



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

**Temporalidad de fenofases y
micropropagación *in vitro* de tres especies
relictuales de *Magnolia* del Occidente de
México: implicaciones para su conservación
in situ y *ex situ***

Tesis

para adquirir el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Nelson Alex Dahua Machoa

Zapopan, Jalisco

Septiembre, 2018



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

**Temporalidad de fenofases y
micropropagación *in vitro* de tres especies
relictuales de *Magnolia* del Occidente de
México: implicaciones para su conservación
in situ y *ex situ***

**Tesis
para adquirir el grado de**

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Nelson Alex Dahua Machoa

Director: Dr. José Antonio Vázquez García

Asesores:

Dr. Miguel Ángel Muñiz Castro

Dr. Liberato Portillo Martínez

Dr. Gerardo Hernández Vera

Zapopan, Jalisco

Septiembre, 2018



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Temporalidad de fenofases y micropropagación *in vitro* de tres especies relictuales de *Magnolia* del Occidente de México: implicaciones para su conservación *in situ* y *ex situ*

Por

Nelson Alex Dahua Machoa

Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

Dr. José Antonio Vázquez García
Director de Tesis e integrante del jurado

Fecha

Dr. Miguel Ángel Muñiz Castro
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

Fecha

Dr. Liberato Portillo Martínez
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

Fecha

Dr. Gerardo Hernández Vera
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

Fecha

Dr. Eduardo Salcedo Pérez
Sinodal del Comité Particular e integrante del jurado

Fecha

DEDICATORIA

Al Dr. José Antonio Vázquez García, mi guía y formador académico.

A mis padres y hermanos, aunque lejos por amarme, estar conmigo y apoyarme siempre, lo cual me ha ayudado a salir adelante en momentos más difíciles.

Muy especial, a mi abuela Virginia Santi por sus enseñanzas, por fomentar y mi consejera de mi vida.

A mi tío Dionisio, tía María por dar ánimos y su apoyo incondicional en todo el momento.

Mi comunidad Sarayaku, por esa gente humilde, animando y dando fortaleza de buenos espíritus de la Selva (Sacha), Agua (Yaku), Tierra (Allpa) que es vivir en armonía (Sumak Kawsay).

Gracias doña Elena Gonzales y su familia por su apoyo incondicional en todo momento, muy motivadora.

Compañeros del CUCBA por ser mi animación en momentos de estrés y cansancio.

A mis amigos, por ser mi alegría.

RIMANAKUNA

Yachachik Dr. José Antonio Vázquez García, ñuka kikin yachayta shayachik, kay hatun yachana wasipi.

Ñuka yayakuna, pani, wawki, payna llakishkamanta, tukuy sami yuyapi, ñuka yachayta tukuchinkapak.

Ñuka llakishka apapama, Virginia Santi, kan kunashkata paktachishkani, sachá, yaku, paju tkuy runa yachaytas kunak apamama.

Ñuka hachy, mikia kankuna yanapashkamanta kwyntasha, yuyayta sinchiyachikapak.

Ñuka llakta Sarayaku, runakuna kankuna sinchichiyachishkamanta ñuka ñaypañama rinkapak, runa yavhayta, sachá yachayta katinkapak, ñukanchi kawasyta rikuchikapak.

Pakrachu mashi Elena Gonzales kampa ayllukunatas, kankuna yapashkamanta.

Ñuka jatun yachana wasipi mashigunata, parijulla katishkamanta kay sinchi yachayta hawapa apanakapa karan ichilla llaktakunapi.

AGRADECIMIENTOS

A la junta académica de Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas de la Universidad de Guadalajara-CUCBA, Zapopan, por contribuir a lograr la beca CONACYT (No. 103590) para mis estudios de Maestría. Al Dr. José Antonio Vázquez García, director de esta tesis, por sus invaluable enseñanzas, y en especial por apoyarme en todo momento. A los doctores (de comité tutorial y/o jurado) Miguel Muñiz, Gerardo Hernández, Liberato Portillo y Eduardo Salcedo por todo su apoyo y sus comentarios formativos que permitieron enriquecer el desarrollo de mi proyecto de tesis en sus distintas fases. A la Dra. Ana Lilia Viguera por su ayuda y asesorías en el laboratorio de cultivo *in vitro*. Un agradecimiento muy especial a Gregorio Nieves Hernández, Alex Zabalgoitia, Ana Nuño, Neill Gerlowski, Claudia Méndez, Luis Sánchez, Javier Rendón, Juvenal Parada, Cynthia Martínez y Carlos García, por su tiempo, asistencia y recomendaciones para el trabajo en campo. A Ralph Osborne, Neill Gerlowski, Weerakit Harnparinphan y Christina Martell por su, apoyo financiero y de logística. A quienes compartieron su conocimiento y experiencia: Reyna Domínguez, Sonia Navarro, Ricardo Guerrero. A quienes me brindaron apoyo para mi hospitalización: Patricia Zarazúa, Antonio Vázquez, Ralph Osborne y Carlos Béas; a los estudiantes y/o amigos solidarios que me hicieron compañía durante mi rehabilitación: Roberto, Liliana, Iliana, Francisco, Karina, Claudia, Norma, Lesli, Erika, Claudia, Fátima y Marco; y a todos quienes aportaron recursos para gastos médicos diversos, entre ellos: Laura Guzmán, Jacqueline Jesús Reynoso y Ofelia Vargas. A todas las personas que de alguna forma fueron pieza importante en mi vida dentro del posgrado.

PAKRACHUNY

Kay hatun yachayta katina Biosistemática en Recursos Naturales y Agrícolas, hatun yachana wasi Universidad de Guadalajara-CUCBA, Zapopan, kankuna shuk taktita yapashkamanta. Kay hatun kikin yachay pushak CONACYT kan anllashkamanta ñuka yachayta katinkapak. Kikin ñukata yachachik Dr. Antonio Vázquez, kan sinchi yuyayta ñukata tarpuchishkamanta. Shuk yachachikuna ñukata sinchiyachinkapak Dr. Miguel Muñiz, Dr. Gerardo Hernández, Dr. Liberato Portillo, Eduardo Salcedo kankunawas yapashkamanta, hatun kilkata shayachikapak. Chimanta y a la Dra. Ana Lilia kan yachayta kushakamanta amawllay ruraypi yanpashamanta, kan kikin sachay kunashkamanta. Pakrachuni ashkata kankuwas ñuka llankaypi yanapshakamanta, Alex Zabalgoitia, Ana Nuño, Neill Gerlowski, Claudia Méndez, Luis Sánchez, Javier Rendón, Juvenal Parada, Cynthia Martínez y Carlos García. Chaymanta puñuna wasi, antawa yakuta rantinkapak mañachishkamanta, mikunakuta kushakamanta, Ralph Osborne, Neill Gerlowski, Weerakit Harnparinphan y Christina Martell. Chimanta makita kunakushkamanta jantun yachana wasipi, Reyna Domínguez, Sonia Navarro, Ricardo Guerrero, chaymantas, ñukata kikin yachachik mamakuna, Laura Guzmán, Jacqueline Jesús, Ofelia Vargas kankuna yanapshkamanta ñuka wañu tugarishkay yanapashkamanta. Chaymanta win mashikuna, Hatun yachana wasipi, katiwkunatas kankuna llakishkamanta, win runakuna ñukata riksikuna, chayrayku yuyarirani ayllushina kankunawan, kay jatun yachana wasipi, yupaychani.

ÍDICE GENERAL

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN.....	8
1.2 ANTECEDENTES.....	9
1.2.1 Diversidad de especies de Magnoliaceae	9
1.2.2 Ubicación taxonómica de la familia Magnoliaceae.....	10
1.2.3 Historia de la familia Magnoliaceae	10
1.2.4 Uso potencial y su situación actual	11
1.2.5 Hábitats de las especies de Magnoliaceae en México	11
1.2.6 Polinización y dispersión	12
1.2.7 Reproducción.....	12
1.2.8 Tratamiento taxonómico de las tres especies de <i>Magnolia</i> bajo estudio	13
1.3 LITERATURA CITADA	15

CAPÍTULO II

Temporalidad y productividad de fenofases de tres especies relictuales de <i>Magnolia</i> (sect. <i>Magnolia</i> , Magnoliaceae) del occidente de México: implicaciones para su conservación	21
A B S T R A C T	21
R E S U M E N.....	22
I C H I L L A Y A C H I S H K A Y U Y A Y.....	22
2.1 INTRODUCCIÓN.....	23
2.1.1 Objetivos específicos	24
2.1.2 Hipótesis específicas	24
2.2 MÉTODOS	25
2.2.1 Área de estudio	25
2.2.2 Muestreo de campo	26
2.2.3 Caracterización y análisis de la estacionalidad de fenofases	27
2.2.4 Comparación de la magnitud de la productividad entre las especies.....	27
2.2.5 Ordenación de temporalidad de fenofases en relación con variables ambientales... 27	
2.3 RESULTADOS.....	28
2.3.1 Temporalidad de fenofases	28
2.3.2 Descripción de las fenofases de cada especie.....	28
2.3.3 Diferencias entre especies para cada fenofase	29
2.3.4 Productividad de fenofases	30
2.3.5 Diferencias de productividad entre especies	31

2.3.6 Ordenación de la temporalidad de fenofases	31
2.4 DISCUSIÓN	32
2.4.1 Temporalidad de fenofases	32
2.4.2 Diferencias entre especies para cada fenofase	34
2.4.3 Productividad de fenofases	35
2.5 AGRADECIMIENTOS	37
2.6 LITERATURA CITADA	38

CAPÍTULO III

Estimulación <i>in vitro</i> de proliferación de yemas apicales en tres especies de <i>Magnolia</i> (secc. <i>Magnolia</i>, Magnoliaceae) del occidente de México en peligro de extinción	46
RESUMEN	46
ABSTRACT	47
ICHILLAYACHISHKA YUYAY	47
3.1 INTRODUCCIÓN	48
3.1.1 Objetivo específico.....	49
3.1.2 Hipótesis específica.....	50
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.2.1 Recolecta de material vegetal	50
3.2.2 Desinfección de material vegetal	50
3.2.3 Fases de experimentación para la proliferación de yemas apicales	50
3.2.4 Mediciones y observaciones.....	51
3.2.5 Diseño experimental y análisis de datos	51
3.3 RESULTADOS	52
3.3.1 Contaminación.....	52
3.3.2 Oxidación	52
3.3.3. Primera fase de proliferación de yemas apicales.....	52
3.3.4 Segunda fase de proliferación de yemas apicales	54
3.3.5 Observaciones de cambios fisiológicos en las dos fases:.....	55
3.4. DISCUSIÓN	55
3.4.1 Contaminación.....	55
3.4.2. Oxidación	56
3.4.3 Primera fase de proliferación de yemas apicales.....	57
3.4.4 Segunda fase de proliferación de yemas apicales	59
3.4.5 Observaciones de cambios fisiológicos en las dos fases.....	60

3.5 AGRADECIMIENTOS	60
3.6 LITERATURA CITADA	61

CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSIONES	64
4.1.1 Temporalidad de fenofases	64
4.1.2 Estacionalidad	64
4.1.3 Productividad de fenofases	64
4.1.4 Ordenación de la temporalidad de fenofases	65
4.1.5 Implicaciones en Conservación	65
4.1.6 Proliferación de yemas apicales	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenofases de tres especies de <i>Magnolia</i>	67
Figura 2. Ubicación de poblaciones de las especies estudiadas de <i>Magnolia</i>	68
Figura 3. Ubicación de las tres especies de <i>Magnolia</i> en el relieve topográfico.....	68
Figura 4. Diagramas ombrotérmicos (nov. 2016 a dic. 2017) de las tres regiones estudiadas.	69
Figura 5. Histogramas circulares de cinco fenofases para las tres especies de <i>Magnolia</i>	70
Figura 6. Ordenaciones NMDS de la temporalidad de las fenofases..	71
Figura 7. Efectos de proliferación de yemas apicales de tres medios, en tres especies en catorce semanas.	72
Figura 8. Efectos de crecimiento de <i>M. pugana in vitro</i> en ocho semanas..	73
Figura 9. Respuesta de las especies en tres medios de estimulación de proliferación de yemas apicales.	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados del análisis de estadística circular para las fenofases de las tres especies.....	75
Cuadro 2. Parámetros de las fenofases de las tres especies. los valores promedios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas (de Tukey $p < 0.05$).....	76
Cuadro 3. Matriz principal (biótica) para <i>Magnolia vallartensis</i>	77
Cuadro 4. Matriz secundaria (ambiental) de la estación meteorológica de Cajón de Peña..	77
Cuadro 5. Matriz principal (biótica) para <i>Magnolia pacifica</i>	78
Cuadro 6. Matriz secundaria (ambiental) de estación meteorológica de Corrinches.....	78
Cuadro 7. Matriz principal (biótica) para <i>Magnolia pugana</i>	79
Cuadro 8. Matriz secundaria (ambiental) de la estación meteorológica de Zapopan.. ..	79
Cuadro 9. Dosis de estimulación de yemas apicales para tres especies de <i>Magnolia</i>	80

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La conservación es una nueva ciencia de origen multidisciplinar que se ha desarrollado en los últimos años (Revilla, 1998). La diversidad biológica presenta crisis global desde el año 1600, la acción humana ha llevado a la extinción a algunas plantas vasculares (Torres-Mura *et al.*, 2008), animales y otros organismos, particularmente por la pérdida de ecosistemas y desaparición de sus hábitats (Moreira-Muñoz, 2005; Squeo *et al.*, 2001; Torres-Mura *et al.*, 2008). La conservación integra, de manera eficiente, acciones de planificación *in situ*, para mantener y recuperar poblaciones viables de sistemas dinámicos y evolutivos en los hábitats propios de las especies, y *ex situ*, para resguardar la diversidad genética de las poblaciones, fuera de sus hábitats naturales o lugares de cultivo, en ambientes controlados con herramientas biotecnológicas (Menges *et al.*, 2004); esto permite garantizar la supervivencia de las especies ante diversos factores de amenaza tanto antrópicos como ambientales.

Dentro del componente de la conservación *in situ*, se resalta la importancia y uso práctico de la información fenológica, que ha sido considerada como estrategia para conservación, por varios autores (Alencar *et al.*, 1979; Fournier, 1974; Fournier y Charpantier, 1978; Frankie *et al.*, 1974; Huxley *et al.*, 2000; Lieth, 1974; Lieth y Radford, 1971). Es innegable la relevancia que posee el estudio del comportamiento fenológico de las especies arbóreas como fundamento para la consolidación de programas de conservación de recursos genéticos. Numerosos estudios coinciden en afirmar que el conocimiento y comprensión de los patrones fenológicos de especies arbóreas en ecosistemas naturales son de interés básico en estudios ecológicos sobre biodiversidad, productividad y las interacciones entre vegetales, animales y otros factores bióticos, convirtiéndose en una herramienta de gran utilidad en la elaboración de planes de protección de fauna y flora (Alencar *et al.*, 1979; Hilty, 1980; Huxley *et al.*, 1999; Kollmann, 2000; Mooney *et al.*, 1980; Morellato, 1991). En cambio, el componente de conservación *ex situ* constituye una herramienta esencial para recuperar recursos genéticos de especies de plantas y animales que enfrentan un mayor riesgo de extinción global (Bacchetta *et al.*, 2008). En periodos recientes ha habido un incremento de más del 60% del número de plantas registradas como en peligro crítico. Estos datos muestran una alarmante e inmediata necesidad de implementar medidas para salvaguardar muchas de las

especies (Sarasan *et al.*, 2006; Torres-Mura *et al.*, 2008). Sin embargo, la conservación *ex situ* ha alcanzado relevancia y reconocimiento internacional, ya sea mediante jardines botánicos (plantas vivas); mediante bancos de germoplasma (genes, semillas, tubérculos o propágulos); y a través de acuerdos mundiales: Convenio sobre Diversidad Biológica y en la Estrategia Global para la Conservación Vegetal (Sarasan *et al.*, 2006; Franco, 2008).

Estudios actuales de magnolias contemplan principalmente descripciones botánicas, ecológicas y de distribución geográfica, así como de su vulnerabilidad a la extinción (Vázquez-García *et al.*, 2016). Sin embargo, el número de especies de la familia Magnoliaceae ha aumentado considerablemente, producto de las recientes exploraciones botánicas en el Neotrópico (Vázquez-García *et al.*, 2016). De estas zonas tropicales son pocos los estudios fenológicos de magnolias, uno de ellos es sobre las fases de floración en *Magnolia splendens* Urb., (Figlar, 1984), mientras Martínez (1995) y Martínez y Cuevas (1988) han realizado observaciones fenológicas en *M. pallescens* y *M. portoricensis* Bello, respectivamente. En Suramérica (Antunes y Ribeiro, 1999) obtuvieron datos fenológicos para *Talauma ovata* [*M. ovata*] (A. St.-Hil.) Spreng. En zonas templadas, en tanto Kameneva y Koksheeva (2013) realizaron estudios fenológicos en siete especies en el lejano oriente de Rusia.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Diversidad de especies de Magnoliaceae

A nivel mundial se estiman aproximadamente 350 especies de Magnoliaceae distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales de Asia y América. Los países que presentan mayor riqueza de especies de *Magnolia* son China, 100 spp., Vietnam, 60 spp., México, 40 spp., Colombia, 35 spp., Ecuador, 23 spp. y otros países con menor diversidad son Costa Rica, Honduras, Venezuela, Brasil (Rivers *et al.*, 2016; Vázquez-García *et al.*, 2016). En México, las *Magnolias* representan el 11 % de las especies a nivel mundial (Vázquez-García *et al.* 2014). Se distribuyen principalmente en los estados de Oaxaca, Veracruz, Chiapas, (10 spp.). En el estado de Jalisco actualmente se conocen seis especies: *M. pugana* (Iltis y A.Vázquez) A.Vázquez y Carvajal (Fig. 1 V-EE), *M. pacifica* A.Vázquez (Fig. 1 L-U), *M. vallartensis* A.Vázquez y Muñoz-Castro (Fig. 1 1-K), *M. iltisiana* A.Vázquez, *M. jaliscana* A.Vázquez y R. Guzmán y *M. ofeliae* A.Vázquez y Cuevas (Vázquez-García *et al.*, 2012). Desde el punto de vista ecosistémico, las especies del género *Magnolia* que prosperan

favorablemente en el bosque mesófilo montaña; son especies representativas e indicativas de conservación de este ecosistema (Vasquez-Morales *et al.*, 2014). La concentración de especies endémicas es considerada como indicador importante para identificar áreas prioritarias para un programa de conservación.

1.2.2 Ubicación taxonómica de la familia Magnoliaceae

Jussieu (1789), en su trabajo *Genera Plantarum* propuso la creación de la familia Magnoliaceae con base en *Magnoliae*; luego, en 1805, reconocida en la publicación "Exposition des Families Naturelles de Saint Hilaire". Desde entonces, numerosos trabajos abordan la circunscripción y clasificación de la familia, y no se ha llegado a un consenso definitivo. En la actualidad aún sigue válido, en gran medida, el primer tratamiento taxonómico propuesto por Dandy en 1927, sin embargo hasta la fecha, su clasificación infra-familiar sigue siendo controversial, porque la delimitación del número de secciones (0–11), géneros (1–13), subgéneros (0–9) y subfamilias (0–2) continúa sin resolverse (Vázquez-García *et al.*, 2016). La clasificación aceptada actualmente es la de Figlar y Nootboom (2004) que reconoce dos géneros (*Magnolia* L. y *Liriodendron* L.), tres subgéneros (*Magnolia*, *Yulania*, *Gynopodium*) y 12 secciones; ésta clasificación está basada en reexaminaciones de caracteres morfológicos y análisis filogenéticos con secuencias de ADN (Kim *et al.*, 2001; Kim y Suh, 2013). Sin embargo, habrá que esperar resultados de estudios filogenómicos con datos de secuenciación de nueva-generación (Vázquez-García *et al.*, 2016).

1.2.3 Historia de la familia Magnoliaceae

La familia Magnoliaceae es uno de los grupos más antiguos de las angiospermas que tuvo su origen en Laurasia (Cronquist, 1968, 1981; Raven y Axelrod, 1974) durante el Cretácico Tardío hace aproximadamente 100–113 millones de años (Azuma *et al.*, 2001; Magallón *et al.*, 2015). El registro fósil de *Archaeanthus* Dilcher y Crane, procedente del Cretácico Medio de la formación Dakota en la región central de Kansas, se presenta como el ancestro directo de *Magnoliaceae*, revelando que esta familia tiene una larga historia evolutiva de más de 100 millones de años (Dilcher y Crane, 1984; Romanov y Dilcher, 2013). La evidencia fósil sugiere que Magnoliaceae se originó en Norteamérica (Spitzbergen, Alaska), migrando después hacia Europa y Asia; posteriormente se extinguieron de Europa y noroeste de

Norteamérica y en el Eoceno migraron hacia el sur, resultando así el patrón bi-continental que ahora se conoce (Hebda y Irving, 2004). La similitud de fósiles de semillas entre Asia y Europa con especies existentes en Norteamérica, sugiere que estas últimas son sobrevivientes del Pleistoceno (Dandy, 1927; Tiffney, 1977). Sin embargo, a pesar del uso de herramientas moleculares, aún no hay un consenso sobre cuál de los grupos actuales de Magnoliidae es basal y se desconocen además las relaciones entre sus distintos clados (Kim y Suh, 2013).

1.2.4 Uso potencial y su situación actual

La madera de Magnoliaceae presenta una textura fina, moderadamente blanda y generalmente de color blanco (Lozano-Contreras, 1994; Velásquez y Serna, 2005), los tamaños de los fustes de varias especies hacen de ellas un recurso maderable muy apreciado (Vázquez-García *et al.*, 2016). Por la variación de su follaje y la belleza de sus flores varias especies son empleadas como ornamentales (p. ej. *Magnolia grandiflora* L. y *M. dealbata* Zucc.). Las espectaculares flores de Magnoliaceae tienen una exquisita fragancia capaz de perfumar toda una habitación, y también se usan en la medicina tradicional y como recurso alimenticio (Cicuzza *et al.*, 2007). Entre las especies que son empleadas como plantas medicinales está *M. mexicana* DC., que en la medicina tradicional mexicana se ha utilizado como cardiotónica (Vázquez-García *et al.* 2016). La gran mayoría de especies enfrenta una situación poblacional crítica para lograr el reclutamiento de juveniles *in situ* por lo que tres de cada cuatro especies se encuentran en riesgo de extinción (Vázquez-García *et al.*, 2016).

1.2.5 Hábitats de las especies de Magnoliaceae en México

Actualmente se distribuyen en fragmentos inmersos entre las manchas urbanas y con una alta perturbación causada por las actividades humanas (Bubb *et al.*, 2004; Ramírez-Marcial *et al.*, 2001). Las poblaciones de *Magnolia* en México se distribuyen exclusivamente en los bosques mesófilos de montaña, en bosques tropicales lluviosos y subcaducifolios y en bosques de galería. Se ha reportado que algunas especies, como *M. guerrerensis* J. Jiménez Ram., K. Vega y Cruz Durán, requieren un bosque maduro para su establecimiento, debido a la poca tolerancia a la insolación directa que presentan sus plántulas (Jimenez-Ramirez *et al.*, 2007), sin embargo un estudio reciente ha encontrado que la regeneración de *M. dealbata* es favorecida en áreas abiertas, en estadíos sucesionales tempranos (Domínguez-Yescas com.

pers.). Otras evidencias recientes sugieren que algunas especies pueden ser adaptables al cambio de uso de suelo mientras se conserven niveles altos de humedad y haya presencia abundante de hojarasca (Dieringer y S., 1994; Vasquez-Morales *et al.*, 2014).

1.2.6 Polinización y dispersión

Los estudios ecológicos muestran que las flores de *Magnolia* son visitadas principalmente por escarabajos (p. ej. Nitidulidae, Chrysomelidae: Scarabaeidae), los cuales frecuentemente actúan como vector principal para su polinización (Bernhardt, 2000; Dieringer y S., 1994; Vázquez-Morales *et al.*, 2014). Los estudios sobre polinización de *Magnolia* Neotropicales son escasos (Gottsberger *et al.*, 2012), por ejemplo, en Ecuador y Brasil el único dato sobre la polinización de este grupo de plantas proviene de la observación de la floración de *M. ovata* (Gottsberger *et al.*, 2012) y de *M. vargasiana* A.Vázquez y D.A.Neill, una especie recientemente descrita (Vázquez-García *et al.*, 2015). Las flores de *Magnolia* abren en forma nocturna. La caída del último hipsófilo que cubre el botón floral es el punto que marca el inicio de la floración, que dura un par de días dependiendo de la especie. Se observó en *M. vargasiana* que la flor inicia su apertura al atardecer (17:00 a 16:00 h) y permanece abierta por unas cuantas horas (hasta las 21:00 h aprox.) para atraer a los polinizadores y posteriormente cerrarse hasta el siguiente día. Esta primera apertura es la fase femenina, donde los estigmas están receptivos a los granos de polen. Al siguiente día la flor se abre al atardecer, es el inicio de la fase masculina, donde los estambres caen y liberan el polen para que los polinizadores lo lleven a otra flor. La flor permanece sin cambios y abierta hasta que los pétalos se desvanecen y empiezan a caer (Chen *et al.*, 2016; Vázquez-García *et al.*, 2015).

1.2.7 Reproducción

En el Neotrópico, y particularmente en México, hay pocos estudios en *Magnolia* sobre la reproducción sexual a partir de semillas, entre ellos los de *M. dealbata* (Dominguez-Yescas, 2012), *M. pugana* y *M. schiedeana* Schltdl. (Jacobó-Pereira *et al.*, 2016; Vázquez-García, 1994). Mientras que en Colombia reportan la exitosa reproducción asexual (acodado) en *M. yarumalensis* (Lozano) Govaerts y *M. espinalii* (Lozano) Govaerts (Gómez-Restrepo, 2010a).

1.2.8 Tratamiento taxonómico de las tres especies de *Magnolia* bajo estudio

Magnolia pacifica A.Vázquez, *Brittonia* 46 (1): 10 1994.

Tipo: —México, Jalisco: Arroyo del Triángulo, San Sebastián, 1425 m 20 mar. 1927 (flor), Y. Mexía 1903 (HOLOTYPO: MICH; ISOTIPO: A!, CAS!, F!, GH!, MO!, NY!, UCR!, US!).

Árboles hasta de 15–25 m de altura, hasta de 150 cm de DAP; con las primeras ramas de 2–15 m del suelo; ramillas densamente glabras, pálidas velutinoso, corteza rugosa 1–2 cm de grosor, gris oscuro a castaño. Hojas coriáceas, angostamente o ampliamente elíptica a ovada-elípticas, (8)12–22 × (3) 5–9 (10) cm; agudas a obtusas o redondeado en el ápice, cuneadas o cortos atenuados en la base; verde oscuro, glabro o glabrado y glauco a verde pálido, rara vez pubescente estipulas lineares de 4.5–6 × 3–6(8) mm, pálido seríceas en el exterior, con nervaduras reticuladas; pecíolos canaliculadas, de (1) 1.5 × 2.5(3.5) cm, glabros o rara vez pubescentes, flores con botones, ovoides a oblongoides; brácteas 2–3, la superior espatácea de 4–6.5 × 1.5–2 cm; raramente velutinoso, glabrescentes, al inferior de bráctea (pérula) dehiscente, 1.5–2 × 6–9 mm, densamente pálida-velutina. Flores abiertas 9–15 cm en diámetro, blancas; pedúnculos glabros, 3.5 × 3.5–6 mm, consiste de dos entrenudos, 0.5–1.5 mm de largo, el menor de 33 mm de largo; sépalos 3, obovados-oblongos, cóncavos, 3–7 × 2–3.5 cm, verdosos en el exterior, blancos o color crema en el interior, glabros en ambas caras; pétalos 6–7, anchamente obovados, abruptamente atenuados hacia su delgado pecíolo, los exteriores 5–7 × 2.5–5.5 cm, los interiores 3–5.5 × 1–4 cm, blancos, glabros en ambas caras; estambres 100 a 113, 8–12 × 1–2 mm, las anteras acuminadas a cuspidadas en el ápice, color crema; gineceo oblongoide-elipsoide, verde, glabro; estilos encorvados, 2–3 mm de largo, verdosos, con papilas estigmáticas inconspicuas. Frutos de tipo polifolículos oblongoides, glabros, con (18) 23–28 (37) folículos, estos, cuando están maduro y abiertos, con lóculos ovales casi redondos, un poco más largos que anchos, algunos tenidos de color rojizo. Semillas primaticas triangulares, subcilíndricas o rotundo comprimidas de 8–14 × 7–11 mm, con sarcotesta de color rojo escarlata (Vázquez-García, 1994).

Magnolia pugana (Iltis y A.Vázquez) A.Vázquez y Carvajal, *Novon* 12(1): 137–141 (2002).

Tipo: —México, Jalisco: margen de bosque en pequeño tributario del arroyo San Lorenzo, 35 km al NW de Guadalajara, 8 km NW de Tesistan, Zapopan, 20°50′ N, 103°34′

W, 1450 m, 18 mar. 1987, *Iltis, Chazaro B. y R. Lopez V.* 29722 (holotipo, Wis, Isótipos, IBUG, MEXU, MICH, MO, US).

Árboles hasta de 20 m de altura, hasta de 150 cm de DAP; con las primeras ramas de 2-15 m del suelo; ramillas esencialmente glabras, corteza rugosa 1–2 cm de grosor, gris oscuro a castaño. Hojas coriáceas, angostamente oblongas o lanceoladas a angostamente elípticas, 12–22 × 2.5–8 cm; agudas a obtusas en el ápice, cuneadas en la base; estípulas lineares de 4.5–7 × 3–6(8)cm de ancho, pálido seríceas en el exterior, con nervaduras reticuladas; pecíolos canaliculadas, de 1–1.5(3) cm de largo, glabros o rara vez pubescentes, flores con botones, ovoides a oblongoides; brácteas 2–3, la superior espatácea de 4–6.5 × 1.5–2 cm; la bráctea inferior (pérula) dehiscente, 1.5–2 × 6–9 mm, densamente pálida-velutina. Flores abiertas 9–15 cm en diámetro, blancas; pedúnculos glabros, 3.5 × 3.5–6 mm, consiste de dos entrenudos, 0.5–1.5 mm de largo, el menor de 33 mm de largo; sépalos, 3, obovadas-oblongos, cóncavos, 3–7 × 2–3.5 cm, verdosos en el exterior, blancos o color crema en el interior, glabros en ambas caras; pétalos 6 a 7, anchamente obovados, abruptamente atenuados hacia su delgado pecíolo, los exteriores 5–7 × 2.5–5.5 cm, los interiores 3–5.5 × 1–4 cm, blancos, glabros en ambas caras; estambres 92–104, 8–12 × 1–2 mm, las anteras acuminadas a cuspidadas en el ápice, color crema; gineceo oblongoide-elipsoide, verde, glabro; estilos encorvados, 2–3 mm de largo, verdosos, con papilas estigmáticas inconspicuas. Frutos de tipo polifolículos oblongoides, glabros, con 25–35 folículos, estos, cuando están maduro y abiertos, con lóculos ovales casi redondos, un poco más largos que anchos, algunos tenidos de color rojizo. Semillas primaticas triangulares, subcilíndricas o rotundo comprimidas de 9–12 × 7–8 mm, con sarcotesta de color rojo escarlata (Vázquez-García *et al.* , 2002).

Magnolia vallartensis A.Vázquez y Muñiz-Castro, *Rec. Forest. Occid. Méx.* 1: 124–127 (2012).

Tipo: MÉXICO: Jalisco. Mpio. Puerto Vallarta, 5.5 km al suroeste del puerto, 20 ° 32'48 "N, 105° 16'7.6 "W, 102 m, 3 dic. 2009 (Bud, fr), J. Antonio Vázquez García 9343 con Rosa Murguía Araiza y Ricardo Díaz Borioli (holotipo: ¡IBUG!, isotipos: ¡MEXU !, ¡IEB! WIS!).

Árboles 15–0.2 m de altura, con las primeras ramas de 1.5 m de altura, ramillas con entrenudos 1–3 × 0.4–0.6 cm, lenticedo, entrenudos glabros, nódulos amarillentos pubescentes. Hoja cuchillas 13.5–25.3 × 6–10.8 cm, ampliamente elípticas obovada o ampliamente lanceolado, obtuso a agudo en el ápice; pecíolos 2–3.4 × 0.1–0.3 cm, canalizado

adaxialmente, engrosado y oscuro en la base, con 14–16 secundarios venas por lado; botón floral de 3.7–5 × 2.3–2.5 cm, ovoide; pedúnculo 2.1–3 × 0.3–0.6 cm, con un entrenudo corto (5–8 mm); bráctea 1, 3.4 × 3.6 cm, cóncava, glabra; flor abierta 8.3–12.5 cm; sépalos 3, 4.6–5.8 × 1.5–2, obovado verdoso-blanquecino, reexpresado; pétalos 6–8, exteriores 3–6.6 × 1.9–3.5, color blanco crema; interiores unos 1.8–4.2 × 0.9–1.8 cm, 0.15 mm a la base; estambres 75–82 (-118), 1–1.1 × 0.1 cm, lineal, triangular en el ápice, blanco crema, longitudinalmente cóncavo, ligeramente contorsionado, más ancho hacia el ápice, algunos más anchos en la base; gineceo 1.5–1.6 × 0.6–0.8 cm, con 14–19 carpelos; estilos 2–2.5 × 0.3 mm, curvado, blanquecino, carpelos 0.9–2.7 × 0.5–1.2; fruta 2.4–5.1 × 2–2.3, obovada; semillas 0.6–0.9 × 0.2–0.3 cm, ovadas a suborbiculadas, rojo escarlata (Vazquez-Garcia *et al.*, 2012).

El siguiente trabajo está organizado en los siguientes capítulos: El capítulo 1 “Introducción general”, describe aspectos teóricos, antecedentes, así como la taxonomía de las especies de *Magnolia* estudiadas. En el capítulo 2 se estudia la temporalidad y productividad de fenofases de las tres especies relictuales de *Magnolia* (Sección *Magnolia*, Magnoliaceae) del occidente de México. Se discuten además algunos aspectos e implicaciones para su conservación. En el capítulo 3 se presentan los resultados de la implementación de un protocolo de micropropagación *in vitro* para *Magnolia vallartensis*, *M. pacifica*, y *M. pugana* a partir de meristemas apicales. Finalmente, en el capítulo 4 se presentan las conclusiones generales de esta investigación; se resaltan los aspectos más generales e importantes de los resultados obtenidos, así como sus alcances y contribución al conocimiento.

1.3 L I T E R A T U R A C I T A D A

- Alencar, J. d. C., Almeida, R. A. d., y Fernandes, N. P. (1979). Fenologia de espécies florestais em floresta tropical úmida de terra firme na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 9(1):163–199.
- Antunes, N. B., y Ribeiro, J. F. (1999). Aspectos fenológicos de seis espécies vegetais em matas de galeria do Distrito Federal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(9):1517–1527.

- 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(12):2275–2285.
- Bacchetta, G., Fenu, G., Mattana, E., Bueno Sanchez, A., Jiménez-Alfaro, B., Piotto, B., y Virevaire, M. (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres: Jardín Botánico Atlántico*. Cagliari, Italia, 378 pp.
- Bernhardt, P. (2000). Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. In *Pollen and pollination*, Springer, Missouri, USA. 293–320 pp.
- Bubb, P., May, I. A., Miles, L., y Sayer, J. (2004). Cloud forest agenda. UNEP-WCMC, Cambridge, UK. Online at: http://www.unep-wcmc.org/resources/publications/UNEP_WCMC_bio_series/20.htm
- Chen, Y., Chen, G., Yang, J., y Sun, W. (2016). Reproductive biology of *Magnolia sinica* (Magnoliaceae), a threatened species with extremely small populations in Yunnan, China. *Plant Diversity*, 38(5):253-258.
- Cicuzza, D., Newton, A., y Oldfield, S. (2007). *The red list of Magnoliaceae: Fauna y Flora Internacional*. Cambridge.
- Cronquist, A. (1968). The evolution and classification of flowering plants. In *The evolution and classification of flowering plants*. Thomas Nelson y Sons Ltd. (Eds.), Reino Unido, pp.xi + 396 pp.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*: Columbia University Press. New York.
- Dandy, J. (1927). The genera of Magnolieae. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)*, 1927(7):257–264.
- Dieringer, G., y S., J. E. E. (1994). Reproductive ecology of *Magnolia schiedeana* (Magnoliaceae), a threatened cloud forest tree species in Veracruz, Mexico. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 154–159.
- Dilcher, D. L., y Crane, P. R. (1984). Archaenthus: an early angiosperm from the cenomanian of the western interior of North America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71:351-383.
- Figlar, R. (1984). *Magnolia splendens*. *Journal of the Magnolia Society*, 20(1):23B24.

- Figlar, R. B., y Nooteboom, H. P. (2004). Notes on Magnoliaceae IV. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 49(1):87–100.
- Fournier, L. A. (1974). Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba*, 24(4):422–423.
- Fournier, O., y Charpentier, C. (1978). Sample size and frequencies of observations for the study of phenological characteristics of tropical trees. *Cespedesia. Suplemento (Colombia)*, 7(25–26):13–20.
- Frankie, G. W., Baker, H. G., y Opler, P. A. (1974). Tropical plant phenology: applications for studies in community ecology. In *Phenology and seasonality modeling*. Springer. 287–296 pp.
- G., J. A. V., Carvajal, S., y Hernandez, L. (2002). *Magnolia pugana* (Magnoliaceae): una nueva combinación en el complejo *M. pacifica*. *Novon*, 137–141.
- Gómez Restrepo, M. L. (2010). Fenología reproductiva de especies forestales nativas presentes en la jurisdicción de Corantioquia. Medellín, Colombia, 132 pp.
- Gottsberger, G., Silberbauer-Gottsberger, I., Seymour, R. S., y Dötterl, S. (2012). Pollination ecology of *Magnolia ovata* may explain the overall large flower size of the genus. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(2):107–118.
- Hebda, R., y Irving, E. (2004). On the origin and distribution of magnolias: Tectonics, DNA and climate change. Geophysical Monograph Series 145. American Geophysical Union, USA. 57 pp.
- Hilty, S. L. (1980). Flowering and fruiting periodicity in a premontane rain forest in Pacific Colombia. *Biotropica*, 12:292–306.
- Huxley, P., y Huxley, P. (1981). *Phenology of tropical woody perennials and seasonal crop plants with reference to their management in agroforestry systems* Consultative Meeting.-Proceedings.-Plant research and agroforestry. Paper presented at the Consultative Meeting, Nairobi (Kenia), 8–15 pp.
- Jacobo-Pereira, C., Romo-Campos, R., y Flores, J. (2016). Seed germination of *Magnolia pugana* (Magnoliaceae), an endemic and endangered species from Western Mexico. In *Botanical Sciences* 94:575–584.

- Jimenez-Ramirez, J., Vega-Filores, K., Cruz-Duran, R., y Vaquez-García, J. A. (2007). *Magnolia guerrerensis* (Magnoliaceae), a new species from the cloud forest of Guerrero State, Mexico. *Boletín De La Sociedad Botánica De México*, 80:73–76.
- Kameneva, L. A., y Koksheeva, I. M. (2013). Reproductive biology of seven taxa of *Magnolia* L. in the south of Russian Far East. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 20(2):163.
- Kannan, R., y James, D. A. (1999). Fruiting phenology and the conservation of the Great Pied Hornbill (*Buceros bicornis*) in the Western Ghats of southern India. *Biotropica*, 31(1):167–177.
- Kim, S., Park, C. W., Kim, Y. D., y Suh, Y. (2001). Phylogenetic relationships in family Magnoliaceae inferred from *ndhF* sequences. *American Journal of Botany*, 88(4):717–728. doi:10.2307/2657073
- Kim, S., y Suh, Y. (2013). Phylogeny of Magnoliaceae based on ten chloroplast DNA regions. *Journal of Plant Biology*, 56(5):290–305.
- Kollmann, J. (2000). Dispersal of fleshy-fruited species: a matter of spatial scale? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3(1):29–51.
- Lieth, H. (1974). Purposes of a Phenology Book. In: Lieth H. (eds) Phenology and Seasonality Modeling. *Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, Springer, Berlin, Heidelberg. 8:3–19.
- Lieth, H., y Radford, J. S. (1971). Phenology, resource management, and synagraphic computer mapping. *BioScience*, 21(2):62–70.
- Lozano Contreras, G. (1994). *Dugandiodendron y talauma (Magnoliaceae)* en el neotrópico. Academia Colombiana de Ciencias Exactas. Bogotá. 147 p.
- Magallón, S., Gómez-Acevedo, S., Sánchez-Reyes, L. L., y Hernández-Hernández, T. (2015). A metacalibrated time-tree documents the early rise of flowering plant phylogenetic diversity. *Nueva Phytologist*, 207(2): 437–453.
- Menges, E. S., Guerrant, E., y Hamzé, S. (2004). Effects of seed collection on the extinction risk of perennial plants. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Island Press, Washington, 305–324.
- Mooney, H., Björkman, O., Hall, A., Medina, E., y Tomlinson, P. (1980). The study of the physiological ecology of tropical plants-current status and needs. *BioScience*, 30(1):22–26.

- Moreira-Muñoz, A. (2005). Conservación en un mundo cambiante: puntos críticos de biodiversidad y el paradigma que distrae. *Junural Conserv Plant*, 1: 1–6.
- Morellato, L. P. C. (1991). *Estudo da fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil*. UNICAMP, Campinas, Brasil, 140 pp.
- Ramírez-Marcial, N., González-Espinosa, M., y Williams-Linera, G. (2001). Anthropogenic disturbance and tree diversity in montane rain forests in Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 154(1–2):311–326.
- Raven, P. H., y Axelrod, D. I. (1974). Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61(3):539–673.
- Rivers, M., Beech, E., Murphy, L., y Oldfield, S. (2016). Magnoliaceae. BGCI, Richmond, 60 pp.
- Romanov, M. S., y Dilcher, D. L. (2013). Fruit structure in Magnoliaceae sl and Archaeanthus and their relationships. *American Journal of Botany*, 100(8):1494–1508.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M. M., Atherton, C., McMichen, M., Prendergast, G., y Rowntree, J. K. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants—progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 42(3):206–214.
- Squeo, F. A., Arancio, G., y Gutiérrez, J. R. (2001). Libro rojo de la flora nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo. Universidad de la Serena, Santiago, Chile, 361 pp.
- Tiffney, H. B. (1977). Fruits and seeds of the Brandon lignite: Magnoliaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 75:299–323.
- Torres-Mura, J. C., Castro, S., Oliva, D., Armesto, J., Villagrán, C., Arroyo, M., . . . IUCN, G. (2008). Conservación de la Biodiversidad. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76:509–525.
- Vasquez-Morales, S. G., Tellez-Valdes, O., Pineda-Lopez, M. D., Sanchez-Velasquez, L. R., Flores-Estevez, N., y Viveros-Viveros, H. (2014). Effect of climate change on the distribution of magnolia schiedeana: a threatened species. *Botanical Sciences*, 92(4):575–585.
- Vázquez-García, J., Neill, D., Asanza, M., Pérez, Á., Arroyo, F., Dahua-Machoa, A., y Merino-Santi, R. (2016). Magnolias de Ecuador: en riesgo de extinción. *Universidad Estatal Amazónica, Puyo*. Ecuador, 128 pp.

- Vázquez-García, J. A. (1994). *Magnolia* (Magnoliaceae) in México y central America: A sinopsis. . *Brittonia*, 46:41–23.
- Vazquez-Garcia, J. A., Dominguez-Yescas, R., Pedraza-Ruiz, R., Sanchez-Gonzalez, A., y Muniz-Castro, M. A. (2015). *Magnolia rzedowskiana* (Magnoliaceae), a new species of section *Macrophylla* from the central Sierra Madre Oriental, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 112:19–36.
- Vazquez-Garcia, J. A., Gomez-Dominguez, H., Lopez-Cruz, A., Espinosa-Jimenez, J. A., Sahagun-Godinez, E., y Muniz-Castro, M. A. (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.
- Vazquez-Garcia, J. A., Neill, D. A., Asanza, M., y Recalde, L. (2015b). *Magnolia vargasiana* (Magnoliaceae), a new Andean species and a key to Ecuadorian species of subsection *Talauma*, with notes on its pollination biology. *Phytotaxa*, 217(1): 26–34.
- Vazquez-Garcia, J. A., Perez-Farrera, M. A., Martinez-Melendez, N., Nieves-Hernandez, G., y Muniz-Castro, M. A. (2012). *Magnolia mayae* (Magnoliaceae), A New Species From Chiapas, Mexico. *Botanical Sciences*, 90(2): 109–112.
- Velásquez, C., y Serna, M. (2005). Magnoliáceas de Antioquia. *Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe, Corantioquia. Impregon SA Medellín*, Colombia, 32 p.

CAPÍTULO II

Temporalidad y productividad de fenofases de tres especies relictuales de *Magnolia* (sect. *Magnolia*, Magnoliaceae) del occidente de México: implicaciones para su conservación

Alex Dahua-Machoa, J. Antonio Vázquez-García*, Miguel Ángel Muñoz-Castro, Gerardo Hernández-Vera, Liberato Portillo-Martínez, Gregorio Nieves Hernández

Herbario IBUG (“Luz María Villarreal de Puga”), Laboratorio de Ecosistemática, Laboratorio Cultivo in vitro, Instituto de Botánica, Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara, CUCBA, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, 45220 Jalisco, México.

*Autor para correspondencia: jvazquez@cucba.udg.mx

A B S T R A C T

Phenology is fundamental for the characterization, management and conservation of plant species, especially those endangered, as is the case for *Magnolia vallartensis* (Jalisco, northern coast), *M. pacifica* (Southern Sierra Madre, western end) and *M. pugana* (central Jalisco). Employing circular statistics, analysis of variance and indirect ordination of Non-Metric Multidimensional Scaling, we examined the temporality, dynamics, and productivity of phenophases of three relict species of *Magnolia* in relation to environmental variables during 14 months. 1) The hypothesis of no differences in the flowering phenofase between the three species is supported. Therefore, there are no temporal barriers that contribute to speciation. 2) The hypothesis of non-seasonality in the phenofases of the three species was rejected, which was high in *M. pugana*, intermediate in *M. pacifica* and low in *M. vallartensis*. The non-seasonality hypothesis is supported for the foliation phenophase of the three species. 3) The hypothesis of no significant differences in the productivity of flowering and fruiting is rejected, since *M. pugana* was significantly more productive in flowers and fruits than *M. pacifica* and *M. vallartensis*. 4) The hypothesis of exogenous causes of the temporality of phenofases is supported (Heuvel dop, 1986) for *M. pacifica* and *M. pugana* species, in view of the fact that the bi-dimensional structure of the ordination was explained by several climatic variables. The ordination of *M. vallartensis*, not being explained by any of the measured climatic variables, is an indication that does not rule out the hypothesis of endogenous causes (Terborgh, 1992).

RESUMEN

La fenología es fundamental para la caracterización, manejo y conservación de las especies vegetales, especialmente de aquellas en peligro de extinción, como *Magnolia vallartensis* (Jalisco, Costa Norte), *M. pacifica* (Sierra Madre del Sur, extremo occidental) y *M. pugana* (centro de Jalisco). Mediante estadística circular, análisis de varianza y la ordenación indirecta Escalar Multidimensional No-Métrico se examinó la temporalidad, dinámica y productividad de fenofases de tres especies relictuales de *Magnolia* en relación con variables ambientales durante 14 meses. 1) Se apoya la hipótesis de no diferencias en la fenofase de floración entre las tres especies. Por lo tanto, no hay barreras temporales que contribuyan a la especiación. 2) Se rechaza la hipótesis de no estacionalidad en las fenofases de las tres especies, la cual fue alta en *M. pugana*, intermedia en *M. pacifica* y baja en *M. vallartensis*. La hipótesis de no estacionalidad se apoya para la fenofase de foliación de las tres especies. 3) Se rechaza la hipótesis de no diferencias significativas en la productividad de la floración y fructificación, ya que *Magnolia pugana* resultó significativamente con mayor productividad en flores y de frutos que *M. pacifica* y *M. vallartensis*. 4) Se apoya la hipótesis de causas exógenas de la temporalidad de fenofases (Heuvel dop, 1986) en las especies *Magnolia pacifica* y *M. pugana*, en vista de que la estructura bidimensional de ésta fue explicada por diversas variables climáticas. *M. vallartensis* al no resultar explicada por ninguna de las variables climáticas medidas, es un indicio que no descarta la hipótesis de causas endógenas (Terborgh, 1992).

ICHILLAYACHISHKA YUYAY

Sisa, muyu yachayta aparanchi, kimsa karan shuk samiruyakunata, *M. vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana*), kay Jalisco, Mexico llaktapi. Chusku chunka shuk ruyakunata rikusha puriranchi, karan killa chunka chusku killakama, tupuranchi (llulluk panka, punda sisa, sisa paskarishka, llullu muyu, pukushka muyu). Ishaky waranaka chunka sukta killay kallairanchi, tukuchirani llankayta ishkay waranka kanchis watapi. Kay tupuykunata aparanchi shuk hatun hamuktayanapayma, tactakunta aparanchi, shuk kikunkapak imakillay tuparin ashka aparishka, ishkay, maykan ruyata alita aparin, kinsa, maykan ruyakuna tamia inti killakunayrikurin ashkata. Sisa, muyukuna ashilla aparishka rikurinawra kay kimsa sami ruyakunay. tamyá y viranu killakunay, shinakpiwas rikurinawra ashillalla, shuk wata initruy

muyu y sisakuna. *M. vallartensis* ruya aparira ashillata muyukunata shinak llayta kay ruya rikuchira ñukanchi llankaypi rikuchira pay kawsay kinkin ruya ukupi, kay ishkay *M. pacifica*, *M. pugana*, sisa, muyukuna rikurinawra ashka tamia, inti, sachá hukushka, chakiriskanayakunay tuparira, chaymanta ishkay karan sami ruya tuparira pay kawsay tamya, inti watay. Ñunkachi tupashkakunawan yuyariranchi kay kimsa ruyakuna llankashka tuparinwara karan sami sachay tuparinajun chay rayku mana pari ju killay sisana rikuchinajun, muyukuna, chinanta karan ruya charin shuk sami kawsayta paywa ukupi.

2.1 INTRODUCCIÓN

El estudio de los patrones y la dinámica de la fenología contribuyen al entendimiento de procesos ecológicos y evolutivos de poblaciones, especies y comunidades, como la diversificación, coexistencia de las especies, el nicho de regeneración, biología de la polinización y cadenas tróficas entre plantas y dispersores (Alvarado *et al.*, 2014; Grubb, 1977; Hagen *et al.*, 2012; Mantovani *et al.*, 2003; Preuhsler *et al.*, 2006; Rathcke y Lacey, 1985; Van *et al.*, 1993). El conocimiento de las épocas de floración y fructificación es importante para la conservación de recursos genéticos y para el manejo forestal de bosques primarios y secundarios, pues marca los meses en los que ocurre; ayudando a la planificación de colectas de semilla y la detección de las mejores procedencias de germoplasma (Ochoa-Gaona *et al.*, 2008).

En la actualidad, la periodicidad de las fenofases en la flora neotropical se atribuye a factores exógenos (Barbour *et al.*, 1980; Heuvel dop *et al.*, 1986; US/IBP, 1972), interacciones bióticas (Aide, 1992; Frankie *et al.*, 1974; Gentry, 1974; Stiles, 1977), factores endógenos (Loubry, 1994; Terborgh, 1992; Van *et al.*, 1993) y a relaciones filogenéticas (Harvey *et al.*, 1995; Kochmer y Handel, 1986; Wright y Calderon, 1995).

Entre los factores exógenos que afectan la distribución de fenofases se encuentran los ambientales o climáticos, por ejemplo, a menor estacionalidad en el clima de un entorno, mayor es la diversidad de las fenofases, ya que no existen factores climáticos que restrinjan el desarrollo de la planta (Morellato *et al.*, 2000).

En general, la floración en los bosques tropicales coincide con un aumento de la radiación solar (fotoperiodo) y una disminución de la precipitación pluvial, mientras que la fructificación generalmente se asocia y se concentra en la estación húmeda (Marques y

Oliveira, 2004). Sin embargo, muchas plantas presentan fenofases estacionales a pesar de estar ubicadas en regiones donde el clima es húmedo durante todo el año (Mehltreter y García-Franco, 2008). Entre los principales factores que modifican la supervivencia y ciclos reproductivos de las especies de plantas tropicales se incluyen la precipitación pluvial, el fotoperiodo y la temperatura (Morellato *et al.*, 2016, Shen *et al.*, 2015). Además, la folicación desempeña un papel crucial para los ecosistemas, en la regulación del intercambio de los flujos de agua, CO₂ y energía entre la biosfera y la atmósfera (Richardson *et al.*, 2013). Sin embargo, la influencia de los factores ambientales locales, como la composición bioquímica del suelo, así como las perturbaciones naturales o inducidas por el hombre (p. ej. incendios y fragmentación de hábitats), en el control de las fenofases todavía es poco conocida (Cardoso *et al.*, 2012; Hagen *et al.*, 2012).

Existen escasos estudios fenológicos de especies de *Magnolia* en México, a pesar de su importancia para la conservación, ya que son catalogadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como especies en peligro de extinción.

2.1.1 Objetivos específicos

- I. Analizar la temporalidad y estacionalidad de las fenofases de *Magnolia vallartensis* A.Vázquez y Muñiz-Castro, *M. pacifica* A.Vázquez y *M. pugana* (Iltis y A.Vázquez) y Carvajal.
- II. Cuantificar la productividad de fenofases reproductivas de las tres especies de estudio.
- III. Examinar la relación entre los eventos vegetativos, reproductivos y las variables de temperatura, precipitación, fotoperiodo y humedad relativa.

2.1.2 Hipótesis específicas

- I. Las fenofases de floración de *Magnolia vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana* se traslapan temporalmente en gran medida, de tal manera, que no constituyen barreras temporales que limiten el flujo genético interespecífico, por lo tanto, no contribuyen a la especiación.
- II. No existe estacionalidad en las fenofases de las tres especies.
- III. No existen diferencias significativas en la productividad de las fenofases de *Magnolia vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana*.

- IV. Las fenofases de *Magnolia vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana* dependen más de causas exógenas ambientales (temperatura y fotoperiodo) (Heuveldop *et al.*, 1986), que de causas endógenas (Terborgh, 1992).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Área de estudio

Las tres localidades estudiadas se encuentran en el estado de Jalisco del occidente de México, en cada una de ellas se distribuye una especie distinta de *Magnolia* (Figs. 2 y 3): a) Cuenca del Río Palo María (20° 31' 54.77" N, 105° 15' 4.72" O, 430 m s.n.m.), a 3 km de distancia al mar en el extremo occidental de la Sierra Madre del Sur, municipio de Puerto Vallarta, Jalisco, México. En esta localidad se distribuye *Magnolia vallartensis* A.Vázquez y Muñiz-Castro [En Peligro Crítico de Extinción (CR) (Rivers *et al.*, 2016)], junto con géneros tales como *Podocarpus*, *Miconia*, *Clusia*, *Cecropia*, *Styrax*; en ecotono de bosque mesófilo de montaña y bosque tropical subcaducifolio o en bosque de galería; en ambos casos colindando con vegetación sabanoide o con bosque de pino-encino. La geomorfología está conformada de pendientes pronunciadas y lomeríos moderados con afloramientos de rocas ígneas intrusivas ácidas, predominada por granito (INEGI, 2017). Los suelos incluyen regosol, litosol, cambisol u ocasionalmente fluvisol. El clima es cálido subhúmedo (Aw), con estación seca en invierno y lluvias en verano (INEGI, 2017). Los datos de la estación meteorológica del Cajón de Peñas muestran que entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017 hubo una precipitación acumulada de 1,253.4 mm, con una temperatura media anual de 25.8°C (Fig. 4a). El fotoperiodo mensual obtenido varió de 10.8 a 13.2 h (CONAGUA, 2017). b) Cuenca del Río Ameca, Bosque El Saucito (20°41'48.74"N, 104°52'37.36"O, 1730 m s.n.), a 40 km de distancia al mar, municipio de San Sebastián del Oeste, Jalisco, México. En esta localidad se desarrolla *Magnolia pacifica* A.Vázquez [En Peligro de Extinción (EN), (Rivers *et al.*, 2016)] en coexistencia con los géneros *Pinus*, *Quercus*, *Persea*, *Inga*; en bosque mesófilo en ecotono con bosque de pino y encino. La geomorfología está conforma de pendientes pronunciadas y lomeríos altas, prolongadas y predominan las rocas ígneas extrusivas ácidas de origen volcánico. Los suelos incluyen regosol, feozem, y ocasionalmente cambisol (rojo o kankab). El clima es principalmente semicálido semihúmedo, (INEGI, 2017). Los datos de la Estación Meteorológica del Corrinches revelan que entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017 hubo

una precipitación acumulada de 1,208.11 mm (14 meses), y una temperatura media anual de 21.61 °C (Fig. 4b). El fotoperiodo mensual obtenido varió de 10.7 a 12.9 h (CONAGUA, 2017). c) Cuenca del Río Santiago, Barranca de San Francisco, (20° 49' 35.61" N, 103° 33 '2.33" O, 1440 m s.n.m), a 180 km de distancia al mar, municipio de Zapopan, Jalisco, México. En esta localidad se desarrolla *Magnolia pugana* [En Peligro Crítico de Extinción (CR) (Rivers *et al.*, 2016)] en coexistencia con los géneros *Clethra*, *Guazuma*, *Persea*, *Lysiloma*, *Nectandra*; en bosque de galería con elementos de bosque tropical caducifolio y en colindancia con bosque encino y pino. La geomorfología está conformada de pendientes suaves, mesetas y barrancas muy pronunciadas, con predominio de roca toba de origen explosivo. Los suelos incluyen regosol, feozem o litosol (SEMARNAT, 2017). El clima es semicálido semihúmedo y subhúmedo (INEGI, 2017). Los datos de la estación meteorológica de Zapopan revelan que entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017 hubo una precipitación acumulada de 1,026.2 mm y una temperatura media anual de 19.10 °C, (Fig. 4c). El fotoperiodo mensual obtenido varió a lo largo del año de 10.7 a 13.3 h (CONAGUA, 2017).

2.2.2 Muestreo de campo

En cada una de las tres localidades donde se distribuye una especie de *Magnolia* distinta, se efectuó un reconocimiento previo ubicando mediante GPS 11–15 árboles en edad reproductiva. *M. vallartensis* consistió de árboles de 5–20 m de altura y de 8.7–49.9 cm DAP, las primeras ramas se encuentran entre 1–6 m. La de *M. pacífica* incluyó árboles de 9–25 m de altura y de 7.0–93.0 cm DAP, las primeras ramas se encuentran de 1.5–3 m. Finalmente, la población de *M. pugana* contó con árboles de 7.5–20 m de altura y de 7.0–170.0 cm DAP, las primeras ramas se encuentran de 1–2 m.

Las observaciones fenológicas se realizaron a intervalos mensuales durante 14 meses de monitoreo, comenzando en noviembre de 2016 y finalizando en diciembre de 2017. Se registró la fenofase vegetativa (brotes de hojas por rama) y las fenofases reproductivas, que incluyó la floración (número de botones con bráctea, botones sin bráctea, flores en fase femenina, fase masculina y flores tirando pétalos) y fructificación (fruto inmaduro sin pétalos, fruto maduro cerrado, fruto mostrando pocas semillas, frutos mostrando mayoría de semillas, eje del fruto sin semillas), (Bauer *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Müller y Schmitt, 2017). Para el análisis

de estadística circular se seleccionaron sólo cinco de las 11 fenofases 1) foliación, 2) botón floral, 3) floración (fase femenina), 4) fructificación (fruto maduro cerrado) y 5) dehiscencia inicial.

2.2.3 Caracterización y análisis de la estacionalidad de fenofases

Entendiendo la fenología como la temporalidad de las fenofases (foliación, floración, fructificación, dehiscencia) en un ciclo anual (Terborgh, 1992), la intensidad de cada evento fenológico se estimó mediante el índice de intensidad de Fournier (Fournier-Origgi, 1976; Fournier, 1974), clasificando los datos obtenidos de forma semi-cuantitativa, incluyendo cinco categorías (0 a 4), con un intervalo del 25% entre cada categoría. Se calculó el índice de intensidad de Fournier para cada mes. La suma de todas las categorías de intensidad asignadas a cada individuo se dividió entre la suma máxima que podría atribuirse a la población (relativizando el número total de individuos seleccionados con la suma total muestreado por mes).

Se emplearon estadísticas circulares para analizar e interpretar los patrones fenológicos (Morellato *et al.*, 2010; Müller y Schmitt, 2017). Mediante el paquete estadístico Oriana versión 4.0 (Kovach, 2009), los meses se convirtieron en ángulos, con intervalos de 0.999° a 30° de ancho y se calculó: 1) ángulo medio (μ) o fecha media que se refiere a la época del año en torno a la cual la actividad fenológica de los individuos está más concentrada; 2) desviación estándar circular; y 3) el vector r , que indica la intensidad de la concentración (0 a 1) alrededor del ángulo medio. La longitud del vector r puede considerarse una medida del grado de estacionalidad. Además, se aplicó la prueba de Rayleigh para indicar la significancia ($P < 0.05$) del ángulo medio (Bauer *et al.*, 2014; Müller y Schmitt, 2017; Patrícia *et al.*, 2000).

2.2.4 Comparación de la magnitud de la productividad entre las especies

Los promedios de las 11 distintas fenofases de las especies fueron comparados mediante análisis de varianza de un solo factor ($p=95\%$) y prueba Tukey (Sokal *et al.*, 1979).

2.2.5 Ordenación de temporalidad de fenofases en relación con variables ambientales.

Se usó la técnica de ordenación Escalar Multidimensional No-Métrica (NMDS) en asociación con la distancia Sorensen, para ordenar los tiempos (mes/año) de acuerdo con la composición

y abundancia relativa de cada una de las fenofases; a posteriori los ejes de la ordenación se correlacionaron con variables climáticas (Toledo *et al.*, 2014; Vogado *et al.*, 2016), usando un punto de corte de $r^2 > 0.4$ con la finalidad de eliminar las variables más débiles. La ordenación Bray-Curtis se usó para identificar cuáles ejes fueron más importantes y tener una idea del porcentaje de varianza explicada por cada una de ellas. La matriz principal para cada una de las tres especies analizadas consistió en 14 tiempos (mes/año) \times 11 fenofases (5 de la floración, 5 del fructificación y brote de hoja): *Magnolia vallartensis* (Cuadro 3), *M. pacifica* (Cuadro 5) y *M. pugana* (Cuadro 7). La matriz secundaria (ambiental) consistió en 14 tiempos \times 5 variables climáticas (precipitación, temperatura, humedad relativa, fotoperiodo y velocidad de viento): *M. vallartensis* (Cuadro 4), *M. pacifica* (Cuadro 6) y *M. pugana* (Cuadro 8). Los datos mensuales de cada una de las variables climáticas se obtuvieron de archivos de estaciones meteorológicas de Jalisco (CONAGUA 2017).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Temporalidad de fenofases

Se registró un total de 41 individuos adultos pertenecientes a las tres especies de *Magnolia* estudiadas, en los que se observaron y cuantificaron las fenofases de los doce meses del 2017.

2.3.2 Descripción de las fenofases de cada especie.

Magnolia vallartensis: a) la foliación, aunque irregular fue continua a lo largo del año, sin estacionalidad evidente. Todos los individuos en la población mostraron foliación, con promedio en octubre, un máximo en diciembre, y un mínimo en junio (Fig. 5aI); b) los botones florales se presentaron de manera irregular a lo largo de todo el año, sin estacionalidad evidente, con valor promedio en junio, un máximo en mayo y un mínimo en octubre (Fig. 5bI); c) la floración (fase femenina) aunque irregular fue continua durante todo el año, sin estacionalidad evidente, con promedio en mayo, un máximo también en mayo y con los valores más bajo en enero, marzo y agosto (Fig. 5cI); d) la fructificación se presentó a lo largo del años, sin estacionalidad, con valor promedio en junio, un máximo en agosto y un mínimo en enero (Fig. 5dI); e) la dehiscencia inicial fue irregular con discontinuidad pero sí mostró alta estacionalidad, con valor promedio en mayo, un máximo en mayo y nula en los meses de enero, agosto, septiembre y diciembre (Cuadro 1) (Fig. 5eI).

Magnolia pacifica: a) la foliación fue continua a lo largo del año, sin estacionalidad, con valor promedio en enero, un máximo en marzo, y un mínimo en julio (Fig. 5aII); b) los botones florales se evidenciaron de manera irregular a lo largo del año y su estacionalidad alta, con valor promedio en mayo, un máximo en mayo y nula presencia en enero, noviembre (Fig. 5bII); c) la floración (fase femenina) aunque fue discontinua sí mostró alta estacionalidad, con valor promedio en junio, máximo en junio y nula ocurrencia en enero, febrero, marzo, abril y octubre (Fig. 5cII); d) la fructificación se presentó a lo largo del año, sin estacionalidad, con valor promedio en diciembre, un máximo en diciembre y un mínimo en julio y agosto (Fig. 5dII); e) la dehiscencia inicial fue irregular y discontinua, sin estacionalidad evidente, con valor promedio en mayo, un máximo en mayo y nula en febrero y julio (Fig. 5eII).

Magnolia pugana: a) la foliación fue continua a lo largo del año, sin estacionalidad evidente, con valor promedio en julio, un máximo en agosto, y un mínimo en febrero (Fig. 5aIII); b) los botones florales se mostraron de manera irregular a lo largo del año, con estacionalidad alta, con valor promedio en mayo, un máximo también en mayo y nula en enero, febrero, marzo, abril, septiembre, octubre, noviembre y diciembre (Fig. 5bIII); c) la floración (fase femenina) se presentó discontinua a lo largo del año, con estacionalidad alta y con valor promedio en junio, un máximo en junio y nula en enero, febrero, marzo, abril, octubre y diciembre (Fig. 5cIII); d) la fructificación se presentó continua a lo largo del año, con estacionalidad alta y el promedio en enero, un máximo en febrero y un mínimo en julio (Fig. 5d III); e) la dehiscencia inicial se mostró irregular a lo largo del año, con estacionalidad alta, el promedio en marzo, un máximo en febrero y un mínimo en enero, septiembre, noviembre y diciembre (Fig. 4eIII).

2.3.3 Diferencias entre especies para cada fenofase

a) Foliación. La foliación mostró asincronía entre las tres especies y se observó ausencia de estacionalidad en todas ellas (Fig. 5aI-III).

f) Botón floral. La producción de botones mostró cierta sincronía entre las tres especies (hacia el mes de mayo), con alta estacionalidad en *Magnolia pugana* y *M. pacifica*, y ausencia en *M. vallartensis* (Fig. 5bI-III).

g) Floración (fase femenina). La floración mostró una incipiente asincronía, siendo más temprana en *Magnolia vallartensis* (finales de mayo), intermedia en *M. pacifica* (2da.

semana de junio), y más tardía en *M. pugana* (finales de junio). La estacionalidad fue alta en *M. pacifica* y en *M. pugana* (Fig. 5cI-III).

h) Fructificación. La fructificación fue asincrónica entre las especies, y solo mostró alta estacionalidad para *Magnolia pugana* (mes de febrero), mientras que en *M. vallartensis* la máxima fructificación fue en agosto y para *M. pacifica* en diciembre (Fig. 5dI-III).

i) Dehiscencia inicial. La dehiscencia inicial mostró un vector promedio en mayo para *Magnolia vallartensis* y *M. pacifica*, mientras que para *M. pugana* fue en el mes de marzo. Solo *M. vallartensis* y *M. pugana* mostraron alta estacionalidad en esta fenofase (Figuras 5eI-III).

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de estadística circular. Los ángulos promedio de las fenofases en las especies de *Magnolia vallartensis* y *M. pacifica* indican un valor del vector r , lo cual refleja una baja estacionalidad. Mientras que en *M. pugana* las fenofases de botone floral, floración (fase femenina), fructificación y dehiscencia de semillas mostraron diferencias significativas; el valor elevado del vector r denota un grado de estacionalidad medio-alto.

2.3.4 Productividad de fenofases

Foliación: *Magnolia vallartensis* presentó una foliación mensual del 12.0 al 76.5%, mostrando una distribución trimodal con picos en febrero (52.3%), agosto (57.6%) y diciembre (76.5%); la mínima foliación (12.0%) ocurrió en junio y la máxima en diciembre. *M. pacifica* presentó una foliación mensual del 22.0 al 78.4%, mostrando una distribución trimodal con picos en diciembre (61,6%), marzo (78.4%) y septiembre (57.0%); la mínima ocurrió (22.0%) en junio y la máxima en marzo. *M. pugana* presentó una foliación mensual del 10.3 al 72.9%, mostrando una distribución bimodal con picos en junio (69.3%) y agosto (72.9%), la mínima ocurrió en febrero (10.3%) y la máxima en agosto.

Floración: En *M. vallartensis* la floración mensual fue del 0.3 al 19.5 %, mostrando una distribución bimodal con picos en mayo (19.0%) y septiembre (16.1%); la mínima floración (0.0%) ocurrió en junio y la máxima en mayo. En *M. pacifica* la floración mensual fue del 0.0 al 32.4%, mostrando una distribución trimodal con picos en mayo (28.40%), junio (32.4%) y julio (19.7%); la mínima (7.7%) ocurrió en julio y la máxima en junio. En *M. pugana* la floración mensual fue de 0.0 a 60.0%, mostrando una distribución bimodal con

picos en mayo (60.0%) y julio (38.9%); la mínima (15.1%) ocurrió en junio y la máxima en mayo.

Fructificación: En *M. vallartensis* la fructificación mensual fue del 0.0 al 36.0%, mostrando una distribución trimodal con picos en marzo (20.9%), mayo (36.0%) y junio (30.0%); la mínima (5.0%) ocurrió en abril y la máxima en mayo. *M. pacifica* la fructificación mensual fue del 0.0 al 57.5%, mostrando una distribución trimodal con picos en mayo (57.5%), junio (35.7%) y noviembre (22.0%); la mínima (0.0%) ocurrió en febrero y la máxima en junio. En *M. pugana* la fructificación mensual fue del 0.0 al 76.0%, mostrando una distribución bimodal con picos en febrero (76.0%) y abril (60.0%); la mínima (7.0%) ocurrió en marzo y la máxima febrero.

2.3.5 Diferencias de productividad entre especies

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las fenofases de las tres especies ($p < 0.05$), y se detectó con la prueba de Tukey que no hubo diferencias significativas entre *M. vallartensis* y *M. pacifica* en cuanto a la productividad de todas sus fenofases. En cambio, *M. pugana* sí mostró diferencias significativas con *M. vallartensis* y *M. pacifica* en cuanto a la producción de todas sus fenofases, excepto en producción de botones florales con bráctea que no resultó diferente de *M. pacifica* (Cuadro 2).

2.3.6 Ordenación de la temporalidad de fenofases

Mediante ordenación Escalar Multidimensional No Métrica (NMDS) se determinó que para *Magnolia vallartensis* se trató de una configuración bidimensional (2 ejes). La Ordenación Bray-Curtis Varianza Regresión (BC-VR) extrajo una varianza acumulada para los dos ejes de 64.84%. El eje 1 extrajo 44.34% de la varianza en la matriz de distancia original y sus extremos fueron mayo 2017 y enero 2017; este eje no fue explicado por ninguna de las cinco variables ambientales medidas, con un punto de corte de $r^2=0.6$. El eje 2 extrajo 20.50% de la varianza en la matriz de distancia original y sus extremos fueron de diciembre 2017 a noviembre de 2016. Este eje tampoco fue explicado por ninguna de las variables medidas (Fig. 6a). Similarmente, para *M. pacifica* se obtuvo una configuración bidimensional (2 ejes). La Ordenación BC-VR extrajo una varianza acumulada para los dos ejes de 76.08%. El eje 1 extrajo 55.32% de la varianza de la matriz de distancia original y sus extremos fueron enero

2017 y julio 2017; este eje fue explicado por fotoperiodo, temperatura y precipitación. El eje 2 extrajo 20.75% de la varianza de la matriz de distancia original y sus extremos fueron los meses de septiembre 2017 y marzo 2017; el segundo eje fue explicado por la humedad relativa y en menor grado por la velocidad de viento (Fig. 6b). De igual manera, para *M. pugana* se identificó una configuración bidimensional (2 ejes). La Ordenación BC-VR extrajo una varianza acumulada para los dos ejes de 66.34%. El eje 1 extrajo 40.32% de la varianza en la matriz de distancia original y sus extremos fueron enero 2017 y junio 2017; este eje fue explicado por el fotoperiodo y la temperatura. El eje 2 extrajo 26.01% de la varianza en la matriz de distancia original y sus extremos fueron agosto 2017 y febrero 2017; este eje fue explicado por la humedad relativa (Fig. 6c).

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Temporalidad de fenofases

La sincronía de la fenofase de floración entre poblaciones o especies es fundamental para detectar posibilidades de flujo génico entre ellas. Para el caso de la floración, los resultados apoyan la hipótesis de que no existen diferencias fenológicas entre especies: en *M. pugana* la productividad en la floración fue mucho menor en el mes de mayo con respecto a las otras dos especies, lo cual denota una incipiente asincronía entre especies, sin embargo, las tres especies tuvieron una importante intersección en la fenofase de floración en el mes de junio y un poco menor en el mes de mayo. Por lo tanto, se apoya la hipótesis de especiación alopátrida explicada en mayor grado por aislamiento geográfico sugerida por Vázquez-García (1994) y Vázquez-García *et al.* (2016) que por la existencia de barreras temporales en fenofases reproductivas, ya que la incipiente asincronía observada en la floración de las tres especies ligada a su amplitud de floración (la cual se extiende hasta por seis semanas con importante intersección) resulta insuficiente para impedir el flujo genético. En un estudio de diversidad y estructura genética (Carranza-Aranda, 2014) se encontró una alta diferenciación genética entre *M. pugana* y *M. pacifica*, la cual puede ser explicada por el aislamiento geográfico entre ambas y sus diferencias ambientales, principalmente en términos de la variación anual de la temperatura (15-24 vs. 18-25°C) y de la humedad relativa (27-81 vs. 34-86%).

Las tres especies de *Magnolia* mostraron importante intersección de la floración (botones florales, fase femenina) a inicios de la estación de lluvia entre mayo y junio; este es

un patrón muy común en otras especies de los bosques secos tropicales (Rivera *et al.*, 2002; Singh y Kushwaha, 2005). Observaciones similares de fenología floral se han realizado para *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae), pero en esta la floración sucede en eventos más prolongados, iniciando desde las primeras lluvias hasta estaciones secas (Núñez-Cruz *et al.*, 2018). Los cambios climáticos que se dan en las primeras lluvias después de la estación seca se consideran unos de los principales factores que inducen la floración en los bosques neotropicales (Lenza y Klink, 2006). Similarmente, en el noreste de la India, en *Magnolia rabaniana* (Hook. f. & Thomson) D.C.S. Raju & M.P. Nayar, la floración es al inicio de estación de lluvia y la ocurrencia de floración máxima es en primavera (Mir *et al.*, 2017). Solo *Magnolia vallartensis* en su floración mostró un patrón de floración continuo (aunque irregular en su productividad) durante todo el año, probablemente debido a una menor estacionalidad en la humedad ambiental dada por su mayor cercanía al Océano Pacífico que puede ayudar a los meristemas de las hojas y flores a mantenerse activos

En el presente estudio la diferencia de estacionalidad de fenofases entre especies, puede ser explicada por factores abióticos, principalmente por el clima. Sin embargo, también la historia evolutiva de las especies puede influir en la distribución de las actividades biológicas como la temporalidad de la foliación, (Borchert *et al.*, 2004; Williams-Linera, 2007; Núñez-Cruz *et al.*, 2017; Patrícia *et al.*, 2000). Las tres especies de *Magnolia* estudiadas mostraron foliación continua a lo largo del año, esto hace evidente el carácter perenne de las especies (Bauer *et al.*, 2014; Bauer *et al.*, 2012). Este patrón vegetativo continuo coincide con el de *Guarea macrophylla* Vahl (Meliaceae), y puede ser considerado como una estrategia ventajosa para las plantas que garantiza la actividad fotosintética durante todo el año (Müller y Schmitt, 2017). En vista de que las fenofases vegetativas constituyen eventos continuos, existe una menor dependencia a la precipitación pluvial (Singh *et al.*, 2006).

Se sabe que la fructificación en la mayoría de las especies en bosques neotropicales ocurre principalmente en la estación seca (Valdez-Hernández *et al.*, 2010; Williams-Linera y Meave, 2002). En las especies de *Magnolia* del occidente de México se encontró un patrón ligeramente diferente, con una mayor productividad en frutos en los inicios de la temporada de lluvias, entre mayo-junio y agosto (*M. vallartensis*), y en la estación seca e inicios de lluvias entre diciembre y mayo (*M. pacifica*, *M. pugana*), aunque se obtuvieron algunas fases con baja estacionalidad, a diferencia de especies de bosques neotropicales estacionalmente secos como

Bursera bipinnata Donn. Sm., *Bursera copallifera* (DC.) Bullock, *Bursera glabrifolia* (Kunth) Engl. y *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg., que han mostrado un patrón de alta estacionalidad con mayor fructificación al final de la temporada de lluvias y en estación seca (Núñez-Cruz *et al.*, 2018). Otras especies de magnolia [*M. sínica* (Y.W. Law) Noot. y *M. schiedeana* Schlechtld.] muestran fenofases de mayor fructificación en la mitad de la estación de lluvia (Chen *et al.*, 2016; Dieringer y Espinosa, 1994). Por otro lado, en la sección *Talauma*, *M. gloriensis* (Pittier) Govaerts ha mostrado una mayor fructificación en la época de menor lluvia, pero sin estacionalidad marcada y con sincronía entre los individuos (Cambronerero y Porras, 2017).

2.4.2 Diferencias entre especies para cada fenofase

La foliación de las tres especies de *Magnolia* se caracterizó por un patrón no estacional y asincrónico. Este comportamiento de producción de hojas también se ha demostrado en las especies zoocóricas monitoreadas en climas secos tropicales (Bauer *et al.*, 2014; Bauer *et al.*, 2012). En los bosques andinos de Colombia, *Magnolia guatapensis* (Lozano) Govaerts, *M. hernandezii* (Lozano) Govaerts, y *M. yarumalensis* (Lozano) Govaerts, han presentado también una foliación asincrónica (Gómez, 2010). El comportamiento continuo de fenofases vegetativas para especies perennes puede ser la estrategia más ventajosa de las plantas, ya que permite mantener la tasa fotosintética durante todo el año (Meza y López, 1997; Singh y Kushwaha, 2005) y que las hojas viejas persistan hasta que se han translocado sus nutrientes (Estrada-Castelo *et al.*, 2012).

La floración: La fase de botón floral mostró un patrón sincrónico entre especies, en tanto, la fase femenina también fue sincrónica, pero con una incipiente asincronía. Sin embargo, a diferencia de algunas especies de magnolia de Colombia (*Magnolia guatapensis*, *M. hernandezii*, *M. yarumalensis*, *M. polyhypsophylla* (Lozano) Govaerts), en las que la floración es comúnmente asincrónica entre especies y entre poblaciones de cada especie, por lo general la intensidad de fructificación se concentra en estaciones de lluvias (Gómez-Restrepo, 2010a). En el caso de *Inga edulis* Mart., que es también una especie de ambientes mesófilos, la floración se ha presentado en forma sincrónica a nivel poblacional (Marín *et al.*, 2012), un patrón observado en varios bosques del Neotrópico (Agudelo *et al.*, 2006; Frankie *et al.*, 1974).

La fructificación y dehiscencia inicial de *Magnolia vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana* mostraron un patrón asincrónico entre especies, mientras que otras especies de bosques secos tropicales [*Bursera* spp., *E. polystachya* y *B. fagaroides* (Kunth) Engl. y *M. guianensis*] muestran un patrón sincrónico (Vogado *et al.*, 2016). En contraste, Núñez-Cruz *et al.* (2018) han reportado que *Leucaena* sp. y *G. ulmifolia* son asincrónicas, atribuyendo esto como una posible estrategia para reducir la competencia entre los dispersores de semillas. Similarmente, para especies pioneras de la Amazonia central de Brasil se reportan ocho especies con un patrón asincrónico (Bentos *et al.*, 2008).

2.4.3 Productividad de fenofases

La mayor productividad de fenofases reproductivas (floración y fructificación) de *Magnolia pugana* con respecto a *M. pacifica* y *M. vallartensis* permite rechazar la hipótesis de no diferencias significativas. Estas diferencias pueden deberse a sus evidentes diferencias genéticas (Carranza-Aranda, 2014), sin embargo, también a sus diferencias ambientales, ya que las poblaciones de *M. pugana* se mantienen en arroyos permanentes que ayudan a mantener más productivas sus fenofases reproductivas (flores y frutos), mientras que en el caso de las especies *M. vallartensis* y *M. pacifica* se presentan una gran parte de individuos en áreas no contiguas, o alejadas, a arroyos, lo que limita su productividad por escasez de humedad en épocas secas del año.

El número de semillas por fruto resultó también relacionado directamente con la magnitud de la productividad. La germinación observada en campo también mostró una relación inversa con la productividad ya que para *Magnolia vallartensis* la germinación fue nula, de un 6.6% para *M. pacifica* y un 26.6% para *M. pugana*, un 50% menor que el reportado para esta especie de la cercana localidad de San Lorenzo (Jacobo-Pereira *et al.*, 2016). A pesar de las contrastantes diferencias de productividad entre las especies y que estas están directamente relacionadas con una mayor producción de semillas por fruto (14-18 en *M. vallartensis*, 20-22 en *M. pacifica* y 28-30 en *M. pugana*) y con un mayor porcentaje de germinación, no repercuten en el reclutamiento, ya que éste resultó similar entre *M. pacifica* (21.4%) y *M. pugana* (21%), mientras que, como era de esperarse, *M. vallartensis* obtuvo el más bajo porcentaje de reclutamiento. Este resultado sugiere que la depredación de semilla pudiera ser mayor para *M. pugana*, aspecto que debe ser investigado.

Magnolia vallartensis que actualmente se encuentra catalogadas como En Peligro (Rivers *et al.*, 2016), debe tener mayor prioridad para la conservación y ser catalogada como En Peligro crítico, debido a su depauperada productividad, frecuencia de abortos de botones florales, menor número de poblaciones y menores tamaños poblacionales.

Los abortos de botones florales fueron más frecuentes en *M. vallartensis* y *M. pacifica*, mientras que *M. pugana* no presentó aborto de botones florales. Similarmente, se han observado abortos de botones florales en *M. polyhypsophylla*, *M. yarumalensis*, *M. guatapensis*, *M. hernandezii* (Gómez-Restrepo, 2010b).

La depredación de frutos durante la dehiscencia inicial ocurrió en las tres especies, aunque con mayor intensidad en *M. pugana*. En otros casos la mayoría de los gineceos caen, por lo que rara vez se han reportado frutos maduros como sucede en *M. mindoensis* A.Vázquez, D.A.Neill & A.Dahua, *M. vargasiana*, *M. mercedesiarum* D.A.Neill, A.Vázquez & F.Arroyo, observados por Vázquez-García *et al.* (2015, 2016, 2017, 2018), siendo una de las causas más comunes la falta de nutrientes (Peters y Vásquez, 1988).

2.4.4 Ordenación de la temporalidad de fenofases

Los resultados de la ordenación de la estructura de la temporalidad de las fenofases entre *Magnolia pacifica* y *M. pugana*, a pesar de la mayor distancia entre éstas, fueron muy similares, ya que en ambos casos el eje 1 fue explicado por el fotoperiodo y la temperatura, y el eje 2 fue explicado por la humedad, con la diferencia de que en *M. pacifica*, adicionalmente la precipitación explicó el eje 1 y la velocidad del viento el eje 2. Este resultado apoya la hipótesis de que la estructura de la temporalidad de las fenofases es regulada principalmente por factores exógenos (Heuvelodop *et al.* 1986). En cambio, la estructura de la temporalidad de las fenofases en *M. vallartensis*, aunque también resultó bidimensional, no correspondió con las otras dos especies, a pesar de su mayor cercanía geográfica con una de ellas, *M. pacifica*, y ambos ejes no fueron explicados por ninguna de las variables medidas, lo cual sugiere que la temporalidad de las fenofases en esta especie podría deberse más bien a causas endógenas (Terborgh 1992).

Los resultados difieren de los reportados para otras zonas tropicales y subtropicales de América y África, en los que se han encontrado relaciones entre los patrones fenológicos y diferentes factores climáticos, dependiendo de la alternancia y distribución de los periodos de

lluvia, sequía y, principalmente, de la existencia en algunas zonas tropicales de una estación seca marcada, lo cual puede inducir la caída de las hojas con la subsecuente floración, o presentarse ésta al inicio de las lluvias (Gentry y Emmons, 1987; Grimm, 1995; Seghieri *et al.*, 1995). En el pacífico sur colombiano, las especies de *Bactris gassipaes* Kunth, *Euterpe oleracea* Mart., *Cespedezia macrophylla* Seem., *Symphonia globulifera* L. f. y otras, presentan una baja proporción de frutos maduros con respecto a los frutos verdes relacionadas con variables exógenas como temperatura, brillo solar y precipitación pluvial y (Urrego y Valle, 2001). Similarmente, algunos autores identifican valores altos de temperatura, brillo solar, y humedad, con condiciones más favorables para la maduración de los frutos en zonas con estación seca marcada (White, 1994).

Estudios similares, sobre aspectos de reproductividad de *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC., muestran que las fenofases están correlacionados fuertemente con las exposición, fotoperiodo y temperatura (Vogado *et al.*, 2016). En cuanto a los bosques secos tropicales, la precipitación se ha correlacionado con la producción de frutos maduros e inmaduros de *B. bipinnata*, *G. ulmifolia* (Núñez-Cruz *et al.*, 2018). Resultados similares se han observado para las especies tropicales (Zhao *et al.*, 2013), donde las plantas expuestas a temperaturas elevadas florecieron, como lo predicen los modelos fototérmicos. Además de la temperatura, diferentes estudios han observado una influencia positiva a la incidencia de la luz en la producción de estructuras reproductivas (Kilkenny y Galloway, 2008; Pires *et al.*, 2014).

2.5 A G R A D E C I M I E N T O S

Se agradece a la Universidad de Guadalajara-CUCBA, Maestría BIMARENA y Departamento de Botánica y Zoología, y al CONACyT-México la beca de posgrado del primer autor. JAVG agradece además el apoyo al SNI y a PROMEP-SEP. Agradecemos a los revisores del manuscrito sus valiosas observaciones, y apreciamos la asistencia en campo de Alex Zabalgoitia, Ana Nuño, Neill Gerlowski, Claudia Méndez, Luis Sanchez, Javier Rendón, Juvenal Parada, Cynthia Martínez y Carlos García. Un agradecimiento muy especial a quienes apoyaron generosamente en la logística de la investigación: Ralph Osborne, Neill Gerlowski, Weerakit Harnparinphan y Christina Martell.

2.6 LITERATURA CITADA

- Agudelo, C., Vélez, M., Macías, D., Molano, F., López, A., y Morales, I. (2006). Riqueza Biótica Quindiana. Editorial Universidad del Quindío. Armenia, 3:312–365.
- Aide, T. M. (1992). Dry season leaf production: an-escape from herbivory. *Biotropica*, 532–537.
- Alvarado, S. T., Buisson, E., Rabarison, H., Rajeriarison, C., Birkinshaw, C., Lowry II, P. P., y Morellato, L. P. (2014). Fire and the reproductive phenology of endangered Madagascar sclerophyllous tapia woodlands. *South African Journal of Botany*, 94:79–87.
- Barbour, M. G., Burk, J. H., y Pitts, W. D. (1980). *Terrestrial plant ecology*: Benjamin/Cummings. California, EE. UU, 604 pp.
- Bauer, D., Müller, A., Goetz, M. N. B., y Schmitt, J. L. (2014). Fenología de *Ocotea pulchella*, *Myrcia brasiliensis* e *Psidium cattleianum*, en Floresta semidecídica do sul do Brasil. *Floresta*, 44(4):657–668.
- Bauer, D., Nunes Bernardes Goetz, M., Müller, A., y Schmitt, J. L. (2012). Fenologia de três espécies de Myrsine L. em floresta secundária semidecídica no Sul do Brasil. *Revista Arvore*, 36(5), 859–868.
- Bentos, T. V., Mesquita, R. C. G., y Williamson, G. B. (2008). Reproductive Phenology of Central Amazon Pioneer Trees. *Tropical Conservation Science*, 1(3):186–203.
- Cambronero, L. B., y Porras, R. S. (2017). Fenología de *Talauma gloriensis* Pittier (Magnoliaceae), Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes, San Ramón, Alajuela, Costa Rica. *Pensamiento Actual*, 17(1):11–22.
- Cárdenas-Henao, M., Londoño-Lemos, V., Llano-Almario, M., González-Colorado, Á. M., Rivera-Hernández, K. L., Vargas-Figueroa, J. A., Moreno-Cavazos, M. P. (2015). Fenología de cuatro especies arbóreas de bosque seco tropical en el Jardín Botánico Universitario, Universidad del Valle (Cali), Colombia. *Actualidades Biológicas*, 37(103):121–130.
- Cardoso, F., Marques, R., Botosso, P., y Marques, M. (2012). Stem growth and phenology of two tropical trees in contrasting soil conditions. *Plant and Soil*, 354(1–2):269–281.

- Carranza-Aranda, A. S (2014). Diversidad y diferenciación genética de *Magnolia pugana* y *Magnolia pacifica*, especies endémicas del occidente de México. Tesis de licenciatura, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México. 52 pp.
- Chen, Y., Chen, G., Yang, J., y Sun, W. (2016). Reproductive biology of *Magnolia sinica* (Magnoliaceae), a threatened species with extremely small populations in Yunnan, China. *Plant Diversity*, 38(5):253–258.
- CONAGUA (2017). Normales climatológicas por estación, Servicio Nacional Meteorológico (acesado: 20 de diciembre de 2017).
[<http://smn.cna.gob.mx/productos/normales/estacion/normales.html>].
- Dieringer, G., y Espinosa, J. E. (1994). Reproductive Ecology of *Magnolia schiedeana* (Magnoliaceae), a Threatened Cloud Forest Tree Species in Veracruz, Mexico. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 121(2):154–159.
- Estrada-Castelo, J., Márquez, G., y Higareda, C. (2012). Fenología foliar de diez especies arbóreas en el mineral de Nuestra Señora de la Candelaria, Cosalá, Sinaloa. Editorial Académica Española, Saarbrücken, Alemania, <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:101:1-201211032852>.
- Fournier-Origgí, L. A. (1976). Observaciones fenológicas en el bosque húmedo de premontano de San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica. Phenological observations on the lower montane rain forest of the region of San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica. *Turrialba*, 26:54–59.
- Fournier, L. A. (1974). Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba*, 24(4):422–423.
- Frankie, G. W., Baker, H. G., y Opler, P. A. (1974). Tropical plant phenology: applications for studies in community ecology. In *Phenology and seasonality modeling*. Springer. 287–296 pp.
- Gentry, A. H. (1974). Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica*, 64–68 pp.
- Gentry, A. H., y Emmons, L. H. (1987). Geographical variation in fertility, phenology, and composition of the understory of Neotropical forests. *Biotropica*, 19, 216–227.
- Gómez-Restrepo, M. L. (2010b). Fenología reproductiva de especies forestales nativas presentes en la jurisdicción de Corantioquia. Medellín, Colombia, 132 pp.

- Grimm, C. (1995). Seed predators and the fruiting phenology of *Pithecellobium pallens* (Leguminosae) in thornscrub, north-eastern Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 11(3):321–332.
- Grubb, P. J. (1977). The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Biological Reviews*, 52(1):107–145.
- Hagen, M., Kissling, W. D., Rasmussen, C., De Aguiar, M. A., Brown, L. E., Carstensen, D. W., Genini, J. (2012). Biodiversity, species interactions and ecological networks in a fragmented world. *Advances in ecological research*. 46:89–210.
- Harvey, P. H., Pagel, M., Read, A., y Nee, S. (1995). Further remarks on the role of phylogeny in comparative ecology. *Naturalist*, 140:421–446.
- Heuveldop, J., Pardo Tases, J., Quiros Conejo, S., y Espinoza Prieto, L. (1986). *Agroclimatología tropical*: Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica, 151 pp.
- INEGI. (2017). *Diagnóstico del municipio Puerto Vallarta, San Sebastián del Oeste y Zapopan noviembre, 2016 hasta noviembre, 2017*. ieeg.gob.mx/contenido/Municipios/pdf. Jalisco: IIEG.
- Jacobo-Pereira, C., Romo-Campos, R., y Flores, J. (2016). Seed germination of *Magnolia pugana* (Magnoliaceae), an endemic and endangered species from Western Mexico. In *Botanical Sciences*. 94:575–584.
- Kilkenny, F. F., y Galloway, L. F. (2008). Reproductive success in varying light environments: direct and indirect effects of light on plants and pollinators. *Oecologia*, 155(2):247–255.
- Kochmer, J. P., y Handel, S. N. (1986). Constraints and competition in the evolution of flowering phenology. *Ecological Monographs*, 56(4):303–325.
- Kovach W.L. (2009). *Oriana–Circular Statistics for Windows: version 4.0* Wales: Kovach Computing Services., Anglesey, Reino Unido, 196 pp.
- Lenza, E., y Klink, C. A. (2006). Comportamento fenológico de espécies lenhosas em um cerrado sentido restrito de Brasília, DF. *Revista Brasileira de Botânica*, 29(4): 627–638.

- Loubry, D. (1994). Phenology of deciduous trees in a French-Guianan forest (5 degrees latitude north)-case of a determinism with endogenous and exogenous components. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 72(12):1843–1857.
- Mantovani, M., Ruschel, A. R., Reis, M. D., Puchalski, A., y Nodari, R. O. (2003). Fenologia reproductiva de espécies arbóreas em uma formação secundária da floresta atlântica. *Revista Arvore*, 27(4):451–458.
- Marín, O., Castaño, G., y Gómez, G. (2012). Fenología del guamo *Inga edulis* (Fabales: Mimosoideae) en dos agroecosistemas del Quindío, Colombia. *Revista Investigaciones-Universidad del Quindío*, 23:127–133.
- Marques, M. C., y Oliveira, P. (2004). Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas Florestas de Restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 27(4):713–723.
- Mehltreter, K., y García-Franco, J. G. (2008). Leaf phenology and trunk growth of the deciduous tree fern *Alsophila firma* (Baker) DS Conant in a lower montane Mexican forest. *American Fern Journal*, 98(1):1–13.
- Meza, L., y López, J. (1997). Vegetación y mesoclimas de Guerrero. *Estudios florísticos en Guerrero*, 1–51 pp.
- Mir, A. H., Upadhaya, K., Odyuo, N., y Tiwari, B. K. (2017). Rediscovery of *Magnolia rabaniana* (Magnoliaceae): A threatened tree species of Meghalaya, northeast India. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 10(1):127–131.
- Morellato, L. P. C., Alberti, L., y Hudson, I. L. (2010). Applications of Circular Statistics in Plant Phenology: a Case Studies Approach. In: Hudson I., Keatley M. (eds.) *Phenological Research*. Springer, Netherlands, pp. 339–359. doi: [10.1007/978-90-481-3335-2_16](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3335-2_16)
- Morellato, L. P. C., Alberton, B., Alvarado, S. T., Borges, B., Buisson, E., Camargo, M. G. G., Cancian, L. F., Carstensen, D. W., Escobar, D.FE. Leite, P. T., Mendoza I., Rocha, N. MWB., Soares, N. C., Silva, T. S. F., Staggermeier, V. G., Streher, A. S., Vargas, B. C., Peres, C. A. (2016). Linking plant phenology to conservation biology. *Biological Conservation*, 195:60–72.

- Müller, A., y Schmitt, J. (2017). Phenology of *Guarea macrophylla* Vahl (Meliaceae) in subtropical riparian forest in southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 78 (2): 187–194.
- Nadia, T. d. L., Morellato, L. P. C., y Machado, I. C. (2012). Reproductive phenology of a northeast Brazilian mangrove community: Environmental and biotic constraints. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(9):682–692.
- Núñez-Cruz, A., Meave, J. A., y Bonfil, C. (2018). Reproductive Phenology and Seed Germination in Eight Tree Species From a Seasonally Dry Tropical Forest of Morelos, Mexico: Implications for Community-Oriented Restoration and Conservation. *Tropical Conservation Science*, 11:1–14.
- Ochoa-Gaona, S., Pérez Hernández, I., y De Jong, B. H. (2008). Fenología reproductiva de las especies arbóreas del bosque tropical de Tenosique, Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*, 56(2):657–673.
- Orozco Vílchez, L. (1991). Estudio ecológico y de estructura horizontal de seis comunidades boscosas en la Cordillera de Talamanca, CATIE, Turrialba, Costa Rica, 33 pp.
- Patrícia, L., Morellato, C., Talora, D. C., Takahasi, A., Bencke, C. C., Romera, E. C., y Zipparro, V. B. (2000). Phenology of Atlantic rain forest trees: a comparative study. *Biotropica*, 32(4):811–823.
- Peters, C., y Vásquez, A. (1988). Estudios ecológicos de Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) producción de frutos en poblaciones naturales. *Folia Amazónica*, 1(1–2):87–102.
- Pires, J. P. d. A., Silva, A. G. d., y Freitas, L. (2014). Plant size, flowering synchrony and edge effects: What, how and where they affect the reproductive success of a Neotropical tree species. *Austral Ecology*, 39(3):328–336.
- Preuhsler, T., Bastrup-Birk, A., y Beuker, E. (2006). Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests Part IX Phenological Observations. *United Nations Economic Commission for Europe Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution. International Cooperative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests*. (pp. 1–16). Finlandia, Carelia del Norte, (<http://www.metla.fi/eu/icp/phenology>).

- Rathcke, B., y Lacey, E. P. (1985). Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of ecology and Systematics*, 16(1):179–214.
- Richardson, A. D., Keenan, T. F., Migliavacca, M., Ryu, Y., Sonnentag, O., y Toomey, M. (2013). Climate change, phenology, and phenological control of vegetation feedbacks to the climate system. *Agricultural and Forest Meteorology*, 169:156–173.
- Rivers, M., Beech, E., Murphy, L., y Oldfield, S. (2016). Magnoliaceae. BGCI, Richmond, Reino Unido, 60 pp.
- Seghieri, J., Floret, C., y Pontanier, R. (1995). Plant phenology in relation to water availability: herbaceous and woody species in the savannas of northern Cameroon. *Journal of Tropical Ecology*, 11(2): 237–254.
- SEMARNAT. (2017). *La Biodiversidad en Estado de Jalisco*. (Vol. Volumen II). Secretaria de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial, Guadalajara, México, 385 pp.
- Shen, M., Piao, S., Cong, N., Zhang, G., y Jassens, I. A. (2015). Precipitation impacts on vegetation spring phenology on the Tibetan Plateau. *Global Change Biology*, 21(10):3647–3656.
- Singh, K., y Kushwaha, C. (2005). Diversity of flowering and fruiting phenology of trees in a tropical deciduous forest in India. *Annals of Botany*, 97(2):265–276.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J., y Lahoz León, M. (1979). *Biometría: principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Blume. Madrid, 832 pp.
- Stiles, F. G. (1977). Coadapted competitors: the flowering seasons of hummingbird-pollinated plants in a tropical forest. *Science*, 198(4322), 1177–1178.
- Terborgh, J. (1992). Diversity and the tropical rain forest: Scientific American Library. New York, EE. UU, xi + 242 pp.
- Toledo, C. V., Barroetaveña, C., y Rajchenberg, M. (2014). Fenología y variables ambientales asociadas a la fructificación de hongos silvestres comestibles de los bosques andino-patagónicos en Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4):1093–1103.
- Urrego, L. E., y Valle, J. I. d. (2001). Relación fenología-clima de algunas especies de los humedales forestales (guandales) del pacífico sur colombiano. *Interciencia*, 26(4):150–156.
- US/IBP (1972). *Report of the US/IBP Phenology Committee*. USA, 3–334 pp.

- Van Schaik, C. P., Terborgh, J. W., y Wright, S. J. (1993). The phenology of tropical forests: adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1):353–377.
- Vázquez-García, J. A., Neill, D. A., Shalisko, V., Arroyo, F., y Merino-Santi, R., (2018). *Magnolia mercedesiarum* (subsect. *Talauma*, Magnoliaceae): una nueva especie andina del norte de Ecuador, con ideas sobre su distribución potencial. *Phytotaxa*, 348(4), 254–268.
- Vázquez-García, J. A., Neill, D. A., Azanza, M., Pérez, Á. J., Dahua-Machoa, A., Merino-Santi, E. y Urbano-Præez, S. M. (2017). *Magnolia mindoensis* (subsect. *Talauma*, Magnoliaceae): una especie nueva del Chocó biogeográfico premontano en Colombia y Ecuador. *Brittonia*, 69(2):197–208.
- Vázquez-García, J., Neill, D., Asanza, M., Pérez, Á., Arroyo, F., Dahua-Machoa, A., y Merino-Santi, R. (2016). Magnolias de Ecuador: en riesgo de extinción. Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Ecuador, 140 pp.
- Vázquez-García, J.-A., Neill, D. A., y Asanza, M. (2015). *Magnolia vargasiana* (Magnoliaceae), a new Andean species and a key to Ecuadorian species of subsection *Talauma*, with notes on its pollination biology. *Phytotaxa*, 217(1):26–34.
- Vázquez-García, J.A., Muñiz-Castro, M.A., De Castro-Arce, E., Murguía-Araiza, R., Nuño-Rubio, A.T. y Cházaro-Basáñez, M.J. (2012c) Twenty new Neotropical tree species of *Magnolia* (Magnoliaceae). In: Salcedo-Pérez, E., Hernández-Álvarez, E., Vázquez García, J.A., Escoto-García, T. y Díaz-Echavarría, N. (Eds.) Recursos forestales del occidente de México: diversidad, manejo, aprovechamiento y conservación. Serie Fronteras de Biodiversidad. Universidad de Guadalajara CUCEI-CUCBA, Guadalajara, México. vol. 4 (t1), pp. 91–130.
- Vázquez-García, J. A. (1994). *Magnolia* (Magnoliaceae) in México y central America: A synopsis. *Brittonia*, 46:41–23.
- Vogado, N. O., de Camargo, M. G. G., Locosselli, G. M., y Morellato, L. P. C. (2016). Edge effects on the phenology of the guamirim, *Myrcia guianensis* (Myrtaceae), a cerrado tree, Brazil. *Tropical Conservation Science*, 9(1):291–312.
- White, L. J. (1994). Patterns of fruit-fall phenology in the Lopé Reserve, Gabon. *Journal of Tropical Ecology*, 10(3):289–312.

- Williams-Linera, G., y Meave, J. (2002). Patrones fenológicos. *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. RM Guariguata y GH Kattan (eds.). Libro Universitario Regional, San José, Costa Rica, 591–624 pp.
- Wright, S. J., y Calderón, O. (1995). Phylogenetic patterns among tropical flowering phenologies. *Journal of Ecology*, 83:937–948.
- Zhao, J., Zhang, Y., Song, F., Xu, Z., y Xiao, L. (2013). Phenological response of tropical plants to regional climate change in Xishuangbanna, south-western China. *Journal of Tropical Ecology*, 29(2):161–172.

CAPÍTULO III

Estimulación *in vitro* de proliferación de yemas apicales en tres especies de *Magnolia* (secc. *Magnolia*, Magnoliaceae) del occidente de México en peligro de extinción

Alex Dahua-Machoa, Liberato Portillo, J. Antonio Vázquez-García, Miguel A. Muñoz-Castro, Gerardo Hernández-Vera.

Laboratorio de Biotecnología e Instituto de Botánica, Departamento de Botánica y Zoología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuaria, Universidad de Guadalajara, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, C.P.45220, Jalisco, México.

RESUMEN

La proliferación de brotes vegetales en yemas apicales bajo cultivo *in vitro* son una alternativa eficaz para la propagación de especies amenazadas con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superando las dificultades reproductivas, contribuyendo a su conservación. Se buscó desarrollar un protocolo para inducir proliferación de brotes apicales en tres especies de *Magnolia* en peligro de extinción (*M. vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana*). La primera fase de inducción incluyó nueve tratamientos, tres medios para cada especie: a) 6-bencilamina (0.5 mg/L) con Polivinilpirrolidona (1 g/L); b) 6-bencilamina (0.4 mg/L) con ácido naftalenacético (0.1 g/L); c) 6-bencilamina (0.5 mg/L) con carbón activado (1 g/L). La segunda fase consistió en sólo dos tratamientos para una sola especie, *M. pugana*: d) 6-bencilamina (0.7 mg/L); y e) ácido naftalenacético (0.1 mg/L). Se evaluaron índices biométricos: longitud de callo, brotes, hojas, número de brotes, número brotes, número de hojas, longitud y ancho de la hoja. El mejor efecto entre especies se observó en *M. pugana* que mostró diferencias significativas en crecimiento en comparación con *M. vallartensis* y *M. pacifica*. El mejor efecto entre medios de reguladores fue para el ácido naftalenacético, el cual mostró diferencias significativas en crecimiento con respecto de los otros medios. Cada especie reaccionó a diferentes dosis ya que se necesitan concentraciones específicas y diferentes medios. El tiempo transcurrido, entre la recolecta del material vegetal y su procesamiento en el laboratorio, fue un posible factor en el impedimento del desarrollo de dos de las especies más remotas [*M. vallartensis* (12 h) y *M. pacifica* (9) vs. *M. pugana* (2)].

ABSTRACT

The vegetative proliferation in apical buds under *in vitro* culture is an effective alternative for the propagation of threatened species in order to rapidly increase the number of individuals, overcoming reproductive difficulties, contributing to their conservation. We sought to develop a protocol to induce proliferation of apical buds in three *Magnolia* species in danger of extinction (*M. vallartensis*, *M. pacifica* and *M. pugana*). The first induction phase included nine treatments, three culture media for each species: a) 6-benzylanine (0.5 mg / L) with Polyvinylpyrrolidone (1 g / L); b) 6-benzylanine (0.4 mg / L) with naphthaleneacetic acid (0.1 g / L); c) 6-benzylanine (0.5 mg / L) with activated carbon (1 g / L). The second phase consisted of only two treatments for a single species, *M. pugana*: d) 6-benzylanine (0.7 mg / L); and e) naphthaleneacetic acid (0.1 mg / L). Biometric indexes (callus length, buds, leaves, number of shoots, number of shoots, number of leaves, length and width of the leaf) were evaluated, in addition physiological changes were observed. The best effect between species was in *M. pugana*, which showed significant differences in relation with the other two species was observed in better physiological appearance. The best effect between culture media was for naphthaleneacetic acid, which showed significant differences with the other media. The medium polyvinylpyrrolidone showed less significant differences, in addition, the activated carbon medium showed absorption of phenols. Each species reacts at different media and need specific concentrations. The time of collection and translation of buds was a possible factor that affected the development of two of the most remote species [*M. vallartensis* (12 h) and *M. pacifica* (9) vs. *M. pugana* (2)].

ICHILLAYACHISHKA YUYAY

Kay wiñachina ichilla ramallullukmanta apasha amawllarurayma, rikuchin kikin mirachinakunta ichilla ruya wawakunata. Chirayku maskaranchik wiñachik yakukunata kay kinsa sami puya kaspi rukunay. Punta llankaywan kallairanchik kinsa sami llulluk pankaruyawan (*M. vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana*), wiñacikuna tuprinajun kinsa sami chapushka, kaypi rikuchini: a) 6-bencilamina (0.5 mg/L) con Polivinilpirrolidona (1 g/L); b) 6-bencilamina (0.4 mg/L) con ácido naftalenacético (0.1 g/L); c) 6-bencilamina (0.5 mg/L) con carbón activado (1 g/L). chaymanta washa kamarani tarpusha amawllarurayma shuk ruyallan, *M. pugana*, kay ishkar chapuska yakuwan, d) 6-bencilamina (0.7 mg/L); y e) naftalenacético

(0.1 mg/L). chinanta tupuranchi kaykuna wiñarishkay; llulluk, muku, panka, llulluk llukshirishkakunata, chinanta panka tullukuna wañutaswas killkaranchik. Tuparira, puya kaspi *M. pugana* llulluk tullu wiñarira allita, shukunawan rikukpi, chinanta wiñachik yaku chapuak, wiñachira kay 6-bencilamina (0.4 mg/L) con ácido naftalenacético (0.1 g/L) chinanta, kay ashilla wikita rickuchia carbón activado niska. Ruya wiñarira ushaskallama chutarisha, chirayku yuyarishkaranchik, kay kuna minishitinajun karan sami wiñachik yakuta, ashilla, ashka chapuska wiñachikwan. Chaymanta kay karumanta apakrishka panka tullu llulluk kuna wañurishkashina tukushakunata tarpuranchik, chiraykucha mana alita wiañarira ka ishakay puya kaspi ruya *M. vallartensis*, *M. pacifica*.

3.1 INTRODUCCIÓN

El género *Magnolia*, es considerado uno de los grupos basales más antiguos de las angiospermas (Cronquist, 1968). A nivel mundial, la diversidad se estima en 350 especies, ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales de Asia y América (Vázquez-García *et al.*, 2016). En México existen 40 especies de *Magnolia* que representan el 11% del total en el mundo (Vázquez-García *et al.*, 2016), se distribuyen en los estados de Sonora, Chihuahua, Durango, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas. En Jalisco actualmente se conocen seis especies, tres de estas se incluyen en la sección *Magnolia*: *M. vallartensis* A.Vázquez y Muñoz-Castro; *M. pacífica* A.Vázquez; y *M. pugana* (Iltis y A.Vázquez) A.Vázquez y Carvajal, que se distribuyen en la costa norte de Jalisco, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur, Región de Cañones de Jalisco y Zacatecas. Las magnolias de la sección *Magnolia* de Jalisco son árboles de 6-30 m de altura, hasta 150 cm de DAP, de hojas perennes, con flores grandes, fragantes de color blanco-crema, de clima templado, que prosperan favorablemente en el bosque mesófilo de montaña y bosques de galería en regiones de cañones (Vázquez-García *et al.*, 2012c; Vázquez-García *et al.*, 2015). La reproducción de estas especies se dificulta en cierto grado, ya que existe aborto en sus etapas de floración y fructificación, reportado en el segundo capítulo; sólo *M. pugana* presenta cierto éxito en su reproducción. Sin embargo, en la actualidad, las poblaciones de estas especies están amenazadas por la expansión de la frontera agropecuaria, la deforestación y la

alteración de sus hábitats, ocasionando que muchas especies disminuyan drásticamente sus poblaciones, en muchos casos quedando en peligro de extinción.

Frente a esta realidad el cultivo *in vitro* es utilizado cada vez más como una alternativa eficaz para la propagación de especies amenazadas y en peligro, ya que ofrece una alternativa para obtener germoplasma desde brotes por proliferación u organogénicos, hasta embriones somáticos con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos; superando problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionando material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir con ello a la conservación de la biodiversidad a mediano y largo plazo (Sospedra *et al.*, 2003; Ardisana *et al.*, 2017).

Existen pocos trabajos sobre micropropagación *in vitro* en magnolia. Por ejemplo, Cardozo-Pinzón *et al.* (2017) emplearon discos de fragmentos de hoja y segmentos de pecíolo de la especie colombiana *M. hernandezii* (Lozano) Govaerts, logrando la formación de callos de tamaño pequeño. Otros trabajos se han dirigido con fines comerciales, principalmente a la respuesta de crecimiento *in vitro* de los híbridos *M. × soulangeana* Soul.-Bod. y *M. × liliiflora* Desr., [*M. stellata* (Siebold & Zucc.) Maxim.], de la serie de *M. 'niña'* (*M. liliiflora* × *M. stellata*), y la *Magnolia yellowblooming*, cruces entre *M. acuminata* (L.) L. y *M. heptapeta* (Buc'hoz) Dandy (Biedermann, 1985; Kamenická *et al.*, 2001; Parris *et al.*, 2012; Radomir, 2012). Otras especies de *Magnolia* se han estudiado con fines farmacológicos, en donde se apoya la conservación *in vitro* del patrimonio genético de genotipos raros y amenazados (Merkle y Wiecko, 1990; Parris *et al.*, 2012). La regeneración de brotes axilares de los híbridos *M. × soulangeana*, y *M. 'Ann'* (Ser. Little Girl) ha sido difícil, lo cual ha limitado su conservación *ex situ* (Radomir, 2012; Sokolov *et al.*, 2014; Sokolov *et al.*, 2015; Wojtania *et al.*, 2015). En México hay pocos trabajos sobre cultivos *in vitro* de especies de árboles forestales amenazadas, como el de las especies de *M. macrophylla* subsp. *ashei* [*M. ashei* Weath.] Spongberg. y *M. macrophylla* subsp. *dealbata* [*M. dealbata* Zucc.] a partir de meristemas apicales (Folgado y Thibault, 2015; Sánchez-Velásquez *et al.*, 2008). En el presente trabajo se persigue el siguiente objetivo:

3.1.1 Objetivo específico

Desarrollar un protocolo de proliferación de yemas en *M. vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana* a partir de meristemas apicales.

3.1.2 Hipótesis específica

Magnolia vallartensis, *M. pacifica* y *M. pugana* bajo condiciones de establecimiento en cultivo *in vitro* y luego de la estimulación con reguladores de crecimiento, producen brotes de yemas apicales en un período de 30 días.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Recolecta de material vegetal

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología de la Universidad de Guadalajara. **El material vegetal** se colectó en tres localidades: “Palo María”, Municipio de Puerto Vallarta (*M. vallartensis*), “Bosque el Saucito”, Mpio. de San Sebastián del Oeste (*M. pacifica*), “Bosque de San Francisco” Mpio. de Zapopan (*M. pugana*), a partir de especímenes adultos (ver capítulo 2 para mayor detalle). Fueron seleccionados 15 brotes de yemas apicales por especie, mismos que se conservaron y trasladaron en frascos húmedos, hasta laboratorio para su procesamiento.

3.2.2 Desinfección de material vegetal

Inicialmente, las yemas apicales de magnolias fueron reducidas en tamaño hasta 2.5 cm de largo, luego se realizó un enjuague con agua destilada, escurridos en un papel filtro y colocados en cajas Petri. La desinfección se realizó en la cámara de flujo laminar donde se aplicó una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% y tres gotas de detergente, en agitación durante 20 min, seguido por un triple lavado con agua estéril durante 10 min. Consecutivamente, las yemas apicales se colocaron en una caja de Petri y se procedió una segunda reducción del material vegetal desinfectado, con la ayuda de pinzas, bisturí y mechero de alcohol. Se desprendió la envoltura externa de los brotes y los residuos de la base de tejido de yemas apicales, y fueron retirados hasta un tamaño de 0.7–0.8 cm de largo. Al momento del establecimiento, se colocó una yema apical por cada frasco de ensayo con rosca de 10.5 × 5.1 cm con 20 ml de medio de cultivo.

3.2.3 Fases de experimentación para la proliferación de yemas apicales

Para la primera fase de experimentación las tres especies de magnolias se sometieron a tres

medios distintos de estimulación, seleccionados de experimentos previos: a) 6-bencilamina (BA), 0.5 mg/L, con polivinilpirrolidona (PVP), 1 g/L; b) 6-BA, 0.4 mg/L con ácido naftalenacético (ANA), 0.1 mg/L; y c) 6-BA, 0.5 mg/L con carbón activado (CA), 1 g/L. Las dosis de los medios a y c son de acuerdo a Parris *et al.*, (2012) y la dosis del medio b fue tomada de Radomir (2012) (cuadro 9).

En la segunda fase de experimentación se probó el efecto independiente de (BA 0,7 mg/L), Parris *et al.*, (2012) y (ANA, 0.1 mg/L) Radomir (2012), solamente con una especie (*M. pugana*) cuadro 1.

En ambas fases de experimentación el medio de cultivo empleado fue medio sólido, MS (Murashige y Skoog, 1962) ajustados a un pH de 5.8, solidificados con agar 8 g/L y esterilizados en húmedo en autoclave a 120°C durante 20 min. Una vez realizado el establecimiento del material vegetal en recipientes de vidrio con 20 ml de medio, éstos se incubaron en cuarto de crecimiento con temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$, bajo fotoperiodo de 16 h luz, con lámparas de luz blanca a una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

3.2.4 Mediciones y observaciones

En la primera fase las observaciones de contaminación y oxidación se contabilizaron desde la primera semana para obtener un porcentaje de incidencia; sin embargo, las variables de respuesta (longitud de brotes, formación de callos, proliferación de brotes y número de hojas) se midieron cada dos semanas hasta completar 14 semanas, tiempo en el cual concluyó la primera fase experimentación.

En la segunda fase se evaluaron las variables de repuestas (número brotes, número de hojas, longitud y ancho de la hoja) durante ocho semanas.

Para toda la fase se observó la senescencia que fue identificada por la pérdida de turgencia de los órganos vegetales y amarillamiento, en este proceso cada vez que se observó, se traspasó el tejido al nuevo medio de MS, y luego a proceder con la medición de su desarrollo.

3.2.5 Diseño experimental y análisis de datos

Para la primera fase el diseño experimental fue bifactorial y contó con un total de nueve tratamientos (tres especies de magnolia en interacción con tres medios-dosis de

estimulación), con cinco repeticiones, para generar un total de 45 unidades experimentales; cada una de las cuales contó con una yema apical de 0.7-0.8 cm de largo. Mientras que, para la segunda fase del experimento, se utilizaron brotes *in vitro* de *M. pugana* para comparar los medios con BA y ANA. También se contó con cinco repeticiones para integrar diez unidades experimentales, cada una con brote.

Los datos obtenidos de ambas fases se analizaron estadísticamente con Statgraphics® (v.18), mediante análisis de varianza (ANVA), $p=95\%$. Se realizó una comparación múltiple de medias entre genotipos, medios e interacciones cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Contaminación

Durante el establecimiento de cultivo *in vitro*, cada especie mostró un porcentaje diferente de contaminación: en *Magnolia vallartensis* fue alta (15%), media en *M. pacifica* (9%) y baja en *M. pugana* (6%), en correspondencia a la distancia y tiempo de recolecta. La contaminación fue intensa en las primeras cuatro semanas y en las diez semanas restantes no hubo contaminación en los medios sólidos.

3.3.2 Oxidación

La oxidación en los medios combinados de BA + ANA y BA + PVP, para las tres especies, se observó desde la segunda semana, con mayor oxidación o ennegrecimiento en la base de las yemas; este fenómeno se incrementó con el tiempo. El medio BA + CA mostró, para las tres especies, lenta oxidación entre 45–95 días. Para cada una de las especies la oxidación fue distinta: en *Magnolia vallartensis* fue del 13%, *M. pacifica* (10%), y *M. pugana* (8%); sin embargo, solo las yemas apicales *M. pugana* resultaron viables.

3.3.3 Primera fase de proliferación de yemas apicales

Crecimiento de Brotes

En la primera fase del experimento se midieron los resultados de las siguientes variables:

A) Efecto entre los medios: El crecimiento de brotes (longitud de brotes) en los distintos medios si presentó diferencias ($p < 0.05$) desde la semana catorce. El medio ANA mostró mayor longitud de brotes con media de 5.0 cm en comparación con las dosis PVP y CA (2.5 y 3.1 cm), respectivamente. Este efecto entre los medios se mantuvo hasta catorce semanas (fin del experimento). B) Efecto entre las especies: Éste no mostró diferencias significativas, sólo durante la semana doce mostró una diferencia cuasi significativa ($p = 0.053$). *Magnolia pugana* fue la especie que produjo brotes de mayor longitud, 4.3 cm en promedio, en comparación con *M. vallartensis*, *M. pacifica* con promedios de 3.0 y 3.2 cm, respectivamente. C) Interacción entre medios y especies: Ésta no presentó diferencias significativas; y se observó que el medio ANA produjo mayor crecimiento de brotes y menor en el medio de PVP, en las especies de *M. pugana* y *M. pacifica*, en cultivo *in vitro* (Fig. 7a).

Formación de callos:

La formación de callos mostró diferencias en el efecto entre medios ($p < 0.05$) solo en la semana catorce. El medio ANA mostró mayor formación de callo en la base de las yemas apicales, con 3.6 cm en promedio, en comparación con los medios de PVP y CA, con 1.6 y 1.4 cm, respectivamente. El efecto entre especies también presentó diferencias ($p < 0.05$) solo en la semana doce. *Magnolia pugana* mostró 3.0 cm en promedio, en comparación con las especies de *M. pacifica* y *M. vallartensis* que mostraron 2.0 y 1.7 cm, respectivamente. Al final de experimento la interacción de medios y especies no presentó diferencias; y se observó que el medio ANA produjo mayores cúmulos de callos y menor en el medio PVP, en especies de *M. pugana* y *M. pacifica* en cultivo *in vitro* (Fig. 7b).

Nuevos brotes:

La proliferación de nuevos brotes presentó diferencias en el efecto entre medios ($p < 0.05$) solo en la semana diez. El medio ANA mostró 3.8 brotes en promedio, en comparación con los medios de PVP y CA, con 2.1 y 2.2 brotes, respectivamente. Este efecto se mantuvo hasta catorce semanas (fin del experimento). El efecto entre especies mostró diferencias ($p < 0.05$), solo en la semana catorce. *Magnolia pugana* mostró 4.4 brotes en promedio, en comparación con las especies de *M. pacifica* y *M. vallartensis* que mostraron en promedio 2.0 y 1.5 brotes,

respectivamente. Al final de experimento, la interacción de medios y especies no presentó diferencias. Se observó que el medio ANA produjo mayor proliferación de brotes, y ésta fue menor en los medios PVP y CA en especies de *M. pugana* y *M. pacífica* en cultivo *in vitro* (Fig. 7c).

Longitud de hojas:

La longitud de hojas no presentó diferencias en el efecto entre medios. Los medios de ANA, PVP y CA mostraron de 2.2, 1.3, 0.9 cm en promedio hasta semana catorce. El efecto entre especies mostró diferencias ($p < 0.05$) solo en la semana catorce. *Magnolia pugana* mostró 2.6 cm en promedio, en comparación con las especies de *M. pacífica*, *M. vallartensis* mostraron en promedio 0.9 y 0.2 cm respectivamente. Al final de experimento, la interacción de medios y especies no presentó diferencias. Se observó medio ANA produjo mayor longitud de hojas y menor en el medio PVP, en especie de *M. pugana* en cultivo *in vitro* (Fig. 7d).

3.3.4 Segunda fase de proliferación de yemas apicales

En la segunda fase del experimento independientemente la dosis ANA y BA en especie de *M. pugana* muestran algunas variables con significancias estadísticas entre el efecto de medios de estimulación durante el experimento (Fig 8.).

Índices biométricos:

El número de brotes mostró diferencias el efecto entre medios ($p < 0.05$) solo en la sexta semana. El medio ANA mostró 5.8 brotes en promedio, en comparación con el medio de BA, con 4.4 brotes, respectivamente. Este efecto se mantuvo hasta ocho semanas (fin del experimento). El número de hojas mostró diferencias el efecto entre medios ($p < 0.05$) hasta la sexta semana. El medio ANA mostró 12.8 hojas en promedio, en comparación con el medio de BA, con 9.6 hojas, respectivamente. La longitud de hoja mostró diferencia ($p < 0.05$) solo en la semana siete. El medio ANA mostró 9.8 brotes en comparación con el medio BA, con 4.6 brotes, respectivamente. El ancho de hoja no mostró diferencia entre el efecto de medio, en la última semana el medio de ANA mostró 5.8 cm en promedio y el medio BA mostró 6.0 cm, respectivamente.

3.3.5 Observaciones de cambios fisiológicos en las dos fases:

En las observaciones de desórdenes fisiológicos mostraron similares apariencias en los medios de PVP y ANA. Se observó desde la semana siete la formación de callos en yemas apicales en las especies de *Magnolia vallartensis* (Figs. 9a-c) y *M. pacifica* (Fig. 9d-f). La senescencia prematura se observó en el medio CA, iniciando desde la semana ocho en *M. vallartensis* y seguido en *M. pacifica*.

Las hojas amarillentas por pérdida de clorofila se mostraron hasta la semana diez. Las hojas de mayor tamaño fueron más claramente distinguibles el amarillamiento en medio de PVP (Fig. 9g). Un fenómeno interesante mostró en la dosis ANA. Las hojas y los brotes permanecieron verdes, ya que el medio promovió el desarrollo de yemas verdosas (Fig. 9h). Sin embargo, el medio independientemente (no combinado) de BA mostró marchitamiento de color verde amarillento en toda su estructura de yemas apicales, probablemente relacionado a una baja concentración de clorofila, como se observa en *M. pugana* (Fig. 9i).

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Contaminación

El protocolo aplicado de desinfección para las tres especies de magnolias permitió obtener un 70% sin contaminación. *Magnolia vallartensis* obtuvo mayor contaminación que en *M. pacifica* y *M. pugana*. A pesar de que se ejecutaron experimentos donde se estableció el proceso de desinfección de 20 min, el material presentó hongos y las yemas fueron inviables en los primeros ensayos, sin embargo, se ajustó el protocolo de agitación con 10 min, lo que resultó en una mejor desinfección, en comparación con el de 20 min. Según, sugieren Esquivel y Escalant (1994), la contaminación está ligada a la concentración del desinfectante y no al tiempo de inmersión, e indican que la utilización de bajas concentraciones de NaClO, a corto tiempo de inmersión, se obtiene el mayor porcentaje de explantes no contaminados. La efectividad de estas sustancias químicas depende del tipo de genotipo, ya que los genotipos leñosos tienen un lento crecimiento y se exponen por más tiempo a microorganismos que son difíciles de erradicar (García-Lozano *et al.*, 2015). Experimentos similares en *M. herandezii*, emplean varios agentes de desinfección: Tween 40 (agitados por 10 min), NaClO al 14% (agitados por 20 min) y alcohol al 70% (agitados por 15 min) y logran un 80% del material vegetal sin contaminación (Cardozo-Pinzón *et al.*, 2017; Ramos, 2012), mientras

que en *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg, cuando se suministra la desinfección con NaClO al 14% (agitado por 10 min) se reporta una contaminación de 10% (Sospedra *et al.*, 2003). En otros experimentos con especies de magnolias se ha aplicado ácido indolbutírico para evitar los compuestos fenólicos (Sospedra *et al.*, 2003).

3.4.2 Oxidación

Durante la fase, se observó oxidación fenólica y ligero ennegrecimiento en la base de yemas apicales. *Magnolia vallartensis* mostró un alto compuesto fenólico (que afecta en la formación de brotes) en comparación con *M. pacifica* y *M. pugana*. El tiempo de colecta y el traslado probablemente afectó produciendo una alta oxidación en *M. vallartensis*. Este fenómeno se muestra en el establecimiento *in vitro* en los medios combinados de BA con PVP, ANA y se controló en su mayor oxidación, sin embargo, en el medio CA resultó en una oxidación ligera, es posible que este medio absorbe los compuestos de fenoles. La oxidación fenólica aparece del resultado de cortes durante la preparación de yemas y de la acción de agentes desinfectantes sobre el tejido dañado que muestra un serio problema para la proliferación de yemas. Los fenoles son benéficos en medio natural, ayudan a la recuperación de la planta mientras en el uso artificial el compuesto fenólico en mayor cantidad es perjudicial, ya que no ayuda a la proliferación de brotes. En otros trabajos mencionan que las plantas leñosas presentan metabolitos secundarios de variada estructura y con diversas clases de biosintetizados de productos naturales, derivados de las ligninas, fenilpropanoides y flavonoides (Boudet, 2007). Se ha demostrado que la regulación del metabolismo secundario está estrechamente relacionada con el metabolismo del carbono y el nitrógeno, además, los fenilpropanoides pueden ser inducidos por diversas tensiones, baja o aumento disponibilidad de nutrientes, lo cual produce fenoles (Palacios-Rojas *et al.*, 2006; Rühmann *et al.*, 2002). Resultados similares se muestran en las concentraciones de BAP y ANA donde a menor concentración, hay mayor estimulación de sustancias fenólicas; y, a mayor concentración, se reduce la oxidación (Wojtania *et al.*, 2015). La especie *M. × soulangiana* tuvo actividad fenólica, al igual que *Malus × domestica* (Suckow) Borkh., la cual cambia según la abundancia de citocinina, el nitrógeno, los niveles de sacarosa y de su interrelación, esto hace que se reduzca significativamente la formación de brotes (Lux-Endrich *et al.*, 2000; Wojtania *et al.*, 2015). Siempre se ha manifestado este fenómeno de oxidación en las especies de

magnolias y ha sido reportado por causa de los compuestos fenólicos (Biedermann, 1985; Kamenicka, 1998).

3.4.3 Primera fase de proliferación de yemas apicales

Los resultados sugieren que se rechaza la hipótesis de obtención de proliferación en tiempo corto de las tres especies, al contrario, se sugiere que cada especie muestra estimulaciones en diferentes concentraciones y en diferentes medios de MS, y señalan que las magnolias tienen requisitos específicos (Kamenická *et al.*, 2001; Parris *et al.*, 2012). Sin embargo, existen pocos trabajos que han abordado la especificidad de las especies en el rendimiento de explantes (Sokolov *et al.*, 2014). Los mejores resultados de proliferación se obtuvieron en medio combinado BA con ANA como muestra el efecto significativo con todas las variables de respuesta.

Crecimiento de Brotes:

Los datos de longitud de brotes mostraron mayor desarrollo en el medio de BA 0.4 mg/L + ANA 0.1 mg/L, el cual los indujo significativamente, y en menor desarrollo en los medios BA 0.5 mg/L + PVP 0.5 mg/L y BA 0.5 mg/L + CA 1 g/L; los fenoles causaron un desarrollo lento de brotes durante 8 semanas, subsecuentemente, se mostraron un importante desarrollo en las últimas semanas del experimento. Otros estudios mencionan que el medio de BA muestra estimulación significativa en la formación de brotes en *M. × soulangiana*, pero el efecto depende del nitrógeno y de los niveles de sacarosa (Wojtania *et al.*, 2015). Estudios similares, revelan que en *M. punduana* (Hook. f. & Thomson) Figlar, el brote de yemas axilares produce mejores explantes y seguido de explantes nodales en el crecimiento de brotes con dosis BAP a 0.5 mg/L, el cual fue el mejor en la estimulación de brotes con un 82.3% (Borah *et al.*, 2017). Además, es aconsejable coleccionar brotes de plántulas ya que poseen tejidos muy activos y menor producción fenólica.

Formación de Callos:

La formación de callo fue fundamental para las tres especies en el medio BA 0.4 mg/L con ANA 0.1 mg/L. En *M. vallartensis* la producción de callos fue alta pero la producción de brotes fue nula. En *M. pacifica* el desarrollo inicial de callos y de brotes fue intermedio, pero

al final se desecaron. En *Magnolia pugana* la producción de callos fue intermedia, pero la producción de brotes fue alta y los brotes y callos se conservaron vivos. La manera más eficaz de formación de brotes fue obtenida con callos en medios de baja y alta concentración iónica. Además, se ha demostrado que el medio de ANA, incluso a bajas concentraciones, causa pardeamiento de los explantes y formación de callo (Kamenická *et al.*, 2001; Parris *et al.*, 2012; Sokolov *et al.*, 2014). Sin embargo, en trabajos recientes en *M. punduana* se encontró que la concentración de IAA en 0,5 mg/L y 2,4-D a 1,0 g/L, fueron las más adecuadas en estimulación de callos (Borah *et al.*, 2017).

Nuevos Brotes:

Los resultados observados en proliferación de nuevos brotes en la base de yemas laterales se revelaron en la semana catorce con diferencias significativas tanto en medios como entre especies. Lo que indica que a medida que se iban desarrollando los callos aparecían nuevos brotes, esto hace que aumente paulatinamente su proliferación en combinación de BA 0,4 mg/L con ANA 0.1 mg/L. La reacción de nuevos brotes fue similar en *Magnolia pacifica* y *M. vallartensis*; después de un tiempo algunas yemas en el medio Murashige y Skoog no prosperaron. *M. pugana* fue la que sobrevivió durante el experimento y manifestó producción de brotes de manera significativa. La combinación de hormonas citoquininas y auxinas son necesarias para inducir un mayor número de brotes (Ajithkumar y Seeni, 1998). Un caso similar se observó en *M. × soulangeana* y *M. liliiflora*, el efecto de sales en la proliferación de nuevos brotes se presentó en 8 semanas a un tamaño de 4 a 5 mm de largo, para proceder a la fase multiplicación. Además, el medio BAP (0.25 mg/L) mostró ser más eficaz para estimular la proliferación de los explantes. El medio BA a 1.0 mg/L con ANA causó menor aumento de la tasa de proliferación (Sokolov *et al.*, 2014). En el medio sólido con el 100% de las sales de nitrógeno, en presencia de BA (0.2 mg/L) + sacarosa (20 g/L) se obtuvo un promedio de 4.8 brotes laterales (Wojtania *et al.*, 2015).

Longitud de hoja:

Los efectos de la longitud de la hoja se muestran en el material sano, las primeras hojas aparecen después de perder las estípulas que cubren la hoja. Sin embargo, las hojas aparecen dependiendo del número brotes basale y la sobrevivencia de yemas apicales y fue significativa

en *Magnolia pugana*. En la segunda fase, *M. pugana* en los medios independientes ANA y BA, presentó la longitud de la hoja como estadísticamente significativa, mientras que, el ancho de hojas resultó homogéneo y el promedio de la longitud de la hoja fue mayor que resultados evaluadas la fase previa.

3.4.4 Segunda fase de proliferación de yemas apicales

Índices biométricos:

Los brotes de *Magnolia pugana*, al inicio de la segunda fase, se transfirieron de BA + ANA, a medios independientes BA y ANA, respectivamente, lo cual causó una demora en la producción de brotes laterales. Trabajos similares reportan que, al transferirlos a la fase de multiplicación, muchos de los brotes retardan su desarrollo, como el de *M. stellata* en los medios de BAP (Radomir, 2012).

El número de hojas se mostró mayor en el eje de la yema principal, debido a que los brotes laterales ejercieron solo proliferación de nuevos brotes. El medio con ANA es el que presentó formación de hojas nuevas. En otros trabajos se menciona que los rebrotes cultivados libres de citocinina presentaron un reducido número de hojas y hojas de mayor tamaño. También en la segunda fase se observaron interesantes cambios para la proliferación, fue obligatorio combinar mayores concentraciones de BA y ANA ya que son necesarios (Sokolov *et al.*, 2015).

El proceso de defoliación dentro del medio se mostró en las dos fases del experimento. Casos diferentes predicen que en los medios utilizados como cultivo de *Vitis* medio (VM), el crecimiento del número, ancho y longitud de hoja es más influenciado en las dos especies de magnolia (*M. × soulangeana* y *M. liliiflora*), al igual en cultivo de Murashige y Skoog (MS), Anderson's Rhododendron Media (RM), Gamborg (B5) y Westvaco (WV3), (Sokolov *et al.*, 2014). Los mejores resultados obtenidos en términos de porcentaje de explantes ha sido la tendencia positiva con combinación 0.7 mg/L de BA, 1 mg/L, de ANA, 0.1 mg/L, de AG3, 5 mg/L de ácido ascórbico y vitaminas LS (V.7) (Radomir, 2012). Estudios recientes mostraron que *M. × soulangeana*, estimulada por BA fue significativo.

3.4.5 Observaciones de cambios fisiológicos en las dos fases

Los brotes de yemas apicales se van inclinando hasta caer en la superficie del medio, iniciando así la formación de callos. Por tal razón, los medios aplicados (BA + ANA; BA + PVP y BA + CA) no fueron adecuados para el desarrollo de brotes basales en *M. vallartensis* y *M. pacifica*. El comportamiento de magnolias en los medios reguladores resultó en cambios como el amarillamiento de las hojas y yemas. Pareciera que la oxidación por fenoles hace que pierda toda los nutrientes y el tiempo de permanencia en el medio indica un envejecimiento de las yemas apicales. Casos similares, han reportado para *Prunus cerasifera* Ehrh. y *Magnolia* sp. que en las primeras etapas el numero de hojas, brotes son significativos y que con el tiempo muestran formación de callos con la deficiencia de Fe (los primeros síntomas de clorosis y hiperhidricidad) (Wojtania *et al.*, 2015). Las hojas amarillentas, y la pérdida de la clorofila se ha observado claramente en las venas y, especialmente en la mitad superior de la hoja (Sokolov *et al.*, 2015). En otros casos como en *M. × soulangeana* y *M. liliiflora* las concentraciones superiores a 0.25 mg/L BAP combinado ANA, de ambos genotipos, mostraron deformaciones, ennegrecimiento foliar, formación de callo, reducción de los retoños y síntomas de hiperhidricidad (Sokolov *et al.*, 2014).

3.5 A G R A D E C I M I E N T O S

Se agradece a la Universidad de Guadalajara-CUCBA, Maestría BIMARENA y al Departamento de Botánica y Zoología. Al CONACyT-México por la beca de posgrado del primer autor. JAVG agradece además al SNI y a PROMEP-SEP por el apoyo financiero. Agradecemos a los revisores del manuscrito sus valiosas observaciones, y apreciamos la ayuda del personal del laboratorio de cultivo *in vitro* por facilitar todo los insumos y materiales, los asistentes y estudiantes, Lourdes, Mario, Jovani, Dra. Ana Lilia, y apreciamos la asistencia en campo de Alex Zabalgoitia, Ana Nuño, Neill Gerlowski, Claudia Méndez, Luis Sanchez, Javier Rendón, Juvenal Parada, Cynthia Martínez y Carlos García. Un agradecimiento muy especial a quienes apoyaron generosamente la logística de la investigación: Ralph Osborne, Neill Gerlowski, Weerakit Harnparinphan y Christina Martell.

3.6 LITERATURA CITADA

- Abdelnour Esquivel, A., y Escalant, J. V. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, CATIE/CEE/CIRAD, CR. p.38.
- Ajithkumar, D., y Seenii, S. (1998). Rapid clonal multiplication through in vitro axillary shoot proliferation of *Aegle marmelos* (L.) Corr., a medicinal tree. *Plant Cell Reports*. **17** : 422-426.
- Biedermann, I. E. (1985). Factors affecting establishment and development of *Magnolia* hybrids *in vitro*. *Paper presented at the Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants* 212. pp. 625-630.
- 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** : 153-159.
- Boudet, A.-M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*. **68** : (22-24), 2722-2735.
- Cardozo Pinzón, J. S., Marín Valencia, B. S., Godoy Castaño, J. S., y Suárez Román, R. S. (2017). Propagación *in vitro* de *Magnolia Hernandezii* (Molinillo) a partir de hojas. *Magazine of the Colombian Association of Biological Sciences (ACCB)*. **1** : 29.
- Cronquist, A. (1968). The evolution and classification of flowering plants. In *The evolution and classification of flowering plants*. New York, USA.
- Folgado, R., y Thibault, T. Application of micropropagation and cryopreservation techniques for the ex situ conservation of *Magnolia* spp. The Huntington Library, Art Collections and Botanical Gardens, San Marino, 91108 California, USA.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., y Stitt, M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*. **46** : 533-548.
- García Lozano, D. L., Mesa López, N., y Ocampo Guerrero, M. L. (2015). Standardization of the disinfection protocol for the micropropagation of *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. **17** : 76-84.
- Jacobo-Pereira, C., Romo-Campos, R., y Flores, J. (2016). Seed germination of *Magnolia pugana* (Magnoliaceae), an endemic and endangered species from Western Mexico. In *Botanical Sciences*. 575-584 pp.

- Kamenicka, A. (1998). Influence of selected carbohydrates on rhizogenesis of shoots saucer magnolia *in vitro*. *Acta physiologiae plantarum*. **20** : 425-429.
- Kamenická, A., Kormuťák, A., y Lanaková, M. (2001). Establishing micropropagation conditions for three Magnolia species. *Propagation of Ornamental Plants*. **1** : 41-45.
- Lux-Endrich, A., Treutter, D., y Feucht, W. (2000). Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **60** : 15-21.
- Merkle, S., y Wiecko, A. (1990). Somatic embryogenesis in three *Magnolia* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **115** : 858-860.
- Vázquez-García, J.A., Muñiz-Castro, M.A., De Castro-Arce, E., Murguía-Araiza, R., Nuño-Rubio, A.T. y Cházaro-Basáñez, M.J. (2012c) Twenty new Neotropical tree species of Magnolia (Magnoliaceae). In: Salcedo-Pérez, E., Hernández-Álvarez, E., Vázquez García, J.A., Escoto-García, T. y Díaz-Echavarría, N. (Eds.) Recursos forestales del occidente de México: diversidad, manejo, aprovechamiento y conservación. Serie Fronteras de Biodiversidad. Universidad de Guadalajara CUCEI-CUCBA, Guadalajara, vol. 4 (t1), pp. 91–130.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15** : 473-497.
- Parris, J. K., Touchell, D. H., Ranney, T. G., y Adelberg, J. (2012). Basal salt composition, cytokinins, and phenolic binding agents influence *in vitro* growth and ex vitro establishment of *Magnolia* 'Ann'. *HortScience*. **47** : 1625-1629.
- Radomir, A. (2012). Comparative study on the *in vitro* multiplication potential of *Magnolia stellata* and *Magnolia × soulangiana* species. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. **16** : 39-44.
- Ramos, J. (2012). Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. *Informe de especialización en biotecnología agraria. Universidad Nacional Abierta ya Distancia. Bogotá. Colombia*. 71 pp.
- Rühmann, S., Leser, C., Bannert, M., y Treutter, D. (2002). Relationship between growth, secondary metabolism, and resistance of apple. *Plant Biology*. **4** : 137-143.

- Sánchez-Velásquez, L. R., Galindo-González, J., y Díaz-Fleischer, F. (2008). *Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México*: Mundi Prensa México. 211 p.
- Sokolov, R. S., Atanassova, B. Y., y Iakimova, E. T. (2014). Physiological response of *in vitro* cultured *Magnolia* sp. to nutrient medium composition. *Journal of Horticultural Research*. **22** : 49-61.
- Sokolov, R. S., Atanassova, B. Y., y Iakimova, E. T. (2015). Influence of iron sources in the nutrient medium on *in vitro* shoot multiplication and rooting of magnolia and cherry plum. *Journal of Horticultural Research*. **23** : 27-38.
- Sospedra, R. S., López, M. G., Cruz, L. J., López, G. G., y Quiñones, E. G. (2003). Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 245-250 pp.
- Vázquez-García, J., Neill, D., Asanza, M., Pérez, Á., Arroyo, F., Dahua-Machoa, A., y Merino-Santi, R. (2016). Magnolias de Ecuador: en riesgo de extinción. Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Ecuador, 134 pp. (I-LXVIII, 1-66).
- Vazquez-Garcia, J. A., Dominguez-Yescas, R., Pedraza-Ruiz, R., Sanchez-Gonzalez, A., y Muniz-Castro, M. A. (2015). *Magnolia rzedowskiana* (Magnoliaceae), a new species of section *Macrophylla* from the central Sierra Madre Oriental, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*. **112** : 19-36.
- Wojtania, A., Skrzypek, E., y Gabryszewska, E. (2015). Effect of cytokinin, sucrose and nitrogen salts concentrations on the growth and development and phenolics content in *Magnolia* × *soulangiana* ‘Coates’ shoots *in vitro*. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*. **14** : 51-62.

CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSIONES

El presente estudio de biología reproductiva en campo e *in vitro* ha permitido contribuir al conocimiento y entendimiento de algunos problemas y retos que enfrenta la conservación *in situ* y *ex situ* de especies de *Magnolia* bajo alguna categoría de amenaza.

4.1.1 Temporalidad de fenofases

Se apoya la hipótesis de que no hay diferencias en la fenofase de floración entre las tres especies de *Magnolia* estudiadas. La incipiente asincronía observada en la floración de las tres especies ligada a su amplitud temporal de floración, que se intersectan en los meses de mayo y junio, resulta insuficiente para impedir un potencial flujo genético, en caso de que las distancias geográficas no sean un impedimento. Por lo tanto, no hay barreras temporales que contribuyan a la especiación.

4.1.2 Estacionalidad

Se rechaza la hipótesis de no estacionalidad en las fenofases de las tres especies, en vista de que *M. pugana* mostró marcada estacionalidad en cuatro de las cinco fenofases [botón floral, floración (fase femenina), fructificación y dehiscencia inicial], *M. pacifica* mostró estacionalidad en dos de las cinco fenofases (botón floral y flor) y *M. vallartensis* sólo mostró estacionalidad en una de las cinco fenofases (dehiscencia inicial). La hipótesis de no estacionalidad se apoya para la fenofase de foliación de las tres especies; igual se apoya para las fenofases de fructificación y dehiscencia de *M. pacifica* y para las fenofases de botón floral, floración (fase femenina) y fructificación de *M. vallartensis*.

4.1.3 Productividad de fenofases

Se rechaza la hipótesis de no diferencias significativas en la productividad de la floración y fructificación, ya que *Magnolia pugana* resultó significativamente con mayor productividad en flores y de frutos que *M. pacifica* y *M. vallartensis*.

4.1.4 Ordenación de la temporalidad de fenofases

Se apoya la hipótesis de causas exógenas como factores determinantes en la regulación de la temporalidad de fenofases (Heuveldop, 1986) en las especies *Magnolia pacifica* y *M. pugana*, en vista de que la estructura bidimensional de la temporalidad de las fenofases fue explicada por diversas variables climáticas. En contraste, la temporalidad de las fenofases en *M. vallartensis*, al no resultar explicada por ninguna de las variables climáticas medidas, no apoya la hipótesis de causas exógenas, siendo ésto un indicio que no descarta la hipótesis de causas endógenas (Terborgh, 1992).

4.1.5 Implicaciones en Conservación

Magnolia vallartensis que actualmente se encuentra catalogada como En Peligro de extinción (EN) (Rivers *et al.*, 2016), debe tener mayor prioridad para la conservación y ser catalogada como En Peligro Crítico (CR), debido a su depauperada productividad de flores y frutos, mayor frecuencia de abortos de botones florales, menor reclutamiento y poblaciones en menor número y de menor tamaño.

4.1.6 Proliferación de yemas apicales

4.2.1 Solo para *Magnolia pugana* se apoya la hipótesis de proliferación de brotes en yemas apicales en un periodo de 30 días bajo cultivo *in vitro*. El número de nuevos brotes de hojas, así como su tamaño (largo y ancho), mostraron mejor crecimiento por yema apical en *M. pugana*. Este mismo resultado continuó en la segunda fase de experimentación. Sin embargo, para *Magnolia vallartensis* y *M. pacifica* se rechaza la hipótesis, ya que fueron más susceptibles a la contaminación y oxidación de fenoles, lo cual estuvo relacionado al tiempo de traslado del campo al laboratorio, por lo que se recomienda realizar el cultivo *in vitro* lo más rápido posible.

4.2.2 El medio de cultivo que resultó más eficaz para evitar la oxidación de fenoles en las tres especies fue BA (0.5 mg/l) y CA (1 g/l); se recomienda como un método alternativo para disminuir la oxidación de fenoles durante la proliferación de yemas apicales.

4.2.3 El medio que resultó más eficaz para la proliferación de yemas y brotes más largos en las yemas apicales durante la primera fase fue BA (0.4 mg/l) y ANA (0.1 mg/l) y para la segunda fase fue BA (0.7 mg/l) y ANA (0.1 mg/l).

4.2.4. Se recomienda continuar con ajustes a los protocolos para lograr éxito en el cultivo *invitro* de *M. vallartensis* y *M. pacifica*.



Figura 1. Fenofases de tres especies de *Magnolia*. *Magnolia vallartensis* (A-K), *M. pacifica* (L-U) y *M. pugana* (V-EE). Foliación (A, L, V). Botón con bráctea, B, M, W. Botón floral (C, N, X). Flor en fase femenina (D-E, O-P, Y-Z). Flor en fase masculina (F, Q, AA). Gineceos (G, R, BB). Fruto maduro cerrado (H, S, CC). Fruto en dehiscencia (I, J, T, DD). Eje del fruto sin semillas (K, U, EE).

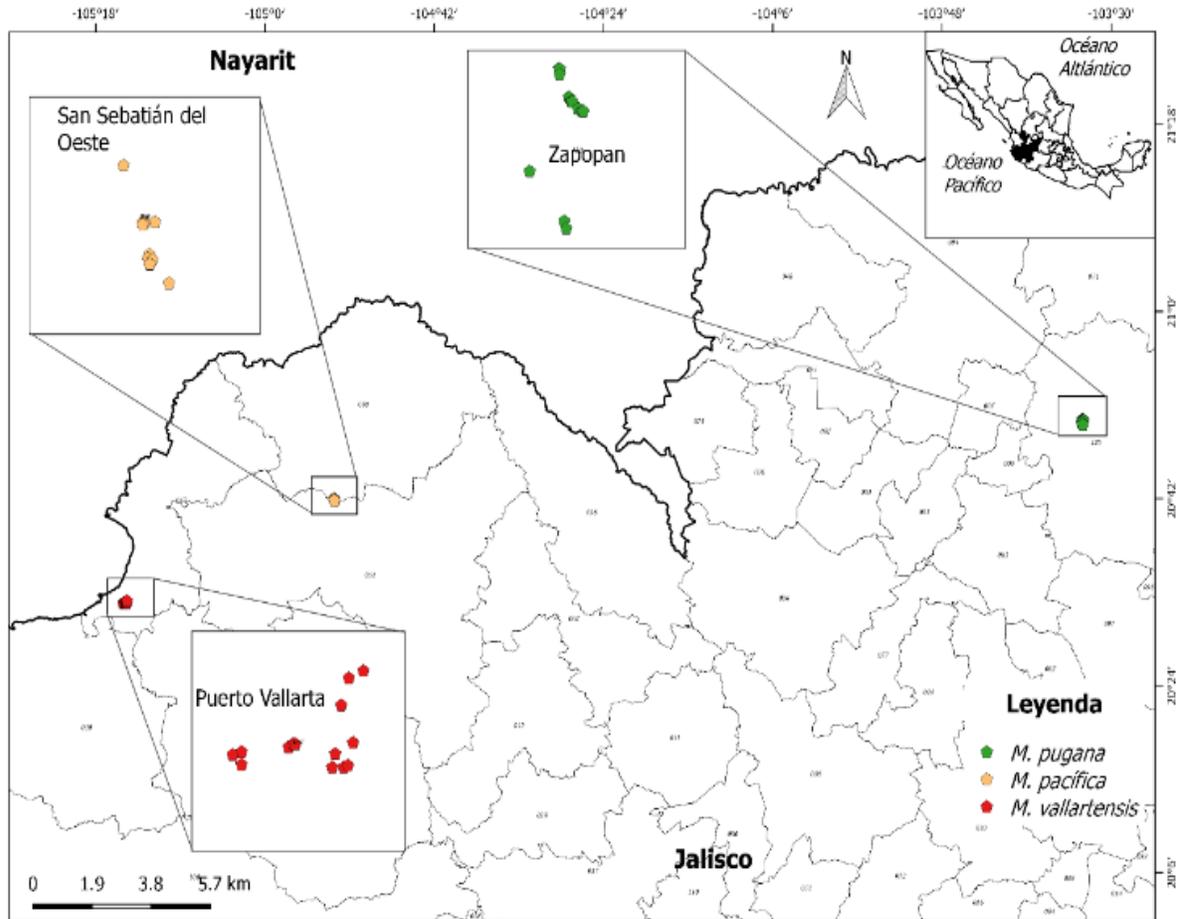


Figura 2. Ubicación de poblaciones de las poblaciones de estudiadas de *Magnolia*. *Magnolia vallartensis*, *M. pacífica* y *M. pugana*; con distribución de individuos adultos (unidad de muestreo) en cada población.

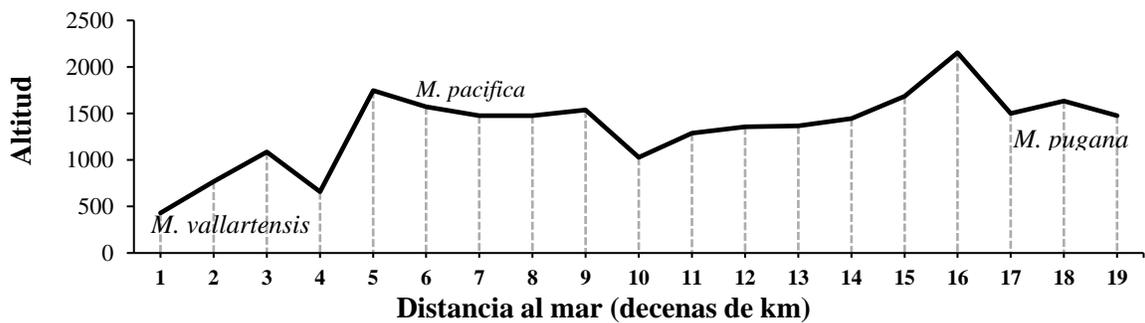


Figura 3. Ubicación de las tres especies de *Magnolia* en el relieve topográfico: *Magnolia vallartensis* (Costa Norte, Jalisco), *M. pacífica* (Sierra Madre del Sur, extremo occidental) y *M. pugana* (Región de Cañones, centro de Jalisco).

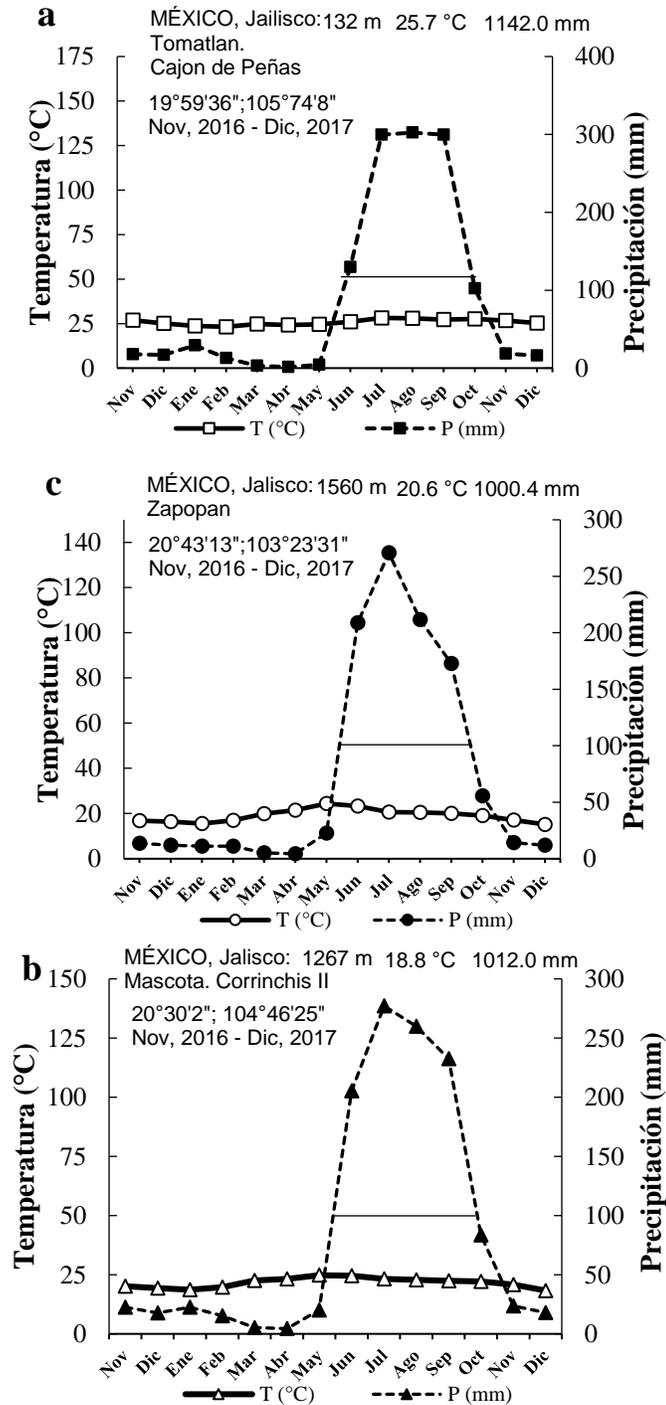


Figura 4. Diagramas ombrotérmicos (nov. 2016 a dic. 2017) de las tres regiones estudiadas. Temperatura media mensual (línea sólida), precipitación pluvial mensual acumulada (línea punteada); Cajón de Peñas, Tomatlán (cuadros); a), estación más cercana a *Magnolia vallartensis*; Corrinchis, Mascota (triángulos), b), estación más cercana a *M. pacifica*; y Zapopan (círculos), c), estación más cercana a *M. pugana*.

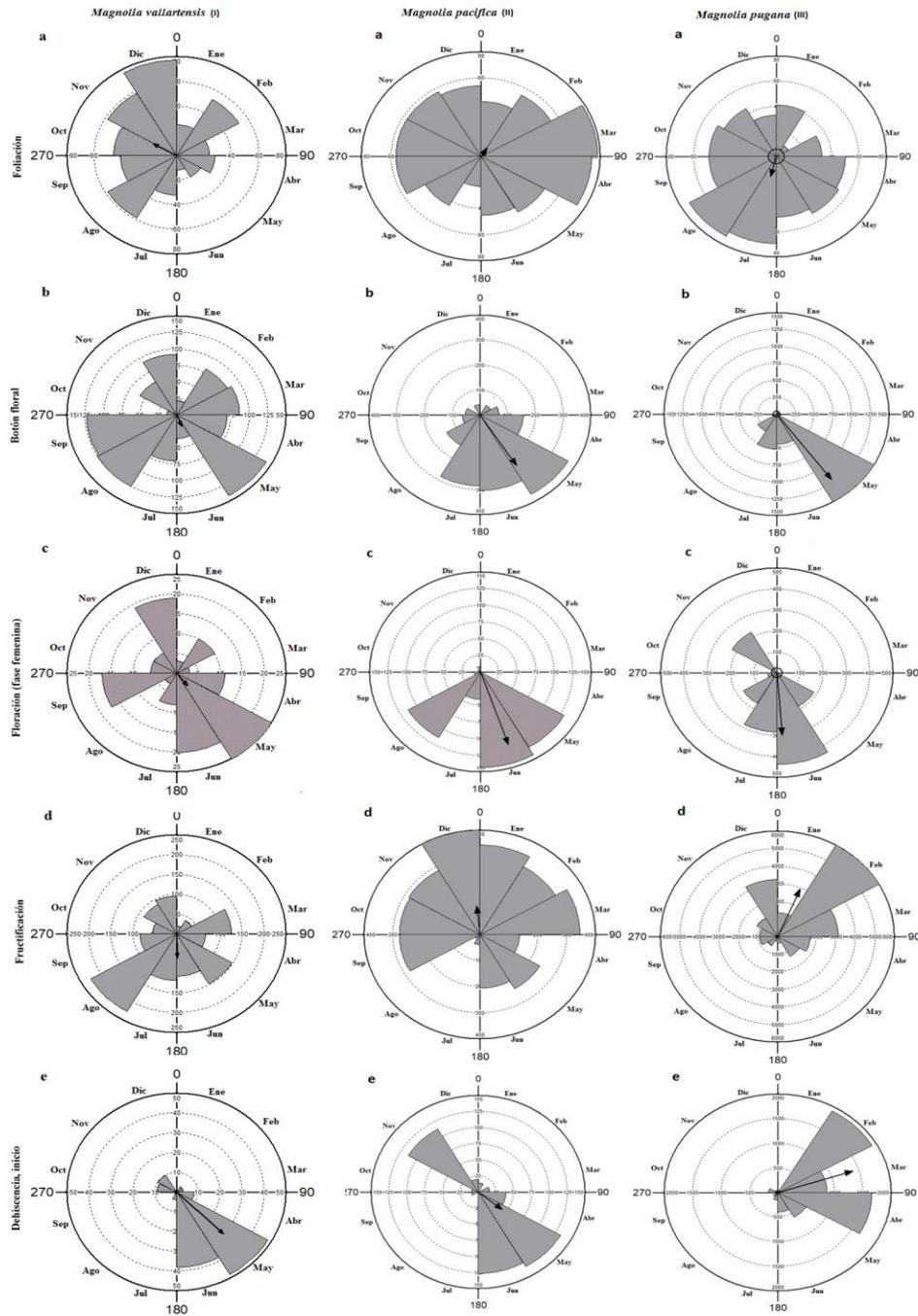


Figura 5. Histogramas circulares de cinco fenofases para las tres especies de *Magnolia*. Foliación (a), botones florales (b), floración (fase femenina) (c), fructificación (d), y dehiscencia (inicio) (e), con base en promedios mensuales de frecuencias de enero a diciembre de 2017 y para tres especies: *Magnolia vallartensis* (I), columna izquierda, *M. pacifica* (II), columna central y *M. pugana* (III), columna derecha. Las flechas representan ángulos promedios significativos (Raleigh test $p < 0.001$), mientras que la longitud del vector r (0 a 1) indica la concentración alrededor del ángulo medio.

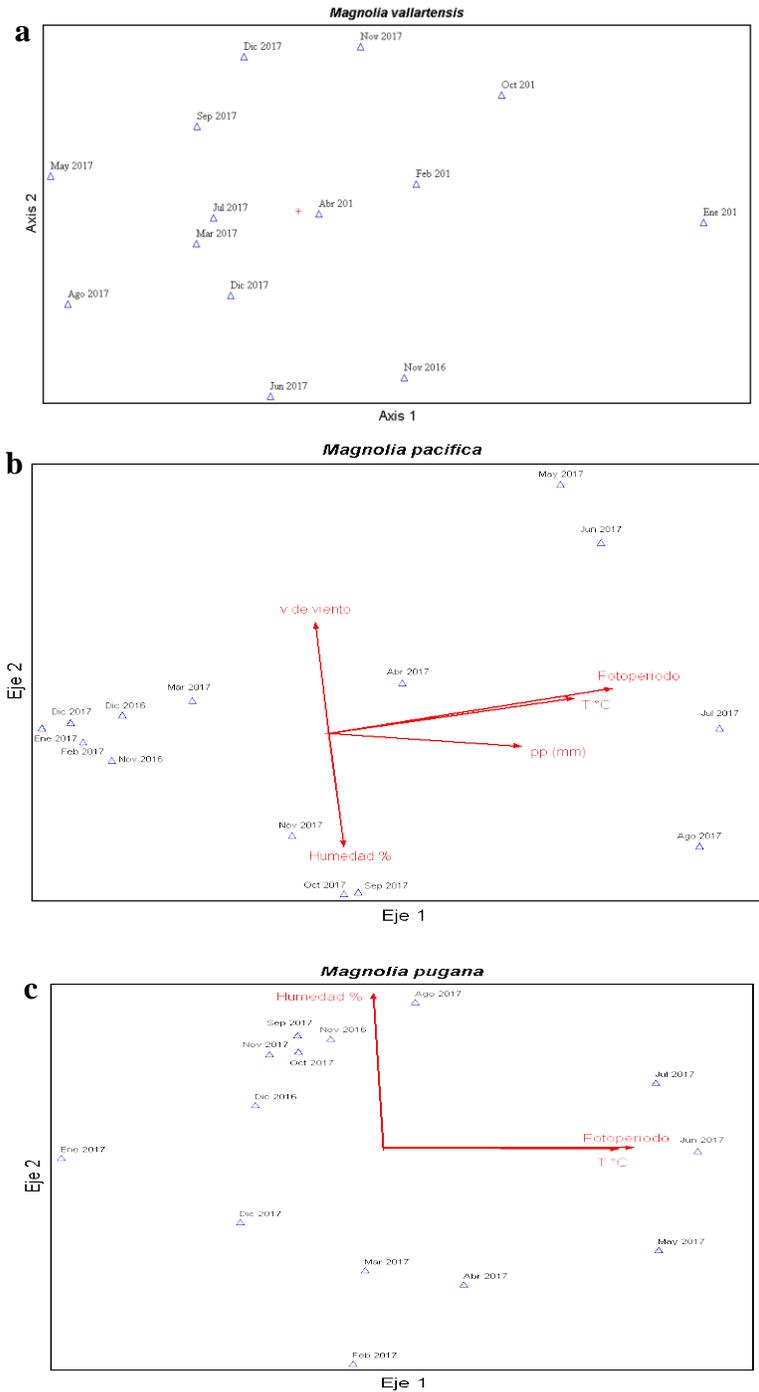


Figura 6. Ordenaciones NMDS de la temporalidad de las fenofases. *Magnolia vallartensis* (a), *M. pacifica* (b), *M. pugana* (c), con sus respectivos vectores (variables ambientales).

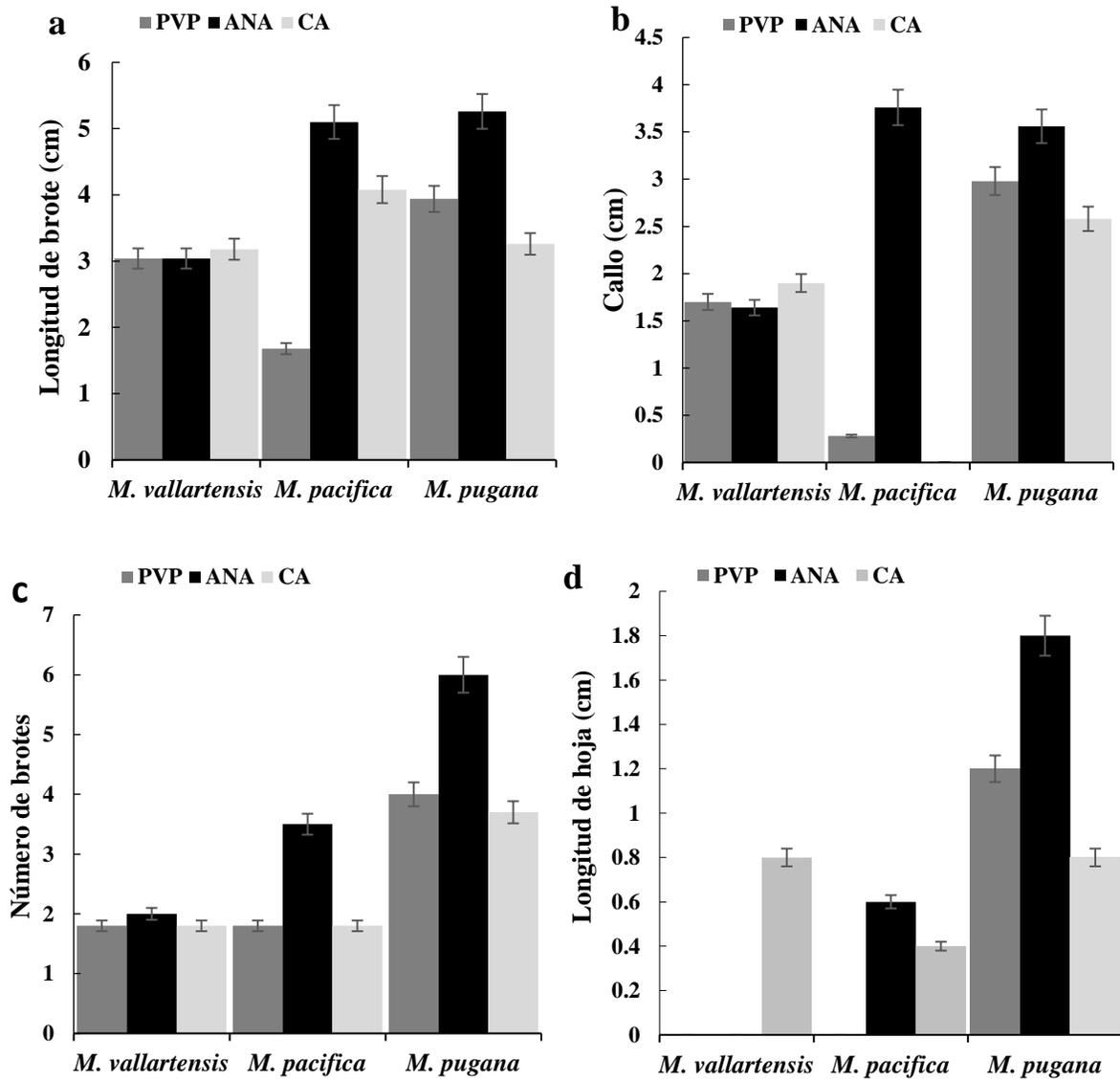


Figura 7. Efectos de proliferación de yemas apicales de tres medios, en tres especies de *Magnolia*, en catorce semanas. Longitud de brotes (a), longitud de callo (b), número de brotes (c), longitud de hojas (d).

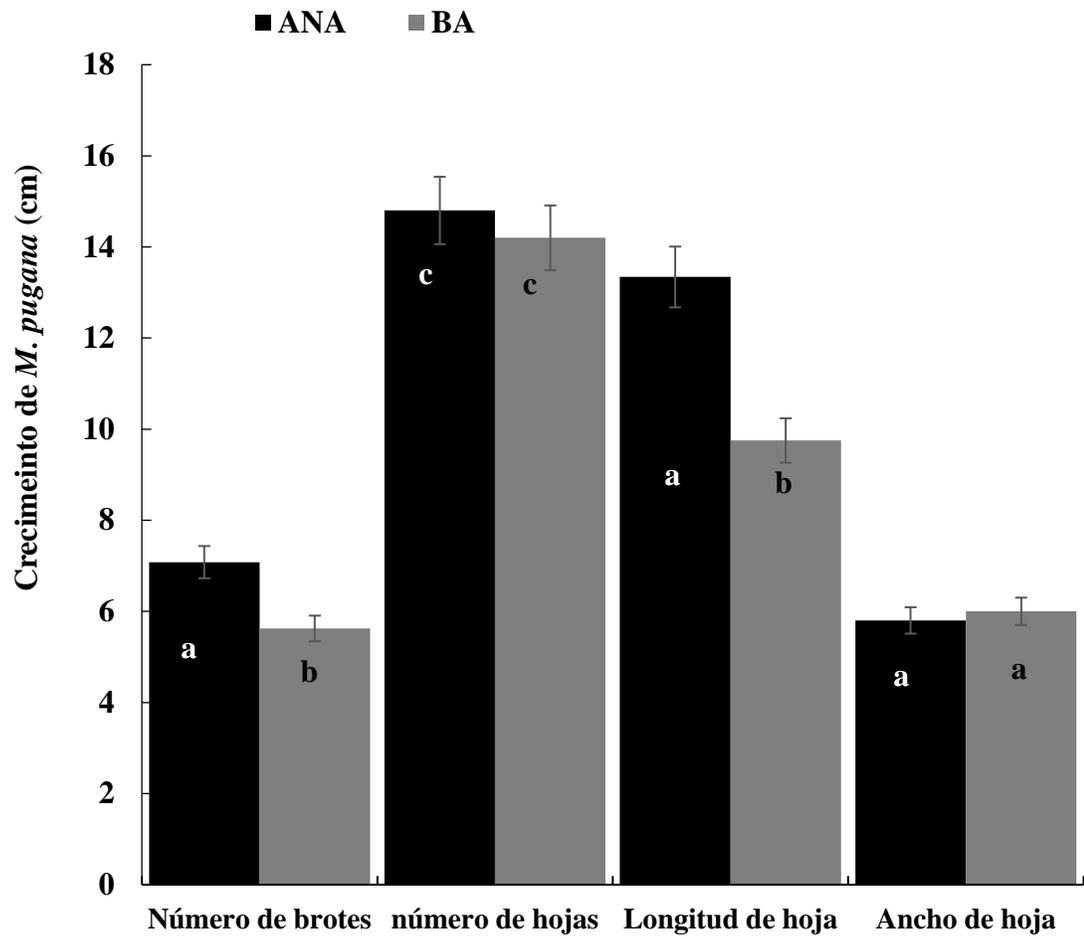


Figura 8. Efectos de crecimiento de *M. pugana in vitro* en ocho semanas. Número de brotes, número de hojas, longitud de hoja, ancho de hoja.

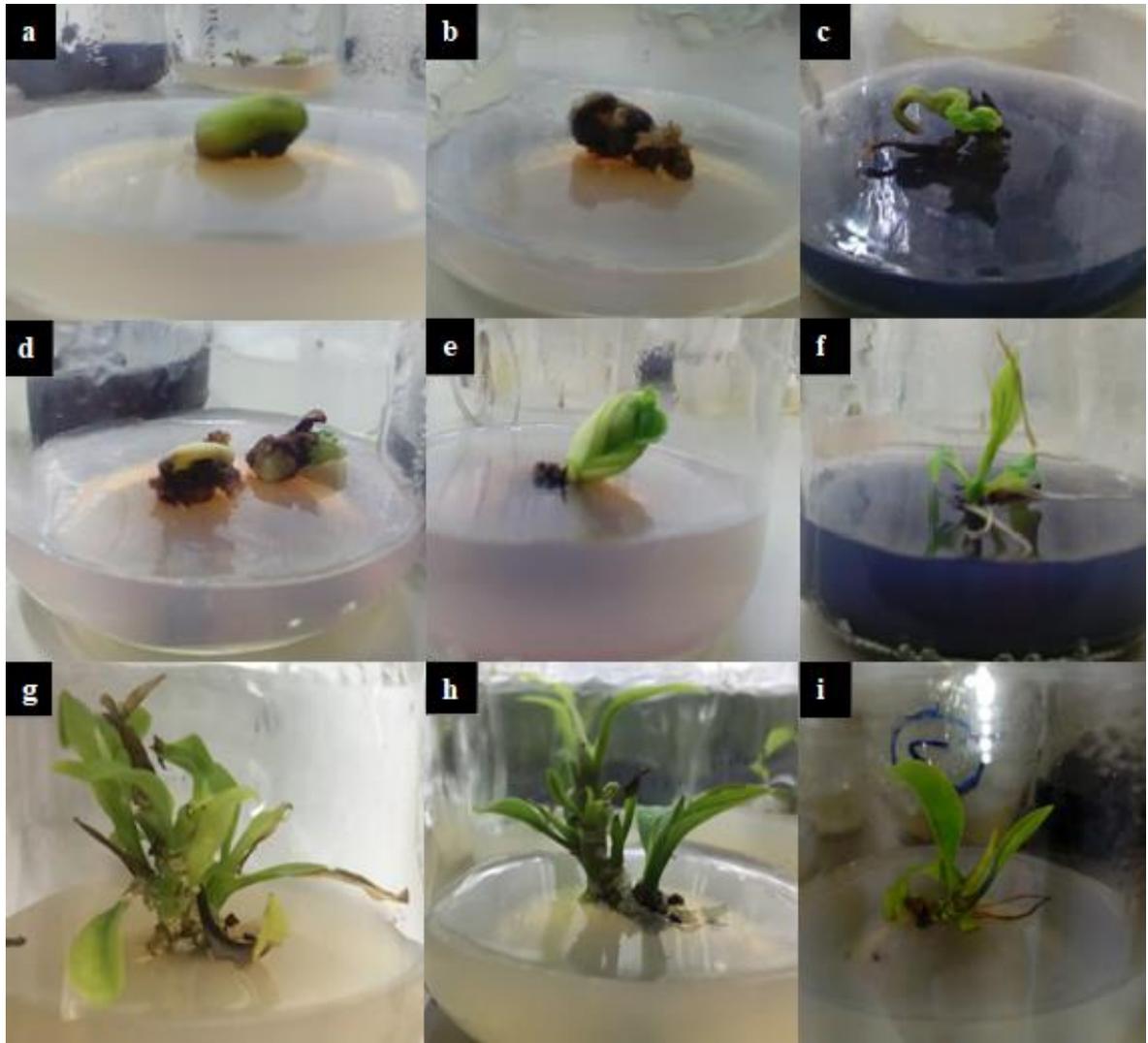


Figura 9. Respuesta de las especies en tres medios de estimulación de proliferación de yemas apicales. *Magnolia vallartensis*, (a, b, c), *M. pacifica*, (d, e, f), *M. pugana* (g, h, i). Medios combinados BA+PVP, (a, d, g), BA+ANA, (b, e, h) y BA+CA, (c, f). Medio BA sin combinar (i). Fotografías tomadas después de la octava semana.

Cuadro 1.

Resultados del análisis de estadística circular para las variables fenológicas de los individuos de *M. vallartensis*, *M. pacifica* y *M. pugana* de enero a diciembre del 2017. Prueba de Rayleigh (* p <0.05 y ** p <0.01).

Variable	Foliación	Botón floral	Floración (fase femenina)	Fructificación	Dehiscencia, inicio
<i>M. vallartensis</i>					
Números observado	473	914	131	1166	126
Media Vector (μ)	298.462	155.328	140.623	177.966	134.549
Fecha promedio	28 de octubre	5 de junio	30 de mayo	27 de junio	15 de mayo
Longitud del Vector (r)	0.242	0.12	0.161	0.24	0.592
Media	300	120	120	180	150
Desviación estándar	96.492	118.04	109.502	96.821	58.687
Rayleigh Test (p)	< 0.001 **	< 0.001**	0.034	< 0.001**	< 0.001**
<i>M. pacifica</i>					
Números observado	633	914	451	2865	479
Media Vector (μ)	30.537	155.328	160.773	354.576	128.332
Fecha promedia	30 de enero	25 de mayo	7 de junio	25 de diciembre	8 de mayo
Longitud del Vector (r)	0.093	0.12	0.76	0.271	0.284
Media	30	120	150	0.98	150
Desviación estándar	124.82	118.04	42.416	92.559	90.94
Rayleigh Test (p)	0.004 **	< 0.001 **	< 0.001**	< 0.001**	< 0.001**
<i>M. pugana</i>					
Números observado	551	2927	1359	20931	5857
Media Vector (μ)	195.202	142.935	175.765	23.298	71.878
Fecha promedia	23 de julio	22 de mayo	26 de junio	23 de enero	9 de mayo
Longitud del Vector (r)	0.202	0.803	0.594	0.488	0.694
Media	210	120	180	30	60
Desviación estándar	102.433	37.965	58.512	68.666	48.996
Rayleigh Test (p)	< 0.001**	< 0.001**	< 0.001**	< 0.001**	< 0.001**

Cuadro 2.

Parámetros de las fenofases de las tres especies de *Magnolia*. Valores promedios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas (de Tukey $p < 0.05$).

Fenofases	<i>M. vallartensis</i>	<i>M. pacifica</i>	<i>M. pugana</i>
Foliación	36.9b	53.2a	44.2b
Botón floral con bráctea	73.8a	109.9ab	209.5b
Botón floral sin bráctea	44.2a	64.7a	165.3b
Floración fase femenina	10.4a	32.6a	100.7b
Floración fase masculina	21.0a	67.3a	200.1b
Caída de pétalos	16.0a	81.7a	174.b
Fruto en desarrollo	110.0a	233.6a	1201.3b
Fructificación cerrada	93.5a	245.6a	1626.5b
Dehiscencia inicial	8.9a	36.6a	426.8b
Dehiscencia abundante	4.8a	53.1a	368.4b
Fruto sin semillas	26.8a	75.1a	793.6b

Cuadro 3.

Matriz principal (biótica), 14 meses \times 11 fenofases *Magnolia vallartensis*.

	Bráctea floral	Botón floral	Flor fase Fem	Flor fase Masc	Flor marchita	Gineceo en desarrollo	Fruto maduro	Dehiscencia inicio	Dehiscencia máxima	Eje sin semillas	Foliación
Nov, 2016	26	9	4	12	5	159	53	5	2	0	22
Dic, 2016	93	43	10	25	18	238	90	6	2	5	21.6
Ene, 2017	21	5	3	2	11	42	19	0	2	4	25.2
Feb, 2017	80	2	10	17	15	88	39	3	0	4	52.3
Mar, 2017	86	62	3	35	17	140	125	3	14	46	24
Abr, 2017	69	43	11	13	19	85	66	8	4	47	28.3
May, 2017	141	93	25	56	41	126	145	48	32	122	20
Jun, 2017	36	8	20	0	13	126	107	38	0	38	12
Jul, 2017	70	69	8	7	17	116	118	4	4	60	32
Ago, 2017	125	57	3	0	0	213	226	1	1	22	57.7
Sep, 2017	123	100	17	45	3	100	84	1	2	12	41
Oct, 2017	13	22	6	29	31	55	55	9	3	4	46
Nov, 2017	58	33	6	18	16	18	86	10	1	8	58
Dic, 2017	92	73	19	35	18	34	96	1	0	3	76.5

Cuadro 4.

Matriz secundaria (ambiental), 14 meses \times cinco variables ambientales obtenidas de la estación meteorológica de Cajón de Peña; Temperatura (T), Humedad relativa (H.R), Velocidad de viento (Vv), Fotoperiodo (Fot.), Precipitación (pp).

	T (°C)	H.R (%)	V.v (m/s)	Fot. (Lx)	pp (mm)
Nov, 2016	26.98	71.92	2.87	11.020	17.6
Dic, 2016	25.16	71.87	3.31	10.800	16.8
Ene, 2017	23.65	73.40	3.87	10.909	29.3
Feb, 2017	23.22	70.87	3.80	11.322	12.7
Mar, 2017	24.72	65.02	3.58	11.857	3.2
Abr, 2017	24.30	66.93	3.44	12.479	1.4
May, 2017	24.63	73.10	3.54	12.962	4.2
Jun, 2017	26.00	78.18	3.25	13.199	129.5
Jul, 2017	28.20	76.80	2.58	13.104	299.8
Ago, 2017	27.98	81.31	3.78	12.703	302.3
Sep, 2017	27.30	83.95	3.30	12.113	299.8
Oct, 2017	27.66	79.74	2.77	11.511	102.2
Nov, 2017	26.72	78.41	2.96	11.020	18.6
Dic, 2017	25.26	71.67	3.53	10.800	16

Cuadro 5.

Matriz principal (biótica), 14 meses × 11 fenofases de *Magnolia pacifica*.

	Bráctea floral	Botón floral	Flor fase Fem	Flor fase Masc	Flor marchita	Gineceo en desarrollo	Fruto maduro	Dehiscencia inicio	Dehiscencia máxima	Eje sin semillas	Foliación
Nov, 2016	8	3	6	12	11	161	294	5	10	1	50.4
Dic, 2016	5	1	0	0	39	160	279	29	73	7	61.6
Ene, 2017	3	2	0	0	6	124	343	14	2	5	41.8
Feb, 2017	44	1	0	0	0	105	300	0	5	16	54.3
Mar, 2017	69	50	0	3	0	141	345	16	28	61	78.4
Abr, 2017	156	71	2	31	4	39	137	39	2	41	73.5
May, 2017	366	213	130	152	83	142	238	133	428	382	48.6
Jun, 2017	302	219	143	306	99	215	205	126	172	376	45
Jul, 2017	283	179	41	139	89	273	39	0	1	66	22.7
Ago, 2017	139	103	113	147	143	514	18	0	0	67	43.2
Sep, 2017	63	30	8	53	219	479	278	9	0	5	57
Oct, 2017	52	18	4	56	192	479	278	9	0	5	57
Nov, 2017	7	7	2	35	259	354	284	113	23	4	57
Dic, 2017	41	9	8	8	0	85	400	20	0	15	53.6

Cuadro 6.

Matriz secundaria (ambiental), 14 meses × cinco variables ambientales obtenidas de la estación meteorológica de Corrinches; Temperatura (T), Humedad relativa (H.R), Velocidad de viento (Vv), Fotoperiodo (Fot.), Precipitación (pp).

	T (°C)	H.R (%)	V.v (m/s)	Fot. (Lx)	pp (mm)
Nov, 2016	20.12	74.61	1.99	10.99	22.5
Dic, 2016	19.31	66.50	2.14	10.76	17.8
Ene, 2017	18.61	58.78	2.17	10.87	22.5
Feb, 2017	19.67	51.91	2.36	11.30	15.3
Mar, 2017	22.60	39.71	2.29	11.85	5.2
Abr, 2017	23.17	33.52	2.54	12.49	4.4
May, 2017	24.78	43.66	2.54	12.99	20.2
Jun, 2017	24.55	64.46	2.19	13.24	205.4
Jul, 2017	23.22	77.91	1.61	13.14	277.1
Ago, 2017	22.78	84.33	1.95	12.73	260.0
Sep, 2017	22.43	85.94	1.78	12.12	232.6
Oct, 2017	22.16	78.69	2.00	11.50	83.6
Nov, 2017	20.80	72.66	1.81	10.99	23.5
Dic, 2017	18.31	66.25	2.05	10.76	18.0

Cuadro 7.

Matriz principal (biótica), 14 meses × 11 fenofases de *Magnolia pugana*.

	Bráctea floral	Botón floral	Flor fase Fem	Flor fase Masc	Flor marchita	Gineceo en desarrollo	Fruto maduro	Dehiscencia inicio	Dehiscencia máxima	Eje sin semillas	Foliación
Nov, 2016	6	15	49	121	115	1268	618	65	22	399	35.8
Dic, 2016	0	1	2	2	0	1773	1222	53	88	399	31.7
Ene, 2017	0	0	0	4	0	76	1373	16	0	375	41.4
Feb, 2017	37	0	0	0	90	3076	5994	1911	793	1236	10.3
Mar, 2017	32	0	0	0	13	1182	3118	866	837	1013	32.9
Abr, 2017	54	14	11	2	1	983	1676	1655	1398	1727	49.7
May, 2017	1494	760	183	313	133	57	1280	572	1128	1802	51.5
Jun, 2017	444	734	436	756	382	607	370	396	781	1294	48.2
Jul, 2017	514	506	282	1090	731	1328	266	155	83	1570	69.3
Ago, 2017	289	199	168	244	306	1624	582	89	7	174	72.9
Sep, 2017	57	37	39	98	86	1463	891	13	2	148	49.2
Oct, 2017	4	9	17	57	285	1214	907	158	18	250	49.2
Nov, 2017	2	39	223	101	237	1107	1220	26	0	106	44.3
Dic, 2017	0	0	0	14	66	1060	3254	0	0	618	33.0

Cuadro 8.

Matriz secundaria (ambiental), 14 meses × cinco variables ambientales obtenidas de la estación meteorológica de Zapopan; Temperatura (T), Humedad relativa (H.R), Velocidad de viento (Vv), Fotoperiodo (Fot.), Precipitación (pp).

	T (°C)	H.R (%)	V.v (m/s)	Fot. (Lx)	pp (mm)
Nov, 2016	16.89	72.00	2.15	10.96	13.6
Dic, 2016	16.39	62.77	2.29	10.73	12.1
Ene, 2017	15.57	52.78	2.29	10.85	11.2
Feb, 2017	16.95	48.01	2.50	11.28	11.1
Mar, 2017	19.97	40.14	2.20	11.85	5.3
Abr, 2017	21.52	26.67	2.51	12.51	4.4
May, 2017	24.42	34.09	2.49	13.02	22.8
Jun, 2017	23.24	58.37	2.16	13.27	208.8
Jul, 2017	20.63	75.16	1.61	13.17	270.7
Ago, 2017	20.47	79.97	1.93	12.74	211.6
Sep, 2017	20.05	80.52	2.00	12.12	172.7
Oct, 2017	19.02	74.87	2.37	11.48	55.7
Nov, 2017	17.16	62.27	2.06	10.96	14.3
Dic, 2017	15.19	63.14	2.08	10.73	11.9

Cuadro 9.

Dosis de estimulación de yemas apicales para tres especies de *Magnolia*.

Especies	Medios	Dosis*	Tratamiento
<i>M. vallartensis</i>	BA + PVP	0.5 + 1	1
	BA + ANA	0.4 + 0.1	2
	BA + CA	0.5 + 1	3
<i>M. pacifica</i>	BA + PVP	0.5 + 1	4
	BA + ANA	0.4 + 0.1	5
	BA + CA	0.5 + 1	6
<i>M. pugana</i>	BA + PVP	0.5 + 1	7
	BA + ANA	0.4 + 0.1	8
	BA + CA	0.5 + 1	9
Segunda fase en el establecimiento <i>in vitro</i>			
<i>M. pugana</i>	BA	0.7	1
	ANA	0.1	2

*BA y ANA en mg/l; PVP y CA en g/l