

132
2ej.

ESTADO DE GUERRERO
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“CULTIVO *in vitro* DE *Ariocarpus retusus* SCHEIDW.
(CACTACEAE), ESPECIE EN PELIGRO
DE EXTINCIÓN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

LAURA PATRICIA OLGUIN SANTOS



MEXICO, D. F.

1994



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realizó 1a pasante _____
Laura Patricia Olquín Santos
con número de cuenta 8034545-1 con el título: _____

"Cultivo in vitro de Ariocarpus retusus Scheidw. (Cactaceae),
especie en peligro de extinción"

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
Biólogo.

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila
Director de Tesis
Dr. David Flores Román

Dra. Margarita Collazo Ortega

Biól. Angel Salvador Arias Montes

Suplente

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Suplente

Ciudad Universitaria, D.F., a 4 de noviembre de 1994

LA PRESENTE INVESTIGACION FUE REALIZADA
EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES DEL JARDIN BOTANICO DEL
INSTITUTO DE BIOLOGIA DE LA U.N.A.M.,
BAJO LA DIRECCION DEL
DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA.

A LA MEMORIA DE DOÑA MARIA NAJERA DE OLGUIN

CON CARÍO Y RESPETO

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

**A MIS TIOS SERGIO Y MARIA ELENA
(Incluyendo a Mariana)**

POR SU ESTIMULO Y APOYO DE TODA LA VIDA.

AGRADECIMIENTOS

- A las autoridades del Jardín Botánico del Instituto de Biología por facilitarme el uso de sus instalaciones durante el desarrollo del presente trabajo, especialmente al Dr. Robert Bye Boettler por todo el apoyo académico otorgado.
- Con profundo respeto y admiración a mi Maestro el Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, por todas sus enseñanzas, las constantes y valiosas asesorías y el gran estímulo que nos ha brindado a todos los estudiantes de este Laboratorio.
- Al Biól. Salvador Arias del Laboratorio de Cactología de este Jardín Botánico por haber proporcionado el material vegetal experimental y por sus valiosas sugerencias durante todo el desarrollo de esta investigación.
- A la Dra. Margarita Collazo, a la Dra. Judith Márquez y al Dr. David Flores por sus acertadas aportaciones y sugerencias en la revisión del manuscrito.
- Al M. en C. Alejandro Martínez Palacios por la donación de semillas y sugerencias durante el desarrollo experimental.
- A la Biól. Ana Laura López Escamilla por toda la asesoría y el apoyo fotográfico.
- Al Biól. Martín Mata y el Ing. Jorge Quiza por el apoyo en la edición de este trabajo.
- A la Biól. Carmen Loyola por el apoyo académico durante el inicio de esta investigación.
- Al Dr. Miguel Ulloa, del Laboratorio de Micología del Instituto de Biología por facilitarnos el uso del fotomicroscopio.

A mis inolvidables compañeros y amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por sus valiosas aportaciones y sugerencias y por haber hecho las horas de trabajo más agradables.

Muy especialmente a Ana Laura, Víctor y Martín por la paciencia, la gran amistad y el apoyo incondicional que me han brindado siempre.

Gracias

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCION	4
II. ANTECEDENTES	
1. Importancia de las Cactáceas	9
2. Problemas de conservación	11
3. Clasificación Botánica	16
4. Descripción Botánica del género <i>Ariocarpus</i>	16
5. <i>Ariocarpus retusus</i> Scheidweiler	18
6. Distribución geográfica	19
7. Usos de <i>Ariocarpus retusus</i>	20
8. Problemas de conservación en <i>Ariocarpus retusus</i>	21
9. Cultivo de Tejidos Vegetales	23
10. Cultivo de Tejidos en Cactáceas	26
11. Cultivo de Tejidos en <i>Ariocarpus</i>	31
III. OBJETIVOS	33
IV. MATERIALES Y METODOS	
1. Desinfección y siembra de las semillas	34
2. Obtención y siembra de explantes	36
V. RESULTADOS Y DISCUSION	
1. Floración	40

	Página
2. Semillas	41
3. Germinación	43
4. Explantes	49
5. Callo	51
6. Respuestas morfogénicas	
i) Brotes	56
ii) Raíces	64
iii) Desarrollo de plántulas	65
iv) Embriogénesis somática	65
VI. CONCLUSIONES	71
VII. LAMINAS	74
VIII. APENDICE	76
IX. BIBLIOGRAFIA	77

ABREVIATURAS

AIA	Acido indol-3-acético
ANA	Acido Naftalenacético
BA	6-Bencilaminopurina
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
2, 4-D	Acido 2, 4-Diclorofenoxiacético
ZIP	N-6 dimetil alil aminopurina
INIREB	Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos
IUCN	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales.
K	Kinetina; 6-Furfurilaminopurina
MS	Medio de Cultivo Murashige y Skoog (1962)
SEDESOL	Secretaría de Desarrollo Social
SEDUE	Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología
Z	Zeatina; 4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina

RESUMEN

Cultivo *in vitro* de Ariocarpus retusus Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción

Ariocarpus retusus es una cactácea endémica de México considerada como especie vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales. El saqueo indiscriminado de esta especie, principalmente con fines ornamentales, aunado a su lento desarrollo y a que sólo se reproduce sexualmente, han ocasionado la disminución de sus poblaciones en su ambiente natural. Como una alternativa para el rescate de cactáceas en peligro de extinción se ha propuesto el uso de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales para su propagación masiva.

En este estudio fue posible establecer las condiciones experimentales que permitieron la regeneración *in vitro* de A. retusus.

Explantos (centrales, laterales, tubérculos y raíces) obtenidos de plántulas germinadas *in vitro* fueron cultivados en medio MS (1962) adicionado de BA (0 a 3 mg/l) en combinación con ANA (0 a 1 mg/l) (24 tratamientos); 2iP (0 a 10 mg/l) combinado con AIA (0 a 1 mg/l) y K (0 a 10 mg/l) en combinación con AIA (0 a 1 mg/l) (ambas series con 8 tratamientos). Las respuestas obtenidas después de 12 meses de cultivo fueron: 1) la formación de callo y 2) respuestas morfogénicas de dos tipos: a) vía organogénesis: regeneración de brotes y de raíces y b) vía embriogénesis somática: con el desarrollo de embriones somáticos (adventicios).

La presencia de fitoreguladores fue necesaria para la inducción de brotes. En términos generales, altas concentraciones de citocininas (BA y 2iP) en ausencia de auxinas (ANA y AIA) promovieron la formación de brotes; los tejidos respondieron negativamente a la presencia de K/AIA.

En los tratamientos con BAVANA, el mayor número de brotes se obtuvo en la concentración 2/0, con un total de 48 de ellos; el mejor tratamiento con 2iP/IAA fue 1/0, donde se originaron en total 25 brotes. En ambos casos, la mayor capacidad morfogénica fue expresada por los explantes laterales.

Fue posible obtener, en forma eventual, embriones somáticos derivados de callo de un explante lateral en el tratamiento 0.5/0.1 con BAVANA, los cuales se desarrollaron en plántulas completas.

Si bien las estructuras regeneradas se originaron y crecieron en los medios de inducción, su número aumentó en el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

INTRODUCCION

La diversidad vegetal es un factor esencial en la existencia de la vida en el planeta. Las plantas juegan un papel importante en los ciclos biogeo-químicos y, al ser los responsables del proceso fotosintético, son la base de todas las redes alimenticias, por lo tanto, influyen en la estabilidad de todos los ecosistemas (Raven, 1976; Clark, 1989). Cuanto mayor sea la diversidad vegetal en el mundo, más seres vivos se pueden valer de ella, de ahí que de la conservación de las floras regionales y de cada país dependa la sobrevivencia de todas las formas de vida animal, incluyendo a la especie humana.

Se calcula que existen aproximadamente 240,000 especies de plantas con flores. Desafortunadamente, alrededor de 60,000 especies vegetales de trópicos y subtrópicos, casi una cuarta parte del total, están amenazadas de extinción (Raven, 1986). Una especie amenazada o en peligro de extinción, de acuerdo con Ehrlich y Wilson (1991), es aquella que tiene una alta probabilidad de extinguirse durante los próximos años o décadas. La IUCN utiliza diferentes categorías para indicar el grado de amenaza de las especies en su hábitat natural, y define a las especies en peligro de extinción "E" como aquellos taxa cuya supervivencia es poco probable si los factores que los amenazan continúan operando, cuyo número ha sido disminuído a niveles críticos o cuyos hábitats se han reducido tan drásticamente que son considerados en inmediato peligro de extinción (Lucas y Synge, 1978; IUCN, 1980). Raven (1976), puntualizó que la extinción de una especie tendría efectos ecológicos significativos sobre el hábitat que ésta ocupaba y, estimó que la desaparición de una especie vegetal, puede provocar la extinción de 10 a 30 especies relacionadas.

La reducción de la biodiversidad, tanto animal como vegetal, se ha acelerado principalmente por las múltiples actividades del hombre. Este, se ha convertido en la especie dominante y más destructiva del planeta, ha crecido de forma tal que ha afectado seriamente los hábitats naturales. Se considera que los tres componentes que más han influido negativamente en el ambiente a causa del crecimiento de la actividad humana son la agricultura, la obtención de energía y la industria. De estas tres, la agricultura ha constituido el agente dominante de la transformación generalizada de las tierras al convertirlas en terrenos de cultivo. Desde el inicio del siglo XVIII se han perdido seis millones de Km² de bosque, una superficie mayor que toda Europa (Clark, 1989). La selva se ha reducido en un 55% de su extensión original y la seguimos destruyendo a un ritmo que supera los 100,000 Km² cada año, no obstante que es el ecosistema más rico y complejo en diversidad biológica así como el más frágil, cubre sólo 7% de la superficie de la Tierra y se estima que alberga entre el 50% y el 80% del total de las especies del mundo (Linden, 1989; Repetto, 1990).

Raven (citado por Linden, 1989) señaló que el efecto devastador que ha tenido la actividad humana sobre la diversidad biológica ha provocado que la tasa de extinción se encuentre en niveles aún superiores a los que se presentaron al final de la era Mesozoica, hace 65 millones de años.

La flora y fauna silvestres de cada país representan una riqueza que no ha sido valorada como la riqueza mineral, la monetaria y la cultural; sin embargo, constituyen una herencia invaluable, producto de millones de años de evolución y, por lo tanto, su estudio y conservación deben ser motivo de preocupación nacional, al tomar en cuenta que son fuente de materiales en forma de alimentos,

medicinas, otras sustancias de interés comercial y mantienen la calidad del ambiente (Wilson, 1989).

La biodiversidad de México es enorme. Los cálculos más recientes indican que el número de plantas vasculares presentes se aproxima a las 22,000, cantidad que supera a la de países con superficie territorial mayor a la nuestra (Vázquez-Yanes y Cervantes, 1993). Esta riqueza biológica se debe a la diversidad geológica, topográfica y climática que presenta nuestro país. Debido a su situación geográfica, es el punto donde tres geofloras se encuentran: la holártica, la autóctona y la neotropical; la mezcla de éstas durante el pasado geológico contribuyeron enormemente a la riqueza actual de la flora mexicana (Vovides y Gómez-Pompa, 1978).

México es considerado uno de los países que poseen gran parte de la diversidad biológica mundial, diversidad que se encuentra seriamente amenazada. En las últimas décadas, los ecosistemas del país se han venido transformando debido al ritmo acelerado con el que se pierden áreas de vegetación natural, aproximadamente 1 ha/min, siendo la causa principal el uso de grandes superficies territoriales con fines agrícolas y ganaderos (Toledo, 1988).

Aproximadamente, la tercera parte del territorio mexicano está constituido por zonas áridas y semiáridas (Davis *et al.*, 1986). En México, estas regiones se caracterizan por poseer el mayor número de especies endémicas, las que muchas veces forman poblaciones pequeñas, o bien, presentan áreas de distribución muy restringidas, por lo que resultan más vulnerables a la drástica reducción de sus hábitats. Dentro de los grupos de plantas que presentan un porcentaje elevado de endemismos está la familia de las Cactáceas, la cual ha logrado en nuestro país

su máxima diversidad y abundancia, y de la que se calculan más de 540 especies endémicas (Rzedowski, 1991).

Las cactáceas son originarias del continente americano, se distribuyen ampliamente desde el norte de Canadá hasta la Patagonia en América del Sur; se les encuentra principalmente en zonas áridas y semiáridas pero también habitan regiones tropicales, de donde es probable que hayan evolucionado las formas actuales (Bravo-Hollis, 1978).

Estas plantas presentan una serie de notables adaptaciones que les han permitido sobrevivir en lugares donde el factor limitante es el agua, por ejemplo: sus hojas se han reducido hasta transformarse en espinas, las cuales se agrupan en zonas denominadas aréolas, siendo ésta la característica distintiva del grupo; los tallos son almacenadores de agua, fotosintéticos y presentan gruesas cutículas para evitar la evapotranspiración, han adquirido diversas formas como las columnares, globosas y articuladas; sus raíces son muy largas, pueden llegar a medir hasta 20 metros y generalmente son de mayor longitud que el tallo.

De las 2,100 especies que se calculan para esta familia, en México se encuentran unas 900 (Rzedowski, 1991), cifras que son estimativas ya que aún no existe un inventario completo de las cactáceas de América. No obstante esta relativa abundancia, se estima que el 40% de las especies endémicas están seriamente amenazadas de extinción (Arias, 1990, 1991).

Las cactáceas se caracterizan por ser plantas de lento crecimiento y porque muchas de ellas se reproducen exclusivamente por semillas (Bravo-Hollis, 1978), lo que representa que el número de individuos en una población no se

restablezca rápidamente de manera natural, es decir, que la velocidad de recuperación de las poblaciones naturales es muy inferior a la velocidad en que están ocurriendo los cambios en la naturaleza.

Una alternativa para resolver problemas de propagación en diversos grupos vegetales ha sido utilizar técnicas especializadas como las del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), las cuales consisten, de manera general, en cultivar bajo condiciones asépticas prácticamente cualquier estructura vegetal y mantenerlas en condiciones nutricionales y ambientales controladas para dirigir así las respuestas morfogenéticas deseadas (George y Sherrington, 1984).

Estas técnicas, empleadas con éxito principalmente en la micropropagación de especies hortícolas y ornamentales, se han aplicado recientemente como una opción más para la preservación de especies amenazadas de extinción (Wochok, 1981), entre ellas orquídeas, cícadas, agaves, coníferas y cactáceas (Binh *et al.*, 1990; Atree y Fowke, 1991; Chávez *et al.*, 1992; Rubluo *et al.*, 1993).

El CTV ha dado resultados satisfactorios en la propagación de algunos miembros de la familia Cactaceae (Johnson y Emimo, 1979b; Starling, 1985; Fay y Gratton, 1992; Hernández *et al.*, 1994). Por lo menos 24 especies pertenecientes a los 16 géneros de cactáceas han sido micropropagadas. La propagación *in vitro* de cactáceas importantes comercialmente beneficiaría a numerosas especies silvestres ya que, al contar con una fuente segura de plantas propagadas vegetativamente para su comercio, se reducirían las presiones de colecta en aquellas poblaciones de especies vulnerables (Hubstenberger *et al.*, 1992).

ANTECEDENTES

IMPORTANCIA DE LAS CACTACEAS

Las cactáceas, al igual que el resto de las plantas, cumplen importantes funciones en el lugar donde habitan. Además de ser alimento y refugio de animales, resultan un excelente medio para evitar la erosión eólica y pluvial de las zonas áridas, gracias a que tienen un sistema radical muy desarrollado que compacta el sustrato y presentan adaptabilidad a factores climáticos extremos. Los pelos absorbentes de las raíces de las cactáceas son caducos, por lo que también constituyen una fuente importante de materia orgánica que constantemente se incorpora al suelo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

Desde épocas prehispánicas las cactáceas han jugado un papel muy importante en la vida del hombre, ya que han sido fuente de alimento, bebida, medicina, forraje, materia prima para la construcción de viviendas, para la elaboración de armas de caza y pesca, y como plantas de ornato, entre otros usos.

Como alimento humano, prácticamente todos los órganos de las cactáceas son comestibles: raíces, tallos, flores, frutos y semillas; sin embargo, los más consumidos a través del tiempo han sido los tallos y los frutos, principalmente de los géneros Echinocactus, Ferocactus, Mammillaria, Myrtillocactus, Melocactus, Nopalea y Opuntia.

Los tallos de algunas especies son consumidos como forraje por el ganado; a pesar de su escaso valor nutritivo, permiten sobrevivir a los animales durante las épocas de sequía aprovechando el contenido acuoso de los parénquimas. Las tunas y las pitayas, también son utilizadas como alimento de cerdos y gallinas.

Desde épocas anteriores a la Conquista de México, los cactus se han utilizado en la **medicina tradicional** dadas sus propiedades farmacológicas. Los más empleados han sido los nopales, sin embargo, actualmente se utilizan también otras especies, principalmente como remedios para curar o tratar de aliviar inflamaciones musculares, dolores reumáticos, fracturas, constipación intestinal, diarrea, úlceras gástricas, controlar diabetes, cáncer del estómago así como afecciones cardiovasculares y mentales, entre otros.

Además de los usos mencionados, estas plantas se han empleado con fines muy diversos tales como **combustible**, cuando los ejemplares están secos; **material de construcción**, al utilizar los haces liberoleñosos del sistema vascular de algunas cactáceas columnares secas; para formar **cercas o setos vivos**; como fuente de **fibras** y pulpa para la fabricación de papel y materiales aislantes; para la extracción de **pigmentos** utilizados en la industria cosmetológica en la elaboración de tintes para el cabello; la obtención directa o indirecta de **colorantes**: directa, a partir de tunas y pitayas de las que se extraen betacianinas utilizadas como colorantes de alimentos, bebidas y cosméticos; e indirecta, a partir de insectos del género Dactylopius, de los que se obtiene un colorante llamado grana o cochinilla del nopal; como fuente de **mucllagos**, para la elaboración de pegamentos y adhesivos y como fuente de **pectinas** para la elaboración de jaleas y mermeladas.

Mención aparte merece el uso de las cactáceas como **plantas de ornato**. El interés por estas plantas se remonta al primer contacto de exploradores, conquistadores y naturalistas europeos con la flora del nuevo mundo, a quienes llamaron la atención por sus raras formas y particular belleza. Al transcurrir el

tiempo este interés aumentó, sobre todo entre aficionados y científicos; por lo que el comercio de cactáceas alcanzó volúmenes insospechados (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

Para satisfacer esta gran demanda, ya sea como plantas de ornato o como objetos de colección, surgieron en el extranjero numerosos establecimientos comerciales dedicados a la importación, reproducción y venta de cactus. Actualmente, los países con una desarrollada producción comercial son Japón, Holanda, Bélgica, Inglaterra, Francia, Italia, España y los Estados Unidos, donde el número de cactófilos aumenta cada día (Oldfield, 1985a; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b; Kobayashi, 1993).

PROBLEMAS DE CONSERVACION

Existen diversos listados que enumeran y sitúan a las diferentes especies de esta familia en la categoría correspondiente de acuerdo al grado de amenaza, entre los que están los publicados por la IUCN y el CITES. Este último es un tratado de carácter internacional fundado para reglamentar los permisos de exportación e importación de la flora y fauna silvestre de los países signatarios y, al que se incorporó México el 2 de julio de 1991 (Franco, 1994). Otros listados publicados son los del INIREB (Vovides, 1981), los de la SEDUE (SEDUE, 1991) y los publicados por la SEDESOL (SEDESOL, 1993).

Vovides (1981), reportó 93 especies de cactus de un total de 212 diferentes plantas mexicanas amenazadas; el mismo autor, en un listado posterior, eleva el número a 167 taxa (Vovides, 1988).

En 1983, la IUCN registró 297 especies de cactáceas ubicadas en las distintas categorías de plantas amenazadas. Esta última cifra, contrasta notablemente con las 111 especies mencionadas en las listas publicadas por la SEDUE en 1991 y SEDESOL en 1993 (IUCN, 1983; SEDUE, 1991; SEDESOL, 1993).

Se considera que las tres causas principales de la reducción continua de las poblaciones silvestres de cactáceas son, en orden de importancia (Sánchez-Mejorada, 1982b; Arias, 1991):

- a) la sobrecolecta del recurso
- b) la destrucción y modificación de su hábitat
- c) factores naturales

Todos estos factores están relacionados sobre todo con una distribución geográfica restringida y es probable que dos o más factores puedan incidir en una misma especie.

a) Sobrecolecta del recurso

Es la razón principal por la que han disminuído las poblaciones silvestres, debido a su uso como plantas ornamentales.

Las cactáceas se encuentran entre las plantas más intensamente comercializadas a nivel mundial. La creciente demanda ha causado que muchas especies de fácil cultivo hayan sido reproducidas masivamente; sin embargo, aquellas que son difíciles de propagar o de lento crecimiento, son extraídas de su hábitat (Oldfield, 1985a, 1985b; Milliken, 1987; Sajeve y Orlando, 1989) ya que este comercio ha resultado altamente lucrativo (Carey, 1980).

Debido a la dimensión y a los efectos de este comercio internacional, se llegó a la inclusión de toda la familia Cactaceae en los Apéndices I y II del CITES desde 1973 (Oldfield, 1985a; Maddams, 1993). El Apéndice I, incluye a aquellas especies con las que no se puede comerciar por ser consideradas en inminente peligro de extinción. El Apéndice II, incluye a las especies cuyo comercio internacional está sujeto a permisos de exportación, aunque no necesariamente indica que se encuentren en peligro de extinción. En este Apéndice, se encuentran todas las especies restantes no incluidas en el Apéndice I (Hunt, 1992).

Se han reportado cifras muy elevadas del comercio desmedido de estas plantas, el cual, en muchas ocasiones ha sido ilegal (Anónimo, 1985; Sánchez-Mejorada, 1982c; Milliken, 1987). Se reporta que los Estados Unidos importaron aproximadamente 7 millones de ejemplares de cactáceas y otras suculentas en 1977, cifra que bajó considerablemente a 2.6 millones en 1982. Las importaciones de plantas suculentas mexicanas, también disminuyeron de 1.5 millones en 1977 a 81,600 en 1982 (Fuller, 1985; Sánchez-Mejorada, 1982c). En 1984, los Estados Unidos importaron casi 80,000 cactus provenientes de México, y se calcula que fue un 18% menos que en 1983 de acuerdo con datos del CITES (Campbell, 1986).

Además de los Estados Unidos, existen numerosos países europeos que comercian con cactáceas y otras suculentas, entre los que están Holanda, Bélgica, Inglaterra, Francia, Italia y España. Japón también comercia con cactus; un estudio realizado por la revista TRAFFIC (US), reveló la importación de entre 20 y 40 especies citadas en el Apéndice I en violación al CITES. En este país,

existe una rara fascinación por las formas o especímenes denominados aberrantes, los cuales alcanzan precios muy elevados; de hecho, los precios en Japón por plantas silvestres colectadas podrían ser los más altos del mundo; por ejemplo, en 1987, algunos ejemplares de Astrophytum se vendieron en 1,300 dólares (Milliken, 1987).

Desde el siglo pasado, los cactus y otras suculentas se cultivan en Europa. Muchas de las especies ya han sido bien establecidas en cultivo, principalmente en viveros comerciales dedicados exclusivamente a estas plantas. Esta producción es a gran escala, y se considera que en la actualidad el grueso de la producción ya es independiente de la fuente de material silvestre, incluyendo semillas; sin embargo, a pesar de la disponibilidad de cactus propagados, aún existe una demanda por cactus colectados de poblaciones silvestres que continuamente son importados de México y otros países (Oldfield, 1985a).

b) Destrucción y modificación de su hábitat

Se considera que la destrucción y la modificación del hábitat han sido ocasionados principalmente por los desmontes con fines agrícolas, el sobrepastoreo, la apertura de nuevas vías de comunicación y ductos, la erosión del suelo y la inundación de zonas para embalses (Arias, 1991). Un ejemplo reciente es el que ocurre en la zona de Matehuala - San Luis Potosí donde se amplió la carretera, lo que provocó la destrucción de poblaciones únicas de cactáceas y otras especies de zonas áridas. La carretera pudo ser trazada y construida en otro sitio para proteger el área de mayor diversidad biológica, sin embargo no ocurrió así (Arias, com. pers., julio/94).

c) Factores naturales

Son pocos los estudios sobre los factores naturales y, al parecer, están muy relacionados con los efectos del saqueo, ya que la recolección de plantas reduce el número de individuos en las poblaciones y por lo tanto disminuye el número disponible de semillas para la reproducción, además, se favorece el cruzamiento entre individuos emparentados, lo que trae consigo defectos genéticos que se reflejan en la capacidad adaptativa de las especies (Arias, 1991).

Entre las cactáceas más severamente amenazadas por el efecto combinado de los factores anteriormente mencionados, se encuentran todas las especies del género Ariocarpus, entre ellas Ariocarpus retusus (Lám. 1a).

CLASIFICACION BOTANICA

(Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a)

REINO	Vegetal
DIVISION	Embryophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Dicotyledonae
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Cactoideae
TRIBU	Cacteae
SUBTRIBU	Thelocactinae
GENERO	<i>Ariocarpus</i>
SUBGENERO	<i>Ariocarpus</i>
ESPECIE	<i>Ariocarpus retusus</i>

DESCRIPCION BOTANICA DEL GENERO *Ariocarpus*

El nombre del género *Ariocarpus* proviene del término griego *Ario*, al referirse al fruto que es semejante a los de las plantas del género *Aria*, y de *carpus*, que significa fruto. La especie *A. retusus*, significa retuso o con el ápice truncado (Britton y Rose, 1922; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a). Fue descrito por Michael J. Scheidweiler en 1838; la especie tipo es *A. retusus*. Actualmente se reconocen siete especies (Mitich y Bruhn, 1977; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a; Hernández y Anderson, 1992):

A. retusus Scheidweiler

A. agavoides (Castañeda) Anderson

A. trigonus Schumann

A. scaphirostris Boedeker

A. kotschoubeyanus (Lemaire) Schumann

A. fissuratus (Engelmann) Schumann

A. bravoanus Hernández & Anderson

Estas especies son endémicas de México, sin embargo, *A. fissuratus* también se encuentra en el límite Sur de Texas (Martin, 1964).

Son plantas pequeñas, con raíces fusiformes grandes y tallos simples de forma globosa o aplanada. Se caracterizan por presentar un extenso sistema de canales mucilaginosos considerados como una probable adaptación para almacenar agua, ya que durante los meses de sequía prácticamente desaparecen (Anderson, 1962; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a); tubérculos imbricados dispuestos en series espiraladas en forma de roseta, de consistencia cartilaginosa. Un aspecto sobresaliente del género es que presenta dimorfismo areolar, es decir, las aréolas floríferas (meristemas que dan origen a las flores) y las aréolas espiníferas (meristemas que dan origen a las espinas) se desarrollan a partir de un solo meristemo: cuando la planta madura, el meristemo florífero permanece próximo a la axila, en la base del tubérculo, y el meristemo espinífero se desplaza hacia el ápice del tubérculo; espinas ausentes o reducidas. El ápice de la planta y las axilas de los tubérculos jóvenes producen una densa masa de tricomas, largos, setosos y amarillentos conocidos en conjunto con el nombre de lana, que se desarrollan a partir de las aréolas floríferas.

El género comprende dos subgéneros: *Roseocactus*, caracterizado por la presencia de un surco desde la base hasta el ápice de cada tubérculo y con flores

casi siempre de color solferino, nunca amarillas y rara vez blancas; y *Ariocarpus*, que nunca presenta surco areolar (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a; Hernández y Anderson, 1992).

***Ariocarpus retusus* Scheldweiller**
Bull. Acad. Sci. Brux. 5:492, 1838

Nombres comunes: chaute, peyote cimarrón.

Plantas que alcanzan 12 cm de altura y de 10 a 25 cm de diámetro, color verde azulado o grisáceo. El Tallo crece parcialmente enterrado en el suelo, globoso; los **tubérculos** son triangulares, atenuados hacia el ápice que en ocasiones se prolongan en forma de un mucrón cónico, la superficie es convexa o casi plana, algo ondulada y más o menos arrugada, no están fisurados, de 1.5 a 4 cm de longitud y 1 a 3.5 cm de ancho, son casi tan largos como anchos (Britton y Rose, 1922; Backeberg, 1976; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a); presenta **dimorfismo areolar** a partir del meristemo original que se elonga y se divide en dos tipos de aréolas: la espinífera, localizada en la punta de los tubérculos, de forma circular y pequeña (1 a 5 mm de diámetro) con poca lana, espinas diminutas y a veces caduca; y la florífera, que es lanosa y está ubicada cerca de la axila de los tubérculos.

Las **flores** son diurnas y surgen de las aréolas floríferas de los tubérculos más jóvenes situados en el ápice de la planta, miden de 4 a 5 cm de diámetro y hasta 4.5 cm de longitud, su color es blanco, en ocasiones con tintes rojizos en la línea media de los segmentos exteriores del perianto; presentan numerosos estambres de filamentos blanquecinos y anteras de color amarillo oro; los granos de polen

miden entre 80 y 85 micras. Las flores son producidas de septiembre a noviembre (Minnich, 1990).

El fruto es ovoide, carnoso y conserva los restos secos del perianto; de 10 a 25 mm de longitud, su color es blanco verdoso hasta rosado pálido, al secarse, adquiere un color castaño y generalmente permanece oculto entre la masa de tricomas en el centro de la planta, donde se desintegra dejando allí las semillas.

Las semillas son piriformes y pequeñas, con testa tuberculada de color negro mate; de 0.75 a 1.6 mm de longitud y 0.6 a 1.5 mm de diámetro; el hilo es grande y basal, el micrópilo está en un extremo del hilo; el embrión es ovoide, con los cotiledones muy gruesos que apenas se distinguen por un surco en el ápice; existe rudimento del perisperma (Anderson, 1962; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a).

Dada la variabilidad en cuanto a la forma, tamaño y superficie de los tubérculos, Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991a), consideran a esta especie integrada por un complejo de formas no lo suficientemente estudiadas para darles reconocimiento taxonómico.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Se localiza en los estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, Tamaulipas y San Luis Potosí. Crece en colinas de piedra caliza cubiertas con rocas fragmentadas siendo visibles sólo los tubérculos. Está asociada a matorrales rosetófilos donde son comunes Agave stricta, Yucca carnerosana, Dasyliirion sp. entre otras especies.

USOS DE *Ariocarpus retusus*

Uno de los usos que se le atribuyen a esta especie es como planta medicinal para combatir los efectos del paludismo (Diguët, 1928), así como curativo para algunas enfermedades febriles. Su empleo en la medicina popular probablemente se remonte al pasado, ya que fue encontrada la mitad de un ejemplar fosilizado en el Valle de Tehuacán Pue., el cual se considera que fue llevado con fines curativos a tal lugar, debido a que esta especie sólo se distribuye desde Coahuila hasta San Luis Potosí (Quintero, 1972; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a). Otro de los usos asignados a esta especie, es el de la obtención de pegamentos a partir de su mucílago (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

Diversos estudios químicos realizados en varias cactáceas proporcionaron datos de la presencia de carbohidratos en A. retusus, además de otros compuestos como el β -sitosterol, un fitosterol; los flavonoides kampferol y quercetina; pigmentos como betacianos y flavonoles encontrados en flores y frutos; taninos y alcaloides, éstos últimos de gran interés debido a sus propiedades farmacológicas (Bravo-Hollis, 1978).

La presencia de alcaloides en el género Ariocarpus, denominado antiguamente como Anhalonium, fue reportada por Lewin en 1888 (citado por Bravo-Hollis, 1978). La investigación de alcaloides en cactáceas se enfocó principalmente hacia el grupo de plantas denominado con el nombre genérico de "peyotes", en el cual se incluye a Ariocarpus, con el fin de buscar el principio activo del peyote (Lophophora williamsii), planta alucinógena de uso ritual en las tribus del norte de México (Anderson, 1960; Bravo-Hollis, 1978).

En A. retusus se encontraron los siguientes alcaloides de estructura química conocida: hordenina (también presente en el peyote), N-metiltiramina y N-metil-3,4-dimetoxi- β -feniletilamina (Bravo-Hollis, 1978).

A. retusus, al igual que las demás especies de su género, se ha comercializado como planta de ornato debido a su rara forma y la belleza de sus flores.

PROBLEMAS DE CONSERVACION EN *Ariocarpus retusus*

El saqueo indiscriminado de plantas silvestres con fines comerciales es la causa principal de la reducción continua de las poblaciones del género Ariocarpus.

Los Ariocarpus han sido muy solicitados por coleccionistas y científicos, razón por la cual son colectados de su hábitat natural, lo que ha causado serios daños a las poblaciones silvestres debido a que son plantas que crecen muy lentamente y alcanzan su madurez reproductiva después de varios años (Sajeva y Orlando, 1989). Se reporta que las especies de este género pueden tardar hasta 20 años para alcanzar un diámetro de tan sólo 6 cm (Oldfield, 1985b) y, aunque no existen datos precisos de la edad a la que florecen en el campo, observaciones en invernadero indican que esto ocurre después de los 4 ó 5 años (Reyes, com. pers., marzo/94).

Estas plantas se han comercializado ilegalmente en volúmenes muy altos, siendo exportadas principalmente de México hacia los Estados Unidos, Japón y varios países de Europa. A pesar de que las importaciones de cactus mexicanos hacia los Estados Unidos disminuyó en 1984, se reporta que se incrementó la proporción de especies de lento crecimiento, especialmente del género Ariocarpus. En ese año, los Ariocarpus constituyeron casi la mitad del total de los

cactos importados de México; así pues, se contaron 39,587 ejemplares, de los cuales 14,116 fueron de A. retusus. El mismo año, fueron legalmente reexportados de los Estados Unidos hacia Japón y Europa, sólo 5,550 Ariocarpus (Campbell, 1986).

En Japón también existe una gran demanda por las especies silvestres de Ariocarpus, algunos de estos especímenes colectados en el campo se estiman con una edad aproximada de 60 años, y que desafortunadamente durante el comercio sufren una alta mortalidad (Milliken, 1987).

Gracias al control en el comercio internacional de estas especies, recientemente se ha fomentado su propagación en viveros europeos (Oldfield, 1985b); no obstante, continúa el saqueo de plantas de las poblaciones silvestres.

Por lo anterior Ariocarpus retusus ha sido catalogada como especie vulnerable "V" en las listas de especies amenazadas (Vovides, 1981, 1988; IUCN, 1983; Villalobos, 1988; Hunt, 1992). Se consideran especies vulnerables aquellas que sus poblaciones han disminuido por sobreexplotación o reducción drástica de su hábital y que, de seguir siendo afectadas, pueden pasar a la categoría de especies en peligro de extinción "E" (IUCN, 1980).

En marzo de 1992 fue incluido todo el género Ariocarpus en el Apéndice I, el más restrictivo del CITES. Las especies que se agregaron en ese año fueron A. kotschoubeyanus, A. fissuratus, A. retusus y el recientemente descrito A. bravoanus (Hunt, 1992; Sajeva y Orlando, 1992).

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El CTV es una rama de la Biología que comprende un conjunto de técnicas basadas en la Teoría Celular, expresada por Schleiden y Schwann en 1838 - 1839, la cual postula que las células son autónomas y totipotentes, es decir, que cada célula vegetal tiene el potencial de regeneración para formar plantas completas (Staba, 1980; Gautheret, 1982).

En general, estas técnicas consisten en cultivar asépticamente (*in vitro*) cualquier estructura vegetal (explante) como por ejemplo: células, protoplastos, embriones, órganos, tejidos, etc., bajo condiciones ambientales y nutricionales controladas (pH, fotoperíodo, intensidad luminosa, temperatura, medio de cultivo, etc.), dirigiendo de este modo los eventos biosintéticos y/o morfogenéticos deseados (Murashige, 1978; George y Sherrington, 1984).

La formación de plantas nuevas a partir de los tejidos cultivados puede ser obtenida siguiendo tres vías: a) a partir de yemas preexistentes a las que se promovió su proliferación y crecimiento ; b) a partir de la morfogénesis cuando nuevos brotes son formados directamente en los explantes o en tejidos desorganizados y, c) a través de la formación de embriones somáticos, semejantes a los embriones cigóticos, que pueden desarrollarse en plántulas (George y Sherrington, 1984).

Skoog y Miller, en 1957 (citados por George y Sherrington, 1984), demostraron que los reguladores del crecimiento, compuestos orgánicos que actúan en pequeñas cantidades y que estimulan, inhiben o modifican diversos procesos fisiológicos de las plantas, constituyen junto con el tipo y estado de desarrollo del explante los factores más importantes en la determinación de las respuestas

morfogenéticas de los tejidos (Litz y Jaiswal, 1991). Los reguladores del crecimiento más utilizados en CTV son aquellos que promueven el crecimiento, tales como las auxinas y las citocininas. Las auxinas estimulan la elongación celular, activan el crecimiento en espesor de los tallos y promueven la rizogénesis. Se sintetizan y se encuentran principalmente en los meristemos apicales y se transportan generalmente hacia abajo (transporte basipétalo). Las citocininas, en cambio, activan principalmente la división celular y retardan la senescencia de los órganos; hay evidencias de que las citocininas se concentran en tejidos con crecimiento activo, predominantemente en las raíces, ya que son sintetizadas en sus ápices, de donde son transportadas hacia la parte superior de la planta (transporte acropétalo). En los tejidos cultivados *in vitro*, generalmente, una concentración alta de auxinas en relación a las citocininas promueve la formación de callo y raíces y, una concentración alta de citocininas respecto a las auxinas induce la formación de brotes, mientras que el desarrollo de callo puede ocurrir en un amplio rango de concentraciones hormonales (George y Sherrington, 1984).

Estas técnicas han constituido herramientas muy importantes en diversas áreas de la ciencia y la tecnología:

- * en la **investigación básica**, donde este sistema proporciona un modelo para estudios bioquímicos, fisiológicos, anatómicos y de genética molecular, entre otros (Sánchez, 1985).

- * en la **micropropagación** de plantas **ALIMENTICIAS**: por ejemplo el espárrago (*Asparagus officinalis*), zanahoria (*Daucus carota*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*); **ORNAMENTALES**: anturio (*Anthurium andreanum*), palmas

(Chamaedorea spp.), crisantemo (Chrysanthemum morifolium), helechos (Cyclosorus dentatus), orquídeas (Cattleya spp.); **FRUTALES**: manzano (Malus sp.), limón (Citrus limon), plátano (Musa sp.); **FORESTALES**: pinos (Pinus spp.), secuoyas (Sequoia spp.) y **MEDICINALES**: toloache (Datura stramonium), agaves (Agave spp.), entre otras especies (Murashige, 1978; George y Sherrington, 1984).

* en el **mejoramiento genético** de las especies a través de distintos procesos de modificación genética (fusión de protoplastos, biolística, rescate de embriones híbridos) y de la selección por medio de diversas técnicas, es posible lograr características bioquímicas, fisiológicas o morfológicas deseadas en las plantas que puedan ser utilizadas en la producción agrícola e industrial como por ejemplo: la obtención de variedades resistentes a herbicidas, enfermedades, a la sequía, a la salinidad, etc. (Robert y Loyola, 1985; Gray y Finer, 1993).

* en la **preservación de germoplasma vegetal *in vitro*** libre de patógenos, que pueda ser almacenado mediante subcultivos periódicos, al utilizar medios mínimos, por medio de la refrigeración o la congelación con nitrógeno líquido, que conserve su estabilidad genética (Rubluo, 1985; Grout, 1990).

Los métodos de CTV han proporcionado grandes posibilidades para la multiplicación masiva y rápida de muchos y diferentes tipos de plantas; sin embargo, su aplicación en la micropropagación de especies amenazadas es relativamente reciente. Su uso ha sido recomendado como una alternativa en aquellas especies con limitada propagación vegetativa o donde la disponibilidad, número y viabilidad de las semillas es escasa, lo que permite que puedan ser regeneradas en un lapso relativamente corto y, posteriormente, llegar a ser

reintroducidas a su hábitat, lo cual representaría una de las primeras etapas en la recuperación de poblaciones amenazadas de extinción (Wochok, 1981; Rubluo, 1985; León, 1987; Fay, 1994; Mistretta, 1994).

CULTIVO DE TEJIDOS EN CACTACEAS

Debido a que las cactáceas constituyen un grupo taxonómico con un alto índice de especies en peligro de extinción, principalmente causado por el saqueo de ejemplares, algunos investigadores han propuesto que el uso del CTV, sería de gran utilidad para la propagación de esta importante familia de plantas (Mauseth, 1979b; Johnson y Emino, 1979b; Starling, 1985). Estas técnicas representarían una alternativa para el estudio y el mantenimiento de germoplasma valioso (Smith *et al.*, 1991), así como para resolver el problema de cómo satisfacer la demanda en aquellas especies de interés comercial y de esta forma reducir la presión que afecta a las poblaciones silvestres (Oldfield, 1985b; Fay, 1994).

A pesar de ser apreciadas como ornamentales de alto valor comercial y gran demanda, hasta 1983 se consideraba que las cactáceas habían recibido poca atención debido a que los reportes de su propagación *in vitro* eran escasos comparados con los de otros grupos de plantas (Starling y Dodds, 1983). Sólo recientemente se han publicado más trabajos sobre el cultivo *in vitro* de plantas suculentas; de éstas, la familia de las cactáceas es la que ha recibido mayor atención y donde también se ha logrado la micropropagación con más éxito (Fay y Gratton, 1992).

Hace ya más de 35 años que se realizaron los primeros intentos para cultivar cactus *in vitro*. El primer estudio fue publicado en 1957, cuando Merrill King indujo la formación de callo en varias especies (Starling y Dodds, 1983) y, desde

entonces, la mayoría de las investigaciones sobre el cultivo de tejidos de cactáceas han sido empleadas con fines de propagación (Bonness *et al.*, 1993); no obstante, también se han realizado estudios con otros objetivos, entre los que se encuentran los de Sachar e Iyer, en 1959 (citados por Fay y Gratton, 1992), quienes investigaron los efectos de las auxinas, citocininas y giberelinas sobre la formación de callo a partir de tejido de placenta de Opuntia dilleanii; los de Steinhart, en 1962, sobre la biosíntesis de alcaloides en callos de Trichocereus spachianus (Echinopsis spachianus) (citado por Johnson y Emino, 1979b); estudios morfogénéticos como los de Mauseth en Opuntia polyacantha y Echinocereus engelmannii (Mauseth y Halperin, 1975; Mauseth, 1976, 1977 y 1979a); estudios sobre el crecimiento y optimización en la producción de callo de Mammillaria prolifera [Neomammillaria] (Minocha y Mehra, 1974); los efectuados por Seeni y Gnanam en 1980 acerca de la fotosíntesis en plantas CAM, en cultivos de células en suspensión de Chamaecereus sylvestrii (Echinopsis chamaecereus) (citado por Fay y Gratton, 1992); otros estudios se han enfocado al desarrollo de métodos para la extracción aséptica de tejidos sin dañar a la planta madre (Havel y Kolár, 1983); más recientemente, los de Dabekaussen *et al.* (1991) quienes investigaron los factores que afectan la activación areolar en Sulcorebutia alba (Rebutia caniqueralii), y los estudios realizados por Bonness *et al.* (1993) referentes al desarrollo y producción de pigmentos en callos de Cephalocereus senilis.

La primera investigación con éxito en la propagación *in vitro* de una cactácea se realizó con Mammillaria woodsii (Kolár *et al.*, 1976) de la que se regeneraron brotes vía callo a partir de tejido medular cultivado en medio MS con 2 mg/l de K y AIA respectivamente; el medio de cultivo empleado fue el mismo que los autores utilizaban para inducir la organogénesis en callos de Nicotiana tabacum, por lo

que enfatizaron que condiciones nutritivas y hormonales idénticas fueron aceptables aún cuando se trataba de dos tipos de plantas ecológica y sistemáticamente diferentes.

En estudios posteriores se logró con éxito la regeneración de plántulas a través de éstas técnicas, en los que se obtuvieron también otras respuestas morfogénicas tales como callo y raíces (Johnson y Emino, 1979a, 1979b; Krulik, 1980). Algunos investigadores lograron inducir brotes sin pasar por una fase de callo (organogénesis directa), lo cual ofrece la ventaja de poder clonar individuos, ya que, si ocurre la formación de callo, éste tiene la desventaja de ser inestable genéticamente y llegar a perder su potencial para producir brotes o bien, puede producir plantas aberrantes (Starling y Dodds, 1983). Esta inestabilidad genética producida bajo condiciones *in vitro*, conocida como variación somaclonal, ligada a estudios de mejoramiento genético puede significar grandes beneficios (Beverdorf, 1990).

El primero en reportar la propagación vegetativa de cactus *in vitro* por organogénesis directa fue Mauseth (1979b), quien indujo la brotación en 10 especies a partir de aréolas cultivadas en presencia de BA (1.0 a 10 mg/l); desde entonces la tendencia ha sido tratar de mantener cultivos más estables, sobre todo, cuando las plantas son propagadas con propósitos de conservación (Fay y Gratton, 1992; Mistretta, 1994).

De acuerdo a los estudios realizados, las técnicas de micropropagación en cactáceas se pueden resumir en las siguientes etapas: el establecimiento de cultivos asépticos por medio de la esterilización superficial de los explantes y la del medio nutritivo, la proliferación de propágulos, el enraizamiento y la

aclimatación ex vitro de los mismos (George y Sherrington, 1984; Starling y Dodds, 1983).

El tipo de explante utilizado para la micropropagación es un factor importante, se ha encontrado que distintos tipos de tejidos pueden ser óptimos en diferentes especies. En cactáceas, debido a sus características anatómicas particulares, se ha utilizado principalmente el tallo o cuerpo de la planta, ya sea de plántulas germinadas in vitro o de plantas maduras, el cual ha sido disectado de diferentes formas para obtener la médula, secciones apicales, laterales o basales, tubérculos o sólo las aréolas.

Las cactáceas, al igual que las demás angiospermas, tienen las yemas localizadas en el sitio donde la hoja se une con el tallo. Estas yemas, denominadas yemas axilares, se desarrollan en aréolas en los cactus y las hojas de estas yemas axilares corresponden a las espinas. Las aréolas normalmente son inactivas después de que se han formado las espinas, sin embargo, pueden ser reactivadas in vitro para producir brotes (Mauseth, 1979b; Bonness et al., 1993). Los tubérculos, que contienen a las aréolas, son análogos a la base de las hojas de las demás plantas con flores (Johnson y Emimo, 1979b; Mauseth, 1979b).

Después de la esterilización superficial, los tejidos vegetales son inoculados en un medio nutritivo, generalmente solidificado con agar. El medio de cultivo más utilizado hasta la fecha ha sido el desarrollado por Murashige y Skoog (1962), conocido como MS, del cual se ha comprobado que tiene el potencial para soportar todas las fases de la organogénesis en algunas cactáceas (Johnson y Emimo, 1979b; Mauseth, 1979b).

La respuesta de los tejidos está determinada en gran medida por el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento contenidos en el medio. En cactáceas, las citocininas más utilizadas para romper la latencia de las yemas axilares (aréolas) son el BA, además de la Z, K y el 2iP (Fay y Gratton, 1992). Se ha demostrado que las auxinas pueden ser necesarias en muy bajas concentraciones o bien, la proliferación de brotes puede proceder en su ausencia (Clayton et al., 1990). Generalmente, el 2,4-D se ha empleado para la inducción de callos y en muchos de los casos de embriogénesis somática, mientras que el AIA y el ANA se han utilizado más para la inducción de raíces en plántulas regeneradas in vitro.

La experiencia en los últimos años ha demostrado que la proliferación de brotes in vitro de cactáceas puede lograrse a través del rompimiento de la dominancia apical, y de esta forma activar las yemas axilares (aréolas) con la adición de citocininas al medio de cultivo, o bien, de citocininas combinadas con auxinas en concentraciones muy bajas (Fay y Gratton, 1992). Los resultados obtenidos, también señalan que los niveles requeridos de auxinas y citocininas en el medio pueden ser específicos para cada especie.

En la tabla I, se resumen el tipo de explante, medio de cultivo y reguladores del crecimiento que algunos investigadores han utilizado para la obtención de plántulas de cactáceas regeneradas in vitro.

CULTIVO DE TEJIDOS EN *Ariocarpus*

Los reportes del cultivo in vitro en el género *Ariocarpus* son escasos. Krulik, en 1980, cultivó secciones de tallo de *A. scaphirostris* en medio MS, sin embargo, no se especifican los reguladores del crecimiento empleados ni las concentraciones, la única respuesta reportada es la obtención de callo. Starling (1985) cultivó ápices de *A. trigonus* también en medio MS suplementado con BA y ANA y eventualmente se obtuvieron algunos brotes.

Recientemente, Stuppy y Nagl (1992) lograron la regeneración in vitro de *A. retusus* vía embriogénesis somática a partir de callo cultivado en medio MS suplementado con agua de coco. Este y otros trabajos demuestran el creciente interés que tienen investigadores extranjeros para propagar cactáceas mexicanas en peligro de extinción, tales como las del género *Ariocarpus*.

TABLE I.- Algunas especies de cactáceas regeneradas *in vitro*.

ESPECIE	EXPLANTE	MEDIO DE CULTIVO	REGULADORES DEL CRECIMIENTO (mg/l)	RESPUESTA <i>IN VITRO</i>	REFERENCIA
<i>Mammillaria woodsi</i>	Médula	MS	K (2.0) + AIA (2.0)	Callo y brotes	Kólar <i>et al.</i> , 1976
<i>M. elongata</i>	Tubérculos	MS	2iP (10.0) + AIA (1.0)	Brotes	Johnson y Emino, 1979a
<i>Mammillaria spp.</i>	Tubérculos	MS	2iP (10.0) + IBA (1.0)	Brotes	"
8 especies	Aréolas y secciones de tallo	MS	No se especifican	Callo y Brotes	"
10 especies	Aréolas	Lin y Staba	BA (1.0 a 10.0)	Brotes	Mauseth, 1979b
<i>Epiphyllum chryso-cardium</i>	Secciones de tallo	MS	BA (1.0) + ANA (0.1)	Brotes	Lazarte <i>et al.</i> , 1982
<i>M. carmenae</i>	Tubérculos	MS	BA (2.0) + ANA (1.0)	Brotes	Vyskot y Jára, 1984
<i>M. prolifera</i>	Tubérculos	MS	BA(0.5 a 1.0) + ANA(0.5 a 1.0)	Brotes	"
<i>Astrophytum myrtillo-stigma</i>	Aréolas	MS	K (0.5) + AIA (5.0)	Brotes	"
<i>Trichocereus spachianus</i>	Aréolas	MS	K (0.5) + AIA (5.0)	Brotes	"
<i>Leuchtenbergia principis</i>	Apices	MS	BA (10.0) + ANA (0.1)	Brotes	Starling, 1985
<i>Ariocarpus trigonus</i>	Apices	MS	No se especifican	Brotes esporádicos	"
<i>Ferocactus acanthodes</i>	Apices	MS	K (10.0) + ANA (1.0)	Callo y brotes	Ault y Blackmon, 1987
<i>Echinocactus grusonii</i>	Secciones de tallo	MS	K (4.3) + AIA (0.8)	Callo y brotes	Frias, 1989
<i>M. haageana</i>	Secciones de tallo	MS	BA (1.0)	Brotes	Martínez-Vázquez y Rublúo, 1989
<i>M. san-angelensis</i>	Secciones de tallo	MS	BA (0.1 a 1.0) + ANA (0.01)	Brotes	"
<i>Coryphantha macromeris</i>	Plántulas	MS	BA (10.0) + 2,4-D (0.1)	Brotes	Smith <i>et al.</i> , 1991
<i>Aztekium ritteri</i>	Secciones de tallo	MS	BA (1.0) + ANA (0.01)	Brotes	Rodríguez -Garay y Rublúo, 1992
<i>Mediocactus coccineus</i>	Apices	MS	BA (1.0) + ANA (0.05)	Brotes	Infante, 1992
<i>Melocactus bellavistensis</i>	Plántulas	MS	BA (5.0) + ANA (1.0) 2iP (2.0) + ANA (0.3)	Brotes	Hernández <i>et al.</i> , 1994
<i>M. huitzilopochtli</i>	Secciones de tallo	MS	2iP (10.0) + AIA (1.0)	Callo y brotes	Arriaga, 1994

Dado que la totipotencialidad de las células vegetales puede ser promovida in vitro a través de la variación controlada de las condiciones de cultivo para la regeneración de nuevos individuos, es posible que a partir de tejidos de plántulas cultivadas in vitro de Ariocarpus retusus se logren diferenciar raíces, brotes y/o embriones somáticos. Con base en esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

a) Objetivo General

Establecer las condiciones experimentales que permitan la regeneración in vitro de Ariocarpus retusus Scheidw. a partir de tejidos de plántulas.

b) Objetivos Particulares

Bajo las condiciones experimentales a ensayar:

1. Determinar el tipo de explante con mayor potencial regenerativo.
2. Determinar las mejores concentraciones y combinaciones de los reguladores del crecimiento para la regeneración in vitro de A. retusus.

MATERIALES Y METODOS

Como material biológico se utilizaron semillas de Ariocarpus retusus colectadas de 3 plantas originarias de los estados de Zacatecas, Tamaulipas y San Luis Potosí cada una. Las semillas fueron germinadas in vitro para obtener plántulas, las cuales se utilizaron como fuente de explantes.

Desinfección y siembra de las semillas

Las semillas fueron previamente seleccionadas y se emplearon aquellas que no presentaron daños en la cubierta seminal. Fueron lavadas durante 15 minutos con detergente líquido comercial "Soilax" al 2% (v/v) en agitación continua. Después de ser enjuagadas con agua destilada, se escarificaron sumergiéndolas en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) durante 30 segundos. Posteriormente se agitaron 2 minutos en etanol al 70% (v/v) y finalmente se desinfectaron con hipoclorito de sodio concentrado (NaOCl, 6% de cloro activo) adicionado con 2 gotas de detergente puro Tween 80 por cada 50 ml de solución, durante 20 minutos en agitación constante.

Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, las semillas fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada esterilizada y posteriormente se sembraron 4 semillas por cada frasco con medio de cultivo. Se sembraron en total 254 semillas (Fig. 1).

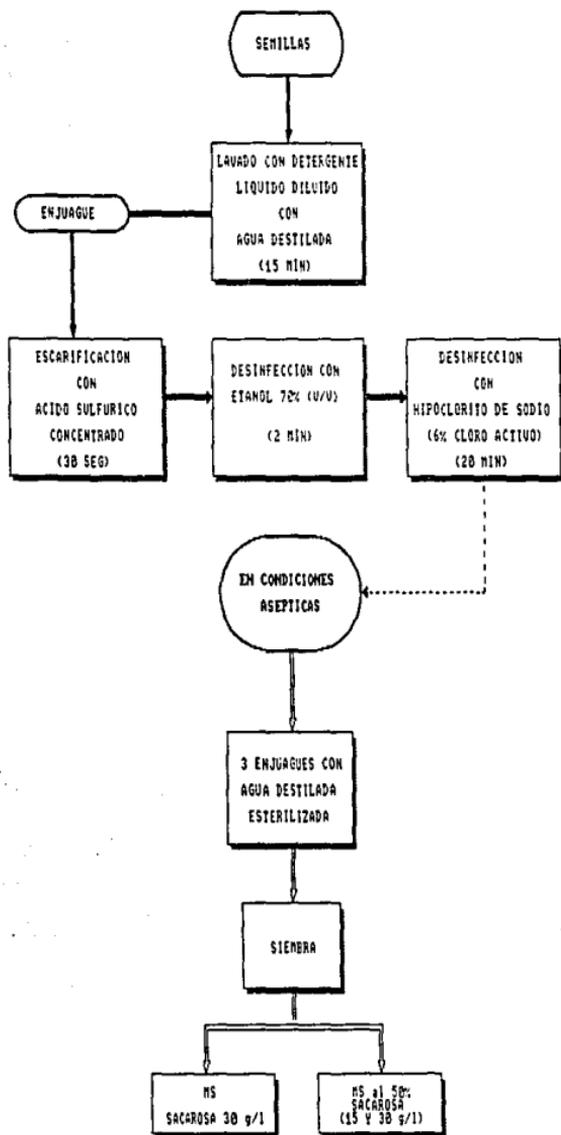


Fig 1.- Procedimiento para la siembra in vitro de semillas de *Ariocarpus retusus*.

El medio basal para la germinación de las semillas fue el de Murashige y Skoog (1962) (MS) con sacarosa 30 g/l y MS al 50% de la concentración de todos sus componentes con sacarosa 15 y 30 g/l, la concentración de agar fue de 8 g/l (Apéndice I).

Obtención y siembra de explantes

Los explantes se obtuvieron a partir de plántulas provenientes de semillas de A. retusus germinadas in vitro.

Las plántulas con un tallo de 6 a 10 mm de longitud fueron disectadas para obtener 4 tipos de explantes que se denominaron de la siguiente manera (Fig. 2; Lám. 1b):

CENTRAL	(C)	Correspondió a la región central del tallo que contiene al meristemo apical
LATERAL	(L)	Regiones laterales del tallo unidas respectivamente a un tubérculo
TUBERCULO	(T)	Todo el tubérculo, desde la base
RAIZ	(R)	Toda la raíz, desde la corona

Por cada plántula se obtuvieron al menos 5 explantes: un explante central, dos explantes laterales, un tubérculo y una raíz.

De acuerdo con la disponibilidad del material biológico, para cada uno de los tratamientos con reguladores del crecimiento se utilizaron tres plántulas, y como mínimo se inocularon tres explantes de cada tipo en un total de cinco frascos.

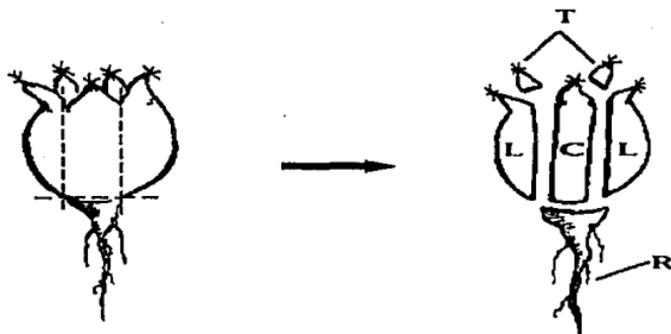


Fig. 2.- Disección de plántulas de *A. retusus* para la obtención de explantes: C, central; L, laterales; T, tubérculos y R, raíz. Altura del tallo: 6 a 10 mm.

Para inducir las respuestas morfogénicas en los explantes inoculados, se utilizó medio MS (1962) con sacarosa 30 g/l (Apéndice I), adicionado de 3 diferentes combinaciones de los siguientes reguladores del crecimiento (Tabla II): BA (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l) en combinación con ANA (0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l); 2iP (0, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/l) combinado con AIA (0 y 1.0 mg/l) y K (0, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/l) combinado con AIA (0 y 1.0 mg/l).

Las relaciones numéricas de mg/l entre citocininas/auxinas, se denotarán separadas por una diagonal, por ejemplo: 3/1 (citocinina 3 mg/l / auxina 1 mg/l).

La concentración de agar fue de 8 g/l para los tratamientos con BA/ANA y 12 g/l para los tratamientos con 2iP/AIA y K/AIA.

Tabla II.- Combinaciones de los reguladores del crecimiento empleados para el cultivo de explantes de *A. retusus* en medio Murashige y Skoog (1962)(MS), pH 5.7, sacarosa 30 g/l, agar 8 g/l (BA/ANA) y agar 12 g/l (2iP/AIA y K/AIA).

		BA (mg/l)					
		0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
ANA (mg/l)	0	1	2	3	4	5	6
	0.1	7	8	9	10	11	12
	0.5	13	14	15	16	17	18
	1.0	19	20	21	22	23	24

		2iP (mg/l)			
		0	1.0	5.0	10.0
AIA (mg/l)	0	1	2	3	4
	1.0	5	6	7	8

		K (mg/l)			
		0	1.0	5.0	10.0
AIA (mg/l)	0	1	2	3	4
	1.0	5	6	7	8

Los medios de cultivo para la germinación de las semillas, así como aquellos donde se cultivaron los explantes, se ajustaron a un pH de 5.7 con soluciones de HCl y KOH 0.1 N.

Cada frasco, de boca ancha con capacidad de 120 ml, contenía 30 ml de medio de cultivo, los cuales fueron esterilizados en un autoclave a 121°C y 1.5 Kg/cm² durante 15 minutos.

Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento a 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h luz con intensidad luminosa de 1800 lux. El desarrollo de los cultivos se siguió mediante observaciones periódicas cada 5 días durante 50 días para la germinación de las semillas y cada 30 días durante 12 meses para los explantes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Floración

El período de floración de tres plantas silvestres de A. retusus mantenidas en condiciones de invernadero fue registrado durante tres años consecutivos (1992, 1993 y 1994). Esta ocurrió entre los meses de julio y diciembre, sin embargo, dos de las tres plantas no florecieron en 1993, y la única que floreció, lo hizo al final de ese año. Moss (1993), registró el inicio de la floración a mediados de septiembre en el lapso de tres años. Peterson (1993), menciona que las plantas del género Ariocarpus son difíciles de mantener fuera de su hábitat natural y en ocasiones es casi imposible que florezcan o que produzcan semillas. En las mejores condiciones, muchas lo hacen una vez al año entre los meses de noviembre a enero.

Al parecer las flores de A. retusus no presentan autogamia y requieren de la polinización cruzada para producir semillas (Arias, com. pers., oct/94), por lo que un segundo problema en su propagación resulta ser que plantas distintas no formen flores al mismo tiempo para poder polinizarlas.

El número de flores registradas por cada planta fue de una a cuatro y generalmente emergieron asincrónicamente. Las flores fueron de color blanco con tintes rosados a verdosos en los segmentos exteriores del perianto, con un diámetro promedio de 5 cm y permanecieron abiertas hasta 5 días. Fue característico que previo a la floración se formara lana abundante en el ápice de las plantas; todas estas observaciones concordaron con lo descrito para la especie (Minnich, 1990; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991a).

Cuando coincidieron en el tiempo de antesis, al menos dos flores de plantas diferentes se polinizaron con la ayuda de pinceles. A los siete meses comenzaron a emerger los frutos, los cuales se colectaron aproximadamente tres meses después, hasta que estuvieron secos para asegurar la maduración de las semillas (Tabla III). La mitad del cuerpo de los frutos permanecieron cubiertos por la lana del ápice de la planta, por lo que fue necesario el empleo de agujas de disección para extraerlos. Cabe señalar que los frutos obtenidos de estas polinizaciones no se utilizaron en este experimento.

No obstante que el objetivo fundamental en el presente estudio fue la regeneración *in vitro* de plantas, los datos de la floración registrados se reportan como una breve aportación al estudio de esta especie.

Semillas

Cuando las plantas son propagadas con propósitos de conservación es importante mantener la diversidad genética, por lo que es conveniente iniciar los cultivos con semillas (Fay y Gratton, 1992); además, éstas pueden resistir una enérgica esterilización superficial y germinar para producir plántulas libres de contaminantes, mismas que pueden ser utilizadas como fuente de explantes (George y Sherrington, 1984).

Debido a que en ensayos preliminares ocurrió un alto índice de contaminación por hongos y bacterias, fue necesario elevar las concentraciones de los desinfectantes y el tiempo de la desinfección, la que se realizó con etanol al 70% e hipoclorito de sodio concentrado (6%), tratamiento que puede considerarse severo ya que en semillas de otras cactáceas éste se ha utilizado generalmente como único agente desinfectante, como se reporta para Mediocatus coccineus

Tabla III.- Antesis y fructificación de 3 plantas de A. retusus mantenidas en condiciones de invernadero

Planta	Antesis	Número de flores	Polinización	No. de frutos obtenidos	Fecha de colecta
A	13-15/sep/1992	1	AxB	1	julio/1993
	26/oct/1992	1	AxC	-	- -
	10-12/jul/1994	1	AxC	-	- -
B	1 ago-15 sep/1992	3	BxA	1	julio/1993
	10-12/jul/1994	1	BxC	-	- -
C	20-26/oct/1992	4	CxB	-	- -
	10-15/dic/1993	2	- -	-	- -
	10-12/jul/1994	3	CxB	-	- -

(Infante, 1992), o bien, con Ferocactus acanthodes, cuyas semillas se desinfectaron solamente con hipoclorito de sodio al 1% antes de ser inoculadas en el medio de cultivo (Ault y Blackmon, 1987).

En A. retusus, es recomendable utilizar semillas provenientes de frutos cerrados debido a que éstas presentan la cubierta seminal de tipo tuberculada, lo que incrementa el riesgo de que, después de su dispersión, se acumulen tierra y otras impurezas entre las ornamentaciones, como ocurre en las semillas de frutos viejos que suelen permanecer entre las axilas de los tubérculos basales de la planta, sitio de donde se obtuvieron las semillas utilizadas en los ensayos preliminares que presentaron una alta incidencia de contaminación. Una vez controlada ésta, ocurrió que las semillas no germinaron. Benson (1982), reportó que en algunas especies de cactáceas la cubierta seminal es muy dura, por lo que se recomienda escarificarla antes de su siembra, ya sea por métodos mecánicos como por fricción con arena o lija, o bien, por métodos químicos tratándola con ácido sulfúrico. En A. retusus, este proceso se realizó al sumergir las semillas en ácido sulfúrico concentrado; 30 segundos fueron suficientes para permitir la germinación; las semillas no respondieron después de estar expuestas 1 minuto al ácido, probablemente éste penetró y afectó al embrión.

Germinación

En ensayos preliminares con semillas no escarificadas la germinación en medio MS no se logró. Posteriormente, en el experimento formal, la germinación de semillas escarificadas ocurrió en los tres medios de cultivo ensayados (Tabla IV), en los que ya a los 5 días después de la siembra había respondido el 6.4% de las semillas en medio MS-50% sacarosa 15 g/l y casi 3 veces ese porcentaje (17.5%) en medio MS-50% sacarosa 30 g/l; no obstante ello, después de 50 días de

iniciados los cultivos, germinaron más semillas en los medios MS (66.3%) y MS-50% sacarosa 15 g/l (63.8%) que en el medio MS sacarosa 30 g/l (33.3%).

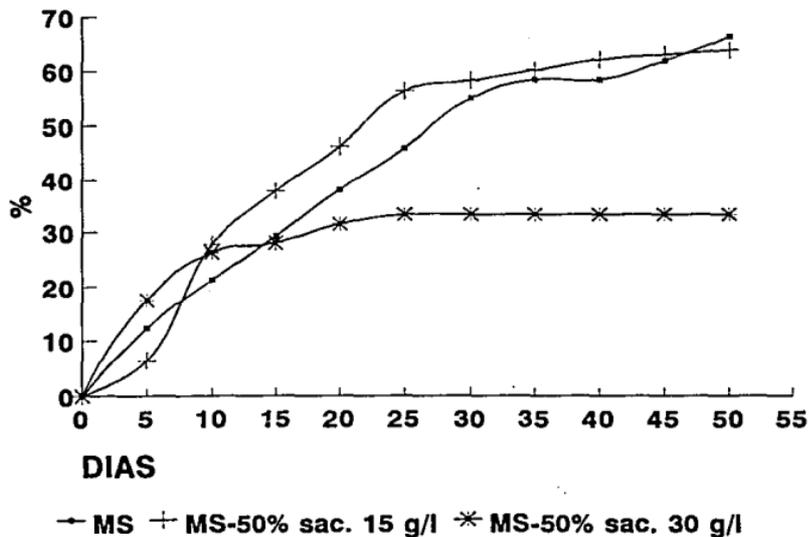
Si se observa la gráfica 1 y la tabla IV, resulta evidente que en los medios de cultivo MS y MS-50% sacarosa 15 g/l, hubo un aumento aproximado de 10 semillas germinadas cada 5 días, conducta que continuó hasta los 30 y 25 días respectivamente, después, los aumentos fueron de 2 a 3 semillas cada 5 días, en tanto que en el medio de cultivo MS-50% sacarosa 30 g/l, los aumentos después de la primera fecha de observación fueron de 1 a 2 semillas germinadas, así hasta el día 25 en que se alcanzó un total de 19 semillas germinadas y ya no germinaron más dentro del período y condiciones ensayadas.

El hecho de que no germinara la totalidad de las semillas puede explicarse por la posible acción de algún mecanismo de latencia. Se sabe que muchas semillas no germinan por esta causa a pesar de tener las condiciones favorables para ello. En algunos casos, una sola planta puede producir diferentes grados de latencia en semillas individuales, de tal forma que la germinación exhibe una distribución discontinua en el tiempo, es decir, en un grupo de semillas puede existir un número reducido inicial de semillas germinando, seguidas de otras con un período prolongado de latencia que pueden germinar repentinamente. Se considera que las cactáceas, que generalmente habitan ambientes áridos, presentan mecanismos naturales de latencia. Resulta notable que muchas semillas de plantas silvestres, que maduraron mientras la planta madre estuvo expuesta a condiciones naturales severas, entran en latencia (Rabenda, 1990). Esto puede interpretarse como un carácter adaptativo de las especies que mantienen así un lote de semillas que no morirían en caso de cambiar las condiciones en que estaría ocurriendo la germinación de un primer grupo de semillas. Moss (1993),

Tabla IV .- Germinación *in vitro* de semillas escarificadas de *A. retusus* en medio a) Murashige y Skoog(1962)(MS); b) MS-50%, sacarosa 15 g/l; c) MS-50%, sacarosa 30 g/l; pH 5.7, agar 8 g/l, 16 h luz, 1800 lux.

TIEMPO (días)	a) Medio MS		b) Medio MS-50%, sacarosa 15 g/l		c) Medio MS-50%, sacarosa 30 g/l	
	SEMILLAS GERMINADAS/ NUMERO INICIAL	%	SEMILLAS GERMINADAS/ NUMERO INICIAL	%	SEMILLAS GERMINADAS/ NUMERO INICIAL	%
0	0/89	0	0/108	0	0/57	0
5	11/89	12.3	7/108	6.4	10/57	17.5
10	19/89	21.3	30/108	27.7	15/57	26.3
15	26/89	29.2	41/108	37.9	16/57	28.0
20	34/89	38.2	50/108	46.3	18/57	31.5
25	41/89	46.0	61/108	56.4	19/57	33.3
30	49/89	55.0	63/108	58.3	19/57	33.3
35	52/89	58.4	65/108	60.1	19/57	33.3
40	52/89	58.4	67/108	62.0	19/57	33.3
45	55/89	61.8	68/108	62.9	19/57	33.3
50	59/89	66.3	69/108	63.8	19/57	33.3

Gráfica 1.- GERMINACION IN VITRO DE SEMILLAS DE *Ariocarpus retusus*



sac. = sacarosa

realizó algunos ensayos para la germinación in vivo de semillas de Ariocarpus y detectó que semillas recién colectadas germinaron más rápidamente en un lapso de 10 días, mientras que Moreton (1992), mencionó que semillas del mismo género podrían tardarse de 15 a 30 días.

La germinación in vitro de las semillas de A. retusus puede considerarse relativamente lenta si se compara con la obtenida in vivo en otras cactáceas, por ejemplo, Ferocactus histrix, en la cual se obtuvo un porcentaje del 96% en 17 días (del Castillo, 1982, 1986). No obstante, ya que A. retusus es una especie de lento crecimiento, asegurar el 66.3% de sobrevivencia in vitro es un resultado significativo en la conservación de esta especie.

El medio MS ha sido el más empleado para germinar semillas de cactáceas in vitro con el fin de obtener plántulas que se utilizan como fuente de explantes (Starling, 1985; Smith et al., 1991), incluso también se ha empleado MS al 50% en la concentración de sus sales (Ault y Blackmon, 1987), sin embargo, aún cuando se reportan pocos datos en relación a los porcentajes de germinación, se considera que éstos son frecuentemente más elevados en el sistema de cultivo in vitro que al aplicar técnicas convencionales (Fay y Gratton, 1992).

Sin dejar de considerar que los porcentajes de germinación pudieron ser influidos por el origen de las semillas (provenientes de tres frutos diferentes) fue evidente que los valores más elevados de semillas germinadas en los períodos de tiempo más cortos se presentaron en el medio MS-50% sacarosa 15g/l, y sin embargo al término del período ensayado, el más alto porcentaje de semillas germinadas ocurrió en el medio MS con la mayor concentración de sales minerales y de sacarosa. No se determinó cuál de estos dos factores ejerció una mayor

promoción de la germinación, no obstante se observó que una alta concentración de sacarosa en presencia de una baja concentración de sales minerales (MS-50% sacarosa 30 g/l) pareció inhibir la germinación de las semillas.

La escarificación de la cubierta seminal hizo posible la germinación. El desarrollo de una plántula se observó in vitro; en la figura 3 se presentan esquemáticamente las diferentes fases entre los 6 y 40 días de edad.

Las plántulas fueron generalmente de forma elíptica. En etapas iniciales, el hipocótilo fue la porción más desarrollada con respecto a la raíz y los cotiledones se presentaron como dos pequeñas protuberancias cónicas en el ápice. Dos semanas después de la germinación, la raíz principal empezó a formar raíces secundarias y aumentó de longitud. Después de 20 días de la siembra, los primeros dos tubérculos emergieron abriéndose paso entre los cotiledones; esta región adquirió una tonalidad verde oscuro, a diferencia de la parte basal que permaneció de color verde claro.

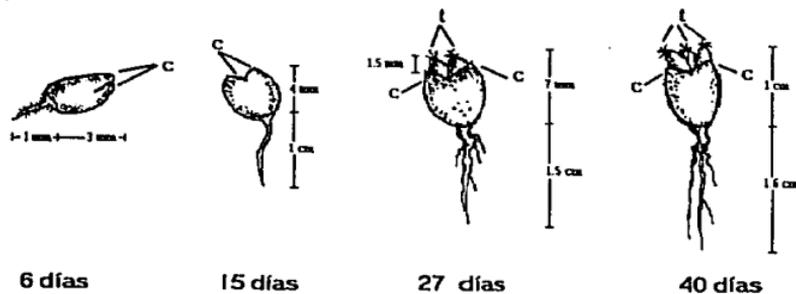


Fig. 3.- Desarrollo de una plántula de *A. retusus* germinada in vitro. c: cotiledones; t: tubérculos.

Los subsecuentes tubérculos surgieron del centro de la plántula delimitada en forma de anillo por los cotiledones y los primeros tubérculos. Los tubérculos presentaron forma cónica y en su vértice 5 espinas setosas. El aspecto arrosado de las plántulas de A. retusus se mostró similar al descrito por Meyrán (1956) para A. trigonus.

Explantos

Con la finalidad de asegurar la asepsia de los explantes, éstos se obtuvieron de plántulas germinadas in vitro, ya que resulta más fácil esterilizar semillas que tejidos de plantas maduras (Starling, 1985), por otra parte, la capacidad regenerativa de los tejidos jóvenes es mayor que en un individuo adulto (Vyskot y Jára, 1984). Plantas adultas de A. retusus presentan una epidermis muy coriácea, lo que dificulta enormemente la disección de los tejidos. Cabe señalar que plántulas desarrolladas in vitro de aproximadamente 4 meses de edad presentaron tejidos compactos y fibrosos que impidieron su manipulación y corte.

En el presente estudio los explantes se obtuvieron de plántulas de 2 meses de edad a partir de la siembra de las semillas, tiempo en el que alcanzaron una talla de 6 a 10 mm de longitud, sin la raíz. La disección de los distintos tipos de explantes se logró con relativa facilidad, no obstante que en la mayoría de los casos fue necesario esperar a que emergieran completamente por lo menos los 2 primeros tubérculos para poder diseccionarlos.

Es pertinente señalar que a diferencia de otras especies de cactáceas, los miembros del género Ariocarpus no presentan aréolas en todo el tallo, estas zonas meristemáticas están restringidas al ápice (aréola espinífera) y a la base (aréola florífera) de los tubérculos, en forma conjunta con el meristemo apical.

Para garantizar que al menos uno de estos puntos estuviera presente en los explantes, las plántulas de A. retusus se disectaron como se muestra en la figura 2. En esta especie las aréolas dejan de ser funcionales en estado adulto, por lo que ésta es otra desventaja al emplear sus tejidos maduros, pues se reduce aún más la disponibilidad de explantes con una mayor capacidad morfogénica que pudiera llevar al desarrollo de nuevos individuos.

En este trabajo se utilizó toda la planta disectada, incluyendo a la raíz, la que generalmente es desechada. Algunos investigadores recomiendan la escisión de los tubérculos individuales enteros como método más efectivo para evitar la destrucción de la planta madre (Hubstenberger et al., 1992).

Aunado al tipo y al desarrollo de los explantes los reguladores del crecimiento son otro factor fundamental en el control de la morfogénesis. En general, se sabe que bajos niveles de auxinas o ausencia de ellas son requeridos en combinación con altos niveles de citocininas para la proliferación de brotes (Hubstenberger et al., 1992), por lo cual las concentraciones de los reguladores del crecimiento empleados en el presente estudio para el cultivo de los explantes de A. retusus fueron mayores para las citocininas que para las auxinas.

Las respuestas obtenidas después de 12 meses de cultivo fueron 1) la formación de callo y 2) respuestas morfogénicas de dos tipos: a) vía organogénesis: regeneración de brotes y de raíces; y b) vía embriogénesis somática: formación de embriones somáticos (adventicios).

Callo

El callo puede definirse como un conjunto de células vegetales desorganizadas que proliferan en una masa de tejido irregular que varía ampliamente en textura, apariencia y tasa de crecimiento, dependiendo del tipo de tejido que le dio origen y la composición del medio (Donnelly y Vidaver, 1988).

La formación de callo ocurrió por lo menos en uno de los cuatro tipos de explantes para cada uno de los tratamientos con BA/ANA, 2iP/AIA y KJAIA.

En este trabajo se observó la presencia de varios tipos de callo los cuales se denominaron de acuerdo a su consistencia en: callo friable (f), fácilmente desmenuzable de color verde claro brillante; callo compacto (c), no desmenuzable de consistencia dura y que generalmente fue de color verde intenso; semcompacto (sc), de consistencia intermedia entre los callos friable y compacto, pero que presentó características más cercanas al compacto, y, el callo esponjoso (e), de aspecto y consistencia similar al de una esponja y que presentó color verde claro opaco (Tablas V, VI y VII). En algunos casos sobre los callos se desarrollaron tricomas (lana), un tipo de espinas muy suaves que de manera natural se presenta en ésta y otras especies de cactus; la presencia de tricomas se designó en las tablas con una "l" después del tipo de callo correspondiente.

En la tabla V se muestran los resultados del callo formado en los tratamientos con BA/ANA donde se obtuvo el mayor número de brotes, característicamente todos sin auxina. En ausencia de los reguladores del crecimiento (0/0) la respuesta de los explantes fue nula excepto para los explantes centrales (66%) que formaron callo friable. Se observa también que hubo un incremento en la proliferación de callo y en la respuesta de los explantes a medida que aumentó la concentración

Tabla V.- Formación de callo (a) en explantes de *Ariocarpus retusus* Scheidw., cultivados en medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con BA y ANA, pH 5.7, 8 g/l agar, 26 ± 2 °C, 16 h luz, 1800 lux.

TRAT.	REG. DEL CREC. (mg/l)		EXPLANTE	EXPL.CON RESPUESTA* (%)		CALLO**		
	BA	ANA				6 MESES	12 MESES	TIPO
1	0	0	C	2/3	(66)	++	++	f
			L	0/6	(0)	-	-	-
			T	0/4	(0)	-	-	-
			R	0/3	(0)	-	-	-
3	0.5	0	C	3/3	(100)	+++	+++	f
			L	3/6	(50)	+++	+++	f
			T	4/4	(100)	+	++	c
			R	1/3	(33)	+	++	f
4	1	0	C	3/3	(100)	+++	+++	f
			L	2/6	(66)	++	+++	f
			T	4/4	(100)	+	++	c
			R	3/3	(100)	+++	+++	f
5	2	0	C	3/3	(100)	+++	+++	f
			L	6/6	(100)	+++	+++	f
			T	4/5	(80)	+	+++	ct
			R	1/3	(33)	+++	+++	f
6	3	0	C	3/3	(100)	+++	+++	sct
			L	6/6	(100)	+++	+++	sct
			T	6/6	(100)	+++	+++	ct
			R	1/3	(33)	++	+++	f

(a) tratamientos en que ocurrió la mayor formación de brotes

C - centrales	f - friable	+++ ($>1 - \leq 3$ cm ³)
L - laterales	c - compacto	++ (0.6 - 1 cm ³)
T - tubérculos	sc - semcompacto	+ (≤ 0.5 cm ³)
R - raíces	t - con tricomas	- nulo

* explantes con respuesta/
total de explantes

** cantidad promedio por
explante

de citocinina. Se sabe que, en cultivo de tejidos, altas concentraciones de auxinas generalmente promueven la formación de callo, sin embargo en estos tratamientos donde no se aplicaron, pudo suceder que hayan actuado auxinas endógenas en conjunto con las elevadas concentraciones de citocinina exógena que estimularon la proliferación del mismo no sólo en los primeros meses de cultivo, sino durante todo su período de incubación.

Los explantes centrales siempre proliferaron en callo (100%), aún en ausencia de reguladores del crecimiento, el que generalmente fue de tipo friable. Resulta notorio señalar que los tubérculos respondieron más rápidamente en presencia de una mayor concentración de citocinina (3/0); es probable que, al tratarse de tejidos organizados que contienen puntos meristemáticos (aréolas), resultó más difícil su desdiferenciación, por lo que a bajas concentraciones de la citocinina la respuesta fue escasa; por otra parte, en todos los casos el tipo de callo fue compacto, el cual en los niveles más elevados de BA (2/0 y 3/0) estuvo asociado con lana en su superficie.

La respuesta de formación de callo en los ensayos con 2iP/AIA ocurrió de manera muy similar a los tratamientos con BA/ANA (Tabla VI). Nuevamente la proliferación de éste se dio aún en ausencia de la auxina, así como cuando se combinó con la citocinina, lo que hace suponer que su efecto se vio estimulado cuando ambos reguladores del crecimiento fueron tomados del medio por los tejidos y alcanzaron en éstos un nivel propicio para inducir la respuesta.

Los tratamientos con 2iP/AIA fueron los únicos que presentaron callo esponjoso, sobre todo al elevar las concentraciones de citocinina (5/0, 5/1 y 10/1). En cuanto a la naturaleza de callo que predominó en cada tipo de explante la respuesta fue

Tabla VII.- Formación de callo en explantes de *Ariocarpus retusus* Scheidw., cultivados 6 y 12 meses en medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con K y AIA, pH 5.7, 12 g/l agar, 26 ± 2 °C, 16 h luz, 1800 lux.

TRAT.	REG. DEL CREC. (mg/l)		EXPLANTE	C A L L O			
	K	AIA		EXPL. CON RESPUESTA* (%)	CANTI- DAD**	TIPO	
1	0	0	C	0/3	(0)	-	-
			L	1/6	(16)	++	sc
			T	0/5	(0)	-	-
			R	0/3	(0)	-	-
2	1	0	C	2/3	(66)	++	sc
			L	0/6	(0)	-	-
			T	0/10	(0)	-	-
			R	0/3	(0)	-	-
3	5	0	C	2/3	(66)	++	c
			L	1/6	(16)	+	f
			T	0/7	(0)	-	-
			R	0/3	(0)	-	-
4	10	0	C	0/3	(0)	-	-
			L	0/6	(0)	-	-
			T	1/10	(10)	+++	c
			R	0/3	(0)	-	-
5	0	1	C	0/3	(0)	-	-
			L	2/6	(33)	+	f
			T	0/5	(0)	-	-
			R	0/3	(0)	-	-
6	1	1	C	3/3	(100)	+++	f
			L	2/6	(33)	++	f
			T	3/11	(27)	+	f
			R	1/3	(33)	+	f
7	5	1	C	2/3	(66)	+++	f
			L	2/6	(33)	+++	sc
			T	2/9	(22)	++	sc
			R	0/3	(0)	-	-
8	10	1	C	3/3	(100)	++	c
			L	0/6	(0)	-	-
			T	1/8	(12)	++	sc
			R	0/3	(0)	-	-

C - centrales f - friable +++ (>1 - ≤ 3 cm³)
L - laterales c - compacto ++ (0.6 - 1 cm³)
T - tubérculos sc - semicompacto + (≤ 0.5 cm³)
R - raíces - nulo

* explantes con respuesta/
total de explantes

** cantidad promedio por
explante

heterogénea, por ejemplo: en los explantes laterales se formó callo semicompacto (sc), friable (f) y esponjoso.

En el ensayo con K/AIA, la respuesta difiere de lo ocurrido en los tratamientos con BA/ANA y 2iP/AIA, ya que en éstos tratamientos el callo se formó en presencia de citocinina y en ausencia de auxina, situación que no se repite con K/AIA, donde se observa generalmente una respuesta relativamente favorable cuando la citocinina está en combinación con la auxina (Tabla VII).

RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS

Brotos

El desarrollo de los brotes in vitro fue evaluado cada mes. Dada la baja velocidad de las respuestas, éstas se reportan a los 6 y 12 meses de cultivo (Tablas, VIII y IX).

Los brotes fueron definidos como aquellas estructuras que presentaron tubérculos dispuestos en roseta con una región apical central de la cual surgían más tubérculos; el diámetro de la roseta fluctuó entre 0.3 y 2.5 cm. Los tubérculos fueron de forma cónica con espinas setosas en el ápice. Cabe señalar que, en la mayoría de los brotes obtenidos, la parte basal del tallo no se diferenció del todo, se confundía con el callo del cual se habían formado y llegaban a formar más callo (Lám. 1c).

La tabla VIII muestra el número de brotes obtenidos por tipo de explante en cada uno de los 24 tratamientos con BA y ANA después de 6 y 12 meses de cultivo.

12	3	0.1	C L T R	1/3 1/6 2/4 0/3	(33) (16) (50) (0)	1 0 1 0	0 2 2 0	1 2 3 0 6
13	0	0.5	C L T R	0/3 0/6 0/4 0/3	(0) (0) (0) (0)	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0
14	0.1	0.5	C L T R	0/3 0/6 0/5 0/3	(0) (0) (0) (0)	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0
15	0.5	0.5	C L T R	0/3 3/6 0/4 0/3	(0) (50) (0) (0)	0 0 0 0	0 4 0 6	0 4 0 0 4
16	1	0.5	C L T R	0/3 0/6 2/11 0/3	(0) (0) (18) (0)	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 2 0 2
17	2	0.5	C L T R	0/3 2/6 0/4 0/3	(0) (33) (0) (0)	0 1 0 0	0 2 0 0	0 3 0 0 3
18	3	0.5	C L T R	0/3 3/6 0/4 0/3	(0) (50) (0) (0)	0 1 0 0	0 8 0 0	0 9 0 0 9
19	0	1	C L T R	0/3 0/6 3/8 0/3	(0) (0) (37) (0)	0 0 1 0	0 0 2 0	0 0 3 0 3
20	0.1	1	C L T R	1/3 0/6 1/6 0/3	(33) (0) (16) (0)	0 0 0 0	2 0 1 0	2 0 1 0 3
21	0.5	1	C L T R	0/3 0/6 1/8 0/3	(0) (0) (18) (0)	0 0 0 0	0 0 1 0	0 0 1 0 1
22	1	1	C L T R	0/3 0/6 0/6 0/3	(0) (0) (0) (0)	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0
23	2	1	C L T R	0/3 0/6 2/5 0/3	(0) (0) (40) (0)	0 0 1 0	0 0 1 0	0 0 2 0 2
24	3	1	C L T R	1/3 0/6 1/5 0/3	(33) (0) (20) (0)	1 0 2 0	0 0 0 0	1 0 2 0 3

C - centrales
L - laterales

T - tubérculos
R - raíces

* explantes con respuesta/total de explantes

El mayor número de brotes se obtuvo en el tratamiento 5, BA 2 mg/l en ausencia de la auxina, con un total de 48 brotes regenerados y en el que respondieron el 100% de los tubérculos y explantes laterales, al menos un explante central y, como ocurrió en la mayoría de los tratamientos, en las raíces la respuesta fue casi nula. Después de 12 meses, el mayor número de brotes fue regenerado por explantes laterales (21), seguidos de los tubérculos (17) y los centrales (10).

El segundo tratamiento favorable fue el número 6, con BA 3 mg/l, también sin la auxina, en el cual se formaron 43 brotes; respondieron todos los tubérculos y sólo el 66% de los explantes centrales y laterales. Estos dos últimos, al igual que todos los explantes regenerativos del tratamiento 5, formaron la mayoría de los brotes dentro de los primeros 6 meses de cultivo, a diferencia de la conducta de los tubérculos los cuales formaron la mayor cantidad de brotes a partir del séptimo mes de cultivo. Esto pareció ser la regla en este estudio pues la mayor frecuencia de las respuestas morfogénicas en prácticamente el resto de los tratamientos con formación de brotes, se dio después de 6 meses de iniciados los cultivos.

La inducción y el desarrollo de los brotes ocurrió en los medios iniciales, no se requirió de un segundo medio de cultivo. Sin embargo, una vez formados, su crecimiento se vio favorecido en medio MS sin reguladores del crecimiento (Lám. 1d) y preferentemente con una alta cantidad de Bacto-agar que limitara la disponibilidad de agua ya que los brotes fácilmente se hiperhidrataban, ocurría el sobrecrecimiento de los tejidos internos, la plántula reventaba y terminaba desorganizada en forma de callo, el cual llegó a ser regenerativo aún en este medio sin reguladores del crecimiento. La hiperhidratación de los brotes en

medios frescos fue la principal razón por la cual no se efectuaron subcultivos a lo largo de un año de incubación.

El hecho de que la morfogénesis de los brotes ocurrió en presencia de la auxina y citocinina, indica la capacidad de los tejidos para regular en forma endógena la concentración de estas sustancias adicionadas al medio que permitieron a las células demostrar su totipotencialidad en las condiciones de cultivo ensayadas.

Otro factor que debió intervenir en el logro de un balance hormonal fue el tiempo en que permanecieron los explantes sin subcultivo, en ese tiempo los reguladores del crecimiento debieron reducir su actividad.

En los mejores tratamientos regenerativos, obtenidos con una alta concentración de BA, se requirió de varios meses (más de seis) y con ello la posible pérdida de actividad de BA para lograr el desarrollo de la mayor cantidad de brotes. Dentro de los primeros meses de cultivo ocurrió la inducción de la morfogénesis y en algunos casos también se logró la formación de brotes que "escaparon" a una posible inhibición por alta concentración de BA (tratamiento 5: 2/0). Esta condición permisiva puede suceder mediante algún proceso de inactivación o bien, por expulsión de la hormona del tejido (George y Sherrington, 1984).

La formación de brotes estuvo asociada principalmente a la presencia de BA, exceptuando los tratamientos 9 (0.5/0.1), 14 (0.1/0.5), y 22 (1/1) en los que aún cuando se adicionó la citocinina, no hubo formación de brotes y sólo en dos tratamientos (7: 0/0.1 y 19: 0/1) en ausencia de BA se formaron brotes.

Fue en ausencia de la auxina y en su más baja concentración (0.1) que se generaron las mayores cantidades de brotes, por ejemplo en los tratamientos: 3, 4, 5, 6, 11 y 12 (0.5/0, 1/0, 2/0, 3/0, 2/0.1 y 3/0.1 respectivamente).

En términos generales, altas concentraciones de BA en ausencia de ANA promovieron la formación de brotes; los tejidos se mostraron muy sensibles, negativamente, a la presencia de ANA pues aún a 0.5 mg/l se redujo notablemente el número de brotes regenerados, esta respuesta se apega a lo establecido por Skoog y Miller (1957 citados por George y Sherrington, 1984) sobre que el balance a favor de las citocininas promovería el desarrollo de brotes.

Se demostró una capacidad morfogénica diferencial, de acuerdo al tipo de explante, que de mayor a menor fue: explantes laterales, centrales, tubérculos y raíces (número total de brotes, 95, 69, 67, y 2 respectivamente).

La regeneración de los brotes comúnmente implicó una fase previa de callo, sin embargo, se observaron varios casos de organogénesis directa, casi todos a partir de los tubérculos, en los cuales los brotes se desarrollaron del ápice de los mismos (Lám. 1e).

El ensayo adicional de 2iP para explorar las respuestas de A. retusus ante otros reguladores del crecimiento pareció arrojar resultados similares a los obtenidos con BA y ANA (Tabla IX), y también se observaron algunas diferencias.

La formación de brotes estuvo asociada a la presencia de 2iP; sólo en el tratamiento 5 (0/1) ocurrió la formación de un brote, aún sin 2iP.

Fue en ausencia de la auxina (AIA) (tratamientos 2 y 3: 1/0 y 5/0 respectivamente) y en el tratamiento 8 (10/1) en los que se formaron la mayor cantidad de brotes.

Tabla IX.- Desarrollo de brotes *in vitro* a partir de explantes de *Ariocarpus retusus* Scheidw., cultivados 6 meses en medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con 2iP y AIA, pH 5.7, sacarosa 30 g/l, agar 12 g/l, 26 ± 2 °C, 16 h luz, 1800 lux.

TRAT.	REG. DEL CREC. (mg/l)		EXPL	EXPLANTES CON RESPUESTA* (%)		BROTOS	
	2iP	AIA				NUMERO	TOTAL
1	0	0	C	0/3	(0)	0	0
			L	0/6	(0)	0	
			T	0/5	(0)	0	
			R	0/3	(0)	0	
2	1	0	C	2/3	(66)	3	25
			L	3/6	(50)	15	
			T	3/8	(37)	7	
			R	0/3	(0)	0	
3	5	0	C	0/3	(0)	0	16
			L	2/6	(33)	8	
			T	2/11	(18)	2	
			R	1/3	(33)	6	
4	10	0	C	0/3	(0)	0	4
			L	0/6	(0)	0	
			T	4/8	(50)	4	
			R	0/3	(0)	0	
5	0	1	C	0/3	(0)	0	1
			L	1/6	(16)	1	
			T	0/6	(0)	0	
			R	0/3	(0)	0	
6	1	1	C	1/3	(33)	5	5
			L	0/6	(0)	0	
			T	0/8	(0)	0	
			R	0/3	(0)	0	
7	5	1	C	1/3	(33)	3	6
			L	1/6	(16)	2	
			T	1/8	(12)	1	
			R	0/3	(0)	0	
8	10	1	C	0/3	(0)	0	18
			L	0/6	(0)	0	
			T	5/7	(71)	12	
			R	3/3	(100)	6	

C - centrales T - tubérculos
L - laterales R - raíces

* explantes con respuesta/
total de explantes

La mayor capacidad morfogénica fue expresada por los explantes laterales (26 brotes) y los tubérculos (26 brotes) seguidos de las raíces (12 brotes) y los explantes centrales (11 brotes).

Una comparación entre los resultados de los tratamientos BAJANA (1/0) y 2iP/AIA (1/0) a los seis meses de iniciados los cultivos indicó que un menor número de brotes se formaron en BAJANA (4) en tanto que con 2iP/AIA (25) se formaron 6 veces más brotes, su inducción y desarrollo fueron más rápidos.

El efecto de estos dos reguladores del crecimiento (2iP/AIA) para la proliferación de brotes fue comprobado en Mammillaria elongata (10/1) por Johnson y Emino (1979a), y más recientemente por Arriaga (1994) para M. huitzilopochtli, en la misma concentración (Tabla I).

No obstante en A. retusus la mejor respuesta se logró con las concentraciones más bajas de 2iP y en ausencia de AIA (1/0), esto sugiere que debe realizarse una exploración más extensa con diferentes combinaciones de los mismos reguladores del crecimiento, que podría rendir mejores resultados.

Las diferencias más notorias que se encontraron entre los tratamientos de BAJANA y 2iP/AIA fueron:

- a) en el mismo tratamiento (1/0), un mayor número de brotes se formaron en menos tiempo con 2iP/AIA que con BAJANA,
- b) con 2iP/AIA los cuatro tipos de explantes formaron brotes. En el caso de las raíces esto fue notable pues con BAJANA la respuesta resultó mínima, en tanto que con 2iP/AIA fueron aún más morfogénicas que los explantes centrales.

En estos eventos (a y b), la combinación 2iP/AIA logró un estímulo más eficiente sobre el control de la morfogénesis no sólo para inducir esta respuesta en los mismos explantes (L, T, C) sino para aumentarla (L, T) y aún promoverla en raíces.

Una de las razones por la que pudieron encontrarse diferencias entre los resultados de los dos grupos de fitorreguladores está en el hecho de que 2iP y AIA son reguladores del crecimiento naturales que se encuentran en los tejidos vegetales, en tanto que BA/ANA son compuestos sintéticos (Dodds y Roberts, 1982). Esta observación encuentra apoyo en lo señalado por Bui Dang Ha (1974, citado por Street, 1979) sobre el efecto de la naturaleza de auxinas y citocininas en las respuestas morfogénicas: callo de Asparagus formó brotes sólo con BA en combinación de AIA o ANA, pero no en presencia de Z ó 2,4-D.

En otro ensayo adicional se exploró la respuesta de los explantes a los reguladores del crecimiento K/AIA; no obstante que con ellos se reporta la regeneración de brotes en Mammillaria woodsii (2/2) (Kólar *et al.*, 1976), Astrophytum myriostigma y Trichocereus spachianus (0.5/5) (Vyskot y Jára, 1984), y Echinocactus grusonii (4.3/0.8) (Frias, 1989), en A. retusus la respuesta fue totalmente nula, además de que sólo con estos fitorreguladores ocurrió la oxidación de los explantes (el 25% del total).

Raíces

La formación de raíces fue otra de las respuestas organogenéticas observadas en este estudio, la cual sucedió por vía directa (a partir del explante) o vía indirecta (a través de una fase de callo).

En las tres series de tratamientos (BA/ANA, 2iP/AIA y K/AIA), todos los casos de regeneración de raíces por organogénesis directa ocurrieron exclusivamente en tubérculos, donde las raíces (generalmente una por explante) se formaron en la base de los mismos. La formación de raíces vía indirecta se pudo observar a partir de callo de explantes centrales, laterales y también de los tubérculos. No existió una clara relación entre el desarrollo de éstas y los niveles de citocininas y auxinas en el medio de cultivo.

Desarrollo de plántulas

Vía organogénesis se llegaron a formar plántulas completas en los medios de inducción y en los medios sin reguladores del crecimiento después de que se subcultivaron los brotes a tal condición (Lám. 1f). Las plántulas tuvieron un aspecto normal por lo que se realizaron ensayos para establecerlas en suelo, sin embargo, esto no se logró pues las plántulas se marchitaron y terminaron por morir. Entre las posibles causas de ello están las siguientes: 1) es probable que las raíces no tuvieran una conexión vascular con el brote; 2) alteraciones provocadas por hiperhidratación (vitrificación) (Ziv, 1991; Debergh *et al.*, 1992): es posible que el tallo presentara cloroplastos no funcionales o malformaciones en la epidermis a nivel de los estomas y su falta de actividad; o la carencia de una cutícula. Para una determinación precisa de estos cambios sería necesario realizar estudios estructurales.

Embriogénesis somática

Si bien los estudios exitosos de regeneración de brotes y plantas completas de cactáceas son escasos, los de inducción de embriones somáticos se encuentran en menor número y, hasta donde se sabe, sólo existen 5 reportes: el de Minocha y Mehra (1974) con Neomammillaria prolifera; el de Rodríguez-Garay y Rubluo

(1992) con Aztekium ritteri; el de Infante (1992) con Mediocactus coccineus; el de Stuppy y Nagl (1992) con A. retusus y el presente trabajo con la misma especie (Tabla X; Lám. 2).

Stuppy y Nagl (1992) demostraron que es posible inducir la formación de embriones somáticos en esta especie, respuesta que obtuvieron en un medio sin reguladores del crecimiento suplementado con agua de coco a partir de una plántula hiperhidratada que se desorganizó en callo. El agua de coco (endospermo líquido de las semillas de Cocos nucifera L.) es un complemento orgánico que contiene sustancias promotoras del crecimiento especialmente con actividad citocinina, sin embargo, al tratarse de un compuesto de composición química no definida, su uso muchas veces no asegura la repetibilidad de los eventos, no obstante ello, se dice que el empleo de concentraciones definidas de fitorreguladores no llegan a sustituir completamente el efecto de este complejo (Dix y van Staden, 1982).

En el presente estudio, en forma eventual se formaron embriones somáticos derivados de callo de un explante lateral, en el tratamiento con 0.5 mg/l de BA combinado con 0.1 mg/l de ANA, así como del callo originado de una plántula germinada en medio MS-50% sacarosa 15 g/l que también se hiperhidrató y se desorganizó.

El callo que formó a los embriones fue de color verde claro, friable, húmedo y con áreas cristalinas, debajo del cual había porciones de tejido de aspecto oxidado donde crecían y proliferaban los embriones en mayor número y se encontraban los más desarrollados, éstos presentaron características similares a las mencionadas en el trabajo reportado por Stuppy y Nagl (1992) (Lám. 2a).

En los cultivos también se dió el proceso de embriogénesis somática directa, cuando los embriones adventicios se originaron directamente sin mediación de callo a partir de la superficie de otros embriones somáticos, este proceso

Tabla X.- Trabajos reportados de embriogénesis somática en cactáceas

ESPECIE	EXPLANTE	MEDIO DE INDUCCION Y REG.CREC. (mg/l)	RESPUESTA	REFERENCIA
<i>Neomammillaria prolifera</i>	aréolas	MS con agua de coco(20%) K (1.0) + 2,4-D (10.0)	ES P	Minocha y Mehra, 1974
<i>Aztekium ritteri</i>	callo	MS K (2.0) + 2,4-D (2.0)	Estructuras parecidas a ES	Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992
<i>Mediocactus coccineus</i>	Ph	MS + ANA (0.5-1.0)	ES	Infante, 1992
<i>Ariocarpus retusus</i>	Ph	MS con agua de coco(20%)	ES P	Stuppy y Nagl, 1992
<i>Ariocarpus retusus</i>	Ph	MS-50%, sacarina 15 g/l	ES	Olguín, 1994*
	Laterales	MS BA (0.5) + ANA (0.1)	ES P	

Ph - Plántulas hiperhidratadas

ES - Embriones somáticos

P - Plántulas

* El presente estudio

denominado embriogénesis somática secundaria fue común observarlo en los embriones somáticos (muy pequeños) más inmaduros que entraron en ciclos repetitivos de embriogénesis somática directa y formaron cúmulos de embriones somáticos (Lám. 2b). Evans *et al.* (1981) y Sharp *et al.* (1982) (citados por Williams y Maheswaran, 1986), mencionan que la embriogénesis directa en un cultivo parece ocurrir a partir de células pre-embriogénicas determinadas que requieren solamente (un estímulo permisivo) de reguladores del crecimiento o algún otro factor que les brinde condiciones favorables para expresarse como tales, mientras que la embriogénesis indirecta requiere de una redeterminación celular, que se puede adquirir durante la proliferación de callo.

Los embriones somáticos fueron inicialmente estructuras de forma oval hialinas que con el tiempo cambiaron a color blanco, fueron compactos y de superficie lisa, en cambio, Stuppy y Nagl (1992) describieron las primeras etapas de desarrollo de los embriones de color amarillo pálido. Los embriones se caracterizaron por ser bipolares en cuyo extremo apical, libre, existía una depresión o hendidura que marcaba el desarrollo de los futuros cotiledones (Lám. 2c). En la región basal o polo ligado al callo se observó, de manera muy similar al estudio reportado para esta misma especie, el desarrollo de un anillo de rizoides donde posteriormente se desarrollaron raíces. No se detectó la presencia de un suspensor.

La formación de los embriones somáticos estuvo relacionada con la presencia de filamentos hialinos, que en ocasiones formaron densas regiones pubescentes de aspecto lanoso, en las que se encontraban entremezclados los embriones somáticos (Lám. 2b). Rodríguez-Garay y Rubluo (1992), notaron también la presencia de filamentos similares a lana y mencionan que "...se desarrollaron incontroladamente en los cultivos de *A. ritteri* y ocasionaron que los embriones no progresaran". En *A. retusus* no parecieron afectar a su desarrollo.

Pocos embriones somáticos lograron desarrollarse en estructuras globulares de color verde que presentaron aréolas y diminutas espinas, la mayoría de ellos no completaron su desarrollo y nuevamente formaron callo, situación que también reportaron Stuppy y Nagl (1992); posteriormente germinaron y se diferenciaron en plántulas completas (Láms. 2d y 2e). A diferencia de lo reportado por estos investigadores, no fue necesario remover a los embriones del callo que los originó para promover su germinación.

Las plántulas fueron subcultivadas en medio basal donde lentamente adquirieron un aspecto normal, semejante al de aquellas obtenidas a partir de (embriones cigóticos) semillas (Lám. 2f). Sólo una de estas plántulas obtenidas de embriones somáticos fue posible establecerla en suelo con éxito en condiciones de invernadero.

Si bien en el estudio de Stuppy y Nagl (1992) y en el presente trabajo se logró la propagación de la misma especie mediante la vía de obtener embriones adventicios, cabe señalar que ambos trabajos fueron casi simultáneos pues sucedió que cuando ya se tenían los resultados la publicación de dichos investigadores fue de gran utilidad para el análisis e interpretación que aquí se ofrece. Se obtuvieron respuestas muy similares, como el hecho de que fue posible regenerar plántulas de A. retusus vía embriogénesis a través del callo de una plántula hiperhidratada y, entre las aportaciones originales, está el haber inducido las respuestas morfogénéticas en medios químicamente definidos así como identificar a los explantes laterales como el tejido embriogénico; asimismo se logró la regeneración de plántulas completas vía organogénesis en todos los tipos de explantes ensayados y con ello comprobar que es posible la inducción de su potencial morfogénético.

Si la regeneración de brotes vía organogénesis (directa o indirecta) fue un resultado satisfactorio para esta especie de lento crecimiento, la obtención de plántulas regeneradas vía embriogénesis somática lo es aún más. Las ventajas de la embriogénesis sobre la organogénesis son, entre otras, el obtener plántulas completas ya con su raíz, lo que evita tener que someterlas a procesos de enraizamiento (in vitro o ex vitro) que muchas veces no permiten establecerlas en suelo con éxito, por otro lado, el número de regenerantes suele ser mayor por procesos de embriogénesis que por organogénesis, además de que se considera que los embriones somáticos son más estables genéticamente que los brotes regenerados vía callo.

CONCLUSIONES

- Con la aplicación de las técnicas de CTV fue posible la regeneración de nuevos individuos de A. retusus a partir de tejidos de plántulas germinadas in vitro.
- La germinación de las semillas ocurrió en los tres tipos de medios de cultivo ensayados. Los más altos porcentajes de germinación se obtuvieron en los medios MS (66.3%) y MS-50% sacarosa 15 g/l (63.8%).
- Las respuestas de los explantes cultivados después de 12 meses fueron: 1) la formación de callo y 2) respuestas morfogénicas de dos tipos: a) vía organogénesis: regeneración de brotes y raíces; y b) vía embriogénesis somática: formación de embriones somáticos adventicios.
- Se obtuvieron cuatro tipos de callo: friable, compacto, semicompacto y esponjoso. Sin reguladores del crecimiento la formación de callo fue mínima, la cual aumentó a medida que se incrementó la concentración de citocininas así como cuando se combinó con las auxinas. Los explantes que más proliferaron en callo fueron los centrales y los laterales; los tubérculos generalmente necesitaron elevadas concentraciones de citocininas y el tipo de callo que formaron fue compacto.
- La inducción y desarrollo de los brotes ocurrió en los medios iniciales y no fue necesario un segundo medio de cultivo, no obstante, su crecimiento se vio favorecido en medio MS sin reguladores del crecimiento.

- La morfogénesis de los brotes ocurrió en presencia de auxinas y citocininas, sin embargo, el mayor número de regenerantes estuvo generalmente relacionado con altas concentraciones de citocininas y bajas concentraciones o ausencia de auxinas. Las mejores combinaciones fueron: BA 2.0 mg/l, con un total de 48 brotes; y 2iP 1.0 mg/l, con 25 brotes, en ambos tratamientos a partir de los explantes laterales, tubérculos y centrales.

- Entre las combinaciones de citocininas/auxinas ensayadas, no fue completamente evidente si la serie de tratamientos 2iP/AIA fue mejor que la serie con BA/AIA, en virtud de que sólo tuvieron un tratamiento en común (1/0).

- La respuesta de los explantes a la formación de brotes con los fitoreguladores K/AIA fue nula.

- Bajo las condiciones experimentales ensayadas, todos los explantes utilizados fueron regenerativos. Se demostró una capacidad morfogenética diferencial de acuerdo al tipo de explante, que de mayor a menor fue: explantes laterales, centrales, tubérculos y raíces.

- La regeneración de brotes comúnmente requirió una fase previa de callo, sin embargo, en algunos casos fue posible obtener regenerantes vía organogénesis directa a partir del ápice de los tubérculos.

- La rizogénesis a partir de los explantes cultivados ocurrió vía organogénesis indirecta, en los cuatro tipos de explantes, y vía organogénesis directa, exclusivamente en tubérculos.

- Fue posible la formación eventual de embriones somáticos en un medio de cultivo con y sin reguladores del crecimiento, de los cuales sólo algunos lograron desarrollarse en plántulas.

- No obstante que algunos de los brotes regenerados por organogénesis desarrollaron raíces en los medios de inducción, o sin fitorreguladores, no se logró su establecimiento en suelo, a diferencia de una sola plántula obtenida por embriogénesis somática.

Los resultados aquí presentados contribuyen a la formación de una metodología de micropropagación que permitiría el establecimiento de plantas en condiciones de invernadero como un primer paso para la reintroducción a su hábitat; al mismo tiempo, se evitaría la desaparición de este recurso genético al propagarlo masivamente con el fin de satisfacer la demanda comercial y, de este modo, impedir el saqueo de sus poblaciones silvestres; por otra parte, esta metodología podría ser aplicada a las especies del género Ariocarpus o a otras relacionadas filogenéticamente.

La pequeña pero significativa colección in vitro que se mantiene en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, demuestra de manera objetiva que los resultados de la presente investigación pueden contribuir al conocimiento, conservación y en un futuro al aprovechamiento sustentable de Ariocarpus retusus sobre una base de producción controlada.

LAMINA 1. Organogénesis (c - f)

- a. Ariocarpus retusus Scheidw., planta adulta en floración.

Escala = 3.8 cm

- b. Aspecto de los explantes disectados a partir de plántulas germinadas in vitro. C: central, L: laterales, R: raíz, y T: tubérculos.

Escala = 1 cm

- c. Brotes regenerados in vitro por organogénesis indirecta a partir de explantes laterales. La parte basal del brote no está completamente diferenciada (↔) y se une con el callo (c) que le dio origen. Cultivo en medio de inducción.

Escala = 0.7 cm

- d. El crecimiento y desarrollo de los brotes in vitro fue favorecido en medio MS sin reguladores del crecimiento.

Escala = 0.5 cm

- e. Brotes regenerados in vitro (b) por organogénesis directa a partir del ápice de un tubérculo (t).

Escala = 0.25 cm

- f. Conjunto de brotes que formaron raíces en el medio de inducción...

Escala = 1.2 cm

LAMINA 1. Organogénesis (c - f)



a



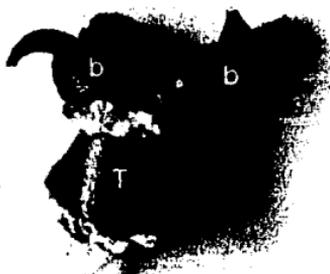
b



c



d



e



f

LAMINA 2. Embriogénesis Somática

- a. Callo embriogénico derivado de un explante lateral (BA/ANA: 0.5/0.1 mg/l), con porciones de tejido de aspecto oxidado (ox). Los embriones somáticos inicialmente fueron ovalados y hialinos (h), después de color blanco (b), y posteriormente estructuras globulares verdes (v) que llegaron a germinar. Algunos no progresaron y nuevamente se desorganizaron en callo (→) embriogénico y no embriogénico.

Escala = 1.5 mm

- b. Embriones somáticos secundarios (ess) originados vía directa a partir de otro embrión somático (es). Notar la presencia de filamentos hialinos (fh).

Escala = 1 mm

- c. Embrión somático en cuyo extremo apical se observa un crecimiento (→) que indica el desarrollo de los cotiledones; la región basal está ligada al callo (c).

Escala = 0.3 mm

- d. Embrión somático (es) en germinación. En la región apical se observa un surco que separa a los cotiledones (c). En el extremo opuesto se encuentra la radícula (r).

Escala = 1 mm

- e. Plántula originada por embriogénesis somática. Notar las raíces (r) y otros embriones somáticos (es) en la base.

Escala = 0.4 cm

- f. Plántulas obtenidas a partir de la germinación de embriones somáticos y subcultivadas en medio MS sin reguladores del crecimiento. Observar el desarrollo de las raíces (r) en el medio de cultivo.

Escala = 0.5 cm

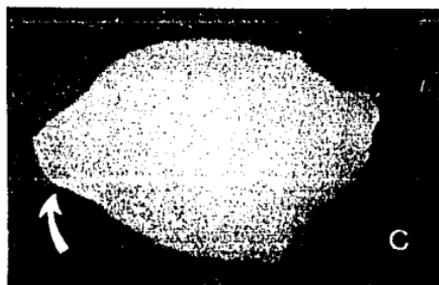
LAMINA 2. Embriogénesis Somática



a



b



c



d



e



f

APENDICE I. Composición de los medios a) Murashige y Skoog (1962) (MS) sacarosa 30 g/l; b) MS-50%, sacarosa 15 g/l y c) 30 g/l. pH 5.7, agar 8 g/l.

CONSTITUYENTE	CONCENTRACION (mg/l)	
	MS	MS-50%
<u>Macronutrientes inorgánicos</u>		
NH ₄ NO ₃	1,650	825
KNO ₃	1,900	950
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	220
<u>Micronutrientes inorgánicos</u>		
KI	0.83	0.415
H ₃ BO ₃	6.20	3.1
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	11.15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	4.3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.0125
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0125
Na ₂ EDTA	37.3	18.65
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	13.9
<u>Compuestos orgánicos</u>		
<u>Vitaminas</u>		
Ac. Nicotínico	0.50	0.25
Piridoxina-HCL	0.50	0.25
Tiamina-HCL	0.10	0.05
Inositol	100	50
<u>Aminoácidos</u>		
Glicina	2	1
Sacarosa (g/l)	a) 30	b) 15 c) 30

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, E.F. 1960. A revision of Ariocarpus (Cactaceae). I. The status of the proposed genus Roseocactus. Amer. J. Bot. 47: 582-589.
- ANDERSON, E.F. 1962. A revision of Ariocarpus (Cactaceae). II. The status of the proposed genus Neogeomesia. Amer. J. Bot. 49: 615-622.
- ANONIMO. 1985. Saving endangered species. Agricell Report. p. 6.
- ARIAS, S. 1990. Colecta de Cactáceas. Memorias de la Reunión Programa Nacional de Rescate de Cactáceas. A. Rubluc y B. Rodríguez-Garay (Organizadores). Guadalajara, Jal.
- ARIAS, S. 1991. Riqueza y conservación: algunas observaciones sobre las cactáceas en México. Reporte interno. Jardín Botánico, IB-UNAM. 25 p.
- ARRIAGA, D.E. 1994. Aplicaciones biotecnológicas en Mammillaria huitzilopochtli D.R. Hunt, especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México, D.F.
- ATREE, S.M. AND L.C. FOWKE. 1991. Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. 53-70. En Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17. High-Tech and Micropropagation. Springer-Verlag, Berlin.
- AULT, J.R. AND W.J. BLACKMON. 1987. In vitro propagation of Ferocactus acanthodes (Cactaceae). HortScience. 22(1):126-127.
- BACKEBERG, C. 1976. Cactus lexicon. Blandford Press. England. pp. 69-70.
- BENSON, L. 1982. The Cacti of the United States and Canada. Stanford University Press. Stanford. 1044 p.
- BEVERSDORF, W.D. 1990. Micropropagation in crop species. 3-12. En: A.J.J. Nijkamp, L.H.W. van Der Plas, J. van Aartrijk (Eds.) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- BINH, L.T., L.T. MUOI, H.T.K. OANH, T.D. THANG AND D.T. PHONG. 1990. Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 23:67-70.

- BONNESS, M.S., P.W. PARE AND T.J. MABRY. 1993. Novel callus and suspension cultures of the "old man" cactus (Cephalocereus senilis). *Cact. & Succ. J. (US)*. 65(3):144-147.
- BRAVO-HOLLIS, H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Vol. I. UNAM. México, D.F. pp. 1-83.
- BRAVO-HOLLIS, H. Y H. SANCHEZ-MEJORADA. 1991a. *Las Cactáceas de México*. Vol.II. UNAM. México, D.F. pp. 252-263.
- BRAVO-HOLLIS, H. Y H. SANCHEZ-MEJORADA. 1991b. *Las Cactáceas de México*. Vol.III. UNAM. México, D.F. pp. 501-536.
- BRITTON, N.L. AND J.N. ROSE. 1922. *The Cactaceae*. Vol. III. Carnegie Institution of Washington, Washington, D.C. pp. 80-83.
- CAMPBELL, F. 1986. Mexican cacti export decline. *TRAFFIC (US)*. 6(4):14-17.
- CAREY, J.R. 1980. Safeguarding the cacti. *Garden*. 4(5):4-7, 31.
- CHAVEZ, V.M., R.E. LITZ AND K. NORSTOG. 1992. *In vitro* morphogenesis of Ceratozamia hildae and C. mexicana from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 30:93-98.
- CLARK, W.C. 1989. *Gestión del Planeta Tierra*. Investigación y Ciencia. 158:12-22.
- CLAYTON, P.W., J.F. HUBSTENBERGER AND G.C. PHILLIPS. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(2):337-343.
- DABEKAUSSEN, M.A.A., R.L.M. PIERIK, J.D. VAN DER LAKEN AND J. HOEK SPAANS. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus Sulcorebutia alba Raush. *Scientia Horticulturae*. 46:283-294.
- DAVIS, S.D., S.J.M. DROOP, P. GREGERSON. 1986. *Plants in danger: What do we know?* IUCN. Gland, Switzerland and Cambridge. pp. 240-245.
- DEBERGH, P., J. AITKEN-CHRISTIE, D. COHEN, B. GROUT, S. VON ARNOLD, R. ZIMMERMAN AND M. ZIV. 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 30:135-140.
- DEL CASTILLO, S.R.F. 1982. Estudio ecológico de Ferocactus histrix (D.C.) Lindsay. Tesis de Licenciatura (Biólogo). E.N.E.P. Iztacala. U.N.A.M. Edo. de México.

- DEL CASTILLO, S.R.F. 1986. Semillas, germinación y establecimiento de Ferocactus histrix. Cact. Suc. Mex. 31:5-12.
- DIGUET, L. 1928. Les Cactacées utiles du Mexique. Paris. 325 p.
- DIX, L. AND J. VAN STADEN. 1982. Auxin and giberellin-like substances in coconut milk and malt extract. Plant Cell Tissue Organ Culture. 1:239-245.
- DODDS, J.H. AND L.W.G. ROBERTS. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge. 178 p.
- DONELLY, D.J. AND W.E. VIDAVER. 1988. Glossary of Plant Tissue Culture. Vol. 3. Dioscorides Press. Portland, Oregon. 141 p.
- EHRlich, P.R. AND E.O. WILSON. 1991. Biodiversity studies: Science and Policy. Science. 253(5021): 758-762.
- FAY, M.F. 1994. In what situations in in vitro culture appropriate to plant conservation?. Biodiversity and Conservation. 3:176-187.
- FAY, M.F. AND J. GRATTON. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. Bradleya. 10:33-48.
- FRANCO, M.I.S. 1994. La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES). Historia, estructura y aplicación. Amaranto. 7(1):1-18.
- FRIAS, D.P.M.E. 1989. Desarrollo metodológico para la propagación vegetativa de Echinocactus grusonii Hildman (Cactaceae), mediante cultivo de tejidos. Tesis de Licenciatura (Biólogo). E.N.E.P. Iztacala. U.N.A.M. Edo. de México.
- FULLER, D. 1985. U.S. Cactus and succulents bussines moves toward propagation. TRAFFIC (US). 6(2):1-5, 8-11.
- GAUTHERET, R.J. 1982. Plant tissue culture: The history. In: A. Fujiwara (Ed.). Plant Tissue Culture. IAPTC. Tokyo. pp. 7-12.
- GEORGE, E.F. AND P.D. SHERRINGTON. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics, Limited. Great Britain. 690 p.
- GRAY, D.J. AND J.J. FINER. 1993. Development and operation of five particle guns for introduction of DNA into plant cells. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 33:219.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

GROUT, B.W.W. 1990. Genetic preservation in vitro. 13-22. En: A.J.J. Nijkamp, L.H.W. van Der Plas, J. van Aartrijk (Eds.) *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

HAVEL, L. AND Z. KOLAR. 1983. Microexplant isolation from Cactaceae. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2:349-353.

HERNANDEZ, H. AND E.F. ANDERSON. 1992. A new species of Ariocarpus (Cactaceae). *Bradleya*. 10:1-4.

HERNANDEZ, J.H., G. RUIZ, E. SANCHEZ. 1994. Apuntes sobre la propagacion in vitro de Melocactus bellavistensis Rauh et Backeb. del Perú. *BGMN*. 1(7):85-86.

HUBSTENGERGER, J.F., P.W. CLAYTON AND G.C. PHILLIPS. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae). 49-58. En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 20. High-Tech and Micropropagation IV. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

HUNT, D. 1992. CITES Cactaceae checklist. Royal Botanic Garden Kew & IOS. Whitstable Litho Ltd. Whitstable. pp. 21, 34, 144, 148.

INFANTE, R. 1992. In vitro axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya Mediocactus coccineus (Salm-Dyck). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 31:155-159.

IUCN, 1980. How to use the IUCN Red Data Book Categories. Royal Botanic Gardens, Kew. Richmond. pp. 1-8.

IUCN. 1983. Rare, threatened and insufficiently known endemic cacti of Mexico. Threatened Plants Committee, Royal Botanic Gardens, Kew.

JOHNSON, J.L. AND E.R. EMINO. 1979a. In vitro propagation of Mammillaria elongata. *HortScience*. 14(5):605-606.

JOHNSON, J.L. AND E.R. EMINO. 1979b. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cact. & Succ. J. (US)*. 51:275-277.

KOBAYASHI, A. 1993. Cacti and succulents in Japan. *Cact. & Succ. J. (US)*. 65(3):126-127.

KOLAR, Z., J. BARTEK AND V. VYSKOT. 1976. Vegetative propagation of the cactus Mammillaria woodsii Craig. through tissue culture. *Experientia*. 32: 668-669.

- KRULIK, G. 1980. Tissue culture of succulent plants. *Nat. Cact. & Succ. J.* 35(1):14-17.
- LAZARTE, J.E., M.S. GAISER AND O.R. BROWN. 1982. In vitro propagation of Epiphyllum chrysocardium. *Hortscience*. 17(1):84.
- LEON, C. 1987. Practical techniques. *Threatened Plants Newsletter*. IUCN. 18:8.
- LINDEN, E. 1989. The death of birth. *Time*. 133(1) 16:19.
- LITZ, R.E. AND V. JAISWAL. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. 247-263. En: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds.). *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- LUCAS, G. AND H. SYNGE. 1978. *The IUCN Plant Red Data Book*. Unwin Brothers Limited, The Gresham Press, Old Woking, Surrey, England. 540 p.
- MADDAMS, B. 1993. The importation of artificially propagated cacti and other succulents. *British Cact. Succ. J.* 11(1): 27-28.
- MARTIN, M.J. 1964. Ariocarpus. *British Cact. Succ. J.* 26(4):83-84.
- MARTINEZ-VAZQUEZ, O AND A. RUBLUO. 1989. In vitro mass propagation of the near-extinct Mammillaria san-angelensis Sánchez-Mejorada *Journal of Horticultural Science*. 64(1):99-105.
- MAUSETH, J.D. 1976. Cytokinin-and gibberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in Opuntia polyacantha (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 63(10):1295-1301.
- MAUSETH, J.D. 1977. Cytokinin-and gibberellic acid-induced effects on the determination of morphogenesis of leaf primordia in Opuntia polyacantha (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 64(3):337-346.
- MAUSETH, J.D. 1979a. Cytokinin-elicited formation of the pith-rib meristems and other effects of growth regulators of the morphogenesis of Echinocereus (Cactaceae) seedling shoot apical meristems. *Amer. J. Bot.* 66(4):446-451.
- MAUSETH, J.D. 1979b. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. & Succ. J. (US)*. 51:186-187.
- MAUSETH, J.D. AND W. HALPERIN. 1975. Hormonal control of organogenesis in Opuntia polyacantha (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 62(8):869-877.
- MEYRAN, J. 1956. Notas sobre plántulas de Cactáceas. Vol. I. 6:107-112.

- MILLIKEN, T. 1987. CITES-Japan. Threatened Plants Newsletter. IUCN. 18:11-12.
- MINNICH, W. 1990. Cacti & Succulents. Cact. & Succ. J. (US). 62:234.
- MINOCHA, S.C. AND P.N. MEHRA. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of Neomammillaria prolifera Miller (Cactaceae). Amer. J. Bot. 61(2):168-173.
- MISTRETTA, O. 1994. Genetics of species re-introductions: applications of genetic analysis. Biodiversity and Conservation. 3:184-190.
- MITICH, L. AND J. BRUHN. 1977. The genus Ariocarpus-a bibliography. Cact. & Succ. J. (US). 49:122-127.
- MORETON, R. 1992. On the germination of cactus seeds. British Cact. Succ. J. 10(3):78.
- MOSS, B. 1993. Ariocarpus from seed. British Cact. Succ. J. 2(1):2-3.
- MURASHIGE, T. 1978. The impact of Plant Tissue Culture on agriculture. 15-26. En: T.A. Thorpe (Ed.) Frontiers of Plant Tissue Culture. IAPTC, Calgary.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- OLDFIELD, S. 1985a. The Western European Trade in Cacti and other Succulents. TRAFFIC Bulletin. 7(3/4):44-56.
- OLDFIELD, S. 1985b. Whither International Trade in Plants? New Scientist. 106:10-11.
- PETERSON, S. 1993. Temperature and flowering of Ariocarpus. C & S Society of America Inc. Newsletter. Supplement to Cact. & Succ. J. (US). 65(6):66.
- QUINTERO, L. 1972. Las cactáceas subfósiles de Tehuacán, Pue. Cact. Suc. Mex. Vol. 17 1:3-15.
- RABENDA, I. 1990. Breaking dormancy in cactus seed. Part 1. Cact. & Succ. J. (US). 62(2):86, 94.
- RAVEN, P. 1976. Ethics and Attitudes. 155-179. En: J.B. Simmons, R.I. Beyer, P.E. Brandham, G.L.I. Lucas and T.H. Parry (Eds.) Conservation on threatened plants. Plenum Press. New York.

RAVEN, P. 1986. 60,000 plants under threat. *Threatened Plants Newsletter*. 16:2-3.

REPETTO, R. 1990. Deforestation in the tropics. *Scientific American*. 262(4):18-24.

ROBERT, M. Y V.M. LOYOLA. (COMP.) 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. 21-26. En: M. Robert y V.M. Loyola (Comp.). *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. CICY y CONACyT. México, D. F.

RODRIGUEZ-GARAY, B. AND A. RUBLUO. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cact. & Succ. J. (US)*. 64:116-119.

RUBLUO, A. 1985. Estrategias para la preservación del germoplasma *in vitro*. 35-55. En: M. Robert y V.M. Loyola (Comp.). *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. CICY y CONACyT. México, D.F.

RUBLUO, A., V. CHAVEZ, A.P. MARTINEZ AND O. MARTINEZ-VAZQUEZ. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation*. 63:163-169.

RZEDOWSKI, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*. 14:3-21.

SAJEVA, M. AND A.M. ORLANDO. 1989. Handbook for the identification of the Cactaceae included in the Appendix I of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). *Piante Grasse*. 10: .

SAJEVA, M. AND A.M. ORLANDO. 1992. Handbook for the identification of the Cactaceae included in the Appendix I of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). *Piante Grasse*. 12: .

SANCHEZ, E. 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en la investigación básica. 111-125. En: M. Robert y V.M. Loyola (Comp.). *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. CICY y CONACyT. México, D.F.

SANCHEZ-MEJORADA, H. 1982a. Algunos usos prehispánicos de las cactáceas entre los indígenas de México. *Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Estado de México*. México. 48 p.

SANCHEZ-MEJORADA, H. 1982b. Problemas en el control del comercio de las cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* 2: 27-30.

SANCHEZ-MEJORADA, H. 1982c. Informe sobre la Reunión de Tucson para analizar el comercio de las cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* 2: 90-95.

SEDESOL, 1993. Determinación de especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas, raras, amenazadas, en peligro de extinción y sujetas a protección especial. *Diario Oficial*, 2 de agosto de 1993. pp. 12-40.

SEDUE. 1991. Listado de especies raras, amenazadas, en peligro de extinción o sujetas a protección especial, y sus endemismos en la República Mexicana. *Diario Oficial*, 17 de mayo de 1991. 36 p.

SMITH, R.H., P.J. BURDICK, J. ANTHONY AND A.A. REILLEY. 1991. *In vitro* propagation of Coryphantha macromeris. *HortScience*. 26(3):315.

STABA, E.J. 1980. Tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Inc. Florida. pp. 2-14.

STARLING, R.J. 1985. *In vitro* propagation of Leuchtenbergia principis. *Cact. & Succ. J. (US)*. 57:114-115.

STARLING, R.J. and J.H. DODDS. 1983. Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya*. 1:84-90.

STREET, H.E. 1979. Embryogenesis and chemically induced organogenesis. 123-153. En: W.R. Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddock and V. Raghavan (Eds.) *Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications*. Ohio State University Press, Columbus.

STUPPY, W. AND W. NAGL. 1992. Regeneration and propagation of Ariocarpus retusus Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya*. 10:85-88.

TOLEDO, V.M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo*. 14(81): 17-30.

VAZQUEZ-YANES, C. Y V. CERVANTES. 1993. Estrategias para la reforestación con árboles nativos de México. *Ciencia y Desarrollo*. 113:52-58.

VILLALOBOS, J. 1988. Threatened Plant List Middle America. IUCN.

VOVIDES, A.P. 1981. Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. *Biótica*. 6(2):219-228.

VOVIDES, A.P. 1988. Relación de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción. En: O. Flores y P. Gerez (Eds.) *Conservación de México*. INIREB. México. 302 p.

VOVIDES, A.P. AND A. GOMEZ-POMPA. 1978. The problems of threatened and endangered plant species of México. 77-88. En: G.T. Prance and T.S. Elias. Extinction is Forever. The status of threatened and endangered plants of the Americas. The New York Botanical Garden.

VYSKOT, B. AND Z. JARA. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds in vitro. Journal of Horticultural Science. 59(3):449-452.

WILLIAMS, E.G. AND G. MAHESWARAN. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Annals of Botany. 57:443-462.

WILSON, E.O. 1989. La biodiversidad amenazada. Investigación y Ciencia. No. 158:64-71.

WOCHOCK, Z.S. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. Biological Conservation. 20:83-89.

ZIV, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. 45-69. En: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (Eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.