



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

Inducción y multiplicación *in vitro* de tejido caloso de *Mammillaria carmenae* y *Mammillaria herrerae*. (Cactaceae).

297229

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE B I O L O G O P R E S E N T A

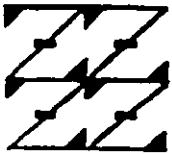
VÍCTOR ANTONIO MÁRQUEZ CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. AMADEO BARBA ALVAREZ

MEXICO, D.F. 2001



LO HUMANO
ES
DE FUERZA REVOLUCION



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A mis amados padres:

Antonio Márquez y Micaela Castillo.

A mis hermanos:

Juan, Rosario, Miguel, Hugo, Francisco y Cristina.

A mis adorables hijos:

Verónica Montserrat, Víctor Hugo y José Uriel.

A mis amigos y compañeros, con gran cariño.

AGRADECIMIENTOS:

Al M. en C. Amadeo Barba Álvarez, por sus consejos y ayuda vertida hacia mí desde que lo conocí hasta la consecución de esta tesis y a su finísima esposa la M. en C. Susana Luna Rosales.

A Ayla por la vida y por dejarme beber del auténtico "líquido sagrado de los Dioses".

A Zanya-Nochipa por "pase lo que pase siempre seremos amigos".

A Regina por "dos jueves santo... no se olvidan".

CONTENIDO

	PAGINA
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE LAMINAS	X
RESUMEN	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Familia Cactaceae	3
Origen	3
Clasificación Botánica	4
Características Botánicas	4
2. Género <i>Mammillaria</i>	5
Características de las especies de estudio	7
Clasificación botánica de las especies	8
3. Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos	8
Reguladores del Crecimiento	10
4. Morfología del callo	11
Cultivo <i>in vitro</i> de callo	12
Organogénesis en cultivo de callo	12
5. Cultivo <i>in vitro</i> de Cactáceas	13
III. MATERIALES Y METODOS	18
1. MATERIAL VEGETATIVO.	18
1.1 Semillas de <i>Mammillaria carmenae</i> .	18

	PAGINA
1.2 Plantas de <i>M. carmenae</i> y <i>M. herrerae</i>	18
2. MEDIO DE CULTIVO.	19
3. CONDICIONES DE INCUBACIÓN.	19
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	20
4.1 Germinación de semillas de <i>M. carmenae</i> .	20
4.2 Desinfestación y siembra de semillas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	21
4.2.1 Desinfestación de semillas.	21
4.2.2 Siembra de semillas <i>in vitro</i> .	21
4.2.3 Siembra de semillas <i>in vivo</i> .	21
4.3 Desinfestación y siembra de inóculos de <i>Mammillaria spp.</i>	22
4.3.1 Inóculos de <i>Mammillaria elongata</i> y <i>M. gracilis</i> .	22
4.3.2 Inóculos de <i>Mammillaria carmenae</i> y <i>M. herrerae</i> .	23
4.3.3 Siembra de Inóculos de <i>Mammillaria spp.</i>	23
4.4 Inducción de callo.	24
4.5 Multiplicación de callo.	25
5. EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN, INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE CALLO.	27
5.1 Germinación de semillas de <i>Mammillaria carmenae</i> .	27
5.1.1. Velocidad de contaminación.	26
5.1.2. Porcentaje de contaminación.	27
5.2. Germinación.	27
5.2.1. Velocidad de germinación.	27
5.2.2. Porcentaje de germinación.	27
5.3. oxidación.	27
5.3.1. Velocidad de oxidación.	27

	PAGINA
5.3.2 Porcentaje de oxidación	27
5.4 Inducción de callo.	27
5.4.1 Combinación de reguladores del crecimiento.	27
5.4.2 Tipo de inóculo que origino al callo.	27
5.4.3 Posición del inóculo.	27
5.4.4 Tipo de callo generado.	28
5.4.5 Tiempo de exposición en medio fresco.	28
5.5 Multiplicación de callo, (FASE I, II y III).	28
5.5.1 Combinación de auxina - citocinina	28
5.5.2 Razón de crecimiento, (R. C.)	28
5.5.3 Biomasa generada.	28
IV RESULTADOS	29
A. Semillas de <i>Mammillaria carmenae</i> .	29
1. Desinfestación.	29
2. Siembra <i>in vitro</i> .	29
3. Siembra <i>in vivo</i> .	29
3.1 Velocidad de germinación	29
B. Inducción de callo.	30
1. Desinfestación y antioxidación en inóculos de <i>M. gracilis</i> y <i>M. elongata</i> .	30
1.1 Contaminación.	30
1.2 Oxidación.	31
2. Desinfestación y antioxidación en inóculos de las especies de prueba y de estudio.	32
2.1 Contaminación y oxidación.	32
3. Matrices de reguladores del crecimiento.	33
3.1. Primera matriz de reguladores del crecimiento ANA/BAP.	33
	III

3.1.1 Generación de callo.	33
3.1.2 Generación de raíz.	33
3.1.3 Generación de brotes.	34
3.1.4 Generación de plántulas.	34
3.2. Segunda matriz de reguladores del crecimiento ANA/BAP.	35
3.2.1 Generación de callo.	35
3.2.2 Generación de raíz.	35
3.2.3 Generación de brotes.	36
3.2.4 Generación de plántulas.	36
3.3. tercera matriz de reguladores del crecimiento ANA/BAP.	37
3.3.1 Generación de callo.	37
3.3.2 Generación de raíz.	37
3.3.3 Generación de brotes.	37
3.3.4 Generación de plántulas.	37
3.4. Primera matriz de reguladores del crecimiento AIA/CIN.	39
3.4.1 Generación de callo.	39
3.4.2 Generación de raíz.	39
3.4.3 Generación de brotes.	39
3.4.4 Generación de plántulas.	40
4. Origen y características del callo.	40
4.1 Tipo de inóculo que origino callo.	40
4.2 Posición del tubérculo para la generación de callo.	40
4.3 Tipo de callo.	41

	PAGINA
4.4 Tiempo de exposición en medio fresco.	41
5. Multiplicación de tejido calloso, (FASE I, II y III).	42
5.1 Razón de crecimiento (R. C.)	42
5.2 Biomasa generada.	48
V. DISCUSIÓN.	54
VI. CONCLUSIONES.	57
VII. BIBLIOGRAFÍA	59
APÉNDICE	63

ÍNDICE DE CUADROS

	PAGINA
Cuadro 1. Sales inorgánicas propuestas en el medio de Murashige y Skoog (1962).	20
Cuadro 2. Tratamientos de desinfección para la siembra <i>in vitro</i> de semillas de <i>Mammillaria carmenae</i> .	22
Cuadro 3. Tratamientos de desinfección para inóculos de <i>Mammillaria gracilis</i> y <i>M. elongata</i>	23
Cuadro 4. Agentes antioxidantes utilizados previo a la siembra de inóculos de <i>Mammillaria gracilis</i> , y <i>M. elongata</i> .	23
Cuadro 5. Primera matriz con ácido naftalen-acético (ANA) y bencil amino-purina (BAP) para la inducción de callo.	24
Cuadro 6. Segunda matriz con ácido naftalen-acético (ANA) y bencil amino-purina (BAP) para la inducción de callo.	24
Cuadro 7. Tercera matriz con ácido naftalen-acético (ANA) y bencil amino-purina (BAP) para la inducción de callo.	25
Cuadro 8. Primera matriz con ácido indol-acético (AIA) y cinetina (CIN), para la inducción de callo.	25
Cuadro 9. Medios de cultivo utilizados en los subcultivos para la multiplicación de callo de <i>M. carmenae</i> y <i>M. herrerae</i> .	26
Cuadro 10. Matriz para la multiplicación de callo con diferentes concentraciones de AIA/CIN, fase III (subcultivo IV) de <i>M. carmenae</i> y <i>M. herrerae</i> .	26
Cuadro 11. Resultados de la siembra <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de semillas de <i>Mammillaria carmenae</i> .	29
Cuadro 12. Resultados a los tratamientos de desinfección de inóculos de <i>Mammillaria gracilis</i> y <i>M. elongata</i> .	31
Cuadro 13. Resultados a los tratamientos de antioxidación de inóculos de <i>Mammillaria gracilis</i> y <i>M. elongata</i> .	32
Cuadro 14. Resultados de contaminación y oxidación de inóculos de <i>Mammillaria spp.</i>	33

Cuadro 15.	Respuesta a la primera matriz de reguladores de crecimiento en ANA/BAP de inóculos de <i>Mammillaria gracilis</i> , <i>M. elongata</i> , <i>M. carmenae</i> y <i>M. herrerae</i> .	34
Cuadro 16.	Respuesta a la segunda matriz de reguladores de crecimiento en ANA/BAP de inóculos de <i>Mammillaria herrerae</i> .	36
Cuadro 17.	Respuesta a la tercera matriz de reguladores de crecimiento en ANA/BAP de inóculos de <i>Mammillaria carmenae</i> .	38
Cuadro 18.	Respuesta a la tercera matriz de reguladores de crecimiento en ANA/BAP de inóculos de <i>Mammillaria herrerae</i> .	39
Cuadro 19.	Respuesta a la primera matriz de reguladores de crecimiento en AIA/CIN de inóculos de <i>Mammillaria herrerae</i> .	40
Cuadro 20.	Razón de crecimiento de cinco callos de <i>M. herrerae</i> y un callo de <i>M. carmenae</i> durante la Fase I, II y III.	42
Cuadro 21.	Biomasa generada de cinco callos de <i>M. herrerae</i> y un callo de <i>M. carmenae</i> durante la Fase I, II y III.	48
Cuadro 22.	Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase I y II del callo "9" de <i>M. herrerae</i> .	63
Cuadro 23.	Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase III del callo "9" de <i>M. herrerae</i> .	63
Cuadro 24.	Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase I y II del callo "10" de <i>M. herrerae</i> .	64
Cuadro 25.	Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase III del callo "10" de <i>M. herrerae</i> .	64
Cuadro 26.	Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase I y II del callo "14" de <i>M. herrerae</i> .	65
Cuadro 27.	Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase III del callo "14" de <i>M. herrerae</i> .	65
Cuadro 28.	Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase I y II del callo "18" de <i>M. herrerae</i> .	66

	PAGINA
Cuadro 29. Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase I y II del callo "19" de <i>M. herrerae</i> .	67
Cuadro 30. Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase III del callo "19" de <i>M. herrerae</i>	67
Cuadro 31. Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase I y II del callo "19" de <i>M. carmenae</i> .	68
Cuadro 32. Resultados de la razón de crecimiento y biomasa generada durante la Fase III del callo "19" de <i>M. carmenae</i> .	68

ÍNDICE DE FIGURAS

PAGINA

Figura 1.	Resultados de la velocidad de germinación <i>in vivo</i> de semillas de <i>Mammillaria carmenae</i> .	30
Figura 2.	Razón de crecimiento de cinco callos de <i>Mammillaria herrerae</i> y un callo de <i>M. carmenae</i> durante las fases I, II y III.	43
Figura 3.	Razón de crecimiento del callo "9" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	45
Figura 4.	Razón de crecimiento del callo "10" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	45
Figura 5.	Razón de crecimiento del callo "14" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	46
Figura 6.	Razón de crecimiento del callo "18" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	46
Figura 7.	Razón de crecimiento del callo "19" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	47
Figura 8.	Razón de crecimiento del callo "19" de <i>Mammillaria carmenae</i> durante las fases I y II.	47
Figura 9.	Biomasa generada de cinco callos de <i>Mammillaria herrerae</i> y un callo de <i>M. carmenae</i> durante las fases I, II y III.	49
Figura 10.	Biomasa generada del callo "9" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	51
Figura 11.	Biomasa generada del callo "10" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	51
Figura 12.	Biomasa generada del callo "14" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	52
Figura 13.	Biomasa generada del callo "18" de <i>Mammillaria herrerae</i> durante las fases I y II.	52

RESUMEN

La Cactaceae es una de las familias que identifican al paisaje mexicano y en especial el género *Mammillaria* que es uno de los más hermosos, significativos y representativos. Estos cactus exhiben un crecimiento lento debido a las condiciones climáticas donde habitan. A pesar de su importancia comercial son escasos los estudios científicos que se han efectuado en esta familia.

Con el presente trabajo se presenta una metodología de cultivo *in vitro* para la inducción de tejido calloso y su multiplicación. Se trabajó con dos especies: *Mammillaria carmenae* y *M. herrerae*.

Las semillas de *M. carmenae* sólo germinaron bajo condiciones *in vivo*, presentando el 19 % de germinación, sometidas a escarificación mediante la aplicación de calor a una temperatura de 32°C en una estufa.

Se efectuaron diferentes ensayos para establecer el mejor procedimiento de desinfección, así como para controlar la oxidación, que es frecuente en los tejidos de estas especies. El medio de cultivo empleado fue el Murashige y Skoog (MS) modificado, adicionado con sacarosa al 5% y tiamina-HCl 0.4 mg/l.

Se experimentaron cuatro matrices de concentraciones de reguladores del crecimiento, tres de ácido naftalen-acético (ANA) con benzil amino-purina (BAP) y uno de ácido indol-acético (AIA) con cinetina (CIN).

El ápice de la planta y los tubérculos con areolas respondieron a la inducción del tejido calloso. Los inóculos de raíz, axilas, tallo y médula no respondieron a ningún tratamiento.

En *M. herrerae* las plántulas se originaron a partir del tejido calloso derivado de inóculo de ápice, en la concentración de 5.0/50.0 mg/l ANA/BAP. Entre tanto la plántula de *M. carmenae* se indujo con la concentración de 0.5/25.0 mg/l de ANA/BAP, también derivada previamente del tejido calloso.

Se obtuvieron tres tipos de callos a partir de tubérculos: 1.- "callo friable", de crecimiento rápido, color blanco y poca pigmentación, 2.- "callo moderado", de color verde claro y de crecimiento moderado y 3.- "callo compacto", de color verde oscuro, de consistencia compacta y crecimiento lento, con los reguladores del crecimiento de (ANA/BAP).

Para la multiplicación del tejido calloso se empleó el medio básico de M S modificado, con 5.0/50.0 mg/l de AIA/CIN adicionando suplementos orgánicos y pulpa de plátano, con esto se acrecentó considerablemente la Razón de Crecimiento (R. C.), consiguiendo el aumento del material vegetativo (Biomasa).

1. INTRODUCCIÓN

Las Cactáceas son nativas del Nuevo Mundo, pero han sido introducidas a muchas partes del Viejo Mundo. Son plantas suculentas, de ordinario espinosas, alcanzando algunas veces el tamaño de un árbol, con hojas muy reducidas o ausentes. En general, tienen flores epígamas, con placentación parietal, numerosos estambres, con poca distinción entre los pétalos y sépalos petaloídes. Los pigmentos florales son betalinas en lugar de antocianinas. Aunque de ordinario son de lugares secos y de regiones cálidas, algunas especies crecen en bosques, (Cronquist, 1982).

Dentro de las Cactáceas uno de los géneros más cultivados y de importancia comercial es el *Mammillaria*, ya que comprende al menos 200 especies originarias de México. Los miembros del género son de dimensiones muy reducidas, tallo globoso cilíndrico; algunas producen yemas, a veces emiten nuevos tallos de las raíces, que forman aglomerados; son las plantas crasas más cultivadas, ya que la mayor parte de ellas florecen a los pocos años después de haber germinado. Las flores pequeñas y acampanadas, forman una corona al final del tallo y producen una baya de color claro, que dura largo tiempo, (Mainardi, 1978).

En México existe una gran diversidad de especies de cactáceas incluso, se le conoce a nuestro país en el ámbito mundial como "El País de las Cactáceas", (Bravo-Hollis, 1978). Aproximadamente el 65% del territorio mexicano esta formado por zonas áridas y semiáridas sitio donde estas plantas abundan. A pesar de poseer esta gran variedad son escasos los estudios de cultivo *in vitro* que se han realizado con especies del género *Mammillaria* de este taxa de vegetales.

Estos cactos presentan un desarrollo extremadamente lento, Carey, (1980) menciona que *Carnegie gigantea* nativa del desierto de Sonora se reproduce con éxito en años de buena lluvia y pueden pasar de 7 a 20 años entre las generaciones. Sin embargo con la ayuda de las técnicas de cultivo *in vitro* se ha podido propagar algunas especies en tiempo relativamente corto. Una de las técnicas mas empleadas es la del cultivo *in vitro* de tejido calloso, la cual consiste en obtener el tejido calloso a partir de un tejido u órgano de la planta y posteriormente multiplicar este tejido y estimular la diferenciación a organogénesis y/o embriogénesis y conseguir plántulas.

Cultivo in vitro de Cactáceas. A partir de los trabajos realizados por King, (1957), la propagación de este tipo de vegetales por cultivo *in vitro*, se ha difundido. Los primeros trabajos que se realizaron fueron en especies que carecían de valor comercial, posteriormente las investigaciones se realizaron con especies de cierto valor comercial como *Mammillaria woodsi*. En la década de los ochenta en México, Corona y Chávez en 1982, publican un artículo, en donde mencionan la importancia del cultivo de tejidos para su aplicación en especies que estén en peligro de extinción

como la familia Cactaceae y en 1984, Corona y Yáñez, reportan el primer trabajo realizado con la familia de las cactáceas, aplicando esta técnica de cultivo *in vitro*, para la propagación de *Cephalocereus senilis*. Pero destacan los estudios efectuados con *Mammillaria san-angelensis* empezando con Rubluo, *et al.*, que iniciaron la inducción de tejido caloso en esta especie. Así en 1993 propusieron que esta técnica se utilizara en vegetales que se encuentren en peligro de extinción, como las especies de la familia Cactaceae.

En 1998 Pérez, *et al.*, desarrollaron sistemas de micropropagación para especies de cactus mexicanos. Las especies propagadas pertenecen a los géneros *Astrophytum*, *Cephalocereus* y *Mammillaria* entre otras. La generación de callos múltiples a partir de areolas se logró en medio básico de Murashige y Skoog (MS) complementado con N6-benzyladenina (BA) y ácido-naftalen-acético (ANA).

Son muchas las especies de cactáceas que son demandadas por parte de los coleccionistas de plantas raras de todo el mundo. Este hecho ha motivado que tanto colectores nacionales y extranjeros se hayan dado a la tarea de saquear indiscriminadamente algunas zonas del país, (Carey, 1980). Dos especies de las más codiciadas por los coleccionistas en México son *Mammillaria carmenae* y *M. herrerae* que de acuerdo a la "Normas Oficiales Mexicanas para la Protección Ambiental" (1994), ambas especies están catalogadas como "En peligro de Extinción".

Para ambas especies se diseñó el presente trabajo de investigación, en donde se ensayaron tres matrices de reguladores del crecimiento de ANA/BAP, para poder conseguir las concentraciones adecuadas para la inducción del callo, obtener el medio básico adecuado para su multiplicación y se experimentaron varios tipos de inóculos como ápices, raíces, tallo, areolas, espinas, axilas y tubérculos, para la inducción del tejido caloso.

II. ANTECEDENTES

1.- Familia Cactaceae

Origen.

Las cactáceas, son autóctonas del continente Americano en donde se encuentran distribuidas especialmente en regiones áridas y semiáridas. México por sus peculiares condiciones de latitud, topografía y diversidad de climas, posee casi la mitad de las especies existentes, (Bravo-Hollis, 1978).

En América se distribuyen en vastas regiones, particularmente en zonas cálidas. Algunas especies del género *Opuntia* se localizan desde el norte hasta el sur del continente. La gran concentración de cactáceas acontece en la región inmediatamente después del norte y sur de la zona central cálida. En el norte es muy abundante en México y parte del sur de los Estados Unidos, las cactáceas mexicanas comprenden muchos géneros y especies raras, incluyendo miniaturas de sólo unos centímetros de altura, (ídem).

En México los cactus son parte de su historia (en su bandera tiene un águila posada sobre una *Opuntia* devorando una serpiente), se le conoce como "La casa de los cactus", es aquí donde se colectaron las primeras cactáceas y se describieron, a partir de ahí se trasladaron a Europa en grandes cantidades que el gobierno mexicano ha tenido que intervenir para limitar su explotación y evitar la exterminación de algunas especies.

En América Central existen pocas Cactáceas, prevaleciendo *Epiphyllum* y *Rhipsalis*, típicas de Bosques y varias termofílicas como *Cerei* y *Melocacti*. El género *Cerei* son los típicos cactus que crecen en la región ecuatorial tropical bordeando el río Amazonas.

En Sudamérica los cactus más distintivos son: *Parodia*, *Brasilicactus*, *Eriocactus*, *Notocactus* y *Gymnocalycum* en las regiones montañosas del Ecuador, Perú y Bolivia, teniendo más Cactáceas en el norte que en el sur. En Chile crecen muchas Cactáceas raras, llamándosele a este país "El Paraíso Perdido de los Cactus", esta tierra es el origen de ciertas especies como; *Neoporteria*, *Chilena* y *Morridocactus* y otras Cactáceas esféricas. Brasil también es la casa de los géneros *Hattoria*, *Pferiffera* y *Discocactus*.

La mayoría de las especies de Sudamérica crecen en Argentina, Uruguay y Paraguay concentrándose principalmente en la zona Noroeste, (Helch, 1981).

El género *Mammillaria* contiene alrededor de 250 especies nativas de México, Colombia, Guatemala, Honduras, el SE de Estados Unidos de América y Venezuela, su tamaño fluctúa en el rango de los 2 cm a los 90 cm, son de forma cilíndrica o globular, los tubérculos están arreglados en forma de espiral y rematan en la punta con una gran cantidad de espinas (areolas), sus flores son de diversos colores, desde blanco, rojas, violeta y amarillo, éstas se originan en la unión de los tubérculos (axilas), son ampliamente cultivadas debido a su florecimiento a los pocos años una vez que han germinado.

Las Cactáceas fuera de América se localizan en Europa, África y Australia.

Clasificación Botánica.

La familia Cactaceae, con alrededor de 200 géneros y unas 2 000 especies, con frecuencia ha sido conocida como un orden separado, pero ahora por lo general, se le incluye en el orden Caryophyllales, (Cronquist, 1982).

Actualmente la familia Cactaceae comprende tres subfamilias; Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae.

La subfamilia Pereskioideae que posee dos géneros, uno de los cuales se considera el género más antiguo de las familias: *Pereskia*.

La segunda subfamilia es la Opuntioideae con 10 géneros, uno de los cuáles es el género *Opuntia*.

La tercer subfamilia, Cactoideae se divide a su vez en 8 tribus; dentro de esta subfamilia se hallan los géneros más bellos de todas las subfamilias, como son: *Astrophytum*, *Mammillaria*, *Echinocactus*, *Notocactus* y *Ferocactus*, (Bravo-Hollis, 1978). Las especies más cultivadas son de esta subfamilia.

Características Botánicas.

Plantas perennes, con hábitos y hábitat distintos. Tallos suculentos, ramosos o unarticulados, cilíndricos, en cladiólos o en diocladíolos, leñosos y de consistencia suave, verdes, grandes o pequeños; hojas tectrices con limbo. Pecíolo o base sólo en los géneros *Pereskia* y *Pereskopsis*, en las demás reducida en la base a un podario tuberculoso y el limbo a una escama o a primordios anatómicos; podarios según su filotaxia, dispuestos en series helicoidales o formando costillas; yemas axilares especializadas en areolas, desplazadas sobre los podarios, excepto en *Pereskia* y *Pereskopsis*, con meristemos, en el inferior vegetativo productor de tallos, espinas, gloquidas, cerdas, pelo, lana o fieltro; y el superior vegetativo florífero, (en *Mammillaria* se desarrolla en la

axila del tubérculo), espina variable en estructura, forma, dimensiones, coloración y número, diferenciándose según su posición en la areola en radiales o centrales, a veces son caducas o no se desarrollan; la espinación es distinta en los estadios juveniles, adulto y seniles, (Bravo-Hollis, 1978).

Las flores casi siempre hermafroditas, a veces unisexuadas dioicas, radiadas, pseudozigomorfas, excepcionalmente zigomorfas, muy grandes y pequeñas. Diurnas, nocturnas y a veces vespertinas; sus órganos axiales con podarios espiralados, escamas o brácteas y areolas con espinas, cerdas o lana, que a veces se reducen hasta desaparecer, el pericarpelo, es mas o menos globoso y verduoso; El receptáculo tubular mas o menos largo (en *Rhypsalis discoide*) verduoso o de coloración del perianto con tépalos exteriores e interiores espiralados, de forma, coloración y número variable; estambres insertos en las paredes del receptáculo hasta la garganta, generalmente incluidos, erectos o más o menos declinados en las flores con tubo receptacular curvo. (idem).

Granos de polen en estructuras diversas, generalmente tricolpados; ovario policarpelar formando una cavidad; óvulos con placentación falsamente parietal; funículos simples o ramificados, estilo largo, generalmente incluido, algo más largo que los estambres; los glóbulos del estigma mas o menos numerosos y coloridos; néctareo en la base del estilo y de estructura diversa; pulpa seca o jugosa, con o sin sabor y olor, (idem).

Semillas mas o menos numerosas, discoideas subglobosas, piriformes; testa reticulada, foveolada o tuberculada, castaña rojiza, negruzca o clara; hilo subbasal mas o menos amplio, micropilo a veces cubierto por los rebordes de la testa, a veces con arilo o con estróbilo; embrión recto o curvo, cotiledones acumbentes, desarrollados o más o menos reducidos. Plántulas con hojas cotiledonares foliáceas o reducidas y crasas; cromosomas 11, (Sánchez Mejorada, 1982).

2.- Género *Mammillaria*

Plantas esféricas o elongadas, simples o cespitosas con o sin lechosidad, aquellas que tienen leche ésta es visible externamente cuando la planta se ha dañado en el período de crecimiento, en lugar de costillas las plantas tienen tubérculos los cuáles varían de forma y están arreglados en ínter espacios espirales los cuáles generalmente son una característica del diagnóstico de las especies relativas a este género. (Backeberg, 1977).

Las flores nunca son apicales, pero aparecen en un rincón de las axilas en los años posteriores a su crecimiento. Las axilas (depresiones entre los tubérculos), pueden ser completamente lisas o llanas, o pueden tener lana de variable longitud, algunas veces poseen también cerdas o pelos mas o menos largos; las areolas (asentamiento de racimos de espinas en la parte apical del tubérculo), por lo general tienen un fieltro o lanosidad al final y al principio, pero por lo común al final es llano, en estos casos la corona en mas o menos lanosa como resultado, o la lana en las axilas y en las areolas.

En un determinado número de especies la lanosidad axilar se desarrolla mas fuertemente en la zona de florecimiento, (idem).

Las flores son variables de tamaño pero por lo común son pequeñas; los colores varían en un rango que va desde el blanco, al amarillo hasta el rojo, y en algunas especies, particularmente las que tienen espinas en forma de garfio, las flores son completamente largas. En las especies con espinas en forma de garfio en donde la carnosidad les da una aparente suavidad, las flores por lo común son pequeñas (estas especies frecuentemente son mas o menos lanudas), en otras especies de este tipo, tienen flores acampanadas en forma de embudo, las cuales varían de tamaño, (idem).

Las espinas en forma de garfio aparecen en cada una de las tres secciones. El tubo y el ovario son lisos y virtualmente sin tefir. Cuando la flor se ha marchitado, el fruto en un principio no es visible, pero aparece a partir de la axila cuando la flor madura y es empujado hacia el exterior el chilito. Los frutos pueden ser verdes o rojos o aún rojizos-verdes o algunas veces rojo-coral, (Pilbean, 1960).

La testa de la semilla es de color oscuro con leves depresiones y más o menos lustrosas, de colores amarillentos a negro, tienen un tamaño variable y forma. Las semillas también exhiben un amplio rango de variación en el número y en el tipo, pudiendo ser piriformes, curvadas o en algunas ocasiones en forma de garfio. Los tubérculos nunca están conectados basalmente. Este género representa ciertas restricciones a caracteres uniformes, (Backeberg, 1977).

Se conocen 250 especies distinguibles que ya han sido descritas, con 98 variaciones. Además de existir 80 especies que han sido inadecuadamente descritas y por lo tanto no están aún catalogadas, ya que no se ha podido aclararse o identificarse con algunas de las especies conocidas, a pesar de esto las *Mammillaria* es un de los géneros más extensos de la familia Cactaceae, (idem).

Características de las especies de estudio.

Mammillaria carmenae. Flores pequeñas, campaniforme, de color cremoso-amarillo o púrpura; plantas de crecimiento lento; espinas centrales rectas, las espinas radiales poco numerosas; plantas globosas principalmente, los tubérculos cilíndricos completamente; semillas de color café.



Lamina 1.- *Mammillaria carmenae*.

Mammillaria herrerae. Flores medianas o pequeñas (raramente exceden los 20 mm de largo), principalmente de color pálido púrpura o purpúreo-rosa; espinas centrales normalmente ausente, raramente presentes y numerosas pero se inclinan dentro de las espinas radiales; las espinas radiales son muy numerosas; plantas globosas principalmente en depresiones y agrupadas, los tubérculos cilíndricos completamente o casi escondidos por las espinas; semillas de color negro, (Hautzin, 1977).



Lamina 2.- *Mammillaria herrerae*.

Clasificación botánica de las especies, (Hunt, 1977 y Cronquist, 1982).

Reino	Vegetal
División	Anthophyta
Clase	Dicotiledónea
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Género	<i>Mammillaria</i>
Subgénero	<i>Mammillaria</i>
Sección	Hydrochylus
Serie	Proliferae
Especie	<i>M. herrerae</i> y <i>M. carmenae</i> .

3. Cultivo *in vitro* de Tejidos.

El cultivo *in vitro* de tejidos, órganos y células vegetales se fundamenta en cultivar en medios nutritivos, adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, partes de hoja, tallo, etc., (Street, 1977), suministrando siempre las condiciones de temperatura, humedad y luminosidad adecuadas.

Toda célula vegetal viva, cualquiera que sea su especialización posee un núcleo que es capaz de reproducir las características de la planta de la cual proviene, (Haberlandt, 1902). Este autor en 1902 introduce el concepto de totipotencialidad celular, mencionó que las células vegetales son totipotenciales, es decir que si a las células se modifican sus condiciones ambientales y nutricionales después de aislarlas pueden recapitular su desarrollo como las plantas en condiciones naturales, (Street, 1977).

Es evidente que la transición de un estado diferenciado a la etapa de célula meristemática proliferante no se logra sin que aparezcan profundas modificaciones en la estructura de la célula. Estas alteraciones regresan a la célula de la etapa adulta a la juvenil, siendo por esto capaz de orientarse hacia la generación de casi cualquier otro tipo celular. Una célula de parénquima por ejemplo se convertirá en un punto de partida de una yema vegetativa o de un meristemo radicular. Por lo anterior la célula vegetal puede remontar las etapas de su ontogenia y volver a convertirse en embrión, (Street, 1977).

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro* se sigue una serie de principios básicos simples. Ya que la técnica se utiliza tanto en trabajos de investigación como en la multiplicación de vegetales, en primer lugar hay que seleccionar de la planta, la parte de ésta que se va a utilizar para ser cultivada, después debe de eliminarse los microorganismos superficiales que contaminan el material vegetativo, controlar lo mejor posible los factores del medio (temperatura, luz, composición del medio, pH, etc.) y las condiciones de incubación y orientarlas hacia un programa determinado, como sería la neoformación de brotes (multiplicación vegetativa), (Villalobos, 1979).

La técnica de cultivo *in vitro* debe solucionar dificultades como: conservar al inóculo con vida activa, si este inóculo es una estructura organizada (meristemo, ápice, yema) debe permitirle un crecimiento normal, si el inóculo esta constituido por células diferenciadas (fragmento de tallo, hoja, pecíolo, raíz) debe inducir en éstas un proceso de dediferenciación al que deberá proseguir una nueva organización, (Carrillo, 1977) Esta técnica esta limitada, ya que no permite la generalización de los resultados, extrapolando éstos de una especie a otra, pues aún plantas de la misma especie pero de diferentes variedades responden de distinta forma a la técnica, (Pérez *et al.*, 1998).

Los nutrientes requeridos en el medio de cultivo varían con la especie vegetal y con el objetivo del cultivo. Las sustancias necesarias pueden agruparse de modo conveniente en varias categorías:

- Elementos Inorgánicos: para cualquier tejido vegetal cultivado *in vitro*, una provisión de elementos inorgánicos es un requerimiento básico. Los primordiales macro y micro nutrientes que deben suministrarse son N, K, O, Ca, y Mg. (Carrillo, 1977).
- Sustancia Orgánicas: una fuente de carbono y de energía es un segundo requerimiento básico para el desarrollo de tejidos y órganos vegetales (excepto embriones maduros que pueden no requerirlos), por lo general se adiciona sacarosa en un rango de 2 a 4 %.
- Vitaminas y otras sustancias: tiamina (0.1 a 1.0 mg/l), el ácido nicotínico (0.5 mg/l), y la piridoxina (0.5 mg/l), el ácido pantoténico (0.1 mg/l) y la biotina (0.1 mg/l), son necesarios para algunos tejidos vegetales y se les puede añadir, de modo rutinario. Entre otras sustancias que se pueden requerir se encuentra el inositol (100.0 mg/l), la adenina o sulfato de adenina (40 a 160 mg/l) y bases nitrogenadas con (100mg/l), (idem).
- Reguladores del Crecimiento, (auxinas y citocininas): Los principales son el ácido naftalen acético (ANA, de 0.1 a 10 mg/l), el ácido diclorofenoxiacético (2,4-D, de 0.05 a 0.5 mg/l) y a veces el ácido indol-acético (AIA, de 1 a 50 mg/l). En cultivo de tejidos de ciertas especies se requiere cinetina (CIN, de 0.01 a 10 mg/l), dimetil alil aminopurina (2iP), Bencil aminopurina (BAP) y Zeatina.

El Cultivo de Tejidos es una herramienta útil para el fitomejoramiento, puesto que permite superar barreras que con el mejoramiento tradicional eran infranqueables, además de ayudar a hacer más eficiente el proceso de obtención de cultivares, (Trejo, 1992).

Reguladores del Crecimiento.

Las plantas responden a estímulos de sus ambientes internos y externos. Estas respuestas las capacitan para desarrollarse normalmente y mantenerse en contacto con las condiciones externas cambiantes. Los reguladores del crecimiento son factores significativos en las respuestas de la planta. Particularmente son activas en cantidades extremadamente pequeñas, (Curtis y Barnes, 1994). Las sustancias sintéticas con efectos reguladores no pueden llamarse hormonas, ya que este término se aplica a sustancias químicas que se producen en glándulas de los animales, por lo que deben de llamarse "Regulador del Crecimiento Vegetal" que define a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, modifican o inhiben de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas, (Barba, 1987).

La auxina es producida principalmente en tejidos que se dividen rápidamente, como los meristemos apicales. Provoca el alargamiento del vástago, promoviendo esencialmente el alargamiento celular. En conjunción con la citocinina y el etileno interviene en la dominancia apical, en la cual se inhibe el crecimiento de las yemas axilares, restringiendo así el crecimiento principalmente al ápice de la planta. En concentraciones bajas la auxina promueve la iniciación de las raíces secundarias y de las raíces adventicias; en concentraciones más altas inhibe el crecimiento del sistema principal de raíces. En los frutos en desarrollo la auxina producida por la semilla estimula el crecimiento de la pared del ovario; la producción reducida de auxina se correlaciona con la abscisión de los frutos y hojas, (Curtis y Barnes, 2000).

Las citocininas promueven la división celular. Alterando la concentración de auxinas y citocininas es posible cambiar los patrones de crecimiento del tejido vegetal indiferenciado en los cultivos de tejidos, (idem).

La inducción *in vitro* de órganos por las citocininas está encaminada a la formación de yemas, en el cultivo estas yemas no se inhiben recíprocamente en su desarrollo, debido a que se anula la dominancia apical, hecho que puede extrapolarse a las plantas intactas pues las citocininas aplicadas exógenamente en general activan el crecimiento de las yemas laterales, (Barba, 1987).

Combinaciones de citocininas y auxinas.

Aparentemente, una célula vegetal no diferenciada como una célula meristemática tiene dos vías a seguir: puede aumentar de tamaño y dividirse para volver a aumentar y dividirse o bien para alargarse sin dividirse. La célula que se divide reiteradamente permanece esencialmente

indiferenciada, mientras que las células que se alargan tienden a diferenciarse y especializarse. En estudios de células caulinares del tabaco, la adición de AIA al medio de cultivo en el que estaban creciendo produjo una rápida expansión celular de manera que se formaron células gigantes. Al añadir cinetina sola, no se ocasionaba ningún efecto o éste era muy pequeño. Sin embargo al añadir AIA mas cinetina se logró una rápida división celular, de manera que se formo una gran cantidad de células relativamente pequeñas, (idem).

Cuando la concentración de AIA es mas alta que la citocinina, el tejido indiferenciado origina raíces organizadas. Con una concentración mas elevada de cinetina, aparecen yemas y con un balance adecuado de ambos reguladores pueden originar tanto raíces como yemas y, de este modo, una planta incipiente, (idem).

4. *Morfología del callo*

Se define al callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una dediferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Esta masa celular puede mostrar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular, (Barba, 1987).

El tejido calloso generado *in vitro* es una masa desorganizada de células que proliferan continuamente y puede obtenerse casi a partir de cualquier parte de la planta, se puede generar espontáneamente en medio básico, pero si se agrega auxina es más factible que se induzca, y más si se agrega en conjunto con una citocinina, (Mantell y Smith, 1983). Alterando ligeramente las concentraciones relativas de AIA y la cinetina se afecta el desarrollo de células indiferenciadas. Con concentraciones aproximadamente iguales de reguladores del crecimiento, las células permanecen indiferenciadas formando una masa de tejido conocido como callo, (Curtis y Barnes, 2000).

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células, ya que, en general, con un manejo apropiado de las condiciones nutricionales, reguladores del crecimiento y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces, embriones, los cuales pueden llegar a formar plántulas. Un serio problema asociado con este tejido es el daño o modificación de la citología nuclear de las células durante el cultivo *in vitro*, se pueden presentar aberraciones cromosómicas, (Barba, 1987).

Las respuestas cualitativas y cuantitativas del crecimiento del callo en cultivo *in vitro* incluyen un sinergismo estrecho y complejo entre el origen del tejido usado para la primera inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante esta etapa, (idem).

Cultivo in vitro de callo.

La inducción del callo a partir de una porción vegetal sucede cuando el inóculo ya desinfectado se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga un crecimiento y una división celular continua, (Barba, 1987).

Dependiendo del inóculo, la proliferación del callo se puede iniciar casi a partir de cualquier órgano vegetal o sus partes. En general los callos derivados de embriones y plántulas tienen un mayor potencial para la morfogénesis. También es trascendente el estado fisiológico y la edad de la planta donadora del callo, siendo recomendable utilizar plantas jóvenes y de crecimiento activo, (idem).

Entre la segunda y tercera semana del cultivo, los inóculos muestran un nuevo crecimiento a través de la superficie del inóculo, dependiendo de la distribución y actividad mitótica del parénquima residente en el tejido seccionado. El incesante crecimiento puede hacer que se regenere el inóculo o se desdiferencie y forme el callo. En presencia de luz los callos se pueden tomar verdes. En ocasiones la generación del callo puede presentarse acompañada de la generación espontánea de raíces, y esto puede estimularse espontáneamente por el incremento del nivel de la auxina en el medio de cultivo, (Indra y Trevor, 1994).

Las auxinas más empleadas en la iniciación y manutención del cultivo de callo son al ácido 3 indol-acético (AIA), ácido naftalén-acético (ANA) y el 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), hallándose, para cada especie, una auxina o un regulador y una concentración adecuada para la inducción y mantenimiento del callo, (Barba, 1987).

Los requerimientos de reguladores de crecimiento para la proliferación recomendable de los callos, la velocidad de respuesta, y el número de brotes producido por inóculos varía entre los géneros y especies. El enraizamiento de los retoños generados *in vitro* se puede lograr en un medio de MS complementado con AIA a 0.5-1 mg/l o IBA a 0.5-1 mg/l, (Pérez *et al.*, 1998).

Cuando los cultivos tienen varias semanas los callos pueden mostrar signos de agotamiento, notándose en la desaceleración en el crecimiento, tornándose café o necrosándose y finalmente en la muerte de éste. La transferencia de secciones de callo de aproximadamente 5 mm de diámetro en 30 ml de medio fresco (subcultivo) y a intervalos de 4 a 6 semanas puede revertir esta tendencia y conservar el callo vigoroso. Algunas líneas de callos han sido conservadas así hasta por 15 años, (Indra y Trevor, 1994).

Organogénesis en cultivo de callo.

La morfogénesis puede orientarse en los callos por la iniciación controlada de órganos brotes y raíces a través de la aplicación de nutrientes y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, el cual contiene los elementos orgánicos e inorgánicos así como reguladores del crecimiento

exógenos. El tejido caloso tiene exigencias de cultivo específico y en ocasiones pierde el potencial morfogénico que puede ser trascendental para la organogénesis. Este fenómeno también depende de otros factores tales como; el tipo de inóculo que dio origen al callo, el genotipo, la edad de la planta donadora, los niveles de reguladores del crecimiento y varios factores físicos, (Reinert y Bajaj, 1977).

Es importante mencionar que la presencia del ápice es crucial para la generación del callo y la producción subsiguiente de plántulas, (Indra y Trevor, 1994). En ausencia de citocinina pero con ANA, se forman raíces. En medio de M S (1962) con agua de coco y 2,4-D o ANA 5mg/l fue el mejor en términos de proporcionar un suministro seguro de producción de callo y plántulas. Si se eliminan las auxinas del medio, pero se dejan con agua de coco este ayudó a las plántulas a reestablecerse y permitió su transferencia a suelo, (idem).

5.- Cultivo *in vitro* de Cactáceas.

Los primeros trabajos *in vitro* que se efectuaron, fueron los reportados por Ricob, en 1962, quien cultivó tejido de tallo de *Trichocereus spachianus* para estudiar la biosíntesis de alcaloides en esa planta. utilizó 2,4-D para inducir callo, descubrió tres tipos diferentes de los mismos; callo verde compacto con crecimiento lento; el segundo de color amarillento y crecimiento moderado y el último de consistencia friable blanquizo y crecimiento rápido, sin embargo no logró conseguir plántulas diferenciadas.

De aquí tuvieron que transcurrir varios años, hasta que en 1974, año en que Subhash y Minocha, reportaron la inducción y proliferación de callo en el medio de cultivo de Murashige y Skoog, con 2,4-D, así como otros reguladores del crecimiento, pero éstos no respondieron a la desdiferenciación de plántulas de *Neomammillaria prolifera*.

En 1975, Kolar *et al.*, cultivaron meristemas de *Mammillaria woodii*, así como yemas axilares y brácteas. Consiguieron callo, los cuales los clasificaron en tres tipos: los primeros que nunca se desdiferencian (oxidados y necrosados), el segundo tipo, los callos que esporádicamente se desdiferencian a plántulas y el tercer tipo, los callos que rápidamente se diferenciaron a plántulas. Siendo este el primer trabajo en que se logró la desdiferenciación de callo hasta la generación de plántulas.

También en 1975 Mauseth y Halperin trabajaron con *Opuntia polyacantha*, emplearon el medio de cultivo de Murashige y Skoog y adicionaron diferentes tipos de reguladores del crecimiento, solos y combinados entre ellos, reportaron que cuando los inóculos se cultivaron en un medio con BAP, se producen brotes, con GA3 raíces y con ANA no sufren ningún cambio morfológico, sólo se indujo la generación de raíces en el inóculo.

En 1976, Mauseth trabajó de nuevo con *Opuntia polyacantha* y estudio las posibles interacciones de reguladores del crecimiento con ciertos sitios específicos de inóculos en cuestión, reportó la actividad mitótica de las células y que el incremento dependió del regulador, ya sea BAP o GA3 y del sitio de acción.

Mauseth en 1977 estudio los efectos del BAP y GA3 sobre la morfogénesis del primordio de hoja en *Opuntia polyacantha*, y descubrió que cuando el inóculo es afectado con BAP, originó brotes hallando un contenido regular de células epidérmicas, células guarda, células del mesófilo y mucilago, así como tejido vascular. El GA3 dio origen a espinas y sus tejidos contienen células fibrosas epidérmicas, concluyendo que el GA3 es incapaz de redirigir la morfogénesis.

Johnson y Emino en 1979 cuando trabajaron con tubérculos de *Mammillaria elongata* descubrieron que su respuesta hacia la generación de callos y raíces y brotes dependió de la interacción auxinas-citocininas. Con 2,4-D y cinetina consiguieron callos mientras que con ANA e IBA se formaron raíces y los brotes se logró con AIA y 2ip.

En ese mismo año de 1979 Johnson y Emino, mencionaron los trabajos anteriores a ellos y dan una lista de las plantas donde se logró diferenciarlas a partir de callo. Hacen mucho hincapié en que empleando el medio de M S (1962), con sus altas concentraciones de sales, es mejor para sostener la organogénesis en *M. elongata* y *Opuntia sp.*, y que el balance de reguladores del crecimiento jugó un papel trascendente en la organogénesis y éste varía mucho con cada especie.

Mauseth en 1979 realizó una recopilación de trabajos anteriores y propuso un método general para el cultivo de tejidos en cactáceas. Además dio una lista de cactáceas donde se consiguieron plántulas a partir de callo, mencionando entre otras *Mammillaria woodsi* y *M. elongata*.

En 1982 Lazarte, Gaiser y Brown trabajaron con *Epiphyllum chrysocardium*, consiguieron plántulas a partir de callo, emplearon medio básico que contenía la mitad de las sales de M S, junto con BAP. La generación de raíces ocurrió después de que se añadió IBA en los cultivos de brotes.

En 1984, Corona y Yáñez, trabajaron con *Cephalocereus senilis*, ellos emplearon el medio de M S (1962) así como diversas combinaciones de citocininas con auxinas, señalaron que cuando se combinan cinetina con ANA, AIA e IBA, éstos no afectan de manera significativa y causan la muerte de los inóculos, mientras que la combinación de cinetina con 2,4-D provocó tejido calloso, sin embargo, no consiguieron el éxito en la desdiferenciación del callo hacia plántula.

Ault y Blackmon, en 1987, trabajaron con ápices de plántulas de *Ferocactus acanthodes*, lograron la proliferación de brotes usando el medio de M S (1962), con cinetina y ANA, además de suplementos vitamínicos, y fueron posteriormente enraizados con cinetina, adenina y ANA, para después trasplantarlos a sustrato, bajo condiciones de invernadero.

Así como se muestra en la síntesis anterior y sobre la base de los planteamientos expuestos se advierte que en la mayoría de los trabajos se empleó el medio básico de Murashige y Skoog, logrando la inducción de callo, con 2,4-D, mientras que con BAP se obtuvo la generación de brotes, el GA3 promueve la generación de espinas y las auxinas dan origen a raíces.

Clayton, *et al.*, en 1990 realizó la micropropagación de 11 especies de la subtribu Cactinae. Los inóculos de brotes se consiguieron a partir del ápice de plantas jóvenes de *Escobaria missouriensis*, y de plantas maduras de *Mammillaria wrightii*, entre otras. Se investigaron los efectos del medio básico y los tipos de auxinas y citocininas en diferentes concentraciones para la proliferación de brotes axilares. Con concentraciones bajas de auxina no se logró la multiplicación, pero con concentraciones moderadas o altas de citocininas favoreció la producción de brotes axilares. Todas las especies enraizaron esporádicamente en medios libres de reguladores del crecimiento; sin embargo, varias especies enraizaron mejor en medios que contenían auxinas.

En 1991, Dabekaussen, *et al.*, desarrollaron un sistema de cultivo para estudiar la Activación de la Areola (AA) con inóculos de cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. El medio de cultivo recomendable para la AA consistió en las sales propuestas por Murashige y Skoog, sacarosa al 2.5% P/V, BA con 0.25-1 mg/l, agar de Daichin 0.5% y pH 5.5. Las citocininas fue requisito esencial para la AA; Con el BA se alcanzó mejores resultados, seguidos por la cinetina. Las citocininas IBA, 2iP y IPA no produjeron resultados satisfactorios. Las condiciones físicas adecuadas para el crecimiento y para la (AA) fueron a una temperatura de 27°C y una irradiación luminosa de 2.3-5 W m².

Stuppy y Nagl en 1992, germinaron semillas de *Ariocarpus retusus*, bajo condiciones estériles en medio sólido de MS con 20 g/l de sacarosa y el 20% (v/v) de agua de coco. Las plántulas originaron callo en el mismo medio, y después de 3-4 meses el primer embrión somático apareció. Sin embargo, la producción masiva de embriones somáticos amarillos pálidos sólo empezó después de 14-16 meses de cultivo. Los callos fueron subcultivados a medio fresco cada 8 semanas. En cada subcultivo, se utilizó el mismo medio de cultivo, pero con sólo 15% (v/v) de agua de coco.

Rubluo, *et al.*, en 1993 cultivaron *in vitro* cactus, y después de la aclimatación algunas de estas se reintegraron a su ambiente natural donde continuaron con su ciclo de vida. Los especímenes de *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae), originados del cultivo *in vitro* florecieron y produjeron semillas fértiles después de haber sido reimplantadas en su hábitat original.

Machado, *et al.*, en 1993 investigaron isoenzimas de la malato deshidrogenasa (MDH) en semillas, plántulas y callos de Cactáceas para poder determinar si estas sufren cambios en sus modelos de acción por la presencia de reguladores del crecimiento y poderlas usar como marcadores bioquímicos para estudiar la expresión del gen durante el desarrollo del callo.

Bonness, *et al.*, en 1993 iniciaron cultivos de callo a partir del tejido interno del tallo en plantas de *Cephalocereus senilis* cultivadas en invernadero, dichos cultivos crecieron de una manera notablemente rápida, la misma rapidez de crecimiento se logró con cultivos en suspensión y pueden persistir durante varios meses sin ser subcultivados.

Mangolin, *et al.*, investigaron en 1994 la isoenzima del alcohol deshidrogenasa, si puede emplearse en presencia del 2,4-D como marcador bioquímico, descubrieron una correlación con la presencia de éste cuando los cultivos se sometieron a un estrés de temperatura y esto afecto el crecimiento del callo. También se descubrió que son marcadores bioquímicos sensibles a altas concentraciones de la cinetina 2,4D., concluyeron que se pueden utilizar para estudios de monitoreo de callos.

En este mismo año de 1994, Mangolin, junto con diferentes colaboradores estudiaron otros compuestos como el isocitrato deshidrogenasa y esteraza, ácido fosforoso y otras sustancias, que pueden ser potenciales marcadores bioquímicos, comprobando que si persiste la uniformidad genética del callo, y éste no es afectado. Concluyeron que pueden ser buenos marcadores bioquímicos.

Torquato, *et al.*, en 1995, retomaron los estudios de sus compañeros, emplearon como marcadores bioquímicos las isoenzimas alcohol deshidrogenasa y la malato deshidrogenasa para estudiar como afecta las altas concentraciones de cinetina al fenotipo del callo. Establecieron que el patrón de cambio observado por ambos marcadores con respecto al crecimiento del callo fue independiente de las concentraciones de cinetina probadas. Concluyeron que estas isoenzimas parecen ser productos de una asociación diferencial de las subunidades de los genes 2 Adh y mMdh.

Prioli, *et al.*, también en 1995 investigaron la correlación de la presencia de varias isoenzimas como la de alcohol, malato, e isocitrato deshidrogenasas, entre otras con respecto a la cinetina y al 2,4-D. El callo fue cultivado por períodos prolongados y se utilizaron 3 combinaciones de 2,4-D (4 mg/l) y cinetina a (4, 6 y 8 mg/l). Los callos que revelaron el número más alto de isoenzimas inducidas, se presentaron en altas concentraciones del 2,4-D. El cual puede utilizarse como marcador del efecto en la generación de brotes a partir de callo.

Oliveira, *et al.*, en 1995 utilizaron plántulas de *Cereus peruvianus* como fuente de inóculos para establecer las condiciones más eficaces para inducir y conservar tejido calloso en un estado de crecimiento rápido y regenerar plantas a partir de callo. Ensayaron las combinaciones factoriales de 2,4-D y cinetina en medio de MS. La combinación de 18.1 μM de 2,4-D y de 18.6 ó 27.9 μM de cinetina fue la adecuada para la inducción del callo. Se originaron brotes a partir de callo friable. Se promovieron raíces a las 2 semanas de estar en el medio con 18.6 μM de cinetina.

En 1996. Corneanu *et al.*, investigaron los efectos de la interacción de fluidos magnéticos y los campos geomagnéticos en el desarrollo del cultivo de tejidos de plantas en *Mammillaria durwei*.

advirtieron efectos significativos en los procesos de crecimiento y de la división celular de los callos.

Mangolin, *et al.*, en 1997, demostraron que hay variaciones morfológicas entre plantas regeneradas a partir del cultivo de callo de *Cereus peruvianus*. Se percibieron diferencias en brotes en 68% de las plantas regeneradas con 4 años de edad, y ninguna variante morfológica se observó en plantas que crecieron a partir de semilla.

Marín, *et al.*, en 1998, cultivaron óvulos de flores de plantas originadas de cultivo *in vitro* de *M. san-angelensis*. Estos fueron cultivados en medio sólido modificado de B5 complementado con 2,4-D (4 mg/l) mas Cin (2 mg/l), el callo fue inducido a partir de los tegumentos de los óvulos. Durante los primeros 3 meses en cultivo, se detectaron las fases tempranas de la embriogénesis somática. El análisis histológico reveló el origen unicelular así como multicelular de las estructuras proembrionicas. La presencia de fenoles afectó negativamente el progreso de la embriogénesis somática.

Pérez, *et al.*, en 1998 desarrollaron sistemas de micropropagación para 21 especies de cactus mexicanos utilizando inóculos a partir de plántulas germinadas *in vitro* o segmentos de plantas cultivadas en invernaderos con 2 a 3 años de edad. Las especies propagadas pertenecen al género *Astrophytum*, *Cephalocereus*, *Mammillaria* entre otras. La generación de brotes múltiples a partir de areolas se logró en medio básico de Murashige y Skoog (MS) complementado con 1 ó 2 mg/l N6-benzyladenina (BA) o BA a 1 ó 2 mg/l más ANA a 0.1 ó 1 mg/l.

Palomino, *et al.*, en 1999, recientemente determinaron que la estabilidad del genoma nuclear en *Mammillaria san-angelensis* de callo expuesto a largos periodos de cultivo *in vitro* en presencia de auxinas exógenas, pueden ser factores que potencialmente inducen la inestabilidad genética. La planta adulta cultivada en invernadero y plántulas jóvenes cultivadas *in vitro*, en ambas se estableció su diploidia de $2n=22$, con el mismo cariotipo, no encontrando diferencias significativas en el contenido de ADN de estos grupos. La meiosis en plantas adultas muestran un comportamiento normal con once bivalentes ($n=11$). Se concluyo que este estudio demostró la estabilidad cariotípica del tejido cultivado *in vitro* de *M. san-angelensis* a pesar de su origen.

III. MATERIALES Y METODOS

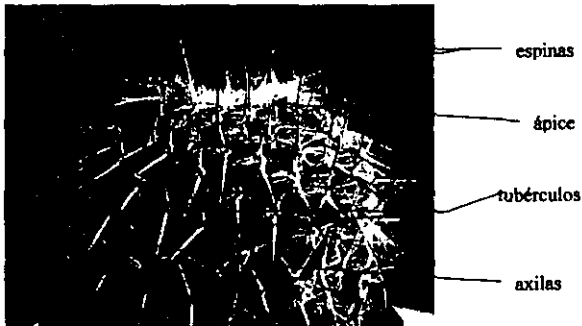
1. MATERIAL VEGETATIVO.

1.1. Semillas de *Mammillaria carmenae*.

Para obtener plántulas de *M. carmenae*, se emplearon 63 semillas de aproximadamente 1 mm de longitud, de forma piriforme y de color café-oscuro.

1.2. Plantas de *Mammillaria carmenae* y *M. herrerae*

Se utilizaron tres plantas de *M. carmenae* y cuatro de *M. herrerae*, todas fueron donadas para la realización del presente trabajo, las 7 plantas procedían de invernaderos, de tamaño de 12 cm aproximadamente y de 3 a 4 años de edad. Debido al escaso material que se disponía de éstas especies de estudio, se utilizaron dos especies (*M. elongata* y *M. gracilis*) de prueba para los tratamientos de desinfección y antioxidación, estas plantas se colectaron de mercados de la Ciudad de México. Las plantas se seccionaron para obtener inóculos de raíz, tallo, médula, axilas, ápice y tubérculos, (ver lamina 3).



Lamina 3.- *Mammillaria spp.* partes de la planta donde se seccionó para la obtención de inóculos.

2. MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado, para la germinación de semillas, siembra de inóculos, en las diferentes matrices con combinaciones de reguladores del crecimiento, en la inducción de callo y su posterior multiplicación.

En la preparación del medio de cultivo se incluyeron tanto compuestos inorgánicos como orgánicos y agar como soporte sólido para el medio.

Dentro de los compuestos inorgánicos se emplearon las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) las cuales se presentan en el cuadro 1.

El nutriente orgánico empleado como fuente de carbono y de energía, fue la sacarosa en concentración de 50 g/l. El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1 N y/o HCl 1 N.

El estado físico del medio de cultivo fue de gel-sólido, utilizándose agar al 1%, añadido al medio de cultivo y fundido a una temperatura de 121°C.

El medio se distribuyó en frascos de vidrio (capacidad de 100 ml aproximadamente) a razón de 15 ml por frasco cerrados con tapas de polipropileno y sellados con cinta plástica.

La esterilización del medio de cultivo se efectuó en autoclave a una temperatura de 121°C. y 1.5 Kg/cm² de presión durante 15 minutos, previo a la siembra.

3. CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Las condiciones de incubación fueron semejantes para semillas e inóculos de las plantas de *Mammillaria*.

Los frascos con semillas e inóculos se colocaron en anaqueles, la iluminación fue suministrada por 6 lámparas Sylvania Gro-Lux de 10 wats, a una temperatura de 25°C \pm 2°C en el día y 18°C \pm 2°C durante la noche. El fotoperiodo fue de 16 horas luz por 8 horas oscuridad. La humedad relativa fue de aproximadamente de 70-80%.

NITRATOS	FÓRMULA QUÍMICA	CONCENTRACIÓN mg/l
NITRATO DE AMONIO	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1650
NITRATO DE POTASIO	KNO_3	1900
SULFATOS		
SULFATO DE MAGNESIO	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370
SULFATO MANGANOSO	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
SULFATO DE ZINC	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8.6
SULFATO DE COBRE	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025
HALÓGENOS		
CLORURO DE CALCIO	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440
IODURO DE POTASIO	KI	0.83
CLORURO DE COBALTO	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.025
B0_3 ; PO_4 ; MoO_4		
BIFOSFATO DE POTASIO	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	170
ÁCIDO BÓRICO	$\text{H}_3 \text{BO}_3$	6.2
MOLIBDATO DE SODIO	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2.5
QUELATOS		
SULFATO DE FIERRO	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784
Na_2EDTA	Na_2EDTA	3.724

CUADRO I. SALES INORGÁNICAS PROPUESTAS EN EL MEDIO DE Murashige Y Skoog, (1962).

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1. Germinación de semillas de *M. carmenae*.

Se utilizó el medio M. S. modificado sin reguladores del crecimiento, ni nutrientes orgánicos.

4.2 Desinfestación y siembra de semillas *in vitro* e *in vivo*.

4.2.1 Desinfestación de semillas.

Las semillas se lavaron con agua y detergente comercial, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en tres paquetes de papel filtro conteniendo 21 semillas, cada uno. Estos se sumergieron en etanol al 70% V/V, durante tres y cinco minutos, posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 1.2% de cloro activo, según los tratamientos establecidos (cuadro, 2). Por último se les aplicó un triple enjuague con agua destilada estéril.

4.2.2 Siembra de semillas *in vitro*.

La siembra de semillas se realizó bajo condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar de aire filtrado marca Veco Mod. GMLF-12 con filtros Hepa.

Para la siembra de semillas, se colocó cada paquete en caja petri esterilizada, con la ayuda de pinzas de disección se tomaron las semillas y se sembraron en frascos con medio de cultivo, poniendo tres semillas por frasco. Cada frasco se marcó para su identificación posterior. (Tratamiento y Fecha de Siembra).

4.2.3 Siembra de semillas *in vivo*.

A los treinta días después de la siembra *in vitro*, se observó que ninguna de las semillas había germinado, por lo cual se decidió transplantar 31 semillas a un sustrato (mezcla de tierra negra con agrolita en una proporción de 2:8 P/P, previamente esterilizada), cubriendo un tercio del volumen del frasco. A continuación se pusieron tres semillas por frasco y se les regó con agua destilada estéril, sellándose con plástico adherente. A los 10 días las 31 semillas se sometieron a un tratamiento de escarificación mediante la aplicación de calor, a una temperatura de 32.5° C en una estufa, por un periodo de 36 hrs., y 15 días después se sometieron las 32 semillas restantes al mismo tratamiento de escarificación con calor y se transplantaron al sustrato similar al que se sembraron previamente las 31 semillas.

TRATAMIENTO	ETANOL AL 70 %	HIPOCLORITO DE SODIO AL 1.2%	AGUA DESTILADA
	MINUTOS DE EXP	MINUTOS DE EXP	ENJUAGUES
1	3	10	3
2	3	15	3
3	5	20	3

CUADRO 2. Tratamiento de desinfección para la siembra *in vitro* de semillas de *Mammillaria carmenae*.

4.3 Desinfección y siembra de inóculos de *Mammillaria spp.*

Fueron sembrados en el medio de M. S. Modificado los inóculos de las dos especies de prueba (*Mammillaria elongata* y *M. gracilis*), para los tratamientos de desinfección y antioxidación, sin añadir ningún otro ingrediente.

4.3.1 Inóculos de *Mammillaria elongata* y *M. gracilis*.

Para determinar el mejor tratamiento de desinfección con las dos especies de prueba se utilizaron tres tipos de desinfectantes: 1. - alcohol etílico, 2. - hipoclorito de calcio y 3. - hipoclorito de sodio, (Shabde y Murashige, 1977; Villalobos, 1979). Una vez obtenidos los resultados, se aplicaron a las dos especies de estudio.

Las pruebas de desinfección se realizaron de acuerdo con en el cuadro 3. Las plantas sin espinas, se lavaron con solución jabonosa y se enjuagaron tres veces con agua corriente. Se colocaron en vasos de precipitado con una solución de etanol al 70% V/V, posteriormente se transfirieron a una solución de hipoclorito de calcio al 4% P/V y por último se pusieron en una solución al 1.2% de cloro activo de hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de exposición y se enjuagaron con agua destilada estéril.

Una vez establecido el tratamiento de desinfección adecuado los inóculos se trasladaron a diferentes agentes antioxidantes, ácido ascórbico y ácido cítrico y exposición a frío, (ver cuadro 4), para determinar el mejor tratamiento de antioxidación.

TRATAMIENTO	LAVADO EN SOLUCIÓN JABONOSA	ETANOL 70% V/V	HIPOCLORITO DE CALCIO 4% P/V	HIPOCLORITO DE SODIO 1.2% CLORO ACTIVO	ENJUAGUE CON AGUA DESTILADA ESTERILIZADA
		TIEMPO EXPOSICIÓN MINUTOS	TIEMPO EXPOSICIÓN MINUTOS	TIEMPO EXPOSICIÓN MINUTOS	
A	SI	3	20	15	3
B	SI	3	20	30	3
C	SI	5	20	45	3
D	SI	5	20	60	3

CUADRO 3. TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN PARA INÓCULOS DE *Mammillaria gracilis* y *M. elongata*.

TRATAMIENTO	ÁCIDO ASCÓRBICO g/l	ÁCIDO CÍTRICO g/l	ALMACENAMIENTO A 7.8 ° C TIEMPO (hrs)
I	0	0	0
II	0.1	0.15	0
III	1.0	1.5	24
IV	10.0	15.0	24

CUADRO 4. AGENTES ANTIOXIDANTES UTILIZADOS PREVIO A LA SIEMBRA DE INÓCULOS DE: *Mammillaria gracilis* y *M. elongata*.

4.3.2 Inóculos de *Mammillaria carmenae* y *M. herrerae*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de desinfestación y antioxidación ensayados para las especies de prueba, se utilizó el tratamiento "C" de desinfestación con la solución de etanol al 70% V/V por 3 y 5 minutos, la solución de hipoclorito de calcio al 4% P/V durante 20 minutos y por último en una solución al 1.2% de cloro activo de hipoclorito de sodio por 45 minutos, y el tratamiento IV de antioxidación con 10 g/l de ácido ascórbico y 15 g/l de ácido cítrico y refrigeración por 24 hrs.

4.3.3 Siembra de inóculos de *Mammillaria spp.*

La siembra de inóculos se realizó bajo condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar de aire filtrado.

Para la siembra de inóculos, la planta se seccionó apartando los tubérculos y cortándolos a manera de rodajas de aproximadamente 4.0 a 5.0 mm de grosor, sembrando inóculos circulares. En el medio de cultivo, se colocaron tres inóculos por frasco. Se cerraron con tapas de polipropileno

sellándose. Los frascos se pusieron por espacio de 24 hrs., en refrigeración a una temperatura de 7.8°C, ver cuadro 3, después se transfirieron al cuarto de incubación.

4.4 Inducción de callo.

Se empleó en el medio de cultivo M. S. modificado y se adicionaron los siguientes compuestos: tiamina-HCl al 0.4 mg/l, inositol 100 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido pantotenoico 1 mg/l, biotina 1 mg/l y ácido fólico 1 mg/l.

De los reguladores del crecimiento se utilizaron: bencil-aminopurina (BAP), ácido naftalen-acético (ANA), cinetina (CIN) y ácido indol-acético (AIA), (ver cuadros 5, 6, 7 y 8) en tres matrices de concentraciones de ANA/BAP y una con AIA/CIN.

ÁCIDO NAFTALEN-ACÉTICO (ANA) mg/l	BENCIL AMINO-PURINA (BAP) mg/l			
	0.00	0.50	5.00	50.00
0.00	1	2	3	4
0.50	5	6	7	8
5.00	9	10	11	12
50.00	13	14	15	16

CUADRO 5. PRIMERA MATRIZ CON ÁCIDO NAFTALEN-ACÉTICO (ANA) Y BENCIL AMINOPURINA (BAP), PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO.

ACIDO NAFTALEN - ACETICO (ANA) mg/l	BENCIL AMINO-PURINA (BAP) mg/l				
	0.00	0.50	5.00	50.00	100.00
0.00	1	2	3	4	5
0.50	6	7	8	9	10
5.00	11	12	13	14	15
50.00	16	17	18	19	20
100.00	21	22	23	24	25

CUADRO 6. SEGUNDA MATRIZ CON ÁCIDO NAFTALEN-ACÉTICO (ANA) Y BENCIL AMINO-PURINA (BAP), PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO.

ACIDO NAFTALEN- ACETICO (ANA) mg/l	BENCIL AMINO-PURINA (BAP) mg/		
	5.0	25.0	50.0
0.5	I	II	III
5.0	IV	V	VI
50.0	VII	VIII	IX

CUADRO 7. TERCERA MATRIZ CON ÁCIDO NAFTALEN-ACÉTICO (ANA) Y BENCIL AMINO-PURINA (BAP), PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO.

ACIDO INDOL-ACÉTICO (AIA) mg/l	CINETINA (CIN) mg/l				
	0.00	0.50	5.00	50.00	100.00
0.00	1	2	3	4	5
0.50	6	7	8	9	10
5.00	11	12	13	14	15
50.00	16	17	18	19	20
100.00	21	22	23	24	25

CUADRO 8. PRIMERA MATRIZ CON ÁCIDO INDOL-ACÉTICO (AIA) Y CINETINA (CIN), PARA LA INDUCCIÓN DE CALLO.

4.5 Multiplicación de callo.

Para determinar la Razón de Crecimiento "R. C." y Biomasa del callo inducido, se probaron subcultivos en diferentes fases en la multiplicación del tejido calloso. Para la FASE I se empleó la segunda matriz de reguladores de crecimiento ANA/BAP para la inducción del tejido calloso. En la FASE II se empleó el medio M. S. modificado, suplementado con diferentes componentes para cada uno de los subcultivos que se realizaron, (ver cuadro 9). Por último en la FASE III se utilizó el subcultivo IV con diferentes concentraciones de AIA/CIN, (ver cuadro 10).

SUPLEMENTOS DEL MEDIO M. S. MODIFICADO	FASE I	FASE II			FASE III
	ORIGINAL M. S.	SUBCULTIVO I	SUBCULTIVO II	SUBCULTIVO III	SUBCULTIVO IV
REG. DEL CRECIMIENTO	CONCENTRACION ANA/BAP	AIA/CIN 5-50 mg/l	AIA/CIN 5-50 mg/l	AIA/CIN 5-50 mg/l	MATRIZ AIA/CIN
SACAROSA	5%	5%	5%	5%	5%
TIAMINA-HCl	0.4 mg/l	0.4 mg/l	0.4 mg/l	0.4 mg/l	0.4 mg/l
MYOINOSITOL			100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l
PIRIDOXINA			1.0 mg/l	1.0 mg/l	1.0 mg/l
Ac. PANTOTENOICO			1.0 mg/l	1.0 mg/l	1.0 mg/l
Ac. FÓLICO			1.0 mg/l	1.0 mg/l	1.0 mg/l
BIOTINA			1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
PLATANO				150 g/l	150 g/l
AGAR COMO SOPORTE SÓLIDO	1%	1%	1%	0.8%	0.8%

CUADRO 9. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LOS SUBCULTIVOS PARA LA MULTIPLICACIÓN DE CALLO DE *M. carmenae* y *M. herrerae*.

ÁCIDO INDOL-ACETICO (AIA) mg/l	CINETINA (CIN) mg/l		
	5.0	25.0	50.0
0.5	A	B	C
5.0	D	E	F
50.0	G	H	I

CUADRO 10. MATRIZ PARA LA MULTIPLICACIÓN DE CALLO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AIA/CIN, FASE III (SUBCULTIVO IV). *M. carmenae* y *M. herrerae*

5. EVALUACIÓN DE GERMINACIÓN, INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE CALLO.

5.1 Germinación de semillas de *Mammillaria carmenae*

5.1.1.- *Velocidad de contaminación.* Se realizaron observaciones diarias para determinar el tiempo en días en que se presenta la contaminación.

5.1.2.- *Porcentaje de contaminación.* Este dato se obtuvo de la cantidad de inóculos contaminados por hongo o bacteria con respecto al total de inóculos sembrados originalmente.

5.2.- Germinación

5.2.1.- *Velocidad de germinación.* Los datos, se consiguieron por observaciones diarias a partir de la fecha de siembra de las semillas tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* por un período de tres meses.

5.2.2.- *Porcentaje de germinación.* Se midió tomando el total de semillas que hayan germinado ya sea *in vitro* o *in vivo* con respecto al total de semillas, se tomaron como base 63 semillas.

5.3.- *Oxidación.* Para el presente trabajo lo definimos como la cantidad de semillas o inóculos que al sembrarse se obscurecieron y necrosaron.

5.3.1.- *Velocidad de oxidación.* Se realizaron observaciones diarias desde el inicio de la primera semilla o inóculo oxidado hasta que dejaron de oxidarse, esto con el fin de establecer la velocidad de la oxidación.

5.3.2.- *Porcentaje de oxidación.* Se tomo como la cantidad de inóculos que se necrosaron con respecto a la cantidad total de inóculos sanos.

5.4. Inducción de callo.

5.4.1.- *Combinación de reguladores de crecimiento.* Se evaluaron combinaciones de Auxinas – Citocininas para determinar el porcentaje de generación de callo, y la organogénesis (raíz, brote o plántula) ver cuadros 5, 6 7 y 8.

5.4.2.- *Tipo de inóculo que origino al callo.* De los inóculos usados: ápices, raíces, tallo, areolas, axilas y tubérculos se determinó que inóculo generó tejido calloso.

5.4.3.- *Posición del inóculo.* Para la generación de callo, los inóculos se colocaron en medio de cultivo, con tres posiciones diferentes 1. "Posición Vertical", con la base del tubérculo adherida a la superficie del medio básico, 2. "posición Horizontal", que el tubérculo sus paredes estén en contacto con la superficie del medio y 3. "Posición Vertical invertida", que la areola sea la parte

que este en contacto con la superficie, esto para determinar la posición del inóculo mas adecuada para generar callo.

5.4.4.- Tipo de callo generado. Se clasificó al callo obtenido de acuerdo a los siguientes parámetros: color, consistencia, apariencia y velocidad de crecimiento.

5.4.5.- Tiempo de exposición en medio fresco. Se midió el tiempo que puede estar el inóculo o callo en el medio de cultivo y conservar sus características sin llegar a deshidratarse o necrosarse.

5.5. Multiplicación de callo. (FASE I, II Y III).

5.5.1.- Combinación de auxina – citocinina. Esto se realizó para establecer la combinación adecuada de estos reguladores para la multiplicación de los callos, ver cuadros 9 y 10.

5.5.2.- Razón de crecimiento, (R. C.)

Se comparo la cantidad de callo producido en cada subcultivo con relación al callo original sembrado, se cuantifico la R. C., durante las fases de inducción y multiplicación de los callos.

5.5.3.- Biomasa generada.

Se midió la cantidad de biomasa generada durante las fases de inducción y multiplicación de los callos.

IV. RESULTADOS

A. Semillas de *Mammillaria carmenae*.

1. Desinfestación.

Todos los tratamientos fueron efectivos para la desinfestación, ya que se obtuvo el 0% de contaminación, sin embargo se eligió el tratamiento menos agresivo.

2. Siembra *in vitro*

Al cabo de 30 días las semillas sembradas en condiciones *in vitro* no germinaron.

Siembra *in vivo*

3. Al cabo de 20 días con la aplicación de calor, y estando ya en condiciones de sustrato estéril, germinó el 19% de semillas, ver cuadro 11.

3.1. Velocidad de germinación.

El inicio de la misma se tomo a partir del momento en que las semillas se transplantaron a sustrato estéril, se observo que el día 15 germinaron dos semillas, al día 18 germinaron cuatro siendo este el clímax y decayó al día 21 con la germinación de dos semillas, disminuyendo a medida que transcurrió el tiempo, esporádicamente germinaron más semillas (ver figura 1).

SIEMBRA	NÚMERO DE SEMILLAS	TRATAMIENTO DE DESINFESTACIÓN	PORCENTAJE DE		
			CONTAMINACIÓN	OXIDACIÓN	GERMINACIÓN
<i>in vitro</i>	63	SI	0	0	0
<i>in vivo</i>	63	***	0	0	19

CUADRO 11. RESULTADOS DE LA SIEMBRA *in vitro* e *in vivo* DE SEMILLAS DE *Mammillaria carmenae*.

*** las semillas provienen de condiciones asépticas.

Días	15	18	21	52	70	85	93	Total
Semillas germinadas	2	4	2	1	1	1	1	12

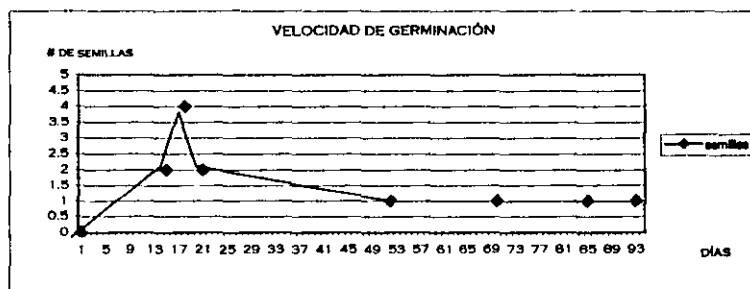


FIGURA 1. RESULTADOS DE LA VELOCIDAD DE GERMINACIÓN *in vivo* DE SEMILLAS DE *Mammillaria carmenae*

B. Inducción de callo.

1. Desinfección y antioxidación en inóculos de *M. gracilis* y *M. elongata*.

Se reportan los resultados obtenidos en los tratamientos de desinfección y antioxidación aplicados a inóculos de las plantas de prueba (*M. gracilis* y *M. elongata*).

1.1. Contaminación.

En el tratamiento "A" se observó el 100% de contaminación, tanto por bacterias como por hongos, además de que la contaminación por hongos ocurrió a las 24 hrs. posteriores a la siembra. En el tratamiento "B", se observó una ligera disminución de la contaminación, y fue ésta del 85% al 100%, siendo alto el porcentaje. Con el tratamiento "C" se logró un descenso muy sensible, y llegó a ser del 22.5% al 28.3%, ver cuadro 12, la contaminación se presentó al quinto y sexto día y posteriormente al séptimo ya no aparece.

No obstante los resultados conseguidos se ensayaron otro tratamiento, el "D", sin embargo, no se alcanzó mejores resultados, ya que afecto mucho a los inóculos, al dejarlos casi sin coloración verde y llegándolos a matar en algunos casos.

1.2. Oxidación.

En las primeras siembras se obtuvo un alto porcentaje de oxidación con el tratamiento I y II, sin embargo esta descendió con los tratamientos posteriores hasta el 20.7% en promedio con el tratamiento IV, ver cuadro 13.

Por lo tanto, el tratamiento adecuado de desinfestación fue el "C", ya que en los últimos cuatro tratamientos del "C" de desinfestación con la solución de etanol al 70% V/V por 3 minutos, la solución de hipoclorito de calcio al 4% P/V durante 20 minutos y por último en una solución al 1.2% de cloro activo de hipoclorito de sodio por 45 minutos, logró bajarla hasta el 24.7% en promedio.

Mientras tanto el tratamiento IV de antioxidantes con 10 g/l de ácido ascórbico y 15 g/l de ácido cítrico, fue el óptimo ya que en las últimas 4 siembras fueron del 24.7% promedio.

NÚMERO DE SIEMBRA	ESPECIE DE <i>Mammillaria</i>	TRATAMIENTO DE DESINFESTACIÓN	CANTIDAD DE INÓCULOS SEMBRADOS	PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN
1	<i>M. gracilis</i>	A	90	100
2	<i>M. gracilis</i>	B	91	91.9
3	<i>M. gracilis</i>	B	90	100
4	<i>M. gracilis</i>	B	90	100
5	<i>M. gracilis</i>	B	86	95.7
6	<i>M. elongata</i>	B	82	99.2
7	<i>M. elongata</i>	B	90	85.1
8	<i>M. elongata</i>	C	90	100
9	<i>M. elongata</i>	C	90	22.5
10	<i>M. elongata</i>	C	90	23.4
11	<i>M. elongata</i>	C	90	24.5
12	<i>M. elongata</i>	C	85	28.3
13	<i>M. elongata</i>	D	59	100

CUADRO 12. RESULTADOS A LOS TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN DE INÓCULOS DE *Mammillaria gracilis* y *M. elongata*.

NÚMERO DE SIEMBRA	ESPECIE DE MAMMILLARIA	TRATAMIENTO DE ANTIOXIDACIÓN	CANTIDAD DE INÓCULOS SANOS	PORCENTAJE DE OXIDACIÓN
1	<i>M. gracilis</i>	NINGUNO	0	**
2	<i>M. gracilis</i>	NINGUNO	0	**
3	<i>M. gracilis</i>	NINGUNO	0	**
4	<i>M. gracilis</i>	NINGUNO	0	**
5	<i>M. gracilis</i>	I	4	90
6	<i>M. elongata</i>	II	4	90
7	<i>M. elongata</i>	II	13	85
8	<i>M. elongata</i>	III	0	**
9	<i>M. elongata</i>	III	70	70
10	<i>M. elongata</i>	IV	69	20
11	<i>M. elongata</i>	IV	86	25
12	<i>M. elongata</i>	NINGUNO	0	**
13	<i>M. elongata</i>	IV	61	17

CUADRO 13. RESULTADOS A LOS TRATAMIENTOS DE ANTIOXIDACIÓN DE INÓCULOS DE *Mammillaria gracilis* y *M. elongata*.

** No se cuantifico ya que no hubo inóculos sanos.

2. Desinfestación y antioxidación en inóculos de las especies de prueba y de estudio.

2.1 Contaminación y Oxidación

Se realizaron 7 siembras en las cuales se aplicó el tratamiento "C" de desinfestación y el "IV" de antioxidación y se observó que no hubo diferencias en cuanto a la contaminación por cada especie, todas cayeron en el rango del 17.2% al 25.2% de contaminación, esto confirmo los resultados obtenidos anteriormente de contaminación con las especies de prueba. Tampoco se observaron diferencias en cuanto a la oxidación de los inóculos por especie, cayendo dentro del rango del 13.2% al 21.3%, ver cuadro 14.

NÚMERO DE SIEMBRA	ESPECIE DE <i>Mammillaria</i>	PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN	PORCENTAJE DE OXIDACIÓN
1	<i>M. carmenae</i>	23.7	18.5
2	<i>M. herrerae</i>	25.2	15
3	<i>M. elongata</i>	18.9	13.2
4	<i>M. elongata</i>	21.3	17.5
5	<i>M. gracilis</i>	22.4	21.3
6	<i>M. gracilis</i>	19.8	20.1
7	<i>M. gracilis</i>	17.2	18.7

CUADRO 14. RESULTADOS DE CONTAMINACIÓN Y OXIDACIÓN DE INÓCULOS DE *Mammillaria* spp.

3. Matrices de reguladores del crecimiento.

3.1. Primera matriz de reguladores del crecimiento ANA/BAP, (ver cuadro 2).

3.1.1 Generación de callo.

Las siembras de inóculos, primero se realizaron en medio básico sin reguladores del crecimiento para controlar la contaminación. En *M. carmenae* al día 15 de realizada la siembra los inóculos se transplantaron a medio básico modificado con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento de ANA y de BAP. A los 22 días se transplantaron a medio fresco y se observó que en el tratamiento "8" con 0.5/50 mg/l de ANA/BAP originó callo de color verde intenso y de consistencia compacta, dicho callo se formó a partir de inóculo de ápice de la planta, teniendo en este momento el 100% de respuesta, ver cuadro 15.

En *M. elongata*, solo el tratamiento 15 con una concentración de 50/5 mg/l de ANA/BAP generó callo a partir del inóculo de tubérculo (mamila), fue callo verde opaco con pelillos alrededor de la base sin llegar a diferenciar espinas, sin embargo, este callo no creció, conservó constante su peso durante dos meses y finalmente empezó a deshidratarse y necrosarse perdiéndose, por tanto se logró el 50% a la generación de callo con este tratamiento, ver cuadro 15.

M. gracilis y *M. herrerae* no respondieron en esta etapa a la generación de callo.

3.1.2 Generación de raíz.

Con *Mammillaria. gracilis*, se logró el 50% de respuesta a la generación de raíces, en la concentración de 5 mg/l de ANA, y fue constante en tres tratamientos, el 10, 11 y 12, ver cuadro

15, mientras que *M. elongata* solo respondió con el 25% en un tratamiento con 0.0/50 mg/l de ANA/BAP a la generación de raíz.

Mammillaria carmenae y *M. herrerae* no respondieron a la generación de raíz, en esta primera matriz.

3.1.3 Generación de brotes.

Ninguna de las cuatro especies de *Mammillaria* respondió a la generación de brotes.

3.1.4 Generación de plántulas.

En *M. carmenae* la respuesta a la generación de plántulas se originó previamente de la generación de callo, es decir, con el tratamiento " 8 " cuya concentración fue de 0.5/50 mg/l de ANA/BAP, logrando obtener una plántula. El proceso de desdiferenciación fue el siguiente: al cuarto día a partir de que surgieron las mamilas del tejido verde caloso, se apreciaron bien las mamilas con areolas y espinas frágiles, al quinto día se diferencio bien la plántula de *M. carmenae*.

M. gracilis, *M. elongata* y *M. herrerae* no respondieron a la generación de plántulas en esta primera matriz.

ESPECIE DE <i>Mammillaria</i>	TRATAMIENTO		TIPO DE INÓCULO QUE RESPONDIO	PORCENTAJE DE RESPUESTA A LA GENERACION DE:				TIPO DE RESPUESTA
	NÚMERO	ANA/BAP mg/l		RAÍZ	BROTE	CALLO	PLÁNTULA	
<i>M. carmenae</i>	8	0.5/50	ÁPICE	0	0	100	UNA	CALLO VERDE
<i>M. herrerae</i>	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>M. elongata</i>	4	0.0/50	ÁPICE	25	0	0	0	RAÍZ CAFÉ
<i>M. elongata</i>	15	50.0/5.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	CALLO VERDE
<i>M. gracilis</i>	10	5.0/0.5	ÁPICE	50	0	0	0	RAÍZ BEIGE
<i>M. gracilis</i>	11	5.0/5.0	HIJUELO	50	0	0	0	RAÍZ BEIGE
<i>M. gracilis</i>	12	5.0/50.0	HIJUELO	50	0	0	0	RAÍZ BEIGE

CUADRO 15, RESPUESTA A LA PRIMERA MATRIZ DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN ANA/BAP, DE INÓCULOS DE *Mammillaria gracilis*, *M. elongata*, *M. carmenae* y *M. herrerae*.

3.2. Segunda matriz de reguladores del crecimiento de ANA/BAP.

Se emplearon plantas de *Mammillaria carmenae* y *M. herrerae*. Tomando en cuenta los resultados conseguidos con las cuatro especies de *Mammillaria* en la primera matriz, y teniendo como referencia que en tres tratamientos con 50 mg/l de BAP respondieron inóculos a la generación de raíz, callo y éste último dio origen a plántula, se amplió el rango de concentraciones a 100 mg/l de ANA y 100 mg/l de BAP, (ver cuadro 6).

M. carmenae en esta matriz sólo respondió en el tratamiento 19 de ANA/BAP, mientras que *M. herrerae* respondió en 16 tratamientos a la generación de callo.

3.2.1 Generación de callo.

Los inóculos de *M. herrerae*, en 16 tratamientos respondieron a la generación de callo, ver cuadro 15, los callos logrados en once tratamientos conservaron constante su peso, color y consistencia durante dos meses, al cabo de este tiempo comenzaron a deshidratarse y necrosarse, para posteriormente perderse, subsistieron los callos de 5 tratamientos, el 9, 10, 14, 18 y 19 a los cuales se les aplicó los tratamientos de la segunda etapa de investigación, es decir, la multiplicación del tejido calloso, que se comentará ampliamente más adelante.

De esta matriz, en los nuevos rangos que se ampliaron hubo respuesta en 33.3%, en los tratamientos 5, 6, 18, 22 y 25.

En dos tratamientos se logró el 100% de respuesta a la generación de callo, en los tratamientos 13 y 21, sin embargo posteriormente se necrosaron.

Todos los callos se originaron a partir del inóculo del tubérculo, dando el 33.3% de respuesta a la generación de callo en promedio.

El tejido calloso originado en el tratamiento "9" con 0.5/50 mg/l de ANA/BAP, fue un callo de coloración verde claro, de consistencia moderada y con pelillos; el originado en el tratamiento "10" con 0.5/100 mg/l de ANA/BAP fue un callo verde claro, la parte inferior oscura y con pelillos; el callo del tratamiento "14" con 5/50 mg/l de ANA/BAP, fue de color verde oscuro, de consistencia moderada y con pelillos; y por último el callo del tratamiento "19" con 50/50 mg/l de ANA/BAP fue de color verde claro de consistencia friable, blanquiza en la parte inferior y con pigmentos de color rojo-rosado y con abundante pelillos blancos, ver cuadro 16.

M. carmenae respondió a la generación de callo con el tratamiento 19 de ANA/BAP.

3.2.2 Generación de raíz.

Fue del 0% tanto para *M. carmenae* y *M. herrerae*.

3.2.3 Generación de brotes.

Fue del 0% tanto para *M. carmenae* y *M. herrerae*.

3.2.4 Generación de plántulas.

Fue del 0% tanto para *M. carmenae* y *M. herrerae*.

ESPECIE DE MAMILLARIA	TRATAMIENTO		TIPO DE INÓCULO QUE RESPONDIÓ	PORCENTAJE DE RESPUESTA A LA GENERACION DE:				TIPO DE RESPUESTA
	NÚMERO	ANA/BAP mg/l		RAÍZ	BROTE	CALLO	PLÁNTULA	
<i>M. herrerae</i>	4	0.0/50.0	TUBÉRCULO	0	0	66	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	5	0.0/100.0	TUBÉRCULO	0	0	33	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	6	0.5/0.0	TUBÉRCULO	0	0	33	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	7	0.5/0.5	TUBÉRCULO	0	0	66	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	9	0.5/50.0	ÁPICE	0	0	66	0	CALLO VERDE
<i>M. herrerae</i>	10	0.5/100.0	TUBÉRCULO	0	0	25	0	CALLO VERDE CLARO
<i>M. herrerae</i>	11	5.0/0.0	TUBÉRCULO	0	0	66	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	12	5.0/0.5	TUBÉRCULO	0	0	50	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	13	5.0/5.0	TUBÉRCULO	0	0	100	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	14	5.0/50.0	TUBÉRCULO	0	0	80	0	CALLO VERDE OSCURO
<i>M. herrerae</i>	16	50.0/0.0	TUBÉRCULO	0	0	66	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	18	50.0/5.0	TUBÉRCULO	0	0	33	0	CALLO VERDE
<i>M. herrerae</i>	19	50.0/50.0	TUBÉRCULO	0	0	66	0	CALLO VERDE FRIABLE
<i>M. herrerae</i>	21	100.0/0.0	TUBÉRCULO	0	0	100	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	22	100.0/0.5	TUBÉRCULO	0	0	33	0	NO CRECIO MAS
<i>M. herrerae</i>	25	100.0/100.0	TUBÉRCULO	0	0	33	0	NO CRECIO MAS

CUADRO 16. RESPUESTA A LA SEGUNDA MATRIZ DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN ANA/BAP, DE INÓCULOS DE *Mammillaria herrerae*.

3.3. Tercera matriz de reguladores del crecimiento de ANA/BAP.

Esta matriz se realizó con el fin de confirmar los resultados conseguidos en las anteriores matrices con 50 mg/l de BAP, reduciendo el rango de concentraciones de 5, 25 y 50 mg/l de ANA/BAP, (ver cuadro 7), para lo cual se emplearon plantas de *M. carmenae* y *M. herrerae*.

3.3.1 Generación de callo.

M. carmenae, respondió en ocho tratamientos, fue variable el porcentaje de respuesta en cada tratamiento, desde 25% hasta el 66.6%, sin embargo, el tratamiento III con 0.5/50 mg/l de ANA/BAP se tuvo el 25% de respuesta, similar al conseguido en las dos anteriores matrices, ver cuadro 17, además el tratamiento II con 0.5/25 mg/l de ANA/BAP el callo ahí formado, fue de coloración verde clara, consistencia compacta y con pelillos blanquecinos, posteriormente dio origen a una plántula.

M. herrerae, respondió en 50% a la generación de callo en promedio, en seis tratamientos. Todos los callos se originaron a partir de inóculo del tubérculo, fueron callos de coloración verde claro y consistencia moderada, ver cuadro 18. En el tratamiento III con 0.5/50 mg/l de ANA/BAP el callo se origino a partir del ápice de la planta, sin embargo en esta siembra se perdieron los callos por contaminación de hongos verdes por errores en la manipulación del callo.

El callo del tratamiento III, obtenido a partir del ápice dio origen a raíz principal de color café oscuro y seis plántulas con areolas y espinas.

3.3.2 Generación de raíz.

En *M. carmenae* se generó una raíz principal de color café originada a partir de inóculo de tubérculo, la respuesta se consiguió con el tratamiento IV con 5/5 mg/l de ANA/BAP, por tanto fue el 50% de respuesta, ver cuadro 17.

En *M. herrerae* se generó raíz principal de color café originada a partir del ápice de la planta, con el tratamiento III de 0.5/50 mg/l de ANA/BAP, consiguiendo el 100% de respuesta, ver cuadro 18.

3.3.3 Generación de brotes.

Fue del 0% tanto para *M. carmenae* y *M. herrerae*.

3.3.4 Generación de plántulas.

En *M. carmenae* se generó una plántula de color verde claro, dicha plántula se origino partir de callo de tubérculo. La concentración de reguladores fue de 0.5/25 mg/l de ANA/BAP, tratamiento II. Para este caso se tuvo el 33.3% de respuesta.

Con *M. herrerae*, se generaron seis plántulas de color verde claro, con areolas y espinas blanquecinas, delgadas, originándose a partir de callo del ápice de la planta en el tratamiento III con 0.5/50 mg/l de ANA/BAP, sin embargo las seis plántulas se perdieron al igual que los callos por contaminación de hongos.

ESPECIE DE <i>MAMMI LLARIA</i>	TRATAMIENTO		TIPO DE INÓCULO QUE RESPONDIO	PORCENTAJE DE RESPUESTA A LA GENERACION DE:				TIPO DE RESPUESTA
	NÚMERO	ANA/BAP mg/l		RAÍZ	BROTE	CALLO	PLÁNTULA	
<i>M. carmenae</i>	I	0.5/5.0	TUBÉRCULO	0	0	25	0	CALLO VERDE
<i>M. carmenae</i>	II	0.5/25.0	TUBÉRCULO	0	0	33	33	CALLO ORIGINO PLÁNTULA
<i>M. carmenae</i>	III	0.5/50.0	TUBÉRCULO	0	0	25	0	CALLO VERDE
<i>M. carmenae</i>	IV	5.0/5.0	TUBÉRCULO	50	0	50	0	RAÍZ BLANCA
<i>M. carmenae</i>	V	5.0/25.0	TUBÉRCULO	0	0	66	0	CALLO VERDE
<i>M. carmenae</i>	VI	5.0/50.0	TUBÉRCULO	0	0	66	0	CALLO CAFÉ
<i>M. carmenae</i>	VII	50.0/5.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	CALLO VERDE
<i>M. carmenae</i>	VIII	50.0/25.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	CALLO BEIGE
<i>M. carmenae</i>	IX	50.0/50.0	TUBÉRCULO	0	0	0	0	NO RESPONDIO

CUADRO 17. RESPUESTA A LA TERCERA MATRIZ DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN ANA/BAP, DE INÓCULOS DE *Mammillaria carmenae*.

ESPECIE DE MAMMILLARIA	TRATAMIENTO		TIPO DE INÓCULO QUE RESPONDIÓ	PORCENTAJE DE RESPUESTA A LA GENERACIÓN DE:				TIPO DE RESPUESTA
	NÚMERO	ANA/BAP mg/l		RAÍZ	BROTE	CALLO	PLÁNTULA	
<i>M. herreriae</i>	I	0.5/5.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	NO CRECIÓ MAS
<i>M. herreriae</i>	II	0.5/25.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	NO CRECIÓ MAS
<i>M. herreriae</i>	III	0.5/50.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	CALLO VERDE CLARO
<i>M. herreriae</i>	III	0.5/50.0	ÁPICE	100	0	100	6	6 PLÁNTULAS
<i>M. herreriae</i>	IV	5.0/5.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	NO CRECIÓ MAS
<i>M. herreriae</i>	VII	50.0/50.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	NO CRECIÓ MAS
<i>M. herreriae</i>	VIII	50.0/25.0	TUBÉRCULO	0	0	50	0	NO CRECIÓ MAS

CUADRO 18. RESPUESTA A LA TERCERA MATRIZ DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN ANA/BAP DE INÓCULOS DE *Mammillaria herreriae*.

3.4. Primera matriz de reguladores del crecimiento de AIA/CIN.

3.4.1 Generación de callo.

En *M. herreriae* se obtuvo callo de coloración verde claro, consistencia compacta y sin pelillos, dicho callo surgió a partir del inóculo del ápice de la planta, las concentraciones de AIA/CIN son de 5.0/50.0 mg/l respectivamente, se logró el 100% de respuesta con el tratamiento 14, ver cuadro 19.

La relación en la concentración de reguladores del crecimiento es idéntica a los callos obtenidos en la segunda matriz de ANA/BAP.

La planta de *M. carmenae* no respondió a la Generación de callo.

3.4.2 Generación de raíz.

Fue del 0% tanto para *M. carmenae* y *M. herreriae*.

3.4.3 Generación de brotes.

Fue del 0% tanto para *M. carmenae* y *M. herreriae*.

3.4.4 Generación de plántulas.

Del callo obtenido en el tratamiento 14, a los 60 días comenzó a diferenciarse en siete tubérculos de coloración verde claro y posteriormente se originaron siete plántulas de color verde oscuro, con areolas y espinas delgadas, con las mismas concentraciones de reguladores del crecimiento, ver cuadro 19.

ÁCIDO INDOL-ACÉTICO (AIA) mg/l	CINETINA (CIN) mg/l				
	0.00	0.50	5.00	50.00	100.00
0.00	1 *	2 *	3 *	4 *	5 *
0.50	6 *	7 *	8 *	9 *	10 *
5.00	11 *	12 *	13 *	14 7 PLÁNTULAS	15 *
50.00	16 *	17 *	18 *	19 *	20 *
100.00	21 *	22 *	23 *	24 *	25 *

CUADRO 19. RESPUESTA A LA PRIMERA MATRIZ DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN AIA/CIN DE INÓCULOS DE *Mammillaria herrerae*.

* No hubo respuesta.

4. Origen y características del callo.

4.1. Tipo de inóculo que origino callo.

Por lo general los callos se originaron a partir de inóculo del tubérculo, no obstante también se genero callo a partir del ápice de las plantas y éste mismo callo posteriormente dio origen a plántulas.

4.2. Posición del tubérculo para la generación de callo.

Dependiendo de la posición se observó lo siguiente: cuando el tubérculo estuvo en "Posición vertical invertida", fue difícil que pudiera absorber los nutrientes y hormonas, tardándose 45 días para la generación de callo.

La "Posición horizontal" tuvo el mismo efecto que en la anterior posición, sin embargo la base del tubérculo se suberiza rápidamente e imposibilita al inóculo absorber y tardó 48 días para formar callo.

Mientras que en la "Posición vertical" la base cortada antes de suberizarse absorbió los nutrientes y reguladores del crecimiento y formo callo al séptimo día de sembrados los inóculos, observándose que el callo no se origina de la epidermis ni de la parte media del tubérculo siendo posiblemente del procambium.

4.3. Tipo de callo.

Para la descripción de los tipos de callo, se tomaron como base los callos generados con la segunda matriz de reguladores de crecimiento ANA/BAP de la siembra realizada con *Mammillaria herrerae* y son estos los callos que se utilizaron para su multiplicación, (ver cuadro 6).

Al tercer trasplante a medio fresco, los callos comenzaron a multiplicarse más rápidamente y es aquí donde los callos tuvieron las siguientes características, clasificándose en tres tipos de callos: A) "Callo compacto" de crecimiento lento, color verde brillante, consistencia compacta y con pocos pelillos sobre la superficie, estas características se presentaron en los callos del tratamiento "14" y "18" con 5.0/50.0 mg/l y 50.0/50.0 mg/l de ANA/BAP respectivamente.

B) "Callo friable", con pigmentos rojo-rosa, además tuvo crecimiento acelerado y desorganizado en comparación con el callo anterior, fue callo con mucho volumen y poco peso, a este tipo pertenece el callo del tratamiento "19" con 50.0/50.0 mg/l de ANA/BAP.

C) "Callo moderado", presentó características intermedias de los dos tipos de callos descritos anteriormente, de color verde claro, crecimiento moderado y poco friable, con pelillos y tonalidad media, presentaron estas características los callos de los tratamientos "9" y el "10" con 0.5/50.0/l y 0.5/100.0 mg/l de ANA/BAP respectivamente.

4.4. Tiempo de exposición en medio fresco.

Al principio los callos fueron transplantados cada 30 días a medio fresco similar del que se originaron, sin embargo su crecimiento fue lento y no poseyeron características definidas. Se prepararon medios básico con las concentraciones de reguladores del crecimiento ANA/BAP de las cuales se originaron, agregándose 10 ml de medio por frasco y se guardaron. A los 15 días de preparados se transplantaron en ellos los callos y fue cuando comenzó a tener constitución definida y su crecimiento aumento sensiblemente. Para comprobar esto, los callos se transplantaron a medio que tenía 30 días de preparado, lo cual fue perjudicial, ya que su crecimiento disminuyó, además de decolorarse los callos.

Posteriormente se transplantaron a medio con 5 días de preparación y se aumento a 15 ml de medio por frasco, fueron transplantados cada 21 días, observándose un crecimiento mas acelerado, un incremento en su producción de biomasa y mejoraron su consistencia y tonalidad.

5. Multiplicación de tejido caloso, (FASE I, II y III).

En la multiplicación del tejido caloso, se utilizaron los callos generados en la segunda matriz de reguladores del crecimiento de ANA/BAP, (ver cuadro 6). Para su identificación se les nombro de acuerdo al tratamiento de concentración ANA/BAP de donde se generaron originalmente, es decir el callo 9 Mh, el "9" indica el numero de tratamiento de donde se generó el callo y las siglas "Mh" significa el tipo de especie al cual pertenece el callo, es decir corresponde a *Mammillaria herrerae*.

5.1. Razón de crecimiento (R. C.)

En esta sección se reporta los resultados conseguidos de la proporción de callo generado en relación con la cantidad de callo original, siendo esta la Razón de Crecimiento (R. C.). Se expone su comportamiento durante la fase I de inducción del tejido caloso, y la fase II y III de multiplicación del tejido caloso.

FASE	MEDIO DE CULTIVO	PERMANENCIA EN EL MEDIO (DÍAS)	RAZÓN DE CRECIMIENTO					
			CALLO 9 Mh	CALLO 10 Mh	CALLO 14 Mh	CALLO 18 Mh	CALLO 19 Mh	CALLO 19 Mc
I	ORIGINAL	20	1.4	1.8	0.9	0.2	1.9	1.1
I	ORIGINAL	25	3	1.8	1.6	1.5	3.1	4.5
II	SUBCULTIVO I	22	3.1	2	1.4	5.3	2.8	4.8
II	SUBCULTIVO II	23	1.3	2.4	1.5	1.4	2	1.3
II	SUBCULTIVO III	28	2	1.5	0	1.9	1.8	1.6
II	SUBCULTIVO IIII	28	3.9	3	3.7	2.6	4.3	2
III	SUBCULTIVO IV	28	5.5	5.5	1.4	0	4.8	3.3

CUADRO 20. RAZÓN DE CRECIMIENTO DE CINCO CALLOS DE *M. herrerae* Y UN CALLO DE *M. carmenae* DURANTE LA FASE I Y II.

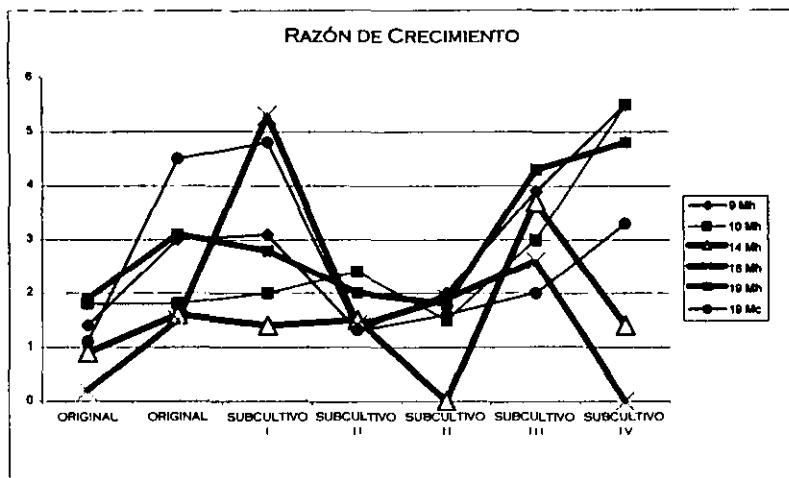


Figura 2. RAZÓN DE CRECIMIENTO DE CINCO CALLOS DE *M. herrerae* Y UN CALLO DE *M. carmenae* DURANTE LA FASE I, II Y III

El callo generado para cada especie tuvo la siguiente Razón de Crecimiento.

Mammillaria herrerae.

Callo 9 Mh.

Este callo originalmente se clasificó como callo del tipo "moderado" por su consistencia y crecimiento, fue constante durante la primera etapa su R. C., ver figuras 2 y 3, aumento al final de la fase I a razón de 3 R.C., ver cuadro 20, esta misma razón se mantuvo en el subcultivo I para descender a 2 R. C. con el subcultivo II, manteniéndose baja. Al momento de transplantarse al subcultivo III aumento considerablemente para ubicarse en 3.9 de R. C., ver cuadro 20.

Callo 10 Mh.

Este callo presentó originalmente consistencia y crecimiento moderado, presentó una R. C. constante de 1.8 en la fase I, y 2 al inicio de la fase II, ver figuras 2 y 4. Posteriormente llegó a una R. C. de 3 al final de la fase II, con el subcultivo III, ver cuadro 20.

Callo 14 Mh.

Al inicio de la fase I, el callo logró una R. C. de 0.9, y creció a 1.6 al final de esta fase y se mantuvo constante hasta el subcultivo II, ver figuras 2 y 5, y termino con 3.7 de R. C. en el subcultivo III, ver cuadro 20.

Callo 18 Mh.

El callo inicio con la R. C. más baja 0.2, indicando que sólo se originó y se mantuvo vivo. Para al final de esta fase llevo a 1.5. Este callo fue del tipo compacto, por su crecimiento y consistencia, y no varió, sino hasta el trasplante al subcultivo I, que llevo a tener una R. C. de 5.3, esta fue una de las R. C. más altas conseguidas, lo que favoreció al callo ya que aumento el volumen de biomasa, ver cuadro 20, para descender a 1.9 con el subcultivo II y de nuevo ascendió con el subcultivo III, ver figuras 2 y 6.

Callo 19 Mh.

Este callo fue tipo friable, con crecimiento acelerado (en volumen) y desorganizado, se observó una R. C. de 1.9, ver cuadro 20. El cual se incremento al final de la fase I, para decrecer paulatinamente con el subcultivo I y II, ver figuras 2 y 7, hasta que tomo de nuevo el 1.8 de R. C. Esto favoreció notablemente al callo, ya que su crecimiento no fue tan acelerado y desorganizado, disminuyó su friabilidad, hasta el punto de hacerlo manejable y mejoró sus características, por último como en la mayoría de los callos con el subcultivo III incremento su R. C. a 4.3, ver cuadro 20.

Mammillaria carmenae

Callo 19 Mc.

Igual que en el anterior callo fue de tipo friable logró R. C. altos de 4.5 y 4.8 al final de la fase I e inicio de la fase II, ver figuras 2 y 8, cuadro 20. Sin embargo al trasplantarlo al subcultivo II su R. C. decreció. Pero esto favoreció al callo, dejando de ser callo friable para ser callo de consistencia y crecimiento semi-moderado, logró una tonalidad verde clara y reafirmó estas nuevas características en cada trasplante, al final volvió a incrementar su R. C. a 2, ver cuadro 20.

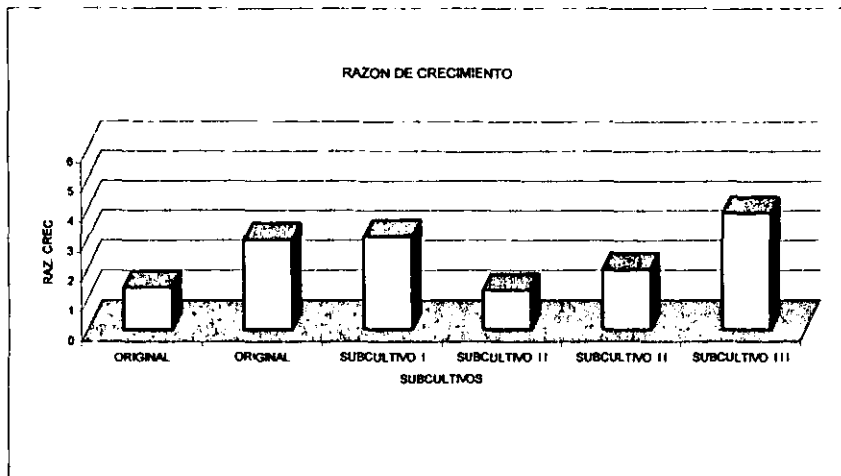


FIGURA 3. RAZON DE CRECIMIENTO DEL CALLO " 9 " DE *M. herrerae* DURANTE LAS FASES I Y II

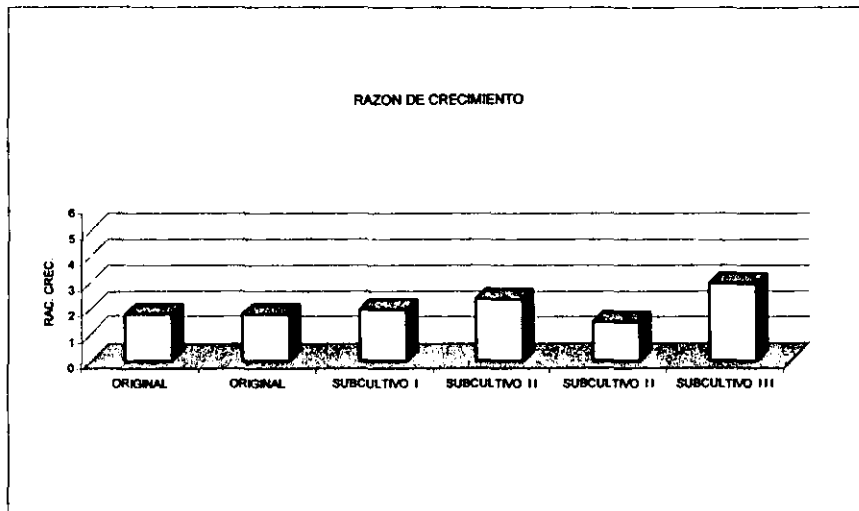


FIGURA 4. RAZON DE CRECIMIENTO DEL CALLO " 10 " DE *M. herrerae* DURANTE LAS FASES I Y II

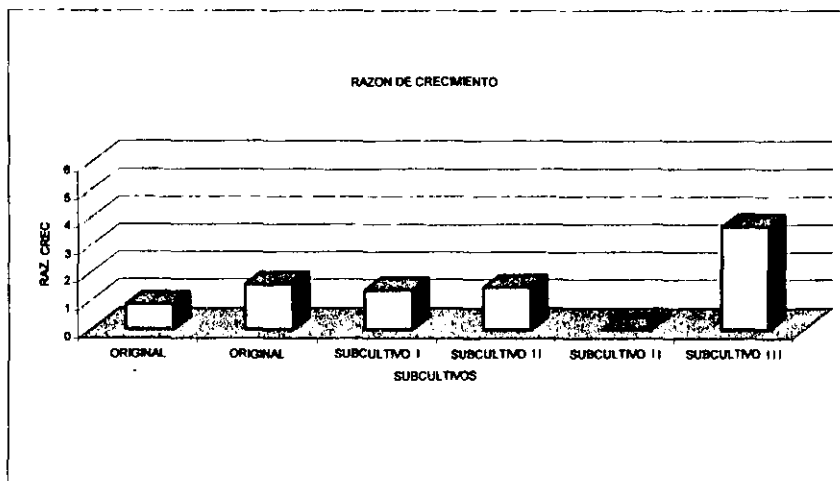


FIGURA 5. RAZON DE CRECIMIENTO DEL CALLO "14" DE *M. herrerae* DURANTE LAS FASES I y II.

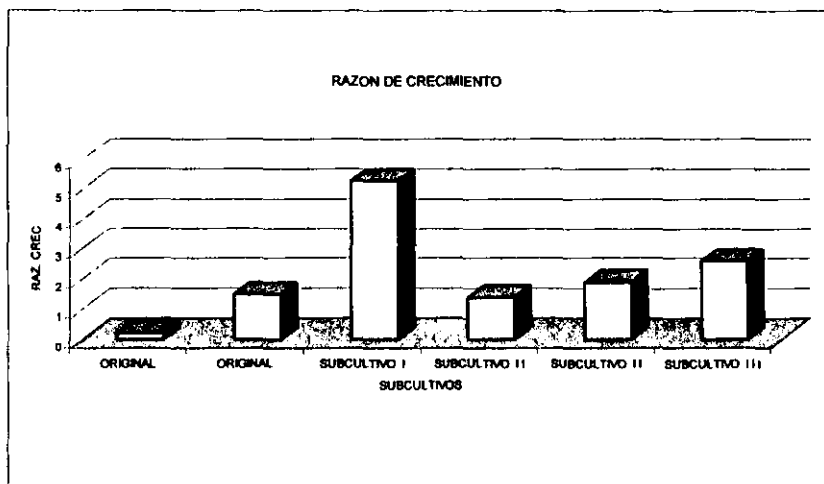


FIGURA 6. RAZON DE CRECIMIENTO DEL CALLO "18" DE *M. herrerae* DURANTE LAS FASES I y II.

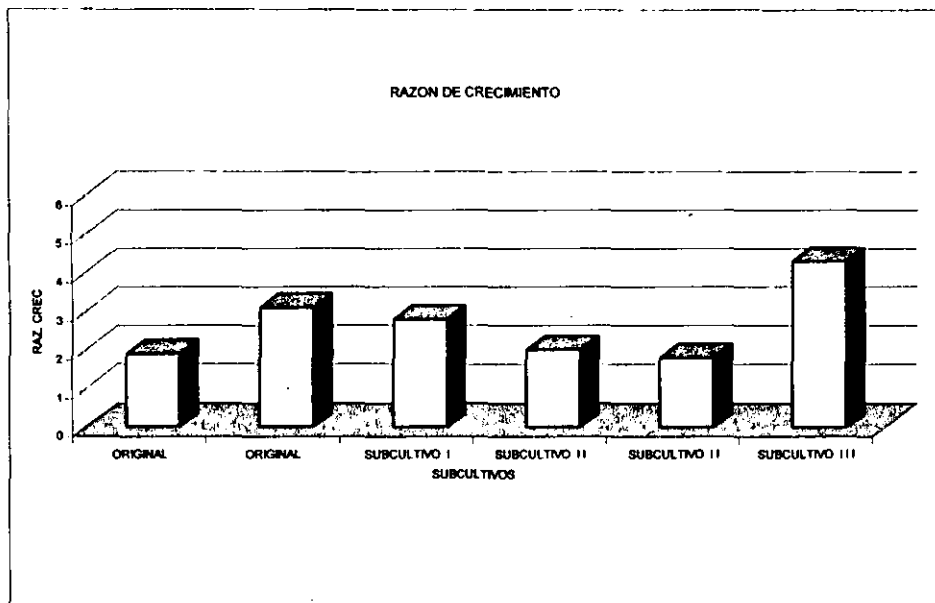


FIGURA 7. RAZON DE CRECIMIENTO DEL CALLO "19" DE *M. hermerae* DURANTE LAS FASES I y II.

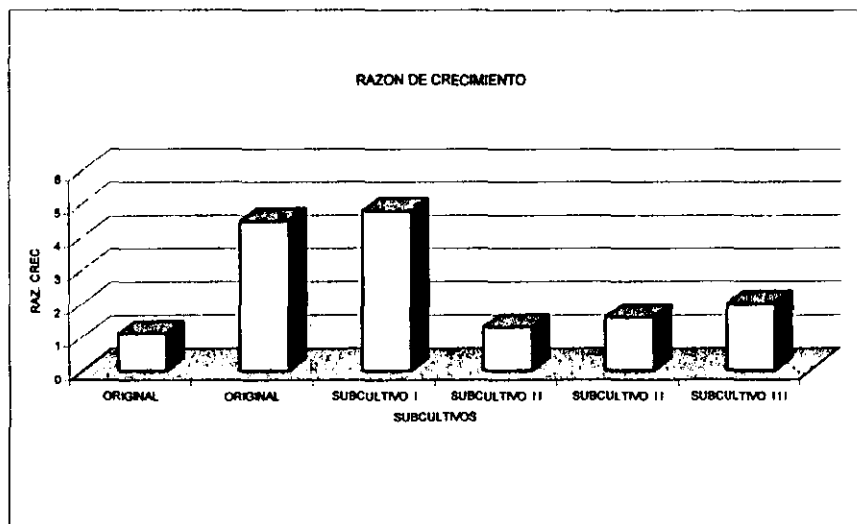


FIGURA 8. RAZON DE CRECIMIENTO DEL CALLO "19" DE *M. carmenae* DURANTE LAS FASES I y II.

5.2. Biomasa generada.

En esta parte se expone los resultados de la cantidad de biomasa generada durante la fase I de inducción de tejido caloso y la fase II de multiplicación del tejido caloso de los 5 callos de *Mammillaria herrerae* y uno de *M. carmenae*.

FASE	MEDIO DE CULTIVO	PERMANENCIA EN EL MEDIO (DÍAS)	BIOMASA GENERADA gr.					
			CALLO 9 Mh	CALLO 10 Mh	CALLO 14 Mh	CALLO 18 Mh	CALLO 19 Mh	CALLO 19 Mc
I	ORIGINAL	20	1.4	1.8	0.9	0.2	1.9	1.1
I	ORIGINAL	25	2.8	1.5	0.5	0.1	3.9	4
II	SUBCULTIVO I	22	8.6	3.2	0.6	1.3	10.4	19.3
II	SUBCULTIVO II	23	4	8.9	0.9	0.9	16.1	6.8
II	SUBCULTIVO II	28	10.6	2.9	0	1.3	11.7	6.6
II	SUBCULTIVO III	28	19.5	20	4.5	1.8	74.2	22
III	SUBCULTIVO IV	28	18	14.7	0.6	0	33.5	12

CUADRO 21. BIOMASA GENERADA DE CINCO CALLOS DE *M. herrerae* Y UN CALLO DE *M. carmenae* DURANTE LA FASE I, II Y III.

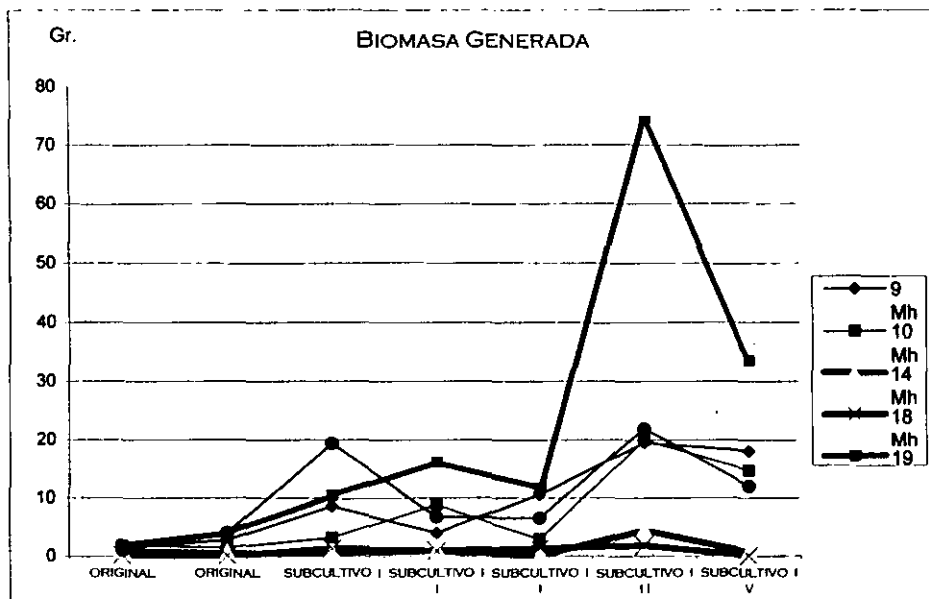


FIGURA 9. BIOMASA GENERADA DE CINCO CALLOS DE *M. herrerae* Y UN CALLO DE *M. carmenae* DURANTE LA FASE I, II Y III.

Mammillaria herrerae.

Callo 9 Mh.

Durante la primera fase el callo mantuvo constante su peso generó poca biomasa, ver figuras 9 y 10, sin embargo al transplantarse al subcultivo 1 de la fase II incremento su biomasa a 8.6 g, para tener un ligero descenso con el subcultivo II y continuó con un incremento bueno al final de la fase II generando 19.5 gr., ver cuadro 21.

Callo 10 Mh.

Este callo en la fase II incrementó su biomasa a 3.2 g al inicio, y terminó con 20.0 g de biomasa al final de esta fase, su crecimiento fue ascendente en la producción de biomasa, ver figuras 9 y 11, cuadro 21.

Callo 14 Mh.

Este callo desde sus inicios mantuvo lento su crecimiento, ver figuras 9 y 12, generó poca biomasa de 0.8 g en promedio, con cada subcultivo, ver cuadro 21, no fue sino hasta el subcultivo III donde generó la mayor cantidad de biomasa con 4.5 g, este callo se favoreció con este subcultivo su producción.

Callo 18 Mh.

Este callo en la fase I generó únicamente 0.1 g de biomasa lo cual indicó que era nula su producción de la misma y sólo se mantuvo vivo, teniendo la mayor parte del tejido necrosado sin embargo, al transplantarlo al subcultivo I, aumento su biomasa a 1.3 g ver figuras 9 y 13, y generó biomasa durante la fase II llegando a obtener 1.8 g al final de esta fase, ver cuadro 21.

Callo 19 Mh.

En la fase I su producción de biomasa fue poca con 3.9 g, aumentó al inicio de la fase II y consiguió 16.1 g y mantuvo constante su ascenso para conseguir 74.2 g de biomasa con el subcultivo III, fue el callo que produjo la mayor cantidad de biomasa con este subcultivo, ver figuras 9 y 14, cuadro 21.

Mammillaria carmenae.

Callo 19 Mc.

Al inicio de la fase I su producción de biomasa fue escasa beneficiándose con el subcultivo I, llegó a generar 19.3 g de biomasa, ver cuadro 21, mantuvo su crecimiento desorganizado, pero al instante de transplantarse al subcultivo II disminuyó considerablemente su producción, llegando a generar solo 6.8 g, lo cual beneficio al callo en cuanto a su fisonomía y crecimiento, siendo este último mas organizado. Al final de esta fase II volvió a crecer su producción hasta llegar a 22.0 g, ver figuras 9 y 15.

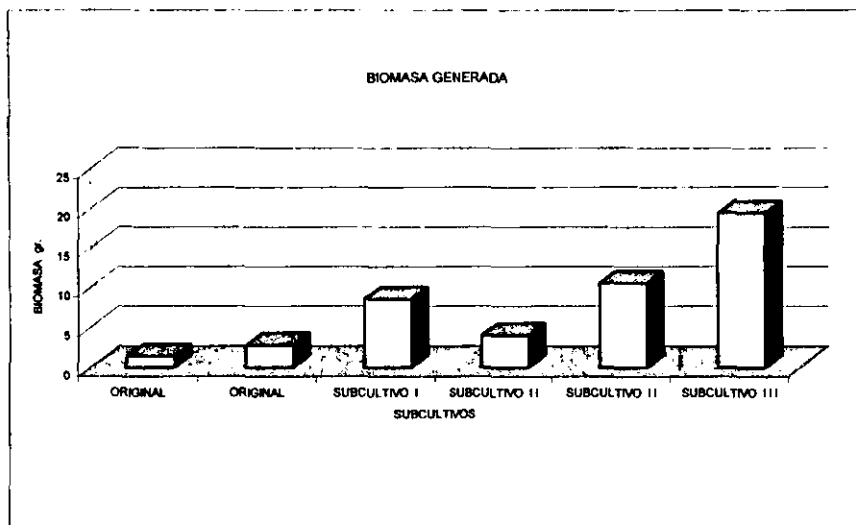


FIGURA 10. BIOMASA GENERADA DEL CALLO "9" DE *M. herreriae* DURANTE LAS FASES I y II.

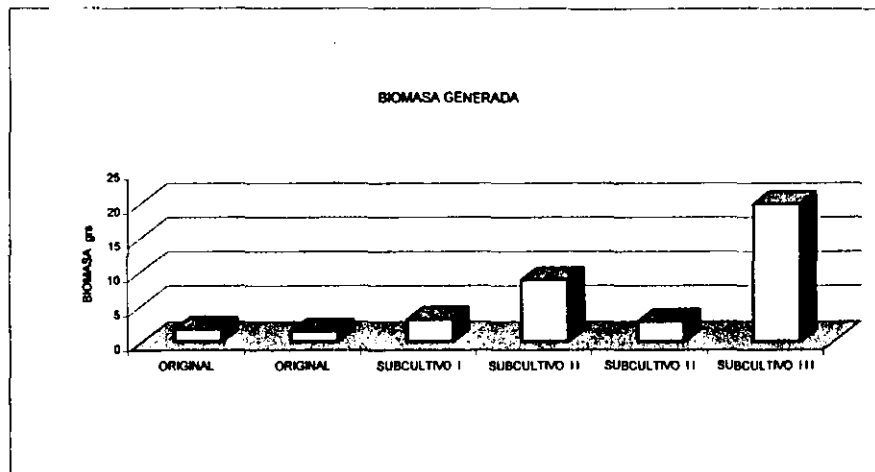


FIGURA 11. BIOMASA GENERADA DEL CALLO "10" DE *M. herreriae* DURANTE LAS FASES I y II.

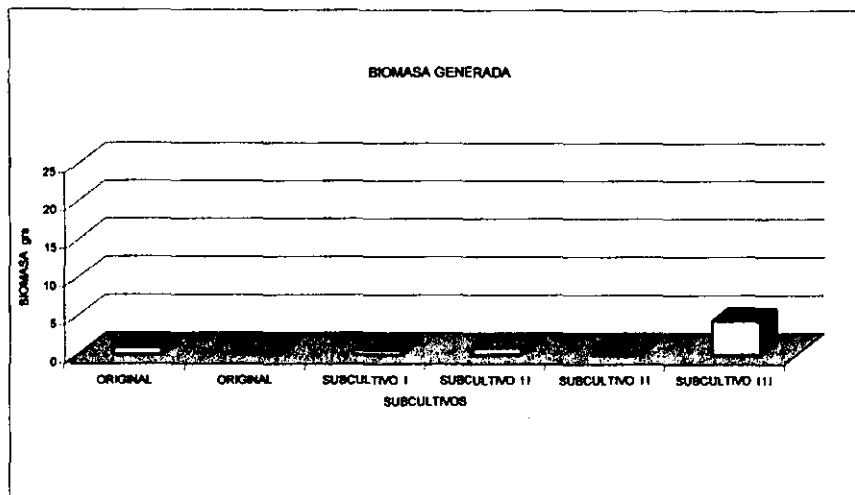


FIGURA 12. BIOMASA GENERADA DEL CALLO "14" DE *M. herrerae* DURANTE LAS FASES I y II.

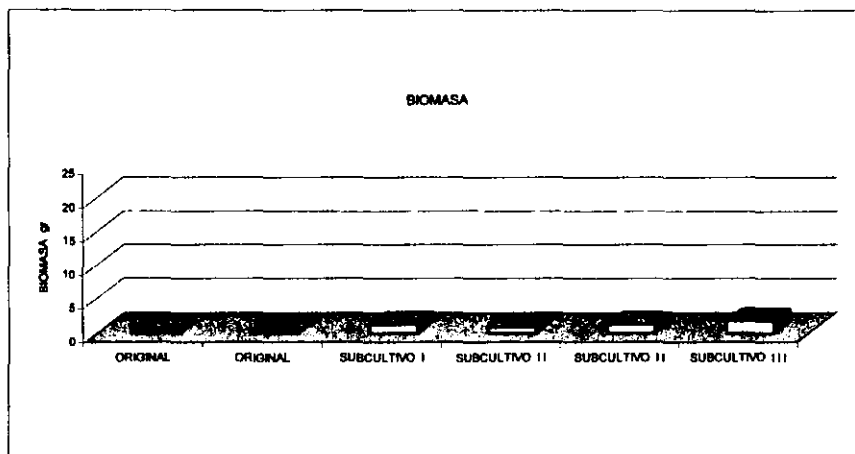


FIGURA 13. BIOMASA DEL CALLO "18" DE *M. herrerae* DURANTE LAS FASES I y II.

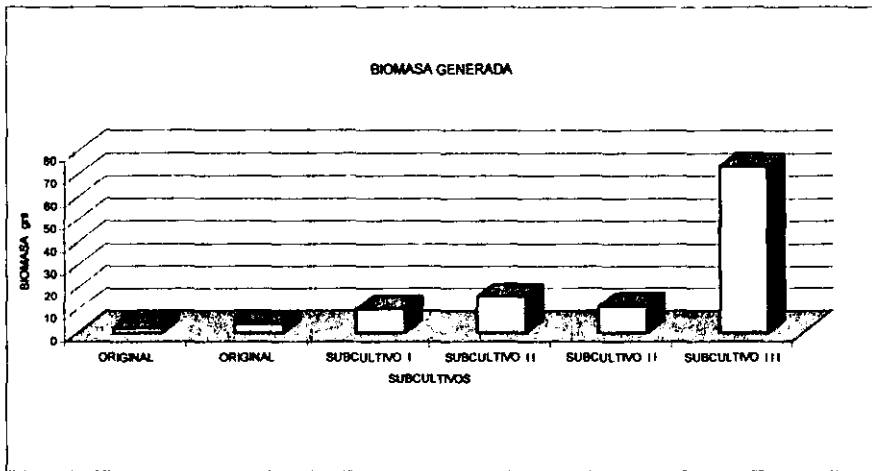


FIGURA 14. BIOMASA GENERADA DEL CALLO "19" DE *M. herrerae* DURANTE LAS FASES I y II.

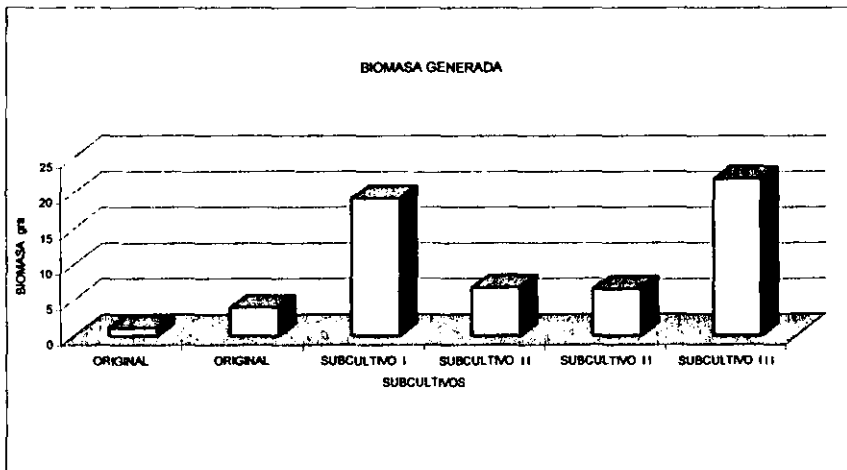


FIGURA 15. BIOMASA GENERADA DEL CALLO "19" DE *M. carmenae* DURANTE LAS FASES I y II.

V. DISCUSIÓN

Siembra de semillas.

Las semillas de *M. carmenae* no germinaron en condiciones *in vitro*, esto pudo deberse a que las semillas de cactáceas están adaptadas a condiciones de aridez, con temperaturas altas y humedad baja, condiciones inversas a las que tenían en medio *in vitro* estéril. Debido a que poseen una testa dura que le sirve de protección, en ocasiones hay que aplicar tratamientos físicos o químicos (escarificación) para que consigan germinar. Fue preciso la aplicación de calor por un periodo de 36 hrs., para reactivarlas y sacarlas de su latencia, además de tener que ser sembradas en sustrato con tierra. La germinación de semillas (19%) cayó por abajo del límite inferior del rango que menciona Bravo-Hollis, (1978) de 20 a 30%, que se presentan generalmente en las Cactáceas.

Contaminación de inóculos.

Con respecto a la contaminación por hongos y bacterias esta se presentó en todos los tipos de inóculos. En los inóculos de espinas, raíces y areolas con espinas, la contaminación fue principalmente por hongo de color verde. Debido a que son los órganos que están más en contacto directo con el polvo del medio ambiente lo que ocasiona que sean buenos receptores de esporas de hongo además de las funciones de la lanosidad y espinas que es la protección y filtro contra organismos patógenos que afectan el desarrollo del vegetal. En 1987 Ault, J. R., indicó que las areolas, espinas y axilas son los órganos que presentaron más dificultad para su desinfección. La contaminación por bacterias se presentó en axilas y tubérculos, y muy poca por hongos. Con la aplicación del hipoclorito de sodio y calcio se desinfectó muy bien el material biológico incrementando la cantidad de inóculos sanos.

Oxidación de inóculos.

El tejido al ser seccionado, rápidamente empieza a suberizarse y la parte interna expuesta al aire comienza a oxidarse, con lo que el tejido se oxida completamente a las 12 horas posteriores a la incisión. Esto se evitó con la aplicación de métodos antioxidantes, uno físico (baja temperatura) y otro químico (con la utilización de sustancias antioxidantes). Primero al reducir la temperatura a 5°C disminuyó la actividad metabólica del tejido retardando el proceso de oxidación, segundo al sumergir los inóculos en ácido ascórbico y ácido cítrico estos ayudaron a impedir la oxidación, además se ha comprobado que estas sustancias ayudan a disminuir la oxidación del tejido, y tercero al colocar la parte seccionada del tejido en contacto directo con el medio básico, éste esta menos tiempo expuesto al oxígeno del ambiente, además de que esta "posición vertical", favoreció al inóculo a responder mejor a los reguladores del crecimiento y formar el tejido calloso.

Respuesta a la generación de callo.

La generación de tejido calloso se presentó primordialmente en inóculos de tubérculo y ápice de la planta, la respuesta fue variable ya que hubo diversas concentraciones de reguladores del crecimiento que indujeron su generación, pero especialmente en todos las matrices, la concentración que siempre generó el tejido calloso fue con 0.5/50 mg/l de ANA/BAP y en menor porcentaje con 5.0/50.0 mg/l. Los callos generados con la primera concentración fueron de consistencia y crecimiento moderado y los de la segunda concentración de consistencia friable y crecimiento acelerado, Mangolín *et al.* en 1997 mencionaron que es apropiado promover la multiplicación tejido calloso friable para conseguir una mayor cantidad de tejido y de esta manera tener bastante material para poder intentar su desdiferenciación a tejido organizado.

Respuesta a la organogénesis.

La generación de raíz se originó en inóculos de ápice de la planta, al tener el inóculo el meristemo apical, éste pudo evitar la desorganización y redirigir la parte seccionada para formar de nuevo raíces. Las raíces se originaron en tratamientos donde la concentración de auxina (ácido naftalenacético) era mayor que la concentración de la citocinina (bencil amino-purina).

Las plántulas se generaron esporádicamente a través del tejido calloso y éste a su vez se generó de inóculos de ápice de planta. Lo cual es trascendental ya que indica que el meristemo apical desempeña un papel significativo en la desdiferenciación a tejido organizado. Indra y Trevor, en 1994 mencionaron que es importante la presencia del ápice, pues es crucial para la Generación del callo y la producción subsiguiente de plántulas. El tejido calloso, al transplantarlo a medio básico en concentraciones de 0.5/50.0 mg/l de ANA/BAP consigue reorientar la desdiferenciación a brotes y plántulas, es decir, primero se logra formar el tejido calloso, a continuación se transplanta a medio que contenga la concentración arriba sugerida para reorientar la desdiferenciación a tejido organizado y alcanzar una gran cantidad de brotes y plántulas.

Multiplicación de tejido calloso.

El paso a través de los subcultivos favorece su multiplicación del tejido calloso, siendo en la fase II con el subcultivo III, donde el callo se multiplica mas rápidamente con los reguladores del crecimiento AIA/CIN en concentración de 5/50mg/l, adicionado con suplementos orgánicos y pulpa de plátano.

Con respecto a la Razón de Crecimiento, el tejido calloso de consistencia friable y crecimiento acelerado, (callo 19 Mh y 19 Mc) lograron los valores más altos, seguidos de los callos de consistencia y crecimiento moderado (10 Mh).

En los callos de tipo friable sus R. C., fluctuaron alrededor de 2 en la Fase I, por lo que era bajo y se acrecentó a 4,8 y 4.3 al adicionar al medio suplementos orgánicos además de pulpa de plátano que contiene diversas sustancias que consiguieron acelerar el crecimiento y reproducción del tejido., con el subcultivo IV de la fase III. También mejoró su consistencia, permaneciendo el tejido calloso friable pero su manejo fue más accesible y exhibió coloración verde pálida lo que demostró que contienen clorofila y efectuaron la fotosíntesis que es necesaria para poder nutrirse y no depender únicamente del medio básico.

El tejido calloso de consistencia moderada inicio con una R. C. de 1.8 en la fase I y logro aumentarla hasta 5.5 en la fase III, con el subcultivo IV. También mostró mejoras en sus características, ya que cambio su tonalidad a un verde más intenso demostrando que la producción de fotosíntesis fue mayor.

Por ultimo en la biomasa generada, de la misma forma tuvo un comportamiento similar que la Razón de Crecimiento ya que con los primeros subcultivos los callos alcanzaron a duplicar su peso, pero fue preciso adicionar otros nutrientes que incitaron su producción, como fueron los suplementos alimenticios cosa que aconteció en los subcultivos III y IV, de las fases II y III respectivamente.

Se debe tener en cuenta que al momento de trasplantarlos de su medio básico con reguladores del crecimiento de los que se originaron, todos los callos se debilitaron al cambio, mostrando que el cambio repentino a nuevas condiciones con nutrientes distintos los callos accionan un mecanismo de homeostasis para evitar la posible pérdida de agua y sales ocasionando una reducción de su producción, pero al segundo trasplante en éste subcultivo III y IV, una vez que se adaptaron a estas condiciones acrecentaron su producción de biomasa vigorosamente.

VI. CONCLUSIONES

Para la desinfección de las semillas se recomienda el primer tratamiento con etanol al 70% V/V sumergidos durante 3 minutos e hipoclorito de sodio al 1.2% de cloro activos durante 10 minutos, por ser el menos agresivo.

La oxidación en condiciones *in vitro* de semillas no se pudo determinar, ya que las semillas no germinaron en condiciones *in vitro*.

Las semillas de *Mammillaria carmenae* germinan con la escarificación, mediante la aplicación de calor a 32°C en estufa y siembra en sustrato, (tierra negra con agrolita en una proporción de 2:8 P/P), logrando un 19% de germinación (por debajo de lo reportado).

Para la desinfección de inóculos el mejor método es: con etanol al 70% V/V, por 5 minutos, hipoclorito de sodio al 1.2% de cloro activo, durante 45 minutos e hipoclorito de calcio al 20% P/V sumergidos durante 20 minutos.

Se reduce considerablemente la oxidación en ácido ascórbico 10g/l y ácido cítrico 15g/l, además de una exposición a temperatura de 7.8°C, durante 24 hrs.

Utilizar medio fresco sin reguladores del crecimiento, resulta práctico para controlar la contaminación (que generalmente se desaparece al quinto día) y oxidación del tejido, previo a su transferencia a medio básico con reguladores del crecimiento.

Si se efectúa subcultivos a medio fresco cada cuatro semanas se conserva el vigor y la sanidad del tejido calloso.

De los diferentes tipos de inóculos experimentados, los adecuados son los tubérculos y el ápice de la planta, ya que responden a la mayoría de los tratamientos para la generación de callo, además de la desdiferenciación esporádica de plántulas.

La posición del inóculo es substancial para la inducción del callo, debiendo colocar la parte recién seccionada en contacto directo con el medio, con esto se evita la cicatrización y acrecienta la posibilidad de subsistir del inóculo y originar callo.

La inducción del tejido calloso se genera principalmente con el balance de reguladores del crecimiento de 0.5/50.0 mg/l de ANA/BAP seguida por 5.0/50.0 mg/l.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ault, J. R. y Blackmon W. J., (1987). In vitro propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience. 22(1): 126-127.
- Backberg, C., (1977). Cactus Lexicon. Bland Ford Press. Pp.: 69-70, 253-299.
- Barba, A. A., (1987). Reguladores del crecimiento vegetal. En *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Hurtado, M. D. y Merino, M. M. Ed., Trillas., 1987.
- Bonness-MS; Pare-PE y Mabry-TJ, (1993). Novel callus and suspension cultures of the "old man" cactus (*Cephalocereus senilis*). Cactus and Succulent Journal, 65: 3, 144-147.
- Bravo-Hollis, H., (1978). Las Cactáceas de México, 2a. edición. UNAM, México. pp.: 1-80.
- Carey, R. H., (1980). Safeguarding the cacti. Garden. 1:5, 4-7.
- Carrillo, C. G., (1977). Manual de Cultivo de Tejidos Vegetales. Chapingo, México. pp.: 81.
- Clayton, P.W; Hubstenberger.-JF; Phillips.-GC y Butler-Nance.-SA. (1990). Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. Journal of the American Society for Horticultural Science, 115: 2, 337-343.
- Corneanu, M., Corneanu, G. C., Morariu, V. V., Cosmulescu, S. N., Badica, C., Bica, D. y Vekas, L., (1996). The effect of biocompatible magnetic fluids on *in vitro* culture in *Mammillaria durwei* (Cactaceae) in the conditions of a near null geomagnetic field. Revue Roumaine de Biologie, 41:1, 53-56.
- Corona, N. V. y Chávez, V. M., (1982). Cultivo de Cactáceas en medios asépticos. Cact. Suc. Mex., XXVII, pp.: 17-23.
- Corona, N. V. y Yáñez, L. L., (1984). Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. Cact. Suc. Mex. XXIX, pp: 3-7.
- Cronquist, A., (1982). Introducción a la Botánica, CECSA, México.
- Curtis, H. y Barnes, N. S., (2000). Biología, Ed. Panamericana, 6ª edición, pp. 692-700.
- Dabekausen.-M.A.A.; Pierik.-R.L.M.; van-der-Laken.-J.D. y Hoek-Spaans.-J. (1991). Factors affecting areole activation in vitro in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. SCI.-HORTIC.-AMST. 46 (3-4): 283-294.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Haberlandt, G., (1902). Kuitinversuche mit isolierten pflanzeller Sber. Acad. Wiss Wien. III: 69-92.
En *Plant tissue and cell culture*, Street, H. E. Second Edition, Academic Press., U.S.A. 1977.

Hautzin, Y., (1977). Redescubrimiento de *Mammillaria carmenae*, Cact. Suc. Mex., XXII (4), pp.: 85.

Helch, H., (1981). Cactus y otras Suculentas. Ed. Omega, Barcelona, España.

Hunt, D. R., (1977). Amendments and additions to the author's earlier classified list of *Mammillaria* and additional notes on the classification of the genus. The Cactus and Succulent Journal of Great Britain, 39(2): 37-40.

Hurtado, M. D. y Merino, M. M., (1988). Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas.

Indra, K. V. y Trevor, A. T., (1994). Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands, pp.: 10-13, 294, 395.

Johnson, J. H. y Emino, E. R., (1979). In vitro Propagation of *Mammillaria elongata*. Hort Science, 14(5): 605-606.

Johnson, J. H. y Emino, E. R., (1979). Tissue Culture Propagation in the Cactaceae. Cactus and Succulent Journal, USA. 51: 275-277.

King, R. M., (1957). Studies on the Tissue Culture of Cacti. Cactus and Succulent Journal, USA. 29: 102-104.

Kolar, Z., (1975). Vegetative propagation of the Cactus *Mammillaria woodsi* craig trough tissue cultures. 32 (5): 668-669.

Krulik, G. (1980). Tissue Culture of Succulent Plant. Nat. Cact. Journal, 35(1): 14-17.

Machado-MFPS; Prioli-AJ y Mangolin-CA., (1993). Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). Biochemical-Genetics. 31: 3-4, 167-172.

Mainardi, F., (1978). Cactus y otras plantas crasas. De Vecchi. Italia.

Mangolin-CA; Prioli-AJ y Machado-MFPS, (1994). Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) isozymes as markers at 2,4-dichlorophenoxyacetic acid X kinetin combinations in callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). Biochemical-Genetics. 32: 5-6, 191-200.

Mangolin-CA; Prioli-AJ y Machado-MFPS, (1994). Isozyme patterns in callus cultures and in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical-Genetics*, 32: 7-8, 237-247.

Mangolin-CA; Prioli-AJ y Machado-MFPS, (1997). Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical-Genetics*, 35: 5-6, 189-204.

Mantell, S. H. y Smith, H., (1983). *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, London England, pp 111-138.

Marín, H. T., Márquez, G. J., Rodríguez, G. B. Y Rubluc, A., (1998). Early stages in the development of somatic embryogenesis in *Mammillaria san-angelensis* Sánchez Mejorada (Cactaceae) a severely endangered species. *Phyton Buenos Aires*, 62: 1-2, 181-186.

Mauseth, J. D. y Halperin, W., (1975). Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 62: 869-877.

Mauseth, J. D., (1976). Cytokinin and giberellie acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 63: 1295-1301.

Mauseth, J. D., (1977). Cactus tissue culture: A potential method of propagation. *Cactus and Succulent Journal*. U. S. A. 49: 80-81

Minocha, S. C. y Mehra, P. N., (1974). Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae) *Amer. J. Bot.* 61: 168-173.

Murashige, T. y Skoog, T., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant.* 15: 473-497.

Normas Oficiales Mexicanas para la Protección Ambiental, (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-1994.

Oliveira-SA-de; Machado-MFPS; Prioli-AJ; Mangolin-CA y De-Oliveira-SA, (1995). *in vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 31: 1, 47-50.

Palomino, G., Dolozel, J., Cid, R., Brunner-yo, Méndez-yo y Rubluc., (1999). Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long term *in vitro* culture. *Plant Science Limerick*. 141: (2), 191-200.

Pérez-Molphe-Balch-E; Pérez-Reyes-ME; Villalobos-Amador-E; Meza-Rangel-E; Morones-Ruiz-L-del-R y Lizalde-Viramontes-HJ., (1998). Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 34: 2, 131-135.

Pilbeam, J., (1960). *Mammillaria*. University Books. New York. USA.

Prioli-AJ; Mangolin-CA; Oliveira-SA-de; Machado-MFPS y De-Oliveira-SA. (1995). Isozymes as markers of the effect of growth regulator combinations on callus tissues from long-term cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Revista Brasileira de Genética*, 18: (1), 105-109.

Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S., (1977). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ cultured. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.

Rubluo-A; Chavez-V; Martínez-AP y Martínez-Vásquez-O, (1993). Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. *Biological Conservation*, 63 (2), 163-169.

Sánchez-Mejorada, H. (1982). Problemas en el control del comercio de las Cactáceas. *Cact. Succ. Mex.* XXVII. pp: 27.

Street, H. E., (1977). Plant tissue and cell culture. Sec. Ed. Academic Press, U. S. A.

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

Torquato-EFB; Prioli-AJ y Machado-MFPS., (1995). Differential alcohol dehydrogenase and malate dehydrogenase isoenzyme expression in long-term callus tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical Genetics*. 33: 11-12, 389-399.

Trejo, C. R., (1992). El cultivo de tejidos vegetales en el fitomejoramiento, Seminarios Académicos de la U.A.Ch. Unidad regional universitaria de zonas áridas.

Villalobos, A. V. M., (1979). Obtención de plantas de clavel *Dianthus caryophyllus* L. Libre de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y ápices vegetativos. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.

APENDICE

MULTIPLICACIÓN DE TEJIDO CALOSO. I. FASE I Y II. (SUBCULTIVOS I, II y III).

F A S E	MEDIO DE CULTIVO	PERMANENCIA EN EL MEDIO (DÍAS)	CALLO TOTAL PESO EN Gr.	RAZON DE CRECIMIENTO	BIOMASA GENERADA PESO EN Gr.
I	ORIGINAL	20	1.4	1.4	1.4
I	ORIGINAL	25	4.2	3	2.8
II	SUBCULTIVO I	22	12.8	3.1	8.6
II	SUBCULTIVO II	23	16.8	1.3	4
II	SUBCULTIVO II	28	21.3	2	10.6
II	SUBCULTIVO III	28	26.2	3.9	19.5

CUADRO 22. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE I Y II DEL CALLO "9" DE *M. herrerae*.

TRATAMIENTO DE AIA/CIN	SUBCULTIVO IV a			SUBCULTIVO IV b		
	CALLO PESO EN g	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN g	CALLO PESO EN g	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN g
A	7.3	2.9	4.8	7.4	3.1	5
B	15.1	4.1	11.4	5.4	1.7	2.2
C	9.5	3.1	6.4	8.6	2.9	5.6
D	6.4	1.9	3	16	3.8	11.8
E	5.7	3.6	4.1	10.6	2.8	6.8
F	3.9	2	1.9	11.1	3.5	7.9
G	6.8	3.6	4.9	20.1	5.5	18
H	7.7	6.4	6.5	10.3	4.9	8.2
I	1.7	0	0	5.9	3.3	4.1

CUADRO 23. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE III DEL CALLO "9" DE *M. herrerae*.

F A S E	MEDIO DE CULTIVO	PERMANENCIA EN EL MEDIO (DÍAS)	CALLO TOTAL PESO EN Gr.	RAZON DE CRECIMIENTO	BIOMASA GENERADA PESO EN Gr.
I	ORIGINAL	20	1.8	1.8	1.8
I	ORIGINAL	25	3.3	1.8	1.5
II	SUBCULTIVO I	22	6.5	2	3.2
II	SUBCULTIVO II	23	15.4	2.4	8.9
II	SUBCULTIVO III	28	8.4	1.5	2.9
II	SUBCULTIVO IIII	28	29.9	3	20

CUADRO 24. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE I Y II DEL CALLO "10" DE *M. herrerae*.

TRATAMIENTO DE AIA/CIN	SUBCULTIVO IV a			SUBCULTIVO IV b		
	CALLO PESO EN g	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN g	CALLO PESO EN g	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN g
A	7	5.8	5.8	4.6	2.9	3
B	2.4	1.1	0.1	13.8	3.8	11.4
C	1.2	0	0	5.5	2.3	3.1
D	1.6	1.6	0.6	12.4	3.8	9.1
E	1.5	1.3	0.3	19.1	4	14.3
F	2.7	2.1	1.4	11.6	2.3	6.6
G	*	*	*	18	5.5	14.7
H	*	*	*	7.7	2.1	4.1
I	*	*	*	16.4	4.7	12.9

CUADRO 25. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE III DEL CALLO "10" DE *M. herrerae*

* NO SE EFECTUO

F A S E	MEDIO DE CULTIVO	PERMANENCIA EN EL MEDIO (DÍAS)	CALLO TOTAL PESO EN Gr.	RAZON DE CRECIMIENTO	BIOMASA GENERADA PESO EN Gr.
I	ORIGINAL	20	09	0.9	0.9
I	ORIGINAL	25	1.4	1.6	0.5
II	SUBCULTIVO I	22	2	1.4	0.6
II	SUBCULTIVO II	23	2.9	1.5	0.9
II	SUBCULTIVO III	28	0	0	0
II	SUBCULTIVO IIII	28	6.2	3.7	4.5

CUADRO 26. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE I Y II DEL CALLO "14" DE *M. herrerae*.

TRATAMIENTO DE AIA/CIN	SUBCULTIVO IV a			SUBCULTIVO IV b		
	CALLO PESO EN g	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN g	CALLO PESO EN g	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN g
A	*	*	*	14.3	10.2	12.9
B	*	*	*	3	1.6	1.1
C	*	*	*	*	*	*
D	*	*	*	*	*	*
E	*	*	*	*	*	*
F	*	*	*	2.1	1.4	0.6
G	*	*	*	*	*	*
H	*	*	*	*	*	*
I	*	*	*	*	*	*

CUADRO 27. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE I II DEL CALLO "14" DE *M. herrerae*.

* NO SE EFECTUO

F A S E	MEDIO DE CULTIVO	PERMANENCIA EN EL MEDIO (DÍAS)	CALLO TOTAL PESO EN Gr.	RAZON DE CRECIMIENTO	BIOMASA GENERADA PESO EN Gr.
I	ORIGINAL	20	0.2	0.2	0.2
I	ORIGINAL	25	0.3	1.5	0.1
II	SUBCULTIVO I	22	1.6	5.3	1.3
II	SUBCULTIVO II	23	2.5	1.4	0.9
II	SUBCULTIVO II	28	2.7	1.9	1.3
II	SUBCULTIVO III	28	2.9	2.6	1.8

CUADRO 28. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE I Y II DEL CALLO "18" DE *M. herrerae*.

F A S E	MEDIO DE CULTIVO	PERMANENCIA EN EL MEDIO (DÍAS)	CALLO TOTAL PESO EN Gr.	RAZON DE CRECIMIENTO	BIOMASA GENERADA PESO EN Gr.
I	ORIGINAL	20	1.9	1.9	1.9
I	ORIGINAL	25	5.7	3.1	3.9
II	SUBCULTIVO I	22	16.1	2.8	10.4
II	SUBCULTIVO II	23	32.2	2	16.1
II	SUBCULTIVO II	28	26.5	1.8	11.7
II	SUBCULTIVO III	28	91.6	4.3	74.2

CUADRO 29. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE I Y II DEL CALLO "19" DE *M. herrerae*

TRATAMIENTO DE AIA/CTN	SUBCULTIVO IV a			SUBCULTIVO IV b		
	CALLO PESO EN g	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN g	CALLO PESO EN g	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN g
A	8.7	3	5.8	19.3	1.7	7.7
B	6.8	3.1	4.6	50.8	6.4	42.9
C	6.9	3	4.6	24.4	2.9	15.9
D	8.3	2.8	5.3	41.4	3.7	30.2
E	8.7	4.4	6.7	49.2	4.9	39.2
F	4.5	2.7	2.8	32.4	3.1	31.8
G	13.7	2.9	8.9	42.4	4.8	33.5
H	10.8	2.7	6.8	48.8	4.3	37.4
I	6.3	1.8	2.7	56.6	4.9	45.1

CUADRO 30. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE III DEL CALLO "19" DE *M. herrerae*.

F A S E	MEDIO DE CULTIVO	PERMANENCIA EN EL MEDIO (DÍAS)	CALLO TOTAL PESO EN Gr.	RAZON DE CRECIMIENTO	BIOMASA GENERADA PESO EN Gr.
I	ORIGINAL	20	1.1	1.1	1.1
I	ORIGINAL	25	5.1	4.5	4
II	SUBCULTIVO I	22	24.4	4.8	19.3
II	SUBCULTIVO II	23	31.2	1.3	6.8
II	SUBCULTIVO II	28	17.3	1.6	6.6
II	SUBCULTIVO III	28	42.5	2	22

CUADRO 31. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE I Y II DEL CALLO "19" DE *M. carmenae*.

TRATAMIENTO DE AIA/CIN	SUBCULTIVO IV a			SUBCULTIVO IV b		
	CALLO PESO EN Gr	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN Gr	CALLO PESO EN Gr	RAZÓN DE CRECIM.	BIOMASA PESO EN Gr
A	4.6	2.3	2.6	18.1	3.1	12.3
B	5.2	2.2	2.8	13.1	2.8	8.5
C	3	1.8	1.3	10.8	2.3	6.1
D	1.4	0	0	9.7	2	5
E	0	0	0	10.5	2.1	5.4
F	7	3.3	4.9	6	1.3	1.4
G	0	0	0	10.2	3.3	12
H	0	0	0	5.9	2	2.9
I	7.8	3.4	5.5	14.8	3.1	10

CUADRO 32. RESULTADOS DE LA RAZÓN DE CRECIMIENTO Y BIOMASA GENERADA DURANTE LA FASE III DEL CALLO "19" DE *M. carmenae*.