



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Evaluación de dos métodos para la visualización de cromosomas de *Opuntia heliabraeana*, *O. leucotricha*, *O. matudae* y *O. rzedowskii*

Tesis que para obtener el título de

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

NAHUM DOMÍNGUEZ MÉNDEZ

DIRECTORA: DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ENERO 2016



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, profesora investigadora del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Chapingo por su orientación incondicional y fraterno a lo largo del desarrollo del presente trabajo; siempre en disposición de brindar el apoyo necesario para continuar y persistir trabajando hasta ver consumado el proyecto.

A la Dra. Claudia V. De Teodoro Pardo investigadora de la Universidad Autónoma Chapingo, por ser un apoyo importante en la construcción de la presente tesis y brindarme la guía necesaria en los momentos requeridos.

A la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce Profesora Investigadora en Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados, por brindarme las condiciones para llevar a la práctica gran parte del presente.

A familiares y amigos cercanos que han estado siempre conmigo y han sido un importante impulso para seguir adelante y conseguir el objetivo planeado.

I. INDICE GENERAL

I.	ÍNDICE GENERAL.....	01
II.	RESUMEN.....	02
III.	INTRODUCCIÓN.....	03
	3.1 Contexto Histórico del Nopal.....	03
	3.2 Centro de Origen.....	04
	3.3 Descripción de <i>Opuntia</i>	04
	3.4 Clasificación Taxonómica.....	05
	3.5 Reproducción.....	06
	3.6 Distribución.....	06
	3.7 Importancia Ecológica.....	06
	3.8 Producción y Consumo.....	07
	3.9 Principales plagas.....	07
	3.10 División celular.....	08
	3.10.1 Interfase.....	09
	3.10.2 Mitosis.....	09
	3.10.3 Citoquinesis.....	10
	3.10.4 Meiosis.....	10
	3.11 Ploidía.....	10
	3.12 Niveles de plodía reportados en <i>Opuntia</i>	11
	3.13 Descripción de especies consideradas en el presente estudio.....	13
IV.	HIPÓTEISIS.....	17
V.	OBJETIVO GENERAL.....	17
VI.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
	7.1 Material Biológico.....	17
	7.2 Métodos.....	18
	7.3 Estandarización de los protocolos en células de cebolla y lenteja...18	
	7.4 Protocolo Majure (2012b).....	18
	7.5 Protocolo García (1990).....	19
VIII.	RESULTADOS.....	20
	8.1 Visualización de cromosomas de cebolla y lenteja.....	20
	8.2 Visualización de cromosomas en <i>Opuntia</i> con la metodología de García (1990).....	22
	8.3 Primera evaluación en <i>Opuntia</i>	24
	8.4 Segunda evaluación de <i>Opuntia</i>	27
IX.	DISCUSIÓN.....	31
X.	CONCLUSIONES.....	32
XI.	PERSPECTIVAS.....	32
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	33
XIII.	ANEXOS.....	37

II. RESUMEN

Estudios del contenido de cromosomas mediante citometría de flujo en las especies *Opuntia heliabravoana*, *O. leucotricha*, *O. matudae* y *O. rzedowskii* indican que tienen un número de cromosoma 2X, 4X, 6X y 8X, respectivamente. El objetivo del presente estudio fue realizar conteo de cromosomas en representantes de estas mismas especies con la finalidad de comparar los datos reportados. Las plantas utilizadas fueron proporcionadas por el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma de México y establecidas en macetas y desarrolladas en condiciones de invernadero. Se emplearon raíces jóvenes de cada material vegetal, principalmente secundarias, y se realizaron cortes que fueron fijados y posteriormente teñidos con orceína para observar y contar los cromosomas en un microscopio Velab modelo VE-B6 a 100x. Los resultados obtenidos indicaron que el número de cromosomas de cada especie en valor promedio correspondió a la mitad de lo reportado, *O. heliabravoana*, (12.9) cromosomas; *O. leucotricha* (21.16); *O. matudae* (34.22) y *O. rzedowskii* (40.68). La disparidad de los resultados obtenidos en el presente estudio y para cada especie, se puede deber a que el tipo de tejido que se utilizó prácticamente carece de polisacáridos; mientras que las preparaciones de DNA que se utilizan para hacer la medición con citometría de flujo, normalmente reportan a este tipo de metabolitos como contaminantes que interfieren en la cuantificación correcta del ácido nucleico purificado.

III. INTRODUCCIÓN

Opuntia spp. es una planta endémica de México; a lo largo del país estas plantas forman parte de su flora con abundancia relativa en climas secos (Bravo y Sánchez, 1978).

Existe una gran variedad de especies reportadas en nuestro país, el continente americano y el mundo. Esta planta presenta una forma de reproducción sexual y asexual; la forma sexual puede ser un factor determinante en la variabilidad de especies, relacionada directamente en su número de cromosomas. Su número haploide es 11 ($2X=22$) y presenta poliploidía 4(X), 6(X) y 8(X), según datos reportados mediante citometría de flujo, una técnica que selecciona células y estructuras citosólicas por su tamaño y forma (Pinkava, 2002).

Mediante un cariotipo también se puede determinar el número de cromosomas por su tamaño y forma con más efectividad, debido a que el microscopio permite observar directamente a estas estructuras ofreciendo la oportunidad de selección y discriminación de material adecuado. Esto ofrece resultados más confiables para diversos estudios, entre ellos los moleculares (Loureiro, 2009).

En el presente trabajo se evaluaron diferentes metodologías para determinar el número de cromosomas de *Opuntia matudae*, *O. heliabravoana*, *O. leucotricha* y *O. rzedowskii* mediante su cariotipo.

3.1 Contexto histórico del nopal

El nombre científico *Opuntia* fue asignado al nopal por Tournefort en 1700, debido a que le encontró gran semejanza a una planta espinosa del poblado de *Opus* en Grecia (Barrientos, 1965).

Dentro de la mitología mexicana, el nopal tiene una gran representación simbólica en la fundación de la ciudad México-Tenochtitlan, pues esta ciudad se originó por el encuentro de un águila devorando una serpiente, la cual estaba posada sobre un nopal que crecía en una roca que se encontraba en medio de un lago (Vázquez A. A., C. Medina, & M. José, 1981).

Las tunas, los frutos del nopal, representaban los corazones de los sacrificados en los ritos ceremoniales de dicha cultura (Santos, R. Anna J., Muños Juan M., Albarrán Jordán A., & Cruz J. 2006).

Las primeras plantas domesticadas en zonas semiáridas de México fueron producto del favorecimiento de las plantas comestibles disponibles (entre los que se encontraban magueyes, nopales y mezquites) y la consecuente remoción de las especies indeseables (Sheinvar, 2011).

En el México prehispánico, las grandes nopaleras fueron uno de los recursos alimenticios principales de los grupos nómadas del centro y norte del país, y su presencia fue factor fundamental en el proceso de sedentarización (Santos et al. 2006).

3.2 Centro de origen

Existen evidencias del nopal utilizado en nuestro territorio que datan de hace 7,000 años en semillas, cáscaras de tuna y fibras de pencas de nopal fosilizadas, encontradas en excavaciones realizadas en Tehuacán, Puebla. Por estas razones Mesoamérica, y particularmente México ha sido reconocido como el centro de origen de *Opuntia spp.* (Bravo y Sánchez, 1978).

La antigüedad del uso del nopal evidenciada en los hallazgos arqueológicos, la presencia actual de diversas formas silvestres y la gran tradición en su utilización y manejo en nuestro país, son prueba irrefutable del origen y/o diversificación del género *Opuntia* en nuestro país (Sheinvar, 2011).

3.3 Descripción de *Opuntia*

Opuntia spp., comúnmente es conocida como nopal, el nombre es de origen náhuatl (nopalli) (Rios y Quyintana, 2004). Son plantas arborescentes, que llegan a convertirse en arbustos y con una altura de hasta 5 m; su tronco no es definido, de éste se proyectan artículos aplanados ovales llamados comúnmente cladodios con apariencia de hoja carnosa, de 8 a 25 cm de longitud por 3 a 6 cm de anchura,

de color verde grisáceo. Así como la familia de los cactus, *Opuntia* spp. desarrolló una cutícula gruesa con abundantes espinas que son modificaciones de hojas para protección a la depredación y pérdida de agua (Rebman, 2001; Sheinvar, 2011). Su fruto es globoso, ovoide hasta turbinado; el pericarpio lleva glóquidas y espinas, pulpa jugosa con abundantes semillas lenticulares, con testa clara y arillo ancho; embrión con hipocotilo y cotiledones grandes; perisperma bien desarrollado; los frutos tienen un sictoma relajante, lo que origina un grupo de frutos dispuestos a lo largo de las puntas de los cladodios; las flores aparecen en los bordes de los cladodios aunque pueden aparecer en los bordes de los frutos, son grandes con los segmentos del perianto (corola) frecuentemente amarillos, aunque también los encontramos rosas, anaranjados o rojizos; su estigma es multilobulado en número de cinco a diez lóbulos (Ánderson, 2001; Santos et al. 2006).

3.4 Clasificación taxonómica

Pertenece al reino plantae, su clasificación científica es la siguiente:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Caryophyllales
Familia: Cactaceae
Género: Opuntia
Subgénero: Platyopuntia

Sheinvar (2011) reporta que existen de 191 a 215 especies según distintos autores; Guzmán y Dávila 2007 indican que en México se encuentran 101 especies.

3.5 Reproducción

La taxonomía de los nopales resulta ser muy complicada debido a múltiples razones, entre otras porque sus fenotipos presentan gran variabilidad según las condiciones ambientales; se encuentran frecuentemente casos de poliploidía, su reproducción se lleva a cabo de manera sexual por polinización o asexual a través de clones de cladodios, y existen numerosos híbridos interespecíficos. (Rebman, 2001; Sáenz, 2006).

3.6 Distribución

El género *Opuntia* (subgénero *Platyopuntia*) es uno de los más diversificados y abundantes en la República Mexicana; se presentan prácticamente en todos los tipos de vegetación de las zonas áridas y semiáridas, y con frecuencia aparecen también en zonas tropicales y templadas (Vázquez et al. 1981).

Opuntia se distribuye latitudinalmente desde Alberta, Canadá, hasta La Patagonia, Argentina; y longitudinalmente desde las Islas del Caribe, a las de Islas Galápagos (Cota, 2008).

Después de la conquista de México, el nopal se introdujo en España en 1500, para propagarse después por algunos otros países del Mediterráneo y la India, principalmente. Actualmente en África y Australia se considera una maleza (Sheinvar, 2011).

3.7 Importancia ecológica

Opuntia spp. es un recurso importante en la economía rural y de las zonas áridas en general, destacando *Opuntia ficus-indica*, por los altos rendimientos que se obtienen de la fruta y demás usos, restaurando superficies que no cuentan con una precipitación pluvial adecuada para la siembra de especies que requieren mayor humedad y suelo fértil (Robles y Julio, 2009).

3.8 Producción y consumo

Opuntia spp. tiene diversos usos productivos en la economía, se ha internacionalizado su consumo tanto de la fruta como los cladodios, de los cuales se elaboran diversos productos: jaleas, jugo bebida, concentrados, etc. (Sáenz, 2006).

Para la producción de harina en la panificación, sin embargo, este producto presenta algunos cambios notorios como son: textura dura, presencia de filamentos, color verdoso y olor a hoja seca. Pero, es un producto que logra competir con otros de producción más antigua (Guerrero, 2012).

También se ha utilizado como alimento para el ganado, en la que se obtienen algunas ventajas debido a que el ganado no muestra mayor interés por beber agua, Las pencas deben ser previamente limpiadas de todo tipo de espinas y gloquidas para que el animal pueda alimentarse sin problemas (Bravo y Sánchez, 1978).

3.9 Principales plagas

La principal plaga que invade los cultivos de nopales es la Cochinilla (*Dactylopius coccus*) que también ha resultado ser cultivada a través de plantas de *Opuntia* spp. para la obtención de colorante, y aunque no presenta ninguna plaga de importancia económica, es importante eliminarla cuando el cultivo de interés es el nopal o la fruta (Sheinvar, 2011).

El gusano de la tierra (*Lumbricus terrestris*), es una larva que se alimenta de las plantas de tuna tiernas y jóvenes causando deformaciones y perforaciones en las mismas, se controla previniendo su ataque mediante aplicaciones de aldrán al momento de la plantación. El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), es otra larva de color verde claro que mide hasta 3 cm de longitud, tiene como hábito alimenticio cladodios tiernos y jóvenes provocando su deformación, se le controla con aplicaciones de tamarón. Y el gusano minador (*Graciliriadeae*) es una larva

pequeña, roja rosada, que vive debajo de la epidermis de las paletas terminales formando galerías (Ríos y Quintana, 2004).

3.10 División Celular

El concepto de división Celular establece que la célula se reproduce por un ciclo de crecimiento y división llamado ciclo celular. Cada vez que una célula completa un ciclo de crecimiento se divide en dos células. La figura 1 muestra una división general del ciclo celular. Existen tres etapas principales en el ciclo que son interfase, mitosis y citoquinesis (Biggs, A., Hains, W. C., Holliday, W. G. Kapicka, C. L., Lundgren, L., MacKenzie A. H., Rogers, W. D., Sewer, B., & Zike D. 2012).

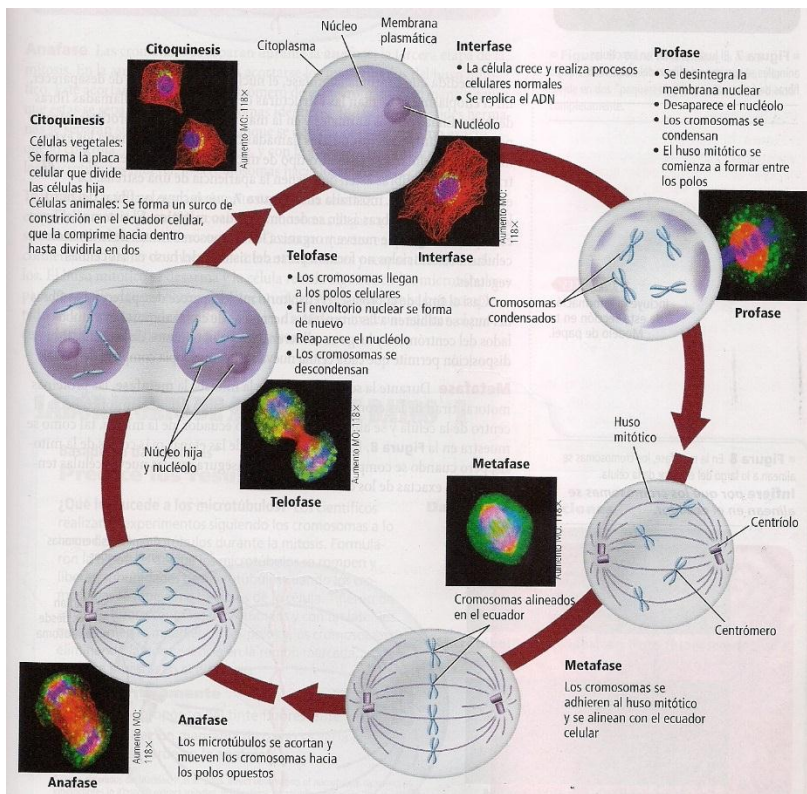


Figura 1. El ciclo celular comienza con la interfase, luego ocurre la mitosis en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase; y finalmente continúa la citoquinesis, y el ciclo celular se repite con cada nueva célula.

3.10.1 Interfase

Es la etapa de crecimiento de la célula, donde se realizan funciones celulares y duplica o hace copias de su ADN en preparación para la siguiente etapa del ciclo. A su vez la interfase se divide en tres subetapas como lo muestran (Nelson & Cox, 2000):

G1: Gap (intervalo) 1; la célula crece y desempeña funciones normales.

S: síntesis; se duplica el ADN

G2: Gap (intervalo) 2; la célula se prepara para la mitosis.

La célula posee un ciclo de crecimiento y reproducción a través de dos procesos llamados meiosis y mitosis:

3.10.2 Mitosis

La mitosis se lleva a cabo en células somáticas, durante este proceso el material genético duplicado celular se separa y la célula se prepara para dividirse en dos. La actividad principal de la mitosis es la separación correcta del ADN de la célula. Esto permite que la información genética celular pase intacta a las nuevas células, lo cual resulta en dos células hijas genéticamente idénticas. En organismos pluricelulares, el proceso de mitosis aumenta el número de células a medida que un organismo joven crece a su tamaño adulto. Se lleva a cabo en diferentes etapas: *Prometáfase*. Se inicia con la desintegración de la envoltura nuclear que se rompe originando vesículas de membrana indiferenciables de las vesículas de retículo endoplásmico. En este momento los microtúbulos del huso entran en la región nuclear. En cada centrómero maduran complejos proteicos llamados cinetocoros que se unen a los microtúbulos del huso, que ejercen una tensión sobre los cromosomas, los cuales se ven sometidos a movimientos agitados. *Metafase*. Los microtúbulos del cinetocoro alinean los cromosomas en un plano ecuatorial de la célula. Cada cromosoma se mantiene en tensión en esta placa metafásica por los cinetocoros apareados y por sus microtúbulos asociados, los cuales están unidos a los polos opuestos del huso (centriolos). *Anafase*. Inicia cuando los cinetocoros apareados se separan, permitiendo que cada cromátida

sea arrastrada lentamente hacia un polo del huso. *Telofase*. Los cromosomas hijos separados llegan a los poros y los microtúbulos del cinetocoro desaparecen. Los microtúbulos polares se alargan aún más y se vuelve a formar la envoltura nuclear. La cromatina condensada se expande y los nucleolos reaparecen; la mitosis ha llegado a su fin. (Biggs et al. 2012).

3.10.3 Citoquinesis

Es el proceso en el que se divide el citoplasma celular para crear una nueva célula.

3.10.4 La meiosis

Es un proceso donde se lleva a cabo la formación de gametos, un tipo de división celular que reduce el número de cromosomas a través de cromosomas homólogos; por esta razón, se le conoce como una división de reducción. La meiosis se presenta en las estructuras reproductoras de los organismos que se reproducen sexualmente (Biggs et al. 2012).

3.11 Ploidía

La ploidía es el número de juegos completos de cromosomas que tiene una célula o un individuo. Todos los seres vivos que posean dos juegos completos de cromosomas son diploides y se representa su número cromosómico como $2n$ o $2x$ al número de cromosomas total que tenga. Por ejemplo, el ser humano tiene $2x=46$, es decir, tiene 23 parejas de cromosomas (X)

Cuando un individuo tiene un número que no es múltiplo de la ploidía de su especie sufre una aneuploidía. En todas las especies diploides la falta o el exceso de tan solo uno de los cromosomas provocan serios problemas. En el mundo natural es poco frecuente observar alguno de estos individuos. Sin embargo no todos los seres vivos son diploides. Existen seres tetraploides o hexaploides, frecuentemente en plantas. Los seres poliploides, con una ploidía superior a dos,

normalmente son el resultado de la interacción entre gametos que no han sufrido una meiosis correcta (Pinkava, 2002).

3.12 Niveles de ploidia reportados en *Opuntia*

Se ha aceptado el valor de $X=11$ para representar el número haploide del género *Opuntia* (Pinkava, 2002); sin embargo diversos estudios demuestran que el número de cromosomas para el género es complicado de determinar, encontrándose desde diploides ($2n=22$) hasta octoploides ($2n=88$), correspondiendo la condición diploide a especies silvestres generalmente de reproducción vegetativa (Segura et al. 2007).

De acuerdo a la literatura consultada, existen diferentes niveles de ploidía que son muy variables ($2n=22$, $2n=44$, $2n=66$, $2n=88$), a pesar de ello no hay reportes de todas las especies conocidas. Algunos ejemplos del nivel tetraploide ($2n=44$) son las especies *Opuntia robusta*, *O. polyacantha*, *O. streptacantha*, *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, etc. El más alto nivel de poliploidía corresponde a ($2n=88$), ejemplos de estos son *Opuntia amyclaea*, *O. megacantha*, etc. (Rebman, 2001; Santiago, 2013; Cota, 2008, Majure, 2012a, Majure, 2012b, Barriento, 1965, Rios y Quintana, 2004). En el Cuadro 1. se muestran los niveles de ploidía de especies reportadas de diferentes autores y con dos técnicas empleadas reportados por Segura et al. 2007:

Cuadro 1. Número de cromosomas observado mediante técnicas diferentes.

Especie	Nivel de ploidía	Autor	Técnica
<i>O. spinulifera</i>	4X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. elizondoana</i>	4X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. robusta</i> var. <i>larreyi</i>	4X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. humifusa</i>	4X	Majure, 2012	Cariotipo
<i>O. macrorhiza</i>	4X	Majure, 2012	Cariotipo
<i>O. oligacantha</i>	6X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. incarnadilla</i>	6X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. fragilis</i>	6X	Majure, 2012	Cariotipo
<i>O. cochineria</i>	8X	Palomino y Heras, 2001	Cariotipo
<i>O. hyptiacantha</i>	8X	Palomino y Heras, 2001	Cariotipo
<i>O. streptiacantha</i>	8X	Palomino y Heras, 2001	Cariotipo
<i>O. zamudioi</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. lasiacantha</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. hyptiacantha</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. streptiacantha</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. megacantha</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. joconostle</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. ficus-indica</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. albicarpa</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. amarilla</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. chavena</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. cochineria</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. cretochaeta</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. robusta</i> var. <i>robusta</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo
<i>O. robusta</i> var. <i>guerrana</i>	8X	Segura et al. 2007	Citometría de flujo

Cuadro tomado de Segura et al. 2007.

Segura et al. (2007) también nos reporta como podemos ver en el Cuadro 2. Los siguientes niveles de ploidía para las especies de interés, en este estudio mediante citometría de flujo:

Cuadro 2. Número de cromosomas reportado de las cuatro especie de interés mediante citometría de flujo.

Espece	Nivel de ploidía
<i>O. heliabravoana</i>	2x
<i>O. leucoctricha</i>	4x
<i>O. matudae</i>	6x
<i>O. rzedowskii</i>	8x

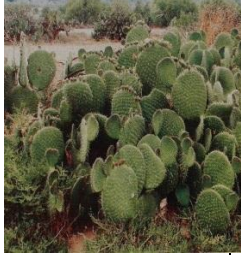
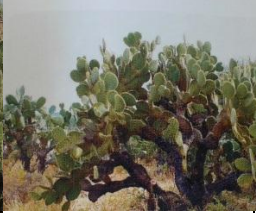


Cuadro tomado de Segura et. al. 2007.

Mediante un cariotipo, el conteo de cromosomas se puede llevar a cabo con mayor precisión y seguridad, ya que la técnica de citometría de flujo generalmente presenta problemas en la lecturas debido a compuestos citosólicos de los tejidos que interfieren en la lectura de los núcleos celulares (Loureiro, 2009).

3. 13 Descripción de Especies consideradas en el presente estudio

En el siguiente cuadro número 3 se muestran las especies de intereses con sus respectivas características particulares.

Característi cas	Especies			
Espece	<i>Opuntia heliabravoana</i>	<i>O. leucoctricha</i>	<i>O. matudae</i>	<i>O. zrendowskii</i>

Ejemplar	 (Scheinvar, 2009).	 (Scheinvar, 2009).	 (Scheinvar, 2009).	 Reyes (2009).
Nombre común	Xoconostle blanco, tetechal, nopal chaparro, duraznillo blanco.	Nopal duraznillo, duraznillo rojo, duraznillo blanco, coyonostle.	Xoconostle cuaresmeño, xoconostle colorado con espinas, joconostle barrilillo, joconostle chapeadito.	Nopal de pedregal.
Cladodios	Glabros a simple vista, microverrucos os vistos al microscopio electrónico, anchamente obovados a subcirculares, de 21 a 50 cm de largo por 15 a 40 cm de ancho, verde	Obovados, ápice obtuso, de 18 a 25 cm. De largo y 11 a 17 cm de ancho, verde claro, grisáceo.	Angostamente obovados, de 20 a 25 cm. de largo y 10 a 15.5 cm de ancho, verde azulosos algo grisáceos, manchas purpúreas alrededor de las aréolas, epidermis glabra.	Elípticos a angostamente obovados, con ápice redondeado y base angosta, de 17.5 a 30 cm de largo, de 8 a 12 cm de ancho y 1.5 cm de espesor.

	limón algo amarillentos.			
Espinas	De 1 a 2 espinas, de 0.4 a 1.3 cm de largo, rígidas, blanco amarillentas con base y ápice ambarinos.	De 3 a 7, acirculares, aplanadas, flexibles, cerdosas, hasta 3 cm de largo, amarillentas con la punta translúcida, pasando a blancos con la edad.	De 1 a 8, de 0.7 a 3.5 cm de largo, muy delgadas y flexibles, algunas torcidas, con base doblada.	Ausentes en las aréolas inferiores, las superiores con 1, 2 o 4 espinas, de 0.6 a 3.5 cm de largo, ambarinas, translúcidas.
Flores	6 cm de ancho en antesis, pericarpelo casi globoso de 3.5 a 3.2 de ancho, aréolas dispuestas en 8 series, segmentos exteriores verde-amarillentos con una ancha estría central rojiza y segmentos	De 5 a 8 cm de largo, amarillo verdosas, con manchas rojizas. Pericarpelo de 3 cm de largo y 2.5 cm de ancho, con hoja basal roja en el ápice. Estambres con filamentos cortos, blancos a amarillos verdosos y anteras amarillo	De 5 a 8 cm de largo y hasta 8 cm de diámetro en la antesis, amarillo brillantes con manchas rojas, pasando con el tiempo a rosado y rojo,	Son chicas de 4.5 a 5 cm en antesis, anaranjadas con tintes rojizos acentuados por el frío y el tiempo, pericarpelo casi globoso, de 2.4 cm de largo y 2 cm de ancho.

	centrales amarillos, filamentos y anteras amarillas, estilo amarillo con tintes rosados, 5 mm de largo,	pálido.		
Granos de polen	Esféricos, periporados, suprareticulados, diámetro de 34 a 40 μm , 10 o más poros distribuidos homogéneamente sobre la superficie.	Periporados, hexagonales, +- 4 μm , 15 poros.	Poliédricos, periporados, suprareticulados, semitectados, de 174 a 160 μm de diámetro, 12 a 13 poros.	Periporados, esféricos, suprareticulados de 44 μm de diámetro, con más de 18 poros, retículos con muros gruesos, lisos de 6 a 4 μm de espesor.
Frutos	Globosos, 3 cm de diámetro aproximadamente, a veces elíptico umbilicado, verde amarillentos con manchas	Obovados, de 4 a 6 cm de diámetro, azul durazno a verde amarillento. Epidermis con aréolas circulares, cercanas y numerosas; sin	Elipsoides a piriformes, de 2.5 a 4 cm de largo y 1.5 a 2.5 cm de ancho, externamente verde purpúreo y pulpa rosa rojiza.	Globosas a piriformes, de 3.4 a 3.2 cm, verde amarillentos con tintes rojizos, internamente rojos, sin espinas, con

	color salmón al madurar.	cerdas o pelos, con fieltro blanco grisáceo y glóquidas amarillas.		35 aréolas ovadas, de 1.5 a 2 mm de diámetro, glóquidas blancas con el ápice castaño.
Semilla	Globosas, anguladas, de 2.5 a 3mm de diámetro; arilo lateral bien formado, angosto, hasta 90 en un solo fruto.	Elipsoides, arillo lateral ancho, taza de hilo lateral corta poco hundida, con tricomas en la superficie.	Discoides, 4 mm de largo, 3 de ancho y 2 de espesor, blanquecinos con tonos rosados.	Discoides, anguladas, folículos jugosos, embrión con dos cotiledones largos, acumbentes.
Distribución geográfica	Valle de México, Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala.	Durango, Hidalgo, Querétaro, Guanajuato, Jalisco, San Luis potosí, Tamaulipas, Zacatecas.	Distrito Federal, Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo, Querétaro, Guanajuato y Michoacán.	Distrito Federal, Guanajuato y Estado de México.
Usos	Como cerca, fruta comestible, cladodios como forraje.		Cladodios y frutos comestibles y medicinales.	

Cuadro 3. Descripción de las especies manipuladas. (Scheinvar, 2009).

IV. HIPÓTESIS

Mediante citometría de flujo, se han reportado los siguientes niveles de ploidía: *O. heliabravoana*, 2x; *O. leucontricha*, 4x; *Opuntia matudae*, 6x y *O. rzedowskii* 8x, por lo tanto, en un conteo cromosómico mediante cariotipos, el número de cromosomas de cada especie debe corresponder a estos mismos datos.

V. OBJETIVO GENERAL

Comparar el número cromosómico de células de *Opuntia matudae*, *O. heliabravoana*, *O. leucontricha* y *O. rzedowskii* mediante cariotipos determinado a través de conteos independientes.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la técnica de tinción de orceína y squash en *Allium* spp. (cebolla) y *Lens* spp. (lenteja).
- Seleccionar el protocolo de tinción más adecuado para aplicarlo sobre células de raíces de las especies *Opuntia matudae*, *O. heliabravoana*, *O. leucontricha* y *O. rzedowskii* y contar los cromosomas.
- Analizar y confrontar el número de cromosomas determinado en las cuatro especies de *Opuntia* de interés y en los conteos independientes respecto a lo reportados por otros autores.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizaron cariotipos y tinciones con dapi y orceína en *Allium* spp. y *Lens* spp., con protocolos diferentes para observar y contar sus cromosomas al microscopio, con la finalidad de conocer la técnica.

Posteriormente se trabajó con cuatro especies de *Opuntia* mantenidas bajo condiciones de invernadero del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, que fueron *Opuntia matudae*, *O. heliabravoana*, *O.*

leucotricha y *O. rzedowskii*, procedentes de la colección del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.2 MÉTODOS

7.3 Estandarización de los protocolos en células de cebolla y lenteja.

Para el estudio de cariotipo, se evaluaron dos protocolos, los cuales hacen uso de sustancias en su mayoría diferentes, pero con el mismo fin. Éstos fueron evaluados primero con *Allium* spp. y *Lens* spp. con el fin de estandarizar la metodología, ya que estas plantas presentan cromosomas grandes y claramente visibles con 100X al microscopio óptico. Posteriormente, una vez estandarizada la metodología, ésta fue aplicada en los ápices radiculares de las especies *Opuntia mutudae*, *O. heliabravoana*, *O. leucotricha* y *O. rzedowskii*.

7.4 Protocolo Majure (2012b): Se tomaron alrededor de 20 raíces de cada especie (*Allium* spp. y *Lens* spp.), incluyendo las muestras de *Opuntia* spp. Se cortaron los meristemos radiculares de 2 cm de longitud; éstas fueron colocadas en una solución de 2mM de 8-hidroxiquinoleína durante 8 horas a 5 °C y se fijaron en una solución de etanol absoluto: ácido acético glacial 3:1, las proporciones utilizadas fueron de 80 mL (60 mL de etanol y 20 mL de ácido acético) durante 24 horas. Posteriormente, los meristemos fueron transferidos a etanol 70% para su almacenamiento; donde después de 2 horas fue posible continuar con el proceso. Posteriormente los meristemos se transfirieron a ácido clorhídrico 36.5 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para el squash respectivo, se colocaron tres muestras de raíces por cada portaobjetos cuidando que solo quedaran colocados los meristemos libres de raíz madura; se le aplicó orceína disuelta en ácido acético al 10% manteniéndose por 10 minutos, y se procedió a hacer el aplastado, colocando el cubreobjetos y presionando con los dedos, para disgregar las células de la masa meristemática. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico Velab modelo VE-B6 a una resolución de 100x.

7.5 Protocolo García (1990): Las muestras de raíz nuevamente de las especies referidas antes, fueron colocadas en agua fría, a una temperatura que osciló entre 0 °C y 5 °C durante 24 horas. Posteriormente se fijaron en una mezcla Carnoy (alcohol 60 %, ácido acético glacial 10%, cloroformo 30%) durante 24 horas a temperatura ambiente y se conservaron en etanol 70% de 2 a 4 semanas en frío (0 °C-5 °C). En la primeras 2 semanas se realizó la primer observación al microscopio, así que se les aplicó HCl 5N a temperatura ambiente por 10 minutos, sumergiéndose después en agua para detener la actividad hidrolítica del ácido y proceder a realizar la tinción. Para la tinción, en un vidrio de reloj se colocaron los meristemas de las raíces, y se le aplicó orceína sobre el portaobjetos durante 10 minutos, después se realizó el squash, presionando con fuerza suficiente en los dedos de tal manera que no se rompiera el cubreobjetos. Por último se realizaron las observaciones en el mismo microscopio óptico referido (Velab modelo VE-B6 a una resolución de 100x).

En ambos protocolos también se hicieron tinciones con dapi, para realizar las observaciones en un microscopio de fluorescencia.

VIII. RESULTADOS

8.1 Visualización de cromosomas de cebolla y lenteja:

A continuación se presentan los resultados obtenidos con los protocolos de Majure (2012b) y García, (1990) utilizados y teñidos con orceina.

Protocolo de Majure (2012). En ninguna de las dos especies (*Allium* spp. y *Lens* spp) se obtuvieron resultados favorables con este protocolo, solo se logró apreciar células con núcleos teñidos, pero no se visualizaron cromosomas distinguibles, tal como se muestra en las fotografías siguientes (Figura 2, 3, y 4):

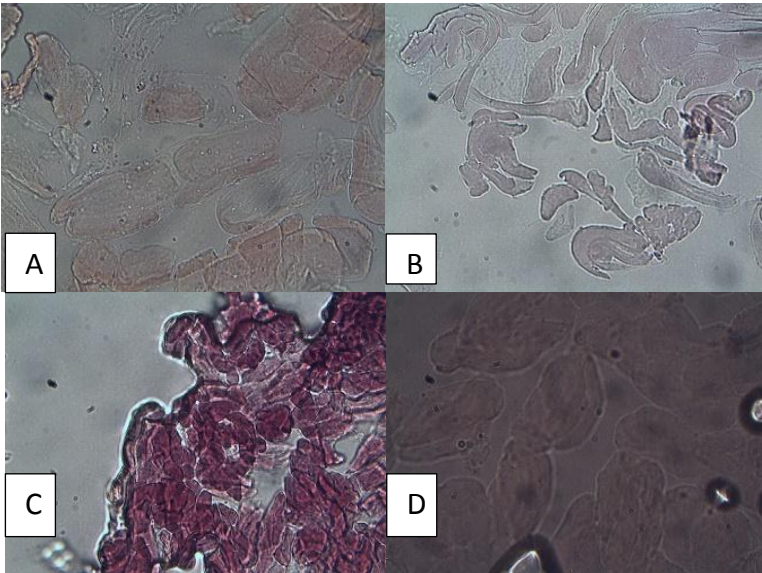


Fig.2. Imágenes de *Allium* spp. y *Lens* spp. en donde no se observan células ni cromosomas con el protocolo de Majure (2012b). A y B *Allium* spp. C y D *Lens* spp.

A diferencia de Majure (2012b), con el protocolo de García (1990) las observaciones fueron muy claras, permitiendo distinguir el número de cromosomas de las especies trabajadas:

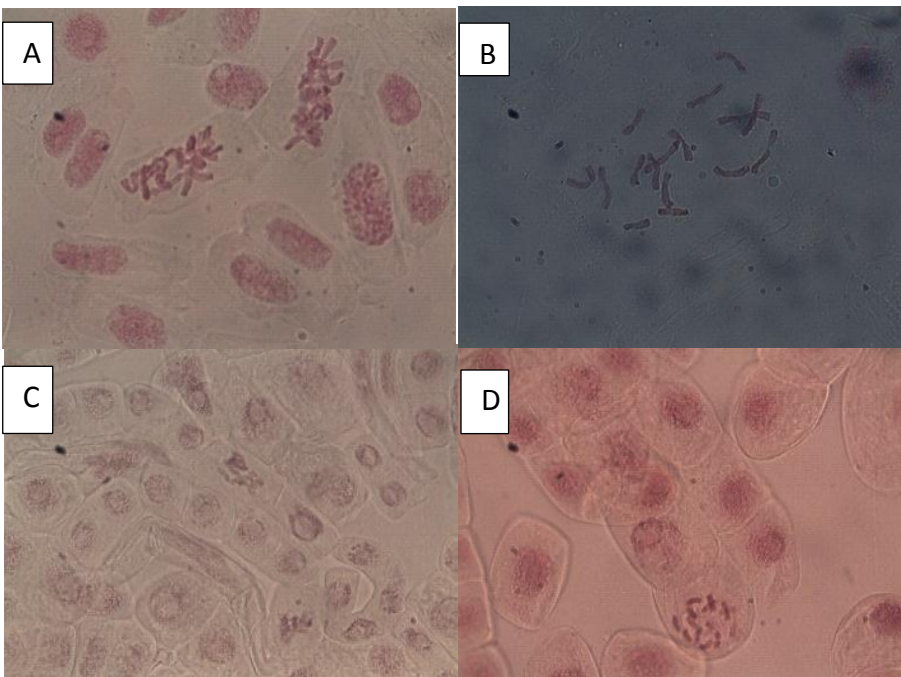


Fig.3. Imágenes de *Allium* spp. y *Lens* spp. en donde se pueden observar cromosomas, aplicando el protocolo de García (1990). A y B *Allium* spp. C y D *Lens* spp. Amplitud (100 X)

Protocolos de Majure (2012b) y García, (1990) teñidos con dapi:

Las tinciones con dapi no fueron muy claras en ambos protocolos (Majure, 2012b y García, 1990). Aunque a diferencia de Majure (2012b), el protocolo de García (1990) sí permitió observar cromosomas, sin embargo los contornos no fueron definidos, lo que dificultó diferenciarlos y poder realizar un conteo:

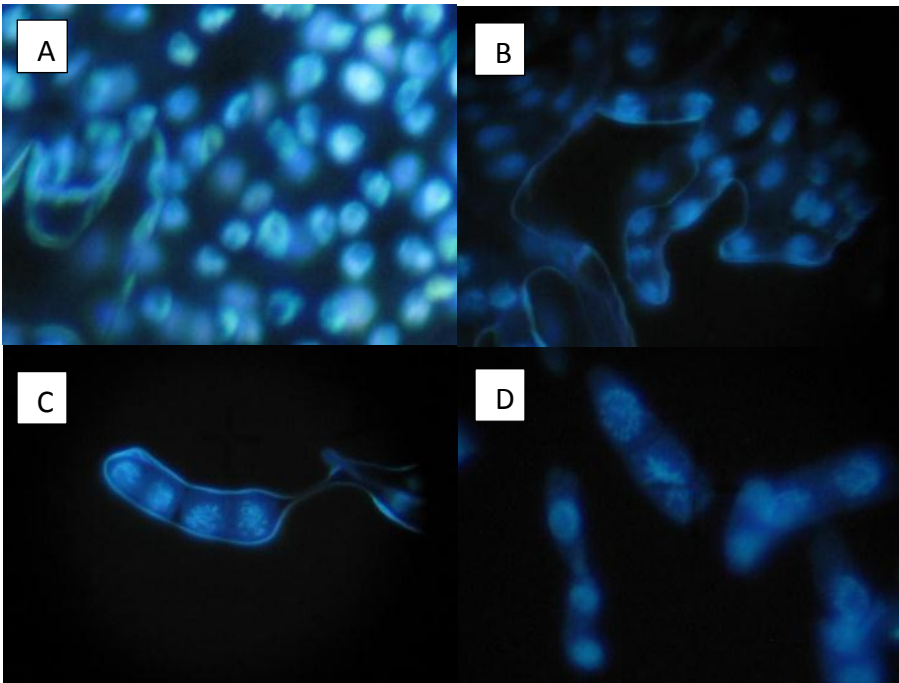


Fig.4. Imágenes de A) *Allium* spp. y B) *Lens* spp.en con Majure (2012b) y C) *Allium* spp. D) *Lens* spp. Resueltas con el protocolo de García (1990). En ambos protocolos las tinciones se realizaron con dapi. Amplitud (100 X)

8.1 Visualización de cromosomas en *Opuntia* con la metodología de García (1990).

Los resultados de *Opuntia* spp. mediante la metodología de García (1990) y teñidas con orceína, permitieron observar los cromosomas, aunque aún no definidos, como se ilustra en la Figura 4. Por tal razón, dichos cromosomas no fueron contabilizados y se procedió a realizar otras observaciones.

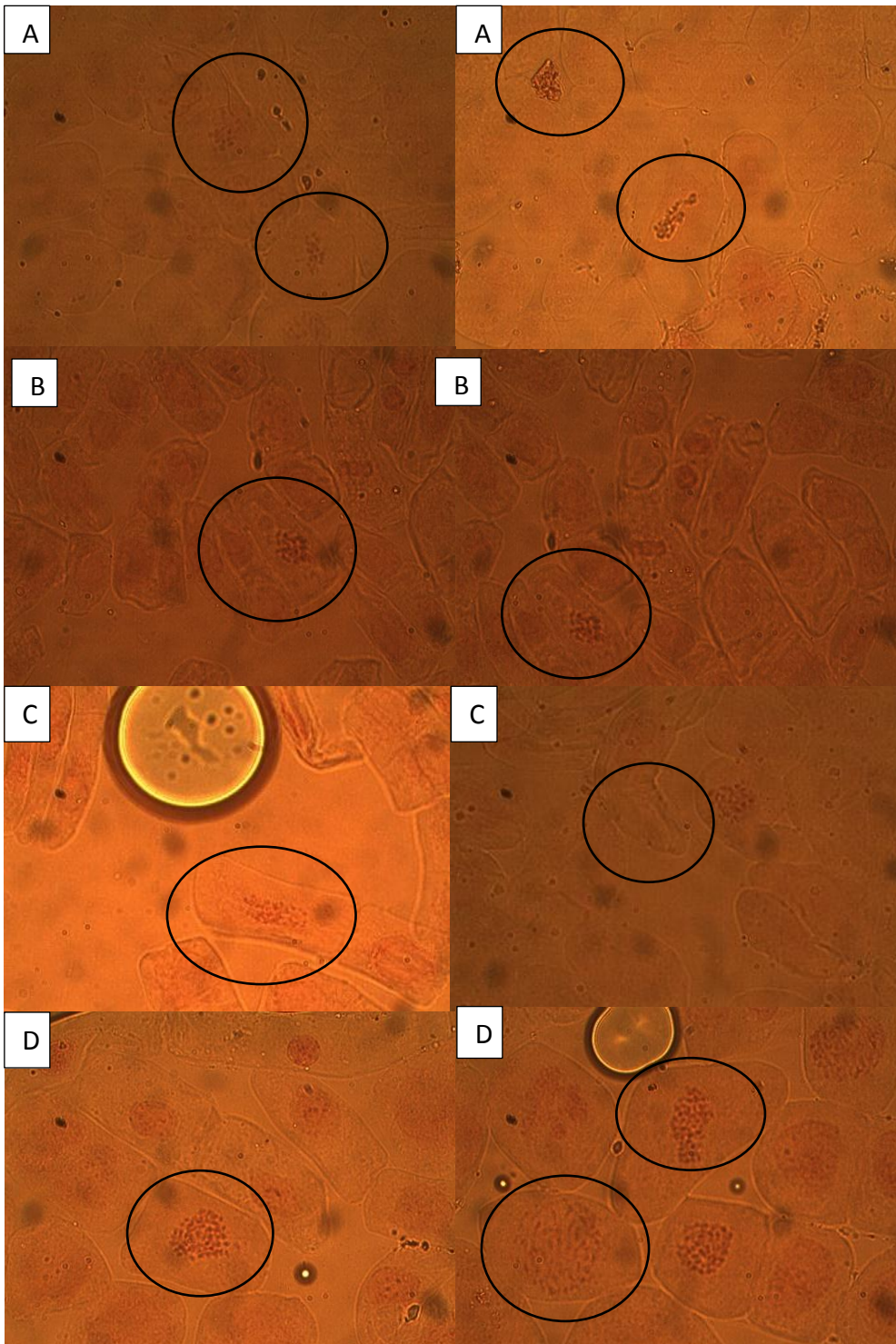


Fig.4. A) *Opuntia heliabravoana* B) *Opuntia leucotricha* C) *Opuntia matudae* D) *Opuntia rzedowskii*, tratadas bajo el protocolo de García (1990) y teñidas con orceina. Amplitud (100 X).

8.2 Primera evaluación en opuntia:

En la segunda evaluación con el protocolo de García (1990), se lograron distinguir los cromosomas con mayor claridad en las preparaciones realizadas. El número de cromosomas no fue constante en cada una de las células observadas de las diferentes especies de *Opuntia*, aun cuando se realizaron al menos 100 observaciones en cada especie. Este resultado se debió probablemente a que los cromosomas de *Opuntia* son muy pequeños y difíciles de observar comparados con los de lenteja y cebolla (especies utilizadas para la estandarización de los protocolos). Otra posibilidad respecto a la falta de resolución pudo deberse a que el aplastado o “squash” del tejido no fue suficiente.

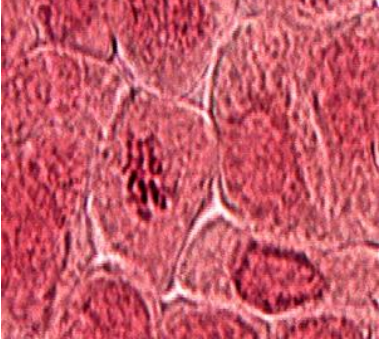
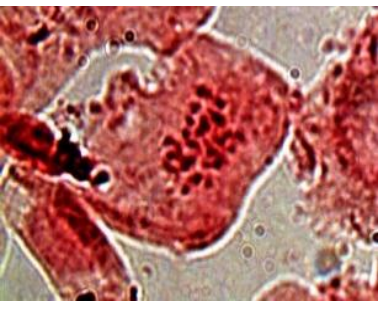

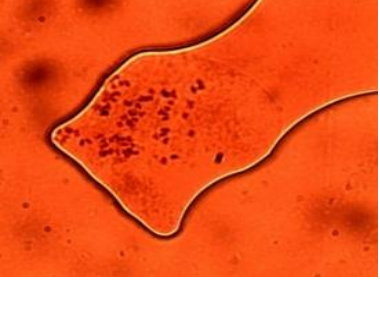
En el Cuadro 3 se resume el número de células y conteo de cromosomas visualizados en la primera observación realizada para los representantes de las cuatro especies de *Opuntia* spp.

Cuadro 3. Número de cromosomas visualizados en 30 células de *Opuntia mutudae*, *O. heliabravoana*, *O. leucotricha* y *O. rzedowskii* evaluadas durante el primer experimento.

	<i>O. heliabravoana</i> (2n=22)		<i>O. leucotricha</i> (2n=44)		<i>O. matudae</i> (2n=66)		<i>O. rzedowskii</i> (2n=88)	
	No. de células	No. de cromosomas visualizado	No. de células	No. de cromosomas visualizado	No. de células	No. de cromosomas visualizado	No. de células	No. de cromosomas visualizado
	1	10	2	19	2	27	2	32
	4	11	6	20	1	28	4	34
	4	12	6	21	4	30	5	36
	5	13	4	22	3	31	4	38
	5	14	5	23	5	32	4	40
	3	15	4	25	1	33	5	42
	6	16	3	25	3	34	1	44
	2	20			3	35	1	48
					1	36	3	50
					3	37	1	64
					1	39		
					1	40		
					1	41		
					2	42		
Total de células observadas	30		30		30		30	
Número de cromosomas contados por especie		13.9		22.0		34.8		40.26

En el siguiente Cuadro se muestran datos comparativos entre el número de cromosomas reportado y el número de cromosomas observado (media) en cada especie de *Opuntia*.

Cuadro 4. Comparación del número de cromosomas de *Opuntia matudae*, *O. heliabravoana*, *O. leucotricha* y *O. rzedowskii* observados a 100 X en 30 células independientes durante la primera observación respecto los valores reportados por Segura *et al.* (2007)

Especie	No. de cromosomas reportado por Segura <i>et al.</i> (2007)	Promedio del numero de cromosomas en 30 células evaluadas	Fotografía
<i>Opuntia heliabravoana</i>	22 (2X)	13.9	
<i>O. leucotricha</i>	44 (4X)	22.0	
<i>O. matudae</i>	66 (6X)	34.8	
<i>O. rzedowskii</i>	88 (8X)	35.76	

8.3 Segunda evaluación en Opuntia:

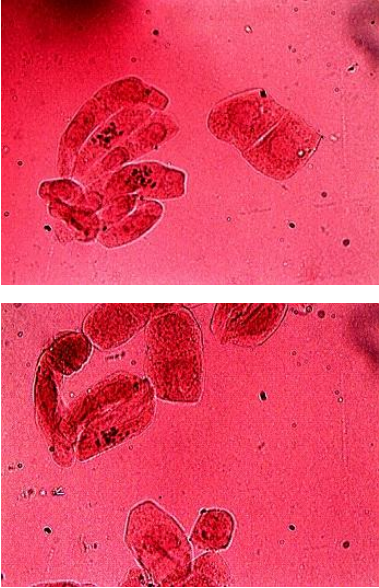
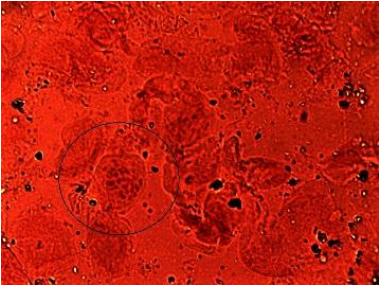
Los resultados obtenidos en la segunda evaluación se muestran el siguiente Cuadro 5. El número de cromosomas también varió para cada especie; y al igual que en la primera evaluación, nuestros datos no corresponden con aquellos reportados en la literatura.

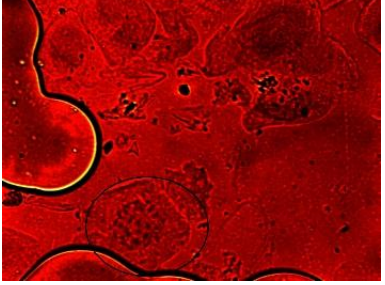
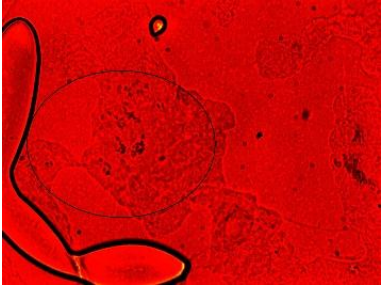
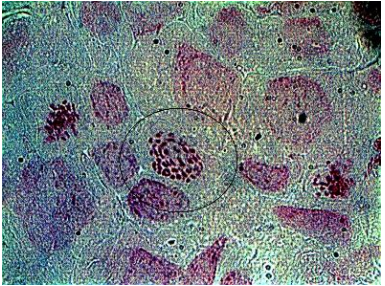
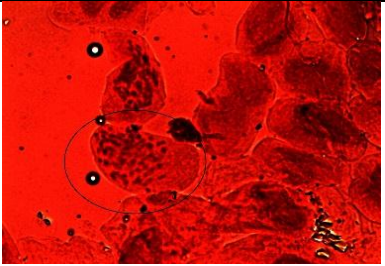
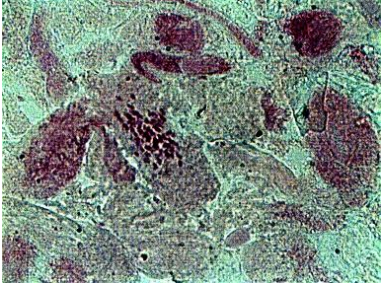
Cuadro 5. Número de cromosomas observados a 100 X en 70 células independientes de *Opuntia mutudae*, *O. heliabravoana*, *O. leucotricha* y *O. rzedowskii*.

	<i>O. heliabravoana</i> (2n=22)		<i>O. leucotricha</i> (2n=44)		<i>O. mutudae</i> (2n=66)		<i>O. rzedowskii</i> (2n=88)	
	No. de células	No. de Cromosomas visualizados	No. de células	No. de cromosomas visualizado	No. de células	No. de cromosomas visualizado	No. de células	No. de cromosomas visualizado
	1	9	1	14	1	23	2	30
	11	10	1	15	2	25	6	36
	24	11	2	16	3	26	1	37
	12	12	4	17	3	27	5	38
	8	13	10	18	5	28	2	39
	8	14	6	19	9	29	7	40
	4	15	6	20	4	30	3	41
	2	16	17	21	4	31	10	42
			12	22	6	32	14	43
			9	23	5	33	7	44
			1	24	4	34	6	45
			1	28	2	35	3	46
					2	36	1	48
					3	37	1	51
					2	38	1	54
					1	39	1	56
					2	40		
					1	41		
					4	42		
					1	43		
					2	46		
					1	49		
					1	51		
					1	52		
Total de células observadas	70		70		70		70	
Número de cromosomas contados por especie		11.9		20.32		33.64		41.1

En el siguiente cuadro se compara nuevamente el número de cromosomas previamente reportados y su técnica así como fotografías que muestran la evidencia de los resultados.

Cuadro 6. Comparación del número de cromosomas de *Opuntia mutudae*, *O. heliabravoana*, *O. leucotricha* y *O. rzedowskii* observados a 100 X en 70 células independientes durante la segunda evaluación respecto los valores reportados por Segura *et al.* (2007).

Especie	No. de cromosomas reportado por Segura <i>et al.</i> (2007)	No. de cromosomas observado en promedio	Fotografía
<i>Opuntia heliabravoana</i>	22 (2X)	11.9	
<i>O. leucotricha</i>	44 (4X)	20.32	

			
<i>O. matudae</i>	66 (6X)	33.64	 
<i>O. rzedowskii</i>	88 (8X)	41.1	 

A continuación se presenta el Cuadro 7, que contiene el total de datos obtenidos en el primer y segundo conteo de cromosomas de las 4 especies de *Opuntia*. Los promedios calculados nos permitieron estimar que en ambos resultados los cromosomas de cada especie están en un rango diferente al reportado, es decir, se observaron prácticamente a la mitad de lo esperado.

Cuadro 7. Datos finales del conteo cromosómico en cien células observadas.

	<i>O. heliabravoana</i> 22 (2X)		<i>O. leucotricha</i> 44 (4X)		<i>O. matudae</i> 66 (6X)		<i>O. rzedowskii</i> 88 (8X)	
	No. de células	No. de cromosomas	No. de células	No. de cromosomas	No. de células	No. de cromosomas	No. de células	No. de cromosomas
	1	9	1	14	1	23	1	29
	12	10	1	15	2	25	2	30
	28	11	2	16	3	26	2	32
	16	12	4	17	5	27	4	34
	13	13	10	18	6	28	11	36
	13	14	8	19	9	29	1	37
	7	15	12	20	8	30	9	38
	8	16	23	21	7	31	2	39
	2	20	16	22	11	32	11	40
			14	23	6	33	3	41
			1	24	7	34	15	42
			7	25	5	35	14	43
			1	28	3	36	8	44
					6	37	6	45
					2	38	3	46
					2	39	2	48
					3	40	3	50
					2	41	1	51
					6	42	1	54

					1	43	1	56
					2	46		
					1	49		
					1	51		
					1	52		
Número de células	100		100		100		100	
Número de cromosomas contados por especie		12.9		21.16		34.22		40.68

IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizaron las metodologías descritas por Majure (2012b) y García (1990). El método que resultó más funcional para nuestro caso y para nuestras condiciones de trabajo, fue el reportado por García (1990) debido a que con éste fue posible observar las células y visualizar los cromosomas de cebolla y lenteja. Para el caso de las 4 especies de *Opuntia* consideradas en el presente estudio, también fue posible lo anterior, e incluso, realizar un conteo de los cromosomas visibles de cada especie de *Opuntia*.

Majure (2012) utilizó su metodología en *Opuntia* sp; sin embargo, en nuestro caso no funcionó probablemente por dos razones: el autor utilizó HCl 40% que nosotros sustituimos por HCl 36.5%; además, utilizó óxido nítrico (N₂O) en lugar de 2-mM 8-hydroxyquinoleina. Estos productos empleados por Majure (2012b) no fue posible conseguirlos en México, por esa razón se sustituyeron.

Por otra parte y de acuerdo a los resultados finales de los dos conteos de cromosomas en las cuatro especies de *Opuntia* (30 y 70 células), se pudo apreciar que el número de cromosomas reportado por Segura, *et al.* (2009) mediante citometría de flujo, difieren manera significativa con los resultados obtenidos en el

presente trabajo; ya que de manera general, el número de cromosomas encontrado fue prácticamente 50% menor que el reportado en las cuatro especies analizadas, *O. heliabravoana* (22), *O. leucotricha* (44), *O. matudae* (66) y *O. rzedowskii* (88). Estas diferencias pueden deberse a lo siguiente: (1) que los cromosomas de *Opuntia* que son de tamaño muy pequeño y generalmente se observan de forma redondeada, pueden confundir su conteo, para lo cual es recomendable utilizar otro tipo de microscopio más potente; este resultado concuerda con lo reportado por Palomino (2001) donde presenta cromosoma de *Opuntia spp.* en un rango de 1.07-2.50 μm en su forma mas pequeña. (2) Debido a la forma en que se visualizan los cromosomas fue difícil definir la posición de su centrómero; razón por la cual no fue posible distinguir entre un cromosoma de doble cromátida respecto a un cromosoma con cromátida sencilla y (3) que la técnica de aplastado (squash) normalmente empleada para este tipo de estudios, requiriera realizarse de diferente manera y con más presión para poder extender este tipo de cromosomas pequeños, y por lo tanto, poder visualizarlos mejor.

X. CONCLUSIONES

Con la metodología y el microscopio utilizado fue posible observar y contar los cromosomas de cebolla y lenteja (*Allium spp* y *Lens spp*).

Con la metodología empleada fue posible observar células de raíces de nopal; así como observar y contar cromosomas.

El número promedio de los cromosomas contados de las cuatro especies de *Opuntia* no correspondió con lo reportado en la literatura.

El número promedio de cromosomas contados fue para *Opuntia heliabravoana* 12.9; *O. leucotricha* 21.16; *O. matudae* 34.22 y *O. rzedowskii* 40.68.

XI. PERSPECTIVAS

A manera de sugerencia en posteriores trabajos relacionados al presente estudio y con *Opuntia*, se podría considerar lo siguiente:

1. Utilizar un microscopio más adecuado que nos permite observar de mejor manera los cromosomas pequeños, propios del género *Opuntia*.
2. Tratar de optimizar la técnica de “squash o aplastado” para lograr extender plenamente a los cromosomas hasta tener el resultado adecuado.
3. Utilizar otras estructuras como por ejemplo granos de polen u óvulos, para hacer el conteo de cromosomas, lo cual nos dará el valor haploide de cada una de las especies de interés.
4. Utilizar embriones recién germinados a partir de semillas de *Opuntia*.
5. Nosotros utilizamos raíces nuevas y jóvenes para hacer los conteos. Se sugiere también considerar nuevamente esta estructura porque prácticamente carece de polisacáridos que interfieren en una buena observación de los cromosomas; metabolito que es muy abundante en cualquier especie o tipo de *Opuntia*. Quizá esta contaminación pudo haber afectado la estimación del número de cromosomas determinado por citometría de flujo.

El hecho de no tener una resolución apropiada para observar y contar los cromosomas de *Opuntia* sp., influyó probablemente en errores de interpretación. También el hecho de que las células fueron contadas inevitablemente en distintas fases de su ciclo celular pudo haber influido en el resultado final. Pero en cualquier caso, el número de cromosomas de las especies *Opuntia heliabravoana*, *O. leucotricha*, *O. matudae* y *O. rzedowskii* no se encuentra en el rango del número reportado por Segura, et al. 2009.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, E. F. (2001). The cactus family. Timber. Portland, OR, EEUU. 776 pp
- Bravo, H. H. y Sánchez H. R. (1978). Las cactáceas de México. Volumen I. 2ª edición. Universidad Nacional Autónoma de México. 743 p.
- Barrientos, F. P. (1965). El Nopal y su utilización en México. Programa de Mejoramiento de Nopal. Colegio, de Post-Graduados. E. N. A., Chapingo. México.
- Cota, S. (2008). Evolución de las cactáceas en la región del Golfo de California, México. En Estudios de las Islas del Golfo de California. Flores-Campaña, L.M. (Editor.) Universidad Autónoma de Sinaloa, Gobierno de Sinaloa y CONACYT, México. pp. 67-79.
- Biggs, A., Hains, W. C., Holliday, W. G. Kapicka, C. L., Lundgren, L., MacKenzie A. H., Rogers, W. D., Sewer, B., Zike D. (2012). Biología, Ciencias de Glencoe. 1220 pag. McGraw-Hill/Interamericana.
- García, Velázquez, A. (1990). *Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 144.
- Guerrero, A. (2012). Innova Biotec. Innova Bioetich, Revista Semestral del Instituto de inovacion en Biotecnología e Industria. ISSN 226-2490. pp 62.
- Guzmán, U., Arias, S. y Dávila, P. (2007). Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. México.
- Loureiro, J. (2009). Aplicación de la citometría de flujo en el Estudio del genoma vegetal Ecosistemas Revista Científica y Técnica de Ecología y Medioambiente. Ecosistemas 18 (2): 103-108.

Majure, Lucas C., (2012a). Chromosome counts of *Opuntia* (Cactáceae), prickly pear cacti, in the midwestern united states and environmental factors restricting the distribution of *Opuntia fragilis*. *Haseltonia* 17:58-65.

Majure, Lucas C., (2012b). Cytogeography of the *Humifusa* clade of *Opuntia* s. s. Mill. 1754 (Cactaceae, Opuntioideae, Opuntieae): correlations with pleistocene refugia and morphological traits in a polyploid complex. *Comp Cytogen* 6(1): 53-77.

Palomino, G. and Heras H. M. (2001). Karyotypic studies in *Opuntia cochinera*, *O. hyptiacantha*, and *O. strepthacantha* (Cactaceae). *54* (2): 147-154.

Pinkava, D. J. (2002). On the Evolution of the continental North American Opuntioideae. In: Hunt D, Taylor N (eds), *Studies in the Opuntioideae* (Cactacea). *Suculent Planta Research, Volume six*. Sherborne, England. pp 59-98.

Rebman, Jon P., Pinkava, D. J. (2001). *Opuntia* Cacti of North America-An Oreview. *Florida Entomologist* 84(4): 474:483.

Reyes, A. J. A. (2009). Catálogo de las principales variedades silvestres y cultivadas de *Opuntia* en la Antiplanicie Meridional de México. *Opuntia –Mexico-Identificación*. SAGARPA-CONACYT. 350 pag. San Luis potosí. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Ríos, R. J. y Quintana A. V. (2004). Manual del Participante, Manejo General del Cultivo del Nopal. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas México-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz-Córdoba. Colegio de Posgraduados. pp. 81.

Nelson & Cox. “Lehninger, Principios de Bioquímica” 3a ed. Ed Omega, 2000

Robles, A. y Julio E. (2009). “El Cultivo de Tuna” *Opuntia ficus indica*. Gerencia Regional Agraria La Libertad, Trujillo-Perú. 18p.

Saenz, C. (2006). Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO 162. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp 97.

Santiago, R. R. (2013). Comparación de perfiles de DNA de cuatro especies de *Opuntia* de diferente nivel de ploidía y su impacto en electroforesis. Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo..pp. 66.

Santos, R., Anna J., Muños Juan M., Albarrán Jordán A., Cruz J. (2006). El Nopal: su relación con los Mexicas, su importancia ecológica y su uso como medicina tradicional. División Académica de Ciencias Biológicas. Centro de Investigación y Posgrado. UJAT.

Scheinvar, L. (2011). Estado del conocimiento de las Especies del nopal (*Opuntia* spp.) Productoras de Xoconostles Silvestres y Cultivadas. Instituto de Biología, UNAM. CONABIO. pp. 34

Scheinvar L.; S. Filardo K.; G. Olalde P.; P. Zavaleta B. (2009). Diez especie mexicanas productoras de xoconostles: *Opuntia* spp. y *Cylindropuntia imbricata* (Cactaceae). Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Biología. México. Pp. 179 .

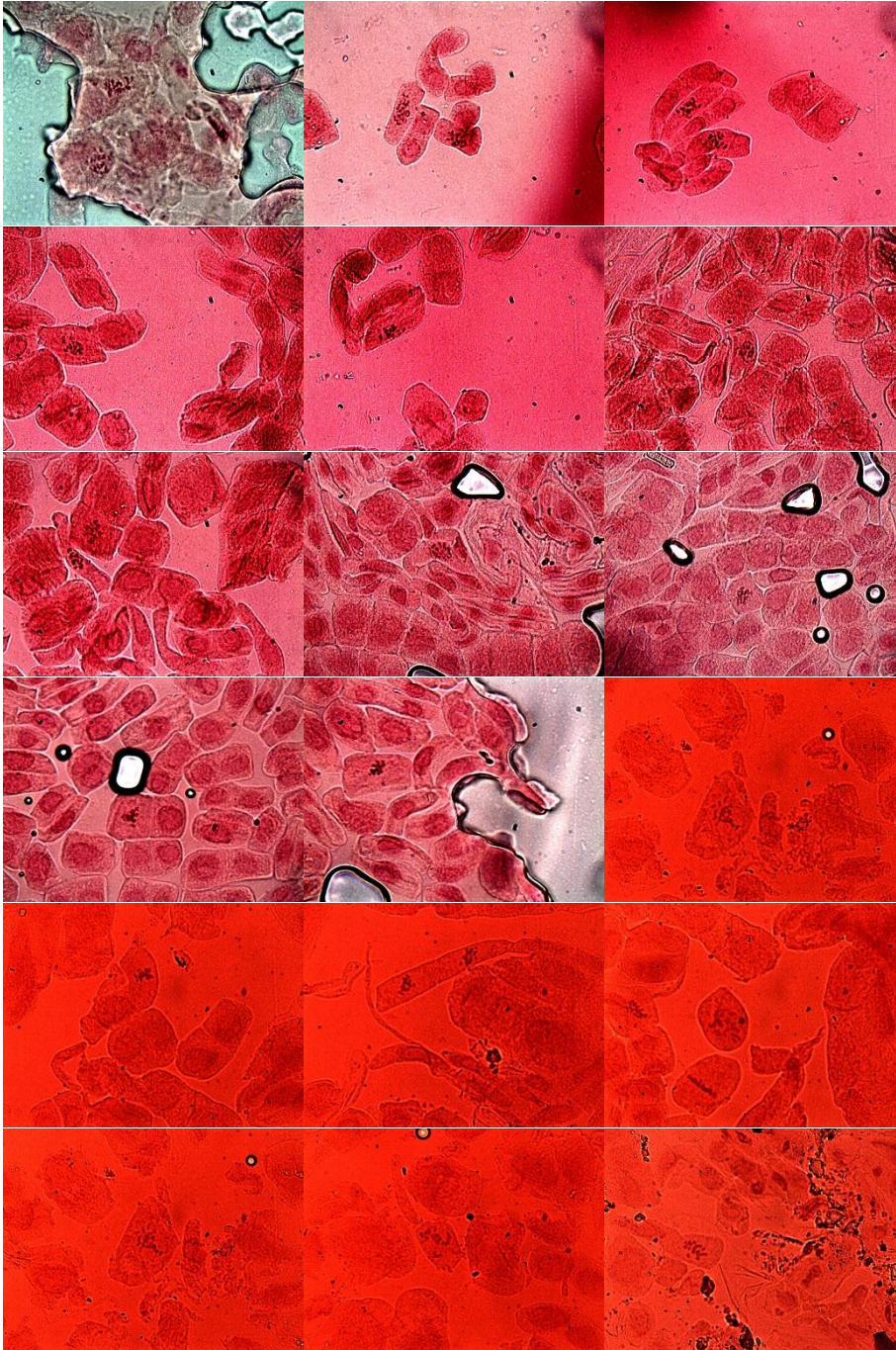
Segura, S.; L. Scheinvar; G. Olalde; O. Leblanc; S. Filardo; A. Muratalla; C. Gallegos; C. Flores. (2007). Genoma size and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucontrichae* DC., *Heliabravoanae* Scheinvar and *Robustae* Britton et Rose. *Genetic Resources and Crop Evolution* (2007) 54:1033-1041.

Vázquez, A. , C. Medina, M. José. (1981). El Nopal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Comisión Nacional de las Zonas Áridas (CONAZA).

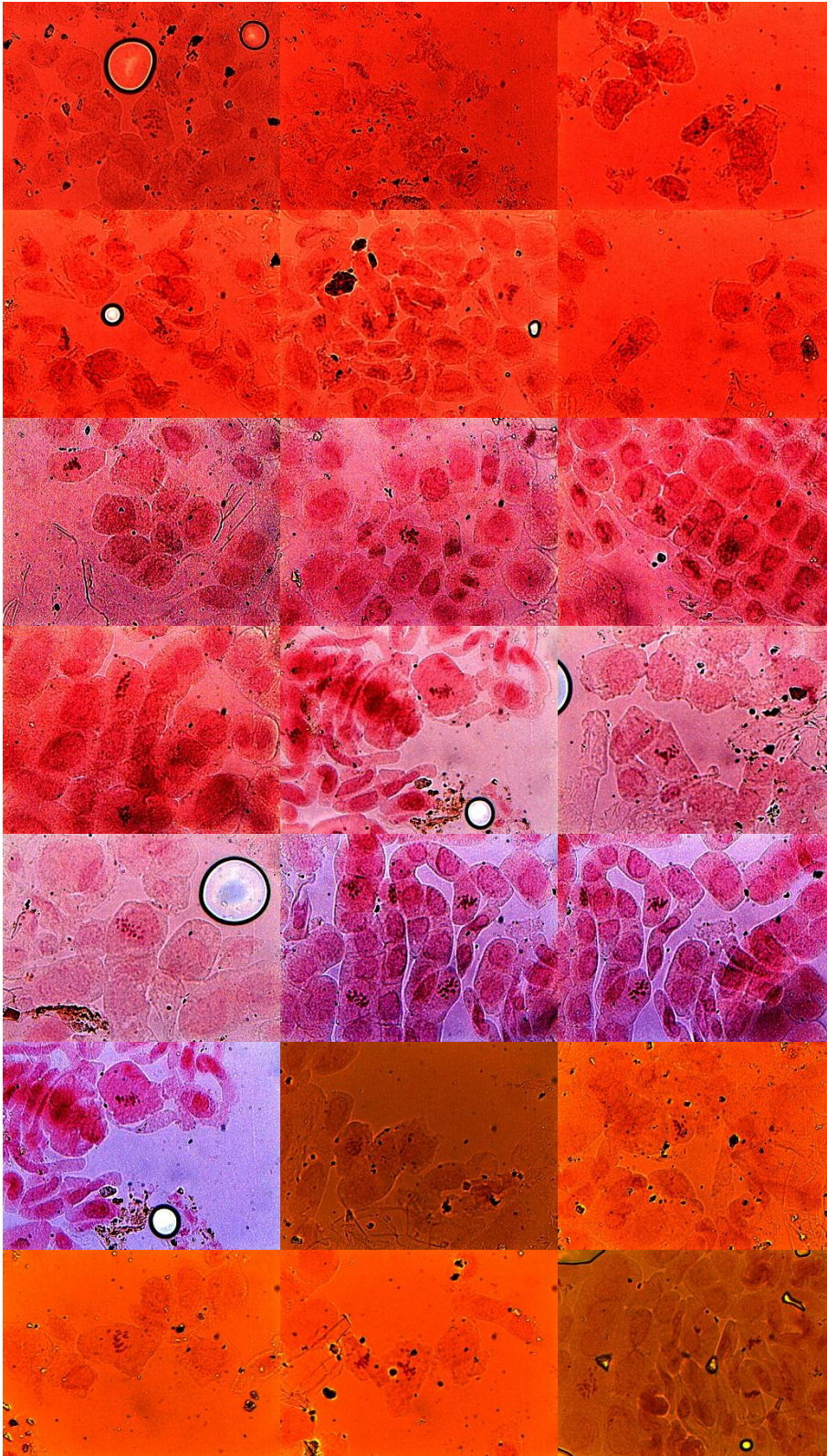
SARH. México.

XIII. ANEXOS

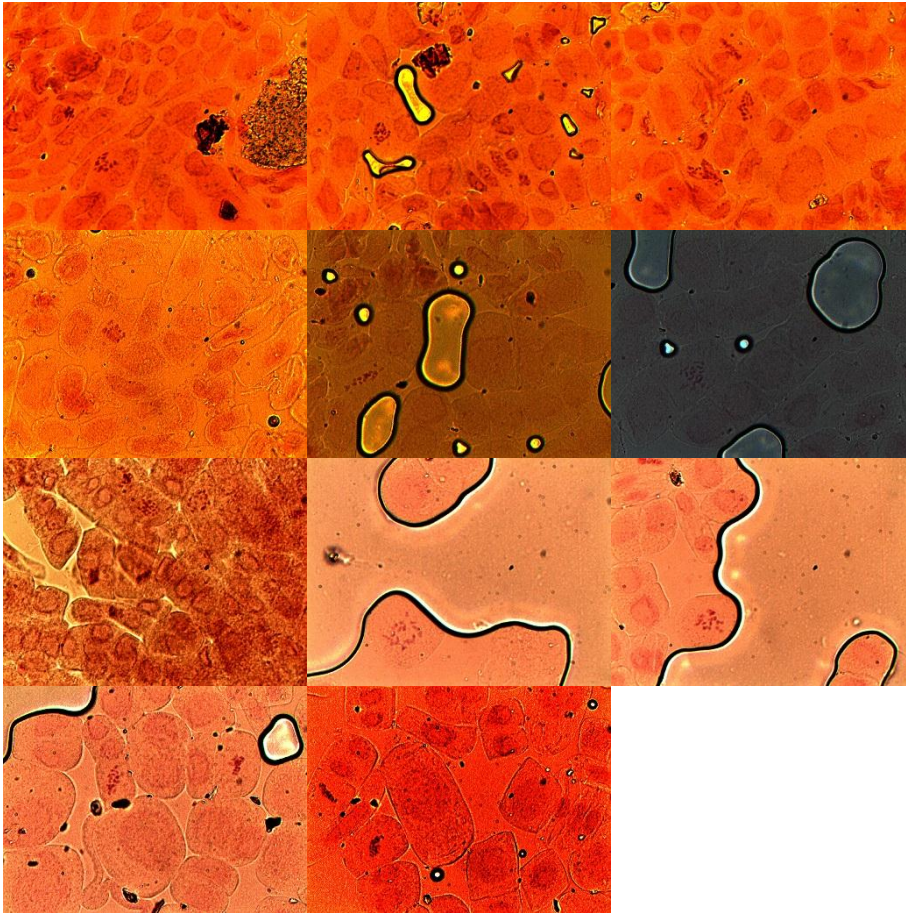
Opuntia heliabravoanas



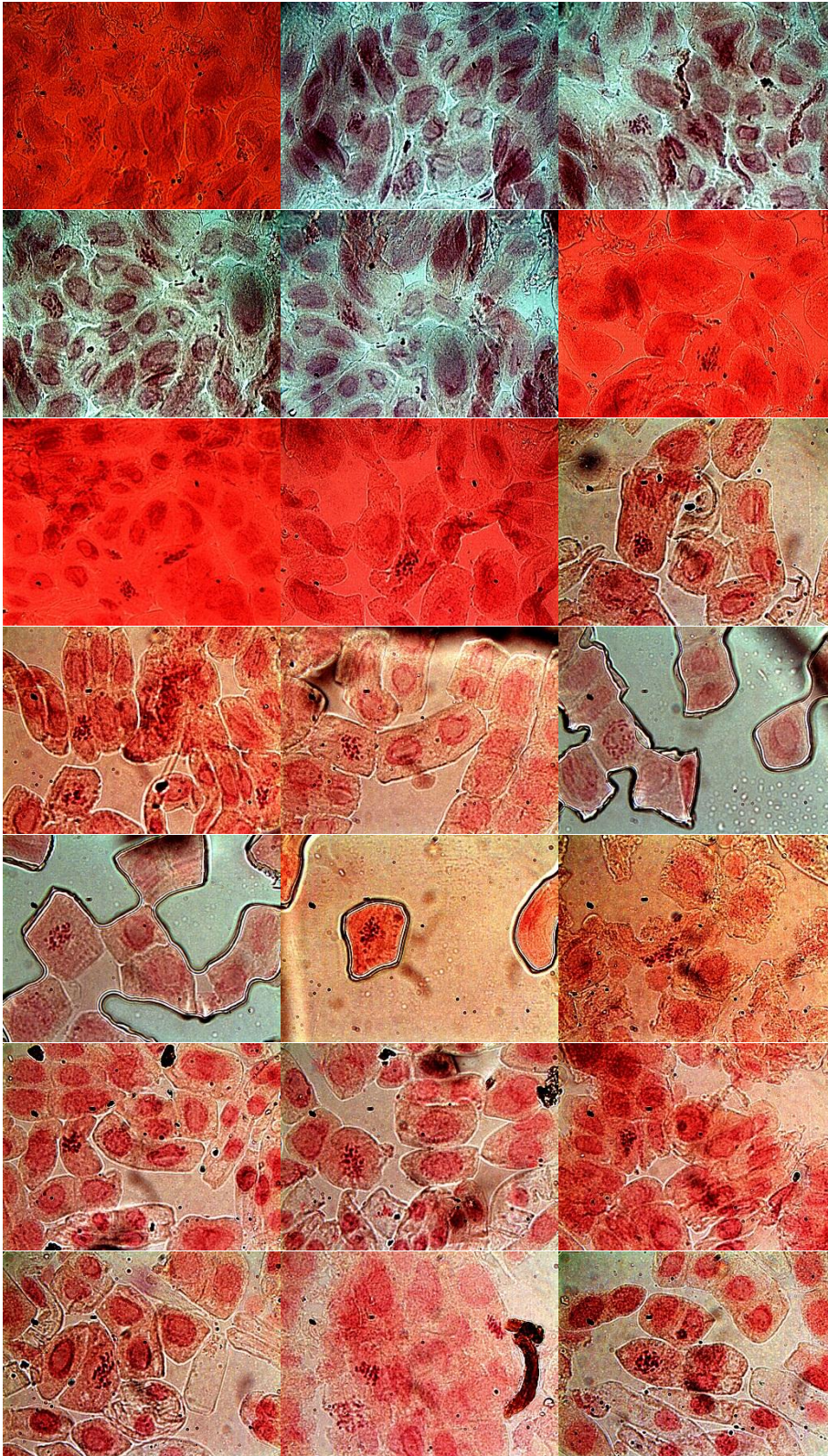
Opuntia heliabravoana



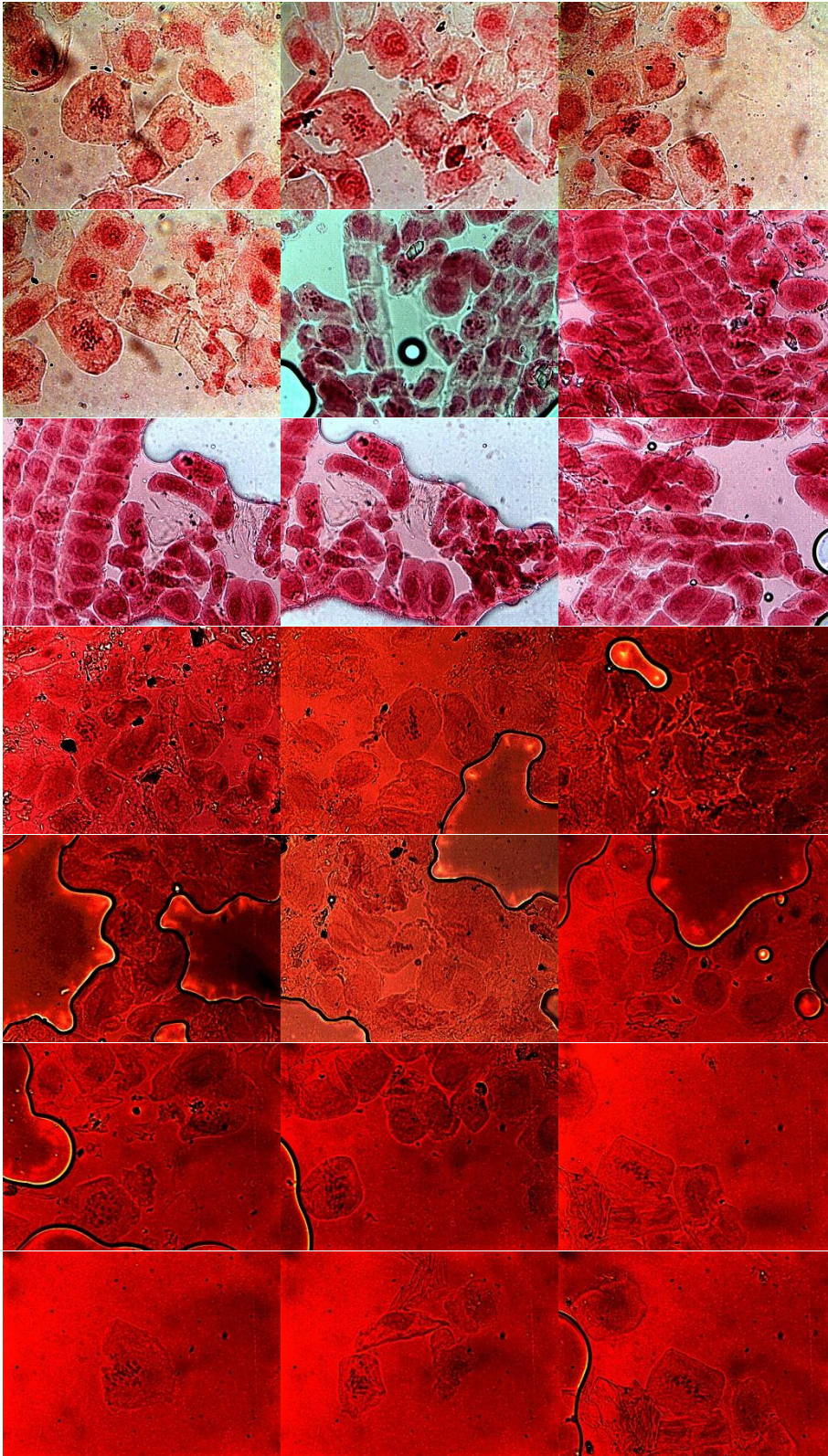
Opuntia heliabravoana



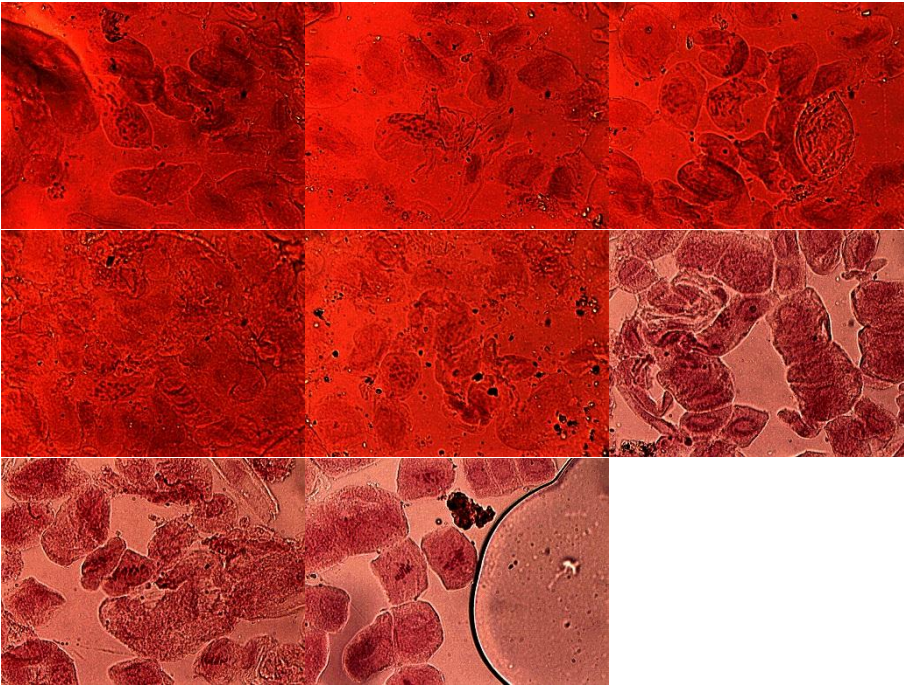
Opuntia leucotricha



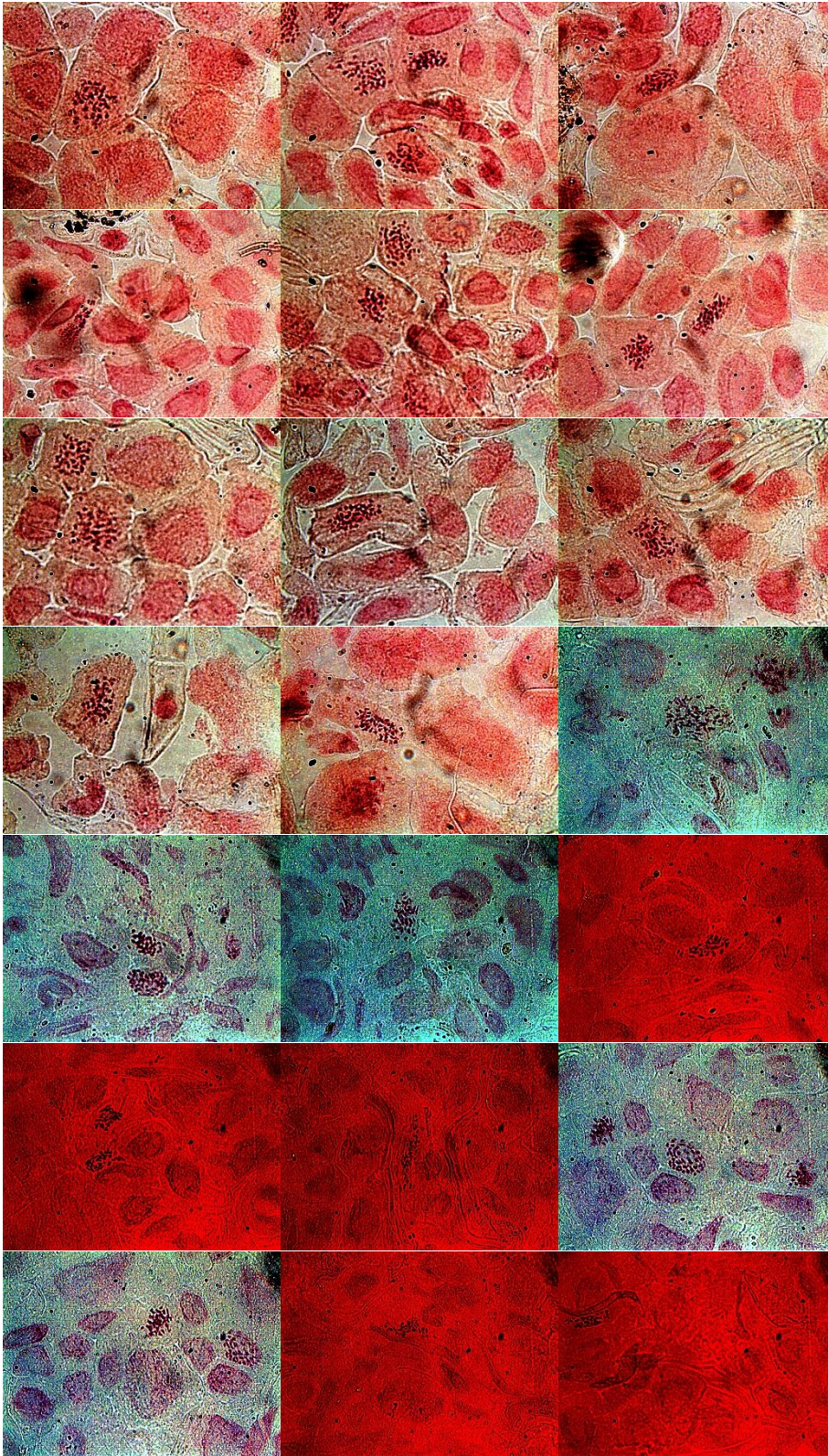
Opuntia leucotricha



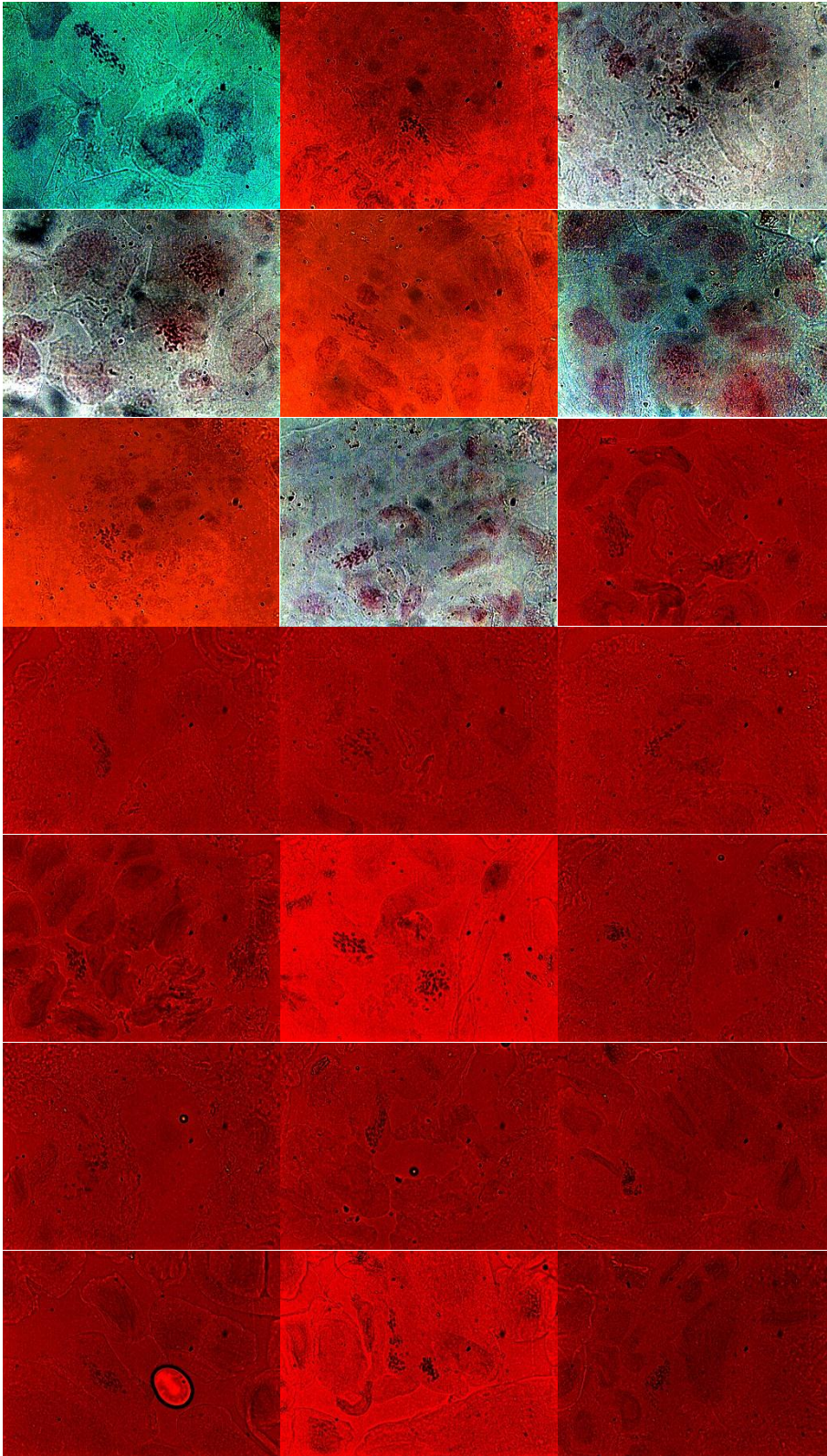
Opuntia leucotricha



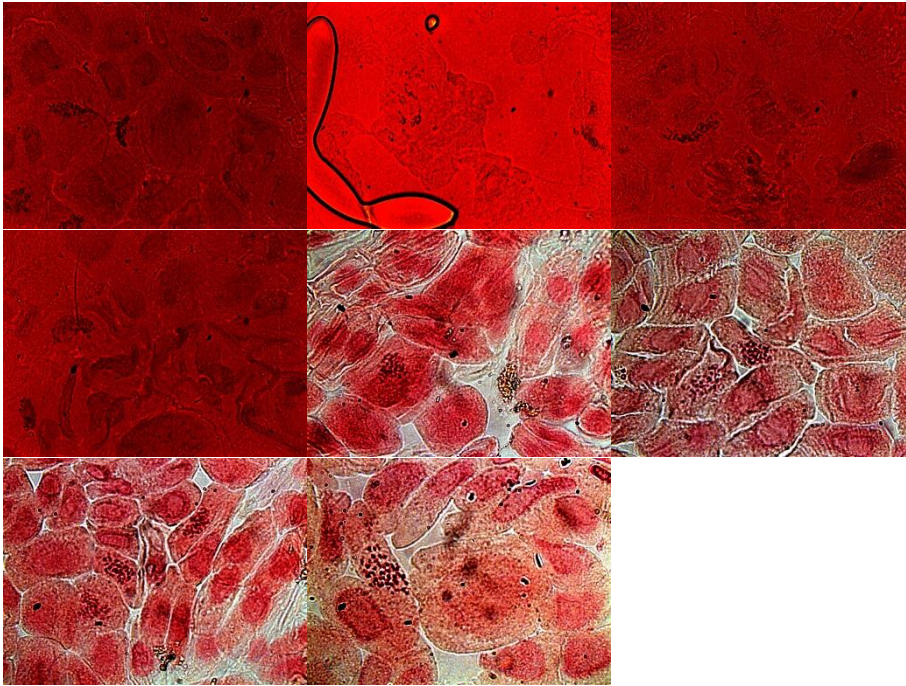
Opuntia matudae



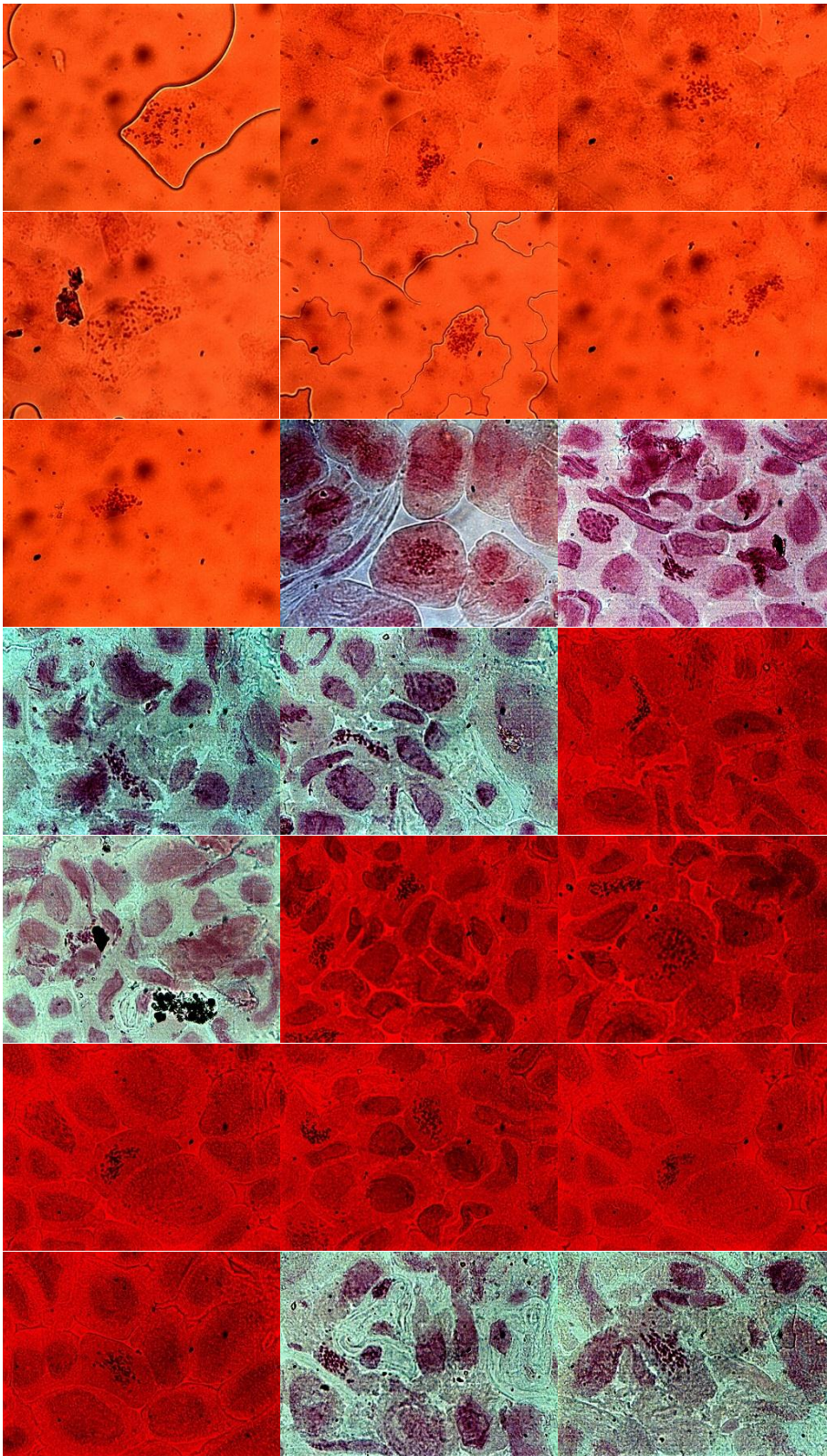
Opuntia matudae



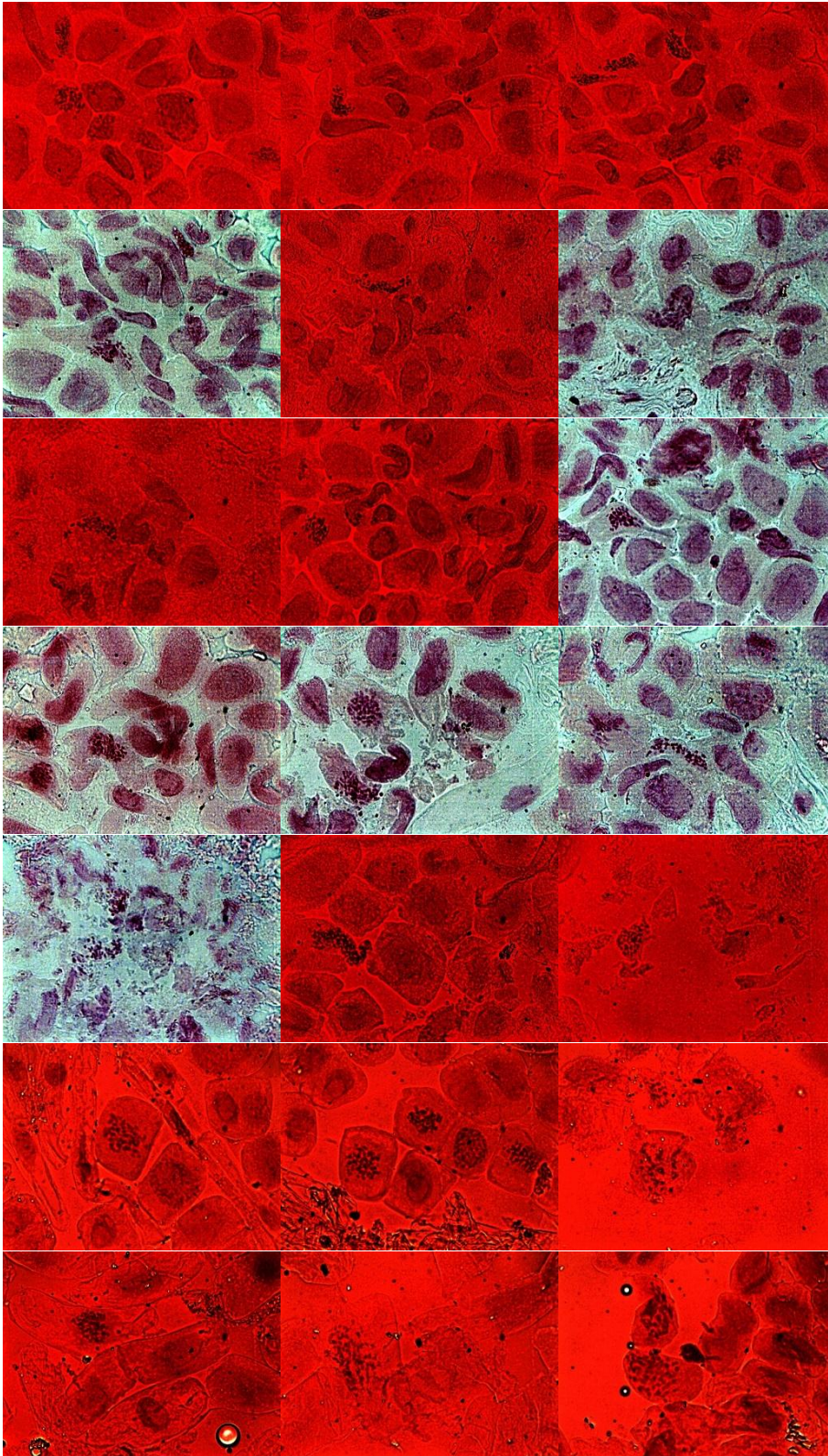
Opuntia matudae



Opuntia rzedowskii



Opuntia rzedowskii



Opuntia rzedowskii

