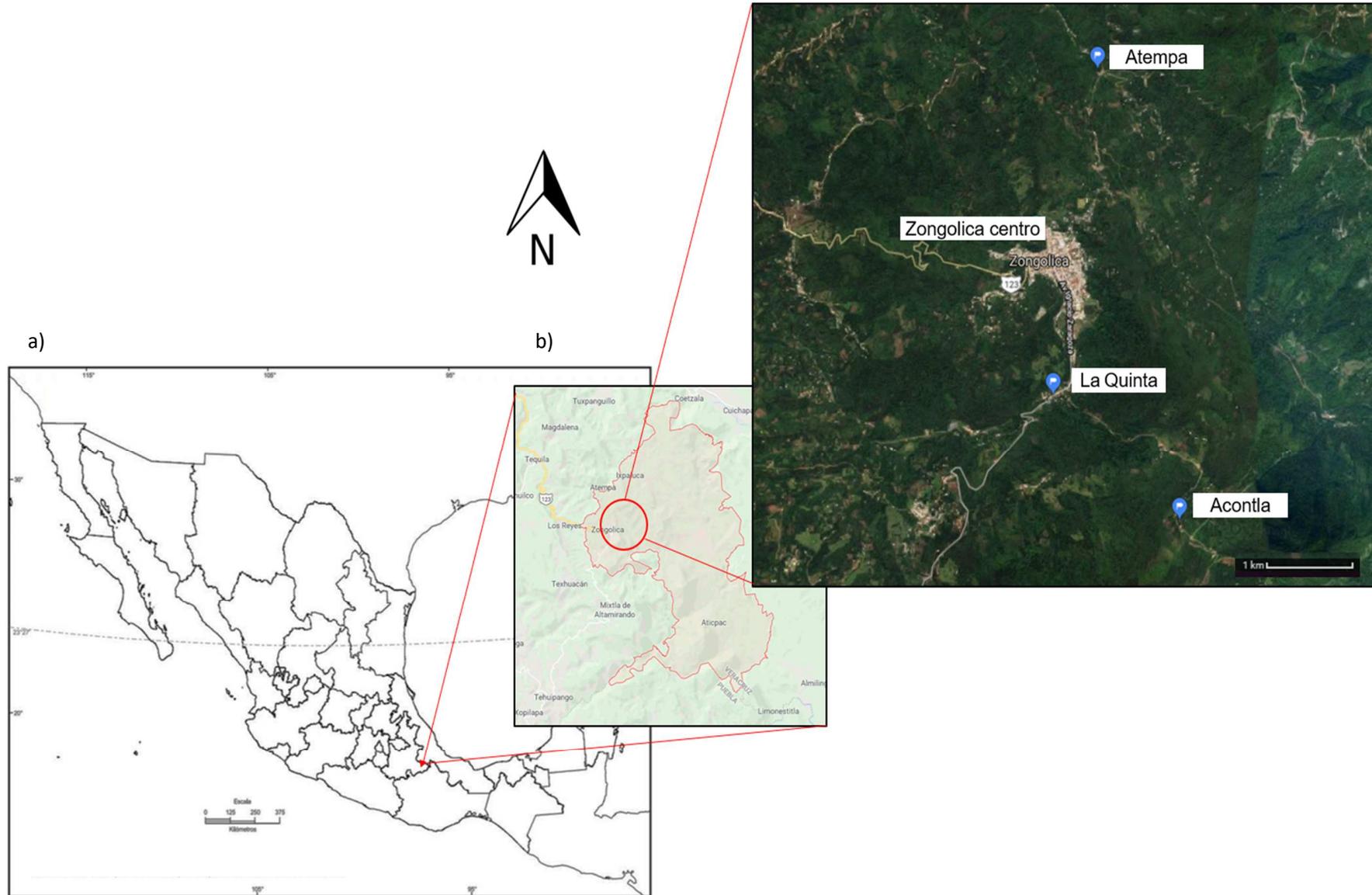


Figura 11. Mapa de ubicación de los sitios de colecta, a) en Veracruz, México, b) municipio de Zongolica en c) las comunidades Acontla, La Quinta y Atempa, (con imágenes de INEGI © y Google Earth©, 2018).

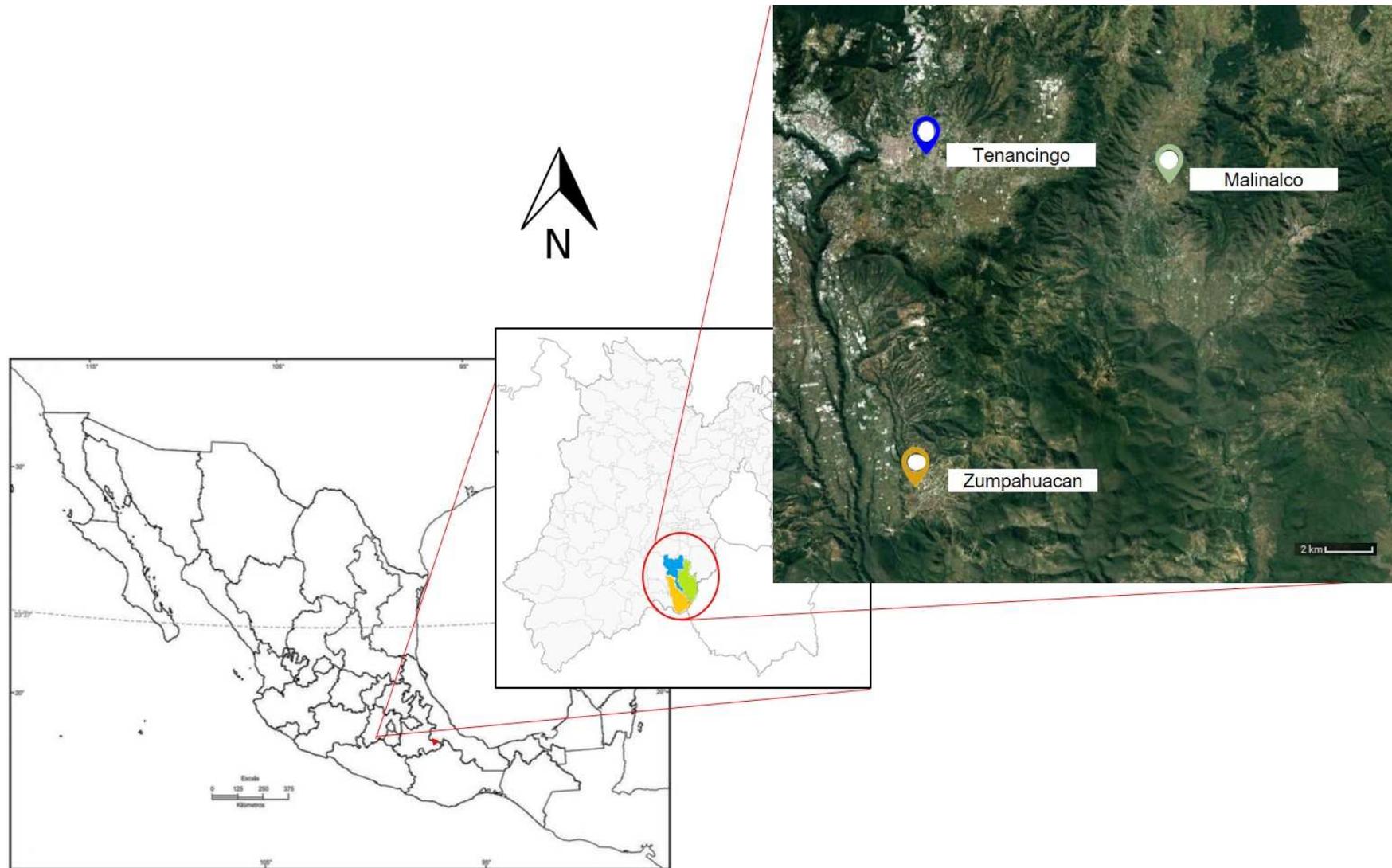


Figura 12. Mapa de ubicación los sitios de colecta en los municipios de Malinalco, Zumpahuacán y Tenancingo, en el Estado de México (con imágenes de INEGI © y Google Earth©, 2018).

Así mismo, y con el fin de tener elementos de referencia para el análisis molecular, se colectaron muestras de árboles de *M. grandiflora* en predios particulares en el municipio de Tenancingo (18 ° 58'6.22''N, 99 ° 36'45.84''O; a 2,053 msnm), del Estado de México; así como de *M. dealbata*, en un área selvática de la comunidad de Atempa en Zongolica (18 ° 41'0.82''N, 96 ° 59'43.9''O; a 1,215 msnm) (Figura 12).

8.3. Registro de datos morfológicos de los ejemplares.

Con el fin de tener elementos de contraste con los datos moleculares, durante las colectas se recabaron datos morfológicos de los árboles de Yoloxóchitl en Malinalco, Zumpahuacán y Zongolica.

Así mismo, a manera de testigo para evaluar la efectividad de los marcadores RAPD para distinguir entre especies, se utilizaron muestras de *M. dealbata* y *M. grandiflora*; las características morfológicas de estas dos especies en contraste con *M. mexicana* se pueden observar en el Anexo 2.

8.4. Caracterización molecular.

8.4.1. Extracción y análisis de integridad de ADN.

Se utilizó el protocolo para extracción de ADN con CTAB al 2% en plantas con alto contenido de fenoles reportado por Silva-Rojas, Uribe-Cortés, Aguirre-Rayó, Martínez-González y García-Morales (2015), con modificaciones (Anexo 3).

La presencia de ADN y su calidad se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, a 90 V por 90 minutos con buffer tris-borato-EDTA (TBE) concentrado 0.5x (Silva-Rojas et al., 2015; Fierro, 2007).

8.4.2. Reacción de PCR.

Se realizó la PCR con un paquete comercial (MyTaq™ de @Bioline), cada reacción incluyó: 11µl de MyTaq, 13µl H₂O destilada-desionizada libre de nucleasas (SIGMA™), 1 µl de cebador RAPD y 2 µl de ADN. Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un termociclador @Mastercycler gradient, bajo las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94 ° C.
2. 35 ciclos de: desnaturalización por 1 minuto a 94 ° C; alineación por 1 minuto a 36 ° C y extensión por 2 minutos a 72 ° C.
3. Extensión final por 7 minutos a 72 ° C.

8.4.3. Separación de los productos de PCR.

Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis, en geles de agarosa al 1.5 % y TBE 0.5x, en una celda electroforética de 48 cm de distancia ánodo-cátodo de la marca @Clever Scientific. Los geles corrieron durante 10 horas a 70 V, con Gelred (Biotium™) como tinte fluorescente para ácidos nucleicos.

A falta de datos suficientes y específicos de RAPDs en *Magnolia* sp., se ensayaron 48 cebadores de 10 bases disponibles previamente, de @Operon Technologies, sobre una muestra de ADN seleccionada al azar y se eligieron 14 que amplificaron bandas polimórficas (Cuadro 5), los cuales se utilizaron posteriormente de forma individual en un juego de 18 muestras de ADN de las magnolias bajo estudio (Cuadro 6).

Cuadro 5. Secuencias de los iniciadores RAPD utilizados en la amplificación del ADN de 18 muestras de *Magnolia* sp.

No.	RAPD*	SECUENCIA
1	OPA6	5'-GGTCCCTGAC-3'
2	OPA7	5'-GAAACGGGTG-3'
3	OPA8	5'-GTGACGTAGG-3'
4	OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'
5	OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'
6	OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'
7	OPA16	5'-AGCCAGCGAA-3'
8	OPB1	5'-GTTTCGCTCC-3'
9	OPB3	5'-CATCCCCCTG-3'
10	OPB10	5'-CTGCTGGGAC-3'
11	OPB17	5'-AGGGAACGAG-3'
12	OPB19	5'-ACCCCCGAAG-3'
13	E18	5'-GGACTGCAGA-3'
14	C08	5'-TGGACCGGTG-3'

Cuadro 6. Clave, especie y origen de muestras de ADN de *Magnolia* spp., utilizadas en el estudio.

NO.	CLAVE	ESPECIE	SITIO DE COLECTA
1	Md1	<i>M. dealbata</i>	Atempa, Zongolica, Veracruz.
2	Md2		
3	MS1	<i>M. grandiflora</i>	Santo Desierto, Tenancingo, Edo. Mex.
4	MS2		
5	MC1		
6	MC2		
7	Mali	<i>Magnolia</i> sp.	Malinalco, Edo. Mex.
8	Zum		Zumpahuacán, Edo. Mex.
9	Mm1	<i>M. mexicana</i>	La Quinta, Zongolica, Veracruz.
10	Mm2		
11	Mm3		
12	Mm4		
13	Mm5		
14	Mm6		
15	Mm7		
16	Mm8		
17	Mm9		
18	Mm10		

8.4.4. Análisis estadístico.

A partir de los geles generados con cada cebador (Anexo 2), se construyó una matriz de datos binarios; se marcó con 1 la presencia y con 0 la ausencia de amplicones en cada banda polimórfica. La lectura de cada gel fue realizada por una sola persona, con la pantalla del ordenador como medio de visualización.

8.4.4.1. Análisis de la eficiencia de los cebadores RAPD.

Una vez que se generó la matriz, se realizó el análisis de la eficiencia de cada cebador con los siguientes indicadores:

- Número de bandas polimórficas: se contabilizó el número de bandas que están presentes en una frecuencia mayor al 1% y menor al 100%; se consideran como monomórficas las que están presentes en la totalidad de los patrones génicos (Luna-Martínez, Flores-Martínez y Ponce-Noyola, 2003).
- Número de amplicones por iniciador: se contabilizó el número de amplicones de ADN sintetizados por cebador en la PCR (FAO, 2010).
- Porcentaje de contribución: se calculó la proporción de amplicones revelados por cada cebador RAPD en relación a los demás utilizados.
- Porcentaje de polimorfismo: se determinó la proporción de bandas polimórficas y no polimórficas reveladas por cada cebador (Adhikari, Saha, Bandyopadhyay y Ghosh, 2014), como sigue:

$$\% \text{ polimorfismo} = (\text{loci polimórficos} / \text{loci totales}) \times 100$$

Contenido de información polimórfica (PIC): este indicador se refiere al grado de información que brinda un determinado cebador para distinguir entre genotipos; este valor es análogo a la estimación de diversidad genética (Laurentin y Karlovsky, 2007; González, Lozano, Cruz, Ochoa y Morillo, 2016). El valor del PIC

se encuentra entre 0 y 0.5 para marcadores dominantes, puesto que no permiten determinar heterocigocidad (De Riek, Calsyn, Everaert, Van Bockstaele y De Loose, 2001), y se calculó como sigue:

$$PIC = 1 - [f^2 + (1-f)^2]$$

Donde:

f = frecuencia de los fragmentos del marcador que estaban presentes.

(1-f) = frecuencia de los fragmentos del marcador que estaban ausentes.

- Índice del marcador (IM): Se calculó para determinar la utilidad total de cada cebador, como un equilibrio entre el nivel de polimorfismo detectado y la medida en que un ensayo puede identificar polimorfismos múltiples (Varshney, Chabane, Hendre, Aggarwal y Graner, 2005).

$$IM = PIC \times (\# \text{ bandas polimórficas})$$

- Poder de resolución: Este indicador depende de la distribución de alelos dentro de los genotipos muestreados y teóricamente asume la división de los genotipos analizados en dos grupos con base en la presencia o ausencia de una banda en una posición particular, de tal forma que el sistema de marcaje perfecto tendría una gran cantidad de bandas que dividirían el taxa en partes casi iguales. Así, entre mayor sea la cantidad de bandas que se consideren, mayor será la probabilidad de que dos de ellas puedan dividir los genotipos dentro de dos mitades complementarias (Prevost y Wilkinson, 1999).

Para calcular este índice, primero se determinó la Informatividad de la banda (I_b) con base en su similitud a la condición óptima teórica de que 50 % de los genotipos contengan la banda y se representa en una escala del 0 al 1 por la siguiente fórmula:

$$I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

Donde:

p = la proporción de todos los genotipos que contienen la banda.

Con este dato se calculó entonces la habilidad de cada cebador para distinguir entre los genotipos analizados:

$$R_p = \sum I_b$$

8.4.4.2. Construcción de dendrogramas.

Las relaciones genotípicas entre las muestras, a partir de la matriz de datos binarios, se evaluaron por medio del método de agrupación *Neighbour-joining* (Saitou y Nei, 1987), con el índice de similitud *Dice* (Nei y Li, 1979) y un remuestreo con reemplazo (*Bootstrap*) de los caracteres en la matriz de datos de 1,000 corridas, por medio del programa FreeTree (Pavlicek, Hrdá y Flegr, 1999). y se eligió el árbol de mayor consenso.

Posteriormente, se crearon dos dendrogramas por medio del programa FigTree (Page, 2001), el primero con todas las muestras de magnolias incluyendo las muestras de *M. dealbata* y *M. grandiflora*; y el segundo sólo con las muestras de Yoloxóchitl del Estado de México y Veracruz.

8.5. Cultivo *in vitro*.

Los trabajos de micropropagación de *M. mexicana* se dividieron en tres etapas:

1. Etapa 1: establecimiento de ensayos de germinación de semillas y enraizado de estacas para analizar problemas de propagación.
2. Etapa 2: establecimiento del método de desinfección de explantes, como un paso previo y necesario para la propagación *in vitro*.
3. Etapa 3: ensayos de micropropagación propiamente dichos.

8.5.1. Colecta del material vegetal.

Etapa 1.

La colecta de varetas se realizó en un solo día durante el mes de febrero de 2017. Se utilizaron tijeras de poda convencionales para separar segmentos de ramas de madera semidura, de aproximadamente 40 cm de largo con presencia de yemas axilares y mantenimiento de un peciolo con un cuarto de lámina foliar y se mantuvieron a la sombra dentro de una cubeta con agua limpia, de acuerdo con las recomendaciones de Aldana (2010). Para su transportación, el material fue envuelto en papel de estraza húmedo y se cubrió con plástico transparente para después ser empacadas en una caja térmica con bolsas de gel refrigerante (Figura 2).

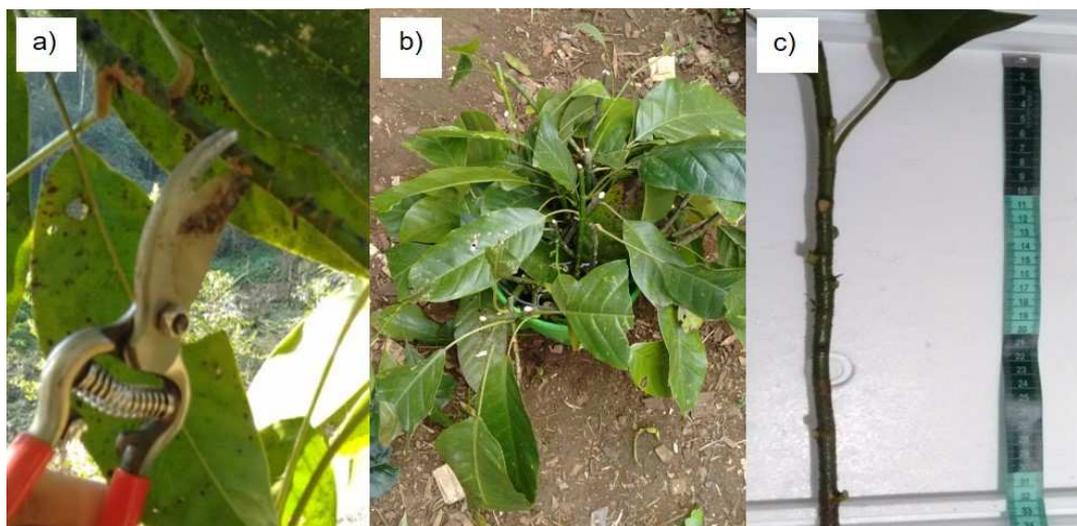


Figura 13. Colecta de varetas: a) corte de ramas de madera semi-dura con tijeras de poda convencionales, b) resguardo de las varetas durante las labores de colecta, c) aspecto de la vareta una vez colectada.

Para la obtención de semillas se colectaron frutos maduros de *M. mexicana*, aún sin abrir, que fueron guardados y transportados en una caja de cartón al sitio de experimentación. Tres días después de su colecta los frutos liberaron las semillas (Figura 14).

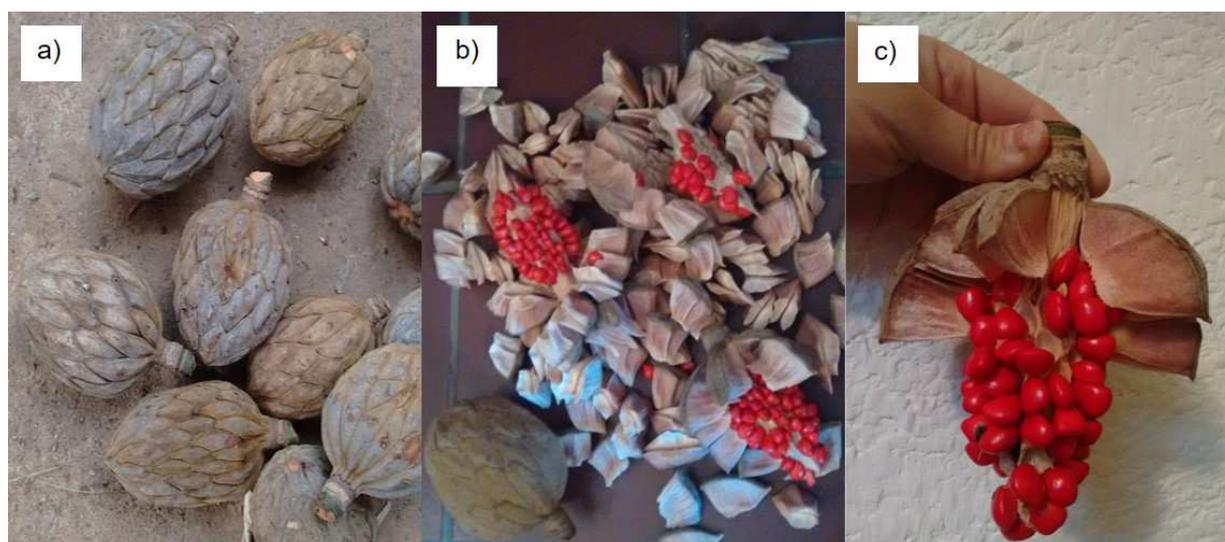


Figura 14. Obtención de semillas de *M. mexicana*: a) frutos maduros recién colectados, b) aspecto de los frutos en el momento de apertura y c) aspecto de las semillas aún adheridas al eje del fruto.

Etapas 2 y 3.

Como material para los experimentos de micropropagación, se colectaron yemas axilares, hojas y semillas, en árboles maduros de *M. mexicana* en los sitios de colecta. También se utilizaron yemas apicales, hojas cotiledonares, hojas y tallos de plántulas obtenidas durante la Etapa 1.

En general, la disponibilidad de material vegetal fue limitada por la lejanía del sitio de colecta, la escasés y dificultad de acceso a los árboles; los experimentos se ajustaron a estas condiciones, lo que limitó el número de repeticiones posibles para cada experimento.

8.5.2. Montaje de los experimentos.

8.5.2.1. Etapa 1: establecimiento de estacas y germinación de semillas.

Establecimiento de estacas.

Varetas de 30 cm de longitud y 1.2 cm de diámetro fueron inmersas por 5 s en una solución con fungicida comercial SPORTAK (Procloraz: N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi) etil]imidazol-1-carboxamida) a razón de 1ml/l y posteriormente tratadas por contacto en su base con ácido indol-3-butírico (AIB) ®RADIX en tres diferentes concentraciones (1.0 %, 0.15 %, 0.06 % y 0.0 (testigo)).

Las varetas se plantaron en bolsas negras de vivero de 1 l con sustrato de una mezcla de agrolita y turba en relación 1:1 (v/v). Las varetas se establecieron en invernadero en rejillas de 12 bolsas de capacidad. Se aplicaron dos riegos manuales diarios y se registró

la temperatura diariamente con un termómetro de máximas y mínimas ®Brixco, la cual osciló entre los 10 ° C la mínima y 35 ° C la máxima. Se verificó semanalmente el estado de las estacas durante un periodo de 2 meses.

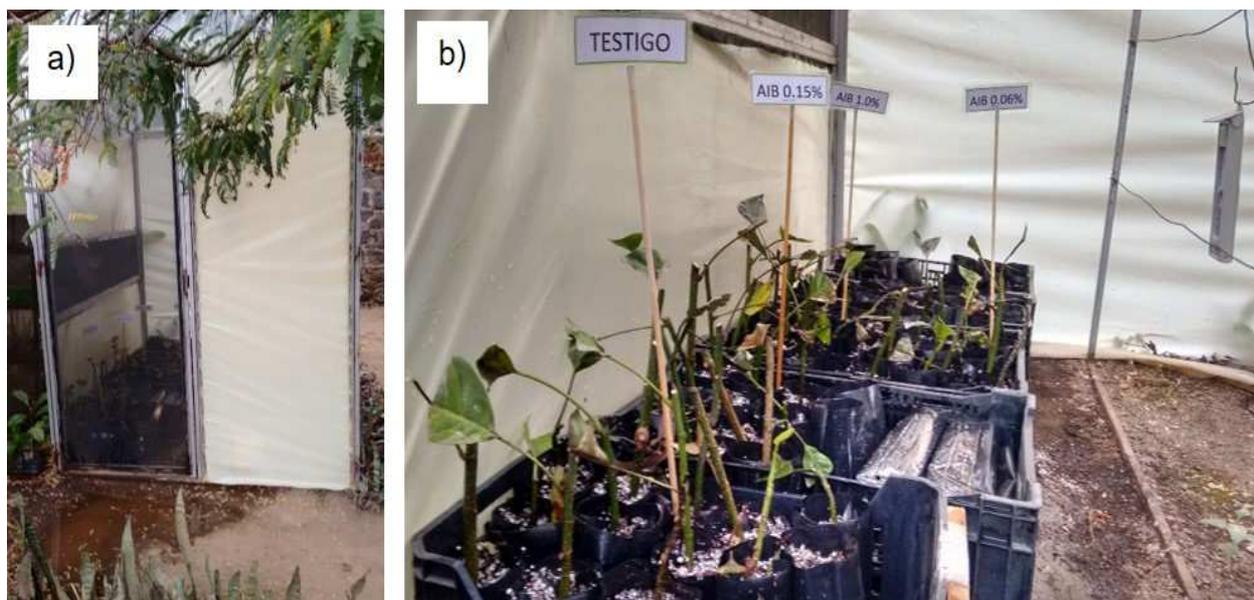


Figura 15. Montaje del ensayo con varetas: a) aspecto exterior del invernadero donde se estableció el experimento, y b) acomodo de varetas al interior del invernadero.

Germinación de semillas.

Las semillas se remojaron por 24 horas con agua purificada, de acuerdo con las recomendaciones de Osuna, Varela y Osuna (2015); posteriormente se retiró la sarcotesta a 26 semillas y se dejó la sarcotesta a otras 26, ambos grupos se sembraron de forma separada en charolas plásticas de 40 x 30 x 13 cm, que contenían una mezcla agrolita y turba en una relación de 1:1 (v/v).

La distancia de siembra entre semillas fue de 5 cm y a 3 cm de profundidad, de acuerdo con la recomendación de Osuna et al. (2015). Las charolas se colocaron en invernadero y se regaron abundantemente de forma manual cada tercer día.

Una vez germinadas las plántulas, cuando alcanzaron una longitud de 10 cm, fueron trasplantadas a macetas cilíndricas de 12 cm de diámetro x 10 cm de altura, con una mezcla de composta, turba y agrolita 1:1:1(v/v/v), mantenidas bajo condiciones de invernadero por 30 días más antes de sacarlas a las condiciones ambientales normales.

Los ensayos con varetas y geminación de semillas fueron totalmente aleatorizados y se realizaron únicamente como exploratorios, por lo que no hubo repeticiones y se analizaron por estadística descriptiva y método de Kruskal Wallis.

8.5.2.2. Etapas 2 y 3: micropropagación.

Todos los experimentos se realizaron bajo condiciones controladas, a una temperatura promedio de 25 ± 2 ° C, con un fotoperiodo 16/8 día/noche, una intensidad lumínica de $33 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, proveída artificialmente por lámparas tubulares fluorescentes de luz blanca fría de 30W; excepto en aquellos experimentos en donde se requirieron condiciones de obscuridad.

Todos los medios de cultivo fueron adicionados con 30 g/l de sacarosa, solidificados con 7 g/l de agar y el pH se ajustó a 5.8 con HCL 0.1 N ó NaOH 0.1 N.

8.5.2.2.1. Etapa 2. Establecimiento del método de desinfección para *M. mexicana*.

Para este experimento se utilizaron únicamente yemas axilares como explantes, provenientes de árboles maduros. Antes de ser sometidas a los distintos tratamientos y con el propósito de remover contaminantes externos, las yemas aún unidas a segmentos de tallo (de aprox. 2 cm de largo), se sumergieron por 30 minutos en una solución de agua con detergente comercial al 1%, con agitación periódica, seguido de tres enjuagues con agua destilada, para posteriormente ser llevadas en papel secante a la cámara de flujo laminar, en donde se separaron las yemas del tallo con ayuda de un escalpelo estéril, de acuerdo con lo recomendado por Sokolov et al. (2014). Una vez separadas, las yemas se sometieron a los tratamientos descritos en el Cuadro 7.

Como unidad experimental se utilizó un solo explante contenido en un frasco de vidrio cilíndrico, de 8 cm de altura x 4 cm de diámetro; cubierto en la boca con papel aluminio sellado con plástico ®KleenPack. Para todos los tratamientos se emplearon, como medio de cultivo base, sales y vitaminas de MS al 100 %, adicionado con 0.25 mg/l de BAP.

En los tratamientos con cloro (T1 a T4) se realizaron tres lavados finales con agua destilada estéril; en los tratamientos T5 a T6, como paso final, los explantes se sumergieron en una solución con el fungicida y sin enjuague. Los fungicidas de los tratamientos T6 y T7 son para uso humano.

Transcurridos diez días, se registró el número de explantes contaminados, número de explantes oxidados (como presencia o ausencia) y número de explantes viables. El diseño experimental fue completamente aleatorizado y los datos obtenidos fueron

sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Duncan con un nivel de probabilidad de $p < 0.05$.

Cuadro 7. Métodos de desinfección probados para el establecimiento *in vitro* de *M. mexicana*.

Tratamientos	Descripción	Réplicas	Repeticiones
T1	+ NaClO 5% v/v (25')		
T2	®Sportak* (5') + 2 enjuagues H ₂ O destilada estéril (5' cada uno) + inmersión por 15' en	10	3
T3	®Microdyn** (15') sin enjuague		
T4	+ NaClO 20% v/v (25')		
T5	+ ®Erbitrax-T***		
T6	®Microdyn (15') sin enjuague + NaClO 20% v/v (25') + 3 enjuagues H ₂ O destilada estéril (5' cada uno)	10	3
T7	+ ®Aponistan V****		
Total:		70	210

* 0.5 ml Sportak (Prochloraz, 450 g/L) en 1l H₂O.

** 3.5 ml Microdyn (plata ionizada al 0.048%) en 1l H₂O.

*** 2 tabletas de Erbitrax-T (500 mg Terbinafina) en 100 ml H₂O.

**** 2 tabletas de Aponistan V (41.2 mg Nistatina) en 100 ml H₂O.

8.5.2.2.2. Etapa 3. Ensayos para la micropropagación de *M. mexicana*.

Ensayo 1. Efectividad de tres agentes inhibidores de fenoles en el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de *M. mexicana*.

Se utilizaron únicamente yemas axilares como explantes, y dado que este ensayo se realizó al mismo tiempo que el experimento para establecer el método de desinfección, se optó por una desinfección de la siguiente forma: las yemas aún unidas a segmentos de

tallo (de aprox. 2 cm de largo), se lavaron con jabón antibacterial comercial ®Lysol al 10 % por 30 minutos con agitación periódica, seguido de un enjuague con agua corriente por 20 minutos; las yemas se llevaron en papel secante a la cámara de flujo laminar, en donde se separaron del tallo con ayuda de un escalpelo estéril, de acuerdo con lo recomendado por Sokolov et al. (2014); posteriormente se pasaron a un recipiente que contenía etanol al 96 % por un minuto, pasado este tiempo se sumergieron en NaClO al 5 %, durante 15 minutos con agitación cada cinco minutos, finalizando con dos enjuagues con agua destilada estéril.

Los explantes se colocaron de forma individual en tubos de ensayo de 20 x 1.8 cm para los que se utilizó como cubierta papel aluminio sellado con ®Kleenpack. Se probaron carbón activado (CA), ácido ascórbico (AA) y polivinilpirrolidona (PVP), que son los agentes inhibidores de fenoles más utilizados en cultivo de tejidos, combinados con condiciones de oscuridad repartidos en seis tratamientos diferentes (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tratamientos con tres agentes inhibidores de fenoles y condiciones de oscuridad probados en el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de *M. mexicana*.

Tratamientos	Descripción	Réplicas	Repeticiones
T1	Carbón activado 2g/l		
T2	Carbón activado 2g/l + oscuridad		
T3	PVP* 1g/l		
T4	PVP 1g/l + oscuridad	10	1
T5	Ácido Ascórbico 400 mg/l		
T6	Ácido Ascórbico 400 mg/l + oscuridad		
Total		60	60

* PVP= polivinilpirrolidona.

El medio de cultivo base constituyó de sales y vitaminas MS al 100 %, adicionado con 0.25 mg/l de BAP. Transcurridos diez días, se registró el número de explantes contaminados, número de explantes oxidados (como presencia o ausencia) y número de explantes viables. El diseño fue completamente aleatorizado y dado el limitado número de explantes disponibles, no se realizaron repeticiones.

Ensayo 2. Inducción de organogénesis en yemas apicales de *M. mexicana*.

El método de desinfección de las yemas fue el siguiente: lavado con detergente comercial al 1 % por 30 minutos con agitación periódica, seguido por tres enjuagues con agua destilada; los explantes fueron llevados a la cámara de flujo laminar en donde se sumergieron 15 minutos en una solución de Microdyn (plata ionizada al 0.048 %) según recomendaciones del fabricante (3.5 ml/l de agua); posteriormente se cambiaron a una solución de NaClO 20 % (v/v), durante 25 minutos con agitación periódica, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril, finalizando con una inmersión en una solución elaborada con 500 mg Terbinafina en 100 ml H₂O, sin enjuagar.

Los explantes se sometieron a cuatro distintos tratamientos, descritos en el Cuadro 9. Todos los tratamientos se adicionaron con 40 g/l sacarosa y 1 g/l PVP.

Como unidad experimental se utilizó un solo explante contenido en un frasco de vidrio cilíndrico, de 8 cm de altura x 4 cm de diámetro; cubierto en la boca con papel aluminio sellado con plástico KleenPack. Una vez establecidos, todos los explantes se sometieron a una semana de obscuridad como prevención a la oxidación por fenoles. Se registró el número de explantes contaminados, explantes oxidados (como presencia o ausencia) y número de explantes viables, por un periodo de seis meses. El diseño fue

completamente aleatorizado. Dado el limitado número de explantes disponibles, no se realizaron repeticiones y los datos obtenidos fueron analizados con estadística descriptiva y método de Kruskal Wallis.

Cuadro 9. Composición de cuatro diferentes medios de cultivo para la activación de yemas axilares de *M. mexicana*.

Tratamientos	Descripción	Réplicas	Repeticiones
T1	+ 0.25 BAP		
T2	+ 0.25 BAP + 0.25 mg/l ANA		
T3	+ 0.5 BAP	10	1
T4	+ 0.5 BAP + 0.25 mg/l ANA		
Total		40	40

Notas: MS= sales basales de Murashige y Skoog (1962); BAP= 6-bencilaminopurina; ANA= ácido α -naftalenacético; PVP= polivinilpirrolidona.

Así mismo, se enviaron a realizar preparaciones histológicas de una yema axilar de *M. mexicana* derivada del tratamiento M4, en el Laboratorio de Apoyo a la Investigación, del Instituto de Biología de la UNAM².

Las preparaciones se realizaron con el procedimiento reportado por Sandoval et al. (2005), al subdividir la yema en siete fragmentos de interés, que se fijaron en solución de Navashin por 24 horas, transcurrido el tiempo se lavaron en agua corriente para iniciar el proceso de deshidratación. Se utilizó la técnica de deshidratación directa con alcohol terbutílico con cambios de concentración cada 24 horas; posteriormente se realizó la infiltración con paraplast, para finalmente incluir cada fragmento en un bloque de

² Ubicado en el piso 1, cubículo 103; Jardín Botánico, circuito Zona Deportiva s/n, C.U., 04510, Ciudad de México.

paraplast puro. Cada bloque se cortó con un micrótopo de rotación ®American Optical, a 5 µm de grosor.

Las laminillas con los cortes se desparafinaron dentro de un horno a 60 °C por una hora, posteriormente se colocaron en xilol y en xilol-alcohol absoluto por 30 minutos en cada solución; seguido de la rehidratación en alcoholes graduales para realizar la tinción con safranina O durante 24 horas; transcurrido este tiempo se lavaron con agua corriente y se deshidrataron con alcoholes graduales hasta 95 %, posteriormente se colocaron en verde rápido por tres minutos y se lavaron con alcohol absoluto para pasarse por aceite de clavo y Citrisolv por 10 minutos cada uno.

Finalmente, las preparaciones se montaron con resina sintética y se dejaron secar durante 15 días en un horno a 60 °C, luego se eliminó el exceso de resina y se etiquetaron para su análisis y toma de microfotografías con un fotomicroscopio Carl Zeiss- Axioskop con una cámara Point Grey, con el programa FlyCapture2 2.10.3.169.

Ensayos exploratorios.

Se realizaron ocho ensayos exploratorios, divididos en 32 tratamientos para analizar la respuesta de diversos explantes de *M. mexicana* tales como partes florales (ovario, óvulo, antera), yemas axilares, semillas maduras e inmaduras completas, embriones aislados, así como partes de plántulas (hoja cotiledonar, hoja, porción apical, tallo y raíz); las condiciones de cultivo fueron las mismas empleadas en los experimentos anteriores, en diseños completamente aleatorizados. En el Cuadro 10 se incluyen todos los tratamientos ensayados.

Cuadro 10. Listado de los ensayos exploratorios realizados sobre la respuesta de diversos tipos de explantes de *Magnolia mexicana* a diferentes medios de cultivo.

Ensayo No.	Explante	Tratamiento	Unidad experimental (No. réplicas)
1	Semillas con sarcotesta	Sales y vitaminas MS 50%	Frasco con 4 semillas (10)
2	Semillas sin sarcotesta	Sales y vitaminas MS 50%	Frasco con 4 semillas (10)
3		Sales y vitaminas MS 50 % + 250 mg/l hidrolizado de caseína + 20 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA + 6 g/l agar	Frasco de vidrio (8x4 cm) con 1 semilla sin sarcotesta (90)
4	Semillas sin testa	Sales y vitaminas MS 50%	Frasco con 4 semillas (4)
5	Embriones y semillas sin sarcotesta seccionadas longitudinalmente	Sales MS 50% + vitaminas MS 100 % + 1 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l KIN +250 mg caseína + 40 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	Caja Petri con 10 explantes (4)
6		Sales MS 50% + vitaminas MS 100 % + 2 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l KIN + 250 mg caseína+ 40 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	
7		Sales MS 50% + vitaminas MS 100 % + 3 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l KIN +250 mg caseína + 40 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	
8		Sales MS 50% + Vitaminas L2 100 % + 1 mg/l 2.4 D + 1 mg/l BAP + 250 mg caseína + 40 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	
9		Sales MS 50% + Vitaminas L2 100 % + 2 mg/l 2.4 D + 1 mg/l BAP + 250 mg caseína + 40 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	
10	Sales MS 50% + Vitaminas L2 100 % + 3 mg/l 2.4 D + 1 mg/l BAP + 250 mg caseína + 40 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA		

Cuadro 10. Continuación...

Ensayo No.	Explante	Tratamiento	Unidad experimental (No. réplicas)
11		Sales MS100% + Vitaminas L2 100% + 3 mg/l 2.4 D + 1mg/l BAP	
12	• Hoja cotiledonar	Sales MS100% + Vitaminas L2 100% + 3 mg/l 2.4 D + 1mg/l BAP + 20 g/l sacarosa	• Hoja cotiledonar: caja petri con 10 explantes (4)
13	• Tallo de plántula	Sales y vitaminas MS 100% + 1 mg/l ANA	• Tallo: caja petri con 8 explantes (3)
14	• Raíz de plántula	Sales y vitaminas MS 100% + 1 mg/l ANA + 20 g/l sacarosa	• Raiz: caja petri con 8 explantes (3)
15	• Yema apical de plántula	Sales MS 100% + Vitaminas L2 100% + 3 mg/l BAP + 5mg/l GA ₃	• Yema apical: caja petri con 4 explantes (1)
16		Sales MS 100% + Vitaminas L2 100% + 3 mg/l BAP + 5mg/l GA ₃ + 20 g/l sacarosa	
17		Sales MS 50% + vitaminas MS 100 % + 1 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l KIN + 250 mg caseína + 20 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	
18		Sales MS 50% + vitaminas MS 100 % + 2 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l KIN + 250 mg caseína + 20 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	
19	Hoja y tallo de plántula	Sales MS 50% + vitaminas MS 100 % + 3 mg/l 2,4-D + 1.5 mg/l KIN + 250 mg caseína + 20 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	Caja Petri con 10 explantes (4)
20		Sales MS 50% + Vitaminas L2 100 % + 1 mg/l 2.4 D + 1 mg/l BAP + 250 mg caseína + 20 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	
21		Sales MS 50% + Vitaminas L2 100 % + 2 mg/l 2.4 D + 1 mg/l BAP + 250 mg caseína + 20 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	
22		Sales MS 50% + Vitaminas L2 100 % + 3 mg/l 2.4 D + 1 mg/l BAP + 250 mg caseína + 20 g/l sacarosa + 0.5 g/l CA	

Cuadro 10. Continuación...

Ensayo No.	Explante	Tratamiento	Unidad experimental (No. réplicas)
23		Sales y vitaminas MS 100% + 0.25 mg/l BAP	
24	Yemas axilares	Sales y vitaminas MS 100% + 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA ₃	Tubo de ensaye con 1 explante (10)
25		Sales y vitaminas MS 100% + 0.3 mg/l BAP + 1 mg/l KIN	
26		Sales MS 25% + Vitaminas L2 100% + 3 mg/l 2.4 D + 1mg/l BAP (Reyes-Díaz et al. 2017)	
27	Embriones		Caja Petri con 10 embriones (3)
28	Óvulos		Caja Petri con 15 óvulos (5)
29	Antera	Sales MS 25% + Vitaminas L2 100% + 3 mg/l 2.4 D + 1mg/l BAP (Reyes-Díaz et al. 2017)	Caja Petri con 22 anteras (12)
30	Pistilo		Caja Petri con 10 explantes (5)
31	Ovario		Caja Petri con 10 explantes (7)
32	Semillas inmaduras		Caja Petri con 10 explantes (5)

Notas:

1. En la mayoría de los medios no se señala la cantidad de sacarosa ni agar utilizados ya que son las utilizadas en la mayoría de los experimentos y se señalan en el texto, en la parte de metodología.
2. MS= sales basales de Murashige y Skoog (1962); L2= mezcla de vitaminas formuladas por Phillips y Collins (1979); BAP= 6-bencilaminopurina; ANA= ácido α -naftalenacético; KIN= kinetina, 2.4 D= ácido 2,4-diclorofenoxiacético; GA₃= ácido giberélico; PVP= polivinilpirrolidona; CA= carbón activado.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1. Caracterización molecular.

9.1.1. Efectividad de los cebadores RAPD.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los RAPDs sobre las muestras de *Magnolia sp.*, se resumen en los Cuadros 11 y 12. Con los 14 cebadores evaluados, se amplificaron 205 bandas representadas en 1,851 amplicones, observándose que OPA15, OPB3 y C08 mostraron el mayor porcentaje de contribución (12.8 %, 9.8 % y 9.3 % respectivamente), es decir, fueron los cebadores con la mayor proporción de amplicones revelados dentro de todo el sistema de marcaje molecular; OPB17 y OPB19 tuvieron la menor contribución, con 4.5 % cada uno; estos datos fueron congruentes con el número de amplicones y bandas obtenidos por dichos cebadores.

Cuadro 11. Análisis general de 14 cebadores RAPD utilizados en 18 accesiones de *Magnolia spp.*

Tipo de iniciador	Clave	# bandas/iniciador	Amplicones/iniciador	% Contribución
RAPD	E18	12	106	0.057
	C08	18	173	0.093
	OPA6	14	125	0.067
	OPA7	17	125	0.067
	OPA8	16	135	0.072
	OPA10	14	149	0.080
	OPA13	20	122	0.066
	OPA15	25	238	0.128
	OPA16	14	106	0.057
	OPB1	12	114	0.061
	OPB3	15	181	0.098
	OPB10	10	109	0.059
	OPB17	9	84	0.045
	OPB19	9	84	0.045
	TOTAL	205	1851	1
	PROMEDIO	14.64	132.21	

Cuadro 12. Características descriptivas de los cebadores RAPD utilizados.

Clave	No. total de bandas/ iniciador	# bandas polimórficas/ iniciador	% Polimorfismos	Poder de resolución (RP)	Contenido de información polimórfica (PIC)	Índice del marcador (MI)
E18	12	12	100	6.88	0.38	3.00
C08	18	17	94.4	8.55	0.31	2.99
OPA6	14	13	92.8	7.44	0.35	3.09
OPA7	17	17	100	10.77	0.41	3.20
OPA8	16	16	100	8.55	0.35	3.04
OPA10	14	13	92.9	5.66	0.28	2.64
OPA13	20	18	90	6.66	0.25	1.39
OPA15	25	21	84	7.77	0.24	1.79
OPA16	14	13	92.8	2.22	0.32	2.33
OPB1	12	10	83.3	0.66	0.29	2.23
OPB3	15	12	80	5.11	0.22	2.41
OPB10	10	7	70	2.11	0.20	1.65
OPB17	9	8	88.8	0.33	0.35	3.16
OPB19	9	7	77.7	3.22	0.28	2.97
TOTAL	205	184		76	4.23	35.89
Promedio	14.64	13.14	89.05	5.42	0.30	2.56

Así mismo, solo los cebadores E18, OPA7 y OPA8 mostraron un 100 % de polimorfismos, es decir, que sólo revelaron bandas polimórficas y ninguna monomórfica, mientras que los cebadores OPB10 y OPB19 mostraron los más bajos con 70 y 77.7 % respectivamente todos los demás cebadores mostraron porcentajes por encima del 70 %.

En cuanto a los índices descriptivos, se observó que el 71.4 % de los RAPDs analizados mostraron un valor de PIC por encima de 0.25 lo que los catalogaría como altamente informativos para marcadores dominantes, de acuerdo con Laurentin y Karlovsky (2007); así mismo, de acuerdo con estos mismos autores, valores entre 0.15 y 0.25 son suficientemente informativos, que es el caso de los marcadores OPA15, OPA13, OPB3 y OPB10; mientras que valores menores a 0.15 se consideran no informativos y no se presentó el caso en este estudio. Lo anterior estaría en concordancia con los referido por

González et al. (2016), quienes consideran que estos valores demostrarían la habilidad de los cebadores utilizados para distinguir entre genotipos. El sistema RAPD tuvo un valor MI promedio de 2.56 y un RP promedio de 5.42.

Individualmente, el cebador OPA7 obtuvo los valores PIC (0.41), MI (3.20) y RP (10.77), más elevados de todo el sistema RAPD aún cuando el número de bandas polimórficas que reveló (17) no fue el más alto. El OPA8 obtuvo el segundo puesto con un valor RP de 8.55 y PIC de 0.35 aunque su valor MI no fue de los más altos por algunas décimas, y en tercer puesto, aunque sus valores RP no están dentro de los más elevados, el OPA6 (PIC=0.35, MI= 3.09) y OPB17 (PIC=0.35, MI= 3.16). Así mismo, el OPA15 obtuvo el tercer valor RP (7.77) más elevado pero sus valores PIC (0.24) y MI (1.79) no estuvieron entre los más altos.

En general, no hubo buena correspondencia entre los valores PIC, RP y MI para cada cebador, con excepción del OPA7; esto podría complicar la elección de un cebador o un sistema de cebadores para futuros estudios si no existe claridad en el objetivo que persigue cada índice ni sus fundamentos teóricos y construcción matemática; así, de manera similar al PIC, el MI también se considera una medida de la informatividad que brinda un sistema o un cebador al medir su eficiencia para detectar polimorfismos (Laurentin y Karlovsky, 2007; Varshney et al. 2007); sin embargo, éste último difiere del primero en que es un valor ajustado o corregido al multiplicar el valor PIC por el número de bandas polimórficas detectadas, aunque Prevost y Wilkinson (1999) consideran que no es un parámetro eficiente debido a que el MI no fue diseñado como una medida para la capacidad discriminante de un cebador, sino más bien para distinguir entre diferentes sistemas de marcaje molecular, por lo que en su trabajo en cultivares de papas no

encontraron correlación entre el MI y la habilidad de los ISSRs que emplearon, para distinguir entre genotipos, por lo que propusieron el cálculo del Rp como una mejor opción con capacidad para distinguir entre un número grande de genotipos, al estar basado en el índice de información que ofrece cada una de las bandas (Ib) bajo una condición óptima hipotética en que el 50 % de los genotipos contiene una banda amplificada y busca establecer la capacidad discriminante que tiene un cebador para distinguir entre genotipos (Milbourne et al. 1997; Prevost y Wilkinson, 1999).

La falta de coincidencia entre índices al tratar de discriminar cebadores se ha visto en otros trabajos, como el realizado en *Sesamum indicum* por Laurentin y Karlovsky (2007) quienes usaron marcadores AFLPs y el realizado en *Cymbopogon* sp. con ISSRs (Adhikari et al., 2014).

Así, para los objetivos de este estudio, donde se evaluó un número pequeño de cebadores y genotipos, el valor de PIC puede ser suficiente al proporcionar un valor de diversidad genética que puede traducirse fácilmente en la selección de un cebador, en este sentido, los cebadores OPA7 y E18 serían los mejores del sistema, con el OPA7 a la cabeza ya que mostró una mayor concordancia entre índices y sería el más recomendado para ser utilizado en otros estudios con especies de magnolias.

9.1.2. Relaciones genéticas entre las muestras de *Magnolia* sp.

El dendrograma obtenido con el método Neighbour-joining (Figura 16) muestra la formación de tres grupos, uno con todas las muestras de *M. grandiflora*, otro para las muestras de *M. dealbata* y un tercero que agrupa las muestras de los dos árboles de Yoloxóchitl del Estado de México con las de los árboles de *M. mexicana* de Veracruz. Este

agrupamiento es más claro cuando se observa el mismo dendrograma, pero con un acomodo radial (Figura 17).

Las tres especies que se usaron en el estudio son contrastantes morfológicamente, ya que cada una pertenece a una distinta sección dentro del género *Magnolia*; *M. grandiflora* pertenece a la sección Magnolia, *M. dealbata* a la sección Macrophylla y *M. mexicana* a la sección Talauma (Anexo 3); por lo que los marcadores RAPD fueron eficientes al discriminar genéticamente entre las tres especies.

El árbol generado representa las relaciones genéticas existentes entre todas las muestras analizadas y en este caso no se buscó hacer alguna inferencia evolutiva, sin embargo, el método de agrupación que se utilizó creó un árbol cuyas ramificaciones se acomodaron de acuerdo con la distancia a la raíz, de donde se puede inferir cuáles grupos divergieron primero y cuales lo hicieron después. Así, se observa el grupo de *M. dealbata* más alejado desde la raíz (distancia 0.6), seguido por el grupo de *M. grandiflora* (distancia 0.5) y, por último, al inicio del árbol el grupo de *M. mexicana*.

Esta disposición de los grupos es congruente con la estructura del árbol filogenético que Kim y Suh (2013), obtuvieron a partir del análisis de regiones de ADN cloroplástico, en donde *M. mexicana* es evolutivamente más antigua que *M. grandiflora* y *M. dealbata*.

En el análisis cada grupo por separado (Figura 16), se pudo observar que dentro del conjunto formado por *M. grandiflora*, la posición de las muestras no coincide con su origen geográfico, en cambio, en el conjunto del Yoloxóchitl, las muestras que se colectaron en Atempa aparecen en el extremo inferior (*M. mexicana* 4, 5 y 6), por encima de ellas las

que se colectaron en La Quinta (*M. mexicana* 1, 2, 3, 8, 7, 9 y 10) y al extremo superior de todo el grupo, las muestras del Estado de México.

Estos resultados coinciden con lo que reportaron Medrano-Hernández et al. 2017, quienes, con colectas en la comunidad de Zapotla (muy cercana a Atempa) y en La Quinta, obtuvieron la separación por origen geográfico de las muestras mediante marcadores ISSRs, aún cuando estas poblaciones están separadas entre sí sólo por un par de kilómetros.

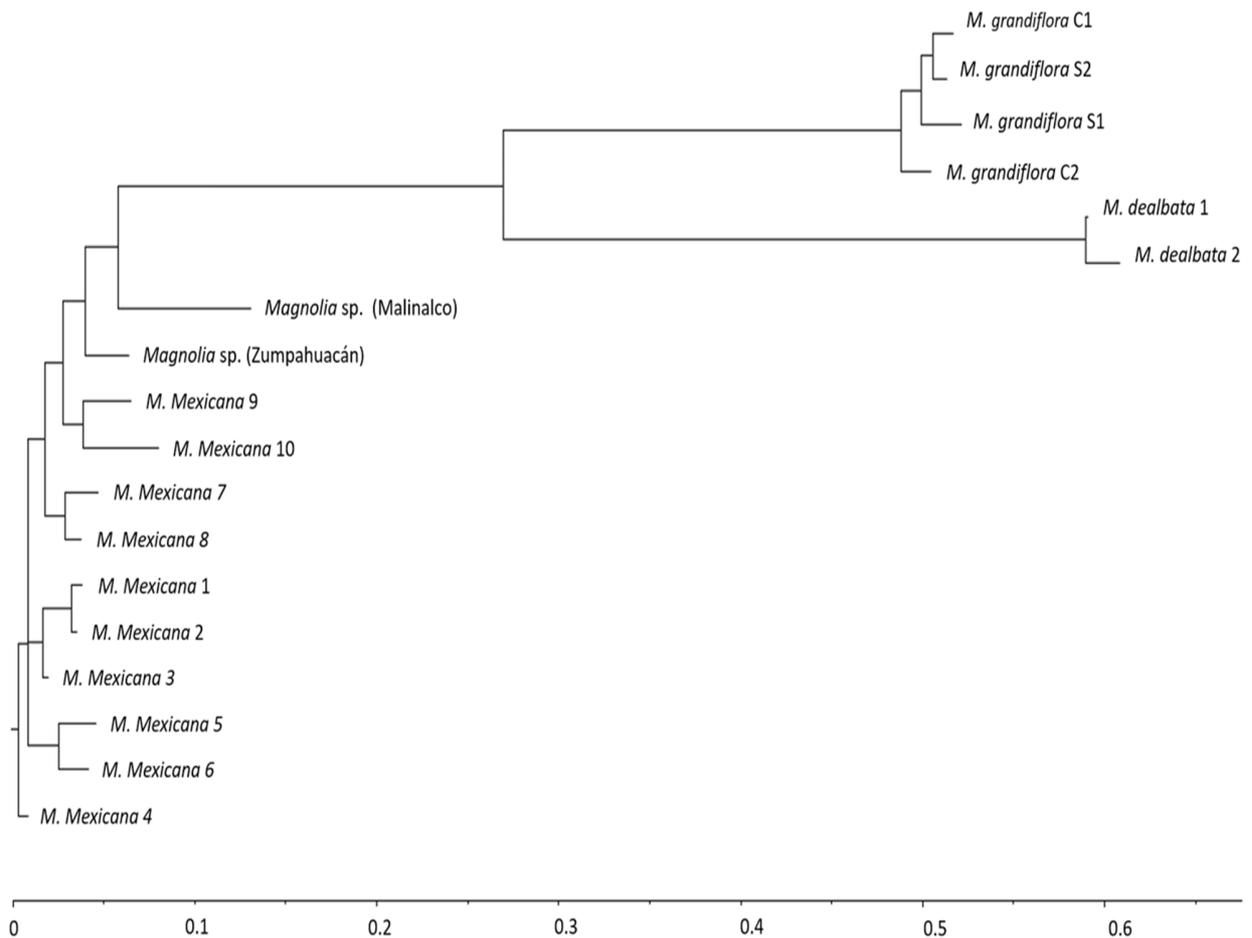


Figura 16. Dendrograma de 18 muestras de *Magnolia* spp., obtenido a partir del análisis con 14 cebadores RAPD por el método Neighbour Joining, con 1000 remuestreos y distancia genética de Dice.



Figura 17. Dendrograma radial de 18 muestras de *Magnolia* spp., obtenido a partir del análisis con 14 cebadores RAPD por el método Neighbour Joining, con 1000 remuestreos y distancia genética de Dice.

La capacidad de los marcadores RAPD para separar muestras de acuerdo con su origen geográfico ya se ha reportado en estudios con otras especies (Casarrubias et al., 2003; Jacinto-Hernández, Garza-García, Garza-García y Bernal-Lugo, 2014). Casarrubias et al. (2003) mencionan que la agrupación por lugar de procedencia podría deberse a la participación de algunos genes en la adaptación a diferentes condiciones climáticas.

Por otra parte, al analizar el dendrograma que se obtuvo sólo con las muestras de Yoloxóchitl, sin usar las dos especies testigo, se observó que las muestras del Estado de México forman un grupo, en la esquina superior derecha del árbol, con la magnolia de Malinalco a una distancia mayor respecto a la de Zumpahuacán y del resto de muestras, esto también se observó en la Figura 16, pero la separación no era tan evidente.

Así mismo; las magnolias de Zongolica, aunque forman 4 grupos, permanecen muy cercanas entre sí, aunque la separación por lugar de origen no fue completa, ya que la muestra 7 proveniente de Acontla se encuentra en conjunto con la muestra 8 y entre los grupos formados por las muestras 1-2 y 9-10 que provienen de la comunidad La Quinta.

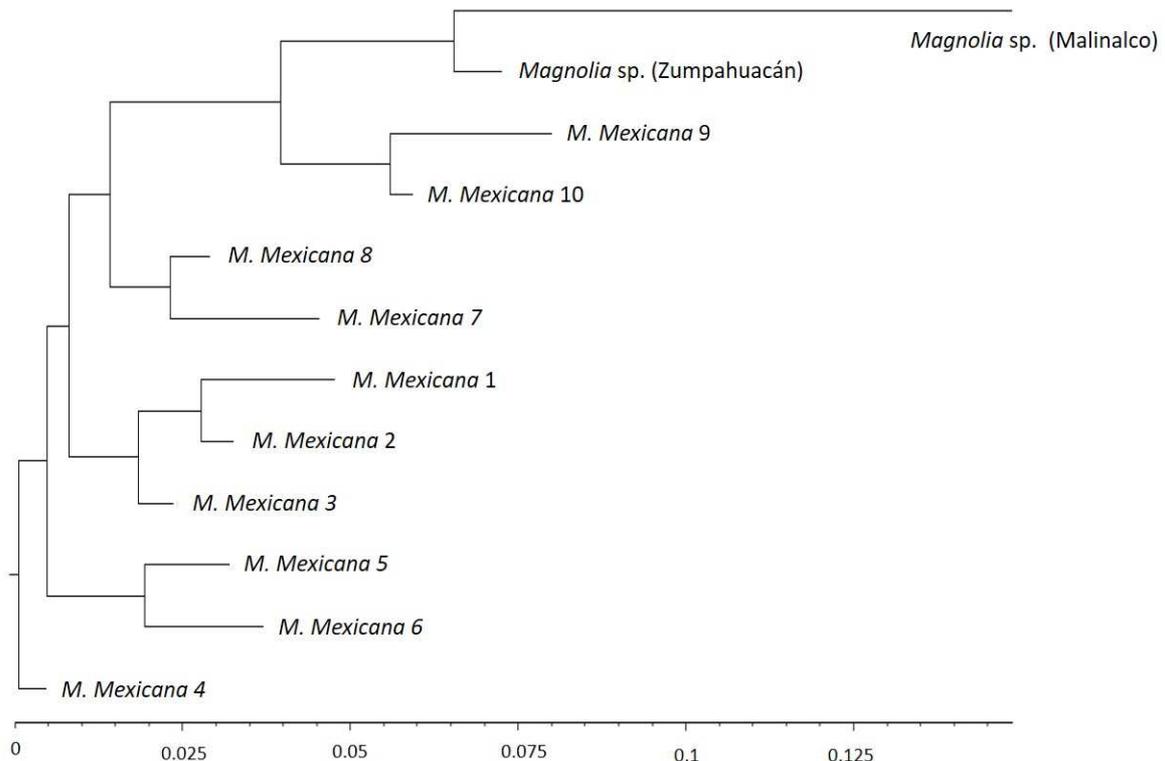


Figura 18. Dendrograma de 10 muestras de *M. mexicana* de Veracruz y 2 muestras de *Magnolia* sp., obtenido a partir del análisis con 14 cebadores RAPD por el método Neighbour Joining, con 1000 remuestreos y distancia genética de Dice.

9.1.3. Datos morfológicos de los árboles de Yoloxóchitl.

El acceso a los árboles de Malinalco y Zumpahuacán para toma de muestras fue restringido debido a limitaciones por los dueños de los predios, y sólo se obtuvieron hojas, un par de frutos y dos flores para el primer sitio; así como hojas, un botón floral, una flor y un fruto para el segundo; de donde derivaron los datos morfológicos asentados en el Cuadro 13, donde se puede observar que el ejemplar de Zumpahuacán guarda mayor relación morfológica con los de Veracruz, con la presencia de un solo fuste principal, similar número de carpelos del fruto, así como similar número y tamaño de los estambres, y difirió en la altura del árbol, forma de la hoja, menor tamaño de las hojas, menor tamaño de los pétalos, forma del fruto y tamaño del fruto (Figura 19), con igual fenología; mientras que el ejemplar de Malinalco difirió en el número de troncos principales, tamaño del peciolo, forma de la hoja, menor tamaño de la hoja, menor número de estambres, menor tamaño de los estambres y menor número de carpelos, además de fenología diferente.

Así mismo, entre los ejemplares de Malinalco y Zumpahuacán se observó variación en el número de troncos principales, tamaño del peciolo, menor tamaño de la hoja, menor número de estambres, forma del fruto, menor número de carpelos y diferencias fenológicas.

Las diferencias observadas pueden deberse a la historia particular de cada ejemplar que no es sabida con certeza, por ejemplo, ambos son antiguos y se desconoce su edad, ambos están muy maltratados y en particular el ejemplar de Malinalco presenta de varios fustes en lugar de uno solo, esto último explicado por lo que se considera un fenómeno común en *M. sprengeri* provocado por intervenciones humanas cuando el árbol es cortado y del tocón renacen brotes múltiples (Kang y Ejder, 2011).

Otro factor a considerar son las condiciones ambientales bajo las que se han desarrollado los árboles analizados, las cuales son muy diferentes entre los dos municipios mexiquenses y más con respecto a Zongolica; por ejemplo, Malinalco es de clima semicálido húmedo con lluvias en verano, con un rango de temperatura de 14 - 28°C y precipitación de 800 - 1300 mm (INEGI, 2009a); en Zumpahuacán el clima es semicálido subhúmedo con lluvias en verano, rango de temperaturas de 16° - 24°C y precipitación de 1000 - 1500 mm(INEGI, 2009b), mientras que en Zongolica el clima es semi-cálido húmedo con lluvias todo el año, rango de temperaturas de 14 – 26°C² y precipitación entre 400 – 3100 mm (INEGI, 2009c).

Si los árboles de Yoloxóchitl en el Estado de México fueron traídos directamente o son descendientes de aquellos que por documentos históricos se asume provinieron de Veracruz (Ver sección 2.1.4.4), entonces los contrastes fenotípicos entre ellos pueden ser resultado de su capacidad plástica para hacer frente a esas diferencias climáticas, ya que, de acuerdo con Sultan (2000), los organismos pueden alterar su desarrollo, fisiología e historia de vida en función de las condiciones ambientales.

Ejemplos de plasticidad fenotípica en magnolias se han reportado como pequeñas variaciones morfológicas en especies como *M. iltisana* en la que se observaron cambios en la biomasa de raíces y hojas en respuesta a variaciones de luz (Saldaña-Acosta, Meave y Sánchez-Velásquez, 2009) y en *M. pugana* para la que se reportaron diferencias significativas en el crecimiento de plántulas bajo distintas condiciones de luz y fertilidad del suelo (García et al., 2018); aunque también se han reportado diferencias mayores, por ejemplo, *M. wufengensis* presentó una amplia variabilidad morfológica de la flores, en cuanto a color, tamaño y número de tépalos, entre cultivares y una población silvestre

(Wang et al., 2017), y en *M. sprengeri* también se encontró una marcada variabilidad en el número y color de tépalos, diámetro de la flor, así como en la forma de las hojas, entre ejemplares solitarios, poblaciones silvestres y cultivadas de esa especie (Kang y Ejder, 2011).

En el último caso y dada la alta variabilidad morfológica presentada en *M. sprengeri*, Kang y Ejder (2011), mencionan que la variación en el número de tépalos y coloración de las flores entre árboles de una población o metapoblación de magnolias no debería tener valor significativo como caracter taxonómico ni ser una razón para el otorgamiento del estatus de especie o subespecie.

Hasta qué punto se puede asumir que las diferencias morfológicas encontradas, más allá de las que distinguen un género, son sólo debidas al ambiente es difícil de determinar mediante experimentación debido a los amplios tiempos de espera al tratarse de árboles; sin embargo, se podría inferir que *M. mexicana* no es una especie con gran capacidad plástica dado su actual status de especie amenazada, que de acuerdo con Sultan (2000), las especies con poca plasticidad para mantener la reproducción y crecimiento, se restringen a nichos especializados y están en particular riesgo de extinción. De forma contraria, si asumimos que las diferencias observadas se deben al ambiente, podría haber entonces implicaciones de consideración para la taxonomía de estas plantas, de acuerdo con el razonamiento de Sultan (2000).

Actualmente, el nombramiento de varias especies nuevas de magnolias se hace con base en diferencias encontradas de entre cinco a diez caracteres cualitativos y cuantitativos, soslayando un efecto plástico; así por ejemplo, Vázquez-García et al. (2013b) describen *M. perezfarrerae* como una nueva especie antes confundida con *M. mexicana* de la cuál

difiere en que los peciolos son más largos, la forma de la base de los tépalos se estrecha gradualmente y no abruptamente como en la segunda, tiene frutos más grandes y un mayor número de carpelos que al abrir caen en masas irregulares y no individualmente, así como la forma de la pared dorsal de los carpelos que es plana y no convexa.

Otro ejemplo es *M. lacandonica*, descrita por Vázquez-García et al. (2013c) que se diferenció de *M. mexicana* por la mayor cantidad de carpelos y estambres, pared dorsal de los carpelos no convexa y pétalos enteramente blancos contra los teñidos de púrpura de *M. mexicana*; así mismo, Vázquez-García et al. (2012b) describieron como especie nueva a *M. zoquepopolucae* al distinguirla de *M. mexicana* por sus frutos esferoidales y no ovoides o elipsoides, por un mayor número de carpelos, dorso de los carpelos no convexo, mayor número de estambres, peciolo de las hojas más largos, tépalos más largos y menores cicatrices pedunculares.

Estas diferencias son mucho menos evidentes que las variaciones en color, tamaño y número de tépalos encontrados en *M. sprengeri* Kang y Ejder (2011), pero fueron consideradas como suficientes para distinguir a *M. lacandónica*, *M. perezfarrerae* y *M. zoquepopolucae* de *M. mexicana*. Sin embargo, Vázquez-García (1994), Cruz, Vega y Jiménez (2008) y Vázquez-García, Domínguez-Yescas, Pedraza-Ruiz, Sánchez-González y Muñiz-Castro (2015) coinciden en que las especies de magnolias en México presentan una marcada especiación alopátrica, que quiere decir que las distancias geográficas o diferencias ambientales son de particular importancia para la separación de las poblaciones en especies diferentes.

Cuadro 13. Caracteres morfológicos observados de los ejemplares de Yoloxóchitl del Estado de México y Veracruz.

	Caracteres morfológicos	<i>M. mexicana</i> de Veracruz	<i>Magnolia</i> sp. de Zumpahuacán	<i>Magnolia</i> sp. de Malinalco
árbol	Altura aproximada (m)	30	10	10
	No. de troncos principales	1	1	5
Hoja	Forma de la hoja	Oblongas o elípticas, base aguda	Oblongas o elípticas, base subobtusada	Oblongas o elípticas, base subobtusada
	Pecíolo (cm)	6.5 – 9.2	6.8 – 8.8	2.6 – 7.6
	Longitud de la hoja (cm)	17.7 – 49.5	11.8 – 23.8	8.4 – 19.5
	Ancho de la hoja (cm)	10.6 – 17	6.7 – 8.8	5.6 – 10.7
	Pubescencia abaxial de la hoja	Glabra	Glabra	Glabra
Flor	Diámetro de la flor (cm)	18-20	16	12 - 17
	Perianto	3 sépalos, 6 pétalos	3 sépalos, 6 pétalos	3 sépalos, 6 pétalos
	Tamaño de los pétalos (cm)	7.5 – 9.8 x 3 – 6.5	6.5 – 7.8 x 3.2 – 4.1	6.5 – 8.3 x 3 - 6
	Color de los pétalos	Blanco cremoso teñido de púrpura	Blanco cremoso teñido de púrpura	Blanco cremoso teñido de púrpura
	Número de estambres	183	121-184	155 - 169
	Tamaño de los estambres (cm)	1.3 – 1.4	1.3	1.2 – 1.3
Fruto	Forma del fruto	Ovoide a elipsoidal	Acorazonado	Ovoide a elipsoidal
	Tamaño del fruto (cm)	15	12*	10*
	No. de carpelos	38-50	39 - 40	35
	Pubescencia del polifolículo	Ligeramente pubescente	Ligeramente pubescente	Ligeramente pubescente
	Longitud de la semilla (cm)	1.4 – 1.7	s/d	s/d
Fenología	Floración	mayo – agosto	mayo – agosto	marzo – junio
	Fructificación (frutos maduros)	febrero - abril	febrero - abril	julio - octubre

*Frutos inmaduros que a madurez no producen semillas.

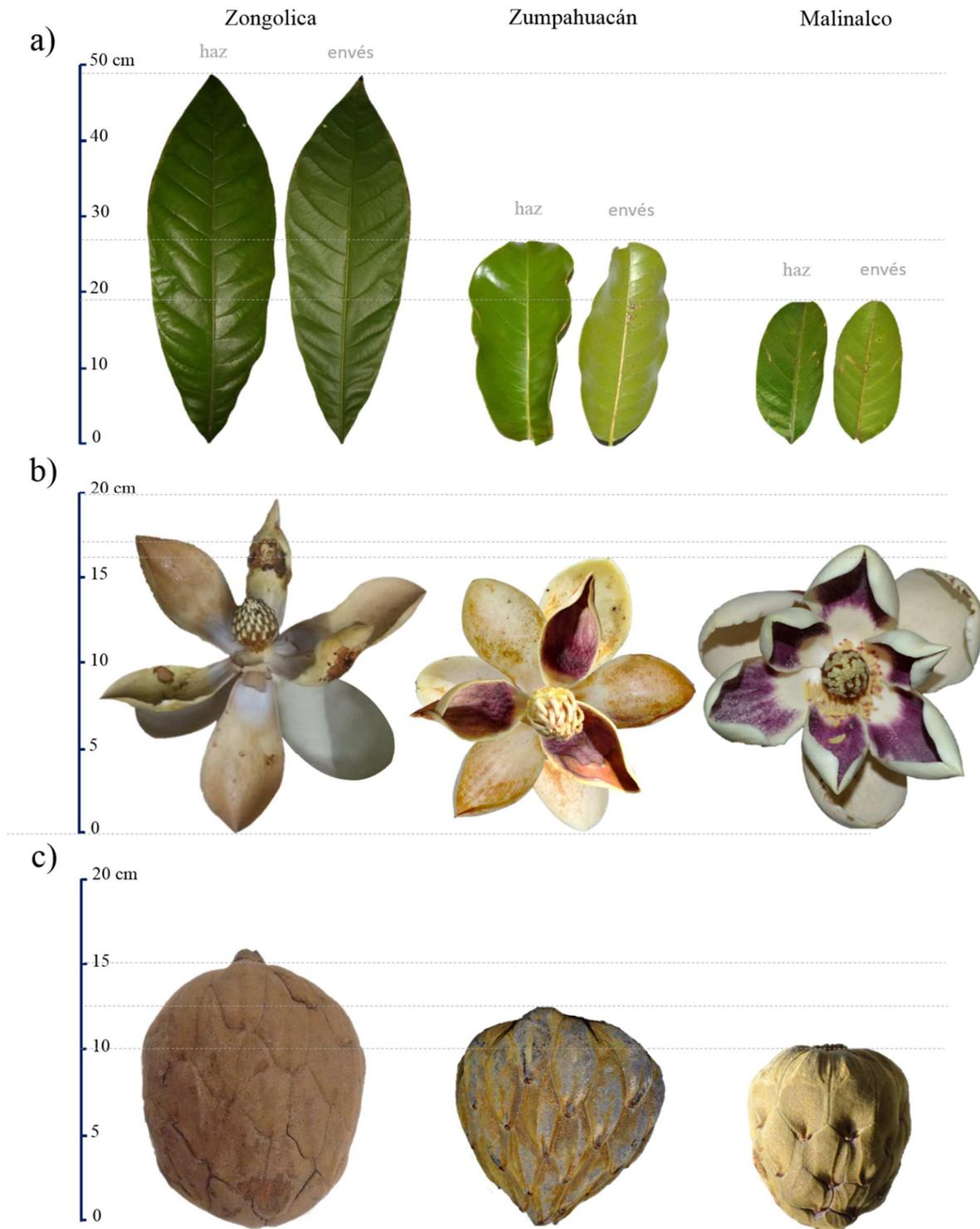


Figura 19. Comparación de algunas características morfológicas de los árboles de Yoloxóchitl de Zongolica, Zumpahuacán y Malinalco: a) haz y envés de hojas b) flor y c) fruto.

Otro aspecto a considerar es el hecho de que no existen registros de magnolias de la sección Talauma en inventarios florísticos realizados en la zona de estudio en el Estado de México (Cerros-Tlatilpa y Espejo-Serna, 1998; Calderón y Rzedowsky, 2001; Rodríguez-Jiménez, Fernández-Nava, Arreguín-Sánchez y Rodríguez-Jiménez, 2005; Martínez, 2010; López, López-Sandoval, Beltrán y Aguilera, 2012); y las especies de magnolias geográficamente más cercanas (*M. krusei*, *M. vazquezii* y *M. guerrerensis*) pertenecen a la sección Magnolia (ver Anexos 1 y 2) que es morfológicamente distinguible de la sección Talauma (Jiménez-Ramírez, Vega-Flores, Cruz-Durán y Vázquez-García, 2007; Jiménez-Ramírez y Cruz, Vega y Jiménez, 2008).

Además, ninguno de los dos ejemplares mexiquenses analizados produce semillas bien desarrolladas y viables (observación directa y *com. pers.* con pobladores) (Figura 20), incapacidad que puede estar asociada a múltiples factores, como defectos en su respuesta fisiológica adaptativa al medio físico, la inexistencia de polinizadores específicos, entre otros.

Este tipo de esterilidad de las semillas se ha observado de forma común en árboles silvestres solitarios de *M. sprengeri* debido a la imposibilidad de una polinización cruzada por falta de otros ejemplares cercanos de la misma especie y se sabe que no es posible la autofecundación aún si se trata de flores distintas del mismo árbol (Kang y Ejder, 2011), también Hiroyama, Ishida y Tomaru (2005) reportaron que se reduce grandemente la producción de semilla en *M. stellata* por efecto de la geitonogamia; resultados similares se reportaron también para *M. obovata* (Ishida et al., 2003).

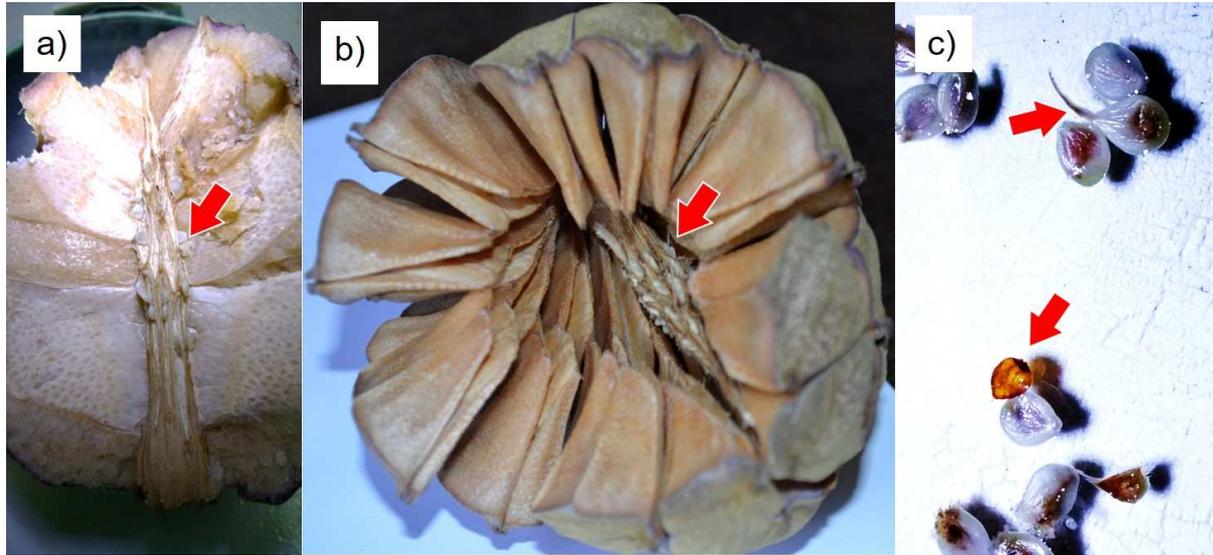


Figura 20. Frutos de un árbol de *Magnolia* sp., en Malinalco, a) fruto inmaduro y b) fruto maduro con semillas que no variaron en tamaño y c) semillas extraídas del fruto inmaduro con sarcotesta y testa bien formadas.

Lo anterior sugiere que los árboles de Yoloxóchitl de Malinalco y Zumpahuacán no producen semillas viables debido a la falta de polinización cruzada ante la ausencia de individuos cercanos de la misma especie, lo que podría deberse a que son ejemplares introducidos, probablemente durante la época prehispánica desde Veracruz (ver apartado 2.1.4.4), y que las diferencias morfológicas con los especímenes de *M. mexicana* se deben al ambiente; o bien, podría especularse también que, dada la falta de referentes cercanos, se trataría de los últimos ejemplares de especies de magnolia que anteriormente pudieron distribuirse en la zona.

Si se considera que las magnolias presentan marcada especiación alopátrica, que *M. mexicana* es una especie de estrecha capacidad plástica y que las diferencias morfológicas encontradas coinciden con aquellas que han posibilitado la reclasificación a

nuevas especies, se sugiere que los árboles de Yoloxóchitl en Malinalco y Zumpahuacán pertenecen a otras especies, que por razones de su historia particular, se encuentran aislados.

9.2. Cultivo *in vitro*.

9.2.1. Etapa 1: establecimiento de estacas y germinación de semillas.

9.2.1.1. Establecimiento de varetas.

Después de cinco semanas de evaluación no hubo prendimiento de varetas, con muerte paulatina en todos los tratamientos (Figura 21). En ninguno de los casos se observó indicios de formación de callo ni raíces adventicias. Resultados similares fueron reportados por Isidro-Casas (2011), quién registró la muerte de todas las estacas de *M. mexicana*, sin formación de raíces, en un experimento realizado *in situ* en Veracruz, con dos concentraciones de AIB (1 % y 0.8 %).

El mayor tiempo de sobrevivencia de las varetas se presentó en el tratamiento con AIB al 0.06% (la última decayó a las cinco semanas de iniciado el experimento) y el menor fue con el testigo donde el 90 % habían decaído a las 3 semanas (Figura 22), aunque las diferencias encontradas no fueron significativas entre los tratamientos ($p=0.53$). También se observó que todas las varetas perdieron la hoja durante la primera semana.

En general, las magnolias son difíciles de enraizar (Bojarczuk, 1985; Sharma, Knox e Ishida, 2005); sin embargo, en especies como *M. sulangeana* se obtuvo el 51 y 42 % de enraizamiento en tratamientos con 1 y 2 % de AIB e incluso se obtuvo enraizamiento del testigo (32 %), luego de 6 a 8 semanas (Bojarczuk, 1985); en *M. Virginiana*, se obtuvo un 83 % de enraizamiento con 0.5 % de AIB, luego de 14 semanas (Griffin, Blazich y Ranney,

1999) y en tres cultivares de *M. acuminata* el mayor porcentaje (> 50 %) de las varetas enraizaron con 1.6 y 3 % de AIB, después de 10 semanas (Sharma et al., 2005). Las concentraciones de AIB utilizadas en este trabajo entran dentro del intervalo de concentraciones que se utilizaron para las especies anteriores, pero no se obtuvo respuesta.



Figura 21. Aspecto de las varetas después de casi 40 días de experimentación: a) última sobreviviente del tratamiento AIB 0.15 y b) estacas consideradas muertas, con tejido necrótico en la base. En ninguna se observó la formación de callo.

La elección de la auxina adecuada, y su concentración, es un factor que influye en el enraizamiento adecuado de varetas; el AIB y el ANA son las auxinas sintéticas más utilizadas para este propósito, ya que han demostrado tener un mejor efecto que el ácido indol-3-acético (AIA) que es una auxina natural; en particular, el AIB tiene efecto en un mayor espectro de especies (Couvillion, 1988; Blythe, Sibley, Tilt y Ruter, 2007); en cuanto a la concentración necesaria, depende del tipo de especie y debe considerarse que el uso

de concentraciones elevadas puede producir anomalías, epinastia de las hojas, curvatura de tallos, reducción en la apertura de los estomas e inhibición del crecimiento (Blythe et al., 2007); sin embargo, en el presente estudio no se logró identificar una concentración adecuada para el enraizamiento de varetas de *M. mexicana*.

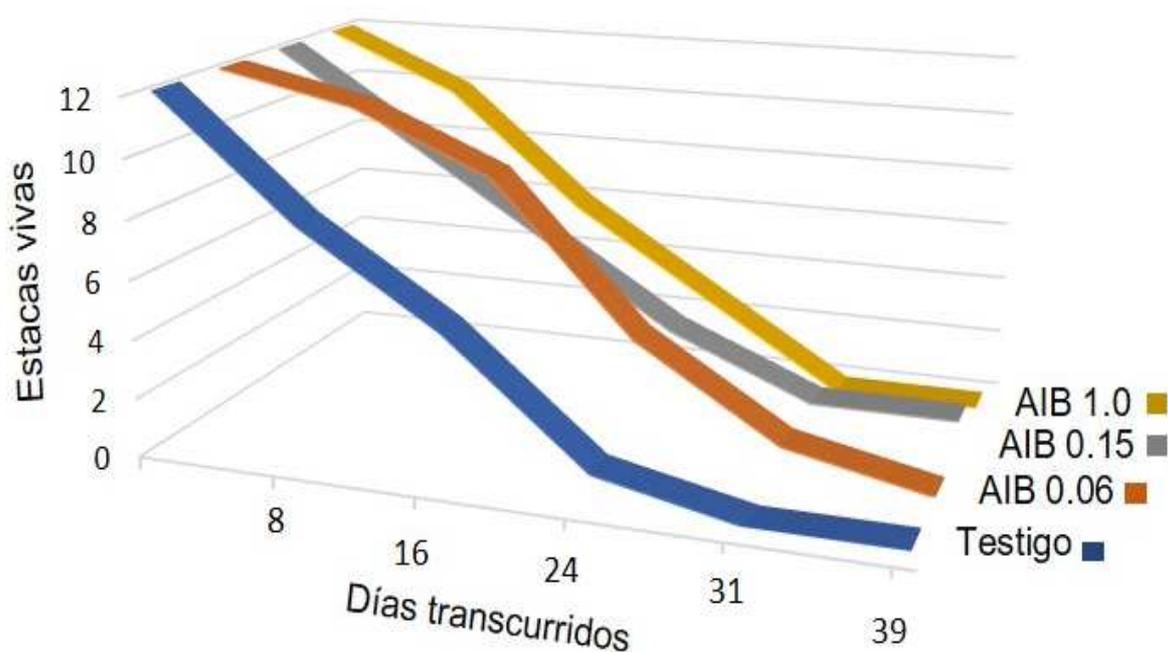


Figura 22. Supervivencia a través del tiempo de las varetas de *M. mexicana*.

La dificultad para enraizar varetas de mangnolia, puede deberse a que presentan una elevada cantidad de sustancias fenólicas, las cuales actúan como agentes inductores de la oxidación de auxinas lo que interfiere con la formación de raíces, fenómeno que varía en función de la calidad y cantidad de los fenoles presentes en la especie (Latsague y Lara, 2003).

De acuerdo con Preece y Compton (1991), la oxidación de los fenoles deriva en la formación de quinonas que se unen a proteínas lo que provoca un paro en la actividad enzimática derivando en el decaimiento y muerte posterior de la varetas; para contrarrestar este efecto, Bojarczuk (1985) reportó el uso de sustancias antioxidantes tales como el ácido ascórbico, ácido cítrico y el flavonoide rutina. En el presente estudio se observó que las varetas mostraban pardeamiento de tejidos casi inmediatamente después de realizado el corte, tiñendo incluso ligeramente el agua en la que se colocaron durante la colecta, lo que fue indicativo de la alta secreción de sustancias fenólicas en esta especie, sin embargo, no se utilizó ningún recurso para inhibirlas.

También, se ha observado que la respuesta al tipo y concentración de auxinas exógenas es específico-dependiente y la resistencia al enraizamiento puede deberse a múltiples factores que pueden ser genéticos, fisiológicos ó ambientales que son difíciles de preveer (Couvillion, 1988; Hartman y Kester, 1995). Sin embargo, existe coincidencia en que las varetas provenientes de plantas juveniles enraízan con más rapidez que las de tejidos añejos, además de que la época en que se haga la colecta resulta también determinante (Couvillion, 1988; Griffin et al., 1999), ya que las especies de magnolias tienen un periodo estrecho al año en el que las varetas pueden ser enraizadas, el cual varía entre especies e incluso entre cultivares (Sharma et al., 2005); por ejemplo, las varetas de *M. soulangeana* colectadas en la primera mitad del mes de julio enraizaron con mayor facilidad (Bojarczuk, 1985) y la varetas de seis cultivares de *M. acuminata*, respondieron mejor cuando se colectaron antes del periodo de brotación de la yemas en el mes de marzo (Sharma et al., 2005). En el presente trabajo las varetas se colectaron durante el

mes de febrero, antes del periodo de brotación de yemas, pero fueron colectadas de árboles añejos.

Así mismo, la presencia de yemas y hojas en las varetas influyen en el enraizamiento, ya que éstas estructuras aéreas producen fitohormonas endógenas como el AIA, que actúan en la zona de corte para promover la actividad mitótica y favorecer la formación de raíces (Hartman y Kester; 1995; Paparozzi, 2008; Ruter, 2008), que actúan en coordinación con las auxinas exógenas para el desarrollo de las raíces, reportándose que en varetas de diversas especies, con ausencia de yemas u hojas, el enraizamiento es prácticamente imposible y que en aquellas en donde la pérdida de hojas ocurre pocos días después del establecimiento es seguro que no se formarán raíces (Hartman y Kester, 1995; Osburn, Trigiano y Cheng, 2014); esto último coincide con lo obtenido en el presente estudio, en donde la pérdida de hojas casi en todas las varetas, ocurrió después de la primera semana.

Para la propagación vegetativa de *M. virginiana* se cortaron varetas con yemas terminales (Griffin et al., 1999), en *M. acuminata* se dejaron dos hojas grandes sin la mitad distal por vareta (Sharma et al., 2005) y en *M. soulangeana* las hojas no fueron removidas ni segmentadas (Bojarczuk, 1985); en vista de lo anterior es posible que el retiro del extremo apical de las varetas así como el dejar una sólo hoja segmentada por la mitad fueron factores que afectaron el enraizamiento de *M. mexicana*, además de que durante la colecta no se tuvo en cuenta el número de nodos por vareta, lo que pudo sumarse a las deficiencias metodológicas anteriores, ya que Bojarczuk (1985) menciona un mejor enraizamiento cuando las varetas de *M. soulangeana* tuvieron tres nodos en comparación a aquellas con sólo dos nodos.

Otros factores técnicos que influyen en el éxito del enraizamiento incluyen la hora del día a la cual se realiza la colecta que se recomienda sea muy temprano por la mañana, así como el lesionado de la base de la estaca que se ha observado contribuye a incrementar las posibilidades de enraizamiento al aumentar la superficie de penetración del agente enraizador (Hartman & Kester, 1995; Badilla y Murillo, 2005; Aldana, 2010); en este sentido, es útil señalar que la colecta de las estacas para el presente estudio se realizó por la tarde y que no fueron establecidas hasta 24 horas después debido a la distancia entre el sitio de colecta y el sitio de experimentación, además de que no se lesionó lateralmente la base de las estacas.

En suma, en el ensayo de prendimiento de varetas no se tuvieron resultados favorables debido a múltiples factores que afectaron su sobrevivencia, muchos de ellos técnicos, que deberán ser considerados en ensayos posteriores.

9.2.1.2. Germinación de semillas.

Se obtuvo el 96 % de germinación en las semillas que se sembraron sin sarcotesta transcurridos siete meses, mientras que no hubo respuesta en aquellas con sarcotesta; con una diferencia significativa entre tratamientos de $p= 0.0001$. El 10 % de las semillas germinó a los dos primeros meses y el resto después de los seis meses (Figura 23). Se logró el 100 % de sobrevivencia de plántulas evaluadas a los 10 meses de germinadas, cuando tenían una altura promedio de 13.7 cm (Figura 24).

La tasa de germinación en este estudio contrastó con lo que reportó Osuna (1997) para la misma especie, al no lograr la germinación de semillas sometidas a varios tratamientos pregerminativos: escarificación mecánica con aplicación de ácido giberélico,

escarificación con ácido y sumersión en agua hirviendo. Por su parte, Hernández-Najarro (2009), obtuvo un porcentaje de germinación del 16.8%, en semillas sin sarcotesta, con el inicio de la emergencia de la radícula a los 60 días; mientras que Gómez (2011), en experimentos con diferentes grados de deshidratación de semillas de *M. mexicana*, registró el inicio del evento germinativo a los 180 días, con un 11.8% de germinación total y un 26.6 % de sobrevivencia de las plántulas.

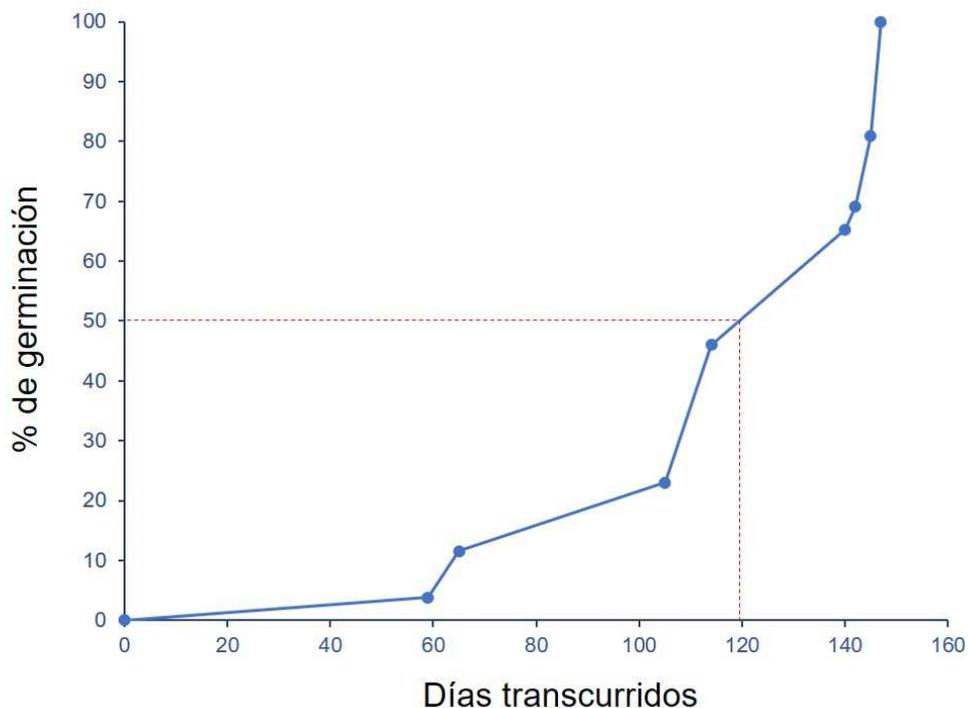


Figura 23. Tasa de germinación de las semillas de *M. mexicana* sembradas sin sarcotesta, la línea roja punteada señala el 50 % de germinación.

En conjunto, se observan bajas tasas de germinación que sus autores atribuyen a diferentes factores, por ejemplo, Osuna (1997) menciona que la testa podría representar una barrera mecánica para el crecimiento del embrión y posterior emergencia de la

plántula; Gómez (2011), menciona como desfavorables las condiciones de siembra en sus experimentos en conjunto con la naturaleza intermedia de las semillas, que las hace resistentes a niveles de deshidratación elevados (90 %) pero no toleran el almacenamiento en frío, mientras que Hernández-Najarro menciona que la sarcotesta actúa como barrera para la imbibición adecuada de las semillas.

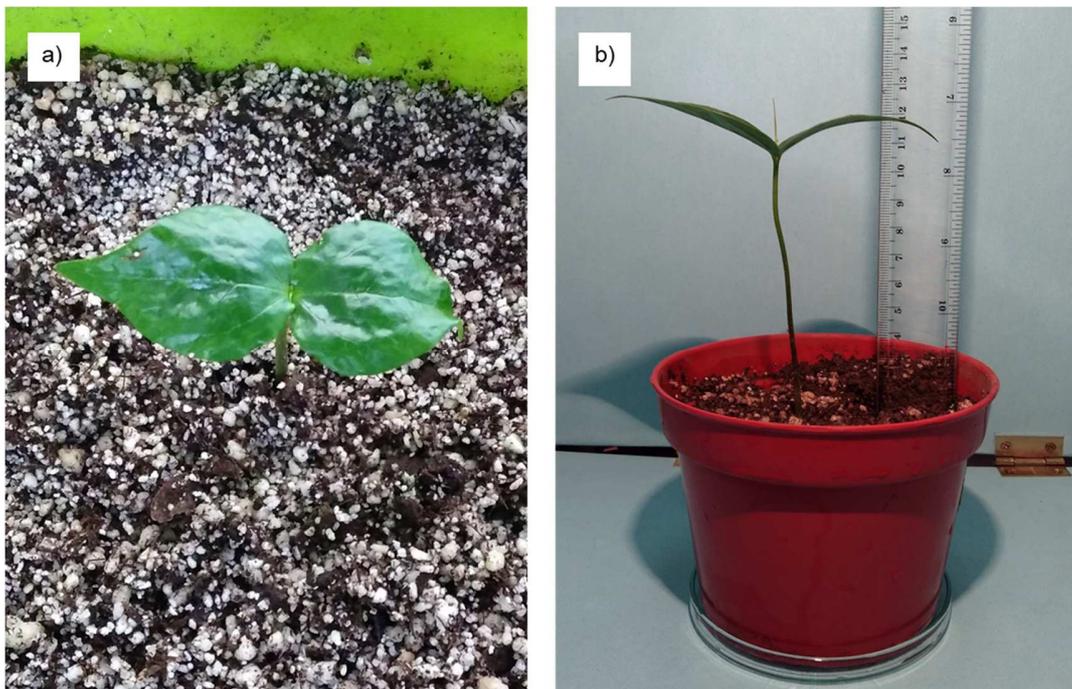


Figura 24. Plántulas de *M. mexicana*. a) Después de dos meses emergió la primera plántula de *M. mexicana*; b) diez meses después de la siembra se transfirieron las plántulas a macetas individuales.

Los resultados del presente trabajo coinciden más con los que obtuvo Becerra-Vázquez (2010), en un experimento *in situ* con sustrato natural en un ejido de Ocozocoautla, Chiapas; quien realizó la siembra una semana después de la colecta y obtuvo un 80.8 % de germinación, en semillas sin sarcotesta, con el inicio del evento a los 46 días, un tiempo medio de germinación de 68.4 días y una supervivencia de plántulas del 94.9; por lo que

concluyó que la especie no presenta problemas si las condiciones de sustrato, temperatura y humedad son adecuados.

La producción de las semillas, su dispersión y la misma germinación, son factores que limitan la dinámica de las poblaciones vegetales (Dalling, 2002) por lo que estos eventos se deben estudiar particularmente en especies con bajas tasas de reproducción o que por diversos motivos se encuentran en alguna categoría de riesgo, que es el caso del 48% del total mundial de especies de magnolias (Rivers et al., 2016b).

Este grupo de plantas presenta tasas de germinación reducidas (Vázquez-Morales et al., 2011; Jacobo-Pereira et al., 2016), condición que se atribuye tanto a los bajos porcentajes de semillas viables que se producen, como a la dormancia morfofisiológica relacionada con la presencia de un embrión rudimentario.

En cuanto a la viabilidad natural de las semillas, se encontró por ejemplo que, para especies como *M. schiediana* y *M. pugana*, ésta fue relativamente baja, del 56% y 67% respectivamente (Vázquez-Morales y Sánchez-Velásquez, 2011; Pereira et al. 2016), situación parecida con *M. mexicana*, para la que se reportó una viabilidad promedio del 60% (Gómez, 2011); sin embargo, esto no es inherente de todas las especies de magnolias puesto que, por ejemplo, en *M. dalbata* se reportó una tasa del 100% (Corral-Aguirre y Sánchez-Velásquez, 2006). Estas discordancias no son fáciles de explicar puesto que la viabilidad de una semilla está influenciada tanto por las características genéticas de la planta madre, como por factores ambientales imperantes en etapas críticas como la floración y la formación-desarrollo-maduración del fruto; a su vez, factores como el grado de madurez de la semilla al momento de la cosecha y su manejo post

colecta también afectan su viabilidad (Orantes-García, Pérez-Farrera, Rioja-Paradela y Garrido-Ramírez, 2013).

En cuanto a la dormancia morfofisiológica que se atribuye a las magnolias, Baskin y Baskin (1998) mencionan que se puede superar al ocurrir dos eventos principales: 1) que el embrión crezca a la talla crítica específica de cada especie y 2) que se rompa la dormancia fisiológica del embrión, sin embargo, están en estudio los métodos o factores que pueden desencadenar dichos eventos. Jacobo-Pereira et al. (2016), mencionan también las dormancias fisiológica, química y mecánica para varias especies del género.

Aunque con fines de propagación, esto representa un problema, la latencia no es un factor negativo en si mismo, si no que es un mecanismo selectivo que permite que las semillas germinen bajo las mejores condiciones ambientales (Flores, Arredondo y Jurado, 2005).

Una de las causas de la dormancia de las semillas se atribuye a la presencia de aceites y sustancias inhibitoras presentes en la sarcotesta, así como a la dureza de la testa que puede limitar la entrada de agua (Osuna, 1997; Vázquez-Morales y Sánchez Velázquez, 2011). Por ejemplo, en *M. schiediana*, otra especie amenazada endémica de México se observó que la sarcotesta inhibió la germinación y se encontró la mejor tasa de germinación (< 80%) cuando la testa se escarificó de forma mecánica, con un periodo de incubación de las semillas a una temperatura de entre 4-10 °C por 13 días e imbibición por 48 horas en agua estéril (Vázquez-Morales y Sánchez Velázquez, 2011).

Así mismo, Jacobo-Pereira et al. (2016), en pruebas de germinación de *M. pugana*, encontraron que la sarcotesta inhibió la germinación (sólo germinó del 3 %), mientras que la remoción manual de sarcotesta permitió una germinación del 52%; además, la adición

de ácido giberélico no estimuló significativamente la germinación, por lo que determinaron latencia química debida la sarcotesta en esta especie.

También, Saldaña et al. (2001) encontraron el mismo tipo de latencia química en *M. iltisana*, con una geminación del 60% en semillas sin sarcotesta y tratadas con estratificación fría. Así mismo, en *M. ovata*, la eliminación de la sarcotesta junto con un tratamiento de desecación a 20°C se reportó un 94 % de germinación, más alto que con semillas frescas sin sarcotesta. En *M. dealbata*, se encontró que la remoción de la sarcotesta junto con un periodo de imbibición de 24 horas en agua a 40°C indujo la mayor tasa de germinación (40 %) entre 11 tratamientos (Vovides e Iglesias, 1996).

No está claro cuáles son las sustancias de la sarcotesta que pudieran inhibir la germinación, esta estructura está formada por sustancias grasosas (Vásquez-Morales et al., 2010) y metabolitos secundarios que, por ejemplo, en *M. dealbata* y *M. Schediana*, son lo suficientemente fuertes como para actuar como insecticidas, cuya presencia en dicha estructura seminal se atribuyó a una respuesta defensiva contra depredadores, hongos y bacterias, previo a la dispersión (Flores-Estévez et al., 2013; Vásquez-Morales et al., 2015).

Sin embargo, es claro que la sarcotesta tiene una función atrayente para la dispersión de las semillas (Vásquez-Morales et al., 2010) por lo que se esperaría su remoción natural por parte de los dispersores en un tiempo reducido, que de no ocurrir tendría efectos negativos obvios puesto que se trata de una estructura carnosa fácilmente putrecible, en este sentido, el total de semillas sembradas con sarcotesta en este estudio, presentaron pudrición. En suma, los ejemplos anteriores coinciden en que la remoción de la sarcotesta fue fundamental para la germinación.

Por otra parte, Gómez (2011) recomienda un periodo corto de secado para favorecer la germinación de *M. mexicana*, al observar a nivel histológico la aparición de tejido después de 10 días de deshidratación; sin embargo, en el presente estudio y en coincidencia con Becerra-Vázquez (2010), quien sembró las semillas después de siete días de abierto el fruto, se obtuvieron altas tasas de germinación con un tratamiento pregerminativo que incluyó únicamente el retiro de la sarcotesta y la imbibición por 24 horas.

Por lo tanto, para *M. mexicana* no serían necesarios periodos de deshidratación de las semillas, al contrario, la siembra debería realizarse en un periodo corto después de abierto el fruto, para evitar que las semillas pierdan viabilidad.

Si bien lo anterior resulta alentador por la facilidad con la que se realizarían tareas de propagación con fines de conservación, esto en sí mismo es un factor limitante para la propagación natural de la especie, ya que si la viabilidad de la semilla se reduce rápidamente, entonces la existencia de dispersores naturales que distribuyan las semillas a tiempo, así como condiciones abióticas adecuadas para la germinación de esas semillas, serían los factores limitantes para la permanencia de esta especie.

En este sentido, aunado a la evidente fragmentación del hábitat del *M. mexicana* (Medina y Soto, 2003; Rivers et al., 2016a), Gutiérrez-Zúñiga y Jimeno-Sevilla (2017) encontraron que 10 especies de aves tanto visitantes como dispersoras de semillas de estos árboles, se encuentran en la NOM-059-SEMARNAT-2010; por lo tanto, la restauración del hábitat de esta especie sería fundamental para su sobrevivencia más allá de la capacidad germinativa de las semillas.

9.2.2. Etapa 2: Establecimiento del método de desinfección para M. mexicana.

Para este estudio se buscó controlar principalmente la contaminación fúngica, ya que se perdieron ensayos previos completos por esta causa. Se utilizó procloraz, fungicida perteneciente al grupo químico de los imidazoles, con actividad por contacto y translaminar, no fitotóxico que ha probado su utilidad contra especies fúngicas como *Septoria* spp., *Fusarium* spp., *Erysiphe graminis*, *Cladosporium* spp. *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Helminthosporium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Sclerotinia* spp. (FMC Agroquímicos de México, 2017). Este fungicida es de uso agrícola extendido y no tanto en micropropagación, para el que, si bien se reporta su utilidad como agente desinfectante, ha generado más interés como inductor de organogénesis, así como potenciador del efecto de las citoquininas exógenas (Ruzic et al. 2008).

En este experimento, no se pudo observar algún efecto estimulador de la fitohormona BAP con el tratamiento con procloraz (®Sportak) en oposición con lo que reportaron Werbrouck y Debergh (1996) y Ruzic et al. (2008), en explantes de “Cuna de moisés” (*Spathiphyllum floribundum*) y del portaijerto de pera *Pyrodwarf* respectivamente, quienes observaron la intensificación del efecto de dicha hormona al producirse mayor número y tamaño de los brotes en presencia del fungicida. El procloraz tampoco controló de forma efectiva la contaminación fúngica de los explantes (contaminación del 70 %) (Figura 25).

En contraste, el tratamiento con terbinafina (®Erbitrax-T), fungicida de la familia de las Alilaminas, que se utilizó por primera vez en este estudio para tratar tejidos vegetales, fue significativamente diferente entre los tratamientos ($p < 0.05$), con la tasa de contaminación más baja (23 %) (Figura 25).

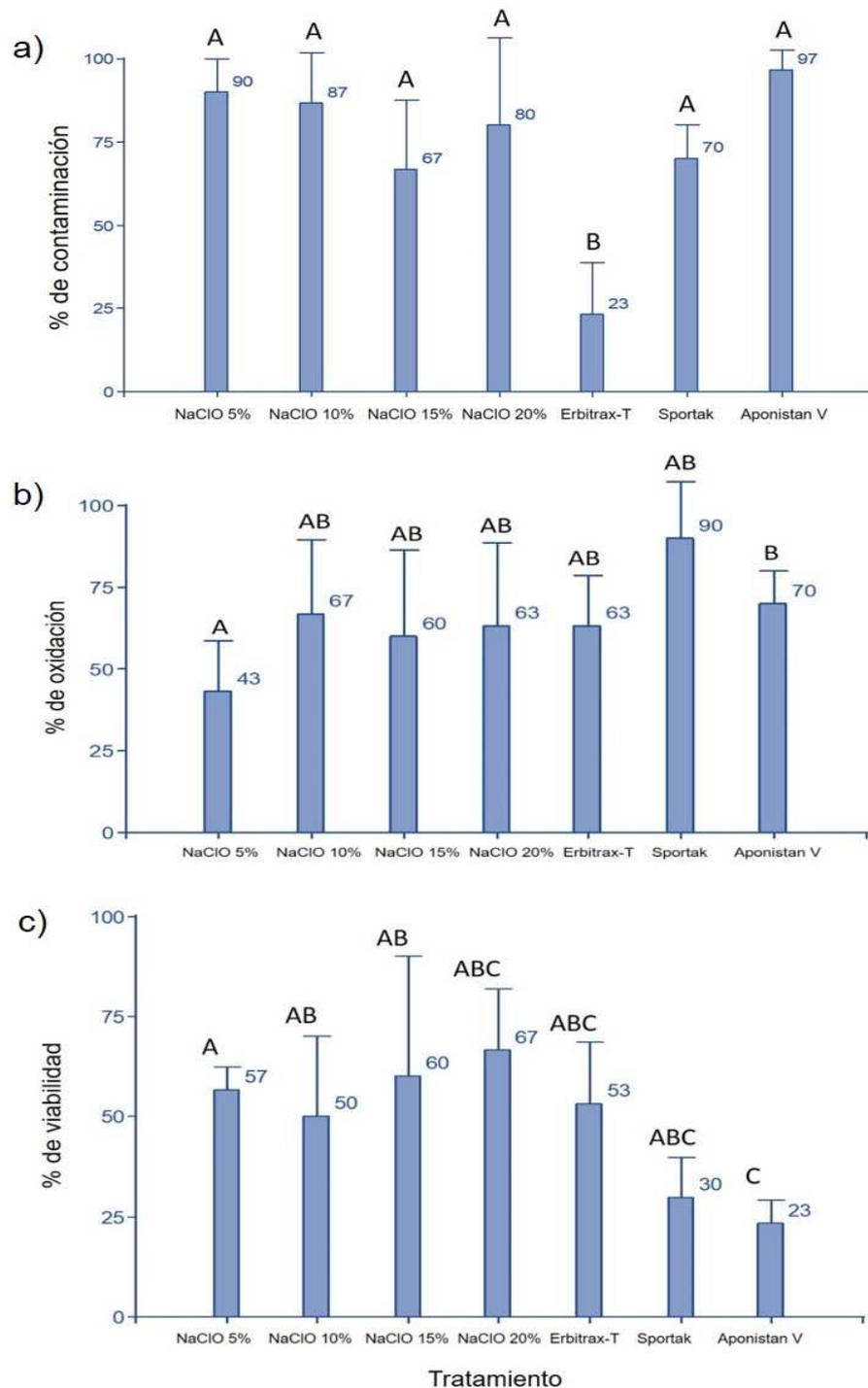


Figura 25. Comparación de ocho tratamientos de desinfección para *M. mexicana*: a) el porcentaje de explantes contaminados con el tratamiento Erbitrax-T fue significativamente diferente; b) el tratamiento con NClO al 5 % mostró la menor oxidación y c) el tratamiento con Aponistan V tuvo la mayor mortalidad de explantes. Barras de error son desviación estándar; letras distintas son significativamente diferentes con $p < 0.05$.

La terbinafina es un antimicótico cutáneo de uso humano, con un amplio espectro de actividad antifúngica y de uso habitual contra *Tinea corporis*, *T. cruris* y *T. pedis*, así como contra *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*, *Microsporum canis* y *Epidermophyton floccosum* (AEMPS, 2017).

Esta alilamina interfiere en la biosíntesis de esteroides fúngicos y su actividad difiere de acuerdo con la especie sobre la que actúe y a la concentración en que se use, al tener efecto fungicida o fungistático (Tapia, 2005; Gregorí, 2005; AEMPS, 2017). En este trabajo no se identificaron las especies de hongos que indujeron contaminación, ni se determinó el tipo de acción ejercido sobre ellos.

Sin embargo, dados los resultados obtenidos con el uso de terbinafina, se probó nuevamente para desinfectar yemas axilares de *M. mexicana* (ver sección 8.5.2.2.2) en donde se logró el 100 % de asepsia de los explantes.

Así mismo se evaluó la eficacia de la Nistatina (®Aponistan V), otro antimicótico de uso humano, de la familia de los polienos que produce naturalmente la actinobacteria *Streptomyces noursei*. Esta sustancia actúa al unirse a los esteroides de la membrana y tiene acción fungostática y fungicida sobre varios géneros de hongos, especialmente *Candida* spp., dependiendo la concentración que se utilice (Formulario Nacional de Medicamentos, 2011). En el presente estudio, mostró la tasa de contaminación más elevada (97 %), esta última significativamente diferente de las demás con $p < 0.05$, esta inhabilidad para controlar contaminación en el tipo de explantes pudo deberse a un error metodológico, ya que para su uso se diluyeron tabletas de esta sustancia en agua, lo que dio como resultado una mezcla grumosa, ya que de acuerdo con Dobias y Hazen (1961),

la Nistatina es casi insoluble en agua, con buena solubilidad en propilenglicol o dimetilsulfóxido.

En suma, los tres fungicidas utilizados actúan sobre el ergosterol, que es un componente lipídico de la membrana celular de los hongos, cuya función es proporcionarle fluidez e integridad, además de propiciar el buen funcionamiento de muchas enzimas, en particular la quitina sintetasa involucrada en el crecimiento y división celular (Tapia, 2005). Sin embargo, cada uno de ellos difiere en su modo de acción, así, la nistatina se une directamente al ergosterol presente en la membrana, lo que induce la formación de poros que alteran su permeabilidad y permite la pérdida de proteínas, glúcidos, cationes y otros componentes que causan la muerte celular; mientras que el procloraz y la terbinafina actúan directamente sobre la síntesis del ergosterol, aunque en diferentes etapas; el primero inactiva la enzima c-14- α -dimetilasa y el segundo inhibe la enzima escualeno epoxidasa, en ambos casos, debido a la falta de ergosterol resultante, se acumulan esteroides tóxicos como el escualeno que es precursor del ergosterol, se afecta la permeabilidad de la membrana del hongo, se interrumpe su crecimiento y la célula eventualmente muere (Gregorí, 2005; Tapia, 2005).

Para establecer de forma más precisa en qué grados y cómo actúan cada uno de estos fungicidas sobre explantes de *M. mexicana* en cultivo *in vitro*, son necesarias correcciones técnicas (para el caso de la nistatina) y un diseño experimental específico.

Por otra parte, el cloro comercial es una de las sustancias que se utilizan con más frecuencia como desinfectante en micropropagación, por ser económico y de fácil adquisición, así como por su efectividad, con uso en distintas concentraciones y tiempos de aplicación (Borges, Estrada, Pérez y Meneses, 2009). En este estudio, de entre los

tratamientos con cloro como principal desinfectante, la concentración de NaClO al 15 % fue la que presentó la contaminación más baja (67 %), aunque no fue significativamente diferente del resto. Sánchez-Cuevas y Salaverría (2004) registraron la tasa de contaminación más baja (>58%), en micropropagación de fresa, con una concentración de cloro al 20 % v/v; de forma similar, Borges et al. (2009) reportaron la menor contaminación (37 %) y alta viabilidad de los explantes, con una concentración de cloro de entre el 25 y 30 %.

El hipoclorito de sodio tiene propiedades oxidantes, es hipertónico y muy alcalino; sus propiedades antimicrobianas se deben a la formación de ácido hipocloroso al contacto con agua, el cual es el principal agente microbicida del cloro; también a su habilidad de oxidar e hidrolizar las proteínas celulares e inhibir reacciones enzimáticas y a su capacidad osmótica para extraer líquidos fuera de las células (Sánchez, Furuya, Arroniz, Gómez y Gómez, 2009; Diomedi et al. 2017).

Los tratamientos con distintas concentraciones de cloro no mostraron diferencias significativas en su acción desinfectante; sin embargo, en todos los tratamientos con fungicidas que se probaron se usó NaClO a una concentración de 20 % v/v por 25 minutos, previo a la aplicación del fungicida, entonces, es probable que la acción de éstos haya mejorado por este paso previo. El uso de cloro comercial como complemento del método de desinfección se ha reportado en otras especies de magnolias (Merkle y Watson-Pauley, 1994; Mata-Rosas et al. 2006; Reyes y Vázquez, 2011).

Por otra parte, el tratamiento con procloraz registró el porcentaje de oxidación más elevado (90 %) y una baja viabilidad de los explantes (30 %); seguido por la nistatina con una oxidación del 70 % y la menor sobrevivencia de los explantes (23 %) entre todos los

tratamientos; mientras que con la terbinafina la oxidación fue un poco más baja 63 %, con una viabilidad del 53 %. Los tratamientos con cloro mostraron en general una oxidación más baja que los tratamientos a los que se les adicionó un fungicida al final del proceso de desinfección y una viabilidad media de 58.5 %.

A parte de la contaminación, otro problema frecuente en el cultivo *in vitro* vegetal, principalmente de especies leñosas, es el oscurecimiento y posterior necrosis de los tejidos; lo cual está asociado a la acción de enzimas del tipo polifenoloxidasas, fenolasas, tirosinasas y peroxidasas, que se sintetizan cuando los tejidos están en estado senescente, en estrés o sufren de alguna herida; estas enzimas, actúan sobre los polifenoles (e.g. taninos, lignina, flavonoides) y la tirosina, oxidándolas a quinonas que son muy reactivas y tóxicas para los tejidos vegetales al destruir lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que lleva al colapso celular (Azofeifa-Delgado, 2009; Hernández y González, 2010).

En micropropagación, los procesos oxidativos se producen por factores tan diversos como el efecto abrasivo del desinfectante aplicado, los cortes que se realizan al explante, la composición del medio de cultivo e incluso el volumen y calidad del recipiente donde se realiza el cultivo (Azofeifa-Delgado, 2009).

En este trabajo, se observó que más que la contaminación, la oxidación fue determinante en el número de explantes viables por tratamiento, conforme aumentó la oxidación, la viabilidad disminuyó en todos los tratamientos; sin embargo, no es posible establecer una causa única para la respuesta oxidativa resultante; en primer lugar, se observó que muchas de las yemas axilares de *M. mexicana*, tendían a oscurecerse inmediatamente después de que se separaran del tejido madre y una vez establecidas en el medio éste

comenzaba a oscurecerse; Azofeifa-Delgado (2009) menciona que esto ocurre en muchos tipos de explantes y que la producción de exudados de naturaleza fenólica es mucho más severa en las primeras etapas del cultivo.

También el tipo de sustancias que se utilizaron durante la desinfección pudo contribuir a esta respuesta oxidativa, ya que en todos los tratamientos se utilizó NaClO que es un agente oxidante en sí mismo, efecto que pudo aumentarse por la adición de los agentes antifúngicos o por la presencia de hongos y bacterias que no pudieron ser controlados. En suma, la oxidación es uno de los factores que afectó grandemente el experimento, pero no se puede establecer una causa única para la misma.

En su trabajo con *M. mexicana*, Reyes y Hernández (2011) no pudieron evaluar la respuesta de los explantes a la composición del medio nutritivo, debido a la oxidación y muerte de estos. Este tipo de problemas se ha reportado en general para las especies de magnolias dado el alto contenido de sustancias fenólicas en sus tejidos (Biederman, 1987; Merkle y Watson-Pauley, 1993; Wojtania et al., 2016).

9.2.3. Etapa 3: Ensayos para la micropropagación de *M. mexicana*.

9.2.3.1. Experimento 1. Efectividad de agentes inhibidores de fenoles (AIFs).

Son muchas las estrategias que se pueden utilizar para el control de oxidación en micropropagación, que van desde la adecuada elección de la planta donadora y el tipo de explante, hasta realizar cambios de consistencia del medio de cultivo, cambio del gelificante, en la intensidad de luz y temperatura de incubación, sales basales, entre otros

(Azofeifa-Delgado, 2009), sin embargo, lo más común es el uso de sustancias inhibidoras de fenoles.

En el presente estudio se utilizaron CA, PVP y AA como AIF. El CA es uno de los adsorbentes más utilizados en cultivo *in vitro* para la remoción de compuestos fenólicos en concentraciones que varían entre 0.5 y 10 g/l (Azofeifa-Delgado, 2009); en magnolias, por ejemplo, fueron suficientes 250 mg/l para la contención de oxidación de *M. dealbata* (Domínguez et al., 2010), 1g/l en el híbrido comercial *Magnolia* “Ann” (Parris, Touchell y Ranney, 2010) y 0.5 g/l para *M. punduana* (Borah et al., 2017).

Sin embargo, no siempre es suficiente la adición de este compuesto para evitar problemas de oxidación, ya que su eficacia puede verse limitada por el tipo de sustancia que adsorbe, así como condiciones fisicoquímicas del medio en el que actúa (Moreno-Piraján, Navarrete, Giraldo y García, 2007; Bernal, Giraldo y Moreno-Piraján, 2016).

De acuerdo con Martínez (2012), el CA tiene estructura cristalina reticular, es extremadamente poroso, con una capacidad superficial del orden de 500 a 1,500 m²/g, en función de la materia prima con que fue creado y el proceso para su activación; es un material adsorbente, porque los átomos en su superficie atraen y retienen moléculas de otros compuestos mediante las llamadas “fuerzas de Van Der Waals”; entre mayor sea su superficie, dada por su porosidad, mayor será su poder adsorbente. También, la presencia de grupos químicos en su superficie; principalmente grupos con oxígeno que determinan su carga, hidrofobicidad y la densidad electrónica, se suman a su capacidad de adsorción (Moreno-Piraján et al., 2007).

Así mismo, el CA también puede favorecer la elongación de brotes y el crecimiento de las raíces en la fase final de la micropropagación de magnolias; sin embargo, puede tener

efectos negativos, por ejemplo, se ha observado que, además de controlar sustancias tóxicas, puede adsorber componentes importantes del medio de cultivo, tales como los reguladores de crecimiento, vitaminas, nutrientes y alterar el pH (Parris et al. 2010; Parris et al., 2012).

Por otra parte, la PVP también es un adsorbente capaz de actuar sobre los fenoles, previniendo su oxidación y polimerización ya que flocula y precipita bajo la acción de los taninos a manera de clarificante orgánico; se usa en micropropagación como paso previo al establecimiento de los explantes, a manera de enjuague ó como componente del medio de cultivo, sólo o en combinación con otros AIF (Azofeifa-Delgado, 2009; Hidalgo, 2011), una de sus principales características es la anfifilia, es decir, que por el balance de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en su estructura, es soluble en solventes polares (e.g. agua, etanol) y apolares (e.g. tolueno, cloroformo), además de tener baja toxicidad y gran estabilidad química (Del Prado, 2016).

Esta sustancia se ha utilizado en la contención de oxidación durante la micropropagación de especies como *Psidium guajava* (Perales, Silos, Valera, Perales y Flores, 2016), *Persea americana* (Dalsaso y Guevara, 1998) y *Punica granatum* (Pushpraj y Patel, 2016), entre otras; sin embargo, no es común su uso en el cultivo *in vitro* de magnolias; Mata-Rosas et al. (2006) utilizaron PVP (1 g/l) en combinación con CA, durante la fase de expresión en la inducción de embriones somáticos de *M. dealbata*.

A diferencia del CA y la PVP, el Ácido Ascórbico (AA), no es adsorbente, es uno de los antióxidantes más utilizados en cultivo de tejidos (Azofeifa-Delgado, 2009), ya que tiene un gran poder reductor; las quinonas que se forman durante el ennegrecimiento de los

explantes son reducidas a fenoles de tal forma que se evita el pardeamiento; si se agota el ácido ascórbico las quinonas se polimerizan y el pardeamiento es irreversible (Maestro y Borja, 1993). En la micropropagación de *Magnolia x soulangiana* y *M. stellata* se usó AA (5mg/l) (Radomir et al., 2012).

En general, el CA, PVP y AA, han probado ser útiles para el cultivo de tejidos de muchas especies vegetales, sobre todo de aquellas con problemas severos de oxidación, sin embargo, su buen funcionamiento depende de muchos factores, tales como la concentración en que se utilizan, la composición del medio de cultivo con el que interactúan e incluso la temperatura e intensidad lumínica; este último factor, resulta interesante, ya que puede inducir a estrés oxidativo, debido a que la luz induce la actividad de muchos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y oxidación de los fenoles (Hernández y González; 2010), de tal forma que el mantenimiento de explantes bajo condiciones de oscuridad durante algunas semanas inmediatamente después de establecidos puede actuar como AIF, Azofeifa-Delgado (2009).

Así, de acuerdo con la gravedad del problema de oxidación que presenten los explantes de la especie con que se trabaja, se deberán establecer las estrategias de mitigación al usar uno o varios AIF. En el presente estudio, se pretendió analizar la eficacia del CA, PVP y AA en conjunción con oscuridad a fin de elegir el mejor método en el establecimiento de explantes de *M. mexicana*; sin embargo, el método de desinfección que se utilizó no fue efectivo y se perdieron por contaminación el 90 % de los explantes, por lo que no fue posible analizar la efectividad de los AIFs.

Es importante aclarar que este experimento se realizó a la par de aquellos para el establecimiento del método de desinfección, por lo que aún no se tenía determinado un método eficaz para este propósito, y no fue posible repetirlo dado la limitada cantidad de material vegetal disponible.

9.2.3.2. Experimento 2. Inducción de organogénesis en yemas apicales.

Se pudo observar que conforme aumentó la oxidación, disminuyó la viabilidad de los explantes en todos los tratamientos, aunque no de forma directa, ya que la oxidación se registró desde los primeros cinco días de transcurrido el experimento y a los 47 días la totalidad de los explantes mostraron algún grado de oxidación; mientras que los explantes de todos los tratamientos se mantuvieron viables durante casi un mes y hasta transcurridos 60 días el 50 % del total de explantes eran inviables. Al final del experimento se registró una viabilidad del 10 % en los tratamientos M1 y M4, y del 35 % en los tratamientos M3 y M2 (Figura 26a y b).

En vista de lo anterior, podemos decir que la adición de PVP y el resguardo en oscuridad durante la primera semana no fueron suficientes para contener la oxidación de los explantes de *M. mexicana* y dado que el tratamiento de desinfección con terbinafina contuvo la contaminación del 100% de los explantes durante casi 40 días, se asumió que los problemas de oxidación observados se debieron a otros factores, como la naturaleza misma del explante por su contenido de sustancias fenólicas como el flavonoide quercetina y taninos (Waizel, 2002), estrés a causa de los cortes realizados ó la interacción con las sustancias del medio, por ejemplo, Wojtania *et al.*, (2015), reportaron que la BAP estimuló la producción de fenoles a concentraciones mayores de 1 mg/l en *Magnolia x*

“Spectrum”. Todos estos posibles factores desencadenantes de oxidación no pudieron ser determinados con claridad y deberán ser estudiados con posterioridad para lograr exitosamente la micropropagación de esta especie.

Por otra parte, durante el traspaso de explantes a medio fresco comenzó a registrarse contaminación, principalmente por hongos, aunque esta no pasó del 60 % hasta el final del experimento (Figura 24c), por lo que podemos decir que si bien se logró la adecuada desinfección de los explantes al inicio del cultivo, el momento del traspaso es crucial y se deberán extremar precauciones en futuras experiencias.

Wojtania et al. (2016), mencionan que las magnolias se micropropagan principalmente mediante la activación de yemas para garantizar la estabilidad genética de las plántulas regeneradas; sin embargo, lograr una alta actividad de las yemas es complicado y depende de factores muy diversos, tanto propios del cultivo como inherentes a la biología de la especie con que se trabaja.

La respuesta a los tratamientos se registró como cualquier cambio en la apariencia de los explantes (aumento de tamaño y engrosamientos), que se presentaron a partir de los 10 días con un máximo a los 50 días en todos los tratamientos, aunque los cambios registrados no fueron lo suficientemente claros entre tratamientos como para poder discernir si el tipo de respuesta sería callo u organogénesis directa (Figura 24d) y después de transcurridos casi 100 días del inicio del experimento, sólo en unos pocos explantes se observaron respuestas favorables y congruentes con el tipo de hormonas utilizadas.

En contraste, para la micropropagación a partir de yemas apicales o axilares de *Magnolia x soulangiana*, la generación de brotes bien formados se registró luego de 60 días

(Kamenicka y Lanakova, 2000), 70 días en *Magolia* x “Spectrum” (Wojtania et al., 2016), 30 días en *M. stellata* (Radomir et al., 2012), 60 días en *M. liliflora* (Sokolov et al., 2014) y 5 a 7 días en *M. punduana* (Borah et al., 2017).

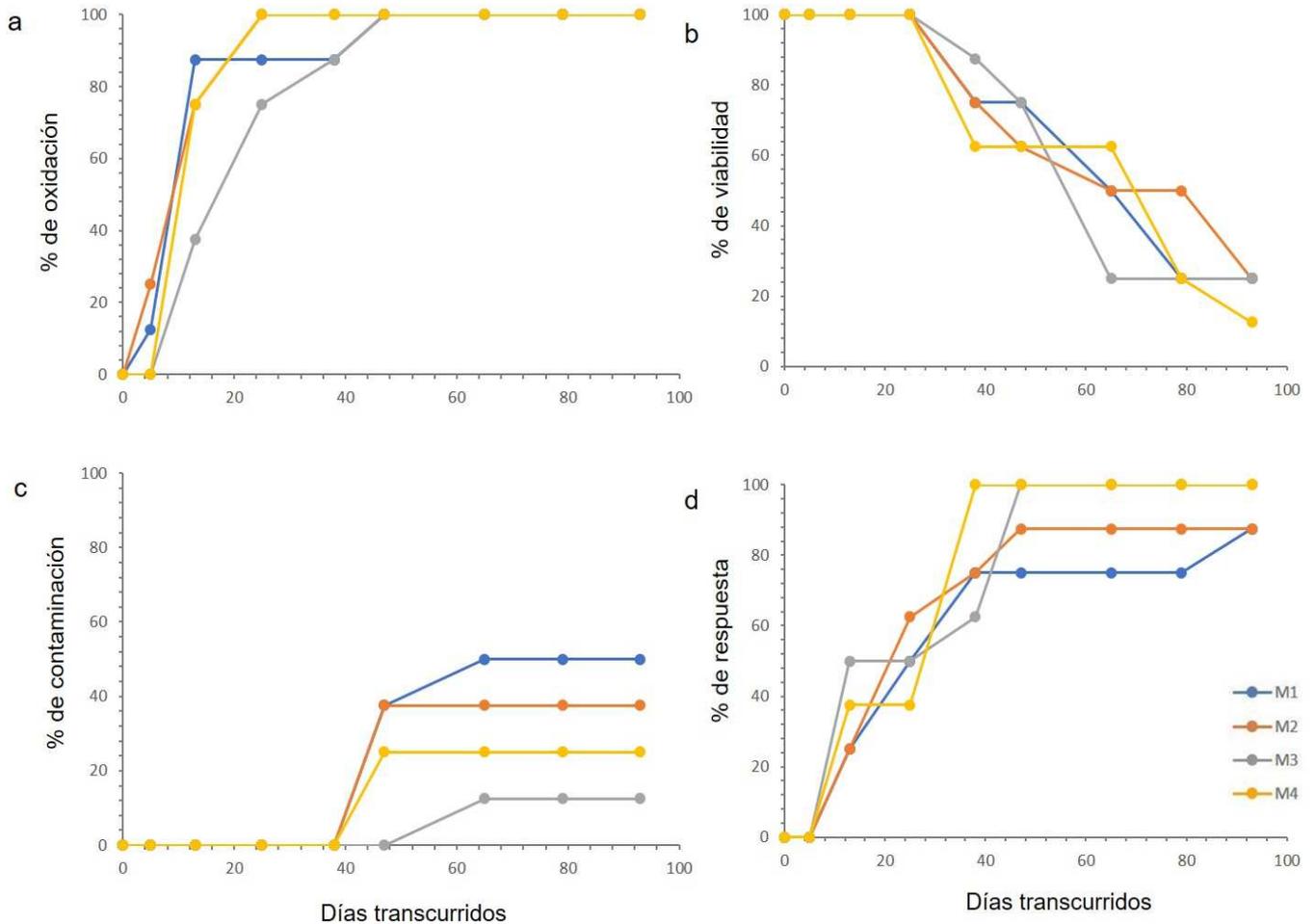


Figura 26. Respuesta de yemas apicales de *M. mexicana* a cuatro distintos medios de cultivo: a) oxidación de los explantes, b) viabilidad del tejido para proporcionar una posible respuesta, c) contaminación, y d) respuesta visible del explante al tratamiento.

Las disimilitudes en los tiempos de brotación son grandes, desde una semana hasta dos meses ó más, en el caso de este trabajo; además de las diferencias metodológicas, estas

variaciones pueden deberse a distintas capacidades de respuesta según se trate de yema apical o axilar, ya que en estas últimas, el fenómeno de paradormancia o dominancia apical puede influir en su desarrollo (Wojtania et al., 2016), por otra parte, aunque se utilizó BAP en todas las especies arriba mencionadas, sola o en combinación con otras hormonas, la concentración fue distinta en cada una de ellas (entre 0.25 y 1 mg/l); en este sentido, se ha observado que la respuesta de las magnolias cultivadas *in vitro*, es de tipo genotipo-específica (Kamenicka y Lanakova, 2000; Radomir, 2012; Sokolov et al. 2014), lo que significa que para cada especie que pretenda micropropagarse debería ser desarrollado un método exclusivo; aunque el tipo de condiciones, sales basales, AIFs y hormonas que se usan pueden ser las mismas, las dosificaciones y combinaciones se deben probar hasta encontrar el método adecuado para cada magnolia.

Debido a los porcentajes de contaminación y oxidación que se presentaron, además de la limitación en el material vegetal disponible, el efecto de los distintos tratamientos sólo se pudo observar en unos cuantos explantes; así, en un solo explante del tratamiento M3 (0.5 BAP) se observó la formación evidente de por lo menos cuatro brotes por organogénesis directa a los 103 días de establecido el experimento (Figura 27), que no progresaron debido a la oxidación total del explante.

Sokolov et al. (2014) obtuvieron la mejor tasa de regeneración de yemas axilares de *Magnolia x soulangeana* y *M. liliflora*, con una concentración de BAP de 0.25 y 0.5 mg/l; Wojtania et al. (2016) usaron como base una concentración intermedia de BAP de 0.3 mg/l para la propagación del híbrido *Magnolia x "Spectrum"* y Parris et al. (2010) obtuvieron una alta tasa de proliferación con 0.45 mg/l de esta citoquinina en *Magnolia "Ann"*. Sokolov

et al. (2014) mencionan que concentraciones de esta citoquinina mayores a 2 mg/l causan ennegrecimiento de los explantes.

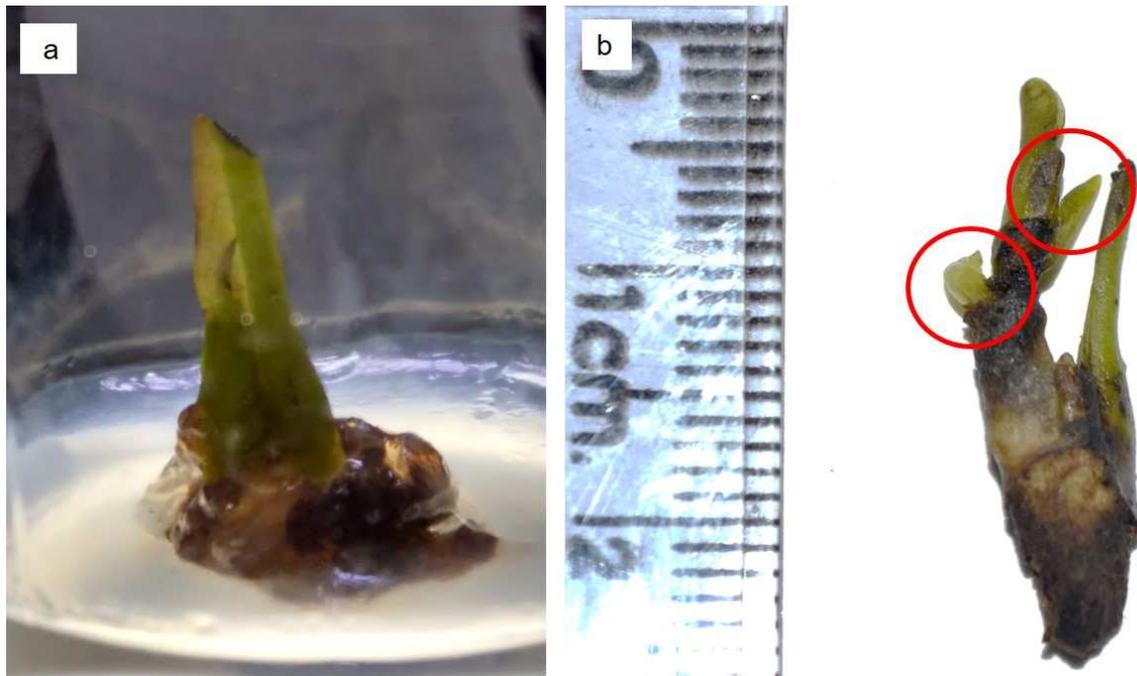


Figura 27. Respuesta de yemas apicales de *M. mexicana* al medio de cultivo: a) yema establecida en el tratamiento M3 (0.5 BAP) a los 67 días, y b) a los 103 días, se observó la presencia evidente de brotes (en círculos rojos).

En este sentido, la concentración de BAP que indujo la brotación en *M. mexicana*, está dentro del intervalo que ha promovido los mejores resultados en otras magnolias. La BAP es una de las citocininas más utilizadas y este tipo de hormonas generalmente se utilizan en bajas concentraciones para estimular la proliferación de tejidos, y su principal propiedad es la estimulación de la división celular al inducir la síntesis de ARN y proteínas, así como la desdiferenciación celular (Chamorro, Martínez, Fernández y Mosquera, 2007; Mesa, Romero y Cruz, 2002).

También, se observó la formación de callo en respuesta al tratamiento M2 (0.25 BAP + 0.25 ANA) a los 136 días, de color blanquecino y consistencia compacta poco friable, morfológicamente parecido a los callos obtenidos para *M. punduana* (Borah et al., 2017) y *M. hernandezii* (Cardozo, Marín, Godoy y Suárez, 2017) y en congruencia con Rodríguez, Álvarez, Centeno, Berros y Rodríguez (2005), quienes mencionan que los callos embriogénicos en especies leñosas son generalmente de apariencia translúcida y consistencia friable.

El callo logrado no prosperó por la oxidación total del explante (Figura 28), que pudo deberse a la exposición a la luz, ya que, aunque la respuesta se obtuvo bajo dichas condiciones, un ambiente de oscuridad es ideal para el buen desarrollo del callo ya que la luz puede inducir la producción de compuestos fenólicos (Weisshaar y Jenkins, 1998; Borah et al., 2017).

En contraste con la mezcla hormonal que indujo callo, Sokolov et al. (2016) encontraron que con la misma proporción BAP/ANA se promovió la generación de brotes en dos híbridos de magnolia, pero su efectividad combinada fue menor que el uso sólo de la citocinina. También reportaron que a concentraciones de BAP mayores de 0.25 mg/l combinadas con ANA se presentaron deformaciones de las hojas, ennegrecimiento, acortamiento de los brotes, hiperhidricidad y formación de callos, mientras que la presencia sólo de la auxina resultó en la formación masiva de callo.



Figura 28. Formación de callo como respuesta de una yema apical de *M. mexicana* al medio de cultivo con el tratamiento M2 (0.25 BAP + 0.25 ANA) a los 136 días.

Kamenicka y Lanakova (2000) encontraron que 3 mg/l de BAP con 0.09 mg/l de ANA promovieron la formación de brotes de *M. x soulangeana*; Nakamura, Wakita y Yokota (1995) en *M. obovata*, encontraron que el 1.25 mg/l de BAP combinados con 0.019, 0.18 o 0.9 mg/l ANA formaron brotes aunque de forma mínima y se relacionó más a la auxina con el ennegrecimiento de los explantes o formación de callo aún en concentraciones bajas. De forma relacionada, para *M. hernandezii*, se encontró que una proporción 1:1 de BAP y la auxina AIA indujo la formación de callo a partir de hoja (Cardozo et al., 2017).

En relación con lo anterior, se sabe que la acción conjunta de dos fitohormonas, sean auxinas ó citocininas, puede inducir una determinada respuesta morfogénica, en función de los niveles relativos entre sí en un tejido, por ejemplo, niveles altos de ambas hormonas conduce a una multiplicación celular con escasa diferenciación, un nivel relativamente alto de citocininas contra auxinas induce formación de brotes, mientras que un nivel alto de

auxinas contra citocininas originarían raíces (Jordan y Casaretto, 2006), lo anterior es una generalidad, pero para cada especie, es necesario ensayar los tipos y concentración de estos mensajeros químicos que inducirán la respuesta deseada, al parecer, para *M. mexicana* una concentración igualitaria citoquinina/auxina promovería la formación de una masa indiferenciada de células.

Por otra parte, en un solo explante del tratamiento M4 (0.5 BAP + 0.25 ANA), se observó la formación de pequeñas protuberancias a los 96 días, de las que no se pudo establecer a simple vista si era inducción a callo o brotes y se tomó la decisión de hacer análisis de sus tejidos antes de que se oxidaran como pasó con los demás explantes de este tratamiento.

Una proporción igual de estas hormonas en *M. x soulangeana* y *M. liliflora*, indujo la formación de brotes, aunque en menor medida comparado con una proporción igualitaria citocinina/auxina o cuando se utilizó únicamente BAP (Sokolov et al., 201), también Kamenika y Lanakova (2000) obtuvieron la formación de brotes con una proporción citocinina/auxina 3:1.

En la Figura 29a, se puede observar una estructura con forma de callo, aunque de forma incipiente y morfológicamente distinta al callo obtenido en el tratamiento M2, por su coloración verde y consistencia compacta. A nivel histológico, se observó en dicha estructura la formación de centros meristemoides dispersos que se aprecian en la imagen como la agrupación de numerosas células con grandes núcleos y escaso citoplasma que evidenciarían actividad celular divisoria.

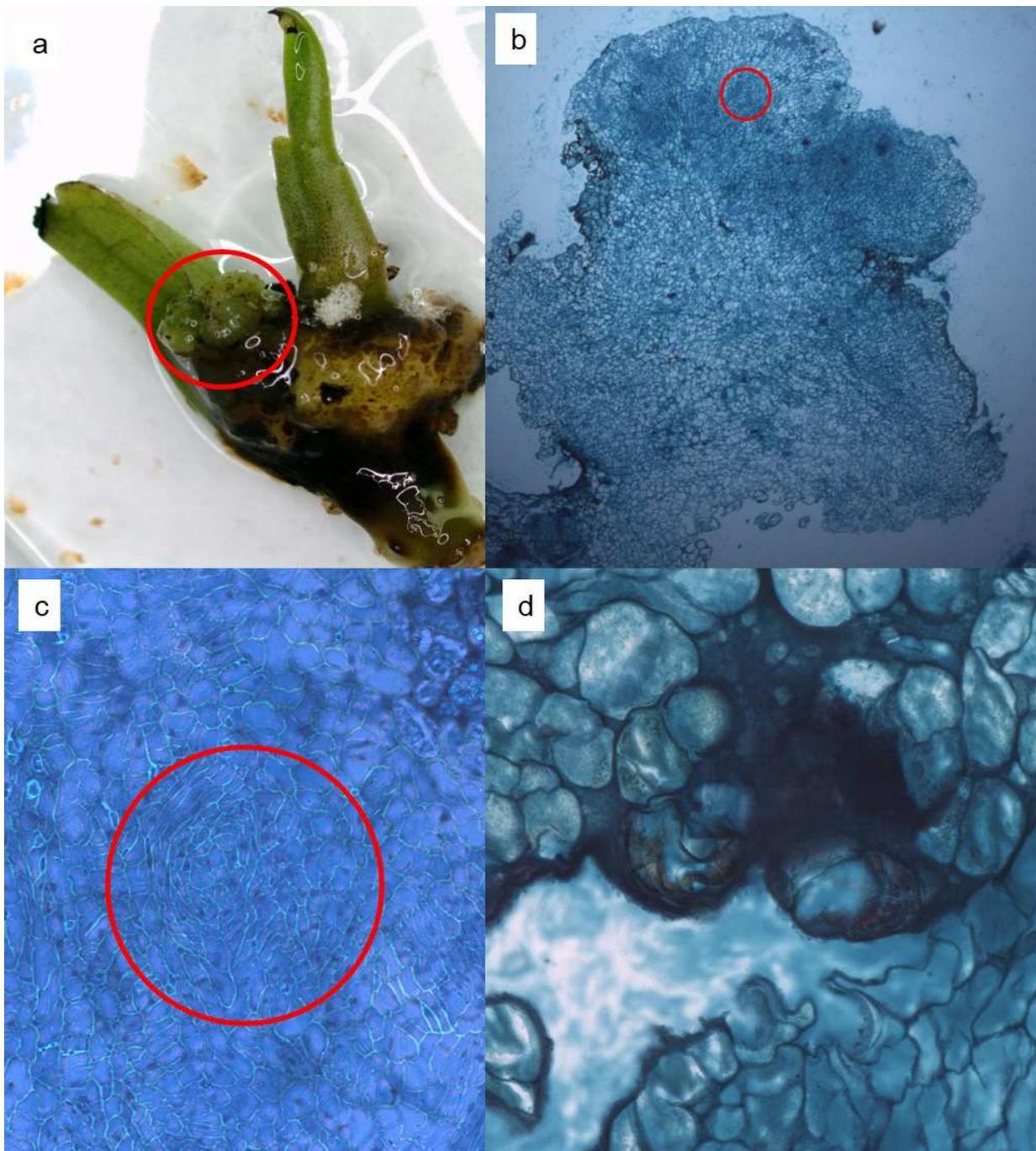


Figura 29. Respuesta de yemas apicales de *M. mexicana* al tratamiento M4 (0.5 BAP + 0.25 ANA): a) el círculo rojo encierra un callo formado en la base del explante, b) corte histológico longitudinal del callo formado (2.5x), en rojo centro meristemoide, c) acercamiento a centro meristemoide (20x, contraste de fases) y, d) presencia de taninos en el tejido del explante (20x).

Este tipo de centros incipientes de división fueron observados en *Stylosanthes guianensis* (Fuentes, Mesa, Ruíz, Peláez y Fernández, 2005), *Coffea canephora* (García, Bravo y Montes, 1995), *Elliotia racemosa* (Woo y Wetzstein, 2008), *Eucalyptus gunnii* (Hervé et al., 2001) y cultivares de *Saccharum* spp. (Dibax, Bomfim, Pereira, Besspalhok y de Oliveira, 2013); en dichos trabajos se reportó que la masa del callo estaba formada principalmente por células parenquimatosas con agrupaciones dispersas de células, que se observaron en los cortes histológicos como agrupamientos de células pequeñas, de citoplasma denso, paredes delgadas y núcleos grandes.

Con la técnica histológica empleada no se logró distinguir con claridad ninguna fase meiótica, sin embargo, la presencia de los centros meristemoides hizo evidente una respuesta generalizada del tejido aunque en una fase muy temprana (Figura 29b yc), ya que no se observó la presencia de bandas procambiales que darían origen a los futuros tejidos vasculares, ni la formación de conos meristemáticos que darían origen a primordios foliares ó la separación de proembriones, que son comunes en callos avanzados (Gómez, Valverde, Arias y Thorpe, 1992; Hervé et al., 2001; Fuentes et al., 2005).

Se pudo observar también la presencia abundante de taninos en las células del explante; a parte de los problemas de contaminación, la oxidación fue un factor crucial que impidió la sobrevivencia de los explantes y se sabe que son los taninos quienes intervienen principalmente en estos procesos, así, se obtuvo evidencia a nivel histológico de la presencia de estas sustancias (Figura 29d).

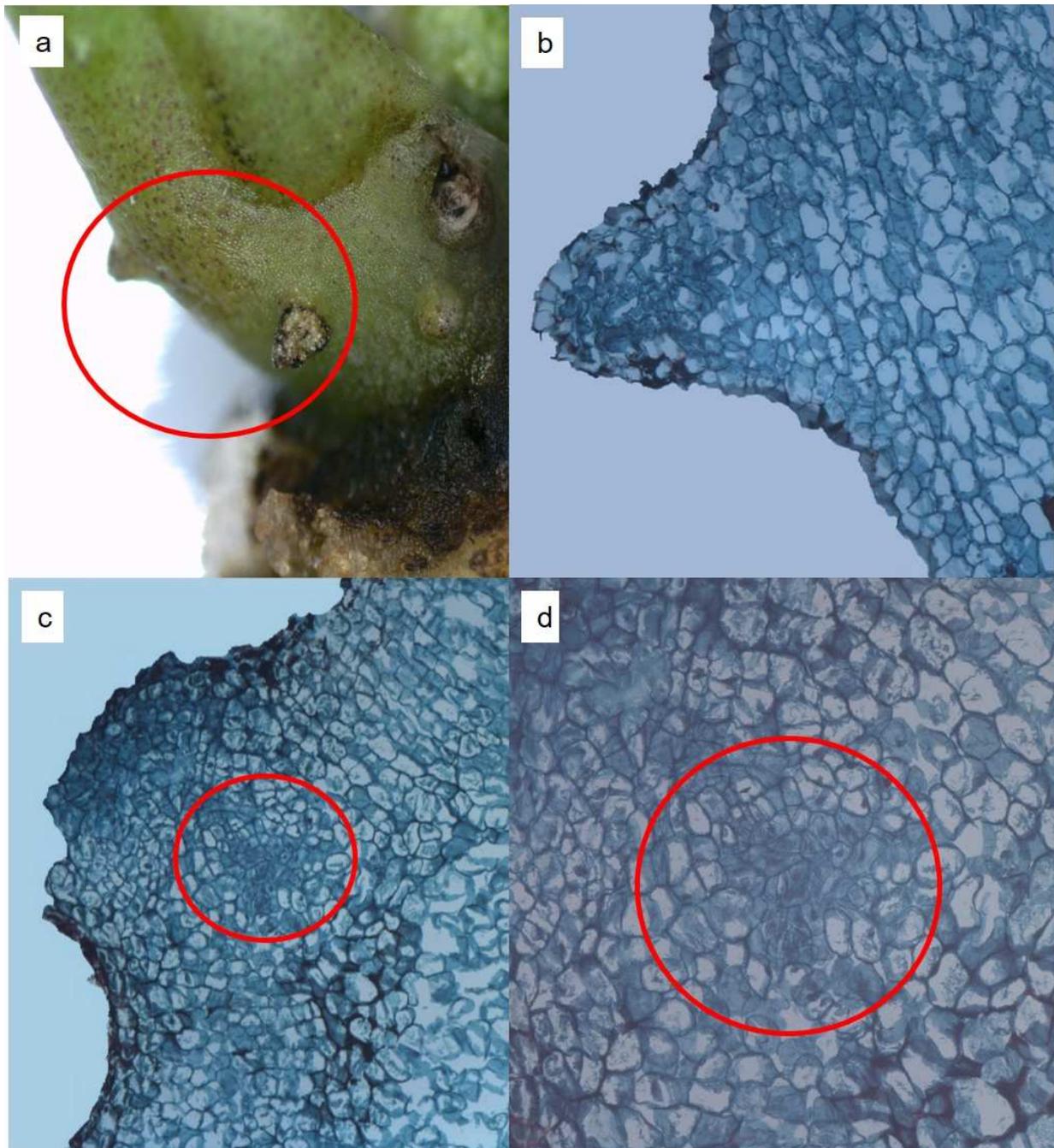


Figura 30. Respuesta de yemas apicales de *M. mexicana* al tratamiento M4 (0.5 BAP + 0.25 ANA): a) el círculo rojo encierra un par de protuberancias formadas en la base de la yema, b y c) corte histológico transversal de las protuberancias formadas (10x), y d) centro meristemoide en la base de la protuberancia (rodeado en rojo) (20x).

En el mismo explante, las protuberancias observadas se interpretaron inicialmente y de forma externa como pequeños brotes organogénicos (Figura 30a); sin embargo, a nivel histológico, aunque el acomodo celular general no fue tan desordenado como en el callo, también se observó formación de centros meristemoides (Figura 30 b, c y d), lo que hace evidente una reacción a la mezcla hormonal pero no se tuvo evidencia de algún proceso organogénico en forma de cono meristemático o de bandas procambiales. Así, podemos decir que bajo el tratamiento M4, es muy probable que sólo se indujera la formación de callo.

No se encontró evidencia en otros estudios de la formación separada de callo y brotes en un solo explante, pero existen muchos ejemplos de la formación de brotes a partir de callo (Hervé et al., 2001; Ikeuchi, Sugimoto e Iwase, 2013; Woo y Wetzstein, 2008, Dibax et al., 2013).

9.2.3.3. Ensayos exploratorios.

Con ninguno de los ensayos exploratorios se obtuvo respuesta evidente, fueron contados los explantes que mostraron algún tipo de actividad, pero esta no prosperó. En la mayoría de los tratamientos se presentaron problemas de contaminación por hongos y bacterias, sin embargo, la oxidación fue el factor principal que afectó la viabilidad de los explantes (Figura 31).

En particular, en los ensayos con embriones y semillas, se encontraron niveles de contaminación y oxidación bajos, pero no se obtuvo respuesta lo que se relacionó con el método de desinfección ya que no se previó que el uso de fungicida sin enjuague podría ser dañino a los tejidos de estas estructuras tan sensibles.

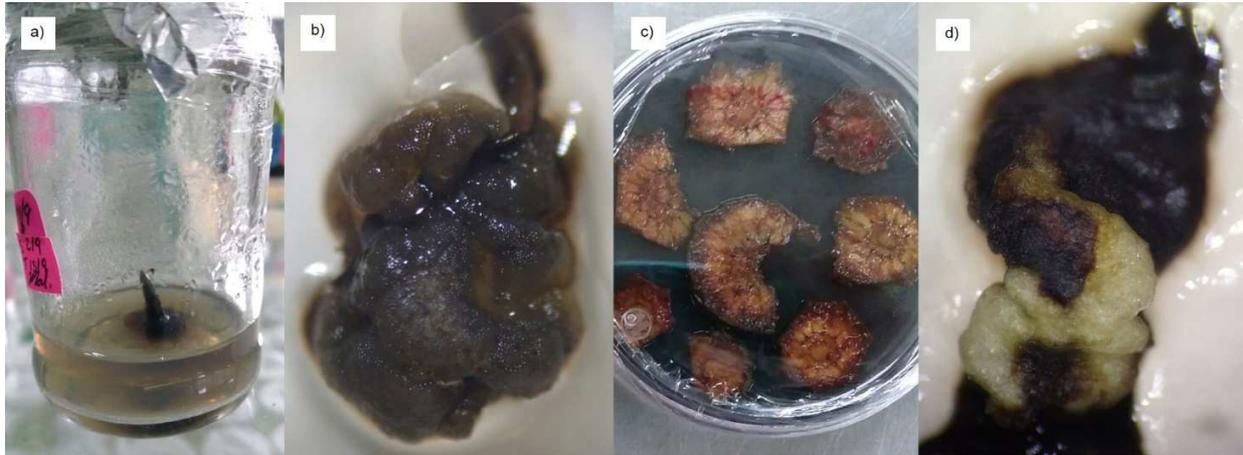


Figura 31. Oxidación en diferentes tipos de explantes de *M. mexicana*, a) yema axilar, b) yema apical, c) sección de ovario y d) tallo.

Sin embargo, aquellos explantes que exhibieron algún tipo de respuesta fueron establecidos coincidentemente en el medio propuesto para agave por Reyes-Díaz, Arzate-Fernández, Piña-Escutia y Vázquez-García (2017) compuesto por sales MS 25% + vitaminas L2 100% + 3 mg/l 2.4 D + 1mg/l BAP con o sin la adición de 250mg/l de caseína hidrolizada, los explantes que mostraron actividad fueron: una semilla inmadura (50 días), un embrión (80 días), una hoja (30 días), siete segmentos de tallo (entre 28 y 30 días), tres yemas apicales 7 (25-30 días) y tres segmentos de raíz (180 días) (Figura 32).

En todos estos explantes se observó la distensión de tejido y la formación incipiente de callo, con variaciones de color entre verde intenso, crema y totalmente translúcido (Figura 32 d, f y h) y de consistencia mayoritariamente compacta; Borah et al. (2017) reportaron que el tipo de callo formado por *M. punduana* varió de color, entre el verde crema, café y blanco, de consistencia friable; mientras, que Mata-Rosas y Jiménez-Rodríguez (2006), reportaron en *M. dealbata* callos de color amarillento, translúcidos y compactos; para *M.*

obovata, se reportaron callos de color amarillento de consistencia friable (Kim et al., 2007); las variaciones morfológicas y de color estarían asociadas con las características de la especie y con el tiempo de desarrollo y manipulación del callo. En todos los casos, los problemas de oxidación impidieron un mayor crecimiento de los callos que al ser transferidos a medio fresco o a medio de inducción con los niveles hormonales reducidos, sufrieron de una oxidación acelerada que fue irreversible en todos los casos.

El ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), es un herbicida de uso amplio en agricultura, pero en pequeñas dosis actúa como auxina sintética, capaz de influenciar división, crecimiento y diferenciación celular (Jordán y Casaretto, 2006). En cultivo *in vitro*, se ha utilizado con éxito en la formación de callos embriogénicos de diversas especies y es de uso común en la micropropagación por embriogénesis somática de magnolias (Merkle y Wiecko 1990; Merkle y Watson-Pauley 1993; Merkle, 1999; Mata-Rosas y Jiménez-Rodríguez, 2006; Kim et al., 2007).

En general, se reporta que la micropropagación de magnolias es complicada y no lo suficientemente exitosa, debido a la recalcitrancia de los tejidos y a problemas de oxidación (Kim et al., 2007; Mata-Rosas y Jiménez-Rodríguez, 2006); sin embargo, se ha logrado la inducción de callo y la obtención de embriones somáticos hasta la obtención de plántulas aclimatadas, con un establecimiento primario de los explantes en un medio con la hormona 2,4-D, sólo o en combinación con citocininas.



Figura 32. Respuesta de diferentes explantes de *M. mexicana* a la acción del medio nutritivo adicionado con 3 mg/l 2.4 D + 1mg/l BAP: a) semilla inadura, b) embrión, c) hoja, d-g) tallo, h) yema apical, e i) raíz.

Así, en *M. punduana*, Borah et al., (2017), encontraron que una concentración de 0.22 mg/l de 2.4D con 0.02 mg/l BAP indujeron callo en el 75 % de las yemas axilares que se usaron como explantes, mientras que en *M. ovobata* se obtuvo la formación de callo embriogénico, en semillas inmaduras, luego de 45 días en el 1- 6 % de los explantes, con 1 mg/l de 2.4-D sola o en combinación con 1g/l de L-glutamina y/o 0.01mg/l de tiazurón (TDZ) (Kim eta al., 2007). En *M. dealbata*, se observó la formación de callo después de 120 días, en el 85 % de los explantes, con el uso de 1 y 0.5 mg/l de 2.4-D (Mata-Rosas y Jiménez-Rodríguez, 2006).

Así mismo, una dosis de 2 mg/l de 2.4D con 0.25 mg/l de BAP y 1g/l de caseína hidrolizada, indujo la formación de callo, en semillas inmaduras de *M. macrophylla*, en el 43 % de los explantes, 60 días después de que se inició el cultivo, aunque sólo uno de los explantes produjo embriones somáticos (Merkle y Watson-Pauley, 1993). Con este mismo medio, en *M. pyramidata* se observó la formación de callos, en el 35 % de los explantes, después de 52 días (Merkle y Watson-Pauley, 1993); en *M. fraseri*, se formó callo en el 12 % de los explantes luego de 22 días; en *M. virginiana* la mayoría de los explantes formaron callo a los 30 días y en *M. acuminata* sólo un explante produjo callo luego de 60 días (Merkle y Wiecko, 1990);

En todos los trabajos anteriores se presentaron problemas de oxidación, que como se ha visto, es un problema común del género; así mismo, los tiempos de respuesta entre las distintas especies varían desde tres semanas hasta 120 días. En el caso de *M. mexicana*, encontramos tiempos de respuesta que variaron según el tipo de explante desde 25 a 180 días.

La auxina 2.4-D es una buena opción para la promoción de callo en Yoloxóchitl, pero se deberá estudiar la concentración de esta auxina que permita un desarrollo exitoso del mismo, así como mecanismos que permitan evitar los problemas de oxidación en los explantes.

9.3. Envío de manuscrito.

Como resultado de esta investigación, en el Anexo 5 se incluye un manuscrito enviado para su revisión y posterior publicación en la revista POLIBOTÁNICA, titulado: “*Comparación molecular y morfológica entre ejemplares de Yoloxóchitl del Estado de México y Veracruz*”.

10. CONCLUSIONES.

1. Los cebadores OPA7, OPA8 y E18, por su mayor capacidad para discriminar entre genotipos, son recomendables para trabajos posteriores con magnolias.
2. La evidencia molecular obtenida indica que los árboles de Yoloxóchitl en Malinalco y Zumpahuacán pertenecen a la sección Talauma y su variación morfológica, sugiere que estos dos ejemplares pertenecen cada uno a una especie diferente a *M. mexicana*.
3. No fue posible el enraizamiento de varetas de *M. mexicana* con ninguno de los tratamientos probados.
4. La propagación por semilla de *M. mexicana* es posible sin ningún tratamiento a la testa, si se aseguran las condiciones de germinación adecuadas.
5. Para lograr la micropropagación exitosa de esta especie será necesario el control efectivo de la oxidación por fenoles.

6. La Terbinafina probó ser eficaz en el control de contaminantes micóticos en cultivo *in vitro*.
7. *M. mexicana* respondió favorablemente a la acción de BAP, ANA y 2.4 D, con diferentes respuestas morfogénicas, pero es necesario asegurar condiciones de asepsia y control de oxidación para lograr un protocolo de micropropagación eficiente.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Adhikari, S., Saha, S., Bandyopadhyay, T. K., and Ghosh, P. (2015). Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon* germplasms and their suitability in molecular barcoding. *Plant. Syst. Evol.*, 301, 439–450.
- AEMPS. (2017). Terbinafina, Ficha Técnica. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. España. 13 pp. Recuperado en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/81957/FT_81957.html.pdf.
- Alcántara-Flores, E. (2002). *Estructura e histoquímica de las partes vegetales usadas en medicina tradicional de Talauma mexicana* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Aldana, M. G. (2010). La multiplicación por estaca o enraizamiento de ramilla: una excelente alternativa para la reproducción asexual o vegetativa del cultivo de cacao. Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional. Recuperado en: www.gambitana.com/cartillas/CARTILLA%20RAMILLA.pdf
- Antonovics, J. (1984). Genetic variation within populations. In: R. Dirzo, and J. Sarukan, Eds., *Perspectives on plant population biology* (pp. 229-241). Sunderland: Sinauer.
- Arrunategui, A. M., Villegas, A., Ocampo, L. A., Rodríguez, L. M., y Badih, A. (2013). Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase I y II en donantes de una población del suroccidente colombiano. *Acta médica colombiana*, 38(1), 16-21.
- Avendaño, R. S., y Acosta R. I. (2000). Plantas utilizadas como cercas vivas en el Estado de Veracruz. *Madera y Bosques*, 6(1), 55-71.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Azofeifa-Delgado, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Azuma, H., García-Franco, J. G., Rico-Gray, V., y Thien, L. B. (2001). Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: the biogeography of tropical and temperate disjunctions. *American Journal of Botany*, 88, 2275-2285.
- Badilla, V. Y., y Murillo, G. O. (2005). Enraizamiento de estacas de especies forestales. *Kurú: Revista Forestal*, 2(6), 1-6.
- Baskin, C. C., and Baskin, J. M. (1998). *Seeds ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. California: Academic Press.

- Becerra-Vazquez, A. G. (2010). *Germinación de semillas y crecimiento inicial de especies arbóreas del bosque seco en la Depresión Central de Chiapas* (Tesis profesional), Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bernal, V., Giraldo, L., y Moreno-Piraján, J. C. (2016). Adsorción de compuestos fenólicos sobre carbones activados modificados químicamente: efecto del sustituyente en el anillo aromático en las interacciones carbón activado-adsorbato. *Afinidad*, 74, 194-201.
- Biederman, I. E. G. (1987). Factors affecting establishment and development of magnolia hybrids *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 212, 625-627.
- Blythe, E. K., Sibley, J. L., Tilt, K. M., and Ruter, J. M. (2007). Methods of auxin application in cutting propagation: a review of 70 years of scientific discovery and commercial practice. *Journal Environmental Horticulture*, 25(3), 166–185.
- Bogado, F., Bravo, C. V., Ayala, P., Sansberro, P., y Luna, C. (2015). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. *Ciencias Agronómicas*, 27, 11-16.
- Bojarczusk, K. (1985). Propagation of magnolias from green cuttings using various factors stimulating rooting and growth of plants. *Acta Horticulture*, 167, 423-432.
- Borah, R., Kumaria, S., y Choudhury, H. (2017). *In vitro* plant regeneration of *Magnolia punduana*: an endemic and threatened plant species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 27(2), 153-159. doi: 10.3329/ptcbv27i2.35020.
- Borges, G. M., Estrada, A. E., Pérez, R. I., y Meneses, R. S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 127-135.
- Budd, C., Zimmer, E., and Freeland, J.R. (2015). Conservation genetics of *Magnolia acuminata*, an endangered species in Canada: can genetic diversity be maintained in fragmented, peripheral populations. *Conservation Genetics*, 16, 1359–1373. doi:10.1007/s10592-015-0746-9.
- Calderón, R. G., y Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del valle de México*. México: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Callaway, D. J. 1994. *The world of magnolias*. Portland: Timber Press.
- Calva, C. G. y Pérez, V. J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista digital universitaria*, 6(11), 1,067-1,079. Recuperado de http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf

- Candolle, P. A. de (1818). *Regni vegetabilis, systema naturale*. Faccímil digital. Recuperado de <http://bibdigital.rjb.csic.es/spa/Libro.php?Libro=2675&Hojas=>
- Cárdenas, M. (2004). El escudo del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. *Archivos de cardiología de México*, 74(3), 173-175.
- Cardozo, P. J. S., Marín, V. B. S., Godoy, C. J. S., y Suárez, R. R. S. (2017). Propagación *in vitro* *Magnolia hernandezii* (Molinillo) a partir de hojas. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(29), 80-85.
- Casarrubias, C. U., González, C. M. M., Cruz, H. A., Cárdenas, S. E., Nieto, A. D. y Guevara, G. R. G. (2003). Variabilidad Genética de *Colletrotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. aislado de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. *Revista Mexicana de fitopatología*, 21(3), 338-345 pp.
- Ceballos, G., List, R., González, M. J. F., Sierra, R. y Ponce, E. (2014). Áreas naturales de México, legado de conservación. México: Fundación TELMEX.
- Cerros-Tlatilpa, R. y Espejo-Serna, A. (1998). Contribución al estudio florístico de los cerros El Sombrero y Las Mariposas (Zoapapalotl) en el municipio de Tlayacapan, Morelos, México. *Polibotánica*, 8, 29-46.
- Chamorro, A. H., Martínez, L. M., Fernández, J. C. y Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. Misty blue. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 47-53.
- Chen, L. Y., Chen, F. J., He, S. C., and Ma, L. Y. (2014). High genetic diversity and small genetic variation among populations of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers. *Biochem. Syst. Ecol.*, 17, 268-274.
- Cires, E., Smet, Y., Cuesta, C., Goetghebeur, P., Sharrock, S., Gibbs, D., and Samain, M. S. (2013). Gap analyses to support *ex situ* conservation of genetic diversity in *Magnolia*, a flagship group. *Biodiversity and conservation*, 22, 567-590.
- CONAFOR. (2010). *Productos maderables certificados, catálogo 2010*, México: CCMSS-CONAFOR.
- Corral-Aguirre, J., and Sánchez-Velásquez, L. R. (2006). Seed ecology and germination treatments in *Magnolia dealbata*: an endangered species. *Flora*, 201, 227-232.
- Couvillion, G. A. (1998). Rooting responses to different treatments. *Acta Horticulturae*, 227, 187-196.

- Cruz, D. R., Vega, F. K. y Jiménez, J. R. (2008). *Magnolia vazquezii* (Magnoliaceae), una especie nueva del Estado de Guerrero, México. *Novon*, 18, 21-24. doi: 10.3417/2005096
- Cruz, M. de la y Badiano J. (1552). *Libellus de medicinalibus Indorum herbis, Códice de la Cruz-Badiano*. Faccímil digital. Recuperado de <https://codices.inah.gob.mx/pc/contenido.php?id=12>
- Cruz, P. F. (2012). *Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas)*. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dalling, J. W. (2002). Ecología de Semillas. En M. Guariguata and G. Kattan (Eds.), *Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales* (pp. 345-375). Costa Rica: Ediciones LUR.
- Dalsaso, L., y Guevara, E. (1998). Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. "Fuerte". *Agronomía Costarricense*, 13(1), 61-71.
- Dibax, R., Bomfim, A. G., Pereira, M. M., Bernal, F. J. C., y Oliveira, R. A. de. (2013). Protocol optimization and histological analysis of *in vitro* plant regeneration of "RB92579" and "RB93509" sugarcane cultivars. *Ciencia Rural*, 43(1), 49-54.
- Dieringer, G., and Espinosa, S. J. E. (1994). Reproductive ecology of *Magnolia schiedeana* (Magnoliaceae), a threatened cloud forest tree species in Veracruz, Mexico. *Bull. Torrey. Bot. Club.*, 121, 154-159.
- Dieringer, G., Cabrera, R. L., Lara, M., Loya, L., and Reyes-Castillo, P. (1999). Beetle pollination and floral thermogenicity in *Magnolia tamaulipana* (Magnoliaceae). *International Journal of Plant Science*, 160(1), 64-71.
- Dieringer, G., Reyes-Castillo, P., Lara, M., Cabrera, R. L., and Loya, L. (1998). Endothermy and floral utilization of *Cyclocephala caelestis* (Coleoptera: Scarabaeoidea; Melolonthidae): a cloud forest endemic beetle. *Acta Zoologica Mexicana*, 73, 145-153.
- Diomedi, A., Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jenena, M. I., Medel, M., Quintanilla, M., Riedel, G., Tinoco, J., and Cifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud. *Revista Chilena de Infectología*, 34,2, 156-174.
- Dobias, B., and Hazen, E. L. (1961). Nystatin. *Chemotherapy*, 3, 108-119. doi: 10.1159/000219536
- DOF. (2010). *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo*, México: Diario Oficial de la Federación.

- Dominguez, F., Chávez, M., Garduño-Ramirez, M. L., Chávez-Avila, V., Rosas, M., and Cruz-Sosa, F. (2010). Honokiol and Magnolol production by *in vitro* micropropagated plants of *Magnolia dealbata*, an endangered endemic mexican species. *Natural product communications*, 5, 235-40.
- Durán, D. (1581). *Historia de las Indias de Nueva España e islas de tierra firme*. Faccímil digital. Recuperado de <http://bdh-rd.bne.es/viewer.vm?id=0000169486&page=1>
- Elizondo-Salas, A. C. (2015). *Conocimiento campesino de árboles maderables en cafetales diversificados en la zona templada de la Sierra de Zogolica* (Tesis de Maestría), Universidad Veracruzana.
- Escobar, I. (1941). *Estudio químico y farmacológico preliminar del yolloxóchitl (Magnolia)*. (Tesis). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L., Souza, V., y Aguirre, X. (Eds.), *Ecología molecular*, México: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.
- Estrada, L. E. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista Muñeton Pérez, Patricia. *Revista Digital Universitaria*, 10(9), Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>
- Falkiner, F. (1990). The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. *Newsletter International Association for Plant Tissue Culture*, 60: 13-23.
- FAO. (2010). Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. En B. Rischkowsky y D. Pilling (Eds.), *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura* (pp. 393-416). Roma: Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>
- Fierro, F. F. (2007). Electroforesis de ADN. En A. Cornejo, A., Serrato, B. Rendon y M. Rocha (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 27-52), México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, SEMARNAT.
- Figlar, R. D., and Nootboom, H. P. (2004). Notes on Magnoliaceae IV. *Blumea*, 49, 87-100.
- Flores, J., Arredondo, A., and Jurado, E. (2005). Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: an endangered cacti genus. *Natural Areas Journal*, 25, 183-187.

- Flores-Estévez, N., Vásquez-Morales, S. G., Cano-Medina, T., Sánchez-Velásquez, L. R., Noa-Carrazana, J. C., and Diaz-Fleischer, F. (2013). Insecticidal activity of raw ethanolic extracts from *Magnolia dealbata* Zucc on a tephritid pest. *Journal of Environmental Science and Health*, 48, 585-589. doi: 10.1080/03601234.2013.774933
- FMC Agroquímicos de México. (2017). *Ficha técnica Sportak*. Recuperado de <http://www.fmcagroquimica.com.mx/wp-content/uploads/2018/06/Sportak-45-CE-Ficha-T%C3%A9cnica.pdf>.
- Fuentes, L., Mesa, A. R., Ruíz, M. L., Peláez, M. I., y Fernández, M. (2005). Estudio histológico en callos de *Sylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. *Pastos y Forrajes*, 28(3), 199-208.
- García, L. A. (2015). En busca de las tierras perdidas Cuertlaxtlan y Amacoyan (Veracruz) en un documento náhuatl de 1542. *Estudios de cultura náhuatl*, 50, 297-328.
- García, A. F., Benchimol, L. L., Barbosa, A. M., Gerdali, I. O., Souza, C. L., and Souza, A. P. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and molecular biology*, 27(4), 579-588.
- García, C. K. D., Romo-Campos, R. L., Pereira, C. J., y Gómez-Rubio, R. (2018). Tasa relativa de crecimiento en plántulas de dos poblaciones de *Magnolia pugana* (Magnoliaceae) en distintos niveles de luz y fertilidad del suelo. *Revista de Biología Tropical*, 66(2), 622-633.
- García, M. E., Bravo, J., y Montes, S. (1995). Estudio histológico de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* variedad Robusta. *Cultivos Tropicales*, 16(2), 35-39.
- Global Tree Specialist Group. (2014). *Magnolia macrophylla*. The IUCN Red List of Threatened Species. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T62595A3116514.en>.
- Gómez, L., Valverde, R., Arias, O., y Thorpe, T. (1992). Regeneración de Tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*) por embriogénesis somática. *Agronomía costarricense*, 16(2), 219-223.
- Gómez, M. B. X. (2011). Germinación de semillas de *Talauma mexicana* deshidratadas en ambientes controlados (Tesis profesional). Universidad Nacional Autónoma de México.
- González, C. C. F., Lozano M. E. L., Cruz, M. C. A., Ochoa, E. I., y Morillo, C. Y. (2016). Caracterización molecular de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq., procedente de diferentes orígenes (Zaire y Camerún) usando marcadores microsátélites, *Acta Agronómica*, 65(3), Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/rt/printerFriendly/48413/56907.

- González, J. (2008). Cultivo de tejidos: una herramienta para el fitomejoramiento. *Contacto Nuclear, ININ*, 49, 37-40.
- Gregorí, V. B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012&lng=es&tlng=es.
- Griffin, J., Blazich, F. y Ranney, T. (1999). Propagation of *Magnolia virginiana* "Santa Rosa" by semi-hardwood cuttings. *Journal of Environmental Horticulture*, 17(1), 47-48.
- Guerra, F. (1938). Contribución al estudio de la farmacología del Yolloxochitl, *Talauma mexicana*. *Archivos Latinoamericanos de Cardiología y Hematología*, 7, 87.
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J. L., y Rodríguez, B. (2003). Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *e-Gnosis*, 1(4). Recuperado de <http://www.e-gnosis.udg.mx/index.php/e-gnosis/article/view/5>
- Gutiérrez-Zúñiga, J. y Jimeno-Sevilla, D. (2017). Dispersores de semilla de Yoloxóchitl (*Magnolia mexicana* DC.) en el Mpio. de Zongolica, Ver. Trabajo presentado en el IV Congreso Mexicano de Ecología, Zongolica, Veracruz. doi:10.13140/RG.2.2.17043.58404
- Hartmann, H. T. y Kester, D. E. (1995). *Propagación de plantas: principios y prácticas*. México: Compañía Editorial Continental.
- He, J., Chen, L., Si, Y., Huang, B., Ban X. and Wang Y. (2009). Population structure and genetic diversity in wild and cultivated populations of the traditional chinese medicinal plant *Magnolia officinalis* subsp. *Biloba* (Magnoliaceae). *Genetica*, 135, 233-243.
- Hebda, R. J., and Irving, E. (2004). On the origin and distribution of Magnolias: tectonics, DNA, and climate change. In E. T. Channell, D.V., Kent, W. Lowrie, and J. G. Meert (Eds.), *Timescales of the Paleomagnetic Field*, Washington: Geophysical Monograph Series.
- Hernández, F. (1577). *Historia natural de la Nueva España*. Faccímil digital. Recuperado en: http://www.ibiologia.unam.mx/plantasnuevaspana/historia_de_las_plantas_IG.html
- Hernández, Y., y González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos tropicales*, 31(4), 15-23.
- Hernández-Cerda, M. E. (1980). Magnoliaceae. *Flora de Veracruz*, México: Gómez-Pompa.

- Hernández-Najarro, F. (2009). *Germinación de Flor de Corazón (Talauma mexicana (DC.) Don)* (Tesis profesional). Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Hervé, P., Jauneau, A., Paques, M., Marien, J. N., Boudet A. M., and Teulieres, C. (2001). A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. *Plant Science*, 161, 645-653.
- Hidalgo, T. J. (2011). *Tratado de enología*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Hiroshima, K., Ishida, K., and Tomaru, N. (2003). Effects of pollen shortage and self-pollination on seed production of an endangered tree, *Magnolia stellata*. *Annals of Botany*, 95, 1009-1015. doi: 10.1093/aob/mci107
- Hogbin, P. M., and Peakall, R. (1999). Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, 13, 514-522.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell Advance*, 25, 3159-3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053
- INEGI. (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Zumpahuacán, México, Clave geoestadística 15119 2009. Recuperado de http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/15/15119.pdf
- INEGI. (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Malinalco, México, Clave geoestadística 15052 2009. Recuperado en: https://ecitydoc.com/download/prontuario-de-informacion-geografica-municipal-30_pdf
- INEGI. (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Zongolica de Ignacio de la Llave, Veracruz, Clave geoestadística 30201 2009. Recuperado en: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30201.pdf
- Ishida, K., Yoshimaru, H., and Ito, H. (2003). Effects of geitonogamy on the seed set of *Magnolia obovata* Thunb. (Magnoliaceae). *International Journal of Plant Science*, 164(5), 729-735.
- Isidro-Casas, G. (2011). *Estudio morfofisiológico y poblacional de Talauma mexicana "Yoloxochitl" (DC.) Don., en bosque mesofilo de montaña, Zongolica Veracruz.* (Reporte de servicio social). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jacinto-Hernández, C., Garza-García, R., Garza-García, D., y Bernal-Lugo, I. (2014). Caracterización de germoplasma nativo de frijol con base en marcadores moleculares y atributos de calidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(2),

Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000200007

- Jacobo-Pereira, C., Romo-Campos, R., y Flores, J. (2016). Germinación de semillas de *Magnolia pugana* (Magnoliaceae), especie endémica y en peligro de extinción del occidente de México. *Botanical Science*, 94(3), 1-10.
- Jiménez-Ramírez, J., y Cruz-Durán, R. (2005). *Magnolia krusei* (Magnoliaceae), una especie nueva de Guerrero, México. *Novon*, 15: 438-441.
- Jiménez-Ramírez, J., Vega-Flores, K., Cruz-Durán, R., y Vázquez-García, J. A. (2007). *Magnolia guerrerensis* (Magnoliaceae), una especie nueva del bosque mesófilo de montaña del estado de Guerrero, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 80, 73-76.
- Jordán, M., y Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En F. A. Squeo y L. Cardemil (Eds.), *Fisiología vegetal*, Chile: Universidad de La Serena.
- Joshi, M., and Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 1(5), 81-97.
- Kamenicka, A. (1996). Rooting of *Magnolia x soulangeana* microcuttings, *Biología*, 51, 135-439.
- Kamenicka, A., and Lanakova, M. (2000). Effect of medium composition and type of vessel closure on axillary shoot production of magnolia *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22, 129–134.
- Kametani, T., Terasawa, H., Ihara, M., and Iriarte, J. (1975). Liriodenine from *Talauma mexicana*. *Phytochemistry*, 14, 1884-1885.
- Kang, Y., y Ejder, E. (2011). *Magnolia sprengeri* Pamp.: morphological variation and geographical distribution. *Plant Biosystems*, 145(4). doi: 10.1080/11263504.2011.633352
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K., Ayad, W., and Hodgkin, T. (1997). *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. Roma: International Plant Genetic Resources Institute.
- Kelleher, C. T., and Diskin, A. (2017). Assessing botanical gardens specimens as a genetic resource for the future conservation – a pilot study using *Magnolia delavayi* in the gardens of Ireland. *Hortus botanicus*, 12. doi: 10.15393/j4.art.2017.3942
- Kikuchi, S., and Isagi, Y. (2002). Microsatellite genetic variation in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* ssp. japonica. *Heredity*, 88, 313-321.
- Kim, S., and Suh, Y. (2013). Phylogeny of Magnoliaceae based on ten chloroplast DNA regions. *Journal of Plant Biology*, 56, 290-305.

- Kim, Y. W., Park, S. Y., Park, I. S., and Moon, H. K. (2007). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of *Magnolia obovata* Thunberg. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 237-242. doi: 10.1007/s11816-007-0037-0.
- Kohn C., Conrad, K., Kramer, M., and Pooler, M. (2018). Genetic diversity of *Magnolia ashei* characterized by SSR markers. *Conservation genetics*, doi: 10.1007/s10592-018-1065-8.
- Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 41-77). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Kuang, D. Y., Wu, H., Wang, Y. L., Gao, L. M., Zhang, S. Z., and Lu, L. (2011). Complete chloroplast genome sequence of *Magnolia Kwangsiensis* (Magnoliaceae): implication for DNA barcoding and population genetics. *Genome*, 54, 663-673.
- Latsague, M., and Lara, J. (2003). Total phenol content and its relations with rhizogenesis in cuttings of *Nothofagus pumilio* (Poepp. et endl.) Krasser. *Gayana Botánica*, 60(2), Recuperado de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-66432003000200002.
- Laurentin, H., and Karlovsky, P. (2007). AFLP fingerprinting of Sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars: identification, genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1437-1446. doi: 10.1007/s10722-006-9128-y
- Litz, R. E., y Jarret, R. L. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En W. M. Roca y L. A. Mroginski. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 143-172). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Llorente, B. E. 2000. Aislamiento, purificación, caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata.
- López, A. D. M., Bock, B. C., and Bedoya, G. (2008). Genetic structure in remnant populations of an endangered Andean *Magnolia*. *Biotropica*, 40, 375-379.
- López-Patiño, E. J., López-Sandoval, J. A., Beltran-Retis, A. S., y Aguilera-Gómez, L. I. (2012). Composición de la flora arbórea en el área natural protegida Tenancingo-Malinalco-Zumpahuacán, Estado de México, México. *Polibotánica*, 34, 51-98.
- Lozoya, X. (1999). *Xiuhpatli, Herba officinalis*. México: Offset.
- Luna-Martínez, F., Flores-Martínez, A., y Ponce-Noyola, P. (2003). Caracterización molecular de aislados de *sclerotium cepivorum* mediante análisis de polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar. *Elementos*, 49(1), 53. Recuperado de <http://www.elementos.buap.mx/num49/htm/53.htm>
- Lynch, M., and Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3, 91-99.

- Maene, L., and Debergh, P. C. (1985). Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 1-11.
- Maestro, D. R., y Borja, P. R. (1993). Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y aceites*, 44(2), 107-111.
- Maldonado, P. J. L. (2000). La expedición botánica a Nueva España, 1786-1803: el jardín botánico y la cátedra de botánica. *Historia Mexicana*, 50(1), 5-56.
- Marín, J. A. (1997). *La micropropagación y la mejora de especies frutales*. Zaragoza: Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales, Zaragoza.
- Martínez, C. I. (2010). *La flora y vegetación ruderal de Malinalco, Estado de México* (Tesis de Maestría). Colegio de Postgraduados.
- Martínez, Y. A. A. (2012). Desarrollo de carbones activados a partir de residuos lignocelulósicos para la adsorción y recuperación de tolueno y n-hexano (Tesis doctoral). Universidad de San Jorge.
- Martínez-Pinillos, C. E., y Martínez-Castillo, J. L. (1996). Características de cepillado y lijado de 33 especies de madera. *Madera y bosques*, 2(2), 11-27.
- Mata-Rosas, M., and Jiménez-Rodríguez, A. (2006). Somatic embryogenesis and organogenesis in *Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae), an endangered, endemic Mexican species. *HortScience*, 41(5), 1325-1329.
- Medina-Abreo, M. E., y Soto, M. (2003). Los sitios de colecta de las especies amenazadas o en peligro de extinción en el estado de Veracruz, México. *Foresta Veracruzana*, 5(1), 7-14.
- Medrano-Hernández, J. M., Rodríguez, O. J. L., Reyes-Trejo, B., and Peña-Ortega, M. G. (2017). Molecular characterization using ISSR primers of *Magnolia mexicana* DC. from two regions in Zongolica, Veracruz, Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23(3), 427-436. doi: 10.5154/r.rchscfa.2017.03.019
- Merkle, S. A., and Wiecko, A. T. (1990). Somatic embryogenesis in three magnolia species. *Journal of American Society of Horticulture Sciences*. 115, 858–860.
- Merkle, S. A., and Watson-Pauley, B. A. (1993). Regeneration of big-leaf magnolia by somatic embryogenesis. *Horticultural Science*, 28, 672-673.
- Merkle, S. A., and Watson-Pauley, B. A. (1994). Ex vitro conversion of *Pyramid magnolia* somatic embryos. *Horticultural Science*, 29, 1186–1188.
- Mesa, D., Romero, A., y Cruz, A. M. (2002). Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación *in vitro* de *Leucaena leucocephala* vc Perú. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36(3), 271-274.
- Micheli-Serra, A. (1998). Acerca de la terapéutica digitalica, Bosquejo histórico. *Gaceta Médica Mexicana*, 136, 511-518.

- Micheli-Serra, A. (2004). El largo camino hacia la cardiología mexicana de hoy. *Gaceta Médica Mexicana*, 140(3), 347-352.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., and Waugh, R. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the análisis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3, 127-136.
- Monardes, N. (1574). *Primera y segunda y tercera partes de la historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en medicina*. Faccímil digital. Recuperado de <http://bdh-rd.bne.es/viewer.vm?id=0000113273&page=1>
- Mondragón, J. C. (2003). Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de nopal (*Opuntia* spp. Cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 9(1), 97-114.
- Mora-Rocha, A. M., y Cerón-Reyes, Y. (2006). *Principales recursos vegetales presentes en el municipio de Malinalco, Edo. de México* (Tesis profesional). Instituto Politécnico Nacional.
- Moreno-Piraján, J. C., Navarrete, L. F., Giraldo, L., y García, V. (2007). Adsorción de fenol y 3-cloro fenol sobre carbones activados mediante calorimetría de inmersión. *Información Tecnológica*, 18(3), 71-80.
- Morón, M. A., Lugo-García, G. A., and Aragón-García, A. (2014). Description of the third instar larvae of five species of Cyclocephala (Coleoptera, Melolonthidae, Dynastinae) from Mexico. *Revista Brasileira de Entomologia*, 58(3), 219-228. doi: 10.1590/S0085-56262014000300001
- Mroginski, L. y Roca, W. (1991). Establecimiento de cultivos vegetales *in vitro*. En W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 19-40). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-65
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 263–273.
- Muñiz-Castro, M. A., Castro-Féliz, A. S., Santerre, A. L., and Vázquez-García, J. A. (2017). Genetic population structure and diversity of *Magnolia pacifica* A. Vázquez species complex in southwestern Mexico inferred from ISSR markers. Work presented in the *XIX International botanical congress*, Shenzhen China.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nakamura, K., Wakita, Y., Yokota, S., Yoshizawa, N., and Idei, T. (1995). Induction of multiple shoots by shoot apex culture in *Magnolia obovata* Thunb. *Plant Tissue Culture Letters*, 12(1), 34-40.

- Nei, M., and 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. doi:10.1073/pnas.76.10.5269
- Newton, A. C., Gow, J., Robertson, A., Williams-Linera, G., Ramírez-Marcial, N., González-Espinosa, M., and Ennos, R. (2008). Genetic variation in two rare endemic Mexican trees, *Magnolia sharpii* and *Magnolia schiedeana*. *Silvae Genetica*, 57, 348-356.
- Nie Z. L., Wen J., Azuma, H., Qiu, Y. L., Sung, H., Meng, Y., Sun, W. B., and Zimmer, E. A. (2008). Phylogenetic and biogeographic complexity of Magnoliaceae in the northern hemisphere inferred from three nuclear data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 1027-1040.
- Orantes-García, C., Pérez-Farrera, M. A., Rioja-Paradela, T. M., y Garrido-Ramírez, E. R. (2013). Viabilidad y germinación de semillas de tres especies arbóreas nativas de la selva tropical, Chiapas, México. *Polibotánica*. 36, 117-127.
- Osburn, L. D., Trigiano, R. N., and Cheng, Z. (2014). Adventitious rooting of woody plants. In C. A. Beyl and R. N. Trigiano (Eds.), *Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises* (pp. 231- 240), Florida: CRC Press.
- Osuna, H. R., Juárez, J., Brechú, A., y Laguna, G. (2000). Caracterización de semillas de *Talauma mexicana* (DC.) Don con base en su morfología y tolerancia a la deshidratación. Trabajo presentado en el 1er. Congreso Latinoamericano de Herbolaria, CIDNAT, México.
- Osuna, H. R., Varela, T., y Osuna, A. M. (2015). *Propagación de plantas medicinales*. México: Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades.
- Osuna-Fernández, H. R. (1997). *Estructura y respuesta germinativa de semillas de plantas medicinales: Chiranthodendron pentadactylon y Talauma mexicana* (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Page, R. D. M. (2001). TreeView versión 1.6.6. Escocia, Reino Unido. Recuperado de <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.htm>
- Palacios, E. (2006). Ficha técnica de *Talauma mexicana*. En Instituto de Historia Natural y Ecología (Eds.), *Cuarenta y ocho especies de la flora de Chiapas incluídas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000*. México: SNIB-CONABIO. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Talaumamexicana00.pdf>
- Paparozzi, E. T. (2008). Anatomical and physiological changes that occur during rooting of cuttings. In C. A. Beyl and R. N. Trigiano (Eds.), *Plant propagation concepts and laboratory exercises* (pp. 189-194), New York: CRC Press.
- Parris, J. K., Touchel, D. H., and Ranney, T. G. (2010). Optimizing *in vitro* Growth Conditions for *Magnolia* "Ann". *SNA Research Convergence*, 55, 30-35.
- Parris, J. K., Touchell, D. H., Ranney, T. G., and Adelberg, J. (2012). Basal salt composition, cytokinins and phenolic binding agents influence *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Magnolia* "Ann". *HortScience*, 47(11), 1625-1629.

- Pavlíček, A., Hrdá, S., and Flegr, J. (1999). FreeTree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/jackknife analysis of the tree's robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Freenkelia*. *Folia Biologica*, 45, 97-99.
- Pennington, T. D., y J. Sarukhán. (1998). Árboles tropicales de México, manual para la identificación de las principales especies. México: Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica.
- Perales, A. L., Silos, E. H., Valera, M. L. L., Perales, S. C., y Flores, B. S. (2016). Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(2), 375-386.
- Pérez, N. N., y Piñero, D. (1997). Isoenzimas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, 77-84. doi: 10.17129/botsoci.1522
- Pérez, V. M. (1996). Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. Trabajo presentado en el 3º Simposio Científico en Biología Celular y Molecular, Universidad de Coruña, España.
- Phillips, W., Rodríguez, H., y Fritz, P. (1995). *Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (Theobroma cacao)*. Costa Rica: Informe técnico # 252. CATIE.
- Prado, A. A. del. 2016. *Polivinilpirrolidonas aminadas: síntesis, caracterización y aplicaciones en los campos biomédico y tecnológico* (Tesis doctoral), Universidad Autónoma de Madrid.
- Preece, J., and Compton, M. (1991). Problems with explant exudation in micropropagation. In Bajaj Y. P. S. (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry* (168-189), Berlin: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-76415-8_10
- Prevost, A., and Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 107-112.
- Pushpraj, S., and Patel, R. M. (2016). Factors affecting *in vitro* degree of browning and culture establishment of pomegranate. *African Journal of Plant Science*, 10(2), 43-49. doi: 10.5897/AJPS2013.1119 AJPS
- Radomir, A. M., Petolescu, C., and Tudor, R. C. M. (2012). The assessment of genetic stability of *Magnolia x soulangiana* and *Magnolia stellata* plant regenerated *in vitro* using RAPD markers. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16(4), 58-62.
- Rentaría, A. M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte L., Souza, V. y Aguirre, X. (Eds.), *Ecología molecular* (pp. 541-566), México: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.
- Reyes A., E., y Vázquez, H. J. P. (2011). Establecimiento *in vitro* de Flor de Corazón (*Talauma mexicana* (DC.) Don). Trabajo presentado en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Querétaro, México.

- Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., and Vázquez-García, L. M. (2017). Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial crops and products*, 108, 81-85. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.06.021.
- Riek, J. de, Calsyn, E., Everaert, I., Bockstaele, E. van, and Loose, M. de. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 1254-1265.
- Rivers, M. C., Beech, E., Murphy, L., and Oldfield, S. (2016a). *The red list of Magnoliaceae: revised and extended*. Richmond, UK: Botanic Gardens Conservation International.
- Rivers, M. C., Martínez-Salas, E., and Samain, M. S. (2016b). *Magnolia Mexicana*. The IUCN Red List of Threatened Species. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T193977A2293105.en>.
- Rodríguez, R., Álvarez, C., Centeno, M., Berros, B., y Rodríguez, A. (2005). Embriogénesis somática y estrategias para superar las limitaciones en leñosas. En Sánchez M. y D. Ríos (Eds.), *Bioteconología vegetal en especies leñosas de interés forestal*, Chile: Universidad de Concepción.
- Rodríguez-Jiménez, C., Fernández-Nava, R., Arreguín-Sánchez, M. L. y Rodríguez-Jiménez, A. (2005). Plantas vasculares endémicas de la cuenca del río Balsas. *Polibotánica*, 20, 73-99.
- Ruter, J. M. (2008). Cloning Plants by Rooting Stem Cuttings. In Beyl C. A. and R. N. Trigiano (Eds.), *Plant propagation: concepts and laboratory exercises*. Florida: CRC Press.
- Ruzic, D., Vujovic, T., Milenkovic, S., Cerovic, R., and Miletic, R. (2008). The influence of imidazole fungicides on multiplication *in vitro* of pyrodwarf pear rootstock. *Australian Journal of Crop Science*, 1(2), 63-68.
- Sahagún, B. (1577). *Historia general de las cosas de la Nueva España*, Códice Florentino. Faccimil digital. Recuperado de <https://www.wdl.org/en/item/10096/view/1/1/>
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Saldaña, A. A., Zuloaga, A. M. A., y Jardel, P. E. J. (2001). Germinación de *Acer skutchii* Rehder y *Magnolia iltisiana* Vázquez en la reserva de la biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco, México. *Foresta Veracruzana*, 3(2), 1-8.
- Saldaña-Acosta, A., Meave, J. A., and Sánchez-Velásquez, L. R. (2009). Seedling biomass allocation and vital rates of cloud forest tree species: responses to light in shade house conditions. *Forest Ecology and Management*, 258, 1650-1659.
- Sánchez, R. F. H., Furuya, M. A. T., Arroniz, P. S., Gómez, M. A., y Gómez, L. (2009). Comparación de la acción bactericida de hipoclorito de sodio y microcyn 60. *Revista Odontológica Mexicana*, 13(1), 9-16.
- Sánchez-Cuahua, R., Jimeno-Sevilla, H. y Elizondo-Salas, A. C. (2017). El Yoloxóchitl (*Magnolia mexicana* DC.), en la Sierra de Zongolica, Ver.: estudio poblacional y

- conocimiento tradicional. Trabajo presentado en el IV Congreso Mexicano de Ecología, Zongolica, Veracruz.
- Sánchez-Cuevas, M. C., and Salaverría, J. L. (2004). Control of oxidation and contamination of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivated *in vitro*. *Revista UDO Agrícola*, 4(1): 21-26.
- Sánchez-Recillas, A., Mantecón-Reyes, P., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., and Estrada-Soto S. (2014). Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases*, 7(3), 179-183.
- Sánchez-Velásquez, L., Pineda-López, M. R., Vásquez-Morales, S., Avendaño-Yáñez, M. L. (2016). Ecology and conservation of endangered species: the case of magnolias. In M. Quinn, *Endangered Species* (pp. 63-84), México: Nova Science Publishers, Inc.
- Sandoval, E., Rojas, A., Guzmán, C., Carmona, L., Ponce, R., León, C., Loyola, C., Vallejo, A., y Medina, A. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*, México: Instituto de Biología UNAM.
- Segretín, M. E. (2006). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)*. Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. Recuperado de <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Serrato-Díaz, A., Flores-Rentería, L, Aportela-Cortez, J., y Sierra-Palacios, E. (2014). En: A. Cornejo-Romero, A. Serrato-Díaz, B. Rendón-Aguilar y M. G. Rocha-Munive (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, México: INECC.
- Sessé y Mociño, (1894). *Flora mexicana*. Faccímil digital. Recuperado de <http://bibdigital.rjb.csic.es/spa/Libro.php?Libro=2923&Hojas=>
- Setsuko, S., Ishida, K., and Tomaru, N. (2004). Size distribution and genetic structure in relation to clonal growth within a population of *Magnolia tomentosa* Thunb. (Magnoliaceae). *Molecular Ecology*, 13, 2645-2653.
- Shalaby, S., and Horwitz, B. A. (2015). Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal-plant interactions. *Current Genetics*, 61, 347-357.
- Sharma, J., Knox, G. W., and Ishida, M. L. (2005). Adventitious rooting of stem cuttings of Yellow-flowered magnolia cultivars is influenced by time after budbreak and índole-3 butyric acid. *HortScience*, 41(1), 202-206.
- Silva-Rojas, H. V., Uribe-Cortés, T. B., Aguirre-Rayó, J. M., Martínez-González, C. R. y García-Morales, S. (2015). *Extracción de DNA y amplificación de genes ribosomales, cloroplastos, mitocondriales y housekeeping*. México: Colegio de Postgraduados.
- Sodi-Pallares E, y Martínez-Garza H. (1947). Contribución al estudio de Yolloxochitl, aislamiento e identificación de los compuestos químicos no alcaloideos, solubles en dicloroetileno. *Archivos del Instituto de Cardiología*, 17, 833-849.

- Sokolov R. S., Atanassova, B. Y., and Iakimova, E. T. (2014). Physiological response of *in vitro* cultured *Magnolia* sp. to nutrient medium composition. *Journal of Horticultural Research*, 22(1), 49-61.
- Stanley, P. C., and Steyermark J. A. (1949). *Flora of Guatemala*. Chicago: Chicago Natural History Museum.
- Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant Science*, 5(12), 537-542.
- Tanksley, S. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, 27, 205-233.
- Tapia, C. (2005). Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. *Medwave*, 5(4). doi: 5867/medwave.2005.04.3548
- Thorpe, T. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37, 169-80. doi: 10.1007/s12033-007-0031-3.
- Ueno, S., Setsuko, S., Kawahara, T., and Yoshimaru, H. (2005). Genetic diversity and differentiation of the endangered Japanese endemic tree *Magnolia stellata* using nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 6, 563-574.
- UICN. (2012). Categorías y criterios de la lista roja de la UICN: versión 3.1. Suiza: UICN Gland, Suiza. Recuperado de <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/RL-2001-001-2nd-Es.pdf>
- UNAM. (2009). *Yoloxóchitl*. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Recuperado de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Yolox%C3%B3chitl&id=7806>
- Valadez, M. E., y Kahl, G. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio)*, México: Mundi Prensas.
- Vargas, M. S. A. (2012). El camino real de Veracruz: pasado, presente y futuro. *Folios*, 27, 101-121
- Varshney, R. K., Chabane, K., Hendre, P. S., Aggarwal, R. K., and Graner, A. (2005). Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science*, 173, 638-649.
- Vásquez-Morales, S. G., and Sánchez-Velásquez, L. R. (2011). Seed ecology and pre-germinative treatments in *Magnolia schiedeana* Schlecht, an endangered species from Mexico. *Journal of Food, Ecology and Agriculture*, 9(1), 604-608.
- Vásquez-Morales, S. G., Flores-Estévez, N., Sánchez-Velásquez, L. R., Pineda-López, M. R., Viveros-Viveros, H., and Díaz-Fleischer, F. (2015). Bioprospecting of botanical insecticides: the case of ethanol extracts of *Magnolia schiedeana* Schltl. applied to a Tephritid, fruit fly *Anastrepha ludens* Loew. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3 (1), 01-05.

- Vásquez-Morales, S. G., Sánchez-Velásquez, L. R., y Pineda-López, M. R. (2010). Las semillas de Magnolias. *La Ciencia y el Hombre*, 23(3), 37-40.
- Vázquez, G., A., Carvajal, S., y Hernández, L. (2002). *Magnolia pugana* (Magnoliaceae): una nueva combinación en el complejo *M. pacífica*. *Novon*, 12, 137-141.
- Vázquez-García, J. A., Castro-Arce, E. De, Pérez-Farrera, M. A., Véliz-Pérez., M. E., y Muñiz-Castro, M. A. (2014). Magnoliaceae en el Neotrópico: riqueza, endemismo y estado de conservación. Trabajo presentado en el XI Congreso Latinoamericano de Botánica, San Salvador Bahía, Brasil.
- Vazquez-García, J. A. (1994). *Magnolia* (Magnoliaceae) in Mexico and Central America: a synopsis. *Brittonia*, 49, 1-23.
- Vazquez-García, J. A., Castro-Arce, E. de, Muñiz-Castro, M. A., and Cházaro-Basañez, M. J. (2012a). *Magnolia zoquepopolucae* (subsection *Talauma*, Magnoliaceae), a new species from Sierra de Santa Marta, Veracruz, México. *Phytotaxa*, 57, 51-57.
- Vazquez-García, J. A., Domínguez-Yescas, R., Pedraza-Ruiz, R., Sánchez-González, A. y Muñiz-Castro, M. A. (2015). *Magnolia rseadowskiana* (Magnoliaceae), una especie nueva de la sección *Macrophylla* de la parte central de la Sierra Madre Oriental, México. *Acta Botánica Mexicana*, 112, 19-36.
- Vazquez-García, J. A., Domínguez-Yescas, R., Velazco-Macías, C., Shalisko, V., and Merino-Santi, R. (2016). *Magnolia nuevoleonensis* sp. nov. (Magnoliaceae) from northeastern Mexico and a key to species of sección *Macrophylla*. *Nordic Journal of Botany*, 34: 48-53.
- Vazquez-García, J. A., Gómez-Domínguez, H., López-Cruz, A., Espinosa-Jiménez, J. A., Sahagún-Godínez, E., and Muñiz-Castro, M. A. (2013a). *Magnolia perezfarrerae*, a new species and a key to Mexican species of *Magnolia* (section *Talauma*, subsection *Talauma*, Magnoliaceae). *Botanical Sciences*, 90(2), 109-112.
- Vázquez-García, J. A., Muñiz-Castro, M. A., Arroyo, F., Pérez, A. J., Serna, M., Cuevas-Guzmán, R., Domínguez-Yescas, R., Castro-Arce, E. de, and Gurrola-Díaz, C. M. (2013c). Novelties in neotropical *Magnolia* and an addendum proposal to the IUCN Red List of Magnoliaceae. In E. Salcedo-Pérez, E. Hernández-Álvarez, J. A. Vázquez-García, T. Escoto-García, and N. Díaz-Echavarría (Eds.), *Recursos forestales en el occidente de México* (pp. 461-496). México: Universidad de Guadalajara.
- Vazquez-García, J. A., Pérez-Farrera, M. A., Gómez-Domínguez, H., Muñiz-Castro, M. A. and Sahagún-Godínez, E. (2017). *Magnolia montebelloensis*, a new species in section *Magnolia* from Lagunas de Montebello National Park, Chiapas, México, with a key to Magnoliaceae of Chiapas. *Phytotaxa*, 328(2), 101-114.
- Vazquez-García, J. A., Pérez-Farrera, M. A., Martínez-Camilo, R., Muñiz-Castro, M. A., and Martínez-Meléndez, N. (2013b). *Magnolia lacandonica* (subsection *Talauma*, Magnoliaceae), a new species from Chiapas, México. *Phytotaxa*, 79(1), 30-55.

- Vazquez-García, J. A., Pérez-Farrera, M. A., Martínez-Melendez, N., Nieves-Hernández, G., and Muñiz-Castro, M. A. (2012d). *Magnolia mayae* (Magnoliaceae), a new species from Chiapas, México. *Botanical Sciences*, 90(2), 109-112.
- Vazquez-García, J. A., Pérez-Farrera, M. A., Martínez-Meléndez, N., Nieves-Hernández, G., and Muñiz-Castro, M. A. (2012b). *Magnolia mayae* (Magnoliaceae), a new species from Chiapas, México. *Botanical Sciences*, 90 (2), 109-112.
- Victoria, J. (1993). Some Mexican medicinal plants: popular uses and pharmacological evaluation. Work presented in the 2o Colloque Européen d'Ethnopharmacologie, et de la 11° Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, Germany.
- Vovides, A. P., Linares, E., y Bye, R. (2010). *Jardines botánicos de México, historia y perspectivas*. México: Instituto de Ecología, A. C.
- Vovides, P. A., and Iglesias, C. G. (1996). Seed germination of *Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae), an endangered species from Mexico. *HortScience*, 31(5), 877.
- Waizel-Bucay, J. (2002). Uso tradicional e investigación científica de *Talauma mexicana* (DC.) Don, ó flor del corazón. *Revista Mexicana de Cardiología*, 3, 31-38.
- Wang, L., Xiao, A. H., Ma, L. Y., Chen, F. J., Sang, Z. Y., and Duan, J. (2017). Identification of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae) cultivars using phenotypic traits, SSR and SRAP markers: insights into breeding and conservation. *Genetics and Molecular Research*. 16(1). doi: 10.4238/gmr16019473.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff K., and Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications*. Florida: CRC Press.
- Weisshaar, B., and Jenkins, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 251-257.
- Werbrouck, S. P. O., and Debergh, P. C. (1996). Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in Araceae. *Journal of Plant Growth Regulation*, 15, 81. doi: 10.1007/BF00192936.
- White, O. L. y Zepeda, G. C. (2008). *El paraíso botánico del convento de Malinalco Estado de México*. México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- White-Olascoaga, L., Juan-Pérez, J. I., Chávez-Mejía, C. y Gutiérrez-Cedillo, J. G. (2013). Flora medicinal en San Nicolás, municipio de Malinalco, Estado de México. *Polibotánica*. 35, 173-206.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingley, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Resources*, 18, 6531–6535.
- Wojtania A., Skrzypek E., and Gabryszewska E. (2015). Effect of cytokinin, sucrose and nitrogen salts concentrations on the growth and development and phenolics content in *Magnolia x soulangeana* "Coates" shoots *in vitro*. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(3), 51-62.

- Wojtania A., Skrzypek E., and Gabryszewska, E. (2016). Morphological and biochemical responses to giberellic acid in *Magnolia* x "Spectrum" *in vitro*. *Acta biológica cracoviensia*, 58(1), 103-111. doi: 10.1515/abcsb-2016-0010.
- Woo, S. M., and Wetzstein, H. Y. (2008). Morphological and histological evaluations of *in vitro* regeneration in *Elliotta racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(2), 167-172.
- Ximénez, F. (1615). *Cuatro libros de la naturaleza y virtudes de las plantas y animales de uso medicinal en la Nueva España*. Faccíml digital. Recuperado de <http://bdh-rd.bne.es/viewer.vm?pid=d-211882>
- Yu, H. H., Yang, Z. L., Sun, B. and Liu, R. N. (2011). Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 71-78.
- Zhang, X. M., Wen, J., Dao, Z. L., Motley, T. J., and Long, C. L. (2010). Genetic variation and conservation assessment of chinese populations of *Magnolia cathcartii* (Magnoliaceae), a rare evergreen tree from the south-central China hotspot in the Eastern Himalayas. *Journal of Plant Research*, 123, 321-331.

12. ANEXOS.

ANEXO 1. Relación de las especies del género *Magnolia* presentes en México, con énfasis en la sección a la que pertenecen, distribución, estatus de conservación y referencia de donde se obtuvo la información.

NO.	SECCIÓN	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	ESTATUS	REFERENCIA
1		<i>M. faustinomirandae</i>	Chiapas (endémica), Mpio. Jitotol	UICN- CR*	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2013a
2		<i>M. guerrerensis</i>	Guerrero (mpios. Leonardo Bravo, Heliodoro Castillo y Quechultenango)	UICN- EN	Jiménez-Ramírez <i>et al.</i> , 2007
3		<i>M. grandiflora</i>	Introducida a México desde EUA, s/d		Vázquez-García, 1994
4		<i>M. iltisana</i> (<i>sin. M. macrophylla</i> <i>var. dealbata</i>)	Jalisco-Guerrero (oeste S. M. del Sur)	UICN- VU NOM059- Am**	Vázquez-García, 1994
5		<i>M. krusei</i> 2005	Guerrero y Oaxaca	UICN- EN	Jiménez-Ramírez y Cruz-Durán, 2005
6	Magnolia	<i>M. mayae</i>	Chiapas (Mpio. Yajalón), Guatemala	UICN- CR	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2012c
7		<i>M. montebelloensis</i>	Chiapas, Lagunas Montebello	IUCN-CR	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2017
8		<i>Magnolia oaxacensis</i>	Oaxaca (Sierra Mazateca en Teotitlán de Flores Magón)	IUCN-EN	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2012a
9		<i>M. pacífica</i>	Sonora, Zacatecas, Jalisco (S. M. Occidental)	UICN- EN	Rivers <i>et al.</i> , 2016a
10		<i>M. pedrazae</i>	Querétaro (Mpios. Landa de matamoros y Jalpan)	UICN- EN	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2013a
11		<i>M. pugana</i>	Jalisco y Zacatecas (endémica de la zona de barrancas)	UICN- EN	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2002
12		<i>M. zamudioi</i>	Veracruz y Chiapas (Mpio. Tecpatán)	s/d***	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2013a

ANEXO 1. Continuación.

NO.	SECCIÓN	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	ESTATUS	REFERENCIA
13		<i>M. schiediana</i>	Querétaro a Veracruz y al sur en Guerrero y Oaxaca	UICN- VU NOM059- Am	Hernández-Cerda, 1980
14		<i>M. sharpii</i>	Chiapas	UICN- EN	Vázquez-García, 1994
15		<i>M. tamaulipana</i> (<i>sin. M. tripetala, M. virginiana var foetida</i>)	Tamaulipas (S. M. Oriental)	UICN- EN	Rivers <i>et al.</i> , 2016a
16		<i>M. tarahumara</i>	Sonora, Corohui, Sierra Saguaribo	s/d	Global Tree Specialist Group, 2014
17		<i>M. vallartensis</i>	Jalisco (endémica Puerto Vallarta y Cabo Corrientes)	IUCN-CR	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2012a
18		<i>M. vazquezii</i>	Guerrero	UICN- EN	Cruz <i>et al.</i> , 2008
19		<i>M. yoroconte</i> (<i>sin. Talauma poasana</i>)	Veracruz y Chiapas (principalmente Guatemala y Honduras)	UICN- VU	Vázquez-García <i>et al.</i> , 1994
20		<i>M. dealbata</i> (<i>sin. M. foetida</i>)	Norte de Oaxaca	UICN- NT NOM059- Pr	Hernández-Cerda, 1980
21		<i>M. macrophylla</i>	Introducida a México desde EUA, s/d	UICN- LC	Global Tree Specialist Group, 2014
22		<i>M. nuevoleonensis</i>	Nuevo León (endémica)	IUCN- EN	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2016
23	Macrophylla	<i>M. vovidesii</i>	Veracruz (Mpio. Ixhuacán de los Reyes)	UICN- EN	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2013a
24		<i>M. rzedowskiana</i>	Querétaro, San Luis Potosí, Hidalgo y Veracruz?	UICN- EN	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2015
25		<i>M. sp. de Güémez</i>	Tamaulipas	s/d	Vázquez-García <i>et al.</i> , 2015

ANEXO 1. Continuación.

NO.	SECCIÓN	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	ESTATUS	REFERENCIA
26		<i>M. sp. de Zongolica</i>	Veracruz	s/d	Vázquez-García <i>et al.</i> 2015
27		<i>M. sp. de Juxtlahuaca y Loxicha</i>	Oaxaca	s/d	Vázquez-García <i>et al.</i> 2015
28		<i>M. decastroi</i>	Oaxaca (Sierra mazateca, Chinantla baja)	UICN- EN	Vázquez-García <i>et al.</i> 2013c
29		<i>M. jaliscana</i>	Jalisco-Colima (Región Manantlán)	UICN- EN	Vázquez-García <i>et al.</i> 2012b
30		<i>M. macrocarpa</i>	Oaxaca (endémica Mpios. Tututepec y Jocotepec)	s/d	Vázquez-García <i>et al.</i> 2013c
31		<i>M. mexicana</i> (sin. <i>Talauma mexicana</i>)	Puebla, Oaxaca y Veracruz	UICN-VU NOM059- Am	Rivers <i>et al.</i> , 2016b
32		<i>M. ofeliae</i>	Jalisco (Mpio. Talpa de Allende)	UICN- CR	Vázquez-García <i>et al.</i> 2013c
33	Talauma	<i>M. perezfarrerae</i>	Chiapas (región Berriozábal y Ocozocuaútlá)	UICN- EN	Vázquez-García <i>et al.</i> 2013a
34		<i>M. lacandonica</i>	Chiapas (región Lacandona-Usumacinta)	UICN- CR	Vázquez-García <i>et al.</i> 2013b
35		<i>M. lopezobradori</i>	Veracruz (Volcán San Martín y Sierra de Santa Marta)	s/d	Vázquez-García <i>et al.</i> 2012b
36		<i>M. sinacacolinii</i>	Veracruz (Los Tuxtlas)	s/d	Vázquez-García <i>et al.</i> 2012b
37		<i>M. wendtii</i>	Veracruz (Mpio. Hidalgotitlán)	UICN- CR	Vázquez-García <i>et al.</i> 2013c
38		<i>M. zoquepopolucae</i>	Veracruz (Mpio. Sta. Marta), probablemente en Oaxaca y Tabasco	s/d	Vázquez-García <i>et al.</i> 2012a

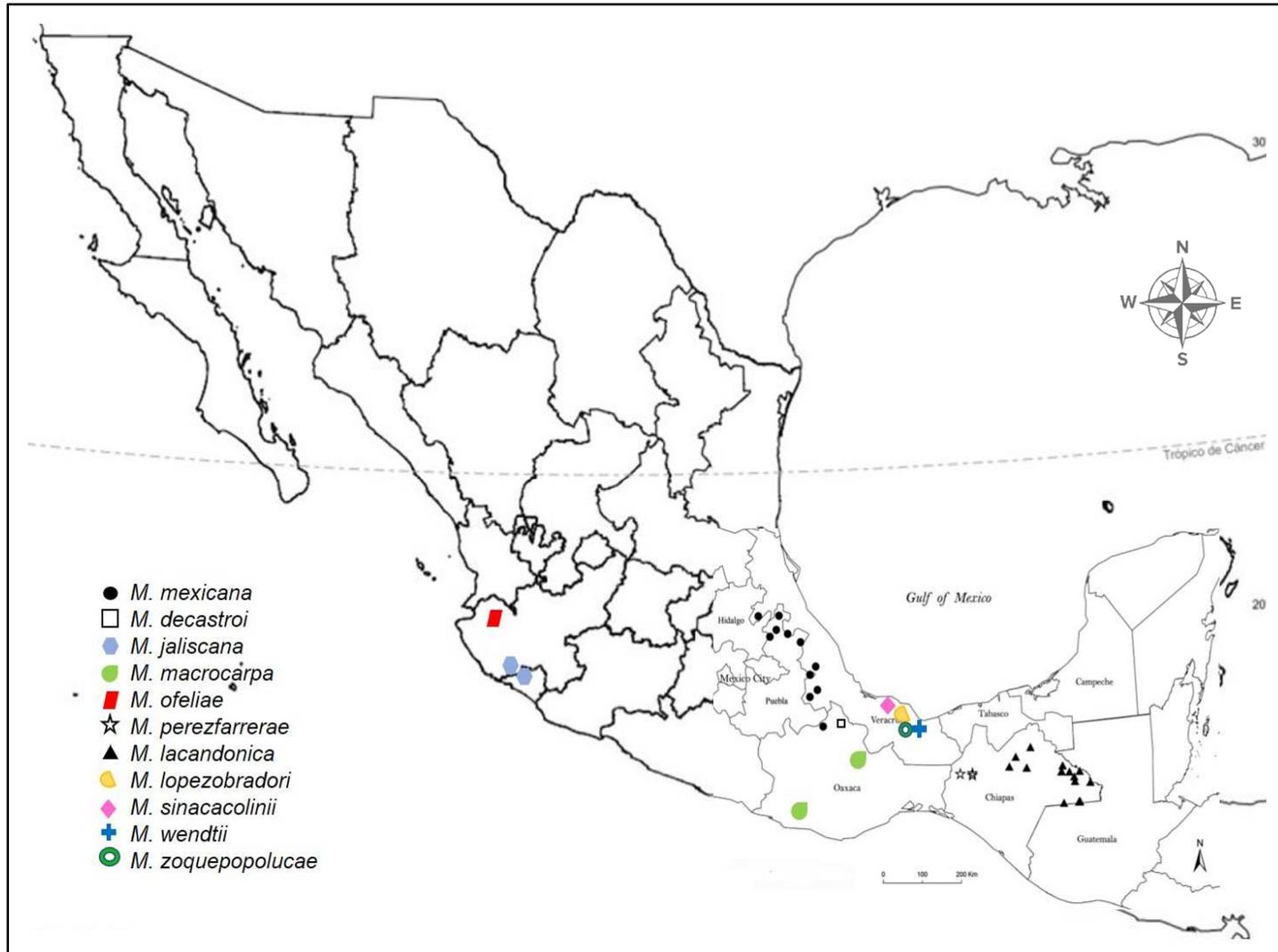
39		<i>M. sierragordae</i>	Querétaro, Reserva Sierra Gorda	s/d	Ceballos et al., 2014
40	s/d	<i>M. sp. nov. Ined. A.</i> <i>Vazquez & M. Muñiz</i>	Hidalgo (Mpio. Zacualtipán)	s/d	Vázquez-García et al. 2013c

* UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (EN: en peligro de extinción, CR: en peligro crítico de extinción, VU: vulnerable, NT: casi amenazada, LC: preocupación menor) (datos obtenidos de Rivers *et al.*, 2016a).

** Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (Am: amenazada, Pr: protegida).

*** Sin datos suficientes para decidir sobre su categorización.

ANEXO 2. Mapa de distribución de las especies del género *Magnolia* de la sección Talauma descritas para México.



Nota: Modificado de Vázquez-García, et al. (2013b), complementado con información de Vázquez-García et al. (2012a, b), Vázquez-García et al. (2013a, c) y Rivers et al. (2016b).

ANEXO 3. Caracteres morfológicos de las tres especies de magnolia utilizadas en la caracterización molecular del Yoloxóchitl.

Caracteres	<i>M. grandiflora</i>	<i>M. dealbata</i>	<i>M. mexicana</i>
Forma de la hoja	Estrechamente a ampliamente oblanceolada a elíptica, menos comúnmente ovada, base aguda o acuminada, consistencia coriácea*	Ovada u oblonga, margen entero, ápice agudo u obtuso, base cordada*	Oblongas o elípticas, base aguda*
Pecíolo (cm)	1 - 3	5.5 - 8	5.2 – 7.8
Longitud de la hoja (cm)	12 - 20	38 – 56 (-70)	12 – 22.4
Ancho de la hoja	6 - 12	15 – 25 (-27)	4 – 12.7*
Pubescencia abaxial de la hoja	Densa, ferruginosa	Glabra, color grisáceo	Glabra, color verde-amarillo*
Diámetro de la flor (cm)	17.5 – 20 (-30)	30 – 50	—
Perianto	3 sépalos, 9-10 pétalos*	3 sépalos, 6 pétalos*	3 sépalos, 6 pétalos*
Forma de los pétalos	Ápice agudo o redondeado y base atenuada*	Ápice agudo y base atenuada*	Abruptamente estrechados en la base
Tamaño de los pétalos (cm)	13 -16.5 x 4.8 - 10	15 - 24 x 8 -10	4.2 – 7.5 x 3.1 - 4.5
Color de los pétalos	Blanco*	Blanco cremoso*	Blanco cremoso teñido de púrpura
Número de estambres	> 250	420 – 430	120 – 178
Tamaño de los estambres (cm)	1.9 – 2.1	1 – 1.5*	1.3 – 1.5*
Forma del fruto	Ovoide-oblongo*	Ovoide-oblongo, subcónico	Ovoide a elipsoidal
Tamaño del fruto maduro (cm)	8 – 12 x 4 – 5	8 – 15 x 4.5 – 6 (-8)	10 – 15*
No. de carpelos	75 – 90	80 - 105	38 – 40
Pubescencia del polifolículo	Densamente ferruginoso	Densa, dorado amarillenta*	Ligeramente pubescente*
Ápice del carpelo	—	Prominentemente picudo	—
Base dorsal de los carpelos	—	—	Jorobada, con ápice hundido
Longitud de la semilla (cm)	1.5*	0.9 – 1.1	0.7 – 1.2

Con base en Vázquez-García, *et al.* (2012b), Vázquez-García, *et al.* (2012a), Vázquez-García, *et al.* (2013b), Vázquez-García, *et al.* (2013c) y * Hernández-Cerda (1980).

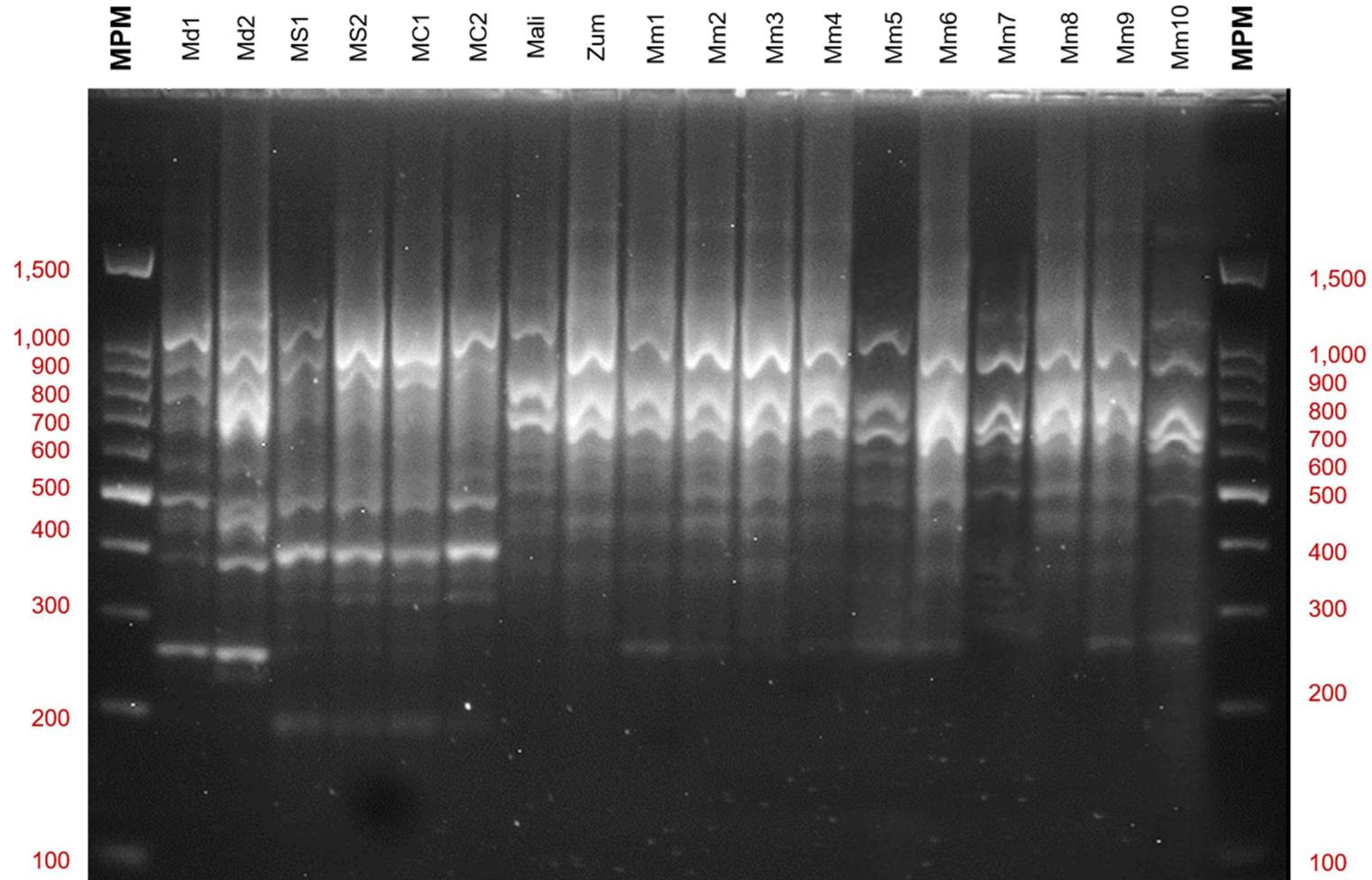
ANEXO 4. Protocolo para la extracción de ADN en plantas con alto contenido de fenoles (Silva-Rojas et al., 2015).

Paso No.	Procedimiento
1	Precaentar el CTAB 2% (Tris-HCl 10mM pH 8, Na ₂ EDTA H ₂ O 20mM pH 8, CTAB, NaCl 1.4M) a 60°C con una plancha ® LabTech.
2	Seleccionar 1.5 g de muestra de tejido previamente lavado y colocarlo en un mortero.
3	Agregar 0.3g de PVP y 1 ml de CTAB 2% a la muestra y moler cuidadosamente hasta obtener una mezcla fina y homogénea.
4	Pasar la mezcla a un tubo ®Eppendorf de 1.5 ml y agitar con el aparato vórtex ®Cleaver.
5	Incubar a baño María a 65°C por 30 minutos, dar vórtex cada 10 minutos.
6	Centrifugar a 12,000 rpm en centrífuga ®Labnet por 10 minutos.
7	Pasar la fase acuosa (750 µl) a tubos de 1.5 ml nuevos y agregar 750 µl de solución cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y agitar por inversión por 10 minutos.
8	Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos.
9	Repetir el paso 7, extrayendo 600 µl de solución acuosa y, en la cámara de extracción de gases, agregar 800 µl de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) en tubos de 1.5 ml nuevos.
10	Agitar por inversión durante 10 minutos y centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.
11	Transferir la solución acuosa a tubos nuevos de 1.5 ml.
12	Agregar 20 µl de acetato de sodio y 400 µl de etanol al 70% y mezclar suavemente.
13	Mantener a -20°C por 2 horas.
14	Centrifugar a 12,000 rpm durante 20 minutos y decantar dejando en el fondo la pastilla de ADN.
15	Agregar 1 ml de isopropanol al 70% y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.
16	Decantar dejando la pastilla de ADN y agregar 400 µl de agua HPLC
17	Incubar a 55°C por 15 minutos.
18	Añadir 34 µl de acetato de sodio (CH ₃ COONa 3M) y 1 ml de etanol 95%.
19	Mantener a -20°C por 1 hora.
20	Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos. Decantar el sobrenadante.
21	Lavar con 600 µl de isopropanol al 70 %, centrifugar a 12,000 rpm y decantar (repetir 3 veces o más, el número de lavados dependerá de la coloración de la pastilla).
22	Dejar secar por 30 minutos y resuspender la pastilla en 220 µl de agua HPLC. Incubar a 60° por 10 minutos.
23	Mantener a -20°C hasta su uso.

Notas: CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), PVP (polivinilpirrolidona), HPLC (agua para cromatografía líquida de alta eficacia).

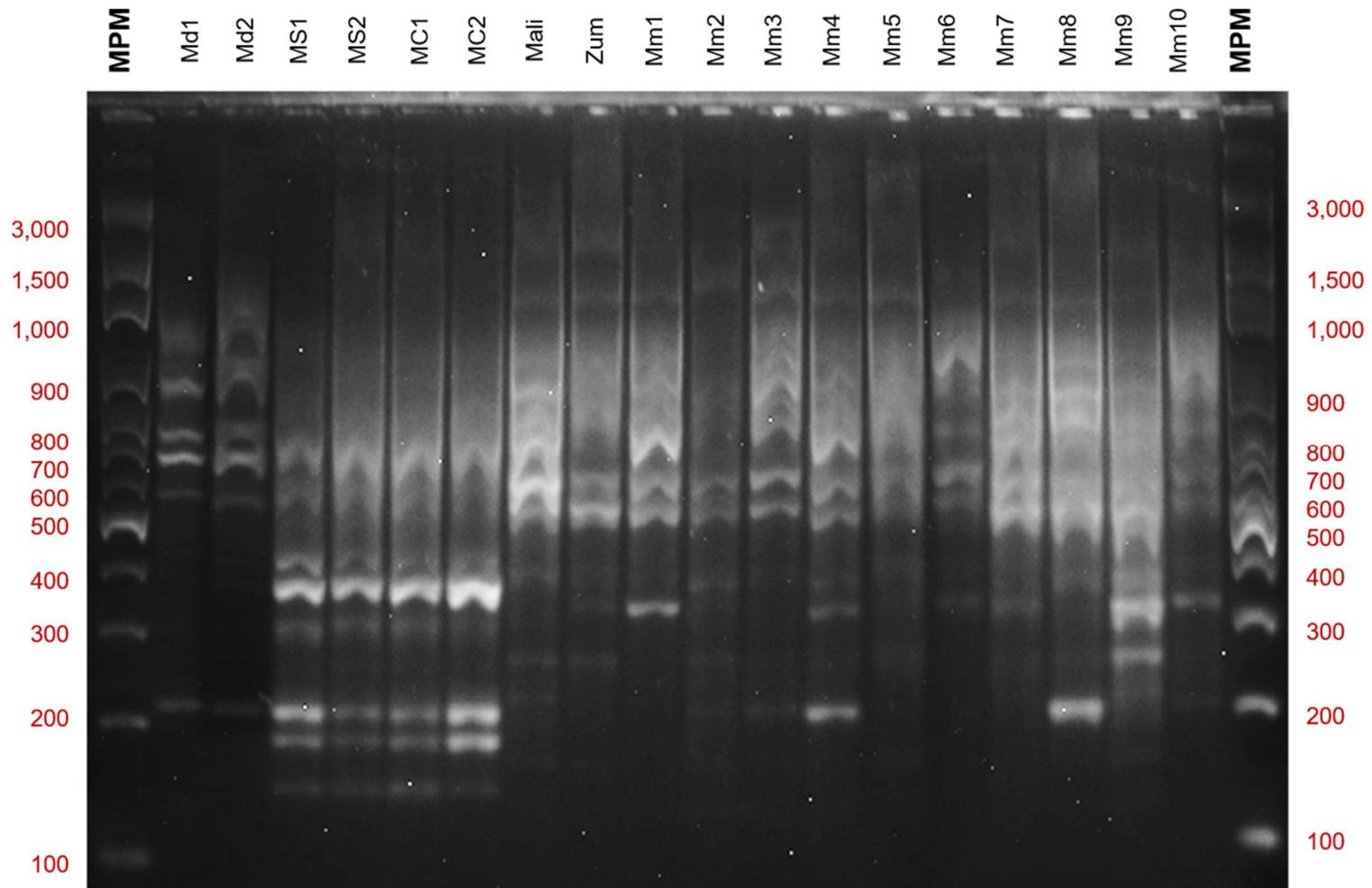
ANEXO 5. Geles de electroforesis obtenidos con cebadores RAPD en 18 muestras de ADN de *Magnolia spp.*

Anexo 5.1. Gel de electroforesis del cebador OPA6 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



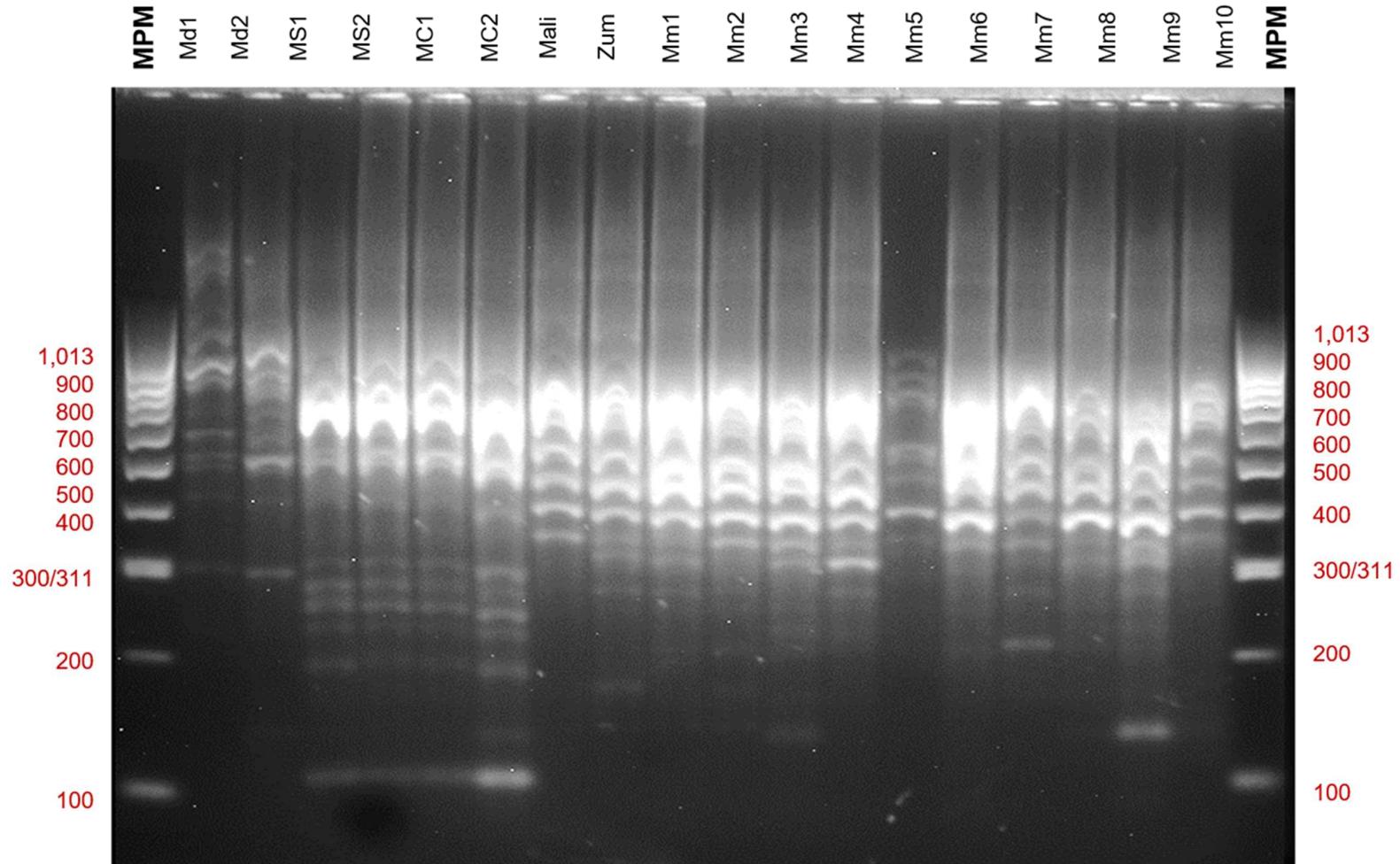
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.2. Gel de electroforesis del cebador OPA7 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



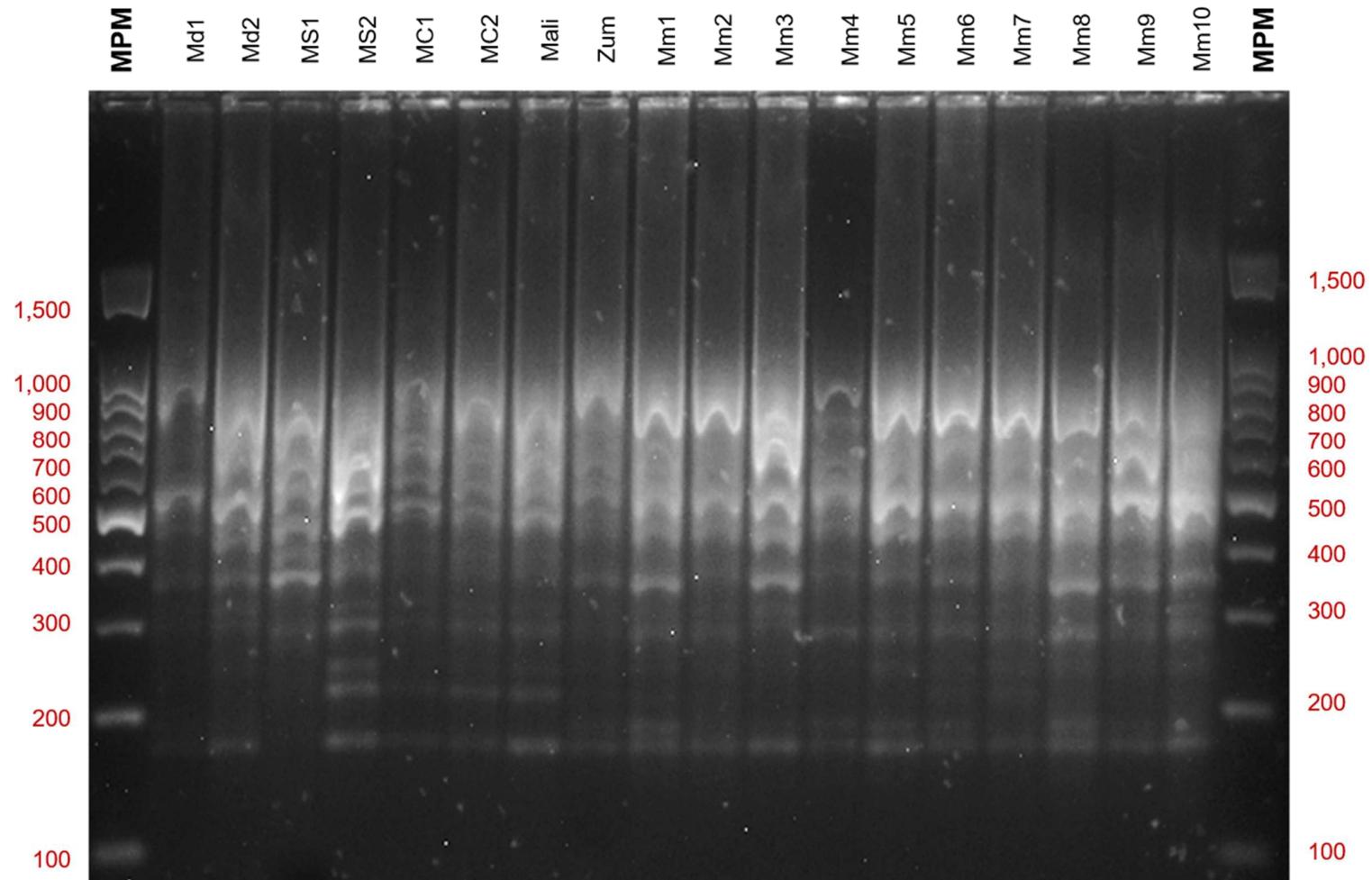
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.3. Gel de electroforesis del cebador OPA8 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



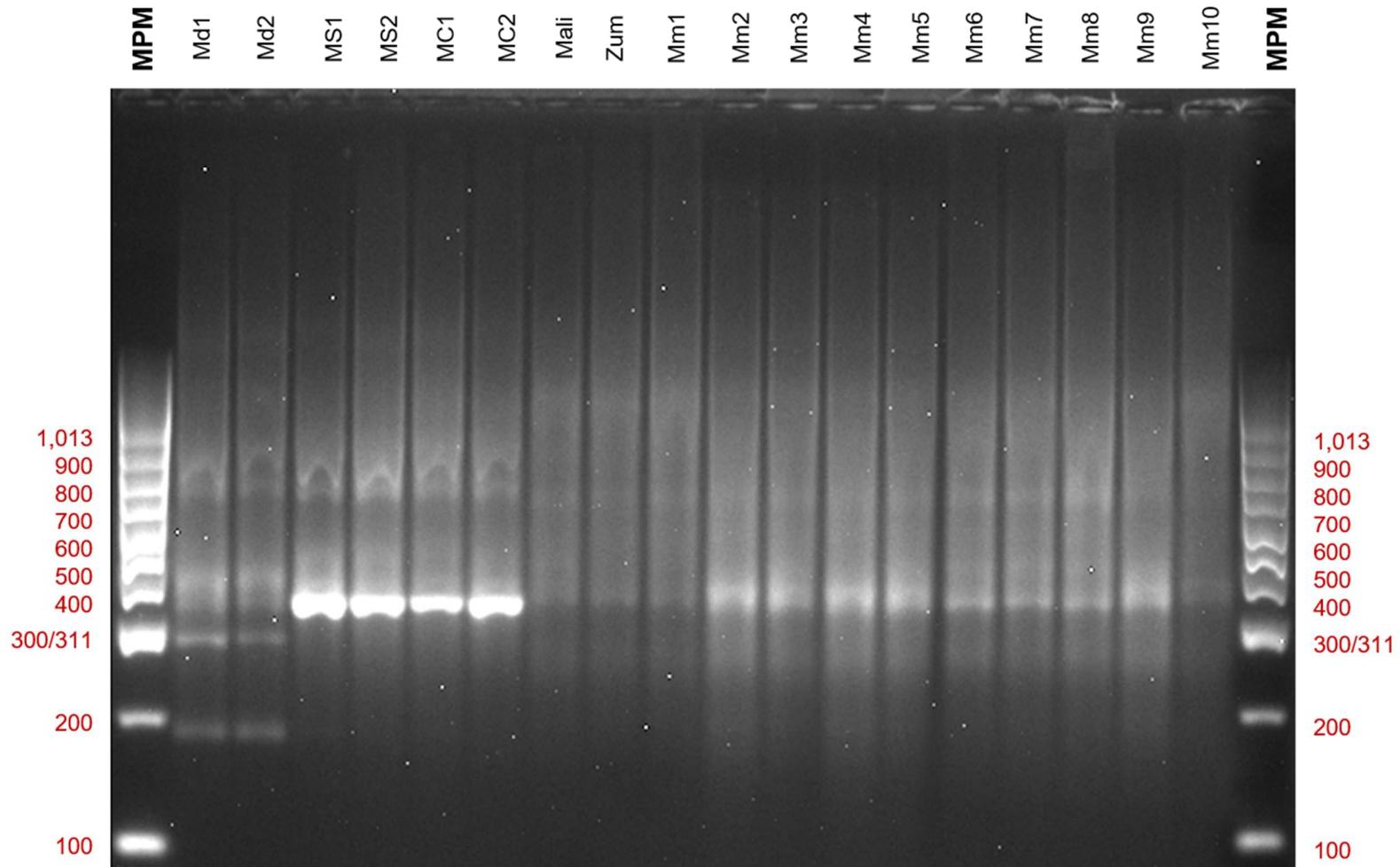
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.4. Gel de electroforesis del cebador OPA10 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



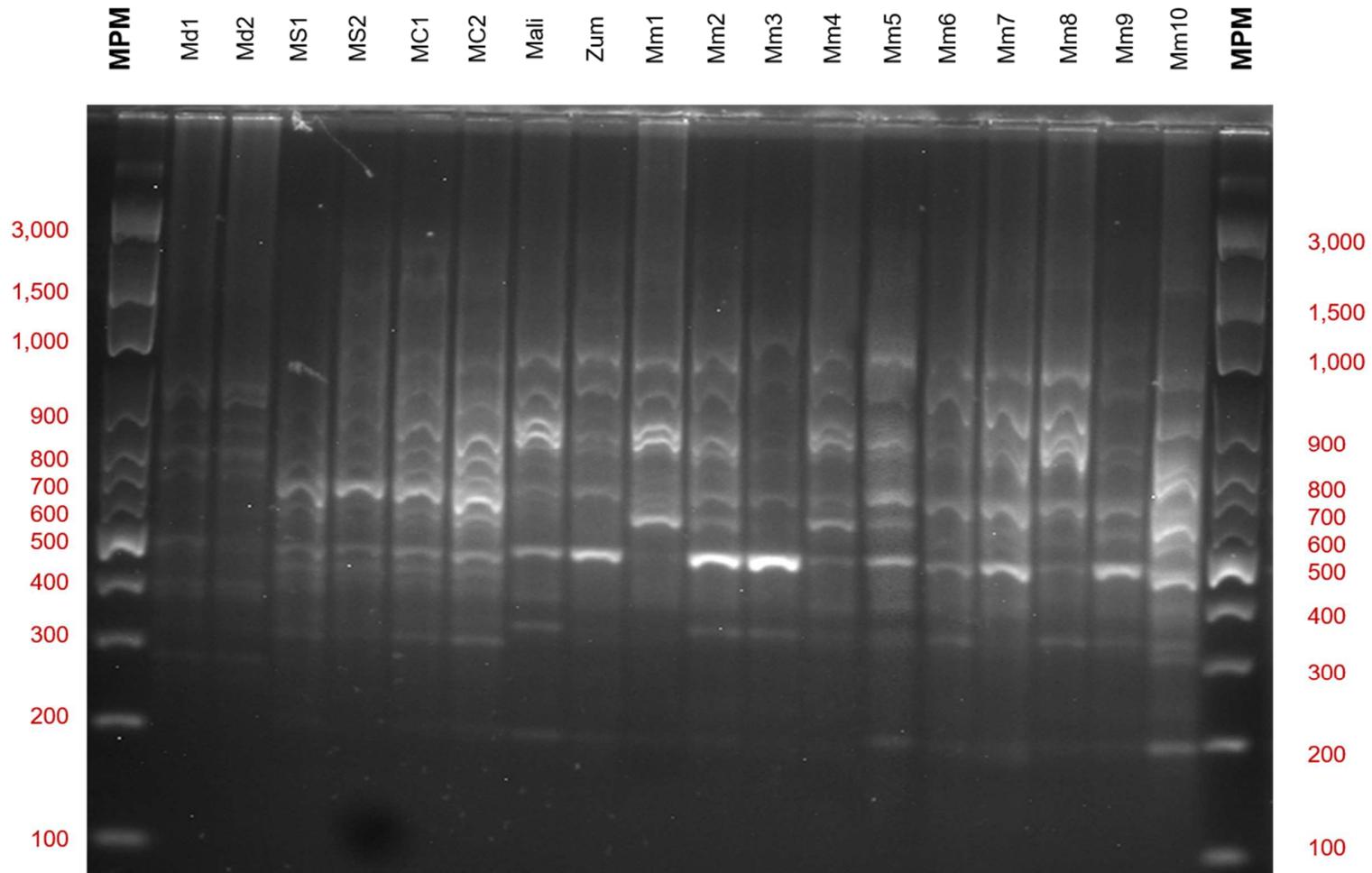
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.5. Gel de electroforesis del cebador OPA13 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



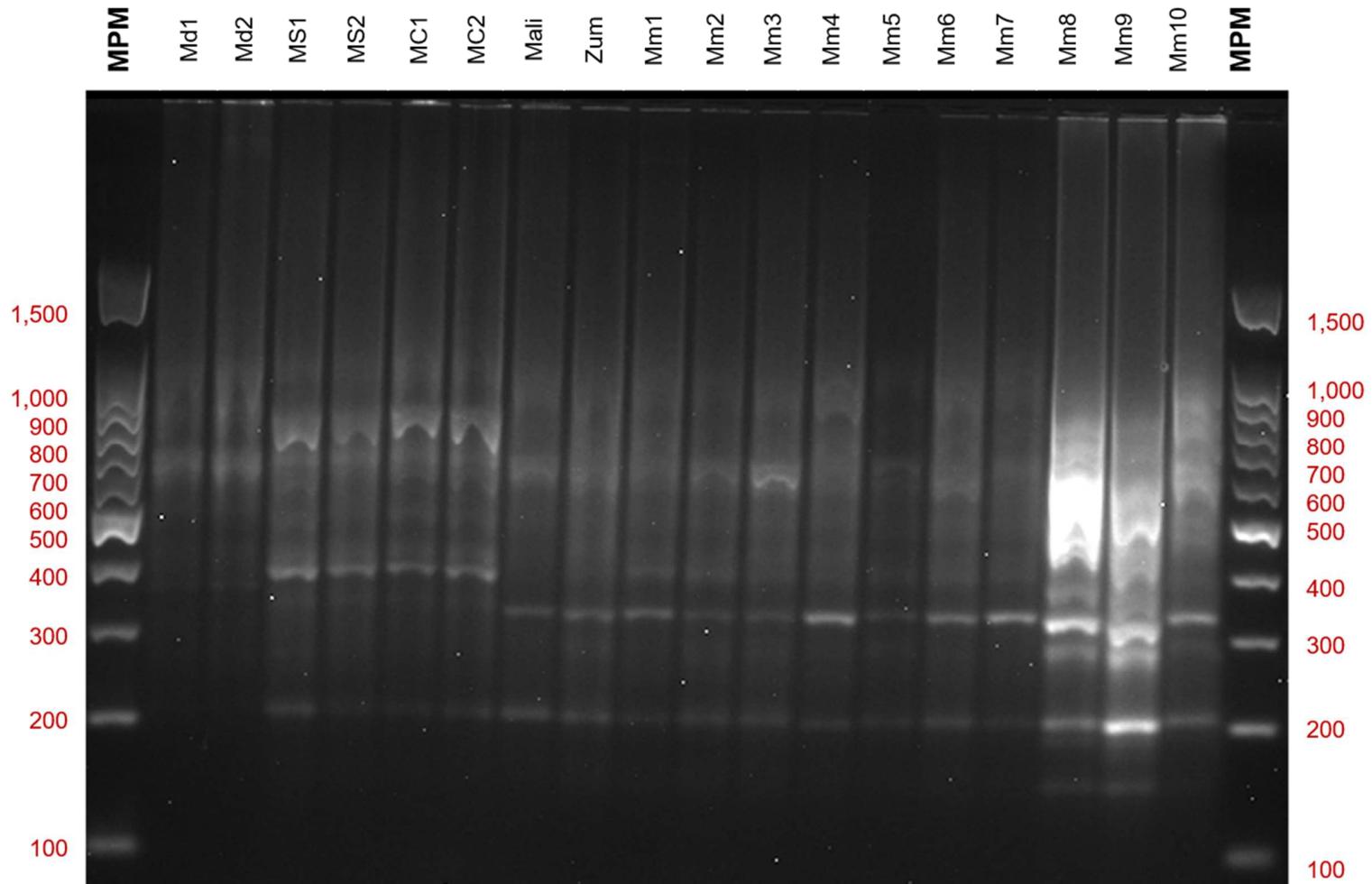
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.6. Gel de electroforesis del cebador OPA15 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



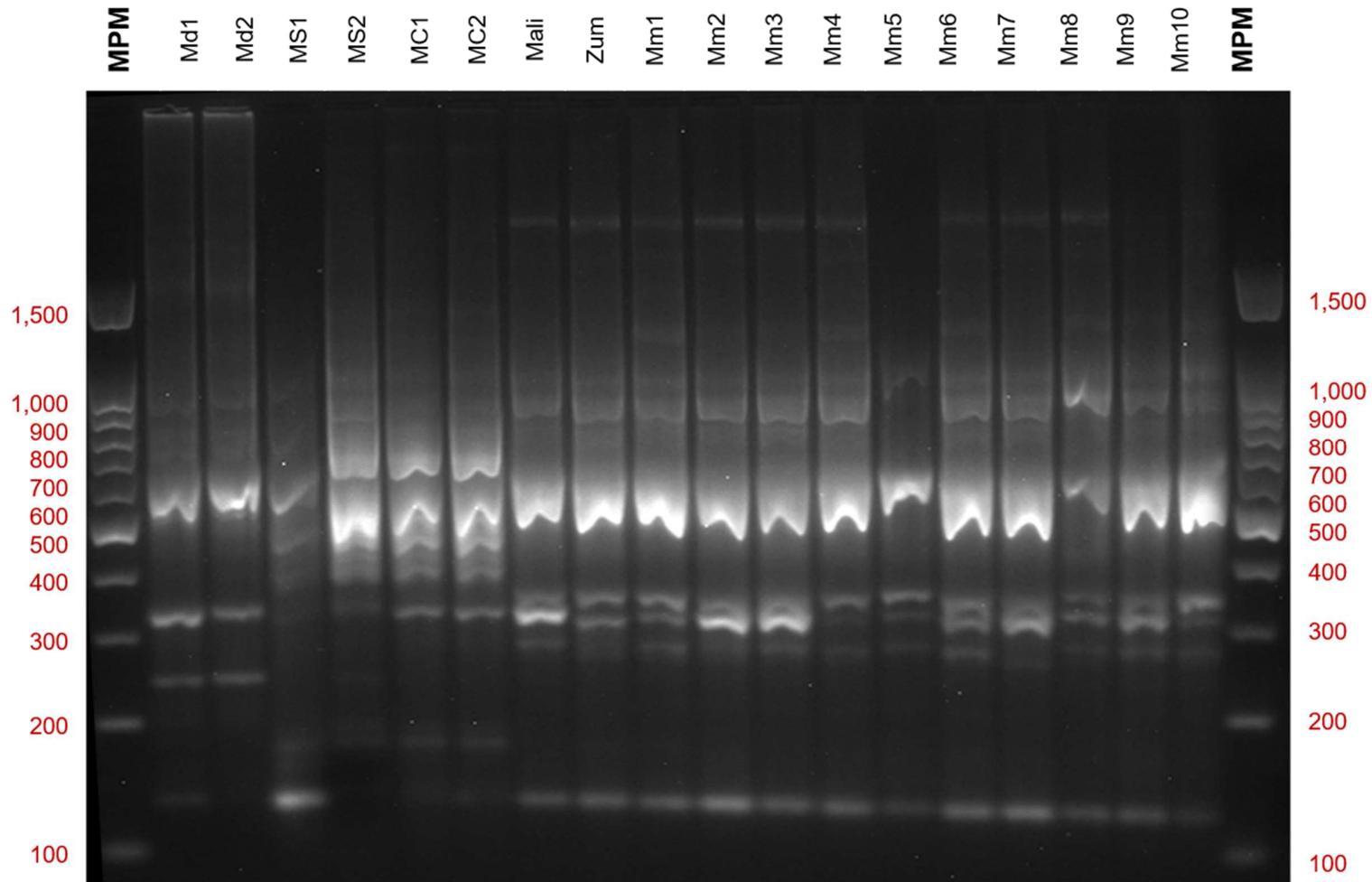
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.7. Gel de electroforesis del cebador OPA16 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



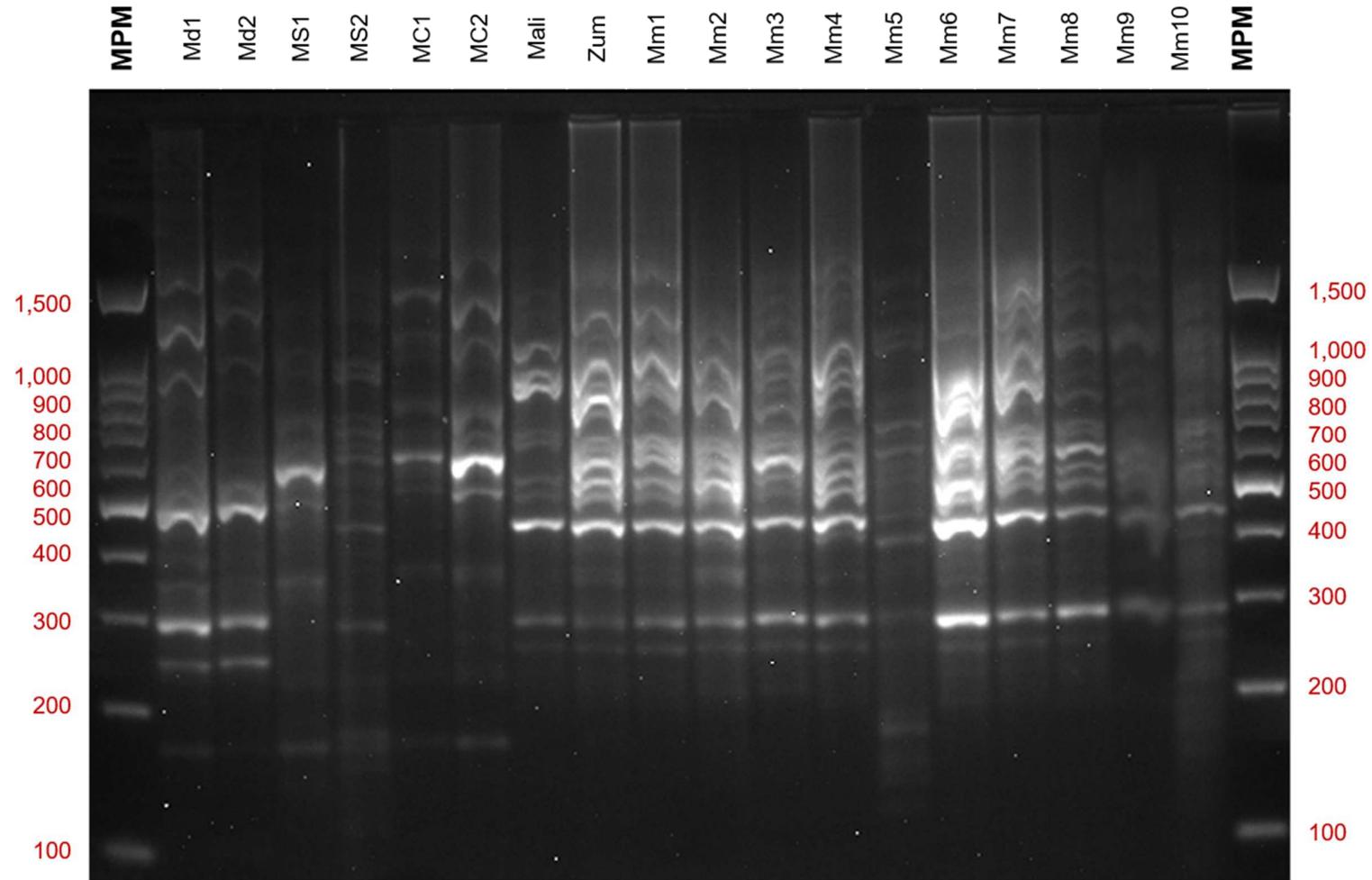
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.8. Gel de electroforesis del cebador OPB1 en 18 muestras de *Magnolia* spp.



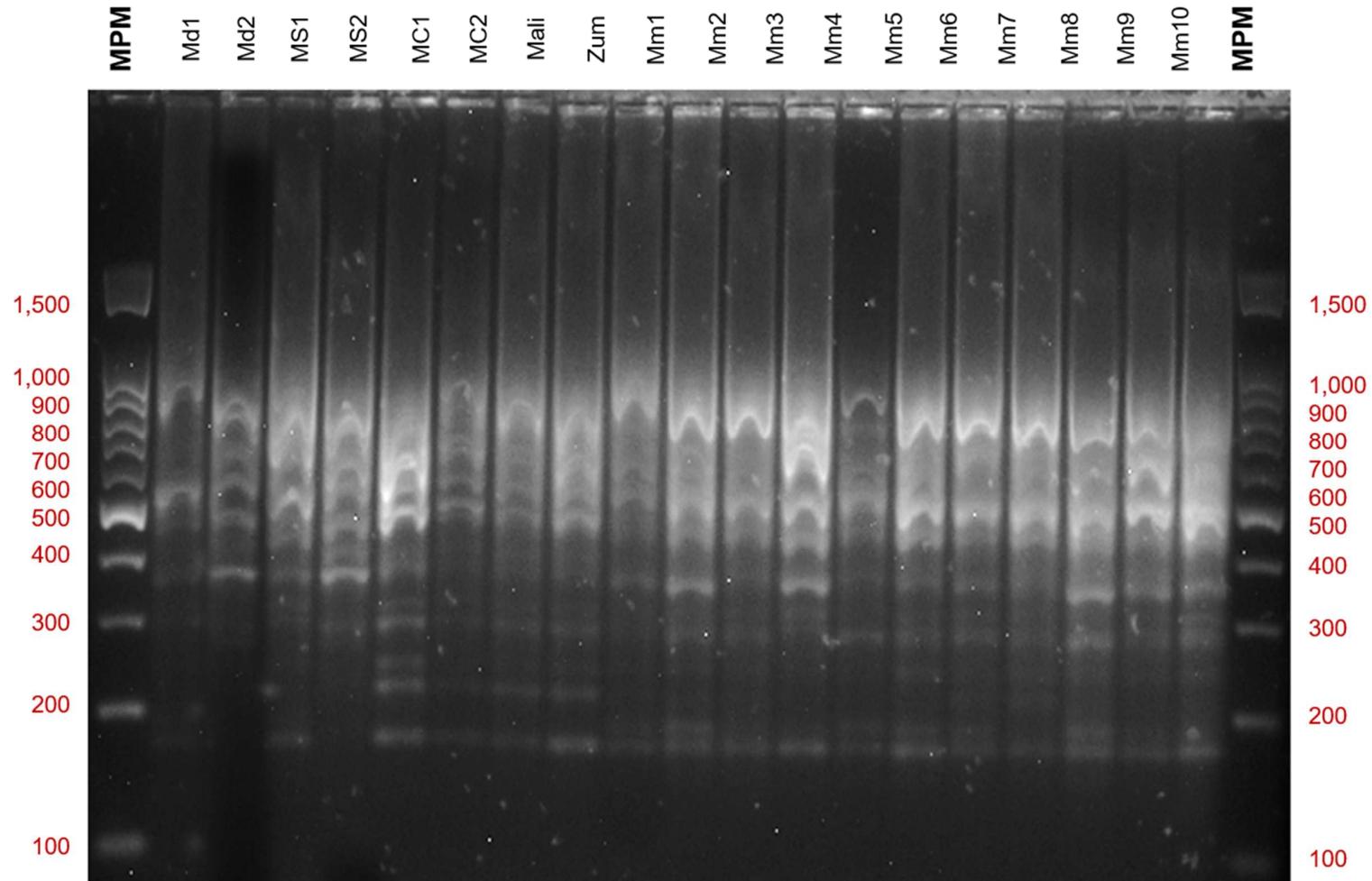
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia* sp. de Malinalco; **Zum:** *Magnolia* sp. Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.9. Gel de electroforesis del cebador OPB3 en 18 muestras de *Magnolia* spp.



Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia* sp. de Malinalco; **Zum:** *Magnolia* sp. Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

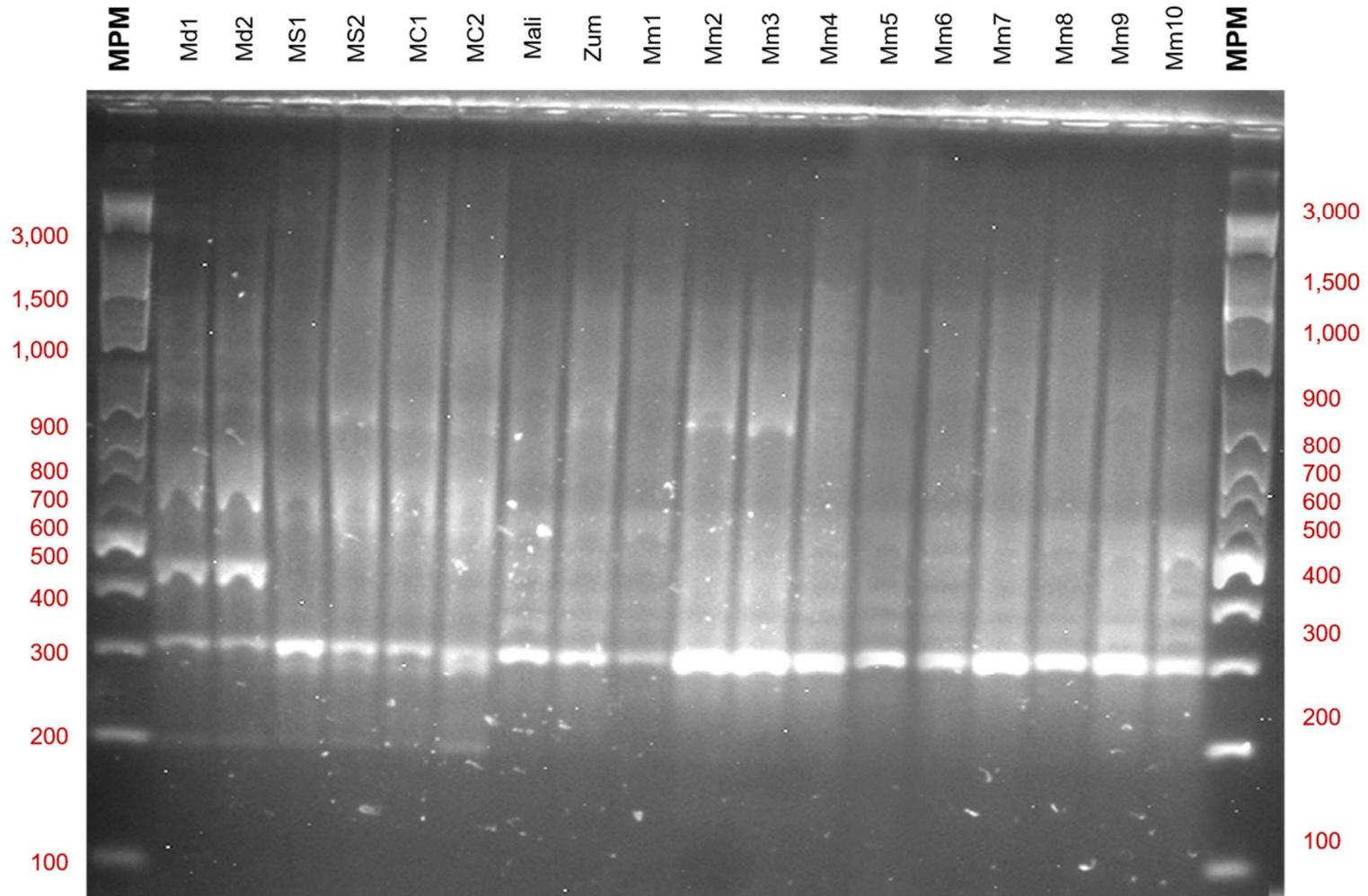
Anexo 5.10. Gel de electroforesis del cebador OPB10 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

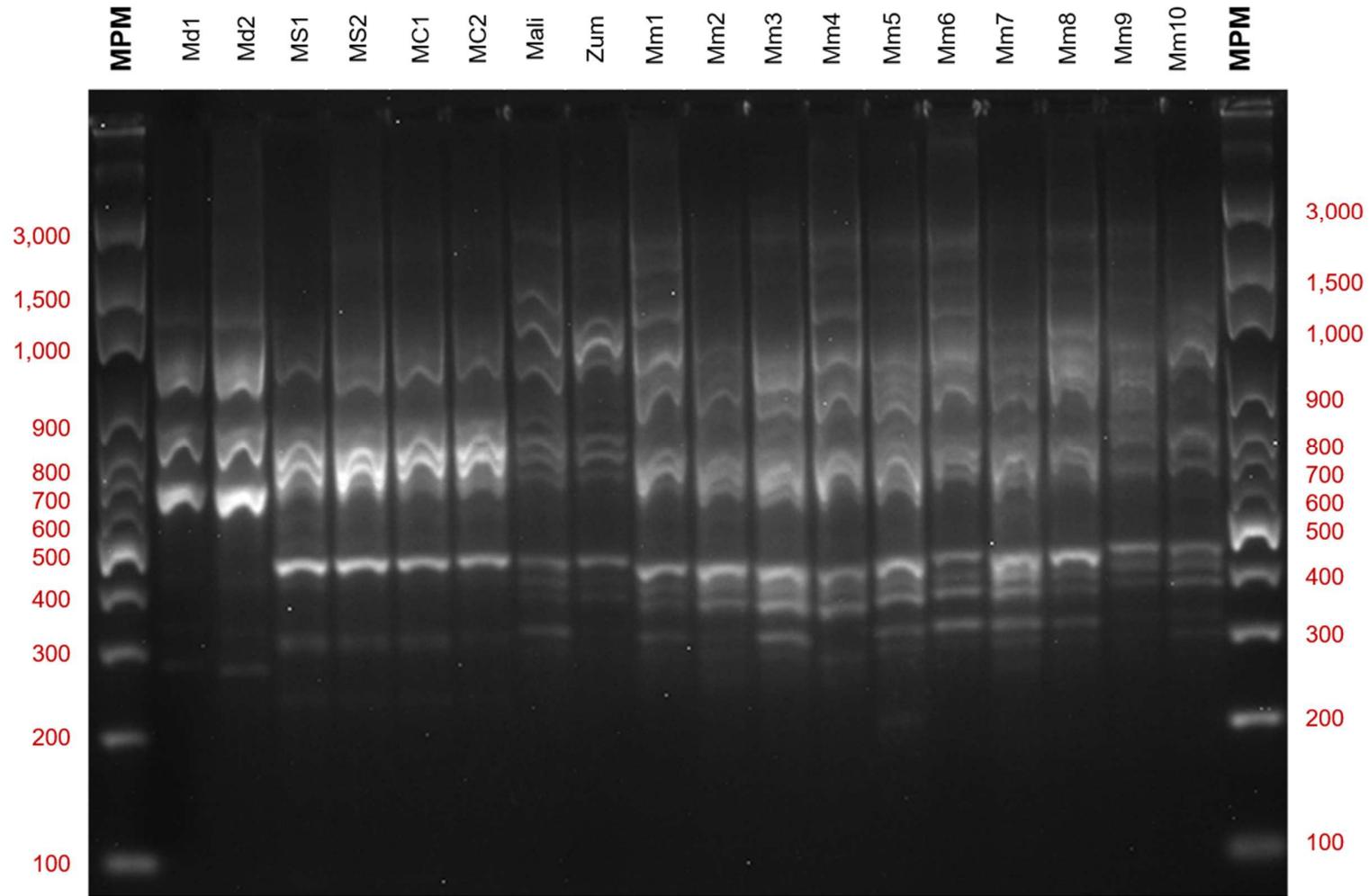
Anexo 4.11. Gel de electroforesis del cebador OPB10 en 18 muestras de *Magnolia sp.*

Anexo 5.11. Gel de electroforesis del cebador OPB17 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



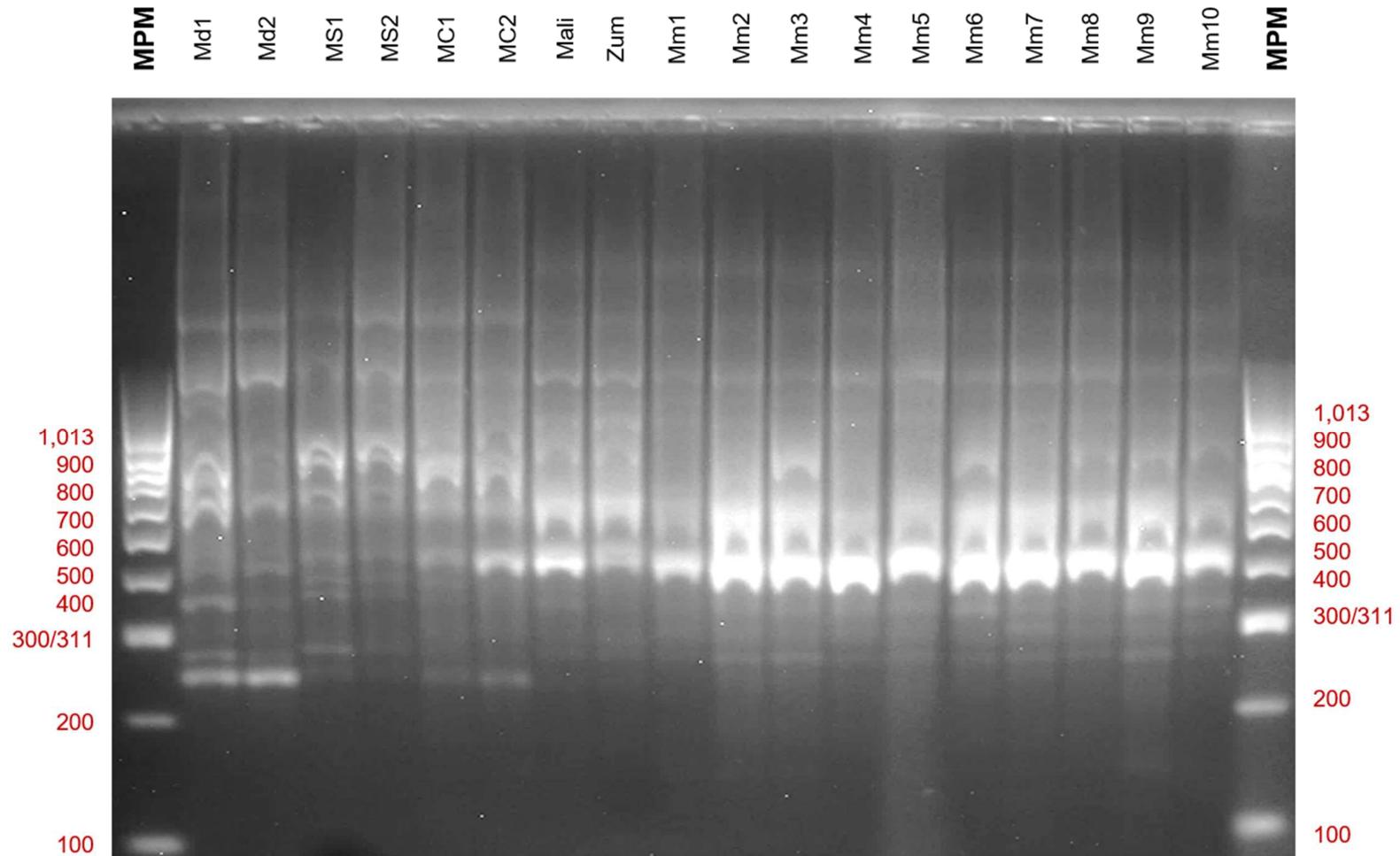
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.12. Gel de electroforesis del cebador OPB19 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



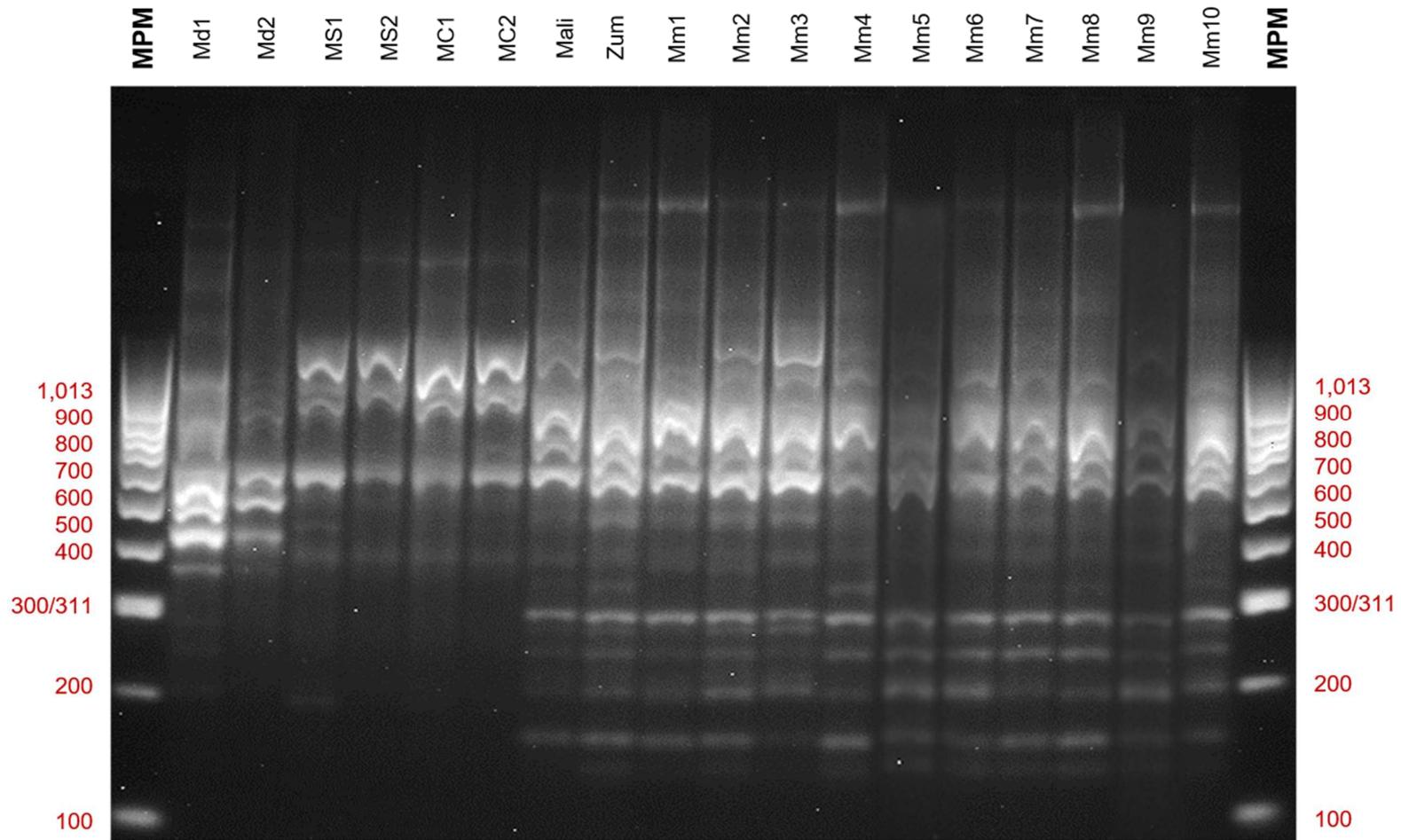
Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.13. Gel de electroforesis del cebador E18 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

Anexo 5.14. Gel de electroforesis del cebador C08 en 18 muestras de *Magnolia spp.*



Notas: **Md:** *M. dealbata*; **MS:** *M. grandiflora* Santo desierto Tenancingo; **MC:** *M. grandiflora* CU Tenancingo; **Mali:** *Magnolia sp.* de Malinalco; **Zum:** *Magnolia sp.* Zumpahuacán; **Mm:** *M. mexicana* Zongolica Veracruz. Gel solidificado con 1.5 % de agarosa, corrido a 70 V por 10 horas.

ANEXO 6. Manuscrito enviado para su revisión y posible publicación en la revista POLIBOTÁNICA.

Comparación molecular y morfológica entre ejemplares de Yoloxóchitl del Estado de México y Veracruz

Molecular and morphological comparison between Yoloxochitl specimens from the State of Mexico and Veracruz

L. D. Arteaga-Rios¹

J. Mejía-Carraza¹

J. L. Piña-Escutia²

J. G. González-Díaz¹

A. Rivera-Colín³

¹Laboratorio de Biología Molecular, Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5, Ex Hacienda Santa Ana, Tenancingo, Estado de México, C.P. 52400.

²Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus “El Cerrillo”, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 11.5, entronque al Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, C.P. 50200.

³Servicios Integrales en Horticultura Ornamental “Florcenter” S. A. de C. V., Carretera Federal Toluca-Ixtapan de la Sal, Km 64, Los Arroyos, Villa Guerrero, Estado de México, C.P. 51760.

J. Mejía-Carraza, jmejia@uaemex.mx

RESUMEN:

El término “Yoloxóchitl” se ha asociado históricamente con *Magnolia mexicana*, especie amenazada de extinción por la disminución en sus poblaciones y áreas donde prospera. La

presencia de dos ejemplares posiblemente de esta especie en Malinalco y Zumpahuacán, Estado de México, genera interrogantes sobre su historia y alcances de su distribución. El objetivo del presente estudio fue establecer las relaciones moleculares y morfológicas existentes entre dichos ejemplares, con individuos de *M. mexicana* presentes en Zongolica, Veracruz. Se colectaron muestras de tejido vegetal, y se determinaron 18 caracteres morfológicos de árboles provenientes de los municipios del Estado de México, así como de *M. mexicana*, provenientes de Acontla y La Quinta en Zongolica Veracruz. Así mismo, como referentes de contraste molecular, se utilizaron muestras de *M. dealbata* y *M. grandiflora*. Se analizaron 14 iniciadores RAPD que amplificaron 205 bandas, obteniendo valores promedio PIC de 0.30 y RP de 5.42, respectivamente. Los iniciadores OPA7, OPA8 y E18 mostraron la mayor capacidad discriminante. El análisis de agrupamiento formó tres clados, dos de ellos para los referentes *M. grandiflora* y *M. dealbata*, y el tercero, agrupó a *M. mexicana* con los genotipos de Malinalco y Zumpahuacán, compartiendo una similitud genética del 87 y 90 % respectivamente. Se observó además variación morfológica en 14 de 18 caracteres entre los genotipos provenientes de Veracruz y los del Estado de México. Los resultados indicaron que los árboles de Yoloxóchitl de Malinalco y Zumpahuacán pertenecen a la sección Talauma, sin embargo, muestran amplia variación morfológica respecto a *M. mexicana*.

Palabras clave: *Magnolia mexicana*, RAPD, Magnoliaceae.

ABSTRACT:

The term "Yoloxochitl" has historically been associated with *Magnolia mexicana*, a species threatened with extinction due to the decrease in its populations and areas where it thrives. The presence of two specimens possibly of this species in Malinalco and Zumpahuacan, State of Mexico, raises questions about its history and scope of its distribution. The objective of the present study was to establish the existing molecular and morphological relationships between these

specimens, with individuals of *M. mexicana* present in Zongolica, Veracruz. Samples of plant tissue were collected, and 18 morphological characters of trees from the municipalities of the State of Mexico, as well as *M. mexicana*, from Acontla and La Quinta in Zongolica Veracruz were determined. Also, as references of molecular contrast, samples of *M. dealbata* and *M. grandiflora* were used. 14 RAPD primers were analyzed, that amplified 205 bands, obtaining average PIC values of 0.30 and RP of 5.42, respectively. The cluster analysis formed three clades, two of them for the referents *M. grandiflora* and *M. dealbata*, and the third, grouped *M. mexicana* with the genotypes of Malinalco and Zumpahuacan, sharing a genetic similarity of 87 and 90% respectively. Morphological variation was also observed in 14 of 18 characters between genotypes from Veracruz and those of the State of Mexico. The results indicated that the Yoloxochitl trees of Malinalco and Zumpahuacan belong to the Talauma section, however, they show a wide morphological variation with respect to *M. mexicana*.

Key words: *Magnolia mexicana*, RAPD, Magnoliaceae.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las magnolias (Magnoliaceae) de México en los últimos 25 años ha conducido a la descripción de nuevas especies, al pasar de once en 1994 (Lozano-Contreras, 1994; Vázquez-García, 1994) a más de 40 en la actualidad (Gómez-Domínguez, Pérez-Farrera, Vázquez-García, Sahagún-Godínez, & Muñiz-Castro, 2017; Vázquez-García et al., 2014); la mayoría de ellas endémicas y con serias amenazas a su permanencia, con limitaciones en información sobre su distribución, biología y ecología (Rivers, Beech, Murphy, & Oldfield, 2016).

En particular, la especie *Magnolia mexicana* ha sido clave en el nuevo inventario de las magnolias del país, al reclasificarse algunas de sus poblaciones a *Magnolia zoquepopolucae* (Vázquez-García, De Castro-Arce, Muñiz-Castro, & Cházaro-Basañez, 2012), *M. lopezobradori*, *M. sinacacolinii*,

M. jaliscana (Vázquez-García, Muñiz-Castro, et al., 2012), *M. perezfarrerae* (Vázquez-García, Gómez-Domínguez, et al., 2013), *M. lacandonica* (Vázquez-García, Pérez-Farrera, Martínez-Camilo, Muñiz-Castro, & Martínez-Meléndez, 2013), *M. macrocarpa*, *M. wendtii*, *M. ofeliae* y *M. decastroi* (Vázquez-García, Muñiz-Castro, et al., 2013), de forma que, la que se consideró la única especie de la sección Talauma en México (Lozano-Contreras, 1994) con distribución en Oaxaca, Puebla, Veracruz, Chiapas y Guatemala (Palacios, 2006) ha replanteado su área de distribución a poblaciones relictuales en los primeros tres estados mencionados (Rivers, Martínez Salas, & Samain, 2016).

Históricamente *M. mexicana* se ha asociado al nombre náhuatl “Yoloxóchitl” (de Candolle, 1818; Lozoya, 1999; Waizel-Bucay, 2002; Micheli, 2004), y se señaló a los estados de Veracruz, Morelos y Ciudad de México como sitios de origen y distribución (de Candolle, 1818; Sessé & Mociño, 1894), que tenía concordancia con lo asentado en el Códice Durán donde se relata que durante el reinado de Moctezuma I, fueron traídos éstos árboles desde la provincia de Cuertlaxtla (actual Veracruz), a lo que hoy es Oaxtepec en el Estado de Morelos para conformar el que fue el primer jardín botánico de América (Durán, 1581; Lozoya, 1999; Ximénez, 1615), lugar de donde pudieron dispersarse por acción humana hacia Chapultepec, otro importante jardín botánico de la época precolombina, en la Ciudad de México (Vovides, Linares, & Bye, 2010).

Sin embargo, actualmente no se tiene registro de *M. mexicana* en inventarios florísticos de Morelos, Ciudad de México ni Estado de México (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2001; Cerros-Tlatilpa & Espejo-Serna, 1998; Martínez de la Cruz, 2010; Martínez de la Cruz, Villaseñor, Aguilera Gómez, & Rubí Arriaga, 2018; Rodríguez-Jiménez, Fernández-Nava, Arreguín-Sánchez, & Rodríguez-Jiménez, 2005) que respalden los relatos históricos, pero se ha observado la presencia de ejemplares viejos y solitarios posiblemente de la especie, en los municipios de Malinalco (White

Olascoaga, Juan Pérez, Cedillo Gutiérrez, & Chávez Mejía, 2013) y Zumpahuacán en el Estado de México, que también podrían tener implicaciones sobre la distribución de *M. mexicana*.

En este sentido, la correcta identificación de los ejemplares mexiquenses resulta fundamental, en una especie que además se encuentra amenazada de extinción de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010), debido a la pérdida de su hábitat (Rivers, Martínez Salas, et al., 2016) y dificultad para propagarla por semilla (Osuna Fernández, 1997). Sin embargo, el acceso a material vegetal de estos ejemplares se encuentra restringido por los pobladores a un número limitado de muestras al tratarse de árboles de importancia social y cultural.

Aun cuando la caracterización morfológica ha permitido la discriminación de especies en otras magnolias (Vázquez-García, Gómez-Domínguez, et al., 2013; Vázquez-García, Muñiz-Castro, et al., 2013, 2012; Vázquez-García, Pérez-Farrera, et al., 2013), el empleo de los marcadores moleculares han probado su utilidad en este grupo por las muestras mínimas de tejido requerido y su capacidad discriminatoria entre poblaciones; tal es el caso de los marcadores RAPD, que se han mantenido vigentes por su simplicidad técnica (Kelleher & Diskin, 2018; Weising, Nybom, Wolff, & Kahl, 2005), detección de un gran número de polimorfismos (Casarrubias-Carrillo et al., 2003; Mondragón-Jacobo, 2003) y su utilidad en la identificación genética de individuos (Rentaría Alcántara, 2007).

Así, el objetivo del presente estudio fue establecer las relaciones moleculares y morfológicas existentes entre los ejemplares de *Magnolia* sp., presentes en Malinalco y Zumpahuacán, Estado de México, con individuos de *M. mexicana* presentes en Zongolica, Veracruz.

MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes de árboles maduros de Yoloxóchitl (*Magnolia* sp.) en los municipios de Malinalco (18°57'7.21"N, 99°57'2.1"O) y Zumpahuacán (18°50'24.7"N, 99°35'15.3"O), Estado de México; así como hojas de *M. mexicana* en las comunidades Acontla (18°31'27.1"N, 96°59'5.57"O) y La Quinta (18°39'6.72"N, 96°59'47.86"O) en Zongolica, Veracruz. Para contar con elementos de referencia, se colectaron muestras de árboles de *M. dealbata*, en la comunidad de Atempa, también en Zongolica (18°41'0.82"N, 96°59'43.9"O) y de *M. grandiflora* en el municipio de Tenancingo (18°58'6.22"N, 99°36'45.84"O), Estado de México, estos últimos se identificaron de acuerdo a sus características morfológicas según Hernández-Cerda (1980) y Vázquez-García, Pérez-Farrera, Martínez-Meléndez, Nieves-Hernández, & Muñiz-Castro (2012).

Análisis molecular

Extracción de ADN

Se utilizó el método CTAB al 2% para plantas con alto contenido de fenoles (Silva Rojas, Uribe Cortés, Aguirre Rayo, Martínez González, & García Morales, 2015). La calidad del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %, a 90 V por 90 minutos con buffer tris-borato-EDTA (TBE) concentrado 0.5x (Fierro Fierro, 2007; Silva Rojas et al., 2015).

Amplificación de fragmentos RAPD

Se utilizaron 14 iniciadores RAPD (Cuadro 1) en un juego de 18 muestras de ADN de las magnolias bajo estudio (Cuadro 2). La amplificación se realizó utilizando 11µl de MyTaq, 13µl de H₂O destilada-desionizada libre de nucleasas Sigma®, 1 µl de cebador RAPD y 2 µl de ADN para un volumen final de reacción de 26µl. El programa de amplificación fue: desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 94 °C, alineación por 1 minuto a 36 °C y extensión por 2 minutos a 72 °C; y un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Cuadro 1. Secuencias de 14 iniciadores RAPD (Operon Technologies Inc.), utilizados en la amplificación del ADN de *Magnolia* spp.

No.	RAPD	SECUENCIA
1	OPA6	5'-GGTCCCTGAC-3'
2	OPA7	5'-GAAACGGGTG-3'
3	OPA8	5'-GTGACGTAGG-3'
4	OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'
5	OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'
6	OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'
7	OPA16	5'-AGCCAGCGAA-3'
8	OPB1	5'-GTTTCGCTCC-3'
9	OPB3	5'-CATCCCCCTG-3'
10	OPB10	5'-CTGCTGGGAC-3'
11	OPB17	5'-AGGGAACGAG-3'
12	OPB19	5'-ACCCCCGAAG-3'
13	E18	5'-GGACTGCAGA-3'
14	C08	5'-TGGACCGGTG-3'

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 0.5x, en una celda electroforética Cleaver®. Los geles corrieron durante 10 horas a 70 V. Para el análisis de los marcadores RAPD, cada banda revelada fue considerada como un locus y se marcó con 1 la presencia y con 0 la ausencia de una banda en particular.

Análisis estadístico

De los amplicones revelados en los geles con cada cebador se construyó una matriz básica de datos (MBD); con la información recopilada de la MBD se analizó la eficiencia de cada cebador RAPD al calcular el Contenido de Información Polimórfica (PIC) (Laurentin & Karlovsky, 2007) y el Poder de Resolución (RP) (Prevost & Wilkinson, 1999).

La estimación de la similitud genética entre los genotipos evaluados fue calculada por medio del método de agrupación *Neighbour-joining* (Saitou & Nei, 1987), con el índice de similitud *Dice* (Nei & Li, 1979) y un remuestreo con reemplazo (*Bootstrap*) de los caracteres en la matriz de datos

de 1,000 corridas, por medio del programa FreeTree (Pavlicek, Hrda, & Flegr, 1999) y se eligió el dendrograma de mayor concenso, que se visualizó por medio del programa FigTree (Page, 2001).

Cuadro 2. Ejemplares del género *Magnolia* evaluados en análisis molecular.

NO.	CLAVE	ESPECIE	SITIO DE COLECTA
1	Md1	<i>M. dealbata</i>	Atempa, Zongolica, Veracruz.
2	Md2		
3	MS1	<i>M. grandiflora</i>	Santo Desierto, Tenancingo, Edo. Mex.
4	MS2		
5	MC1		
6	MC2		
7	Mali	<i>Magnolia</i> sp.	Malinalco, Edo. Mex.
8	Zum		Zumpahuacán, Edo. Mex.
9	Mm1	<i>M. mexicana</i>	La Quinta, Zongolica, Veracruz.
10	Mm2		
11	Mm3		
12	Mm4		
13	Mm5		
14	Mm6		
15	Mm7		
16	Mm8		
17	Mm9		
18	Mm10		

Análisis morfológico

Para los ejemplares de Yoloxóchitl del Estado de México y Veracruz, se recabaron datos morfológicos de descriptores discriminantes entre especies de magnolias de la sección Talauma a saber: estructura del árbol (altura y número de troncos principales), hoja (presencia o ausencia de pubescencia abaxial, forma, largo del peciolo, largo y ancho de la lámina), flor (cantidad, coloración, largo y ancho de los pétalos, así como número y tamaño de los estambres) y fruto (tamaño, presencia o ausencia de pubescencia y número de carpelos). También se registró información fenológica de los ejemplares bajo estudio.

RESULTADOS

Efectividad de los cebadores RAPD

Con los 14 cebadores evaluados se amplificaron 205 bandas, con valores máximo y mínimo por cebador de 25 y nueve bandas respectivamente (Cuadro 3). Los cebadores OPA7, OPA8 y E18 mostraron el mayor porcentaje de polimorfismo (100 %) y los cebadores OPB10 y OPB19 los más bajos (70 y 77.7 respectivamente).

Cuadro 3. Parámetros descriptivos de los cebadores RAPD utilizados.

Clave	NB ^a	NBP ^b	% Pol ^c	PIC ^d	RP ^f
E18	12	12	100	0.38	6.88
C08	18	17	94.4	0.31	8.55
OPA6	14	13	92.8	0.35	7.44
OPA7	17	17	100	0.41	10.77
OPA8	16	16	100	0.35	8.55
OPA10	14	13	92.9	0.28	5.66
OPA13	20	18	90	0.25	6.66
OPA15	25	21	84	0.24	7.77
OPA16	14	13	92.8	0.32	2.22
OPB1	12	10	83.3	0.29	0.66
OPB3	15	12	80	0.22	5.11
OPB10	10	7	70	0.20	2.11
OPB17	9	8	88.8	0.35	0.33
OPB19	9	7	77.7	0.28	3.22
TOTAL	205	184		4.23	76
Promedio	14.64	13.14	89.05	0.30	5.42
Máximo	25	21	100	0.41	10.77
Mínimo	9	7	70	0.20	0.33

^a Número de bandas

^b Número de bandas polimórficas

^c Porcentaje de polimorfismos

^d Contenido de información polimórfica

^e Índice del marcador

^f Poder de resolución

Se obtuvo un valor PIC promedio de 0.30, con un máximo de 0.41 y mínimo de 0.20; los cebadores con los valores PIC más elevados fueron el OPA7 (0.41), OPA8 (0.35) y E18 (0.38). También se registró un valor RP promedio de 5.42, con un máximo de 10.77 y mínimo de 0.33, los cebadores con mayor valor RP fueron el OPA7 (8.55), OPA8 (10.77) y C08 (8.55). El cebador OPA7 mostró los valores PIC y RP más elevados.

Relaciones genéticas entre las muestras de *Magnolia* spp.

En el dendrograma derivado del análisis de agrupamiento (Figura 1), el empleo de las especies *M. dealbata* y *M. grandiflora* como referencia o control mostró su utilidad al separar claramente estas dos especies, con valores bootstrap del 100%, en dos clados diferentes al clado “Yoloxóchitl” (*M. mexicana* con los genotipos de Zumpahuacán y Malinalco).

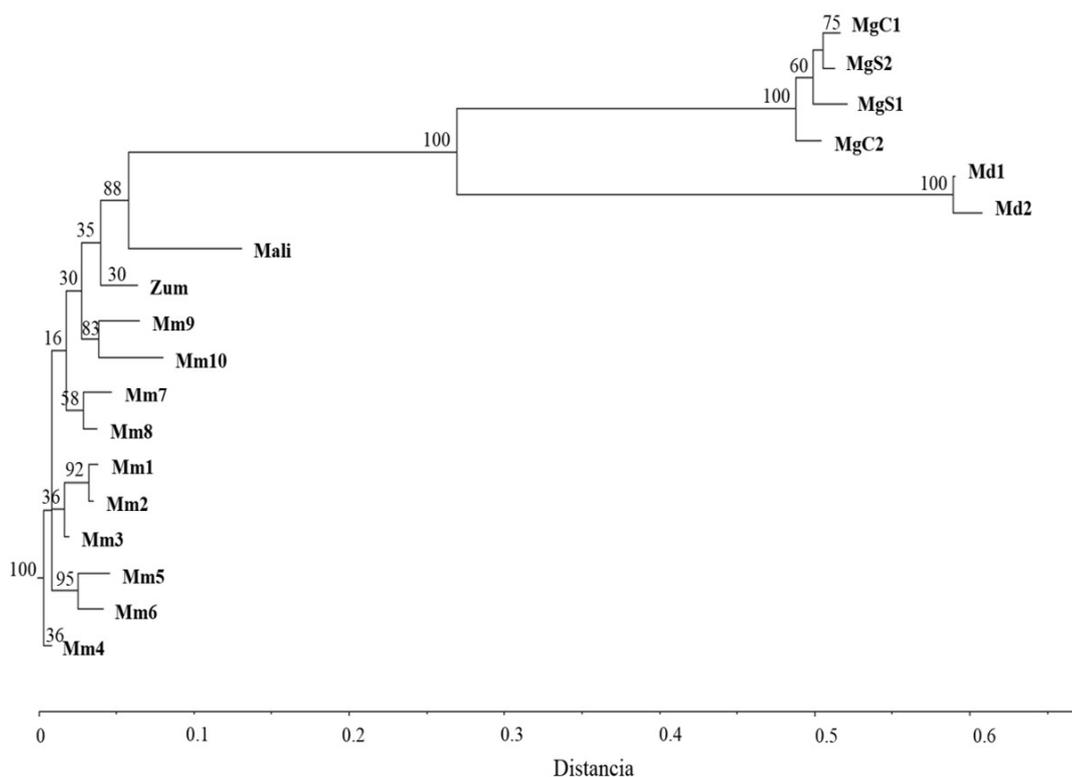


Figura 1: Dendrograma de 18 muestras de *Magnolia* spp., con 14 cebadores RAPD por el método Neighbour Joining y distancia genética de Dice, los números encima de cada nodo indican valores bootstrap (1000 remuestrados).

Dentro del clado Yoloxóchitl, se observaron los genotipos de Zumpahuacán y Malinalco posicionados espacialmente al extremo del conjunto con valores bootstrap de 30 % y 88 %. Así mismo, se observó una similitud superior al 90 % entre los genotipos de Veracruz y el de Zumpahuacán, y de 87 % de éstos con el genotipo de Malinalco. La variación de similitud entre las poblaciones de Veracruz y los genotipos mexiquenses fue de aproximadamente 7%.

Se observó que dentro del conjunto formado por *M. mexicana*, las muestras que se colectaron en Acontla aparecen en el extremo inferior (muestras Mm4, Mm5 y Mm6), por encima de ellas las que se colectaron en La Quinta (muestras Mm1, Mm2, Mm3, Mm8, Mm7, Mm9 y Mm10) y al extremo superior de todo el grupo, las muestras del Estado de México.

Comparación morfológica de Yoloxóchitl

Se observó aproximadamente un 77 % de variación morfológica entre los genotipos de Yoloxóchitl provenientes de Veracruz y los del Estado de México, pues sólo cuatro caracteres (pubescencia abaxial de la hoja, perianto, color de los pétalos y pubescencia del polifolículo del fruto), fueron constantes en los tres tipos de Yoloxóchitl (Cuadro 4 y Figura 2).

El ejemplar de Zumpahuacán guarda mayor relación morfológica con *M. mexicana* con la presencia de un solo fuste principal, similar número de carpelos del fruto, así como similar número y tamaño de los estambres y difirió en la altura del árbol (10m vs. 30m), forma de la hoja (base subobtusada vs. base aguda), menor tamaño de las hojas (11.8 – 23.8 cm vs. 17.7 – 49.5 cm), menor tamaño de los pétalos (6.5 – 7.8 vs. 7.5 – 9.8), forma del fruto (acorazonado vs. ovoide elipsoidal) y tamaño del fruto (12 cm vs. 15 cm), con igual fenología; mientras que el ejemplar de Malinalco difirió en el número de troncos principales (5 vs. 1), tamaño del peciolo (2.6 – 7.6 vs. 6.5 – 9.2), forma de la hoja (base subobtusada vs. base aguda), menor tamaño de la hoja (8.4 – 7.6 vs. 17.7 – 49.5 cm),

menor número de estambres (155 – 169 vs. 183), menor tamaño de los estambres (1.2 – 1.3 vs. 1.3 – 1.4) y menor número de carpelos (35 vs. 38 – 50), además de fenología diferente.

Cuadro 4. Caracteres morfológicos de ejemplares de Yoloxóchitl del Estado de México y Veracruz.

Caracteres morfológicos		<i>M. mexicana</i> de Veracruz	<i>Magnolia</i> sp. de Zumpahuacán	<i>Magnolia</i> sp. de Malinalco
árbol	Altura aproximada (m)	30	10	10
	No. de troncos principales	1	1	5
Hoja	Forma de la hoja	Oblongas o elípticas, base aguda	Oblongas o elípticas, base subobtusa	Oblongas o elípticas, base subobtusa
	Pecíolo (cm)	6.5 – 9.2	6.8 – 8.8	2.6 – 7.6
	Longitud de la hoja (cm)	17.7 – 49.5	11.8 – 23.8	8.4 – 19.5
	Ancho de la hoja (cm)	10.6 – 17	6.7 – 8.8	5.6 – 10.7
	Pubescencia abaxial de la hoja	Glabra	Glabra	Glabra
Flor	Diámetro de la flor (cm)	18-20	16	12 - 17
	Perianto	3 sépalos, 6 pétalos	3 sépalos, 6 pétalos	3 sépalos, 6 pétalos
	Tamaño de los pétalos (cm)	7.5 – 9.8 x 3 – 6.5	6.5 – 7.8 x 3.2 – 4.1	6.5 – 8.3 x 3 - 6
	Color de los pétalos	Blanco cremoso teñido de púrpura	Blanco cremoso teñido de púrpura	Blanco cremoso teñido de púrpura
	Número de estambres	183	121-184	155 - 169
	Tamaño de los estambres (cm)	1.3 – 1.4	1.3	1.2 – 1.3
Fruto	Forma del fruto	Ovoide a elipsoidal	Acorazonado	Ovoide a elipsoidal
	Tamaño del fruto (cm)	15	12*	10*
	No. de carpelos	38-50	39 - 40	35
	Pubescencia del polifolículo	Ligeramente pubescente	Ligeramente pubescente	Ligeramente pubescente
	Longitud de la semilla (cm)	1.4 – 1.7	s/d	s/d
Fenología	Floración	mayo – agosto	mayo – agosto	marzo – junio
	Fructificación (frutos maduros)	febrero - abril	febrero - abril	julio - octubre

Nota: *Frutos inmaduros que a madurez no producen semillas.

Así mismo, entre los ejemplares de Malinalco y Zumpahuacán se observó variación en el número de troncos principales (5 vs. 1), tamaño del pecíolo (2.6 – 7.6 vs. 6.8 – 8.8), menor tamaño de la hoja (8.4 – 7.6 vs. 11.8 – 23.8 cm), menor número de estambres (155 – 169 vs. 121 - 184), forma del fruto (acorazonado vs. ovoide elipsoidal), menor número de carpelos (35 vs. 39 – 40) y diferencias fenológicas

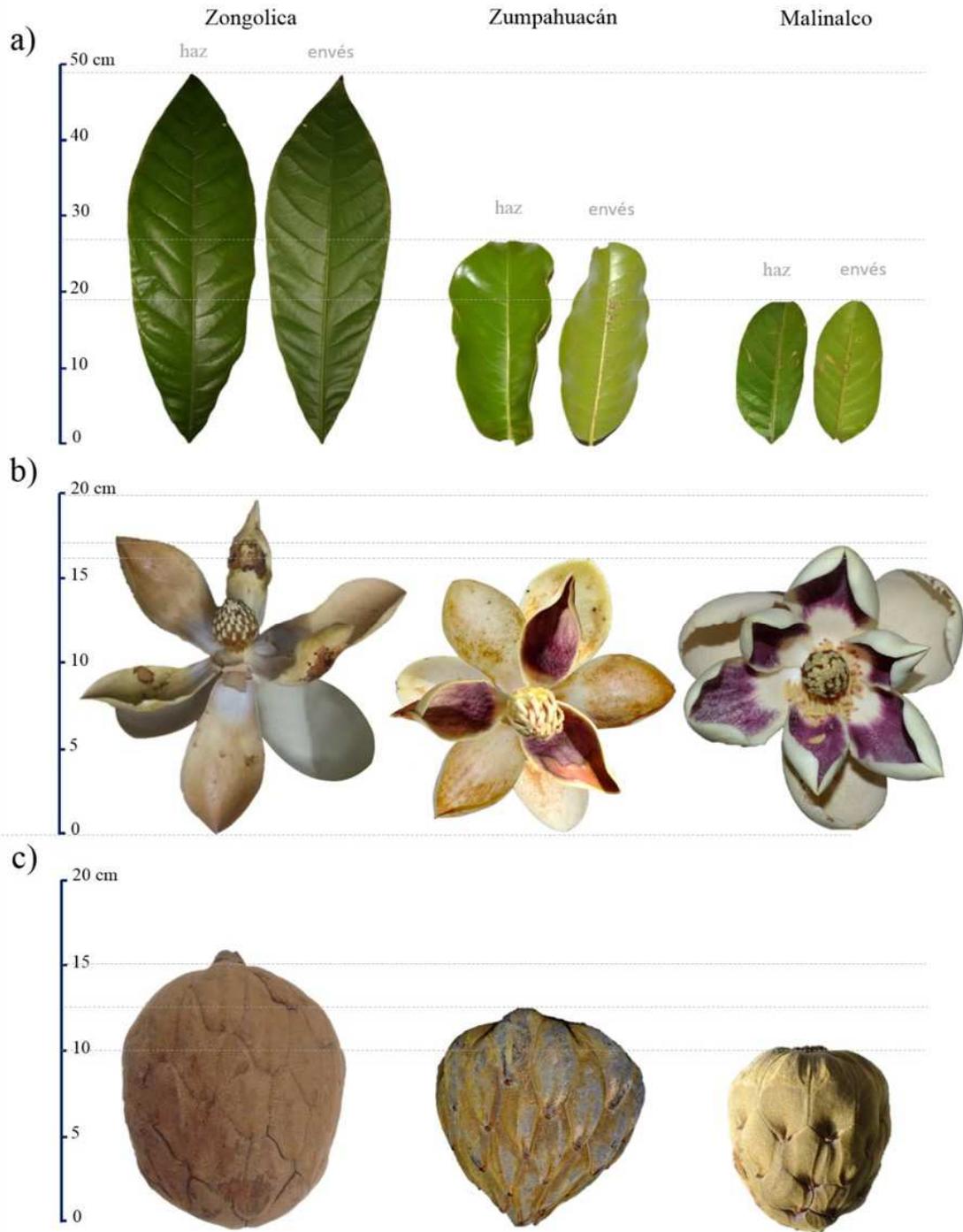


Figura 2: Comparación de hoja (a), flor (b) y fruto (c) de los árboles de Yoloxóchitl de Zongolica, Zumpahuacán y Malinalco.

DISCUSIÓN

Los marcadores RAPD utilizados mostraron en su mayoría valores PIC superiores a 0.25 y ninguno tuvo valores por debajo de 0.15, considerándose entonces como altamente informativos de acuerdo con Laurentin & Karlovsky (2007); además, por el porcentaje de polimorfismos detectados, los marcadores en conjunto se consideraron eficientes y útiles para la caracterización de genotipos de *Magnolia* spp.

Así mismo, el valor RP se utilizó como una medida de la capacidad de cada cebador para distinguir entre genotipos (Prevost & Wilkinson, 1999), por lo que, al obtener los valores RP más elevados, los cebadores E18, C08, OPA7 y OPA8 denotaron la mayor capacidad discriminante entre los genotipos de *Magnolia* spp., en particular, el cebador OPA7, al mostrar concordancia entre sus valores PIC y RP, sería el más recomendable para trabajar con este grupo botánico.

La habilidad observada de los RAPDs para separar muestras de acuerdo con su origen geográfico se ha reportado en otras especies (Casarrubias-Carrillo et al., 2003; Jacinto-Hernández, Garza-García, Garza-García, & Bernal-Lugo, 2014) y podría deberse a la participación de algunos genes en la adaptación a diferentes condiciones climáticas (Casarrubias-Carrillo et al., 2003); en el caso de los genotipos de Zongolica, se observó la separación por origen aun cuando no son evidentes diferencias ambientales o geográficas entre los sitios de colecta; sin embargo, la existencia de factores genéticos asociados al lugar de origen ya se han reportado para la misma especie en la misma zona de estudio (Medrano-Hernández, Rodríguez de la O, Reyes-Trejo, & Peña-Ortega, 2017).

La separación en dendrograma de los tipos de *M. grandiflora* (sección *Magnolia*) y *M. dealbata* (sección *Macrophylla*) en dos clados distantes del correspondiente al de los Yoloxóchitl se evidencia que los genotipos de Veracruz y los del Estado de México pertenecen a la misma la

sección botánica (Talauma). Además, la topología del dendrograma, con los grupos *M. dealbata* y *M. grandiflora* ubicados por encima del clado Yoloxóchitl, es coincidente con lo reportado por Azuma, García-Franco, Rico-Gray, & Thien (2001) y Kim & Suh (2013) en estudios sobre filogenia de las magnolias, quienes sugieren para la sección Talauma del género *Magnolia*, una divergencia evolutiva más temprana que las secciones *Magnolia* y *Macrophylla*.

Respecto al clado Yoloxóchitl, la alta similitud observada entre los genotipos de *M. mexicana* y el genotipo de Zumpahuacan indicaría que pertenecen a la misma especie aunque su posición en el dendrograma no está fuertemente respaldada por el valor bootstrap (35 %), mientras que la mayor distancia observada con el genotipo de Malinalco, respaldada por el valor de remuestreo (88 %), podría indicar que se trata de una especie diferente, sin embargo, al no tener como referencia otras especies de la misma sección botánica no fue claro el grado de separación que se esperaría para afirmarlo, sin embargo, en un estudio mediante ISSRs realizado por Muñoz-Castro, Castro-Félix, Carranza-Aranda, Santerre Lucas, & Vázquez-García (2017), con *M. pugana*, *M. pacifica* y *M. vallartensis* de la sección *Magnolia*, encontraron una variación de sólo el 8 % entre poblaciones de éstos tres taxa, similar a la encontrada en el presente estudio (7%).

La variación morfológica observada entre *M. mexicana* respecto al genotipo de Zumpahuacán (seis caracteres) y el de Malinalco (siete caracteres), sugiere también una diferenciación a nivel específico, ya que la reclasificación a nuevas especies de algunas poblaciones de *M. mexicana* ha resultado de variaciones morfológicas similares; por ejemplo, la reclasificación a *M. perezfarrerae* refirió variación en seis caracteres (Vázquez-García, Gómez-Domínguez, et al., 2013), la reclasificación a *M. lacandonica* consideró cuatro caracteres (Vázquez-García, Pérez-Farrera, et al., 2013), la reclasificación a *M. zoquepopolucae* contempló siete caracteres (Vázquez-García, De Castro-Arce, et al., 2012) y similar número de diferencias se consideraron en el resto de especies

mexicanas de la sección Talauma recientemente descritas (Vázquez-García, Muñoz-Castro, et al., 2013, 2012).

Algunos autores señalan la posibilidad de que las variaciones observadas se deban a intervención humana, como lo es la emisión de varios fustes por efecto de corte del tronco principal en edad temprana, ya documentado para *M. sprengeri* (Kang & Ejder, 2011); o bien, sean producto de la plasticidad fenotípica propia de una especie como respuesta adaptativa a un nuevo hábitat (Sultan, 2000). Así, si se considera que los árboles de Yoloxóchitl en el Estado de México fueron traídos directamente o son descendientes de aquellos que se presume provinieron de Veracruz, entonces los contrastes fenotípicos entre ellos podrían ser resultado de su plasticidad a la variación ambiental, toda vez que entre Malinalco, Zumpahuacán y Zongolica existen diferencias de altitud, intervalo de temperatura y nivel de precipitación pluvial de consideración (INEGI, 2009c, 2009a, 2009b).

Ejemplos de plasticidad fenotípica en magnolias se han reportado como pequeñas variaciones morfológicas en especies como *M. iltisana* en la que se observaron cambios en la biomasa de raíces y hojas en respuesta a variación de luz (Saldaña-Acosta, Meave, & Sánchez-Velásquez, 2009) y en *M. pugana* que presentó diferencias significativas en el crecimiento de plántulas bajo distintas condiciones de luz y fertilidad del suelo (García Castro, Romo-Campos, Pereira, & Gómez-Rubio, 2018); también se ha reportado variabilidad morfológica en color, tamaño y número de tépalos de las flores en *M. wufengensis* entre cultivares y una población silvestre (Wang et al., 2017) y variación en la forma de las hojas y coloración de las flores entre ejemplares solitarios y poblaciones tanto silvestres como cultivadas de *M. sprengeri* (Kang & Ejder, 2011), en este último caso, las diferencias morfológicas pueden ser tan marcadas que los autores consideran que la variación en la forma y tamaño de las hojas, así como en el número de tépalos y coloración de las flores entre árboles de una población o meta población de magnolias no debería tener valor

significativo como caracter taxonómico ni ser una razón para el otorgamiento del estatus de especie o subespecie, coincidiendo con lo mencionado por Vázquez-García, Domínguez-Yescas, Pedraza-Ruiz, Sánchez-González, & Muñiz-Castro (2015) en este mismo sentido.

Sería necesario realizar experimentos de establecimiento entre las áreas de estudio para determinar hasta qué punto se puede asumir que las diferencias morfológicas encontradas, más allá de las que distinguen un género, son sólo debidas al ambiente, lo que representaría reconsiderar la reclasificación de nuevas especies; sin embargo, se ha observado que las magnolias en México presentan una marcada especiación alopátrica, en donde las diferencias ambientales o geográficas tienen gran importancia en la separación de poblaciones en especies diferentes (Cruz-Durán, Vega-Flores, & Jiménez-Ramírez, 2008; Vázquez-García, 1994; Vázquez-García et al., 2015); además, el *status* actual de *M. mexicana* como especie amenazada, sugiere que no es una especie con gran capacidad plástica, ya que de acuerdo con Sultan (2000), las especies con poca plasticidad para mantener la reproducción y crecimiento, se restringen a nichos especializados y están en particular riesgo de extinción.

Entonces, la posible ausencia de efecto de plasticidad, sugiere que, por la variación morfológica observada, los Yoloxóchitl de Malinalco y Zumpahuacán serían especies distintas a *M. mexicana* y a las demás especies recientemente reclasificadas de la sección Talauma, al diferir de éstas últimas en similar número de caracteres, por ejemplo, el Yoloxóchitl de Zumpahuacán difiere en cuatro caracteres de flor y fruto con *M. zoquepopolucae* (Vázquez-García, De Castro-Arce, et al., 2012) y en ocho caracteres de hoja, flor y fruto con *M. jaliscana* (Vázquez-García, Muñiz-Castro, et al., 2012); mientras que *Magnolia* sp. de Malinalco difiere en cinco y seis caracteres con estas mismas especies.

El origen de los Yoloxóchitl mexiquenses es incierto, ya que las especies de magnolias geográficamente más cercanas (*M. krusei*, *M. vazquezii* y *M. guerrerensis*) pertenecen a la sección

Magnolia que es morfológicamente distinguible de la sección Talauma (Cruz-Durán et al., 2008; Jiménez-Ramírez, Vega-Flores, Cruz-Durán, & Vázquez-García, 2007; Vázquez-García, Muñiz-Castro, et al., 2013), de la cual no existen registros en inventarios florísticos realizados en la zona de estudio (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2001; Cerros-Tlatilpa & Espejo-Serna, 1998; López Patiño, López-Sandoval, Beltrán-Retis, & Aguilera-Gómez, 2018; Martínez de la Cruz, 2010; Martínez de la Cruz et al., 2018; Rodríguez-Jiménez et al., 2005).

En concordancia con los relatos históricos, podría tratarse de ejemplares introducidos a partir de poblaciones de especies en Veracruz ya inexistentes o bien ser ejemplares únicos de especies nativas ya desaparecidas, ambas suposiciones se soportan en el hecho de que ninguno de los dos ejemplares mexiquenses analizados produce semillas viables (observación directa y *com. pers.* con pobladores), incapacidad que puede estar asociada a diferentes factores como la inexistencia de polinizadores específicos o autoincompatibilidad; este tipo de esterilidad de las semillas se ha observado de forma común en árboles silvestres solitarios de *M. sprengeri* debido a la imposibilidad de una polinización cruzada por falta de otros ejemplares cercanos de la misma especie y se sabe que no es posible la autofecundación en dicha especie aún si se trata de flores distintas del mismo árbol (Kang & Ejder, 2011), también Hirayama, Ishida, & Tomaru (2005) reportaron que se reduce grandemente la producción de semilla en *M. stellata* por efecto de la geitonogamia; resultados similares se reportaron también para *M. obovata* (Ishida, Yoshimaru, & Ito, 2003); lo anterior sugiere que los árboles de Yoloxóchitl de Malinalco y Zumpahuacán no producen semillas viables debido a la falta de polinización cruzada ante la ausencia de individuos cercanos de la misma especie.

Si se considera que las magnolias presentan marcada especiación alopátrica, que *M. mexicana* es una especie de estrecha capacidad plástica y que las diferencias morfológicas encontradas coinciden con aquellas que han posibilitado la reclasificación a nuevas especies, se sugiere que los

árboles de Yoloxóchitl en Malinalco y Zumpahuacán pertenecen a otras especies, que por razones de su historia particular, se encuentran aislados.

CONCLUSIONES

La evidencia molecular obtenida indica que los árboles de Yoloxóchitl en Malinalco y Zumpahuacán pertenecen a la sección Talauma y su variación morfológica, sugiere que estos dos ejemplares pertenecen cada uno a una especie diferente a *M. mexicana*.

LITERATURA CITADA

- Azuma, H., García-Franco, J. G., Rico-Gray, V., & Thien, L. B. (2001). Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: The biogeography of tropical and temperate disjunctions. *American Journal of Botany*, 88(12), 2275–2285. <https://doi.org/10.2307/3558389>
- Calderón de Rzedowski, G., & Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México* (2a ed.). México, D.F.: Instituto de Ecología A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Casarrubias-Carrillo, U., González-Chavira, M. M., Cruz-Hernández, A., Cárdenas-Soriano, E., Nieto-Ángel, D., & Guevara-González, R. G. (2003). Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz y Sacc. aislado de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 338–345.
- Cerros-Tlatilpa, R., & Espejo-Serna, A. (1998). Contribución al estudio florístico de los cerros El Sombrerito y Las Mariposas (Zoapapalotl) en el municipio de Tlayacapan , Morelos. *Polibotánica*, (8), 29–46.
- Cruz-Durán, R., Vega-Flores, K., & Jiménez-Ramírez, J. (2008). *Magnolia vazquezii* (Magnoliaceae), una especie nueva del Estado de Guerrero, México. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 18(1), 21–24. <https://doi.org/10.3417/2005096>
- de Candolle, A. P. (1818). *Regni Vegetabilis Systema Naturale*. Retrieved from <http://bibdigital.rjb.csic.es/spa/Libro.php?Libro=2675&Hojas=>
- DOF. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.* , (2010).
- Durán, D. (1581). *Historia de las Indias de Nueva España e Islas de tierra firme*. Retrieved from <http://bdh-rd.bne.es/viewer.vm?id=0000169486&page=1>
- Fierro Fierro, F. (2007). Electroforesis de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (1a ed.). México, D.F.: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- García Castro, K. D., Romo-Campos, R. de L., Pereira, C. J., & Gómez-Rubio, R. (2018). Tasa relativa de crecimiento en plántulas de dos poblaciones de *Magnolia pugana* (Magnoliaceae) en distintos niveles de luz y fertilidad del suelo. *Revista de Biología Tropical*, 66(2), 622.

- <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i2.33394>
- Gómez-Domínguez, H., Pérez-Farrera, M. Á., Vázquez-García, J. A., Sahagún-Godínez, E., & Muñiz-Castro, M. Á. (2017). *Magnolia montebelloensis*, a new species in section *Magnolia* from Lagunas de Montebello National Park, Chiapas, México, with a key to Magnoliaceae of Chiapas. *Phytotaxa*, 328(2), 101. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.328.2.1>
- Hernández-Cerda, M. E. (1980). Magnoliaceae. In *Flora de Veracruz*. https://doi.org/10.1142/9781938368356_0004
- Hirayama, K., Ishida, K., & Tomaru, N. (2005). Effects of pollen shortage and self-pollination on seed production of an endangered tree, *Magnolia stellata*. *Annals of Botany*, 95(6), 1009–1015. <https://doi.org/10.1093/aob/mci107>
- INEGI. (2009a). *Malinalco, México*. Retrieved from https://ecitydoc.com/download/prontuario-de-informacion-geografica-municipal-30_pdf
- INEGI. (2009b). *Zongolica, Veracruz de Ignacio de la Llave*. Retrieved from http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30201.pdf
- INEGI. (2009c). Zumpahuacán, México. In *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. Retrieved from http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/15/15119.pdf
- Ishida, K., Yoshimaru, H., & Ito, H. (2003). Effects of geitonogamy on the seed set of *Magnolia obovata* Thunb. (Magnoliaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 164(5), 729–735.
- Jacinto-Hernández, C., Garza-García, R., Garza-García, D., & Bernal-Lugo, I. (2014). Caracterización de germoplasma nativo de frijol con base en marcadores moleculares y atributos de calidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(2), 253–264. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i2.964>
- Jiménez-Ramírez, J., Vega-Flores, K., Cruz-Durán, R., & Vázquez-García, J. A. (2007). *Magnolia guerrerensis* (Magnoliaceae), una especie nueva del bosque mesófilo de montaña del estado de Guerrero, México. *Botanical Sciences*, 80, 73–76. <https://doi.org/10.17129/botsci.1746>
- Kang, Y., & Ejder, E. (2011). *Magnolia sprengeri* Pamp.: Morphological variation and geographical distribution. *Plan Biosystems*, 145(4), 906–923. <https://doi.org/10.1080/11263504.2011.633352>
- Kelleher, C. T., & Diskin, A. (2018). Assessing botanical gardens specimens as a genetic resource for the future conservation - a pilot study using *Magnolia delavayi* in the gardens of Ireland. *Hortus Botanicus*, 12(12), 151–159. <https://doi.org/10.15393/j4.art.2017.3942>
- Kim, S., & Suh, Y. (2013). Phylogeny of Magnoliaceae based on ten chloroplast DNA regions. *Journal of Plant Biology*, 56(5), 290–305. <https://doi.org/10.1007/s12374-013-0111-9>
- Laurentin, H., & Karlovsky, P. (2007). AFLP fingerprinting of sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars: Identification, genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(7), 1437–1446. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9128-y>
- López Patiño, E. J., López-Sandoval, J. A., Beltrán-Retis, A. S., & Aguilera-Gómez, L. I. (2018). Composición de la flora arbórea en el área natural protegida Tenancingo-Malinalco-Zumpahuacán, Estado de México, México. *Polibotánica*, (34), 51–98.
- Lozano-Contreras, G. (1994). *Dugandiodendron y Talauma (Magnoliaceae) en el Neotrópico*. Bogotá: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Lozoya, X. (1999). Yoloxóchitl. In *Xiuhpatli, Herba Officinalis*. México, D.F.: UNAM Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial.
- Martínez de la Cruz, I. (2010). *La flora y vegetación ruderal de Malinalco, Estado de México* (Colegio de Postgraduados). Retrieved from

- <http://www.remeri.org.mx/portal/REMERI.jsp?id=oai:www.biblio.colpos.mx:10521/143>
- Martínez de la Cruz, I., Villaseñor, J. L., Aguilera Gómez, L. I., & Rubí Arriaga, M. (2018). Angiospermas nativas documentadas en la literatura para el Estado de México, México. *Acta Botánica Mexicana*, 124, 135–217. <https://doi.org/10.21829/abm124.2018.1273>
- Medrano-Hernández, J. M., Rodríguez de la O, J. L., Reyes-Trejo, B., & Peña-Ortega, M. G. (2017). Molecular characterization using ISSR primers of *Magnolia mexicana* DC. from two regions in Zongolica, Veracruz, Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 23(3), 427–436. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.03.019>
- Micheli, A. De. (2004). El largo camino hacia lacardiología mexicana de hoy. *Gaceta Médica de México*, 140, 346–352.
- Mondragón-Jacobo, C. (2003). Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de nopal (*Opuntia* spp. Cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 9(1), 97–105.
- Muñiz-Castro, M. Á., Castro-Félix, P., Carranza-Aranda, A. S., Santerre Lucas, A., & Vázquez-García, J. A. (2017). Genetic population structure and diversity of *Magnolia pacifica* A.Vázquez species complex in southwestern Mexico inferred from ISSR markers. XIX *International Botanical Congress*, (July 17-21), 262. Shenzhen, China: XIX International Botanical Congress.
- Nei, M., & 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(10), 5269–5273. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/291943> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC413122>
- Osuna Fernández, H. R. (1997). *Estructura y respuesta germinativa de semillas de plantas medicinales: Chiranthodendron pentadactylon y Talauma mexicana*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Page, R. D. M. (2001). *TreeView*. Retrieved from <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.htm>
- Palacios, E. (2006). *Talauma mexicana*. In *Cuarenta y ocho especies de la flora de Chiapas incluídas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000* (Vol. 28, pp. 1–6). Retrieved from <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichas/doctos/introduccion.html>
- Pavlicek, A., Hrdá, S., & Flegr, J. (1999). FreeTree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica*, 45(3), 97–99. Retrieved from http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=2&SID=3CncemegikaKEaCa1i8&page=29&doc=1422
- Prevost, A., & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1), 107–112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
- Rentaría Alcántara, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. In *Ecología molecular* (1a ed., pp. 541–566). Retrieved from <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap18.pdf>
- Rivers, M., Beech, E., Murphy, L., & Oldfield, S. (2016). *Magnoliaceae revised and extended*. Richmond, UK: Botanic Gardens Conservation International.
- Rivers, M., Martínez Salas, E., & Samain, M. S. (2016). *Magnolia mexicana, Yoloxóchitl*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T193977A2293105.en>

- Rodríguez-Jiménez, C., Fernández-Nava, R., Arreguín-Sánchez, M. de la L., & Rodríguez-Jiménez, A. (2005). Plantas vasculares endémicas de la cuenca del río Balsas, México. *Polibotánica*, (20), 73–99.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. Retrieved from papers://92fd5174-9e31-4983-9b1c-5a79350234b8/Paper/p6217
- Saldaña-Acosta, Á., Meave, J. A., & Sánchez-Velásquez, L. R. (2009). Seedling biomass allocation and vital rates of cloud forest tree species: Responses to light in shade house conditions. *Forest Ecology and Management*, 258(7), 1650–1659. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.07.027>
- Sessé, M., & Mociño, J. M. (1894). *Flora mexicana* (2a ed.). Retrieved from <http://bibdigital.rjb.csic.es/spa/Libro.php?Libro=2923&Hojas=>
- Silva Rojas, H. V., Uribe Cortés, T. B., Aguirre Rayo, J. M., Martínez González, C. R., & García Morales, S. (2015). *Extracción de DNA y amplificación de genes ribosomales, cloroplastos, mitocondriales y housekeeping* (1a ed.). Texcoco, Estado de México: Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Sultan, S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science*, 5(12), 537–542. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01797-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01797-0)
- Vázquez-García, J. A. (1994). *Magnolia* (Magnoliaceae) in Mexico and Central America: A Synopsis. *Brittonia*, 46(1), 1. <https://doi.org/10.2307/2807454>
- Vázquez-García, J. A., De Castro-Arce, E., Muñoz-Castro, M. Á., & Cházaro-Basañez, M. de J. (2012). *Magnolia zoquepopolucae*. *Phytotaxa*, 55(May), 51–55.
- Vázquez-García, J. A., Domínguez-Yescas, R., Pedraza-Ruiz, R., Sánchez-González, A., & Muñoz-Castro, M. Á. (2015). *Magnolia rzedowskiana* (Magnoliaceae), a new species of section *Macrophylla* from the central Sierra Madre Oriental, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 112, 19–36.
- Vázquez-García, J. A., Gómez-Domínguez, H., López-Cruz, A., Espinosa-Jiménez, J. A., Sahagún-Godínez, E., & Muñoz-Castro, M. Á. (2013). *Magnolia perezfarrerae*, a new species and a key to Mexican species of *Magnolia* (section *Talauma*, subsection *Talauma*, Magnoliaceae). *Botanical Sciences*, 91(4), 417–425.
- Vázquez-García, J. A., Muñoz-Castro, M. Á., Arroyo, F., Pérez, Á. J., Serna, M., Cuevas Guzmán, R., ... Gurrola-Díaz, C. M. (2013). Novelty in neotropical *Magnolia* and an addendum proposal to the IUCN Red List of Magnoliaceae. In J. A. Vázquez-garcía, M. Á. Muñoz-Castro, E. Salcedo Pérez, E. Hernández Álvarez, T. Escoto García, & N. Díaz Echavarría (Eds.), *Recursos Forestales en el Occidente de México: Diversidad, Manejo, Producción, Aprovechamiento y Conservación*. Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
- Vázquez-García, J. A., Muñoz-Castro, M. Á., De Castro-Arce, E., Murguía Araiza, R., Nuño Rubio, A. T., & Cházaro-Basañez, M. de J. (2012). Twenty new neotropical tree species of *Magnolia* (Magnoliaceae). In E. Salcedo Pérez, E. Hernández Álvarez, J. A. Vázquez-García, T. Escoto García, & N. Díaz Echavarría (Eds.), *Recursos Forestales en el Occidente de México: Diversidad, Manejo, Producción, Aprovechamiento y Conservación* (1a ed., pp. 91–130). Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
- Vázquez-García, J. A., Neill, D. A., Pérez-Castro, Á. J., Arroyo, F., Núñez, M. P., Serna, M., ... González, A. S. (2014). Magnoliaceae en el Neotrópico: Riqueza, endemismo y estado de conservación. *XI Congreso Latinoamericano de Botánica*, (October), 10. <https://doi.org/10.13140/2.1.4945.6324>
- Vázquez-García, J. A., Pérez-Farrera, M. Á., Martínez-Camilo, R., Muñoz-Castro, M. Á., & Martínez-Meléndez, N. (2013). *Magnolia lacandonica* (subsection *Talauma*, Magnoliaceae),

- a new rainforest species from Chiapas, Mexico. *Phytotaxa*, 79(1), 30–36. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.79.1.2>
- Vázquez-García, J. A., Pérez-Farrera, M. Á., Martínez-Meléndez, N., Nieves-Hernández, G., & Muñiz-Castro, M. Á. (2012). *Magnolia mayae* (Magnoliaceae), a new species from Chiapas, Mexico. *Botanical Sciences*, 90(2), 109–112.
- Vovides, A. P., Linares, E., & Bye, R. (2010). *Jardines botánicos de México: historia y perspectivas* (1a ed.). Jalapa, Veracruz: Instituto de Ecología.
- Waizel-Bucay, J. (2002). Uso tradicional e investigación científica de *Talauma mexicana* (D.C.) Don., o flor del corazón. *Revista Mexicana de Cardiología*, 13(1), 31–38.
- Wang, L., Xiao, A. H., Ma, L. Y., Chen, F. J., Sang, Z. Y., & Duan, J. (2017). Identification of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae) cultivars using phenotypic traits, SSR and SRAP markers: Insights into breeding and conservation. *Genetics and Molecular Research*, 16(1). <https://doi.org/10.4238/gmr16019473>
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*.
- White Olascoaga, L., Juan Pérez, J. I., Cedillo Gutiérrez, J. G., & Chávez Mejía, C. (2013). Flora Medicinal En San Nicolás, Municipio De Malinalco, Estado De México. *Polibotánica*, 2(3), 173–206. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9796-9>
- Ximénez, F. (1615). *Cuatro libros de la naturaleza y virtudes de las plantas y animales de uso medicinal en la Nueva España*. Retrieved from <http://bdh-rd.bne.es/viewer.vm?pid=d-211882>