

00381



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

22
Fm

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INDUCCIÓN DE RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS *IN*
VITRO EN *Mammillaria san-angelensis* SÁNCHEZ-
MEJORADA ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

TERESITA DEL NIÑO JESÚS MARÍN HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS

MEXICO, D.F.

1998.

262230

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES DEL JARDIN BOTANICO, INSTITUTO DE BIOLOGIA DE LA UNAM,
BAJO LA DIRECCION DEL DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS Y EN EL LABORATORIO
DE CITOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCION
DE LA DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN

A mis hijas Leslie y Eunice con todo mi amor y ternura.

A mis papás Rafael y Ma. Teresa, por enseñarme a querer las cosas que hago día con día. A mis hermanos Jose, Lucy, Carlos y Rafa, por estar siempre presentes. A mis sobrinos Marité, Luis Roberto, Silvestre, José Luis, José Alberto, Eli, Rafael, Ruy, Norma y Verónica por todos los buenos momentos compartidos. A mis amigos, Pilar, Oscar, Verónica, Isabel y Mabel, por compartir conmigo sus conocimientos y buenos consejos. A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y del Laboratorio de Citología.

Con agradecimiento

A Doctor Abraham Rubluo Islas, por su asesoría para llevar a cabo esta investigación.

A la Doctora Judith Márquez Guzmán, por su constante enseñanza y compromiso con sus estudiantes.

A la Doctor Benjamín Rodríguez Garay, por su asesoría durante la realización de esta investigación.

A los Doctores Víctor Manuel Chávez Avila, Patricia Dolores Dávila Aranda y Manuel Jiménez Estrada, por la acertada revisión y sugerencias para mejorar el manuscrito.

A la Doctora Sonia Vázquez Santana, por su asesoría en las técnicas histológicas.

A la Doctora Margarita Collazo Ortega por sus sugerencias en el inicio de este trabajo.

A los Doctores Hector Benavides Meza y Carlos Rodríguez Franco, por las facilidades brindadas para realizar mis estudios de doctorado.

A Biólogo Jerónimo Reyes Santiago, por la donación de plántulas de *Mammillaria lasiacantha* Engel.

A la Bióloga Estela Sandoval, por facilitarme su equipo durante la realización de este trabajo.

A Biólogo Agustín Vargas Vera, por el apoyo en el análisis estadístico.

A Señor Aquiles Gonzalo García Montiel, por su asesoría en el trabajo de computación.

A Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado para la realización de la presente investigación.

INDICE

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 6 |
| Resumen | 7 |
| Abstract | 9 |
| Introducción | 10 |
| Justificación | 28 |
| Objetivos | 29 |
| Materiales y métodos | 30 |
| Resultados y discusión | |
| I. Inducción a la embriogénesis somática | 36 |
| II. Respuestas morfogénicas de brotes por la acción de las auxinas | 49 |
| Conclusiones | 59 |
| Apéndices | 61 |
| Literatura consultada | 68 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| AA | Acido 3-indolacético |
| AB | Acido indolbutírico |
| ANA | Acido naftalenacético |
| B5 M | Medio B5 Gamborg <i>et al.</i> (1968) modificado de acuerdo con Norstog y Rhamstine (1962) |
| 2,4-D | Acido 2,4-diclorofenoxiacético |
| K | Kinetina 6-furfurilaminopurina |
| MS | Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) |

RESUMEN

Los objetivos de esta investigación fueron: a) Inducir la embriogénesis somática en *Mammillaria san-angelensis* analizando las causas que la disparan, b) determinar el origen de los proembriones somáticos de *M. san-angelensis* y c) describir las respuestas morfogénicas ante diferentes auxinas que se producen en brotes obtenidos de vitroplantas que han sido mantenidas *in vitro* durante 7 años.

Para la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* en *Mammillaria san-angelensis* se establecieron los requerimientos particulares de reguladores del crecimiento y medio de cultivo, se probaron diferentes tipos de explantes, y se analizó histológica e histoquímicamente los callos embriogénicos con el fin de caracterizar las distintas etapas de la ontogenia de los embriones somáticos.

Los resultados mostraron que de las variables analizadas, los óvulos de flores en etapa de anthesis de *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada, cultivados en medio basal B5 modificado por Norstog y Rhamstine (1962) suplementado con 2,4-D (4 mg l^{-1}) más kinetina (2 mg l^{-1}) y cultivados en oscuridad, desarrollaron un callo embriogénico el cual se originó a partir de los tegumentos del óvulo. El análisis histológico reveló dos orígenes para la formación de proembriones, uno unicelular y otro pluricelular. Sin embargo, no fue posible establecer la maduración y germinación de los proembriones. El estudio histoquímico dio una pauta para el entendimiento de la posible causa que detuvo el desarrollo embriogénico.

Otros aspectos morfogénéticos que se analizaron fueron, la organogénesis indirecta y la activación de meristemas espiníferos y axilares bajo la influencia de 5 diferentes tipos de auxinas (AIA, AIB, ANA, 2,4-D y picloram), como única fuente de fitorregulador exógeno en secciones de brotes de *M. san-angelensis* que habían sido mantenidos durante 7 años mediante subcultivos *in vitro*, en medio MS sin reguladores del crecimiento. Los estudios histológicos revelaron que nuevos brotes se formaron a partir de la activación de los dos meristemas el axilar y el espinífero. El presente estudio mostró que las plantas de *M. san-angelensis* mantenidas *in vitro* por largos períodos, dan respuestas morfogénéticas que sugieren una posible modificación en su regulación endógena, que pueden contribuir al entendimiento del papel de las auxinas en las respuestas morfogénéticas *in vitro*.

ABSTRACT

The present investigation had the following objectives: a) to induce somatic embryogenesis in *Mammillaria san-angelensis* and analyze the causes of its onset; b) to determine the origin of somatic pro-embryos in *M. san-angelensis*, and c) to describe the morphogenetic responses to various auxins produced by buds obtained from vitroplants, grown *in vitro* for 7 years.

The particular requirements of growth regulators and culture medium for induction of somatic embryogenesis *in vitro* in *M. san-angelensis* were established, various types of explants were tested and a histological and histochemical analysis of embryogenic calluses was performed to characterize the ontogenic stages of somatic embryos.

Results showed that ovules from *M. san-angelensis* flowers at the anthesis stage, cultured in basal medium B5 modified by Norstog and Rhamstine (1962), supplemented with 2,4-D (4mg.l⁻¹) plus Kin (2 mg.l⁻¹), in darkness, developed an embryogenic callus which originated in the ovule teguments. Histological analysis revealed two possible origins for the formation of pro-embryos, one unicellular and another multicellular. However, maturation and germination of pro-embryos could not be accomplished. The histochemical study gave clues as to explain the causes of embryogenesis development arrest.

Other morphogenetic aspects analyzed were indirect organogenesis and activation of spiniferous and axillary meristems under the influence of 5 different types of auxins (AIA, AIB, ANA, 2,4-D and picloram), as sole source of exogenous growth regulator in bud sections of *M. san-angelensis* maintained during 7 years by *in vitro* subculture, in MS medium lacking growth regulators. Histologic studies revealed that new buds were formed from the activation of maintained *in vitro* for large periods, which were able to show morphogenetic responses suggesting a possible modification in endogenous regulation of auxin.

INTRODUCCIÓN

México es considerado como uno de los países con megadiversidad, en términos generales el país tiene el 10% de la biodiversidad terrestre del planeta, además no solamente se distingue por su diversidad de especies sino también por su alto índice de endemismos, es decir, especies que solamente se encuentran dentro de los límites geográficos del país (Rzedowski, 1993, SEMARNAP-INE-CONABIO, 1995).

Para México la familia *Cactaceae* es considerada de gran importancia en cuanto a su diversidad biológica, con un total de 48 géneros y 563 especies reconocidas. Del total de los géneros que se encuentran en el país, 15 (31.3%) son endémicos (Hernández y Godínez, 1994). Esta familia es una de las más amenazadas del reino vegetal debido principalmente a la conversión de terrenos forestales para usos agrícolas y/o pecuarios y a las actividades de extracción de las plantas de su hábitat, para su venta ilegal en mercados nacionales e internacionales (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978; Toledo y Ordoñez, 1993).

Características de las cactáceas.

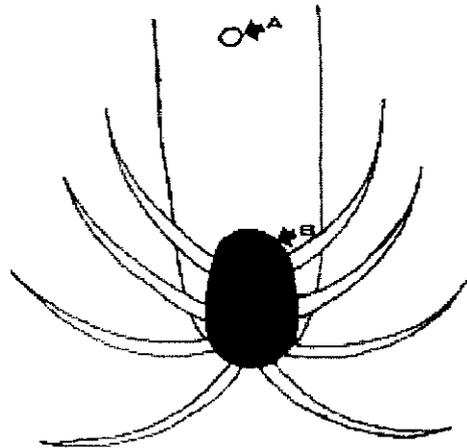
Las cactáceas, aunque en lo general son, por sus características de organización, estructuralmente semejantes a las demás dicotiledoneas, presentan hábitos y estructuras anatómicas de adaptación altamente especializadas que les imparten una fisonomía particular. Entre las adaptaciones más importantes están: el gran desarrollo del tejido parenquimatoso, correlacionado con la succulencia; la reducción de la superficie transpiratoria al adquirir formas globosas, la atrofia hasta estados vestigiales del limbo de las hojas y en contraste, la base de éstas se hipertrofia dando origen a un tubérculo, o su transformación ha generado escamas, espinas y glóquidas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

Durante el desarrollo de la plántula, el meristemo de la yema cotiledonar apical, forma los tubérculos que se ordenan en series espiraladas acropétalas. En la parte superior de estos órganos se encuentran las aréolas, éstas son los órganos más característicos

de las cactáceas y se les considera como homólogas a las yemas axilares de las otras dicotiledóneas (Boke, 1958; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

Las yemas apicales y axilares de las dicotiledóneas, pueden dar origen a hojas, nuevos tallos y flores, mientras que en las cactáceas, forman también espinas, glóquidas, cerdas y pelos y algunas veces raíces adventicias (Meyrán, 1956; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978; Gibson y Nobel, 1986). En casi todas las especies existe, en el centro de las aréolas, un meristemo integrado por dos porciones, la externa, que forma las espinas y la adaxial, que origina las flores. La externa entra en actividad primero y ya que se han formado las espinas se activa la parte adaxial produciendo flores. Por otra parte, en el género *Mammillaria* las dos aréolas, la florífera y la espinífera, están separadas completamente desde su origen en dos meristemos areolares independientes (esquema 1) (Boke, 1958; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

La estructura histológica del tallo en las cactáceas es semejante, en lo general, a la de las demás dicotiledóneas, pero tiene algunas modalidades propias de las plantas suculentas. El sistema tegumentario está constituido por los tejidos epidérmico y peridérmico. Las paredes de las células epidérmicas que se encuentran en contacto con el medio externo, están revestidas de una gruesa película de cutina que impide la evaporación del agua y proporciona resistencia a las células. En casi todos los géneros, debajo del sistema tegumentario se localiza el tejido colenquimatoso, que da consistencia y solidez al tallo. Los estomas en las cactáceas están más o menos hundidos y su número es más escaso, con relación al de las especies no xerófitas, el hundimiento de los estomas determina la formación de espacios aéreos que se saturan con el vapor de agua, lo que permite que la transpiración disminuya (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).



Esquema 1.- Aréola de *Mammillaria* en donde el meristemo florífero (A) y el meristemo vegetativo (B) están completamente separados desde su origen, el primero en el ápice del tubérculo y el segundo en la axila del mismo (según Buxbaum, 1956, citado por Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

Inmediatamente abajo del sistema tegumentario, está el parénquima en empalizada o clorofílico, semejante al de las hojas, formado por varias capas de células prismáticas, grandes y alargadas, de paredes delgadas y con abundantes cloroplastos. Debajo de este último tejido se encuentra el parénquima colector que forma una zona bastante amplia, con células grandes, esferoides, turgentes por la gran cantidad de agua y diversos polisacáridos que almacenan, a este tejido se deben las formas suculentas de las cactáceas. En lo que respecta al tejido conductor, la disposición de los haces liberoleñosos, varía entre los géneros, así en *Opuntia* está integrado por un cilindro reticulado y aplanado de acuerdo a la forma del tallo; en numerosos cactus columnares los haces vasculares constituyen cuerdas gruesas y largas como varillas, que se disponen en torno al tejido medular y en otros casos como en *Mammillaria* se integran especialmente en la base del tallo y de la raíz formando un cilindro grueso y compacto. De estos haces salen paquetes vasculares hacia la corteza, que terminan en el tejido parénquimatoso o en los tejidos indiferenciados de las aréolas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

Caractísticas generales del género *Mammillaria*.

De los géneros más representativos de las cactáceas en México, *Mammillaria* ocupa un lugar preponderante, hospedando 160 especies de las 166 descritas, de las cuales 150 son endémicas de éste país (Hernández y Godínez, 1994). Además, de que aquí se localiza su centro de diversidad genética, creciendo desde el nivel del mar hasta los 3000 metros sobre el nivel del mar, aunque el mayor número de especies está distribuido en las regiones áridas y semiáridas del país. Las mamilarias, reciben este nombre debido a que los tubérculos tienen forma de mamilas, en la axila de éstos crece lana y cerdas, en la parte superior están incrustadas las espinas que se diferencian en centrales y radiales y carecen totalmente de hojas. Las raíces son largas o tuberosas, en estas últimas pueden almacenar agua. En general, estos cactus, se desarrollan de manera aislada, no forman ramificaciones y son terrestres o rupícolas (Benson, 1968). Las flores nacen en la axila de los tubérculos, pequeñas, de color variado, muy llamativas y atractivas, lo que las hace ser apreciadas por la gente. El fruto es cilíndrico o cónico, sin aréolas persistentes. La semilla es de uno a dos milímetros de largo, piriforme, ovoide o elipsoide.

En este género, los cotiledones del embrión maduro pueden estar tan reducidos que son difíciles de apreciar a simple vista sobre el hipocótilo, el cual es globoso o ligeramente alargado y en él se almacenan las reservas alimenticias (Meyrán, 1956; Mauseth, 1984). Como tejidos de reserva extraembrionarios se presentan el endospermo y el perispermo. El endospermo, es digerido a medida que crece el embrión; sólo un estrato persiste en las semillas maduras como una capa muy delgada entre el embrión y la cubierta seminal (Engleman, 1960). El otro tejido extraembrionario, el perispermo, se origina cuando la nucela empieza a acumular sustancias de reserva, éste puede ser consumido por el embrión, o ser persistente en embriones maduros, así por ejemplo, en *Mammillaria rhodantha* y *M. compressa* el perispermo se encuentra en semillas maduras almacenando gránulos de almidón (Hernández-García y García-Villanueva, 1991).

Las plantas pertenecientes al género *Mammillaria* tienen una importancia comercial debido a lo llamativo de su forma y al color de sus flores que pueden ser blancas, rojas, anaranjadas, rosas, púrpura y amarillas. Algunas de sus especies como *M. craigii*, *M. grahamii* y *M. senilis* contienen metabolitos secundarios (alucinógenos) que pueden ser importantes para la industria farmacéutica (Evans y Hofmann, 1979).

Debido a estos atributos y a una distribución restringida, cuando se realizan colectas de plantas para su comercialización sin una debida planeación se está provocando una disminución de la biodiversidad por la pérdida del germoplasma. Un ejemplo de ello es *Mammillaria san-angelensis*, ésta especie es endémica del Pedregal de San Angel de la Ciudad de México, actualmente se encuentra catalogada en el Diario Oficial de la Federación (1994) como una especie en peligro de extinción debido principalmente a la sobreexplotación y al crecimiento de la ciudad (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Para contrarrestar la pérdida de la biodiversidad vegetal se han realizado varias estrategias como son: las reservas biológicas, jardines botánicos y bancos de semillas (Fay, 1994). Recientemente se ha incorporado una estrategia más, el cultivo *in vitro*, según Smith *et al.* (1991) el cultivo *in vitro* representa una alternativa para el estudio y mantenimiento de germoplasma valioso. Este término genérico se utiliza comúnmente para denominar a los cultivos asépticos de origen vegetal (Fay, 1994). Esta técnica se basa en la teoría de la totipotencialidad de las células, la cual propone que las células son capaces de regenerar un organismo completo (Haberlandt, 1902, citado por Hurtado y Merino, 1988). Esto es posible siempre y cuando se les provea de las condiciones externas necesarias para su desarrollo, como nutrientes, azúcares, reguladores del crecimiento, complejos naturales, luz, temperatura, humedad y otros (Krikorian, 1991).

Cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* ofrece ventajas adicionales a las técnicas convencionales de la propagación, como son una rápida multiplicación a partir de pequeñas fracciones de la

planta, así como plantas libres de patógenos y germinación de semillas que bajo condiciones de semillero no lo efectúan (Fay, 1994). Además, debido a las condiciones asépticas en que se obtienen, es posible agilizar los trámites para el movimiento internacional de plantas ya que la mayoría de los países pueden aceptar este material vegetal sin requerir una cuarentena rigurosa, permitiendo que llegue a su destino más rápidamente (Fay, 1994). No obstante, hay que tener en cuenta que el cultivo *in vitro* es más costoso que las técnicas convencionales, por lo que es conveniente aplicarla en situaciones en donde se cuenta con problemas para su reproducción o propagación, o bien se quieran realizar estudios bioquímicos, genéticos, químicos o fisiológicos que ayuden a comprender los procesos vegetales.

Para lograr la propagación de plantas por cultivo *in vitro*, es posible utilizar cualquier fragmento vegetal por ejemplo; tallos, partes de la flor, secciones de hojas, tubérculos, aréolas, meristemos, células en suspensión, etc.; a estos materiales biológicos se les denomina explantes (Sagawa y Kunisaki, 1990; Fay, 1994). Mediante el uso de explantes es posible inducir la morfogénesis, término que se utiliza para denominar al conjunto de procesos relacionados con la diferenciación y desarrollo de órganos o tejidos (Fahn, 1982).

Los órganos o embriones pueden surgir directamente del explante o a partir del callo. El callo es un grupo amorfo de células que surge del explante creciendo de manera desorganizada y en él se pueden observar varios tipos de células. La formación de callo involucra rediferenciación, interacción celular y reacciones a señales bioquímicas específicas. Sin embargo, se sabe que existe una mayor probabilidad de que se produzca una variación somaclonal (Wyman *et al.*, 1992).

La variación somaclonal puede surgir por tres caminos; a partir del mismo explante en donde existe un mosaico de células con diferentes variaciones genéticas que al estar en cultivo se les permite manifestarse. Por consiguiente, la variación somaclonal puede usarse, con mucha frecuencia, para recuperar la variación genética natural de una población. Otro camino de la variación observada, puede provenir de un cambio

temporal (epigenético) debido al estrés producido en el explante. Por definición, los cambios epigenéticos no se transmiten meióticamente, razón por la cual no se transmite a su descendencia y el tercer camino puede ser debido a mutaciones que ocurren durante el cultivo de tejidos (Tabares *et al.*, 1991). Debido a lo anterior es necesario conocer el genotipo de las plantas micropropagadas, ya que de acuerdo a los objetivos que se persigan, la variación somaclonal puede ser una desventaja cuando se busca una uniformidad genética como es el caso de los bancos de germoplasma (Tabares *et al.*, 1991), o bien puede ser deseable para incrementar la ocurrencia de variabilidad en el mejoramiento de plantas por ejemplo en la búsqueda de resistencia a plagas y enfermedades (Tabares *et al.*, 1991; Hadi y Bridgen, 1996).

El primer reporte de cultivo *in vitro* en el género *Mammillaria*, fue realizado por Minocha y Mehra (1974) quienes obtuvieron callo a partir de explantes de brotes y órganos florales de *Neomammillaria prolifera*. Posteriormente Kolar *et al.* (1976) trabajando con *M. woodsii* fueron los primeros en obtener plantas *in vitro* utilizando como explante secciones de brotes. Desde entonces se han podido cultivar *in vitro* alrededor de 40 especies de *Mammillaria* (Rubluo, 1997). La mayoría de estos estudios tienen un enfoque de micropropagación de plantas. Sin embargo, también se han realizado estudios con otros enfoques, así el trabajo de Minocha y Mehra (1974) usaron la inducción del callo para investigar aspectos nutricionales y morfogenéticos en *M. prolifera*. Rubluo *et al.* (1990) usaron callo de *M. huitzilopochtli* como una posible fuente de betalainas. Johnson y Emino (1979) trabajaron con diferentes especies de *Mammillaria* bajo las mismas condiciones experimentales, para analizar las respuestas morfogenéticas de un mismo origen de explante al variar la especie, ellos encontraron que la respuesta varió, desde el éxito total en la micropropagación de *M. elongata*, hasta la ausencia de respuesta en *M. eichalmajii*, sugiriendo con ello que cada especie requiere de condiciones específicas para su cultivo.

Las vías de morfogénesis más comunes en cultivo de tejidos son: la embriogénesis somática, la multiplicación de brotes a partir de yemas axilares o terminales y la organogénesis (Krikorian, 1991).

Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es un término que se usa para definir el desarrollo de plantas a partir de células somáticas o haploides en ausencia de fertilización. Este proceso se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* (Sharp, 1980). Por definición, un embrión es un esporofito completo en su estado inicial de desarrollo. Es una estructura bipolar con raíz y tallo (Zimmerman, 1993).

Embriogénesis cigótica en las angiospermas.

Para desarrollar protocolos de embriogénesis somática *in vitro*, es importante remitirse a los eventos que conforman la embriogénesis cigótica. La morfogénesis de los embriones cigóticos está caracterizada por presentar una polaridad bien definida, la cual se puede notar desde la célula huevo no fertilizada, en donde el núcleo y la mayor parte de los constituyentes del citoplasma están confinados a un polo calazal, mientras que una gran vacuola está localizada en el extremo micropilar (Wets y Harada, 1993). Dicha polaridad se mantiene después de la fertilización. La generación esporofítica es iniciada con la doble fecundación, que da por resultado el cigoto y el núcleo primario del endospermo, el cigoto, en la mayoría de las angiospermas, se divide transversal y asimétricamente dando como resultado dos células; la más próxima al micropilo se denomina basal y la otra es la terminal (Fahn, 1982). La célula terminal es más pequeña que la basal vacuolada; la primera dará origen al embrión propiamente dicho y la segunda al suspensor (West y Harada, 1993). Enseguida, la célula suspensora se divide formando el suspensor permaneciendo en la embriogénesis temprana y posteriormente degenera en un gran número de especies (Yeung y Meinke, 1993).

Una vez que se ha diferenciado el cigoto, éste sufre dos divisiones longitudinales para producir cuatro células y después ocho, posteriormente, sufre una división periclinal o paralela a la superficie del embrión formando el primer tejido histológicamente detectable, el protodermo el cual es precursor de la epidermis. La delineación del protodermo establece el estado globular del embrión el cual crece debido al aumento del número de sus células. En los márgenes laterales del estado globular las células que lo conforman se dividen y dan lugar a dos lóbulos que darán origen al estado de

corazón representado estructuralmente por la aparición de los cotiledones y el eje embrionario. Después, los cotiledones se elongan rápidamente como resultado de la división y expansión celular produciendo el estado de torpedo (West y Harada, 1993).

En algunos géneros de la familia *Cactaceae* como en *Mammillaria* y en *Melocactus* pueden no presentarse las formas clásicas de las dicotiledoneas en los embriones maduros, ya que en especies de estos géneros se pueden observar los cotiledones tan reducidos que es difícil de apreciarlos sobre el hipocótilo, el cual es globoso o ligeramente alargado, consideraciones que deben tomarse en cuenta al realizar un estudio anatómico (Meyrán, 1956; Hernández-García y García-Villanueva, 1991).

Embriogénesis somática *in vitro*

En las angiospermas, el primer reporte de embriogénesis somática *in vitro* fue a partir de células de callo embriogénico de zanahoria, éste hallazgo lo realizaron Steward *et al.* (1958) (citado por Zimmerman, 1993). A partir de ese trabajo se han publicado cientos de referencias describiendo el proceso de la embriogénesis somática *in vitro* tanto en especies que la presentan *in vivo* como en aquellas que no lo hacen, demostrando con ello que esta capacidad es una propiedad inherente de las células vegetales (Tisserat *et al* 1979; Zimmerman, 1993).

Existen dos vías generales del desarrollo embriogénico *in vitro*: a) la embriogénesis directa, en donde los embriones se originan directamente del explante en ausencia de una etapa de callo. b) la embriogénesis indirecta, en la cual la proliferación de callo se requiere para el desarrollo del embrión (Sharp, 1980; Litz y Jarret, 1991; Krikorian, 1991). Este sistema puede ser el de mayor potencial para la micropropagación por cultivo *in vitro*, ya que permite producir miles de embriones a partir de unos cuantos gramos de tejido, callo o de algunos mililitros de una suspensión celular, reduciendo significativamente los costos en comparación con los otros métodos de micropropagación (Denchev y Atanassov, 1995).

El origen de los embriones puede ser unicelular o pluricelular. El unicelular puede surgir a partir de células aisladas o después de la formación de una masa de células proembriogénicas (Sharp, 1980; Wang *et al.*, 1990). En ambos casos, los proembriones formados presentan una clara polaridad, la cual se muestra en las primeras divisiones las cuales son desiguales dando por resultado una célula más pequeña (apical) y otra más grande vacuolada (basal) parecida a las células suspensoras del embrión cigótico. La polaridad es mantenida en el embrión maduro ya que la raíz estará siempre en contacto con los vestigios de la célula basal. Similarmente, los embriones que surgen de la masa de células proembrionales, permanecen unidos a ésta por medio de sus raíces. Esta situación se extiende a los embriones somáticos *in vivo* en tallos de plantas de *Ranunculus sceleratus*, en donde los embriones surgen de las células epidermales quedando unidos a ellas por medio de sus raíces (Sharp, 1980).

Desde los primeros trabajos llevados a cabo por Steward *et al.* (1958) en zanahoria, se ha supuesto que el origen de los embriones es unicelular (Schumann *et al.*, 1995), no obstante, en años recientes se ha observado que también pueden tener un origen multicelular (Halperin y Wetherell, 1965; Williams y Maheswaran, 1986; Michaux-Ferrière *et al.*, 1992; Santarem *et al.*, 1997) en el cual se desarrolla primero un centro meristemático también llamado "complejo celular proembrional" (Trigiano *et al.*, 1989). Es este complejo el proembrión formado, a diferencia del origen unicelular, desde su inicio, no presenta una polaridad definida, trayendo posibles consecuencias en la formación del embrión como, falta de meristemo apical o embriones múltiples fusionados (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992; Schumann *et al.*, 1995)

Es frecuente que se presenten otras diferencias entre el embrión cigótico y el somático, como lo reportaron Carron *et al.* (1995) quienes observaron un menor contenido de reservas en el cuerpo del embrión somático que en el cigótico. También el patrón de los reguladores del crecimiento fue muy diferente en la ontogenia de estos dos tipos de embriones, ya que en los cigóticos durante la fase de desarrollo presentaron un pico de AIA de 20 nmol/g (peso seco) y en la fase final otro pico de ácido abscísico (ABA) de 25 nmol/g (peso seco), en cambio los embriones somáticos mostraron poca diferencia

entre sus reguladores del crecimiento endógenos durante su ontogenia, así como niveles muy por debajo de los cigóticos (0.6-2 nmol peso seco). Esto explica el porque se favorece el desarrollo de los embriones al adicionar al medio auxinas y una buena germinación, al adicionar al final del cultivo el ABA.

Entre los estímulos importantes para que la célula somática dirija sus divisiones a la formación de una nueva planta, se encuentran sus reguladores del crecimiento, siendo la auxina el principal compuesto necesario para desencadenar el proceso embriogénico (Sharp, 1980). La mayoría de los sistemas embriogénicos requieren, para la inducción de los embriones, de una concentración alta de auxina en el medio y una vez obtenida las primeras manifestaciones embriogénicas, es necesario retirar la auxina del medio, ya que si ésta permanece en los subcultivos el número de embriones maduros formados se reducirá o incluso se inhibirá su desarrollo (Sharp, 1980, Konan *et al.*, 1994; Rajbhandari y Stomp, 1997). Se ha propuesto, que ésta situación ocurre porque la regulación del desarrollo embriológico está dada por dos mecanismos; uno materno (externo) y otro propio del embrión (interno) (Zimmerman, 1993). Así es posible que la auxina exógena inicie el fenómeno de la polaridad en la célula somática, como lo indica Meinke (1995) para la polaridad del cigoto en las plantas superiores, siendo este el primer signo de similitud con la embriogénesis sexual. Una vez obtenida la rediferenciación celular es necesario eliminar del medio la auxina exógena para que se manifieste la auxina endógena del proembrión, expresada a través de divisiones que favorezcan el crecimiento desigual del embrión globular a un embrión en estado de corazón. (Liu *et al.*, 1993; Kawahara y Komamine, 1995).

La auxina que generalmente se utiliza como promotora de la embriogénesis somática es el 2,4-D (Litz y Jarret, 1991), sin embargo, otras auxinas tales como el picloram, AIB ANA (George y Sherrington, 1984; Krikorian, 1991), han demostrado ser efectivas en la inducción de la embriogénesis somática, por lo que es conveniente investigar un espectro más amplio de auxinas cuando se requiere implementar protocolos de embriogénesis en especies no estudiadas.

Las citocininas en términos generales no se requieren en el medio de cultivo, sin embargo en algunas especies (34.6 % de especies comerciales cultivadas *in vitro*) es necesaria su presencia para la inducción, maduración y germinación de los embriones (Litz y Jarret, 1991). El ácido abscísico, se adiciona al medio de cultivo para reducir la frecuencia de anomalías de desarrollo como son la formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz (Litz y Jarret, 1991).

El agua de coco, ha sido reportada como un buen inductor de la embriogénesis somática además de un buen amortiguador, esto es debido probablemente a los componentes tanto orgánicos (AIA, zeatina, aminoácidos y vitaminas) como inorgánicos (magnesio y fosfatos en mayor medida) que contiene este endospermo líquido, el cual interactúa con las auxinas exógenas estimulando la división celular y el crecimiento, sin embargo, su uso tiene la fuerte limitante de que el contenido de sus componentes varía por ejemplo con el origen, genotipo y estado de la planta de donde se obtienen los cocos. Debido a esta variabilidad y a la falta de precisión en la composición del agua de coco, su uso se ha visto restringido, aunque no suprimido ya que en ocasiones sólo en presencia de ella se han promovido las respuestas esperadas; además de que el costo comparado con la zeatina o el inositol son significativamente menores (Krikorian, 1991).

El uso de medios de cultivo para el desarrollo de especies vegetales *in vitro* es uno de los temas de gran interés científico, que se ve reflejado en la gran variedad de medios desarrollados (George y Sherrington, 1984). Con frecuencia los explantes no responden en un medio determinado y en otro sí, aún utilizando las mismas concentraciones de reguladores del crecimiento, lo que refleja que es necesaria una adecuada combinación de nutrientes para disparar el proceso morfogénico (Murray, 1988; Maës *et al.*, 1996), así como, más investigación sobre la fisiología del desarrollo.

Murray (1988), citó que las principales fuentes naturales de nitrógeno *in vivo* en el desarrollo embriogénico cigótico son: la arginina, glutamina, alanina, metionina y

asparagina entre las más importantes. De esta manera en una investigación realizada con cultivo de embriones de chicharos *in vitro*, se observó que la adición de estas fuentes de nitrógeno al medio de cultivo influyó radicalmente en el contenido de proteínas en el embrión (Murray, 1988). Sin embargo, existen algunos reportes que mencionan el efecto inhibitor de estos amino ácidos, Krikorian (1991) dio una explicación a tales contradicciones, él dijo que cuando se adicionan al medio de cultivo D-aminoácidos esta es a menudo inhibitoria, mientras que los L-aminoácidos pueden propiciar un buen desarrollo embriogénico (Krikorian, 1991). Así cuando se han utilizado los L-aminoácidos, es más frecuente obtener un efecto positivo en la embriogénesis somática, como ocurrió con zanahoria en donde la adición de L-glutamina, L-alanina y ácido L-glutámico favorecieron el desarrollo de los embriones y en el incremento en su número (Higashi *et al.*, 1996). Otras observaciones realizadas con fuentes de nitrógeno orgánico son las relacionadas con las poliaminas. A este respecto, Carron *et al.*, (1995) explican que la iniciación del callo embriogénico está acompañada por una elevada síntesis de poliaminas (espermina, espermidina y putrescina). La acción de las poliaminas en la inducción de embriogénesis somática al parecer, se debe a la inhibición de la biosíntesis del etileno el cual tiene un efecto adverso sobre el desarrollo y mantenimiento de la embriogénesis (Carron, *et al.*, 1995).

Se ha reportado que el tipo de explante ha sido la clave que determina la inducción y desarrollo de la embriogénesis. Debido a que en las cactáceas, tan sólo en tres especies se han obtenido embriones somáticos *in vitro* (Infante, 1992; Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994; Torres-Muñoz y Rodríguez-Garay, 1996), es conveniente tomar en cuenta a otras especies de familias diferentes para la selección de los explantes en los que se ha obtenido embriogénesis somática. Los explantes con mayor éxito en la inducción a la embriogénesis somática son los provenientes de partes reproductivas de la planta madre como, embriones inmaduros o maduros, partes de la flor, y óvulos (Tisserat *et al.*, 1979). Por ejemplo en *Lolium multiflorum* Lam. en donde utilizaron como explantes óvulos fecundados, obteniendo la regeneración de plantas tanto por el desarrollo de los embriones cigóticos, como por el de los adventicios (Kumlehn y

Nitzsche, 1995), o bien *Guitztotia abyssinica*, en donde la embriogénesis fue inducida a partir de epicotilos y cotiledones (Adda, *et al.*, 1994).

Factores inhibidores de la embriogénesis

Se ha encontrado una relación entre la respuesta morfogenética y los componentes de la atmósfera del cultivo. Los tejidos vegetales producen normalmente sustancias volátiles como el CO₂, el etileno y el etanol que se acumulan en la atmósfera del cultivo. El etanol y el etileno son capaces de inhibir o limitar el proceso embriogénico (Sharp, 1980; Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994, 1996). También se ha reportado que los compuestos no volátiles como los fenoles, pueden ser fitotóxicos causando desde daños ligeros a las células hasta la muerte del explante (Debregh y Read, 1991; Preece y Compton, 1991; Michaux-Ferrière *et al.*, 1992). El daño ocasionado por los compuestos volátiles es factible de ser minimizado, utilizando recipientes que permitan un eficiente intercambio de gases (Buddendorf-Joosten y Woltering, 1994, 1996). Por otra parte, el metabolismo de los compuestos fenólicos se puede reducir si se eligen como explantes tejidos jóvenes, dañando lo menos posible al tejido en el momento de la extracción, manteniendo los cultivos en completa oscuridad y adicionando al medio compuestos antioxidantes como el ácido cítrico o ascórbico.

Embriogénesis somática en las cactáceas

El primer reporte de embriogénesis somática *in vivo* en las cactáceas, fue realizado por Ganong (1898) (citado por Engleman, 1960), a partir de este reporte se ha observado que en la familia *Cactaceae*, varias especies pueden presentar embriones somáticos. De hecho, Engleman (1960) discute que la presencia o ausencia de los embriones somáticos pueden llegar a ser una característica taxonómica para las cactáceas. Al contrario de la embriogénesis somática *in vivo* en las cactáceas, *in vitro* se tienen tan solo tres especies propagadas por esta vía; *Mediocactus coccineus*, en la que se usó el medio MS y el ANA como auxina inductora (Infante, 1992), *Turbincarpus pseudomacrolele* en donde se usó el medio MS con 2,4-D, kinetina, glutamina e hidrolizado de caseína (Torres-Muñoz y Rodríguez-Garay, 1996) y *Ariocarpus retusus*, que pudo ser inducida por la adición de agua de coco al medio MS (Stuppy y Nagl,

1992), en esta última especie también se pudo inducir la embriogénesis en medio MS con 6-bencilaminopurina y ANA (Olguín, 1994). En los tres primeros casos, para la maduración de los embriones se requirió subcultivar en MS sin reguladores del crecimiento de crecimiento, situación que concuerda con Zimmerman (1993).

La multiplicación de brotes a partir de yemas axilares o terminales.

La multiplicación de brotes a partir de las yemas axilares, se basa en el fenómeno de dominancia apical, el cual es el control regulador del crecimiento (Thimann y Skoog, 1934 citado por Devlin, 1976). El punto de inicio en este caso puede estar en los meristemas apicales, las yemas y los nudos debido a que estas estructuras contienen células potencialmente morfogenéticas. A partir de estas estructuras, teóricamente es posible generar un brote o estimular la formación de brotes múltiples que desarrollarán ramas que puedan separarse y enraizar. Las plantas así obtenidas pueden nuevamente ser utilizadas como fuente de explantes e iniciar la multiplicación vegetativa bajo este esquema (Krikorian, 1991). Esta microtécnica, tiene la ventaja de que cuando se quiere mantener la fidelidad genética con relación a la planta madre, la variación somaclonal es muy baja (George y Sherrington, 1984; Rodríguez-Garay, 1994).

Organogénesis *in vitro*.

La organogénesis es un proceso mediante el cual se forman primordios de órganos (raíces o brotes adventicios). En general dos vías de desarrollo se pueden discernir: 1) la organogénesis directa, en donde el primordio surge directamente del explante sin la mediación de una etapa de callo; 2) la organogénesis indirecta, en la cual el primordio surge a partir de células del callo (Sharp, 1980; Litz y Jarret, 1991; Krikorian, 1991).

Actualmente se conoce un gran número de especies en las cuales se puede fomentar la proliferación aleatoria de callos en los explantes mediante la adición de una o varias auxinas y citocininas al medio basal, en los cuales, se puede inducir la formación de brotes y raíces ajustando la relación auxinas-citocininas exógenas. Así la diferenciación hacia brotes se logra subcultivando los callos en un medio que contenga una alta

relación citocininas-auxinas, en cambio, para la diferenciación de raíces se requiere de subcultivos en medios con una relación citocininas-auxinas baja, o incluso solo de la presencia de las auxinas (Litz y Jarret, 1991; Rey y Mroginski, 1996). Sin embargo, este procedimiento no es de ninguna manera universalmente efectivo, ya que en algunos casos pese a la adición de auxinas, citocininas y otros compuestos al medio, no ha sido posible estimular la formación de un callo organogénico (Krikorian, 1991).

En la familia *Cactaceae*, la interacción de auxinas y citocininas para la regeneración de plantas *in vitro* ha sido bien documentada, se ha reportado que las citocininas exógenas siempre han sido requeridas en la proliferación de brotes, en cambio las auxinas no han sido estrictamente necesarias, así Hubstenberger *et al.* (1992), sugirieron que las cactáceas aparentemente tienen una alta capacidad para producir un exceso de auxina *in vitro*. Por lo que la mayoría de los autores han utilizado bajas concentraciones de auxinas o intentan no utilizarla (Rubluo, 1997).

Incluso, Reyes *et al.* (1995), reportaron el uso de antiauxinas en el medio de cultivo organogénico de *Aztekium ritteri*, un cactus que presenta problemas en su propagación tanto por vías convencionales como por cultivo *in vitro*. De esta manera, después de utilizar concentraciones moderadas de antiauxinas se pudieron mejorar los rangos de formación de brotes y calidad de estos, sugiriendo que la eliminación de las auxinas favoreció la micropropagación de esta especie (Reyes *et al.*, 1995).

Por otra parte, la inclusión de citocininas ha sido clave para el disparo de la organogénesis (Hubstenberger *et al.*, 1992). De esta manera, Dabekaussen *et al.*, (1991) reportaron que para la activación de las areolas en *Sulcorebutia alba*, la presencia de las citocininas fue necesaria, siendo BAP (6-benzil-adenina) la que dio los mejores resultados seguida de kinetina, pero la auxina (ANA) al ser agregada con la citocinina BAP tuvo pocos efectos sobre la activación de las aréolas, por lo que la adición de auxinas fue considerada sin importancia para su micropropagación.

Un factor de gran importancia en la micropropagación organogénica, es el explante, Murashige (1974) y Narayanuswamy (1977) describieron algunas características del

explante, que se deben de estudiar para tener éxito en la micropropagación, estas son: estado fisiológico, fenológico y sanitario de la planta madre, el tejido u órgano del que es extraído, así como el tamaño del explante. En el caso de las cactáceas, es importante considerar la presencia de aréolas, las que además de ser una de las características distintivas de la familia, son importantes porque contienen centros meristemáticos, (axilar y espinífero), también, se ha tenido éxito con brotes y tubérculos. La presencia de aréolas y tubérculos permite el obtener estos explantes de la planta madre causando un daño mínimo lo que representa una gran ventaja para aquellas especies en peligro de extinción (Hubstenberger *et al.*, 1992; Rubluo *et al.*, 1996).

Por otra parte hay que considerar que cuando se utilizan brotes como explantes, si se elimina la parte apical de éstos es muy probable que la dominancia apical se rompa o debilite y las yemas axilares pueden ser activadas para formar nuevos brotes (Vyskot y Jara 1984). Este efecto probablemente se debe a un cambio en el balance hormonal dentro de la planta que permite crecer a las yemas reprimidas (Krulik, 1980). Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) obtuvieron resultados que concuerdan con esta idea, al lograr una mayor propagación en explantes con la punta apical cortada que con aquellas que mantenían el ápice, en la regeneración de plantas de *Mammillaria haageana* y *Mammillaria san-angelensis*.

El proceso organogénico también es influido por factores ambientales, así, el fotoperíodo e intensidad luminosa son factores determinantes ya que son indispensables para el proceso fotosintético y que pueden variar con la especie. La mayoría de las cactáceas habitan en sitios con una elevada irradiación, por lo que una vez que se han obtenido las vitroplantas, antes de su trasplante a suelo, es conveniente colocarlas en sitios con un espectro luminoso lo más semejante a la luz solar, para que los cloroplastos terminen su desarrollo y sean totalmente funcionales, así, Hubstenberger *et al.* (1992), informaron de la acción benéfica del uso de niveles de irradiación elevadas ($15.0 \text{ } \mu\text{m}^{-2}$, lo común son valores alrededor de $3.0 \text{ } \mu\text{m}^{-2}$). Existen factores de gran importancia que no se han estudiado a profundidad en las cactáceas,

como el fotoperiodo, ya que este es de gran importancia para desencadenar el proceso morfogénico requiriéndose desde oscuridad continua, hasta luz continua (Lozoya, 1985; Ferradini *et al.*, 1996; Moon y Stomp, 1997).

La temperatura y la humedad, son otros factores en los que desafortunadamente no se han realizado investigaciones con relación a las características ecofisiológicas de las cactáceas, como son el presentar metabolismo ácido crasuláceo, y que pueden crecer en ambientes con condiciones extremas p.e. temperaturas de bajo cero a 50°C (Rubluo *et al.*, 1996).

JUSTIFICACIÓN

Siendo el género *Mammillaria* prácticamente restringido de México y además uno de los más diversos y numerosos dentro de la familia *Cactáceae*, el laboratorio de cultivo de tejidos del Instituto de Biología de la UNAM, ha realizado investigaciones encauzadas a generar un modelo de micropropagación que contribuya al rescate de las especies de este género que se encuentren en peligro de extinción. *Mammillaria san-angelensis* constituye un caso extremo de especies en peligro de extinción. En estudios previos ha sido posible el micropropagar esta especie por vía organogénica. Sin embargo, es necesario explorar otras vías como es la inducción a la embriogénesis somática, la cual, ofrece además de poder lograr un número eventualmente ilimitado de individuos, otras ventajas como son el poder realizar estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y morfogenéticos del proceso embriogénico en los vegetales. Entre los aspectos de interés de esta inducción se encuentra el determinar el origen unicelular o pluricelular de los embriones somáticos, debido a que esta situación tiene relevancia para una especie en extinción dada su estrecha variabilidad genética, ya que el origen unicelular conlleva a un nivel de variación somaclonal muy bajo en comparación al pluricelular, dado que en este último existe una mayor probabilidad de dar origen a quimeras (Schumann, 1995).

Por otra parte, en el laboratorio de cultivo de tejidos se han mantenido por subcultivos, vitroplantas durante 7 años. Actualmente, los subcultivos se realizan sin reguladores del crecimiento exógenos, por lo que es de interés estudiar el efecto de la auxina como disparador del proceso morfogenético, en brotes de *M. san-angelensis* que han sido micropropagadas por largos periodos. Este estudio puede ayudar a comprender los procesos modulatorios en la activación de los meristemas.

Debido a lo anteriormente dicho los objetivos del presente trabajo fueron:

OBJETIVOS

- Inducir la embriogénesis somática en *Mammillaria san-angelensis* analizando las causas que la disparan.
- Determinar el origen de los proembriones somáticos de *M. san-angelensis*.
- Describir las respuestas morfogénicas ante diferentes auxinas que se producen en brotes obtenidos de vitroplantas que han sido mantenidas *in vitro* durante 7 años.

Objetivos particulares

- Establecer los requerimientos particulares de reguladores del crecimiento, fuente de explante y medio de cultivo, para la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* en *Mammillaria san-angelensis*.
- Analizar histológica e histoquímicamente los callos embriogénicos con el fin de caracterizar las distintas etapas de la ontogenia de los embriones somáticos.
- Analizar histológicamente el desarrollo de la activación de meristemas axilares y espiníferos por la acción de auxinas exógenas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

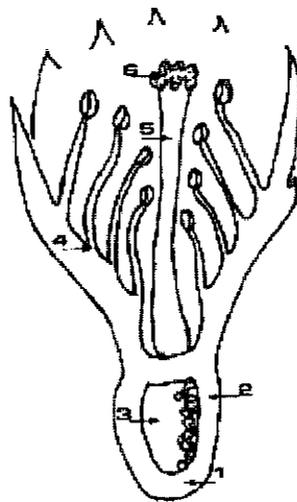
1 Inducción de la embriogénesis somática.

1.1 Material Biológico

Se trabajó con flores en etapa de anthesis (esquema 2) de plantas adultas de *Mammillaria san-angelensis*, derivadas del cultivo *in vitro* que se mantienen creciendo en el invernadero del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

Las flores se desinfectaron colocándolas en un vaso de precipitados con 50 ml de hipoclorito de sodio al 1.7% y en constante agitación durante 15 min. Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada. Posteriormente, se separó el ovario del resto de la flor, se realizó un corte longitudinal para dividir en dos al ovario quedando expuestos los óvulos y se sembraron como explantes:

- a) Ovario con sus óvulos quedando la parte del corte en contacto con el medio.
- b) Ovario sin sus óvulos, sembrándolos de igual manera que en (a).
- c) Óvulo individual.
- d) Óvulos en grupo; el contenido de óvulos de un ovario (entre 15 y 20 óvulos).



Esquema 2.- Sección longitudinal de la flor de *Mammillaria* en donde se distingue: 1, zona peduncular; 2, zona pericarpelar; 3, cavidad del ovario; 4, estambres; 5, estilo; 7, lóbulos del estigma (según Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

1.2 Desarrollo experimental de los cultivos *in vitro*.

En el inicio de este estudio se realizaron experimentos preliminares con los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y White (1963) (ver apéndices 1,2 y3), adicionando al medio los reguladores del crecimiento que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos utilizados para la inducción de embriones somáticos en *Mammillaria san-angelensis*.

| | a | b | c | d | e | f |
|-------|---|---|---|----|----|----|
| MS | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| White | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

a) Control; b) ANA (0.5 mg l^{-1}) + adenina (25 mg l^{-1}) + 10% p/v de extracto de *Opuntia* y 3 g l^{-1} de carbón activado; c) 2,4-D (2 mg l^{-1}); d) 2,4-D (4 mg l^{-1}); e) 2,4-D (8 mg l^{-1}); f) 20% de agua de coco.

A los 12 diferentes tratamientos (tabla 1), se les agregó 30 g l^{-1} de sacarosa. Los cultivos fueron incubados bajo dos condiciones de iluminación; 1) con un fotoperiodo de

16 horas luz ($14.88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 2) en completa oscuridad, ambos incubados a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, realizando subcultivos cada 3 meses, bajo las mismas condiciones de cultivo, con y sin reguladores del crecimiento.

Después del segundo subcultivo, se observó que el explante más prometedor en la embriogénesis somática formando un callo con características morfológicas parecidas a los callos embriogénicos, fue aquel en el que se usó como explante a los óvulos en grupo en el medio White, en presencia de 2,4-D y en completa oscuridad. Sin embargo, no se observaron indicios histológicos del desarrollo de embriones, por lo que se decidió seleccionar el mejor explante (los óvulos en grupo) y cultivarlos en otro medio basal, el B5M, el cual consistió de los macronutrientes del B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (ver apéndice 1); micronutrientes y compuestos orgánicos del MS (ver apéndice 2 y 3) y suplementado con L-glutamina (400 mg l^{-1}), hidrolizado de caseína (100 mg l^{-1}), L-arginina (100 mg l^{-1}), L-asparagina (100 mg l^{-1}), ácido ascórbico (100 mg l^{-1}) y sacarosa (60 g l^{-1}). A éste medio se le adicionaron los reguladores del crecimiento, 2,4-D y kinetina, con las concentraciones que se muestran en la tabla 2. A los tres meses de cultivo se subcultivaron en medio con y sin reguladores del crecimiento. En todos los medios de cultivo se ajustó el pH a 5.7 con hidróxido de potasio y ácido clorhídrico 0.5 N, el medio se gelificó con Difco Bacto agar 8 g l^{-1} y se esterilizó por autoclave a 121°C , 1.1 Kg cm^{-2} durante 15 minutos.

Tab a 2.- Tratamientos de reguladores del crecimiento en medio B5 M, para el cultivo de óvulos en grupo de flores en anthesis de *Mammillaria san-angelensis*

| Kin/2,4-D | | (mg l ⁻¹) | | | |
|-----------------------|---|-----------------------|---|---|---|
| | | 0 | 2 | 4 | 8 |
| (mg l ⁻¹) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | 2 | 5 | 6 | 7 | 8 |

1.3 Tratamiento estadístico.

El diseño experimental fue completamente al azar con dos factores (reguladores del crecimiento y medio de cultivo). Se usaron cajas petri de 100 x 15 mm, en cada una de las cuales se sembraron 5 explantes y se hicieron 5 repeticiones, por lo tanto fueron cultivados para cada tratamiento 25 explantes. Los datos registrados fueron superficie del callo producido y presencia o ausencia de los primeros estadios embriogénicos.

1.4 Análisis histológico.

Para observar las características generales de los explantes similares a los que se usaron así como los callos producidos, se fijaron en FAA (formaldehído, ácido acético glacial, etanol, agua (2:1:10:7) ovarios completos disectados durante la etapa de antriosis. Durante todo el experimento, cada mes, se tomaron muestras de los callos formados y se fijaron también en FAA; una vez fijadas, se deshidrataron en diluciones graduales de acetona (30%, 50%, 70%, 85%, 96%, con un doble cambio de acetona al 100%), el tiempo de tratamiento en cada concentración de acetona fue de 20 min. Una vez deshidratadas las muestras se incluyeron inmediatamente en la resina JB-4 (ver apéndice 5), polimerizándose a temperatura ambiente, en ausencia de oxígeno y en cápsulas de Beem. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo, con navajas de vidrio, obteniéndose cortes de $\pm 2 \mu\text{m}$ de grosor, algunos se tiñeron con azul de toluidina (ver apéndice 6), para observar las estructuras que se desarrollaron en el callo, y otros se usaron para las pruebas histiquímicas las cuales fueron:

La tinción doble de Ácido peryódico-Reactivo de Schiff (APS) + azul negro de naftol. (ver apéndice 7). Se utilizó para evidenciar los polisacáridos insolubles y las proteínas. Los polisacáridos insolubles se tiñen de rosa intenso y las proteínas de azul. Para evidenciar la presencia de fenoles, se utilizó la tinción de vainillina-ácido clorhídrico los cuales tiñen de color café-pardo (ver apéndice 8).

También se realizó la técnica de tinción diferencial con acetocarmin-azul de Evans (ver apéndice 4), mediante la cual es posible distinguir dos tipos de núcleos, uno más prominente que reacciona con el acetocarmin debido a que este tiñe a los cromosomas en mitosis y el otro núcleo más pequeño que no se encuentra en mitosis, éste se tiñe con el azul de Evans. Los callos embriogénicos se tiñen diferencialmente mostrando una zona anaranjada rojiza y otra azul, este tipo de callos es llamado por Gupta y Durzan (1987) como "masa embriogénica suspensora", también con esta técnica se pueden observar los diferentes estadios embrionales en donde el cuerpo del embrión se tiñe de rojo y las células del suspensor se tiñen de azul.

2 Respuestas morfogénicas de brotes por la acción de las auxinas.

2.1. Material Biológico

Se experimentó con plantas de *M. san-angelensis* Sánchez-Mejorada y con dos especies más del género *Mammillaria*; *M. huitzilopochtli* D. Hunt que es una especie que ya ha sido micropropagada y mantenida por subcultivos *in vitro* por largos periodos de tiempo y *M. lasiacantha* Engel, esta especie se eligió porque fue reproducida por semilla y se contaba con plantas en el invernadero. Se usaron como explantes, secciones longitudinales de brotes de 2.5 cm de largo a los cuales se les eliminó la parte apical.

Los brotes obtenidos de *M. lasiacantha* fueron a partir de plántulas que tenían 5 meses de haber germinado bajo condiciones de invernadero, debido a esta situación, fue necesaria la desinfección de este material biológico. Los brotes se lavaron con agua corriente, después se colocaron en agitación constante con agua y jabón durante 5 minutos, se enjuagaron con agua corriente y nuevamente se colocaron en agitación por 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1.7 %. Bajo condiciones asépticas se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada.

Los brotes de *M. san-angelensis* y *M. huitzilopochtli*, fueron tomados de cultivos asépticos que se han mantenido *in vitro* durante 7 y 6 años respectivamente, con subcultivos cada 6 meses en medio MS (Murashige y Skoog, 1962, ver apéndices 1,2,3), sin reguladores del crecimiento e incubados a temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo de 16 horas luz ($14.88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.2 Desarrollo experimental de los cultivos *in vitro*.

Los explantes de las tres especies ensayadas (*M. lasiacantha*, *M. huitzilopochtli*, y *M. san-angelensis*) se sembraron sobre MS, con 30 g l^{-1} de sacarosa, pH 5.7 y gelificado con 8 g l^{-1} de agar, así como en presencia de las auxinas AIA, ANA, AIB, 2,4-D y Picloram a las concentraciones (0,2, 4 y 6 mg l^{-1}). Los cultivos fueron incubados a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas luz ($14.88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.3 Tratamiento estadístico.

El diseño experimental fue completamente al azar. Se sembraron 3 explantes por frasco de cultivo con al menos 6 repeticiones, por lo que se obtuvieron 18 muestras en total. Después de tres meses, se cuantificó el peso fresco del callo producido por explante y número de brotes por explante. Para disminuir la variabilidad de la respuesta se transformó el número de brotes a logaritmo natural. Para determinar la significancia de la respuesta ($p < 0.5$) se realizó un ajuste por medio de polinomios ortogonales, además de un ANOVA y una prueba de comparación de medias LSD (Fisher).

2.4 Análisis histológico.

Para el análisis histológico, después de los primeros tres meses de cultivo, se tomaron muestras de las respuestas de los explantes de *M. san-angelensis* y se fijaron en FAA, posteriormente, se incluyeron en paraplast (ver apéndice 9), y se realizaron cortes de $10 \mu\text{m}$ de grosor y se tiñeron con safranina verde rápido (ver apéndice 10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Inducción de la embriogénesis somática

Al analizar la respuesta de los explantes de *Mammillaria san-angelensis* a los diferentes inductores de la embriogénesis somática usados en otras cactáceas con éxito, se observó que sólo bajo la influencia del 2,4-D se pudo manifestar la formación de callo, estos datos coinciden con Torres-Muñoz y Rodríguez-Garay, (1996) quienes con esta auxina tuvieron éxito en la micropropagación de *Tubinocarpus pseudomacrochele*. Además, cabe mencionar que el 2,4-D es la auxina más usada para la inducción a la embriogénesis somática (Evans *et al.*, 1981; Litz y Jarret, 1991; Carron *et al.*, 1995), esto probablemente sea debido a que el 2,4-D es una auxina muy estable permitiendo con ello una actividad intrínseca muy grande (George y Sherrington, 1984). En cambio en *M. san-angelensis* bajo las condiciones experimentadas, ni el agua de coco ni el ANA indujeron respuesta alguna en los explantes analizados. Estos resultados no coinciden con Infante (1992) ni con Stuppy y Nagl (1992) quienes respectivamente, pudieron obtener embriones de *Mediocactus coccineus* al usar como inductor al ANA, y en *Ariocarpus retusus* al adicionar agua de coco al medio de cultivo.

De los dos regímenes luminosos experimentados; con fotoperiodo y en completa oscuridad, solo bajo esta última condición se propició la proliferación de callo. En cuanto a los medios de cultivo tanto en el medio White como en el medio MS, hubo formación de callo bajo las condiciones anteriormente descritas, sin embargo, las características del callo fueron diferentes: en el medio White, el callo fue más friable y de color amarillo claro, en cambio, en el medio MS el desarrollo de callo fue menos friable y con signos de necrosis; esta pudo ser provocada por la presencia de fenoles, debido a que estos fueron detectados en el estudio histoquímico.

En los dos medios White y MS si bien todos los explantes formaron callo en presencia de 2,4-D en todas las concentraciones estudiadas y en condiciones de oscuridad, el

desarrollo de éste varió de acuerdo al origen del explante. A los tres meses de cultivo se observó; los óvulos individuales produjeron un callo amarillo cristalino el cual pronto se oxidó. Los ovarios sin sus óvulos formaron un callo amarillo oscuro que pronto se oxidó. Los ovarios con sus óvulos desarrollaron rápidamente un callo, formandose principalmente de los óvulos y participando el tejido ovárico con sólo una pequeña proporción de su tejido. Al mes cultivo se observó indicios de una oxidación del tejido ovárico no rediferenciado y a los tres meses tanto el tejido no rediferenciado como el callo formado se oxidó. Los óvulos en grupo fueron los que mejor respuesta dieron, formando un callo amarillo-ámbar, friable el cual continuo con su crecimiento.

Al realizar las observaciones histológicas en los callos formados no se observó ninguna organización que indicara la presencia de embriones, por lo que se ensayó con el medio B5 modificado (B5M). Con base en los resultados obtenidos con el medio MS y el medio White se decidió experimentar con los óvulos en grupo, en completa oscuridad y en presencia de varias combinaciones de 2,4-D y kinetina (tabla 2). Bajo estas condiciones, cuando los óvulos en grupo estuvieron expuestos a las diferentes combinaciones de 2,4-D y kinetina, pudieron desarrollar al mes de cultivo un callo friable, viscoso y de color amarillo-ambar.

Por otra parte, cuando los explantes fueron sembrados en el medio sin reguladores del crecimiento exógenos o con la sola presencia de kinetina, no hubo en ningún caso formación de callo, no obstante, estos explantes presentaron diferencias, ya que los óvulos sin reguladores del crecimiento exógenos sufrieron oxidación, en cambio en presencia de la kinetina aunque no hubo una formación de callo no se observó la oxidación del explante. Este posible efecto antioxidante de la kinetina coincide con Kurz (1986) (citado por Preece y Compton, 1991) quien reportó el efecto antioxidante de la kinetina en las yemas de árboles adultos de *Pseudotsuga menziesii*.

En la figura 1 se pueden observar dos óvulos que se encontraron en el ovario de flores en etapa de antesis, y que fueron semejantes a los explantes usados en esta investigación. Los óvulos presentaron: un funículo largo mediante el cual se unen a la

pared del ovario, tegumentos, la nucela y el saco embrionario (figura 2). Cuando se analizaron los cortes de callos producidos a partir de óvulos en grupo, se observó que el callo se formó fundamentalmente a partir de los tegumentos (figura 3). La formación de este callo embriogénico coincide con lo reportado por Tisserat *et al* (1979) y Michaux-Ferrière *et al.*, (1992) quienes citan que los tegumentos pueden dar origen a embriones somáticos, esto indica que al menos para *M. san-angelensis*, los óvulos son buenos candidatos para ser usados como explantes. Cabe hacer notar, la posibilidad de que la nucela y el funículo hayan intervenido en la formación del callo, sin embargo hasta donde se pudo observar, sólo los tegumentos participaron.

En la formación del callo, las células parenquimáticas de los tegumentos comenzaron a desorganizarse aumentando su volumen y haciendo más laxa la unión entre ellas. La proliferación de las células tipo callo (células parenquimatosas de formas irregulares, núcleos no aparentes, algunas de ellas de gran tamaño y con espacios intercelulares) ocasionó que la epidermis de los tegumentos perdieran su continuidad (figura 3). Posteriormente, el callo proliferó haciéndose independiente del explante. Estos datos coinciden con los reportados por Profumo *et al.* (1986) quienes reportaron una situación similar cuando utilizaron hojas de *Aesculus hippocastanum* L. como explantes, en donde el callo al proliferar rompió la epidermis de la hoja haciéndose independiente del explante.

Para observar la formación del callo, se requirió exponer los explantes al medio de cultivo de 20 a 30 días, esta respuesta, puede ser explicada por las observaciones realizadas por Carron *et al.*, (1995) quienes encontraron que cuando se expusieron al medio de cultivo explantes de *Hevea brasiliensis*, presentaron también un periodo de latencia antes de que las primeras divisiones celulares se pudieran observar. Esa latencia se atribuye a una diferencia en el potencial hídrico entre el medio de cultivo y el explante, por lo que este último requirió de varios días para establecerlo, una vez superado el estado de latencia el explante entró a una fase de alta actividad formando el callo, esta respuesta fue similar a la encontrada en el presente estudio.

Al realizar la técnica de tinción diferencial con acetocarmín-azul de Evans para evidenciar la embriogénesis, se encontró que el callo producido a los dos meses de cultivo, sólo bajo la relación 4 mg l^{-1} de 2,4-D y 2 mg l^{-1} de kinetina, se tuvo indicios de una embriogénesis somática, estos callos mostraron diferencias en tinción y en sus características histológicas. El callo mostró una zona con células que se tiñeron de color anaranjado-rojizo y otra zona formada por células más grandes y vacuoladas que se tiñeron de azul (figura 4). La apariencia de este tipo de callo es llamada por Gupta y Durzan (1987) como "embryonal-suspensor mass" (masa embriogénica-suspensora). Al realizar las suspensiones celulares en este callo, fue posible observar las etapas tempranas del desarrollo del embrión, en el cual se distinguieron dos regiones, una intensamente teñida con 2-4 células con núcleo prominente, que correspondió al cuerpo del embrión (Ce) (figura 5). Estas células se tiñeron con acetocarmín indicando con ello una alta actividad mitótica, y la otra unicelular la cual se tiñó de azul, esta fue altamente vacuolada y correspondió al suspensor (S). En el mismo callo se observaron estructuras embrionales con un mayor crecimiento mostrando una zona densamente teñida que podría corresponder al cuerpo del embrión y grupos celulares muy poco teñidos que correspondieron a células suspensoras (figura 6). Estos resultados reflejan un origen unicelular de los proembriones de *M. san-angelensis*, similar al cigótico de las angiospermas en donde la célula cigótica se divide para formar una célula apical y una célula basal. La célula apical es densa y con una intensa actividad de síntesis de ADN, detectable por medio de compuestos como el acetocarmín y el naranja de acridina, que tiñen el material genético. Según West y Harada, (1993) y Rodríguez-Garay *et al.*, (1996) ésta célula apical es la que a través de divisiones ordenadas dará lugar al cuerpo del embrión que finalmente se convertirá en una planta. Otro aporte más que apoya los resultados obtenidos es el realizado por Kawahara y Komamine (1995), quienes reportaron que en los primeros días de cultivo en células de zanahoria, la síntesis de DNA ocurrió al azar, sin embargo, cuando se empezaron a formar grupos de células conformando un estado preglobular se detectó una polaridad en la síntesis de DNA, ya que en el cuerpo embrional ocurrió una alta actividad mientras que en el suspensor no se manifestó.

También fue posible visualizar en el mismo tipo de callo, grupos de células (tri y tetracelulares) formados por divisiones periclinales (figura 7). Este tipo de conjuntos celulares es considerado por Profumo *et al.* (1986) como indicadores de un callo embriogénico, debido a que estos autores, en su trabajo con *Aesculus hippocastanum* encontraron en el callo producido varios tipos celulares y cuando vieron grupos similares a los que se muestran en la figura 7, se desarrollaron embriones, por lo que los autores llamaron a estas células "células E1 precursoras del callo embriogénico". Esta observación también ha sido reportada por Williams y Maheswaran (1986); Michaux-Ferrière *et al.* (1992) y Schumann (1995). En la figura 8 se puede observar una estructura más compleja, que se asemeja a los primeros estadios proembrionales cigóticos de las angiospermas (West y Harada, 1993) la cual presentó divisiones periclinales y anticlinales, en ella se puede apreciar un cierto grado de polaridad, con dos zonas diferentes; una zona correspondiendo al embrión y otra constituyendo al suspensor. *In vivo* en las cactáceas, se ha observado la formación de embriones somáticos con un buen desarrollo del suspensor como en *Opuntia ficus-indica* (Vélez-Gutiérrez y Rodríguez-Garay, 1996) y en *Mammillaria tenuis* (Tiagi, 1956). El haberse desarrollado un suspensor en los cultivos de *M. san-angelensis* es importante, ya que de acuerdo con Yeung y Meinke (1993) el suspensor tiene un papel en la síntesis de reguladores del crecimiento además del transporte de nutrientes necesarios para el embrión. Por otra parte, los proembriones desarrollados mostraron una polaridad en su formación, la cual es un principio básico en el proceso de la embriogénesis (Zimmerman, 1993; West y Harada, 1993). Similares resultados han sido informados por Schumann *et al.* (1995) en el análisis anatómico de embriogénesis somática en cereales.

En la figura 9 es posible observar cerca de la periferia del callo (de tres meses de cultivo) conjuntos multicelulares, con células de núcleos prominentes, formando zonas meristemáticas con división activa celular. La figura 10 muestra una mayor diferenciación que puede corresponder a un embrión globular, ya que en él es posible ver células pequeñas con núcleos grandes, cuyo citoplasma se tiñó intensamente, así como, células procambiales y capas celulares periféricas que delimitan lo claramente.

Con la prueba histoquímica de APS y azul negro de naftol, el citoplasma del cuerpo de estos proembriones se tiñó de color azul, indicando un alto contenido proteico, y las células de las capas periféricas se tiñeron de rosa intenso indicando la presencia de polisacáridos insolubles. Las características histológicas e histoquímicas de estas estructuras se asemejan a las reportadas por Carron *et al.* (1995) quien describe el origen multicelular de los embriones como sigue: "El origen multicelular comienza a partir de sitios definidos constituidos por células parenquimatosas que progresivamente adquieren características embriogénicas expresadas por una intensa actividad metabólica, células con citoplasma denso y núcleo prominente altamente teñible. Estos sitios continúan su desarrollo formando un embrión globular, el cual está siempre delimitado por dos o tres capas de células ricas en almidón; posteriormente éstas son sustituidas por células epidermales comenzando también la formación del procambium".

Por las características de las estructuras descritas en la figura 10, (un alto contenido de proteínas en su citoplasma y el desarrollo del procambium) puede suponerse que son embriones globulares, sin embargo, para considerarlos como tales deben presentar además una protodermis (DeJong *et al.*, 1992; Kawahara y Komamine, 1995; West y Harada, 1993). Por tal motivo se decidió llamar a estas estructuras proembriones globulares. Probablemente las capas periféricas podrían dar origen al protodermo, no obstante, las células que formaron estas capas se observaron muy dañadas. Al realizar la técnica de vainillina para la detección de fenoles, ésta resultó positiva en el citoplasma de éstas células, por lo que puede adjudicarse que la presencia de estos compuestos sea causante del daño celular impidiendo los subsecuentes estadios embriogénicos. Similares resultados fueron reportados por Michaux-Ferriere *et al.* (1992) y por DeJong *et al.* (1992). DeJong *et al.* (1992) encontraron que embriones globulares mutantes de zanahoria, formaron un protodermo aberrante cuyas células presentaron fenoles oxidando al embrión. Ellos pudieron aislar una glicoproteína de 35 kD secretada por embriones no mutados. Cuando se adicionó esta glicoproteína al medio de cultivo de los embriones mutados, provocaron que en los nuevos embriones formados no se presentara una oxidación, más aún se desarrolló una epidermis bien

formada y posteriormente se obtuvieron los subsecuentes estadios embriogénicos. Posiblemente el haber obtenido proembriones globulares con características semejantes a las de DeJong *et al.* (1992), pudieran indicar una falta de síntesis de alguna o algunas proteínas, por lo que es de interés realizar un protocolo de investigación que contemple este aspecto.

El origen de los proembriones globulares de *M. san-angelensis* tuvo dos caminos, uno unicelular (figuras 5,6,8) y otro pluricelular (figuras 9,10). El origen unicelular se observó tanto a partir de células aisladas (figura 5) como de grupos celulares (figura 8) en ambos casos se observó una clara polaridad en los proembriones. Los proembriones formados a partir de grupos celulares siguieron unidos a éste, mediante las células del suspensor (figura 8). Estos datos coinciden con lo señalado por Sharp (1980) quien dice que los embriones somáticos quedan unidos a los grupos celulares que les dieron origen, y que ésta unión continua aún, cuando el embrión ha finalizado su formación por medio de la raíz embrional.

En la formación de proembriones a partir de un centro meristemático, llamado también complejo celular proembrional (Trigiano *et al.*, 1989) fue posible apreciar núcleos altamente teñidos indicando un intenso metabolismo, marcadamente meristemático, análogo a las células embriogénicas cigóticas (figuras 9, 10). Estas observaciones están de acuerdo con lo reportado por Michaux-Ferrière *et al.* (1992). En este origen no se pudo ver una polaridad bien definida. Esta situación puede tener consecuencias anatómicas, ya que en el origen unicelular la bipolaridad se establece desde la primera división celular, en cambio en el pluricelular es posible que se formen anomalías en el embrión asociadas a la falta de polaridad desde la formación del complejo celular proembrional, trayendo consigo que los embriones formados puedan carecer de uno de sus meristemas o bien se obtengan embriones múltiples unidos entre sí (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992; Shumann *et al.*, 1995). Por otra parte, el que los embriones tengan un origen unicelular tiene implicaciones importantes ya que al provenir de una sola célula se mantiene la identidad genética o bien si esta célula sufre una mutación o una transformación genética, la planta completa tendrá dicha modificación. En cambio el

origen multicelular tiene una mayor probabilidad de producir embriones quiméricos con lo cual la identidad genética no puede ser asegurada (Schumann *et al.*, 1995) por lo que el obtener un procedimiento para la inducción de la embriogénesis por las dos vías, puede permitir realizar investigaciones que favorezcan la expresión de uno u otro origen de acuerdo a los objetivos que se persigan, como se ha realizado en *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferriere *et al.*, 1992).

En reportes recientes se discute el origen de los embriones somáticos (Haccius, 1978; Michaux-Ferriere *et al.*, 1992; Schumann *et al.*, 1995). Ambos conceptos han sido respaldados por evidencias histológicas. Por otro lado, el que se manifieste uno u otro origen parece estar influido por el medio de cultivo (Shwendiman *et al.*, 1988; Michaux-Ferriere *et al.*, 1992). El haber obtenido en este trabajo dos rutas embriogénicas abre caminos para el análisis del origen de los embriones somáticos y su posterior desarrollo que permitirán un mayor entendimiento en el proceso embriogénico en los óvulos en grupo de *Mammillaria san-angelensis*.

Para que el callo embriogénico de *M. san-angelensis* formara proembriones globulares necesitaron estar expuestos al medio de inducción (con auxinas) durante tres meses. Ha sido ampliamente reportado que los requerimientos en las concentraciones y el tiempo de exposición a la auxina exógena varía con la especie (Zimmerman, 1993). Así explantes de *Agave victoria-reginae* necesitaron de 6 semanas de incubación en el medio inductor antes de transferirlos a un medio sin reguladores del crecimiento exógenos (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996), y en *Turbinicarpus pseudomacrolele* requirió de 4 semanas en el medio inductor (Torres-Muñoz y Rodríguez-Garay, 1996), en cambio en dos reportes de *Ariocarpus retusus* se mantuvieron los cultivos en el medio inductor durante 12 meses (Stuppy y Nagl, 1992; Olguin, 1994).

Por otra parte, cabe hacer notar que al haber obtenido indicios de los primeros estadios embriogénicos, podemos decir que aunque la auxina (2,4-D), influyó de manera determinante en la formación de callo, fue necesaria la adición de kinetina para lograr tal desarrollo. Estos resultados son coincidentes con los de Kumlehn y Nitzsche (1995)

quienes reportaron respuestas similares con estos dos reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro* de óvulos de *Lolium multiflorum* Lam. La presencia de las citocininas en el medio no siempre es necesaria para disparar el proceso embriogénico (Litz y Jarret, 1991), probablemente en *M. san-angelensis* el contenido endogeno de estos reguladores del crecimiento, no fue suficiente para disparar el proceso morfogénico.

Para la inducción de la embriogénesis somática el medio nutritivo también influyó de manera determinante, ya que solo en el medio B5M fue posible inducir la embriogénesis. De los constituyentes de este medio, hay que destacar, la presencia del hidrolizado de caseína, la L-asparagina, la L-arginina, la L-glutamina y la elevada concentración de sacarosa 6%

La adición al medio de cultivo de compuestos orgánicos nitrogenados tuvo un efecto positivo en la expresión embriogénica, este hecho ha sido reportado para un elevado número de plantas (Shetty y Asano, 1991), una de las explicaciones de esta respuesta es: debida a que la fuente natural de nitrógeno en los embriones *in vivo*, son los aminoácidos, como la glutamina, alanina, metionina, teorina, valina, leucina, prolina, tirosina, fenilalanina, histidina, lisina y arginina, así como la amida asparagina (Murray, 1988). Estos aminoácidos y otros más se encuentran en el hidrolizado de caseína por lo que aunque no se conoce con precisión su composición es conveniente él adiccionarla sobre todo en estudios iniciales sobre embriogénesis (Krikorian, 1991).

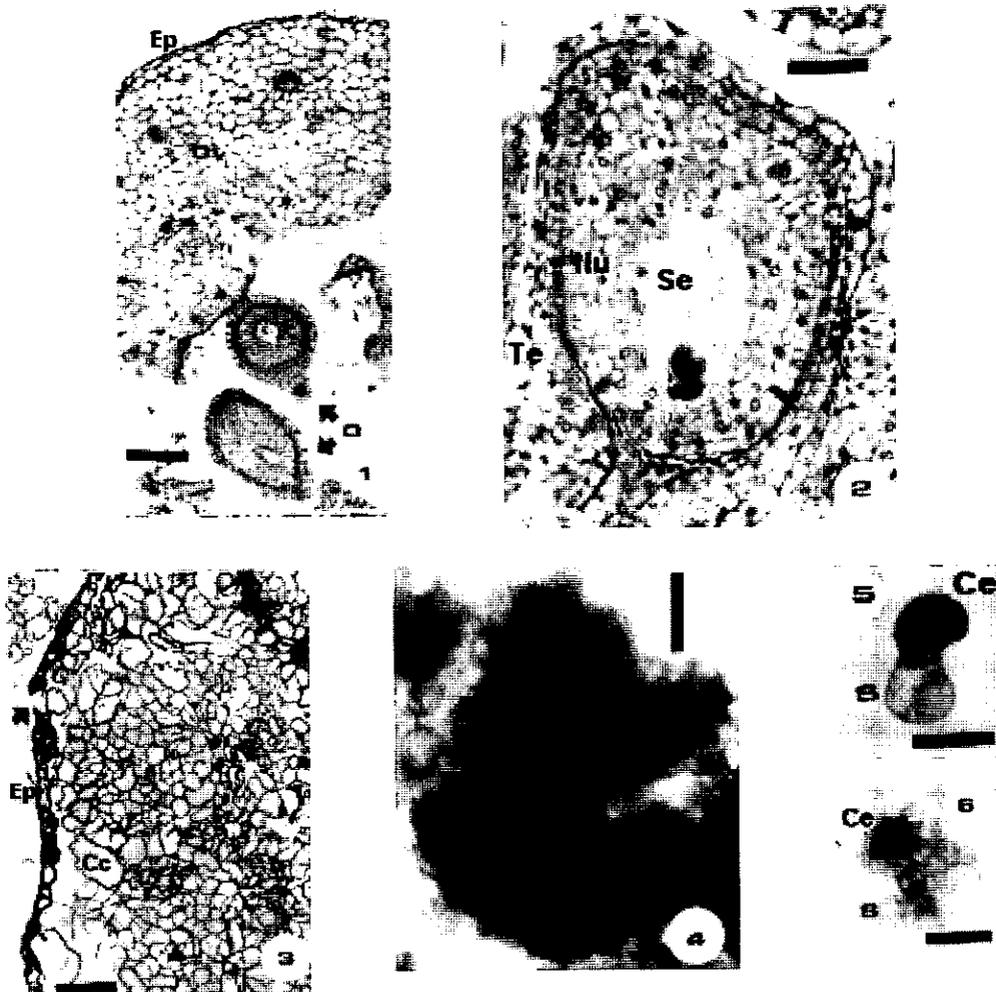
El callo que se desarrolló en este medio con 4 mg l^{-1} de 2,4-D y 2 mg l^{-1} de kinetina fue amarillo friable y viscoso similar al reportado por Carron *et al.* (1995). Estos autores concluyen que en *Hevea brasiliensis*, los altos niveles de sacarosa (12 %) tuvieron un efecto en las características del callo ya que al incrementar la concentración de esta, el callo adquirió una apariencia viscosa y en su matriz se presentaron células embriogénicas y embriones globulares, lo cual es una situación similar a la reportada en presente estudio. Por otra parte se ha observado que las altas concentraciones de sacarosa estimulan la acumulación de almidón en las células embriogénicas (Carron *et al.* 1995). Otro aporte más del efecto benéfico de la sacarosa, es el observado en el

proceso embriogénico de *Medicago sativa* en el cual el incremento de sacarosa se reflejó en un aumento en el vigor y en la conversión de las células callo a células embriogénicas (Anandarajah y McKersie, 1990)

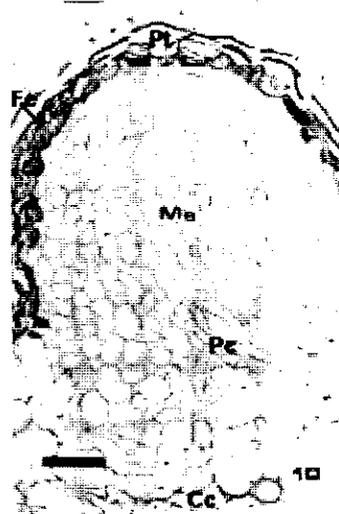
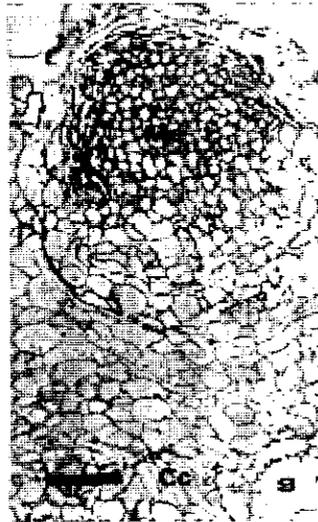
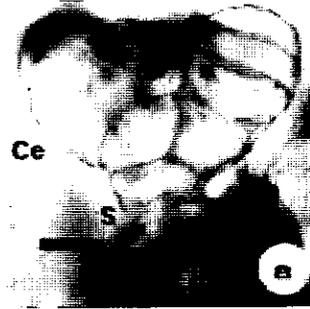
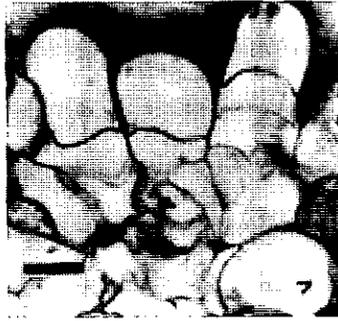
Por otra parte es posible que al utilizar una concentración de sacarosa (6%) superior a la comunmente usada (2 %), así como la adición de glutamina (400 mg l⁻¹) al medio de cultivo hayan favorecido la expresión hacia la embriogénesis en *M. san-angelensis*. Esta hipótesis se basa en el hecho de que Lai *et al.* (1992) discute que la sacarosa tiene un efecto aditivo con la glutamina, en el incremento de reservas alimenticias, pues la glutamina en el medio de cultivo juega un papel en la estimulación para la síntesis de proteínas. Además, la glutamina en el medio de cultivo ha dado evidencias de tener un papel importante en la regulación genética para la síntesis de las reservas proteicas del embrión de zanahoria (Higashi *et al.*, 1996). Para determinar si estos dos constituyentes del medio B5M tuvieron un efecto en los aspectos anteriormente expuestos, es recomendable el realizar en un futuro próximo, una investigación que contemple cada uno de los aminoácidos de manera aislada y combinándolos bajo un diseño experimental, así también para la sacarosa, en donde se analizarían otras concentraciones para determinar su efecto así como su óptima respuesta en la embriogénesis de *M. san-angelensis*.

Es ampliamente reportado, que el paso de un medio de cultivo con auxinas a otro que carece de ellas puede ser crucial, ya que se ha demostrado que la presencia de auxina exógena permite la inducción y el desarrollo hasta estados globulares, sin embargo si éstas continúan presentes pueden disminuir e incluso inhibir el desarrollo a estados más avanzados (Sharp, 1980; George y Sherrington, 1984; Litz y Jarret, 1991; Zimmerman, 1993; Kawahara y Komamine, 1995). Los callos embriogénicos de *M. san-angelensis*, fueron subcultivados tanto en presencia de auxinas como sin ellas, en ambos subcultivos no se desarrollaron etapas más avanzadas de la embriogénesis. El detenerse el proceso embriogénico en estado globular, aún sin la presencia de fenoles en los embriones, es una situación probable en el cultivo *in vitro* de tal manera que Tisserat *et al* (1979) agrupan el proceso embriogénico en, completo e incompleto. La

embriogénesis incompleta implica que el desarrollo se detiene durante los primeros estados embriogénicos, generalmente en el globular. Esta última situación se ha visto asociada a la presencia y concentración de la auxina exógena en los subcultivos, en donde ésta puede disminuir o incluso inhibir el número de embriones formados hasta el estado de torpedo (Sharp, 1980; Zimmerman, 1993). Esta inhibición es debida a que a partir del estado globular, el cual tiene una simetría radial, las auxinas endógenas empiezan a distribuirse en sitios específicos presentando un gradiente polar para promover un crecimiento desigual dando por resultado el estado de corazón y posteriormente al de torpedo (Kawahara y Komamine, 1995). En la presente investigación no es posible asegurar que la auxina haya sido la causante de inhibir los de estados más avanzados ya que cuando se realizaron subcultivos sin la auxina, no se formaron etapas más avanzadas, es más el callo paró su crecimiento y sé necrosó finalmente.



Figuras 1-6. Figs.1-2 Cortes histológicos que muestran los óvulos y ovario utilizados como explantes. 1. Sección transversal del ovario, escala = 250 μ m; 2. Sección longitudinal del óvulo, escala = 70 μ m. Fig. 3. Origen del callo embriogénico a partir de los tegumentos, escala = 60 μ m (un mes de cultivo). Figs. 4-6. Primeros estadios de la embriogénesis somática en *M. san-angelensis*. 4. Callo embriogénico (2 meses de cultivo), escala = 0.15 mm; 5. Células densamente teñidas con acetocarmín, éstas son las células iniciales de la cabeza embrional. La célula clara altamente vacuolada es la célula inicial del suspensor, escala = 40 μ m. 6. Estructura embrional con una zona densamente teñida que podría corresponder al cuerpo del embrión y grupos celulares muy poco teñidos que corresponden a células suspensoras, escala = 40 μ m. Cc, células parenquimatosas tipo callo; Ce, cuerpo del embrión; Ep, epidermis; Nu, nuclea; O, óvulos; Ov, ovario; S, suspensor; Se, saco embrionario; Te, tegumentos.



Figuras 7-10. Desarrollo de proembriones. Figs. 7-8 Origen unicelular. 7. Células parenquimatosas con divisiones transversales creciendo en la superficie del callo (dos meses de cultivo) escala = 15 μm ; 8. Proembrión creciendo sobre el callo (dos meses de cultivo), mostrando divisiones transversales y tangenciales, escala = 20 μm . Figs. 9-10 Origen multicelular (tres meses de cultivo). 9. Zona meristemática diferenciándose a partir del callo, escala = 60 μm ; 10. Proembrión globular en el cual se observan capas periféricas que lo delimitan, éstas pueden corresponder al protodermo, escala = 50 μm . Cc células parenquimatosas tipo callo; Ce, cuerpo del embrión; Fe, fenoles; Me, células meristemáticas; Pc, procambium; Pt, posible protodermis; S, suspensor.

RESULTADOS Y DISCUSION

II Respuestas morfogénicas de brotes por la acción de las auxinas.

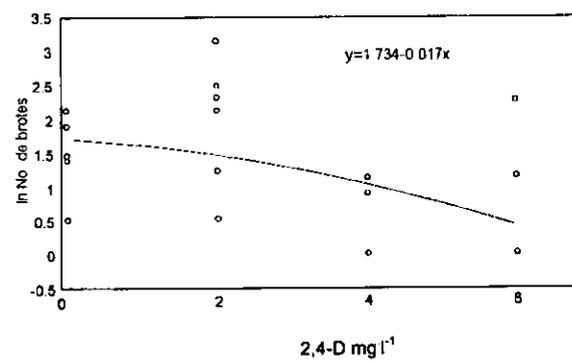
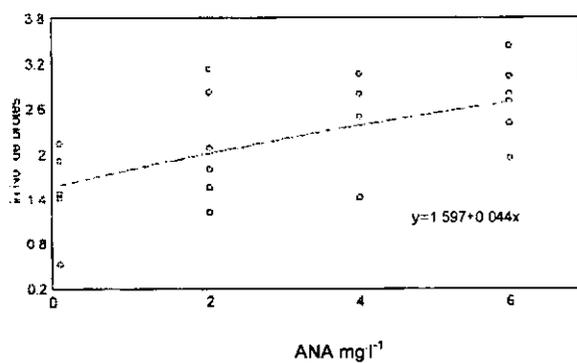
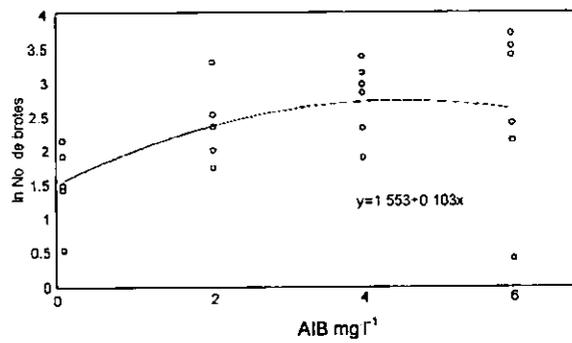
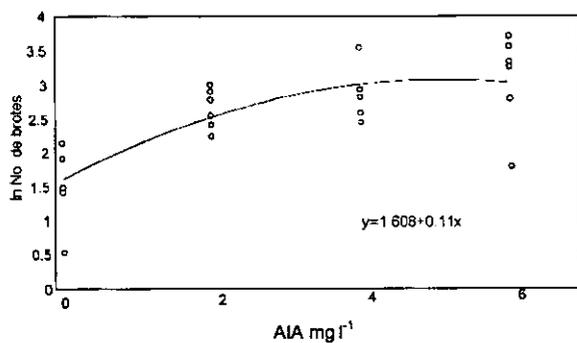
Las secciones de brotes usadas como explantes de las tres especies de mamilarias estudiadas, cuando fueron expuestas a las auxinas, dos de ellas (*M. lasiacantha*, y *M. huitzilopochtli*), tuvieron un buen desarrollo de callo, el cual fue friable y verde, sin embargo no se observó formación de brotes en ninguna de las concentraciones de las auxinas probadas (AIA, AIB, ANA, 2,4-D y picloram). Este efecto de las auxinas en la proliferación de callo ha sido ampliamente demostrado en el cultivo de tejidos vegetales (George y Sherrington, 1984) y en las cactáceas (Johnson y Emino, 1979).

En los explantes de *M. san-angelensis*, las respuestas morfogénicas, fueron diferentes, porque la exposición de los explantes a las auxinas; además de provocar la formación un callo también indujo la organogénesis indirecta así como la activación de los meristemos preexistentes. Por otra parte, en el control se produjo un callo verde y friable, también organogénico, en donde se observó el crecimiento de brotes y raíces (figura 11).

Al peso fresco del callo producido por los explantes de *M. san-angelensis* tanto en el control como en presencia de AIA, ANA, AIB, 2,4-D y picloram (tabla 4), se le aplicó el análisis de varianza el cual no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos. Resultados similares han sido reportados por otros autores (George, 1993).

La formación de brotes se observó en todos los tratamientos, sin embargo, en presencia de picloram la mayoría de los explantes sembrados tuvieron una respuesta pobre en la dosis más baja (2 mg l^{-1}) y prácticamente nula en 4 y 6 mg l^{-1} (datos no presentados), por lo que al parecer, esta auxina fue inhibitoria a las concentraciones usadas. Para las otras auxinas (AIA, ANA, IBA y 2,4-D), el análisis estadístico mostró que el mejor ajuste correspondió a la componente lineal la cual fue significativa ($p <$

0.05); no obstante, como se puede observar en las gráficas 1 y 2, tanto el AIA como el AIB presentaron una tendencia cuadrática aunque no significativa ($p > 0.05$), haciendo posible visualizar que el AIA a una concentración de 5 mg l^{-1} y el IBA a 4 mg l^{-1} generaron las mejores respuestas. En cambio el ANA y el 2,4-D no presentaron ninguna aproximación a un ajuste cuadrático (gráficas 3 y 4) por lo que no se puede establecer un óptimo, además el 2,4-D fue el único que tuvo una componente lineal inversa (gráfica 4), mostrando con ello que hubo una respuesta dependiente de la dosis, siendo directamente proporcional para AIA y ANA e inversamente proporcional para 2,4-D. En el caso de AIB la tendencia cuadrática fue más acusada y no se observó un efecto tan marcado como en los otros reguladores del crecimiento (gráficas 1-4). Estos resultados se reflejan al efectuar el análisis de comparación de medias LSD de Fisher en donde se encontró que sólo el AIB no resultó significativo ($p > 0.05$) en ninguna de las concentraciones utilizadas en tanto que en AIA, ANA y 2,4-D sí se observaron. Al analizar el efecto del AIA se observó que el control con un promedio de 1.57, resultó ser diferente a la presencia de AIA en todas las concentraciones ($p < 0.05$), sin embargo entre ellas resultaron ser iguales, con promedios de 2.62, 2.81 y 2.9 respectivamente (tabla 3). En presencia de ANA solo se obtuvieron diferencias entre el control y 6 mg l^{-1} , no obstante, las demás concentraciones no resultaron diferentes estadísticamente ($p > 0.05$) (tabla 3). Para el 2,4-D, su control y la concentración más baja (2 mg l^{-1}) mostraron diferencias entre éstas y las concentraciones 4 y 6 mg l^{-1} ($p < 0.05$), con un promedio de 1.57 para el control, 1.97 para 2 mg l^{-1} y 0.53, 0.57 para 4 y 6 mg l^{-1} respectivamente (tabla 3).



Gráficas 1- 4.- Ajuste por medio de polinomios ortogonales ($p < 0.05$) de la respuesta de brotes inducidos en explantes de *Mammillaria san-angelensis* cultivados sobre MS con AIA (1); AIB (2); ANA (3) y 2,4-D (4)

Tabla.3. Prueba de comparación de medias LSD (Fisher), del ln de brotes inducidos con AIA, ANA y 2,4-D a partir explantes de brotes¹ *Mammillaria san-angelensis* en MS incubados durante 3 meses a 27°C ± 2°C y 14.88 μmol m⁻² s⁻¹ 16 h luz.

| AUXINAS | Concentración | | Promedio de brotes(ln) por explante ² |
|---------|--------------------|-------|--|
| | mg l ⁻¹ | μM | |
| AIA | 2 | 11.41 | 2.62 b |
| AIA | 4 | 22.83 | 2.81 b |
| AIA | 6 | 34.25 | 2.98 b |
| Control | --- | | 1.57 a |
| ANA | 2 | 10.74 | 2.12 a |
| ANA | 4 | 21.48 | 2.3 a |
| ANA | 6 | 32.22 | 2.72 b |
| Control | --- | | 1.57 a |
| 2,4-D | 2 | 9.05 | 1.97 b |
| 2,4-D | 4 | 18.09 | 0.53 a |
| 2,4-D | 6 | 27.14 | 0.57 a |
| Control | --- | | 1.57 b |

¹Número de explantes cultivados: 18 por tratamiento

²Los valores seguidos por diferentes letras, difieren significativamente (p<0.05) de acuerdo a la prueba de comparación de medias LSD (Fisher). Las comparaciones son entre cada regulador del crecimiento.

La inducción de raíces se observó tanto en el control como en presencia de las auxinas AIA, AIB y ANA, aproximadamente en las mismas proporciones, por lo que no se puede afirmar que el desarrollo de las raíces se origine por la presencia de estos reguladores del crecimiento exógenos, por otra parte, el picloram y la concentración más alta de 2,4-D (6 mg l⁻¹), no promovieron la formación de raíces (Tabla 4). La inducción de raíces por la acción de las auxinas en los cactus ha sido bien documentada (Clayton *et al.* 1990), sin embargo, en el presente trabajo hubo un porcentaje similar de raíces tanto en el control como en presencia de auxinas exógenas, por lo que su inducción

pudo deberse a las auxinas endógenas del explante, situación que se ha reportado para varias especies (Hubstenberger *et al.*, 1992; Rubluo *et al.*, 1997).

Tabla 4. Respuesta en la formación de raíces y callo en 18 explantes de *Mammillaria san-angelensis* expuestos a cinco auxinas en MS incubados durante 3 meses a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $14.88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 16 h luz.

| AUXINAS | Concentración | | Número de brotes que formaron raíces | (% de enraizamiento | χ del peso fresco (g) del callo |
|----------|--------------------|---------------|--|------------------------|---|
| | mg l ⁻¹ | μM | | | |
| AIA | 2 | 11.41 | 15 | 83 | 2.99 |
| AIA | 4 | 22.83 | 14 | 77 | 2.14 |
| AIA | 6 | 34.25 | 10 | 55 | 4.44 |
| ANA | 2 | 10.74 | 11 | 61 | 4.16 |
| ANA | 4 | 21.48 | 9 | 50 | 2.90 |
| ANA | 6 | 32.22 | 11 | 61 | 2.45 |
| AIB | 2 | 9.84 | 13 | 72 | 2.51 |
| AIB | 4 | 19.68 | 14 | 77 | 3.04 |
| AIB | 6 | 29.52 | 14 | 77 | 3.53 |
| 2,4-D | 2 | 9.05 | 3 | 16 | 3.25 |
| 2,4-D | 4 | 18.09 | 4 | 22 | 1.08 |
| 2,4-D | 6 | 27.14 | 0 | 0 | 2.27 |
| Picloram | 2 | 8.28 | 0 | 0 | 2.81 |
| Picloram | 4 | 16.56 | 0 | 0 | 2.85 |
| Picloram | 6 | 28.84 | 0 | 0 | 2.44 |
| Control | - | | 13 | 72 | 2.08 |

En el presente trabajo se pudo observar que los brotes se originaron por tres vías diferentes a partir del explante original: Formación de *novo*, y la activación de las dos aréolas, la espinífera y la axilar. La formación de *novo*, se observó mediante un microscopio estereoscópico, las características de los callos, fueron desmenuzables y verdes, con una apariencia nodular debido a la gran cantidad de protuberancias verdes formadas. A medida que estas crecían, se transformaron en brotes con pequeñas espinas, estos datos concuerdan con lo reportado por Duval (1995).

Con relación a la activación de las aréolas en los explantes de *Mammillaria san-angelensis* se pudo observar el clásico dimorfismo areolar del género distinguiéndose

las aréolas espiníferas y las aréolas florales, también llamadas axilares (Boke, 1958; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978), localizándose la espinífera en el ápice del tubérculo y la floral en la axila del mismo (figura 13). En este estudio se pudo ver el efecto de la activación de estos meristemas por la influencia de las auxinas. En la figura 13, se distingue claramente el meristemo axilar entre dos tubérculos, sobre la parte superior de uno de éstos tubérculos se distingue el meristemo espinífero, en el cual se observa una activa división de las células que lo conforman (figura 14), seguida por la formación de una pequeña planta con tubérculos, aréolas, parénquima y sistema vascular bien desarrollado (figura 15).

El meristemo axilar también fue inducido a la formación de nuevos brotes; en la figura 16, se observa la activación del meristemo axilar formando una pequeña protuberancia en la axila de uno de los tubérculos. La figura 17 muestra en los flancos de la protuberancia, la presencia de dos zonas diferenciadas, las cuales probablemente darán origen a la formación de nuevos tubérculos. Finalmente, en la figura 18, crece una estructura parecida a un brote al lado de uno de los dos tubérculos.

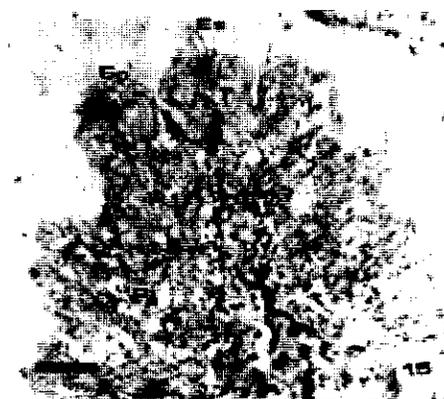
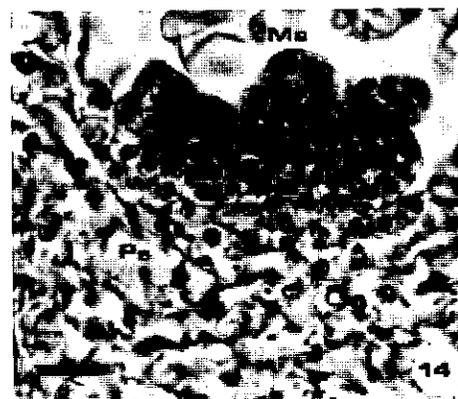
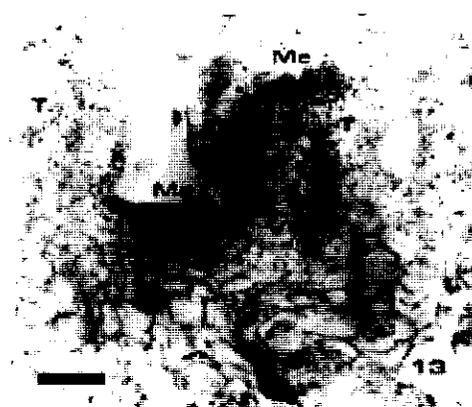
El haber obtenido una inducción hacia la formación de nuevos brotes bajo la influencia de las auxinas fue una respuesta inesperada debido al siguiente principio: La regulación del crecimiento de las plantas y su desarrollo, incluyendo la regeneración de plantas a partir de células aisladas y tejidos, está dada por el control hormonal. Dos clases de reguladores del crecimiento (auxinas y citocininas), son cruciales para la estimulación de la división celular y diferenciación de tejidos cultivados *in vitro* (Kaminek, 1992). La interacción de estos dos reguladores del crecimiento en el cultivo de tejidos es de crucial importancia. Mientras una alta concentración de auxina con relación a la citocinina induce la formación de raíces, una relación inversa favorece la formación de brotes (Skoog y Miller, 1957, citado por Kaminek, 1992). Más aún, Reynolds (1989) en un estudio realizado con segmentos de tallo de *Solanum carolinense*, encontró que cuando estos explantes fueron cultivados en medios con benciladenina (una citocinina) como única fuente de fitorregulador exógeno, se propició la formación de brotes, en cambio cuando se cultivaron explantes en presencia del 2,4-

D (una auxina) se formó exclusivamente callo. Al analizar los perfiles de las proteínas y RNAm en ambos cultivos se observaron diferencias cuantitativas y cualitativas ya que en los cultivos organogénicos se encontraron nuevos RNAm que no estuvieron presentes en los cultivos no organogénicos, además se incrementó la acumulación de algunas proteínas o bien se sintetizaron nuevas proteínas que estuvieron ausentes en los cultivos no organogénicos (Reynolds, 1989). En los reportes previos en las cactáceas se ha constatado éste principio en donde ha sido necesaria las citocininas exógenas para la formación de nuevos brotes en cambio las auxinas no han sido estrictamente necesarias. (Hubstenberger *et al.*, 1992). Incluso Reyes *et al.* (1995) reportaron el uso de antiauxinas para promover la organogénesis adventicia en *Aztekium ritteri*. Por otro lado, Dabekaussen *et al.* (1991), puntualizaron que la adición del ANA tuvo poca importancia para la activación de las aréolas.

Estos reportes contrastan con los resultados obtenidos, debido a que se obtuvo una alta respuesta morfogénica en presencia de altas concentraciones de este mismo fitorregulador activando los meristemas espinífero y axilar (figuras 13 y 16). Por otra parte, hay que hacer notar que Martínez-Vaquez y Rubluo (1989), cuando utilizaron el mismo tipo de explante de *M. san-angelensis* pero proveniente de plántulas (a partir de semilla) el fitorregulador que dio una mejor respuesta en la proliferación de las yemas axilares fue la benciladenina también intervino el ANA en combinación con esta citocinina, sin embargo, su requerimiento fue a muy bajas concentraciones (0.01 mg l^{-1}), incluso, cuando se incrementó la concentración del ANA con las mismas concentraciones de la benciladenina, se redujo el porcentaje de brotes formados. Por estas razones, el que se haya inducido la formación de nuevos brotes bajo la influencia de las auxinas en *M. san.angelensis* parece ser contradictoria. Sin embargo, existen algunos reportes sobre la capacidad organogénica activada por auxinas; Tabei *et al.* (1991) trabajando con *Cucumis melo*, encontró que la formación de brotes adventicios estuvo influenciada por las auxinas 2,4-D, AIA y ANA, lo cual concuerda con los presentes resultados, no obstante, estos autores reportaron que los mejores resultados los obtuvieron con bajos niveles de las auxinas (0.01 mg l^{-1} 2,4-D; 1.0 mg l^{-1} AIA y 0.1 mg l^{-1} ANA), contrastando con las altas concentraciones que en este estudio se

adicionaron al medio de cultivo (2, 4 y 6 $\text{m}\cdot\text{l}^{-1}$). Estas disimilitudes tal vez sean debidas fundamentalmente a las diferencias en el contenido endógeno de las citocininas naturales en cada especie, aunque no hay que perder de vista que también pudo influir el estado fisiológico, el tipo de explante y condiciones ambientales entre otros factores.

El comportamiento regenerativo de los cultivos de *M. san-angelensis* en MS se apega al de una habituación en donde no se requieren de reguladores del crecimiento exógenos para que ocurra un proceso morfogénico (Meins, 1983), probablemente en esta habituación existió un balance a favor (al menos temporalmente) de las citocininas, ya que cuando se adicionaron auxinas al medio de cultivo la inducción hacia la formación de brotes pudiera ser debida a un equilibrio dinámico entre las auxinas y las citocininas, de tal manera que al existir un incremento de las auxinas se estimularía un incremento en la citocinina, provocando con ello la formación de nuevos brotes. Estas consideraciones son basadas en el hecho de que las actividades de los reguladores del crecimiento dependen de sus interacciones con otros reguladores del crecimiento, pero aún no se conocen los mecanismos por los cuales se controla el desarrollo y los procesos fisiológicos de éstas interacciones (Binns, 1994). Por medio de aproximaciones bioquímicas y genéticas se han tenido avances en el conocimiento de las interacciones de los reguladores del crecimiento, sin embargo, es conveniente y en ocasiones indispensable el uso de tejidos sensibles a ellos para poder determinar los efectos que producen (Trevawas, 1981; Cline, 1994). Por lo que los resultados aquí presentados pueden ser un indicativo de un posible cambio endógeno en las plantas de *M. san-angelensis* que han sido mantenidas *in vitro* por largos periodos de tiempo. Esta hipótesis abre caminos para realizar estudios a nivel molecular enfocados al entendimiento del papel de las auxinas en estas plantas.



Figuras 11-15. Respuestas morfológicas a partir de secciones de brotes de *M. san-angelensis* después de tres meses de cultivo. 11. Sin reguladores del crecimiento, escala = 1 cm; 12. Expuestos a 6 mg l^{-1} de AIA, escala = 1 cm; 13. Tubérculos con el meristemo axilar y espinífero iniciando su activación, escala = $86 \text{ } \mu\text{m}$; 14. Meristemo espinífero, escala = $30 \text{ } \mu\text{m}$; 15. Brote con tubérculos de *M. san-angelensis*, escala = $240 \text{ } \mu\text{m}$. Ep, epidermis; Es, espinas; Me, meristemo espinífero; Ma, meristemo axilar; Pa, parénquima; T, tubérculo; V, haz vascular.



Figuras 16-18.- Secuencia de eventos en la inducción de brotes a partir del meristemo axilar. 16. Prctuberancia adyacente al meristemo axilar, escala = 120 μm ; 17. Meristemo axilar con dos zonas de crecimiento (flechas), escala = 34 μm ; 18. Crecimiento de un pequeño brote (flecha) entre dos tubérculos, escala = 85 μm . Ma, meristemo axilar; Pa, parénquima; T, tubérculos; V, haz vascular.

CONCLUSIONES

Este trabajo aporta el primer reporte en la familia *Cactaceae* donde se pudieron observar los primeros estadios embriogénicos inducidos *in vitro*, esto es de gran interés debido a que en ésta familia aunque está ampliamente representada en nuestro país pocos son los estudios realizados por investigadores nacionales en el área de cultivo de tejidos. En la presente investigación fue posible obtener proembriones en estado globular a partir de células de callo originado del tegumento del óvulo. Ello sin descartar la posibilidad de que otras partes del óvulo hayan participado. De las variables experimentadas, se pudo constatar que el tipo y tamaño del explante (óvulos en grupo de flores en etapa de anthesis), medio de cultivo (B5 M), la oscuridad y combinación de los reguladores del crecimiento, (4mg l^{-1} de 2,4-D y 2 mg l^{-1} de kinetina), fueron determinantes para obtener una respuesta hacia los primeros estadios de la embriogénesis somática. Por otro lado, uno de los factores que impidieron el proceso embriogénico no fue la falta de capacidad embriogénica, sino la biosíntesis de compuestos fenólicos que muy probablemente impidieron la maduración de los embriones somáticos, por lo que en estudios futuros se debe considerar la reducción o eliminación de estos compuestos para el logro de embriones somáticos maduros.

La inducción a la embriogénesis somática en *M. san-angelensis*, tuvo dos orígenes uno unicelular y otro pluricelular generando hasta proembriones globulares bajo las mismas condiciones de cultivo, lo cual indica la amplia respuesta genética hacia la embriogénesis somática. Esto es importante para una especie que se encuentra en extremo grado de peligro de extinción, ya que por un lado se puede favorecer el origen unicelular en donde la probabilidad de una variación somaclonal se verá reducida en comparación con el origen pluricelular. Para fines de conservación del germoplasma, los dos orígenes pueden ayudar a lograrlo, ya que por una parte en el caso del origen unicelular se mantendrían altos niveles de fidelidad genética y por otro lado en el multicelular al incrementar la probabilidad de una variación en el genotipo se podría obtener una alternativa para mantener la estabilidad de la especie.

A partir de estos resultados es posible continuar con la obtención de embriones maduros realizando estudios histológicos, fisiológicos y genéticos que puedan propiciar un origen unicelular o pluricelular que permitan un mayor entendimiento del proceso embriogénico *in vitro* en *M. san-angelensis* así como el de contar con otras alternativas para la conservación de esta especie.

Por otra parte, si bien *M. san-angelensis* en estudios previos tuvo éxito en su micropropagación por vía organogénica, los cultivos por largos periodos de tiempo tuvieron respuestas interesantes a nivel fisiológico, ya que las secciones longitudinales de brotes al ser expuestos a las auxinas, mostraron diferencias en sus respuestas hace 7 años y en el momento actual. Actualmente las respuestas morfogenéticas de brotes de plantas de *M. san-angelensis* que han sido mantenidas *in vitro*, por subcultivos en medio sin reguladores del crecimiento durante 7 años, se expresaron por organogénesis indirecta, así como por la activación de sus aréolas espiníferas y axilares. Estas respuestas fueron promovidas por la acción de las auxinas exógenas sin la participación de las citocininas en el medio de cultivo, las cuales se necesitaron hace 7 años para su propagación. Estos resultados no concuerdan con los reportados por Dabekaussen *et al.* (1991) quienes puntualizaron que la adición del ANA es de poca importancia para la activación de las areolas en *Sulcorebutia alba*. El efecto de los tratamientos con auxinas que se manifestó con la inducción de plantas a partir de explantes provenientes de cultivos muy viejos (7 años) es atípico y contrario a la mayoría de los reportes publicados hasta ahora. El presente resultado indica que las plantas de *M. san-angelensis* mantenidas *in vitro* por largos periodos, dan respuestas morfogenéticas que apuntan hacia una posible modificación en su regulación endógena, lo que podría representar que estas vitroplantas puedan ser usadas para futuros estudios moleculares enfocados al esclarecimiento del cómo actúan las auxinas exógenas en la inducción de nuevos brotes.

Apéndice 1. Formulación de los macronutrientes (mg l^{-1}) de los medios MS, (Murashige y Skoog, 1962), B5 (Gamborg et al., 1968) y White (White, 1963).

| Macronutrientes | MS | B5 | White |
|--|-------|-------|-------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | ---- | 134 | ---- |
| $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ | 1,650 | ---- | ---- |
| KNO_3 | 1,900 | 2,500 | 80 |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ | ---- | ---- | 300 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 440 | 150 | ---- |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 370 | 250 | 720 |
| Na_2SO_4 | ---- | ---- | 200 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | ---- | 150 | 16.5 |
| KCl | ---- | ---- | 65 |

Apéndice 2. Formulación de los micronutrientes (mg l^{-1}) de los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y White (White, 1963).

| Micronutrientes | MS | White |
|---|-------|-------|
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.8 | --- |
| Na_2EDTA | 37.8 | --- |
| $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ | --- | 2.5 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 22.3 | 7 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 8.6 | 3 |
| H_3BO_3 | 6.2 | 1.5 |
| KI | 0.83 | 0.75 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 | --- |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | --- |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 | --- |

Apéndice 3. Formulación de las vitaminas (mg l⁻¹) de los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y White (White, 1963).

| Vitaminas | MS | White |
|------------------|-----|-------|
| Acido nicotínico | 0.5 | 0.5 |
| Glicina | 2.0 | 3.0 |
| Myo-inositol | 100 | --- |
| Piridoxina-HCl | 0.5 | 0.1 |
| Tiamina-HCl | 0.1 | 0.1 |

Apéndice 4. Tinción diferencial Acetocarmin-azul de Evans (Gupta y Durzan, 1987)

Se colocó una muestra de aproximadamente 3 mm³ en un tubo de ensaye, se acicionaron 3 gotas de acetocarmin al 2 %, con una aguja de disección se fraccionó la muestra y se colocó el tubo en un vaso de precipitado que contenía 30 ml aproximadamente de agua a 70 °C hasta que el tubo se calentó y la muestra presentó un color rosa, posteriormente, la muestra se lavó tres veces con agua destilada y se le adicionaron 3 gotas de azul de Evans al 0.5 %, pasando 30 segundos, se lavó nuevamente tres veces con agua destilada y se le añadieron 2 gotas de glicerol.

Apéndice 5. Técnica de inclusión en JB-4 (López-Curto et al., 1995)

Preinclusión.

- Se tomaron muestras de 3-5 mm de grosor del material fijado en FAA, y se depositaron en frascos pequeños, limpios y secos.

- Se lavaron en agua corriente.
- Se deshidrataron en acetonas graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y un doble cambio de acetona al 100%), 20 min en cada cambio, a temperatura ambiente.
- Se colocó en un recipiente de plástico el componente A 25 (ml) + el catalizador (225 mg) y agitar constantemente hasta disolver por completo el catalizador. Se preincludió el material colocando las muestras en esta mezcla durante 24 h. a temperatura ambiente.

Inclusión.

- Se preparó una mezcla del componente A (25 ml) + catalizador (225 mg) + componente B (1 ml).
- Con un aplicador de madera se tomó la muestra y se depositó en el fondo de una cápsula de Beem, posteriormente se lleno la cápsula con la misma mezcla y se cerró herméticamente.

Apéndice 6. Tinción con azul de toluidina (López-Curto et al., 1995)

| | |
|------------------------------|-----------------|
| Azul de toluidina | 1 g |
| Bórax (tetraborato de sodio) | 1 g |
| Agua destilada | Aforar a 100 ml |

Apéndice 7. Ácido peryódico-reactivo de Schiff (APS)-Azul negro de naftol (López-Curto et al., 1995)

Los cortes que se colocaron en el portaobjetos se tiñeron de la siguiente manera:

- Se aplicó ácido peryódico durante 15 min.
- Se lavó con agua.
- Se aplicó reactivo de Schiff durante 15 min

- Se lavó con agua
- Se lavó con ácido acético al 2% durante 1 min para evitar formación de cristales.
- Se enjuagó con agua.
- Se deshidrató hasta xilol
- Se aplicó unas gotas de azul negro de naftol durante 20 min.
- Se enjuagó con butanol
- Se pasó a xilol durante 3 min.

Apéndice 8. Vainillina-ácido clorhídrico (Engleman, comunicación personal)

- 10 g de vainillina se disolvieron en 10 ml de etanol absoluto.
- Se mezcló una gota de vainillina con otra de ácido clorhídrico 6 M, se colocaron sobre los cortes y se observa inmediatamente. La presencia de fenoles se revela porque estos se tornan de color rojo o café rojizo. Esta preparación no es permanente.

Apéndice 9. Inclusión en paraplast (López-Curto et al., 1995)

Inclusión.

- Se pasó el material deshidratado a mezclas de xilol-paraplast 2:1, 1:1, 1:2 y paraplast puro, se mantuvieron las muestras, en cada una de estas mezclas, durante 24 h dentro de una estufa a una temperatura entre 58 y 60 °C.

Apéndice 10. Tinción doble safranina-verde rápido (López-Curto et al., 1995)

Los cortes que se colocaron en el portaobjetos se tiñeron de la siguiente manera:

- Se tiñó con safranina por 20 min.
- Se deshidrató hasta etanol al 96%.
- Se contrastó con verde rápido de 10 a 30 seg.

Preparación de colorantes y reactivos (López-Curto et al., 1995)

Azul negro de naftol

| | |
|----------------------|--------|
| Azul negro de naftol | 1 g |
| Etanol 50% | 100 ml |

Ácido peryódico

| | |
|--------------------------|--------|
| Ácido peryódico | 0.5 g |
| Agua destilada, aforar a | 100 ml |

Reactivo de Schiff

| | |
|--------------------------|----------|
| Fucsina básica | 0.5 g |
| Meta-bisulfito de sodio | 0.5 g |
| Ac. acético | 2.0 ml |
| Alcohol 50% | 2.0 ml |
| Agua destilada, aforar a | 100.0 ml |

Safranina (metilcelosolve)

| | |
|-------------------|--------|
| Safranina O | 4 g |
| Metilcelosolve | 200 ml |
| Mezclar y agregar | |
| Alcohol 96% | 100 ml |
| Agua destilada | 5 ml |
| Acetato de sodio | 4 g |
| Formol | 8 ml |

Verde rápido (metilcelosolve)

| | |
|------------------|---------|
| Verde rápido | 0.5 g |
| Alcohol absoluto | 33.3 ml |
| Metilcelosolve | 33.3 ml |
| Aceite de clavo | 33.3 ml |

Acetocarmin 2.0% (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996)

| | |
|------------------|-------|
| Ácido acético | 45 ml |
| Agua bidestilada | 55 ml |
| Carmin | 2 g |

Calentar por 5 minutos agitar, enfriar y filtrar.

LITERATURA CONSULTADA

- Adda, S.; Reddy T.P.; Kishor, P.N.K. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Guizotia abyssinica*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 30P (2): 104-107; 1994.
- Ammirato P V. Embryogenesis. En: Evans D A; Sharp W R; Ammirato P V; Yamada Y (eds). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing. Nueva York. 82-123; 1983.
- Anandarajh K; McKersie B D. Enhanced vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with increased sucrose. *Pl. Sci.* 71: 261-266; 1990.
- Anonymous 1994. CITIES NEWS-PLANTS. A newsletter for the European Region of the CITIES Plants Committe. Issue 1. En: Rubluo, A; Reyes J.; Rodriguez-Garay B.; Pimienta-Barrios E.; Bruner Y. Métodos de propagación en cactáceas para zonas áridas. Serie : Zonas áridas y semiáridas # 9, FAO/PUMA. Santiago, Chile. 1996. 3-56.
- Benson L. The cacti of Arizona. University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 1968. 219.
- Binnns, A.N. Cytokinin an accumulation and action: Biochemical, Genetic and Molecular Approaches. *Ann. Rev. Pl. Physiol. Pl. Mol. Biol.* 45: 173-196; 1994.
- Boke, N.H. Areole histogenesis in *Mammillaria lasiocantha*. *Amer. J. Bot.* 45: 473-479; 1958
- Bravo-Hollis, H.; Sánchez-Mejorada, H. Las Cactáceas de México. Vol.1. México: UNAM; 1978: 21-60.
- Bravo-Hollis, H.; Sánchez-Mejorada, H. Las Cactáceas de México. Vol. III. México: UNAM; 1991: 30-34.
- Brisibe EA; Nishioka D; Miyake H; Taniguchi T; Maeda E. Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. *Pl. Sci.* 89:85-92;1993.
- Buddendorf-Joosten J M C; Woltering E J. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. En: Lumsden P J; Nicholas J R; Davies W J. (eds). Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1994: 165-190.
- Buddendorf-Joosten J M C; Woltering E J. Controllin the gaseous composition *in vitro* description of a flow system and effects of the different gaseous components on *in vitro* growth of potato plantles. Elsevier Science. *Scientia Horticulturae*; 1996: 65: 11-23.
- Calixto F; Pais M S. Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pineaster* Sol. ex Aiton. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 33: 119-124; 1997.
- Cassells A C. Problems in tissue culture: culture contamination. En; Debergh P C; Zimmerman R H (eds). Micropropagation. Technology and application.1991: 31-45.
- Clayton, P.W. ; Hubstengberger, J.F.; Phillips, G.C. Micropropagation of members of the *Cactaceae* subtribe *Cactinae*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115 (2): 337-343; 1990.
- Cline, N.G. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Pl. (Copenhagen)* 90: 230-237; 1994.
- Chavez, V. M.; Litz, R.E.; Marquez, J. Histology of somatic embriogenesis of the cycad *Ceratozamia mexicana* var. *Robusta* (Miq.) Dyer. *Pl. Sci.* 108: 191-200; 1995.

- Dabekaussen MAA; Pierik RLM; Van der Laken JD; Hoek SJ. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. Hort. Sci. 46: 283-294;1991.
- Debergh P C; Read P E. Micropropagation. En: Debergh P C; Zimmerman (eds). Micropropagation and Technology and applications. Kluwer academic publishers. Netherlands. 1-13; 1991.
- DeJong AJ; Cordewener J; Schiavo FL; Terzi M; Vandekerckhove J; Kammen AV; DeVires SC. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. The Plant Cell. 4: 425-433; 1992.
- Denchev PD; Atanassov AI. Micropropagation through somatic embryos. En: Y.P.S. Bajaj. (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 30 High Tech. and Micropropagation IV Springer-Verlag Berlin Heidelberg ;1995:193-206.
- Devlin R M. Fisiología Vegetal. Ediciones Omega, 1976; 359-366.
- Diario Oficial de la Federación, Organo del Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos.1994. Tomo CDLXXXVIII No. 10 México, D.F. lunes 16 de mayo de 1994. (Primera Sección): 2-54.
- Duval, H.K. Organogénesis *de novo* en *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada, especie cultivada *in vitro*. Tesis. Biología. UNAM. ENEP. Iztacala. México; 1995: 31-40.
- Engleman E M. Ovule and seed morphology of certain cacti. Amer. J. Bot. 47:460-467; 1960.
- Evans SR; Hofmann A. Plants of the gods. McGraw-Hill, Maidenhead. 1979.
- Evans D; Sharp WR;Ammirato PV; Yamada Y. Handbook of plant cell culture, vol. 1. Techniques for propagation and breeding. McMillan Publising Co. New York; 1983: 177-227.
- Evans D; Sharp W; Frick C. Growth and behavior of cell culture: Embryogenesis and organogenesis. In: Thorpe TA (ed). Plant Tissue Culture. Methods and applications in agriculture. Academic Press. New York. 1981; 43-113.
- Fay, M.F. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. Biodiversity and Conservation. 3: 176-183; 1994.
- Fahn, A. Anatomía Vegetal. Madrid: Ediciones Pirámide; 1982: 497-499.
- Ferradini N; Famiani F; Proeitti P; Stanica F. Influence of growth regulators and light on *in vitro* shoot regeneration in M.26 apple roostock. J. Hort. Sci. 71 (6): 859-865; 1996.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. Plant Cell Culture: Nutrient requirements of suspensión cultures of soybean root cell. Exp. Cell. Res. 50: 151-158; 1968.
- George, E.F. Plant Propagation by Tissue Culture. Part. 1. The technology. London: Exegetics Ltd.; 2nd.; (ed) ;1993:420-434.
- George, E.F.; Sherrington, P.D. Plant propagation by tissue culture: Hand book and directory of commercial laboratories. London: Exegetics Ltd.; 1984: 709p.
- Gibson AC; Nobel PS. Areoles and Spines. En: The cactus primer. Harvad University Press; 1986: 94-106.
- Gladfelter H J; Phillips G C. *De novo* shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. In vitro 1. Reproducible regeneration from long term callus cultures. Pl. Cell. Rep. 6:163-166;1987.
- Goldberg R.B.; Barker S.J. ; Perez-Grau L. Regulation ef gene expression during plant embryogenesis. Cell. 56: 149-160; 1989.

- Gomez CAC; Fernández FM. Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth kinetics of flax. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 47:1-8; 1996.
- Gupta, P.K. ; Durzan, D.J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Research Papers. Biotechnology*. 5:147-151; 1987.
- Haccius . Question of unicellular origin of non-zygotíc embryos in callus cultures. *Phytomorphology*. March:74-81; 1978.
- Halperin W; Wetherell DF. Ontogeny of adventive embryos of wild carrot. *Science* 147: 756-758.:1965.
- Hadi M Z ; Bridgen M P. Somaclonal variation as a tool to develop pest resistant plants of *Torenia fourmieri* "Compacta Blue". *Plant Cell and Organ Culture*. 46: 43-50; 1996.
- Harry I S; Thorpe T A. Regeneratin of plantlets through organogenesis form mature embryos of jack pine. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 37: 159-164; 1996.
- Hernández HM; GodínezHA. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Bot. Mexicana*. 26:33-52; 1994.
- Hernández-García G; García-Villanueva E. Anatomía comparada de óvulos y semillas de dos especies del género *Mammillaria* (Cactaceae). *Bol. Soc. Bot. México* 51:25-38:1991
- Hgashi K; Kamada H; Harada H. The effects of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetasa activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. *Plant Cell and Tissue Organ Culture* 45: 109-114; 1996.
- Hubstenberger, J.F.; Clayton, P.W.; Phillips, G.C. Micropropagation of Cacti (Cactaceae) . En: Y.P.S. Bajaj. (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 20 High Tech. and Micropropagation IV Springer-Verlag Berlin Heidelberg;1992: 49-68.
- Hurtado M.D. y Merino M.M. Cultivo de tejidos vegetales. México: Ed. Trillas; 1988:15-16.
- Hutabarat, D. Gama ray induced effects on plant regeneration from callus in *Echinocereus* species (Cactaceae). In: Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. Proceeding of a Symposium, Viena, AIEA: 187-192; 1986.
- In'ante, R. *In vitro* axillary proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Slam-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31: 155-159; 1992.
- Johnson, J. L.; Emino, E. R. *In vitro* propagation of the cactus *Mammillaria enlongata*. *Hortscience*. 14: 605-606; 1979.
- Kaminek, M. Progress in cytokinin research. *TIBECH*. 10: 159-164;1992.
- Kawahara R; Komamine A. Molecular basis of somatic embryogenesis. En: YPS (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Syntetic Seed Y*. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 30: 30-39; 1995.
- Kolar Z.; Bartek J.; Vyskot B. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* trough tissue cultures. *Experientia*. 32: 668-669; 1976.
- Konan N K; Sangwan R S; Sangwan B S. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 37: 91-102; 1994.
- Krikorian A D. Medios de cultivo: Generalidades. En Roca W M y Mroginski L A. Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Cali Colombia. 143-171; 1991.

- Krulik G. Tissue culture of succulent plants. *J. Nat. Cact. Succ. India.* 35: 14-17; 1980.
- Kumlehn J; Nitzsche W. Plant regeneration from isolated ovules of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.): effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and different cytokinins supplemented to the ovule culture medium. *Pl. Sci.* 111:107-116; 1995.
- Lai F; Senaratna T; Mckersie B D. Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. somatic embryos. *Pl. Sci.* 87: 69-77; 1992.
- Ltz R E y Jarret R L. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En Roca W M y Mroginski L A. Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Cali Colombia. 143-171; 1991.
- Liu Ch; Xu Z; Chua N. Auxin Polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell.* 5: 621-630; 1993.
- López C M L; Márquez G J; Murguía S G; Técnicas para el estudio de la Biología reproductiva en Angiospermas. Departamento de Biología (Laboratorio de Citología Vegetal). Las prensas de Ciencias. Fac. Ciencias. UNAM. México. 1995. 116 p.
- Lozoya H. Micropropagación de especies herbáceas. En: M. Robert y V M Loyola (Eds). El cultivo de tejidos en México. CICY, CONACYT. 65-80; 1985. CONACYT. México
- Maës C O; Chibbar R N; Caswell K; Leung N; Kartha K K. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. *Pl. Sci.* 2: 75-84; 1996.
- Martinez-Vazquez, O.; Rubluo, A. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sanchez Mejorada. *J. Hort. Sci.* 64 (1): 99-105; 1989.
- Mauseth, J.D. Introduction to cactus anatomy. Part 10. Flowers and sex. *Cact. Succ. J.* 56 (5): 212-216; 1984.
- Mauseth, J.D.; Halperin, W. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha*. *Amer. J. Bot.* 62: 869-877; 1975.
- Mckersie, B.D. Somatic embryogenesis and artificial seeds in (*Medicago sativa* L.). A short course. Corp Science Departament. University of Guelph. Ontario, Canada; 1994: 3-29.
- Meins, F. Hereditary variation in plant cell culture. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 34: 327-346; 1983.
- Meins, F.; Binns, A. Epigenetic variation of cultured somatic cells. Evidence for gradual changes in the requirement for factor promoting cell division. *Poc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74 (7): 2928-2932; 1977.
- Meyrán, J. Notas sobre plántulas de Cactáceas. En: Cactáceas y suculentas mexicanas. Tomo 1, No. 4 : 107-109 ; 1956.
- Michaux-Ferrière N; Grout H; Carron, M.P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Amer. J. Botany.* 79(2): 174-180; 1992.
- Minocha S C; Mehra PN. Nutritional and morphogenetic investigations investigations of callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61: 168-173; 1974.
- Moon H K ; Stomp A M. Effect of medium components and light on callus induction, growth, and frond regeneration in *Lemna gibba* (Duckweed). *In Viro Cell. Dev. Biol.* *Pl.* 33:20-25; 1997.

- Murashige T. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Physiol Plant.* 25:135-166;1974.
- Murashige T; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Pl.* 15: 473-479; 1962.
- Murray D.R. Nutrition of the Angiosperm Embryo. New York: John Wiley & Sons Ltd.; 1988; 121-205.
- Narayanuswamy S. Phytomorphology. En: Y.P.S. Bajaj, (Eds). Applied fundamentals aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag. 1997; 179-206.
- Norstog K; Rhamstine E. Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissues. *Phytomorphology.* 17:374-381; 1967.
- Olguin SL. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Sheidw. (*Cactaceae*), especie en peligro de extinción. Tesis Biología. UNAM. México, 1994; 1-84.
- Phillips GC; Collins GB. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration of red clover. *Crop. Sci.* 19:59-64;1979.
- Preece JE; Compton ME. Problems with explant exudation in micropropagation. In: Biotechnology in agriculture and forestry (Eds) YPS Bajaj, Springer Verlag, Berlin. 17:169;1991
- Profumo P, P Gastaldo, RM Dameri, L Caffaro, L. Histological study of calli and embryoids from leaf explants of *Aesculus hippocastanum* L. *J. Pl. Physiol.* 126: 97-103;1986.
- Rajbhandari N; Stomp A M. Embryogenic callus induction in Fraser fir. *HortScience* 32 (4): 737-738; 1997.
- Ray H Y; Mroginski L A. Regeneration plants from callus tissue of *Aeschynomene* spp. (*Leguminosae*). *Plant Cell and Organ Tissue Culture.* 45: 185-190; 1996.
- Reyes, I.; Hubstenberger, J. F.; Phillips, G. C. Antiauxin effects on morphogenesis in cultures of the endangered cactus *Aztekium ritteri*. *In Vitro.* 31 (3) part II: 52 A; 1995.
- Reynolds, T.L. Changes in RNA, protein and translatable messenger RNA synthesis and accumulation during adventive organogenesis in somatic tissue cultures of *Solanum carolinense*. *Pl. Sci.* 65: 77-85; 1989.
- Rochat, C.; Boutin, J.P. Carbohydrates and nitrogenous compounds changes in hull and in the seed during the pod development of pea. *Pl. Physiol. Biochem.* 27 (6): 881-887; 1989.
- Rodríguez-Garay B. Producción Verde. Técnicas modernas para una antigua actividad. *Techno/Industria.* 1994; 17: 20-24.
- Rodríguez-Garay B; Gutiérrez-Mora A; Santacruz-Ruvalcaba F. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en agaváceas para zonas áridas. En: Izquierdo J; Palomino G. Técnicas convencionales y Biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas. Serie : Zonas áridas y semiáridas # 9, FAO/PUMA. Santiago, Chile. 1996; 57-86.
- Rodríguez-Garay, B.; Rubluo, A. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeher). *Cact. and Succ. J.* 64: 116-119; 1992.
- Rubluo, A.; Micropropagation in *Mammillaria*. En: Y.P.S. Bajaj, (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. High Tech. and Micropropagation V. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 1997; 193-205.

- Rubluo A; Arriaga E; Arias S; Pérez-Amador C; Amor D; Santos E; Rojas E; Elizalde P. Tissue culture applications in endangered *Mammillaria huitzilopochtli* (Cactaceae). VII Int Congr Plant Tissue Cell. Amsterdam. 1990; 130.
- Rubluo, A; Reyes J.; Rodríguez-Garay B.; Pimienta-Barrios E.; Bruner Y. Métodos de propagación en cactáceas para zonas áridas. En: Izquierdo J; Palomino G. Técnicas convencionales y Biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas. Serie : Zonas áridas y semiáridas # 9, FAO/PUMA. Santiago, Chile. 1996; 3-56.
- Rzedowski, J. Diversity and origins of the Phanerogamic flora of Mexico. En: Ramamoorthy, T.P.; Sot.; Bye, R. (eds). Biological Diversity of Mexico. Origins and Distribution. Oxford University Press; 1993; 129-144.
- Rzedowski J; Rzedowski G. Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol II. ENCB. IPN. 1985; 674.
- Sagare AP; Suhasini K; Krishnamurthy KV. Histology of somatic embryo initiation and development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pl. Sci. 109: 87-93; 1995.
- Sagawa Y; Kunisaki J T. Micropropagation of floriculture crops. En: Amirato P V; Evans D A; Sharp W R. (eds). Handbook of plant cell cultures vol 5. 1990; 25-57.
- Santarem E R; Pelissier B; Finer J J. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Pl.* 33:13-19; 1997.
- Sharp W R. The Physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. En: Janick (Ed) Horticultural Reviews. Avi Publishing Co. INC. Westport, Connecticut. 1980; Vol. 268-310.
- Shwendiman J; Pannetier C; Michaux-Ferriere N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Ann. Bot.* 45: 705-708; 1988.
- Schenk R; Hildebrandt. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204;1972.
- Schumann G; Ryschka U; Schulze J; Klocke E. Anatomy of somatic embryogenesis. En: Y.P.S. Bajaj, (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 1995; 71-86.
- SEMARNAP-INE-CONABIO. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca; Instituto Nacional de Ecología; Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Reservas de la Biosfera y otras áreas naturales protegidas de México. México; 1995; 7-12.
- Skoog F. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Amer. J. Bot.* 31:19-24; 1944.
- Skoog F. Tsui C. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro . *Amer. J. Bot.* 35: 783-787; 1948.
- Smith RH; Burdick PJ; Reilley AA. *In vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. *HortScience.* 26(3) 315; 1991.
- Stefaniak B. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Gladiolus* (*Gladiolus hort.*). *Plant Cell Reports* 13: 386-389; 1994.
- Stuppy, W; Nagl, W. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* 10: 85-88; 1992.

- Suardi M L; Bernasconi S; Pelizzoni F; Racchi M L. In vitro cultures of *Solanum malacoxylon* Sendt.: nutritional requirements and sterol production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36:9-14;1994.
- Tabei, Y.; Kanno, T.; Nishigio, T. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports* 10 (5): 225-229; 1991.
- Tagi ID. Polyembryony in *Mammillaria tenuis* D.C. *Bull. Bot. Soc. Univ. Saugar* 8: 25-27; 1956.
- Tisserat, B.; Esan, E.B.; Murashige, T. Somatic embryogenesis in angiosperms. En: Janick, J. (Ed). *Horticultural Reviews*. Vol. 1. Publishing Co. West Port Conn; 1979: 1-78.
- Toledo, V.M.; Ordoñez, M.J. The biodiversity scenario of Mexico: A review of terrestrial habitats. En: Ramamoorthy T.P.; Lot, A.; Bye, R. (eds). *Biological Diversity of Mexico. Origins and Distribution*. Oxford University Press. 1993; 757-777.
- Torres-Muñoz L; Rodríguez-Garay B. Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbincarpus pseudomacrolele* (Buxbaum & Backeberg). *J Prof. Assoc. Cactus Dev.* 1: 36-38; 1996.
- Trevawas, A. How of plant growth substances work? *Plant Cell Environ.* 4: 203-228; 1981.
- Trigiano R N; Gray D J; Conger B V; McDaniel J K. Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Bot. Gaz.* 150: 72-77; 1989.
- Villalobos VM; Thorpe TA. Micropropagación : conceptos, metodología y resultados. En Roca W M y Mroginski L A. *Cultivo de tejidos en la agricultura*. CIAT. Cali Colombia. 1991;121-141.
- Vyskot B; Jara Z. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 59 (3): 449-452;1984.
- Wang L; Huang B He M; Hao S. Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freesia refracta*. *Ann Bot.* 65:217-276;1990.
- West, M.A.L.; Harada, J.J. Embryogenesis in higher plants: An overview. *The Plant Cell.* 5: 1361-1369; 1993.
- White, P.R. 1963. *The cultivation of animal and plant cells*, 2nd de., New York: Ronald Press. 223 p.
- Williams E G.; Maheswaran G. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57: 448-462; 1986.
- Wyman J; Brassard N; Flipo D; Laliberté S. Ploidy level stability of callus tissue, axillary and adventitious shoots of *Larix x eurolepis* Henry regenerated *in vitro*. *Pl. Sci.* 85:189-196; 1992.
- Yadav R C; Saleh M T; Grumet R. High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. *Plant Cell and Tissue Organ Culture.* 45: 207-214; 1996.
- Yeung EC; Meinke DW. Embryogenesis in angiosperms: Development of the suspensor. *The Plant Cell.* 5:1371-1381;1993.
- Zirmerman, J.L. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell.* 5: 1411-1423; 1993.