

003 45 1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis cromosómico y respuesta  
*in vitro* de tres especies de  
*Mammillaria* (Serie *Supertextae*).**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA VEGETAL)**

PRESENTA

**BIÓL. MARÍA FLORENCIA BRIONES SÁNCHEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. GUADALUPE PALOMINO HASBACH

COORDIRECTOR:

DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS

MÉXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MAYO 2002



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 mi madre, Agustina Sánchez Pérez, por lo que significa para mí, por su  
paciencia y apoyo durante este tiempo.*

*A mis hermanas (os) con cariño*

*A mis amigos con sincera estimación*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El presente estudio se realizó en el laboratorio de citogenética y en el laboratorio de cultivo *in vitro* del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM; bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Palomino Hasbach y la coodirección del Dr. Abraham Rubluo Islas. Investigadores Titulares de dicha institución

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra Guadalupe Palomino H. por dirigir esta tesis, brindándome orientación, apoyo y su tiempo durante mi trabajo.

Al Dr. Abraham Rubluo I. por su acertada coodirección en esta tesis.

A los sinodales: Dr. Armando García V. , M. en C. Salvador Arias M., Dra. Judith Marquez G., Dra Patricia Ramos M. y a la M. en C. Rocio Cid J. por sus valiosas sugerencias en la revisión de este escrito.

Al Biól. Jerónimo Reyes S. por su ayuda en la colecta de plantas de *Mammillaria* y su identificación.

Al M. en C. Javier Martínez R. por transmitirme sus conocimientos y por el apoyo fotográfico en especies de *Mammillaria*.

A la Biól. Ingrid Brunner por la asesoría otorgada en el laboratorio de cultivo *in vitro*.

Al Biól Jorge Saldivar S. del área de computo del Jardín Botánico por su ayuda en la digitalización y edición de las imágenes y en la edición final por computadora de este trabajo, así como por su amistad.

A la dirección del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

RESUMEN	8
INTRODUCCION	9
ANTECEDENTES	11
I Citogenética	11
Cromosomas mitóticos	11
Cromosomas meióticos	13
Importancia de la citogenética en estudios taxonómicos	14
II Citogenética en cactáceas	15
Variabilidad interespecifica y mitosis en cactáceas	15
Variabilidad interespecifica, poliploidía y meiosis en cactáceas	16
III Cultivo <i>in vitro</i>	16
Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	16
Principales aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	17
Micropropagación en cactáceas	17
Rescate de especies en extinción por cultivo <i>in vitro</i>	17
Micropropagación del género <i>Mammillaria</i>	18
IV Familia Cactáceae	18
Endemismos en cactáceas	19
El género <i>Mammillaria</i>	20
Distribución geográfica del género <i>Mammillaria</i>	20
Utilidad de las especies del género <i>Mammillaria</i>	20
Taxonomía del género <i>Mammillaria</i>	21
Clasificación taxonómica de <i>Mammillaria haageana</i> , <i>M. supertexta</i> y <i>M. crucigera</i>	22
Descripción morfológica y distribución de <i>Mammillaria haageana</i> , <i>M. supertexta</i> y <i>M. crucigera</i>	22
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y METODO	26

I Procedencia de las especies	26
II Selección de material biológico	26
III Análisis de cromosomas mitóticos	28
IV Comportamiento de cromosomas meióticos	29
V Determinación de viabilidad de polen	29
VI Micropropagación	29
Germinación de semillas	30
Subcultivo de explantes	30
<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
I Cariotipos	32
Número cromosómico	32
<i>Mammillaria supertexta</i>	32
<i>Mammillaria crucigera</i>	35
<i>Mammillaria haageana</i>	37
II Comportamiento meiótico	39
III Viabilidad de polen	39
IV Respuesta <i>in vitro</i>	41
<i>Mammillaria supertexta</i>	41
<i>Mammillaria crucigera</i>	41
<i>Mammillaria haageana</i>	42
V Cálculo de $X^2$ para germinación de semillas y ANOVA para producción de brotes	45
<b>DISCUSION</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>66</b>

## RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron: la elaboración de cariotipos en células somáticas de ápices radicales y la determinación de variación interespecífica en tres especies de la serie *Supertextae*: *Mammillaria supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*. Así como su viabilidad de polen y su respuesta al cultivo *in vitro*. También se compararon los cariotipos de *M. haageana* y *M. san-angelensis*, dado que algunos taxónomos las consideran sinónimo.

Para *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* es el primer reporte de número cromosómico y fue igual en las tres especies  $2n=22$ ,  $x=11$ , mismo que concuerda con el ya reportado para el género *Mammillaria* y para la familia Cactaceae. Sin embargo se observó variación interespecífica en sus cariotipos manifestada de la siguiente manera: *M. supertexta* mostró los cromosomas con mayor longitud (1.79-3.21 $\mu$ m) y *M. haageana* los cromosomas de menor longitud (1.51-2.69 $\mu$ m); en *M. crucigera* los cromosomas presentaron un tamaño de 1.63-2.74 $\mu$ m. En las tres especies el tamaño de los cromosomas fue mayor al de los cromosomas de *M. san-angelensis* (0.80-1.70 $\mu$ m).

Del mismo modo se observó variación en la longitud del genomio haploide (LG), siendo de 26.84 $\mu$ m para *M. supertexta*; de 23.81 $\mu$ m para *M. crucigera* y de 23.06 $\mu$ m para *M. haageana*. La LG de *M. san-angelensis* fue menor a la de dichas especies (13.83 $\mu$ m).

La fórmula cariotípica para *M. supertexta* y *M. crucigera* fue de  $10m+1sm$  y en *M. haageana* de  $9m+2sm$ . Se observó un par de cromosomas con satélites en *M. supertexta* y *M. haageana*; en *M. crucigera* se observaron dos pares de satélites. A diferencia de estas especies, *M. san-angelensis* no mostró ningún cromosoma sm, todos fueron metacéntricos y al igual que *M. crucigera*, presentó dos pares de cromosomas con satélites.

El índice de asimetría calculado para *M. supertexta* fue de, TF% = 43.44, en *M. crucigera*, TF% = 42.55 y en *M. haageana*, TF% = 42.71, indicando que sus cariotipos fueron simétricos.

El cariotipo de *M. haageana* ( $9m+2sm$ ) fue diferente al determinado en *M. san-angelensis* (11m) lo que muestra una divergencia entre sus genomas. Hunt (1987) las considera sinónimo, por lo que se requieren estudios complementarios de morfología, hibridación y citogenética molecular, para dilucidar la categoría taxonómica de estas plantas.

También se determinó el comportamiento meiótico en *M. haageana*, mostrando un total de 11 bivalentes, una frecuencia de quiasmas,  $Fq = 13.86$  y un índice de recombinación,  $IR = 24.86$ . Estos resultados difieren con los de *M. san-angelensis* cuya  $Fq = 16.74$  y el  $IR = 27.74$  son mayores que en *M. haageana*. El valor mayor del IR en *M. san-angelensis* indica que esta especie tiene más posibilidades de nuevas combinaciones genéticas en la progenie y más oportunidades de adaptarse a cambios ambientales que *M. haageana*, con un IR menor.

El alto porcentaje de polen viable observado en *M. supertexta*, *M. haageana* y *M. crucigera* (superior al 95%) indicó que son especies fértiles y probablemente no son de origen híbrido.

La variación interespecífica observada entre las cuatro especies de *Mammillaria* mencionadas, se debe a cambios estructurales espontáneos en sus cromosomas, originados por deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones que se presentaron en las primeras etapas de su evolución.

Resultados en el cultivo *in vitro* indicaron que el porcentaje de germinación de semillas *in vitro*, fue mayor en *M. supertexta* (95.83%) y en *M. haageana* (82.50%) del Edo. de Puebla. Y fue diferente en ambas especies con respecto a *M. haageana* (48.78%) del Edo. de Oaxaca y a *M. crucigera* (57.77%). Para la evaluación de respuesta morfogenética se consideró la formación de callo, brote y raíz en los explantes de *M. supertexta* y *M. haageana*, los resultados indicaron que no hubo diferencia significativa en la producción de dichas estructuras entre ambas especies.



## INTRODUCCION

En la familia Cactaceae como en otras familias vegetales, la obtención de sus números cromosómicos ( $n$ ,  $2n$  y  $x$ ), el análisis de sus cariotipos y el comportamiento de sus cromosomas meióticos, representan un marcador citogenético para caracterizar especies (Johnson, 1980; Cota y Wallace, 1995) y variedades (Palomino *et al.*, 1988).

En diferentes especies de cactáceas se ha observado variabilidad interespecífica. Esta se determina por variación en el número cromosómico ( $n$  y  $2n$ ), la estructura cariotípica que incluye forma de los cromosomas, número y posición de satélites y longitud total del genomio. Esto se ha observado en especies de *Mammillaria bombycina*, *M. wildii* y *M. microheliopsis* (Remski, 1954, y Johnson, 1978 y 1980) y *Echinocereus* (Cota y Wallace, 1995).

La variabilidad interespecífica se manifiesta también por cambios en el nivel de ploidía, comportamiento que es muy frecuente en especies de *Opuntia* como *O. atrispina* ( $2n=66$ ), *O. chaffeyi* ( $2n=44$ ) y *O. ficus-indica* ( $2n=88$ ). También en *Mammillaria* se ha observado poliploidía, Remski (1954) reporta tetraploides ( $4x$ ) en *M. compressa* y *M. dioica*, hexaploides ( $6x$ ) en *M. prolifera* y 24 ploidies ( $24x$ ) en *M. capensis*.

En este trabajo se presenta un análisis cromosómico, realizado a tres especies del género *Mammillaria*: *M. haageana*, *M. supertexta* y *M. crucigera*. Las tres pertenecen a la serie *Supertextae*, en la que se incluye *M. san-angelensis*. Dicha especie mantiene sinonimia con *M. haageana* (Hunt, 1987). *M. supertexta* es la especie tipo de la serie y está catalogada, al igual que *M. crucigera*, como especie vulnerable o amenazada de extinción, según la IUCN, (Walter y Gillett, 1998). *M. crucigera*, además es una especie rara (SEDESOL, 1994).

Además del análisis cromosómico, se determinó la viabilidad de polen en estas especies, con la finalidad de conocer si su origen es híbrido y si presentan comportamiento meiótico normal. Se ha informado que varias especies híbridas de *Opuntia*, presentan reducción de viabilidad de polen hasta del 22-29% (Baker y Pinkava, 1987). También se ha determinado en algunas plantas que los cambios cromosómicos heterocigóticos pueden producir gametos desbalanceados y reducción de fertilidad de polen como en *Gibasis pulchella*, donde las plantas heterocigóticas por translocaciones presentaron una reducción de la viabilidad del polen del 50%, evidenciada por la presencia de micropolen y polen vacío (Kenton, 1987).

Se determinó también, la respuesta al cultivo *in vitro* de las tres especies con el propósito de planear estrategias de rescate, particularmente para *M. supertexta* y *M. crucigera*, que están catalogadas como especies vulnerables o amenazadas de extinción, debido a que presentan una sobreexplotación, por la gran demanda por

parte de los horticultores que las consideran plantas ornamentales por el color llamativo de sus flores (rojo carmesí, rosa intenso, rojo purpúreo, amarillo, etc.), además se presenta la destrucción de sus hábitats lo que ha llevado a la disminución de estas plantas en sus lugares de distribución. En este sentido, existe el antecedente del trabajo de Martínez-Vázquez y Rubluo (1989), quienes lograron la micropropagación masiva de *M. san-angelensis*, especie endémica del Pedregal de San Angel, en el Valle de México y considerada en peligro de extinción (Walter y Gillett, 1998).

Por ello la realización de este tipo de estudios es importante y más sí se trabaja con especies de nuestro país, ya que la República Mexicana, es el país que presenta mayor diversidad en cactáceas, tanto a nivel de género como a nivel de especie y con gran número de especies endémicas, razón por la cual, nuestro país es reconocido como uno de los dos grandes centros de diversidad florística en cactáceas (Arias, 1993). El género *Mammillaria* es considerado casi endémico; de un total de 160 especies existentes en el país, 150 son endémicas (Hunt, 1992, con modificaciones de Hernández y Godínez, 1994).

## ANTECEDENTES

### I. Citogenética

Los cromosomas desempeñan un papel biológico muy importante en la herencia, mutación, variación genética, así como en el control de la morfogénesis. Su función es almacenar, replicar y transmitir la información hereditaria. Esto a través de dos procesos, uno de ellos la **mitosis**, mediante la cual se conserva la información genética en las generaciones celulares sucesivas que han de transformar un cigoto en el individuo adulto. El otro proceso es la **meiosis**, que se encarga de transmitir la información genética de generación en generación y mantener la variación genética a través de intercambio de segmentos de cromosomas (Rusell, 1992).

Teoría Cromosómica de la Herencia.

Esta teoría fue propuesta por Wilson en 1896 y sus puntos esenciales son:

- a) Los genes están situados sobre los cromosomas;
- b) Su ordenación sobre los mismos es lineal y
- c) Al fenómeno genético de la recombinación le corresponde un fenómeno citológico de intercambio de segmentos cromosómicos (Lacadena, 1988).

Pueden sucederse en forma espontánea o artificial variaciones cromosómicas estructurales como duplicaciones, deficiencias, inversiones, translocaciones, etc, que afectan la ordenación lineal de genes. O bien, aquellas que afectan el número, es decir, variación cromosómica numérica como poliploidías o aneuploidías. Estas alteraciones son elementos primordiales para conocer los cambios producidos en el cariotipo y su relación con el proceso de formación y evolución de las especies (Lacadena, 1988).

### Cromosomas mitóticos

Estos son observados en células somáticas obtenidas de tejido meristemático, las cuales son sometidas a tratamientos de diversos mitostáticos, fijación y tinción. A partir de estas células se determina el cariotipo.

El cariotipo

El cariotipo es el complemento cromosómico de una especie y se caracteriza por el número, forma y tamaño de los cromosomas. Es característico del individuo, la raza, el género y aún de grupos taxonómicos más grandes (García, 1990).

Número básico (x). Es aquel que representa el número monoploide más pequeño de cromosomas de una serie poliploide (Sinoto y Sato, 1940, citados por Rieger *et al.*, 1982).

El número básico ( $x$ ) de cromosomas es una de las características citológicas mejor conocidas y la más utilizada en la determinación de la posición taxonómica y filogenética de las especies (García, 1990), ya que proporciona una idea de la similitud genética entre poblaciones y especies (Kenton, 1986).

El número de cromosomas en una especie determinada generalmente es constante; todos los miembros de esa especie tienen el mismo número diploide ( $2n$ ) de cromosomas en sus células somáticas y el mismo número haploide ( $n$ ) en sus gametos (García, 1990).

**Morfología cromosómica.** La forma de los cromosomas se observa mejor durante la metafase o anafase somáticas, en estas etapas los cromosomas han alcanzado su máxima contracción, logrando una longitud que bajo condiciones ambientales normales permanece constante de célula a célula (Lacadena, 1988).

La morfología cromosómica es determinada por la posición del centrómero, el cual separa al cromosoma en dos regiones o brazos. La localización del centrómero puede expresarse en términos de relación de brazos que se estima mediante la división de la longitud del brazo más largo entre la del más corto (García, 1990).

Según la posición del centrómero, Levan *et al.*, (1964) clasifican a los cromosomas en:

- Metacéntrico: cuando el centrómero se encuentra cerca o en la parte media del cromosoma, de modo que sus brazos son casi o iguales en longitud.
- Submetacéntrico: el centrómero se localiza más cerca de un extremo de un cromosoma que del otro, de modo que son dos brazos desiguales pero menos que en el acrocéntrico.
- Subtelocéntrico o acrocéntrico: el centrómero se encuentra cerca de uno de los extremos del cromosoma de modo que tiene un brazo largo y uno muy corto.
- Telocéntrico: el centrómero se observa en uno de los extremos del cromosoma de modo que éste consiste de un brazo.

**Satélite.** Es una estructura utilizada para marcar ciertos cromosomas. Es un segmento largo o corto de un brazo separado del resto del mismo por una constricción secundaria. En muchas ocasiones la constricción está cerca de la punta de un brazo y el satélite es apenas una pequeña esfera. Generalmente se presentan en el extremo del brazo corto de un cromosoma con centrómero subterminal, pero también se encuentran en cromosomas metacéntricos. La mayoría de las especies diploides presentan únicamente un par de satélites, pero también las hay con tres o más pares de cromosomas con satélite (García, 1990).

**Tamaño del cromosoma.** El tamaño absoluto se refiere a la longitud y diámetro, expresados en micras, del total y de cada uno de los cromosomas.

El tamaño relativo ( $L\%$ ) es la relación que guarda la longitud de un cromosoma particular con respecto a la de los demás y a la total del genomio. Esta es una

característica constante y permite la identificación y clasificación del complejo cromosómico (García, 1990).

**Tamaño del genomio.** Puede evaluarse por medio de la longitud total de la cromatina (LTC), que se obtiene mediante la suma de las longitudes de todos los cromosomas de un genomio. Patil y Chennaveeraiah (1975) y Gupta y Gupta (1978), señalan que en algunos casos, la diferencia en la LTC en la misma especie, define la variación entre los taxa. Por tanto el tamaño del genomio es un parámetro que ayuda a definir citotipos en angiospermas y puede variar en poblaciones de la misma especie (Price, 1976) o también a nivel interespecífico (Barlow y Nevin, 1976; Bennett *et al.*, 1991 y Palomino, 2000).

**Simetría y asimetría en el cariotipo.** El cariotipo de muchas especies vegetales consiste de cromosomas que son comparables uno de otro en tamaño. Existen sin embargo, muchos complementos que contienen cromosomas de dos tamaños, grandes y pequeños.

En un cariotipo simétrico todos sus cromosomas son similares en tamaño, con centrómero medio o submedio. Un cariotipo asimétrico posee muchos cromosomas con centrómero subterminal o con grandes diferencias en tamaño entre los cromosomas (Stebbins, 1971).

**Cariograma:** el complemento cromosómico se representa mediante el arreglo de las fotomicrografías de cada uno de los cromosomas, los cuales se disponen en pares de homólogos y en series de tamaños decrecientes (García, 1990).

**Idiograma:** es una representación diagramática que se integra con la información de varias células, en la que se disponen los cromosomas a manera de barras en orden decreciente de longitud, con la localización del centrómero de cada cromosoma e indicando y representando el satélite y las constricciones secundarias (García, 1990).

### **Cromosomas meióticos**

La meiosis tiene un significado biológico especial, ya que durante ésta se produce la recombinación genética y la reducción del número de cromosomas. La recombinación genética permite aumentar la variabilidad de una población al combinar en un individuo la información genética recibida de sus progenitores, de manera que dicho individuo transmitirá a su descendencia, a través de sus gametos, una combinación al azar de la información genética recibida de sus padres. Esa variabilidad genética es la base de la selección natural y de la adaptación del organismo al medio ambiente. La meiosis es en consecuencia, un proceso sumamente importante en la existencia y el desarrollo continuo de la especie (Lacadena, 1988).

Los cromosomas meióticos comúnmente se observan en células madres del polen (CMP) contenidas en las anteras de flores jóvenes, por la emasculación de anteras, tinción y observación al microscopio de luz (García, 1990).

El análisis de la meiosis permite establecer relaciones entre las especies a nivel genómico. El conocimiento de la frecuencia de quiasmas ( $Fq$ ) tiene importancia en el comportamiento genético de un organismo, y se define como el número promedio de quiasmas del bivalente o de todo el cariotipo (White, 1973). El número y posición de los intercambios (quiasmas), observados en los bivalentes de la metafase I de la meiosis, determina el grado de recombinación (o índice de recombinación, IR) entre genomas individuales y determina también el grado de segregación génica en la siguiente generación.

Con los análisis meióticos pueden conocerse los cambios estructurales heterocigóticos producidos por inversiones, intercambios o fusiones cromosómicas, los que alteran la posición de los quiasmas y la constitución genética de los gametos. También el estudio de los cromosomas meióticos es importante para distinguir autoploidos (que generalmente forman asociaciones multivalentes), de los alopoloidos, donde usualmente se observan bivalentes (Palomino, 1995).

### Importancia de la citogenética en estudios taxonómicos

La determinación del cariotipo es importante ya que permite conocer el número básico de grupos de ligamiento génico ( $x$ ) y cuantas veces se repiten, proporcionando un indicador rápido de la similitud génica entre poblaciones o especies (Palomino, 1995).

La determinación de la relación de brazos cromosómicos y de otros parámetros obtenidos del análisis de los cromosomas ayudan a conocer la similitud cariotípica entre poblaciones y especies relacionadas, dicha similitud favorece la posibilidad de entrecruzamiento. Estas variables también son importantes para conocer el nivel de ploidía, a pesar de que no son útiles para distinguir entre un autoploide y un alopoloide.

Con estos estudios se analiza también la variación numérica y estructural de los cariotipos de poblaciones de una misma especie (llamados citotipos) o de especies emparentadas. Esta información es relevante para comprender el papel que juegan los cambios cromosómicos en la evolución y especiación de las plantas (Palomino, 1995).

Así, la obtención del número cromosómico gamético, somático ( $n$  y  $2n$ ) y básico ( $x$ ), el análisis del cariotipo y el comportamiento de los cromosomas meióticos, son parámetros citológicos útiles en la caracterización de especies en conjunto con estudios morfológicos, reproductivos, químicos; etc. Por ejemplo Sinha y Roy (1979) observaron en el género *Phaseolus* un número cromosómico constante ( $2n=22$ ), sin embargo, las especies estudiadas mostraron variación en la longitud y morfología de los cromosomas; en el género *Sophora* (Fabaceae), los estudios de número cromosómico y cariotípicos, contribuyeron a la determinación de dos géneros, el género *Sophora* con un  $x=9$  y  $2n=18$ , y el género *Styphnolobium* con un  $x=14$  y  $2n=28$  (Palomino *et al.*, 1993); otro ejemplo es el género *Datura* en el que un estudio

citológico de 5 especies mostró un mismo número cromosómico para las 5 ( $2n=24$ ), pero reveló diferencia a nivel cariotípico, se relacionaron en cuanto a longitud del genomio *D. discolor* con *D. inoxia* (de la misma sección, Dutra) y *D. quercifolia* con *D. stramonium*, (de la misma sección, Datura) pero no hubo similitud entre *D. stramonium* y *D. discolor* (de secciones diferentes, Ramírez, 1999).

## II. Citogenética en cactáceas

Tanto el análisis del cariotipo como del comportamiento de los cromosomas meióticos representan un marcador citogenético para caracterizar especies (Johnson, 1980; Cota y Wallace, 1995) y variedades de cactáceas (Palomino *et al.*, 1988).

Los estudios en variación numérica y estructural de los cromosomas aportan información valiosa para la sistemática de la familia Cactaceae (Sosa y Acosta, 1966; Cota y Wallace, 1995). La poliploidía es la principal fuente de variación en esta familia (Beard, 1937; Remski, 1954; Pinkava y McLeod, 1971). Autopoliploides o aloploiploides se han reportado en 10 géneros, incluyendo a *Mammillaria* y *Opuntia* (Katagiri, 1953 y Remski, 1954).

Se han reportado conteos cromosómicos en 155 especies del género *Mammillaria*, estableciéndose que su número básico es  $x=11$ , al igual que en la familia Cactaceae (Remski, 1954; Sosa y Acosta, 1966; Johnson, 1980 y Palomino *et al.*, 1999). La mayoría de las especies diploides se localizan en la República Mexicana, donde se ubica el centro de origen y diversidad del género (Remski, 1954; Johnson, 1978 y 1980).

Dentro del subgénero *Mammillaria* se ha determinado el número cromosómico en 30 especies (Remski, 1954; Pinkava *et al.*, 1971; Weedin y Powell, 1978; Johnson, 1978, 1980; Ross, 1981; Gallagher y Parfitt, 1982; Pinkava y Parfitt, 1982; Gill y Goyal, 1984; Pinkava *et al.*, 1985; y Das *et al.*, 1996).

En la serie *Supertextae*, hay reportes de números cromosómicos ( $n$  y  $2n$ ) para 4 especies: *M. ruestii*, especie tetraploide ( $4n=4x=44$ ), (Remski, 1954) y tres especies diploides ( $2n=2x=22$ ), *M. vaupelii* (Remski, 1954), *M. lanata* (Gill y Goyal, 1984) y *M. san-angelensis* ( $n=11$ ;  $2n=22$ , Palomino *et al.*, 1999).

### Variabilidad interespecífica y mitosis en cactáceas

En diferentes especies de cactáceas se ha observado variabilidad intra e interespecífica. Ambas se determinan por la variación en el número cromosómico ( $n$  y  $2n$ ), la estructura cariotípica que incluye la forma de los cromosomas, el número y posición de satélites, la longitud total del genomio y los cambios en el nivel de ploidía.

La variabilidad interespecífica a nivel de cariotipo se ha observado en especies del género *Mammillaria*: *M. bombycina*, *M. wildii*, *M. pygmaea*, *M. ritteriana* y *M. microheliopsis* en estas especies dos cromosomas presentan grandes satélites, la mayoría de los cromosomas son metacéntricos y sólo seis cromosomas tienen brazos

con una longitud ligeramente desigual (Remski, 1954 y Johnson, 1978 y 1980). La especie *M. san-angelensis*, presentó 11 pares de cromosomas metacéntricos y dos pares de cromosomas con satélite (Palomino *et al.*, 1999).

También se ha observado variación interespecífica en especies diploides de *Echinocereus*: *E. knippelianus*, *E. laui* y *E. stoloniferus*, donde las tres especies muestran diferente longitud cromosómica en sus genomios y una predominancia de cromosomas metacéntricos (Cota y Wallace, 1995).

Los cromosomas de *Nyctocereus castellanosii* y *N. serpentinus*, presentaron diferente longitud, sin embargo todos fueron metacéntricos. Ambas especies mostraron satélite en tres pares de cromosomas. Sin embargo, *N. serpentinus*, var. *splendens* mostró dos pares de cromosomas submetacéntricos (Palomino *et al.*, 1988).

### Variabilidad interespecífica, poliploidía y meiosis en cactáceas

La variabilidad interespecífica determinada por cambios en el nivel de ploidía, es muy frecuente en especies de *Opuntia* como *O. atrispina* ( $2n=66$ ), *O. chaffeyi* ( $2n=44$ ) y *O. ficus-indica* ( $2n=88$ ).

También en *Mammillaria* se ha observado poliploidía, Remski (1954), reporta tetraploides ( $4x$ ) en *M. compressa*, *M. dioica*, *M. morganiana*, *M. multiceps* y *M. prolifera*; hexaploides ( $6x$ ) en *M. prolifera* y 24 ploidies ( $24x$ ) en *M. capensis* var. *pallida*.

En las especies tetraploides *M. multiceps* y *M. prolifera*, Remski, (1954) observó autoploidía. La restitución cromosómica (en la 1ª o 2ª división meiótica) ocasiona autoploidía y de acuerdo a Harlan y De Wet (1975) la poliploidía ocurre con mayor frecuencia vía meiosis, y la presencia de multivalentes sólo confirma que se trata de un autoploide y no necesariamente el mecanismo de origen.

Mohanty *et al.*, (1997), observaron variación interespecífica en la frecuencia de quiasmas, en las especies *M. asteriflora*, *M. bella*, *M. elongata*, *M. matudae*, entre otras. En *M. collinsii* y *M. klissingiana* observaron la formación de univalentes, separación temprana o tardía de bivalentes y presencia de más de 4 microesporas en telofase II.

### III. Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos se define como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Pérez, 1998).

#### Factores que influyen en el cultivo *in vitro*.

##### Medio de cultivo

Se compone de sales minerales, fuentes de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento, con o sin agar y otros compuestos orgánicos, carbón activado, agua de



coco, etc. (George, 1993).

### Explante

El estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante, así como su tamaño, son de gran influencia en el éxito del cultivo *in vitro* (George y Sherrington, 1984).

Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro* (Pérez, 1998).

### Luz

Tanto la duración diurna (fotoperíodo) como la calidad (longitud de onda e intensidad) son importantes, ya que al influir en la síntesis y acumulación de almidón y en la actuación de las hormonas endógenas, entre otras sustancias, afectan el desarrollo del explante.

### Temperatura

Una temperatura que oscile entre 25° y 30°C es aceptable para la incubación, aunque según la especie, las temperaturas específicas pueden estar entre 17° y 32°C (George, 1993).

### Principales aplicaciones del cultivo *in vitro*

Sus aplicaciones van desde estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* y la ingeniería genética (Pérez, 1998).

### Micropropagación en cactáceas

La micropropagación es la reproducción asexual *in vitro* a partir de un explante (meristemo, callo, células en suspensión, polen, etc.) mediante la inducción de la embriogénesis u organogénesis (George, 1993). Entre las plantas suculentas, las cactáceas son las que han recibido mayor atención en micropropagación, y entre las cactáceas, los géneros que han respondido más satisfactoriamente al cultivo *in vitro* son *Opuntia* y *Mammillaria*.

### Rescate de especies en extinción por cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos se basa en la teoría de la totipotencialidad celular y la realización de este potencial en muchas especies de interés comercial, abre la posibilidad de usar esta metodología en especies en extinción (Beverdors, 1990).

Según Murashige (1974), el cultivo de tejidos vegetales se divide convencionalmente en tres etapas: la primera se refiere al establecimiento de los cultivos *in vitro* en forma aséptica; la segunda etapa consiste en la expresión morfo genética *in vitro* de los

explantes seleccionados y la tercera incluye su preparación para pasar de *in vitro* a *in vivo* incluyendo la fase de enraizamiento. Con esto se cumple lo que sería la primera fase del rescate de especies en extinción.

El rescate de especies en extinción por cultivo *in vitro* resulta benéfico ya que permite al investigador manipular el sistema experimental en varias rutas que resuelvan el problema, no sólo generando cantidades masivas de plantas aptas para su reintroducción, sino generando cierto tipo de individuos que van a incidir directamente en la presión que causa la extinción de la especie (Rubluo, 1997).

La micropropagación de especies de cactáceas raras y en peligro de extinción ha sido reportada por Nava-Esparza y Yáñez (1984) en *Cephalocereus senilis*; Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) propagaron *M. san-angelensis*; Rubluo *et al.*, (1990) a *M. huitzilopochtli*. Fay y Muir (1990) reportaron la exitosa propagación de *Opuntia echios* var. *gigantea*.

#### Micropropagación del género *Mammillaria*

La importancia primordial de las especies de *Mammillaria* es su valor estético como planta ornamental, debido a ello ha sido excesivamente depredada en campo. Las prácticas convencionales de propagación son insuficientes para cubrir la demanda comercial de *Mammillaria*, particularmente de aquellas especies con baja germinación, lento crecimiento y/o insuficiente ramificación lateral.

La micropropagación proporciona estrategias no sólo para recuperar las especies en peligro de extinción sino que además ofrece posibilidades para su comercialización y para mantener e incrementar la diversidad genética de *Mammillarias* en peligro de extinción (Rubluo *et al.*, 1994).

El primer cultivo *in vitro* en *Mammillaria*, fue reportado por Minocha y Mehra (1974) y *M. woodsii* fue el primer cactus propagado por cultivo de tejidos. Algunas otras especies del género *Mammillaria*, que han sido propagadas con éxito son *M. prolifera* y *M. carmenae* (Vyskot y Jára, 1984); *M. duwei* (Delgadillo-Reynoso, 1990); *M. wrightii* (Clayton *et al.*, 1990); *M. albilanata*, *M. gracilis*, *M. lasiacantha*, *M. mammillaris*, *M. nana*, *M. parkinsonii*, *M. solisioides*, *M. theresae* y *M. viperina* (Fay y Gratton, 1992).

En el género *Mammillaria* se han explorado dos tipos de propagación *in vitro*: 1) producción de brotes a partir de meristemas preexistentes y 2) regeneración de brotes adventicios a través de la formación de callo. Sin embargo requiere también de embriogénesis somática directa o indirecta, dado que muchas de sus especies están en peligro de extinción o bien por su demanda comercial (Rubluo, 1997).

#### IV. Familia Cactáceae

Las cactáceas son nativas del Continente Americano, la región norte de Sudamérica es considerada como la posible zona de origen de la familia (Gibson y Nobel, 1986). Se distribuyen desde Canadá, a una latitud de 56°N, hasta la Patagonia en Argentina a 52°

latitud S (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). La única especie que crece introducida en las selvas húmedas de África, Madagascar y Ceylán es *Rhipsalis baccifera* (Bravo-Hollis, 1978).

Es una de las principales familias de angiospermas del Nuevo Mundo, y se caracteriza por un alto nivel de diversidad en hábitat, morfología vegetativa, floral y de fruto, así como en morfología de la semilla y síndromes de polinización. Estos son factores que han contribuido a la riqueza de las especies en la familia. Además de la participación de procesos como la poliploidización, hibridación y mutación génica, que se han involucrado en la evolución y especiación de las especies de cactáceas (Cota y Wallace, 1995).

Por otra parte, las características geográficas de México, particularmente la topografía y fisiografía, son una condición importante que ha favorecido el aislamiento y diferenciación entre poblaciones de la misma especie, al originar gran cantidad de microclimas y al actuar como barreras geográficas (Montes, 1978).

### Endemismos en cactáceas

La mayoría de las cactáceas presentan una combinación de características biológicas y ecológicas, sus tasas de crecimiento son muy bajas, sus ciclos de vida largos y sus áreas de distribución son extremadamente restringidas y en ocasiones viven en condiciones edáficas especializadas (Gibson y Nobel, 1986).

La familia incluye cerca de 110 géneros y 2000 especies, de este total, 52 géneros y 850 especies se encuentran en México. Aproximadamente 18 géneros (35%) y 715 especies (84%) son endémicos de nuestro país (Arias, 1993).

Sin embargo para Hunt (1992), con modificaciones de Hernández y Godínez (1994), México cuenta con un total de 48 géneros y 563 especies reconocidas, de los cuales 15 géneros (31.3%) están estrictamente restringidos al territorio nacional.

Bravo-Hollis (1978); Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991a y 1991b) reconocen un 78.9% de especies endémicas (744 especies), mientras que Hunt (1992), reconoce un 77.9% de especies endémicas (559 especies) en México.

De las especies restringidas a México, cerca de tres cuartas partes se concentran en tres tribus: Echinocereae, Pachycereae y Cactaeae, reportándose para esta última 400 especies en nuestro país y de ellas, 340 son endémicas (Arias, 1993).

El género *Mammillaria*, pertenece a la tribu Cactaeae, y es casi endémico en nuestro país. Ya que de un total de 166 especies, 160 se encuentran en México y de esa cantidad 150 son especies endémicas a este país, incluyendo a las especies *M. supertexta*, *M. haageana* y *M. crucigera* (Hunt, 1992, con modificaciones de Hernández y Godínez, 1994).

### El género *Mammillaria* Haworth

*Mammillaria* es el género tipo de la familia Cactaceae y parece ser una entidad heterogénea, ya que los grupos taxonómicos que lo integran presentan una variabilidad estructural en tallo, flor y principalmente en la semilla (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

Las especies que pertenecen a este género presentan las siguientes características: Plantas pequeñas, simples o cespitosas. El tallo es globoso-aplanado, cortamente cilíndrico. Se ramifica por brotes basales o laterales, contiene jugo acuoso o lechoso. Los tubérculos están dispuestos en series espiraladas, 3 y 5, 5 y 8, 8 y 13, 13 y 21 o 21 y 34, son más o menos numerosos, cónico-cilíndricos. Las aréolas son dimorfas, las espiníferas están situadas en el ápice de los tubérculos, provistas de lana cuando jóvenes, con o sin cerdas; las floríferas situadas en la axila de los tubérculos, con lana, con cerdas o desnudas. Las espinas se diferencian en centrales y radiales, pero a veces, son sólo centrales o radiales, son variables en número, forma, dimensiones y color; están dispuestas en las aréolas en formas diversas. Las flores generalmente se disponen en corona cerca del ápice, son pequeñas y/o grandes, de aspecto infundibuliformes o campanuladas, de color blanco, amarillo, rosado, rojo o púrpura; el pericarpelo normalmente sin escamas; el tubo receptacular es corto; en la mayoría de los casos, los estambres son escasos, el estilo es delgado, incluido y los lóbulos del estigma lineares. Los frutos son bayas pequeñas, claviformes, de color rosado-purpúreo hasta escarlata. Las semillas son pequeñas, más o menos globosas o piriformes, con testa de estructura reticulada, foveolada y de color castaño rojizo oscuro o negro; el embrión es ovoide o algo cilíndrico, muy suculento, con cotiledones reducidos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

### Distribución geográfica del género *Mammillaria*

El género *Mammillaria*, evolutivamente más reciente en la familia Cactaceae, está ampliamente representado en la República Mexicana. Sólo algunas especies crecen en el Sur de Estados Unidos, las Antillas, Colombia y Venezuela (Bravo-Hollis, 1978).

Según Craig (1945) en México se distribuye en tres áreas principales:

- 1) en las zonas más áridas, en la región de la meseta central, particularmente en los Estados de Hidalgo, Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí.
- 2) en la parte noroeste, en los Estados de Sonora, Chihuahua y Sinaloa.
- 3) en la Península de Baja California y en las islas vecinas.

Crece desde los litorales hasta las montañas, sin sobrepasar los 3000 m de altitud (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

### Utilidad de las especies del género *Mammillaria*

Los tallos de numerosas cactáceas, entre ellas las especies de *Mammillaria*, se emplean desde tiempos antiguos como alimento humano. En México se expende en

los mercados como una confitura llamada "acitrón" o "dulce de viznaga". *M. discolor* se consume en forma de verdura en la región limítrofe de Puebla y Veracruz. Los frutos o "chilitos de viznaga" como los de *M. magnimamma*, son muy gustados para comerse frescos o preparados en mermelada, por lo que son objeto de intenso comercio en los mercados de algunas poblaciones de la región (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

Desde el primer contacto europeo con la flora del Nuevo Mundo, las cactáceas despertaron el interés por sus formas particulares, el color tan variado de sus espinas y la belleza de sus flores. De ahí que una gran cantidad de ellas se utilicen como plantas de ornato, un ejemplo es *M. crucigera*, la cual desde hace décadas se cultiva con fines ornamentales en el extranjero (Reyes y Arias, 1995).

### Taxonomía del género *Mammillaria*

Buxbaum (1950) expuso la teoría de que algunos de los diversos grupos que integran el género *Mammillaria* derivaron de distintos grupos filogenéticos, adquiriendo por convergencia, la forma "*Mammillaria*".

Según Buxbaum (1951), el género *Echinocactus*, dió origen a distintas líneas evolutivas, en una de las cuales se encuentra el género *Mammillaria*.

De acuerdo con la hipótesis de Buxbaum (1969), el género *Mammillaria* que está comprendido taxonómicamente en la subfamilia Cactoideae, tuvo su origen, como las demás cactáceas, en las formas ancestrales del Caribe que emigraron hacia el noroeste, diferenciándose durante su trayecto en los géneros actuales que crecen en la mayoría de los tipos de vegetación de México.

De acuerdo a Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991b), el género *Mammillaria* comprende 10 subgéneros, a su vez algunos de ellos se subdividen en secciones o series:

#### Género *Mammillaria*

Subgénero *Phellosperma* (Britton et Rose)

Subgénero *Bartschella* (Britton et Rose) Moran

Subgénero *Mammilloidya* (Buxbaum) Moran

Subgénero *Pseudomammillaria* (Buxbaum) Bravo

Subgénero *Longiflora* (Hunt) Bravo

Subgénero *Solisia* (Britton et Rose)

Subgénero *Porfiria* (Boedeker)

Subgénero *Leptocladodia* (Lemaire) Bravo

Serie I *Leptocladodae* (Lemaire) Schuman

Serie II *Sphacelatae* Hunt

Subgénero *Chilita* (Orcutt, Buxbaum) Moran ex Buxb.

Serie I *Archiebnerellae* (Buxbaum) Bravo

Serie II *Stylothelae* (Pfeiffer) Schumann

Serie III *Ancistracanthae* Schumann

Serie IV *Proliferae* Hunt

Serie V *Lasiacanthae* Hunt

Subgénero *Mammillaria*

Sección *Subhydrochylus* Backeberg

Serie *Polyacanthae* (Salm-Dyck) Schumann

Serie *Heterochlorae* (Salm-Dyck) Schumann

Serie *Supertextae* Hunt

Sección *Mammillaria*

Serie *Leucocephalae* (Lemaire) Schumann

Serie *Polyedrae* (Pfeiffer) Schumann

Serie *Macrothelae* (Salm-Dyck) Schumann

### Clasificación taxonómica de *Mammillaria haageana*, *M. supertexta* y *M. crucigera*.

De acuerdo a Buxbaum (1958) citado por Bravo-Hollis (1978).

Orden: Cactales Britton et Rose

Familia: Cactaceae A. L. Jussieu

Subfamilia: Cactoideae (Cereoideae Schumann)

Tribu: Cacteeae (Echinocacteeae, Schumann, Buxbaum)

Subtribu: Cactinae (Ferocactinae, Buxbaum)

Línea: Neobesseya Buxbaum

Género: *Mammillaria* Haworth

Subgénero: *Mammillaria*

Sección: *Subhydrochylus* Backeberg

Serie *Supertextae* Hunt

Especie: *M. haageana* Pfeiffer

Especie: *M. supertexta* Martius ex Pfeiffer

Especie: *M. crucigera* Martius

### Descripción morfológica y distribución de *M. haageana*, *M. supertexta* y *M. crucigera*.

Las especies que integran la serie *Supertextae*, entre ellas, *M. haageana*, *M. supertexta* y *M. crucigera*, se caracterizan por ser muy variables morfológicamente. Generalmente crecen en suelos calizos o yesosos, principalmente en bosque tropical caducifolio y matorral espinoso (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991b).

### Descripción de *M. haageana* Pfeiffer

TALLO simple, a veces cespitoso desde la base, globoso o cilíndrico, ápice redondeado, con el centro hundido. TUBERCULOS dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, cónico-piramidales y de consistencia firme, color verde-azulado, con jugo acuoso. AREOLAS ovales, con lana blanca cuando jóvenes. AXILAS con lana blanca, que desaparece con el tiempo. ESPINAS RADIALES 18 a 20 espinas delgadas y

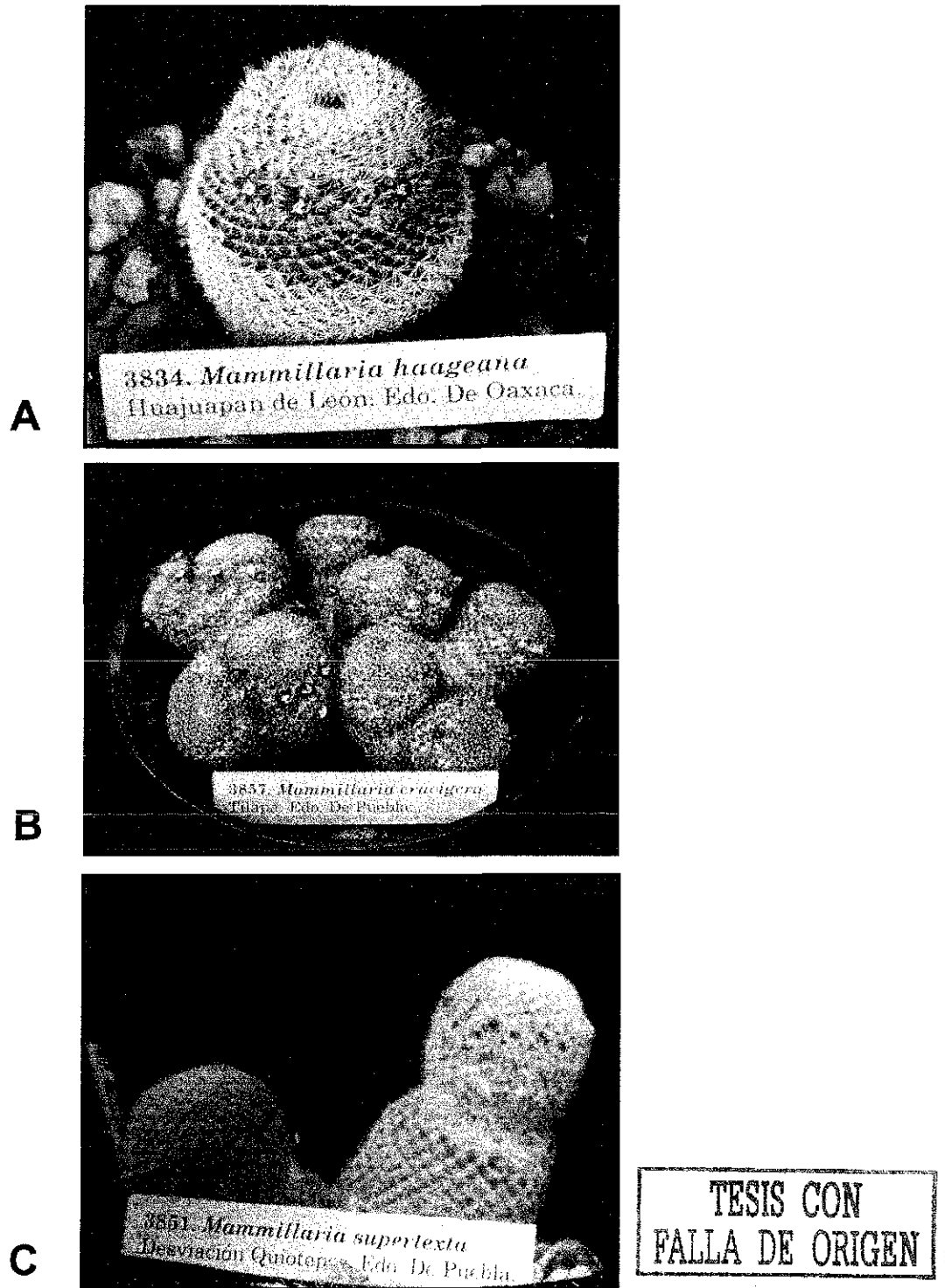
aciculares, rectas ó ligeramente encorvadas y lisas de color blanco. ESPINAS CENTRALES dos, la inferior más larga, aciculares o ligeramente encorvadas. Color castaño o negro, divergentes hacia arriba y hacia abajo. SEMILLA encorvado-piriforme, de 1mm de longitud. Color castaño-oliváceo. FLOR laterales, infundibuliformes, de 12mm de longitud y color púrpura. Filamentos de color blanco abajo y rosado arriba, las anteras son amarillas. Los lóbulos del estigma tres, de color verde olivo pálido. Fruto cilíndrico, claviforme de 1 cm de longitud, rojo arriba y rosado en la base; conserva adheridos los restos del perianto. DISTRIBUCION Estados de Puebla y Oaxaca. (Figura 1 A).

#### Descripción de *M. crucigera* Martius

TALLO simple a cespitoso, ramificado por dicotomía; globoso hasta cilíndrico, con el apice hundido. Comúnmente produce formas cristatas. TUBERCULOS dispuestos en 8 y 13 ó 13 y 21 series espiraladas, de consistencia firme. Color verde olivo grisáceo, contienen jugo acuoso. AREOLAS circulares con escasa lana blanca en las más jóvenes. AXILAS con abundante lana blanca, después desnudas. ESPINAS RADIALES 24 a 30, desde finamente aciculares, hasta setosas. Rectas y lisas de color blanco, las horizontales más delgadas que las centrales. ESPINAS CENTRALES generalmente 4, subuladas, rectas rígidas y lisas, color amarillento o blanco yesoso con la punta castaño oscuro o negra y la base castaño anaranjada. Su posición es horizontal y dispuestas en cruz. SEMILLA encorvado-piriformes, de 1mm de longitud, color amarillento hasta castaño. FLOR infundibuliformes, color rojo púrpureo. Filamentos purpúreos y las anteras amarillas. Lóbulos del estigma son 4 o 5, rojo carmín hasta violeta, sobrepasando las anteras. Fruto claviforme, rojo, de 1 cm de longitud, conserva adheridos los restos del perianto. DISTRIBUCION Estados de Puebla y Oaxaca. (Figura 1 B).

#### Descripción de *M. supertexta* Martius ex Pfeiffer

TALLO globoso o un poco cilíndrico. TUBERCULOS dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, redondeados y verdes de consistencia firme, jugo acuoso. AREOLAS ovales con lana amarillenta cuando jóvenes, después caduca. AXILAS con lana de modo que el ápice de los tubérculos resalta bastante. ESPINAS RADIALES 10 a 16 espinas, setosas, las laterales, más largas y rígidas de color blanco. ESPINAS CENTRALES dos, cortas y rígidas, un poco aplanadas. De color blanco hacia abajo, castaño hacia arriba y con las puntas negras. SEMILLA piriforme y de color castaño. FLOR infundibuliformes, de 12mm de longitud, color púrpura. Filamentos blancos, anteras amarillas. Lóbulos del estigma cinco, de color amarillo. Fruto claviforme, rosado a rojizo. DISTRIBUCION Estados de Puebla y Oaxaca. (Figura 1 C).



**FIGURA 1.** Ejemplares representativos de tres especies del género *Mammillaria* en las que se realizaron los estudios cariotípicos y de cultivo *in vitro*. **A:** *M. haageana*, **B:** *M. crucigera* y **C:** *M. supertexta*.



## OBJETIVOS

- ♦ Elaborar cariotipos y determinar variación interespecífica en individuos pertenecientes a las especies *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*. Comparar estos resultados con los obtenidos en *M. san-angelensis* por Palomino *et al.*, (1999).
- ♦ Conocer el comportamiento meiótico, determinando la presencia de bivalentes, frecuencia de quiasmas ( $Fq$ ) e índice de recombinación (IR). Conocer el porcentaje de polen viable de las especies mencionadas.
- ♦ Determinar el comportamiento *in vitro* de las especies *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*, aplicando el método propuesto por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) para *M. san- angelensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con tres especies del género *Mammillaria*, serie *Supertextae*: *M. haageana*, *M. crucigera* y *M. supertexta*, (Figuras 1 A, B y C).

### I. Procedencia de las especies.

Los individuos de las especies de *Mammillaria*, utilizados en esta investigación, se colectaron en los Estados de Puebla y Oaxaca (Cuadro 1; Figura 2). Las plantas se mantienen en los invernaderos del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM. Los ejemplares de herbario fueron depositados en el Herbario Nacional (MEXU).

### II. Selección de material biológico.

Criterios de selección de especies: las tres son especies endémicas de México. *M. supertexta* es la especie tipo de la serie y está catalogada, al igual que *M. crucigera*, como una especie vulnerable o amenazada de extinción, según la IUCN. *M. crucigera*, además es una especie rara (SEDESOL; 1994). *M. haageana* mantiene sinonimia con *M. san-angelensis* (Hunt, 1987).

CUADRO 1. Datos de colecta de tres especies de *Mammillaria*.

Especie	Número de individuos	Colector	Número de colecta	Localidad
<i>M. haageana</i>	4	J. Reyes—F. Briones	3833	Acatlán, Edo. de Puebla. 1050 msnm.
<i>M. haageana</i>	11	J. Reyes—F. Briones	3834	Huajuapán de León, Edo. de Oaxaca. 1750 msnm.
<i>M. supertexta</i>	6	J. Reyes—F. Briones	3851	Desviación Quiotepec, carretera Teotitlán-Cuicatlán, Edo. de Oaxaca.
<i>M. crucigera</i>	12	J. Reyes—F. Briones	3857	Tilapa, Edo. de Puebla 900 msnm

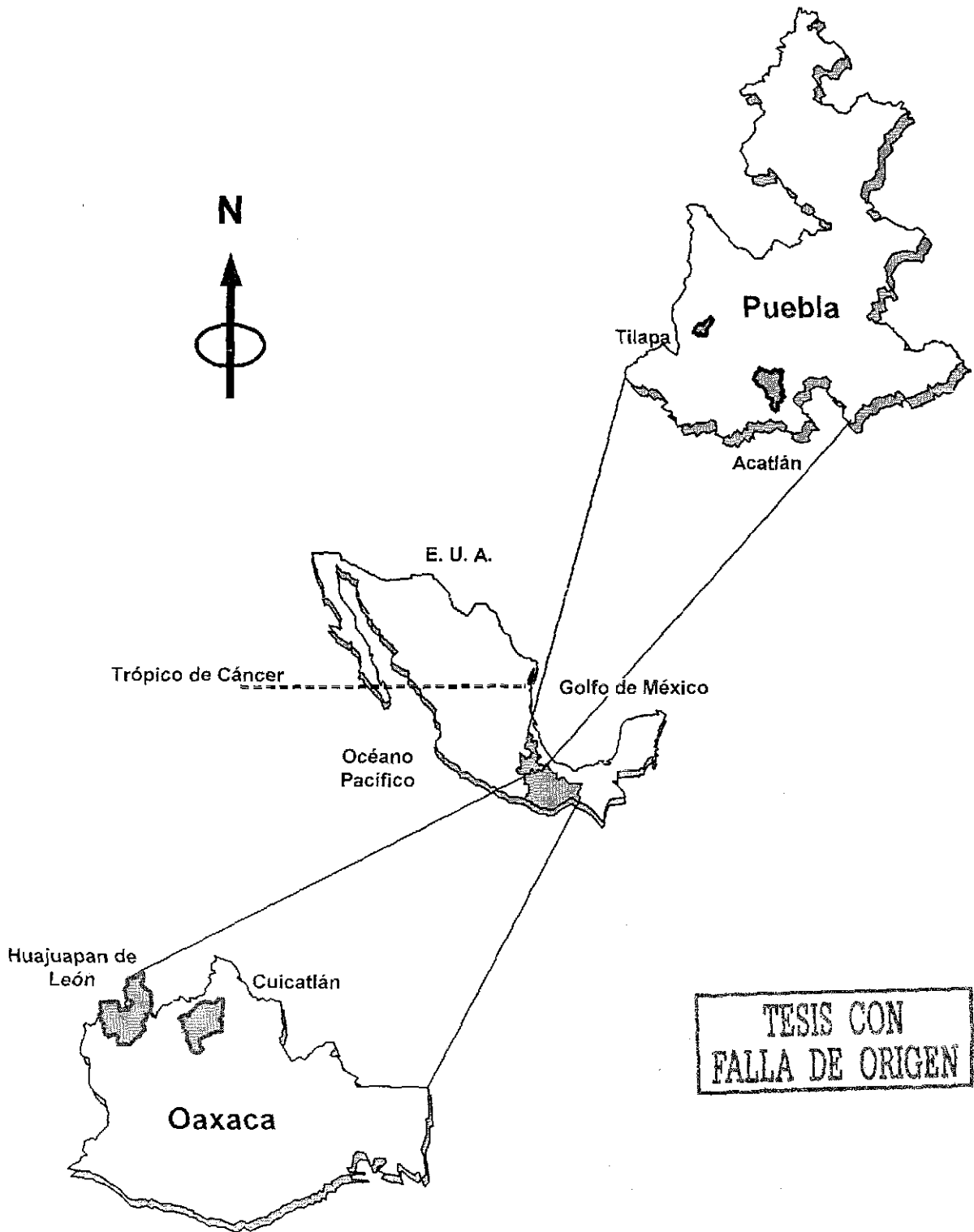


FIGURA 2. Localidades de colecta de *Mammillaria*, en Tilapa se colectó *M. crucigera* y en Acatlán *M. haageana*; en Huajuapán de León se colectó *M. haageana* y en Cuicatlán *M. supertexta*.

### III. Análisis de cromosomas mitóticos

Estos se observaron en las especies: *M. supertexta* (Edo. de Oaxaca), *M. crucigera* (Edo. de Puebla) y *M. haageana* (Edo. de Oaxaca). La metodología a seguir para la elaboración de cariotipos fue la propuesta por García (1990); Cid y Palomino (1996).

Para la observación de los cromosomas mitóticos, se utilizaron ápices radicales obtenidos de las plantas de cada una de las especies colectadas. Se trabajó con 3 individuos por especie y se analizaron de 3 a 5 células de meristemas radicales diferentes en cada individuo.

Raíces de 1cm de longitud se colectaron entre las 7:30 y 8:30 AM y se pretrataron con solución acuosa saturada de 1-Bromo-Naftaleno por 6 hrs. a 18°-20°C. Los ápices radicales se fijaron en mezcla Farmer (alcohol etílico 96° y ácido acético glacial, 3:1v/v). Se hidrolizaron en HCl 1N durante 11 min. a 60°C. Se colorearon con Feulgen, a temperatura ambiente, en el que se mantuvieron hasta obtener un color magenta.

Posteriormente se aplicó la técnica de aplastado, que consiste en colocar una porción de 0.5-1mm. de ápice sobre un portaobjetos, se le adiciona una gota de aceto-orceína 1% y se golpea ligeramente con la parte superior de una aguja de disección, logrando dispersar las células. La preparación se aplasta entre dos hojas de papel absorbente, y se observa al microscopio óptico. Las células que muestran cromosomas en un plano y bien separados, se hacen permanentes mediante la técnica de hielo seco según Conger y Fairchild (1953).

#### Elaboración de cariotipos

Las células que mostraron cromosomas bien separados y en un solo plano, se fotografiaron en un Fotomicroscopio II (Zeiss) con un objetivo de 100X y optovar 1.25, utilizando película Technical Pan, ASA 100. Los negativos se utilizaron para dibujar y medir los cromosomas de cada célula, para ello se auxilió con un proyector de transparencias.

De cada uno de los cromosomas del complemento, se determinó la longitud de los brazos largo y corto, cuya suma proporciona la longitud total (Lt) de cada uno de los cromosomas, se determinó también la longitud relativa (L%) y la posición del centrómero, expresada en términos de relación de brazos (r). La clasificación morfológica de los cromosomas se asignó de acuerdo a la clasificación de Levan *et al.*, (1964). Se determinó también la presencia, número y posición de satélites.

Para homologar los cromosomas, se consideró la longitud de brazo largo, brazo corto y total de cada cromosoma del complemento. Mediante el promedio de ésta se obtuvo un valor único de longitud para cada par cromosómico homólogo. También, se tomó en cuenta la similitud morfológica y presencia de marcadores como son los satélites.

El índice de asimetría (TF%) del cariotipo de cada especie, se determinó de acuerdo a Gupta y Gupta (1978), mediante la siguiente ecuación:

$$TF\% = \frac{\text{Suma total de brazos cortos de los cromosomas}}{\text{suma total de la longitud del genomio}} \times 100$$

#### IV. Comportamiento de cromosomas meióticos

El análisis de meiosis en metafase I (MI) se llevó a cabo en 32 células madres del polen (CMP) de anteras de botones florales de individuos de la especie *M. haageana* (Edo. de Oaxaca).

Los botones florales se colectaron entre las 11:00 - 13:00 PM, se fijaron en mezcla Farmer. Se extrajeron las anteras y se cortaron en forma transversal para exponer así los microsporocitos. Se agregó aceto-orceína 1% para teñir los cromosomas de las CMP y se practicó el aplastamiento del mismo modo que en los meristemos radicales para observar cromosomas mitóticos. Las preparaciones que presentaron células en MI, se hicieron permanentes por el método de Conger y Fairchild (1953).

Se determinó la presencia de bivalentes, la frecuencia de quiasmas por núcleo (Fq) y el índice de recombinación (IR). Las fórmulas utilizadas para determinar la Fq ( Sáez y Cardoso, 1978) y el IR (Darlington, 1937; White, 1973 y Sáez y Cardoso, 1978) fueron:

$$Fq = \frac{\text{Número total de quiasmas por núcleo}}{\text{número total de núcleos}}$$

IR= número de bivalentes (número haploide) + el promedio de quiasmas de todos los cromosomas de una célula.

#### V. Determinación de viabilidad de polen

Se determinó en las especies: *M. supertexta* (Edo. de Oaxaca), *M. crucigera* (Edo. de Puebla) y *M. haageana* (Edo. de Oaxaca). El polen se colectó en un portaobjetos y se le agregó una gota de lacto-fenol-azúl de algodón. Los granos de polen esféricos, con coloración azul intenso se consideraron viables y los incoloros o deformes como no viables (Radford *et al.*, 1974).

#### VI. Micropropagación

Para determinar la respuesta al cultivo *in vitro* de las especies mencionadas se utilizó el método propuesto por Martínez- Vázquez y Rubluo (1989).

El método se dividió básicamente en dos etapas: 1) germinación de semillas *in vitro*, a fin de obtener plántulas y 2) a partir de las plántulas, se obtuvieron los explantes

(porciones laterales de tallo) que se subcultivaron *in vitro* para evaluar su respuesta morfogénica.

### Germinación de semillas

Se germinaron semillas de las tres especies, antes de inducir la germinación, éstas se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 6%, durante 20 min y se lavaron tres veces con agua bidestilada.

Las semillas se sembraron en condiciones asépticas en frascos con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), adicionado únicamente con sacarosa al 3%, sin reguladores de crecimiento.

En seguida se incubaron a temperatura constante  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperiodo de 16 hrs. luz y 8 hrs. de oscuridad, hasta obtener plántulas de 10-15 mm. de longitud, las cuales se utilizaron como fuente de explante.

Se consideró en un inicio trabajar lotes de 30 semillas para cada especie. *M. supertexta* fue la única especie que se trabajó con dicho número de semillas. Sin embargo en *M. haageana* se trabajó con 50 semillas y en *M. crucigera* con 45, debido a que no se observó respuesta en la germinación en el tiempo deseado, por lo que se decidió incrementar el lote de semillas. Incluso se realizaron pruebas de viabilidad de semillas de *M. haageana*. Tales pruebas consistieron en colocar las semillas en cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1% y se guardaron en una cámara de temperatura constante ( $32^{\circ}\text{C}$ ) en oscuridad, por un periodo de una semana, se registró entonces el porcentaje de embriones teñidos, lo que indicó el porcentaje de viabilidad de semillas, que fue del 80%.

### Subcultivo de explantes

Para *M. supertexta* se subcultivaron 28 explantes provenientes de 12 plántulas; para *M. haageana*, del Edo. de Oaxaca se subcultivaron 14 explantes obtenidos de 5 plántulas y para la del Edo. de Puebla se subcultivaron 27 explantes provenientes de 9 plántulas. De los tallos de las plántulas, cuyo tamaño osciló entre 0.5-1.0 cm., se hicieron cortes, bajo condiciones asépticas, en segmentos laterales de 5 mm de diámetro, los cuales constituyeron los explantes. De cada plántula se obtuvo entre 2 y 4 explantes.

Éstos se inocularon en medio de cultivo MS adicionado con Benziladenina (BA) a una concentración de 0.02mg/lt. Se procedió a incubar a una temperatura de  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  con un fotoperíodo de 16 hrs luz (2000 lux) y 8 hrs oscuridad.

Se efectuaron observaciones cada 15 días durante cuatro meses, después de la siembra, y se evaluó su respuesta morfogénica, para lo cual se registró la formación de callo, de brotes y el surgimiento de raíces.

Cabe aclarar que la disponibilidad de material vegetal para el cultivo *in vitro* no fue suficiente, debido a la baja germinación y al lento crecimiento de las plántulas, lo que limitó la posibilidad de incrementar el tamaño de muestra para cada especie.

Los resultados obtenidos en la germinación de semillas y respuesta morfogénica se analizaron estadísticamente mediante el cálculo de  $X^2$  (De fossard, 1976) y de ANOVA (Daniel, 1983) respectivamente.

## RESULTADOS

### I. Cariotipos

#### Número cromosómico

Las especies *Mammillaria supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* mostraron un número cromosómico diploide  $2n=2x=22$ ,  $x=11$  (Figuras 3 A, B y C), en *M. haageana* se observó un  $n = 11$ .

Los complementos cromosómicos de las tres especies se ordenaron por pares de homólogos y de acuerdo a su longitud, siendo el par cromosómico 1 el de mayor longitud y el par cromosómico 11 el de menor longitud (Figuras 4 A, B y C).

#### *Mammillaria supertexta*

##### Longitud cromosómica

La longitud total de los 11 pares de cromosomas, se ubicó en el rango de **1.79-321**  $\mu\text{m}$ . Los pares cromosómicos 1 y 2 mostraron una diferencia más evidente en la longitud total, de 0.28  $\mu\text{m}$ , en tanto que, en los pares cromosómicos 8 y 9, la diferencia fue menor, 0.04  $\mu\text{m}$  (Cuadro 2).

La longitud relativa de los 11 pares de cromosomas, se mantuvo en el intervalo de **6.67-11.96** %. El par cromosómico 1 presentó la mayor longitud relativa y la menor longitud se observó en el par cromosómico 11 (Cuadro 2).

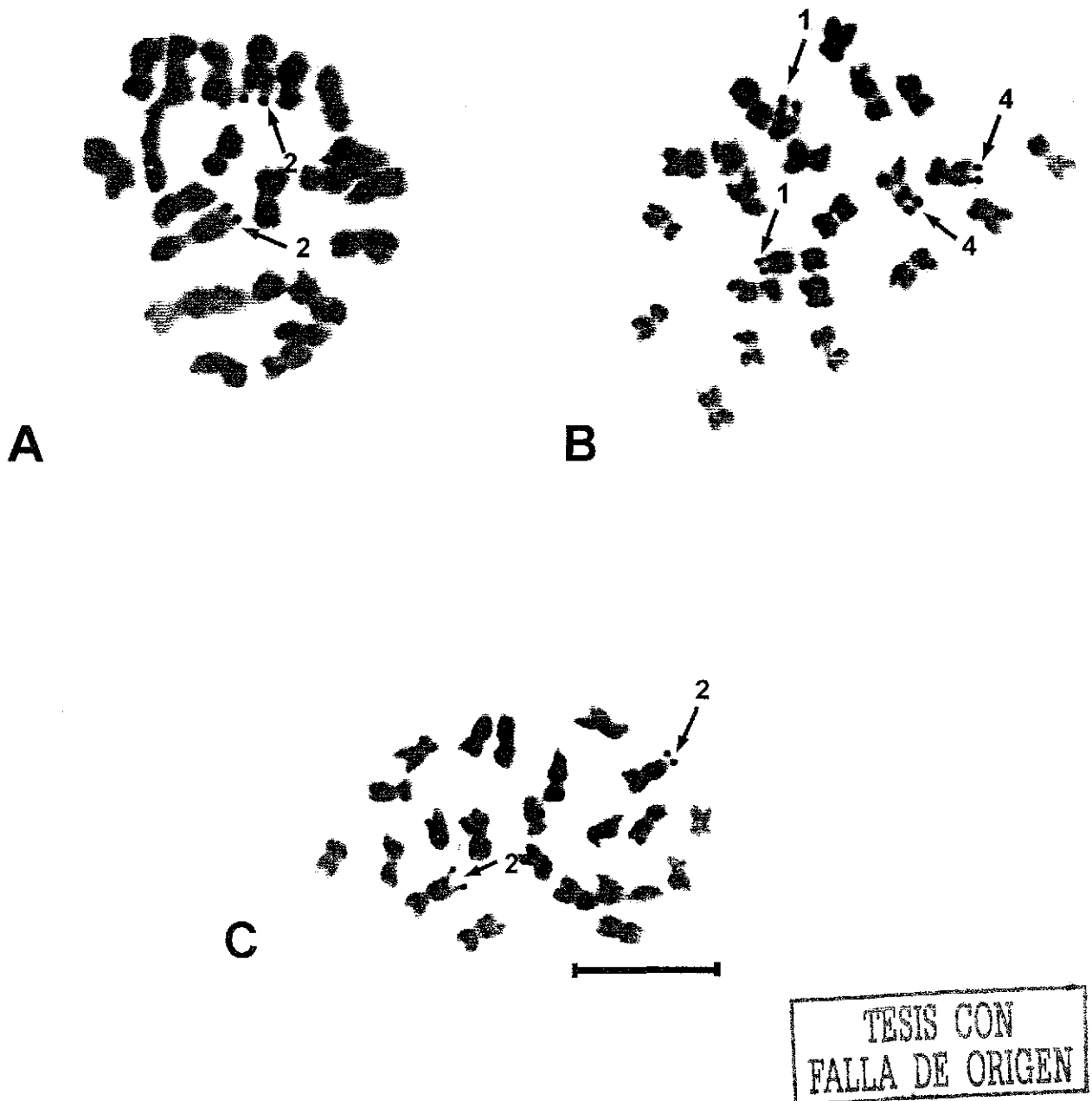
En el complemento cromosómico de esta especie, cada cromosoma mostró un brazo corto y un brazo largo. El tamaño del brazo corto, fue de **0.78**  $\mu\text{m}$  para el par cromosómico menor (No. 11) y de **1.48**  $\mu\text{m}$  para el par cromosómico mayor (No. 1). El tamaño del brazo corto de los restantes 9 pares de cromosomas, se mantiene dentro de estos valores. El intervalo para el tamaño del brazo largo de los 11 pares de cromosomas fue de **1.01-1.73**  $\mu\text{m}$  (Cuadro 2).

La longitud total del genomio haploide fue de 26.84  $\mu\text{m}$  (Cuadro 5).

##### Morfología cromosómica

*M. supertexta* mostró una fórmula cromosómica con  $10m+1sm$ , esto es, diez pares de cromosomas metacéntricos, que corresponden a los pares cromosómicos, 1 al 7 y 9 al 11, y un par de cromosomas submetacéntricos, par No. 8. (Cuadro 2, Figura 4A).





**FIGURA 3.** Cromosomas en metafase de células somáticas de tres especies de *Mammillaria* en las que se aprecia el número cromosómico  $2n=22$   
A) *M. supertexta*, B) *M. crucigera* y C) *M. haageana*. Los números indican los cromosomas homólogos con satélites. Escala 10  $\mu$ m.

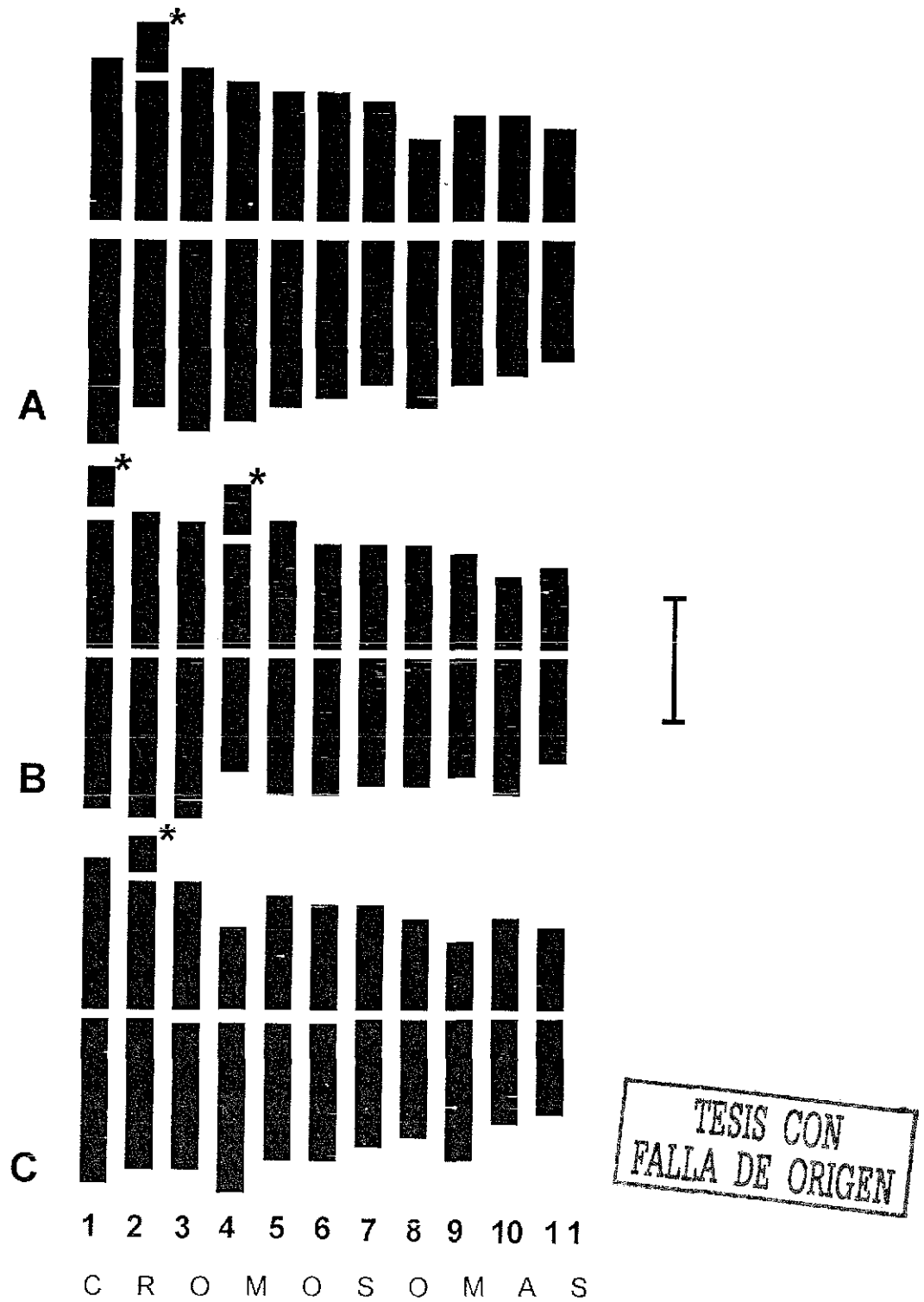


FIGURA 4. Idiogramas de tres especies de *Mammillaria* A) *M. supertexta*,  $2n=22$ ,  $10m+1sm$ ; B) *M. crucigera*,  $2n=22$ ,  $10m+1sm$  y C) *M. haageana*,  $2n=22$ ,  $9m+2sm$ . Los asteriscos indican cromosomas con satélites. Escala  $1\mu m$ .

**Cuadro 2.** Longitud total, de brazo corto y largo, tamaño relativo (L%) y relación de brazos del complemento cromosómico de *Mammillaria supertexta* del estado de Oaxaca.

Par cromosómico	Longitud $\mu\text{m}$			Tamaño relativo (L%)	Relación de brazos (r)	Clasificación cromosómica	
	Brazo corto	Brazo largo	Satélites				Total
1	1.48±0.14	1.73±0.15		3.21±0.20	11.96	1.17	M
2	1.17±0.12	1.36±0.13	0.40	2.93±0.19	10.92	1.16	M
3	1.32±0.13	1.56±0.14		2.88±0.19	10.73	1.18	M
4	1.19±0.12	1.49±0.14		2.68±0.18	9.99	1.25	M
5	1.11±0.12	1.43±0.13		2.54±0.18	9.46	1.29	M
6	1.07±0.11	1.31±0.13		2.38±0.17	8.87	1.22	M
7	1.01±0.11	1.22±0.12		2.23±0.14	8.31	1.21	M
8	0.71±0.09	1.43±0.13		2.14±0.16	7.97	2.01	SM
9	0.94±0.11	1.16±0.12		2.10±0.16	7.82	1.23	M
10	0.88±0.10	1.08±0.12		1.96±0.15	7.30	1.23	M
11	0.78±0.10	1.01±0.11		1.79±0.15	6.67	1.29	M

M: cromosoma metacéntrico SM: cromosoma submetacéntrico.

### Presencia de satélites

El par cromosómico 2, metacéntrico, presentó satélites de forma esférica, de 0.4 $\mu\text{m}$  en tamaño, localizados en ambos brazos cortos de cada cromosoma (Cuadro 2, Figura 4A).

### Índice de asimetría (TF%)

El índice de asimetría (TF%) en el cariotipo de *M. supertexta*, fue de 43.44 % (Cuadro 5).

### *Mammillaria crucigera*

#### Longitud cromosómica

La longitud total de los 11 pares de cromosomas de *M. crucigera* fue de 1.63-2.74  $\mu\text{m}$ , siendo el par No. 1 el de mayor longitud y el par No. 11 el de menor longitud. Los pares cromosómicos 2 y 3 mostraron una diferencia máxima, 0.21  $\mu\text{m}$ , en longitud

total, y entre los pares cromosómicos 9 y 10, fue mínima, 0.02  $\mu\text{m}$  (Cuadro 3).

Los 11 pares cromosómicos presentaron un tamaño relativo de 6.85-11.51 %. El tamaño relativo mayor corresponde al par cromosómico 1 y el menor al par cromosómico 11 (Cuadro 3).

Al igual que en *M. supertexta*, en *M. crucigera*, los 11 pares de cromosomas mostraron un brazo corto y un brazo largo. El tamaño del brazo corto y del brazo largo para los 11 pares de cromosomas, fue de 0.61  $\mu\text{m}$  - 1.21  $\mu\text{m}$  y de 0.92  $\mu\text{m}$ -1.42  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Cuadro 3).

La longitud total del genomio haploide fue de 23.81  $\mu\text{m}$  (Cuadro 5).

### Morfología cromosómica

La fórmula cromosómica de *M. crucigera* se conformó, al igual que en *M. supertexta*, de 10m+1sm. Los pares cromosómicos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 11 fueron metacéntricos y el par cromosómico No. 10 submetacéntrico (Cuadro 3, Figura 4B).

**Cuadro 3.** Longitud total, de brazo corto y largo, tamaño relativo (L%) y relación de brazos del complemento cromosómico de *Mammillaria crucigera* del estado de Puebla.

Par cromosómico	Longitud $\mu\text{m}$				Tamaño relativo (L%)	Relación de brazos (r)	Clasificación cromosómica
	Brazo corto	Brazo largo	Satélites	Total			
1	1.08±0.09	1.26±0.10	0.40	2.74±0.15	11.51	1.16	M
2	1.21±0.10	1.42±0.11		2.63±0.15	11.05	1.17	M
3	1.07±0.09	1.35±0.11		2.42±0.14	10.16	1.26	M
4	0.89±0.09	1.07±0.09	0.40	2.36±0.14	9.91	1.20	M
5	1.02±0.09	1.23±0.10		2.25±0.14	9.45	1.21	M
6	0.93±0.09	1.22±0.10		2.15±0.13	9.03	1.31	M
7	0.91±0.09	1.13±0.10		2.04±0.13	8.60	1.24	M
8	0.87±0.08	1.06±0.09		1.93±0.13	8.11	1.22	M
9	0.83±0.08	1.01±0.09		1.84±0.12	7.73	1.22	M
10	0.61±0.07	1.21±0.10		1.82±0.12	7.64	1.98	SM
11	0.71±0.08	0.92±0.09		1.63±0.12	6.85	1.29	M

M: cromosoma metacéntrico SM: cromosoma submetacéntrico.

### Presencia de satélites

Los pares cromosómicos 1 y 4 metacéntricos, presentaron satélites en los dos brazos cortos de cada par cromosómico. Los satélites fueron esféricos y de 0.4µm (Cuadro 3, Figura 4B).

### Índice de asimetría (TF%)

El índice de asimetría (TF%) para el cariotipo de *M. crucigera* correspondió a un 42.55 % (Cuadro 5).

## *Mammillaria haageana*

### Longitud cromosómica

En *Mammillaria haageana*, la longitud total de los 11 pares cromosómicos varió de 1.51 - 2.69 µm; el par cromosómico No. 1 presentó la mayor longitud total y el par cromosómico No. 11 presentó la menor longitud total. Del mismo modo que *M. crucigera*, en *M. haageana*, los pares de cromosomas 2 y 3 presentaron más diferencia en longitud total, 0.30 µm; Sin embargo entre los pares 1 y 2, dicha diferencia fue menor, 0.03 µm, y entre los pares cromosómicos 4 y 5 no hubo diferencia en longitud total (Cuadro 4).

En *M. haageana*, el tamaño relativo de los 11 pares de cromosomas, se ubico en el rango 6.55 -11.67 % (Cuadro 4).

De la misma manera que *M. supertexta* y *M. crucigera*, *M. haageana* mostró un complemento cromosómico, con cromosomas de dos brazos, cuyo tamaño para los 11 pares de cromosomas fue de 0.59 µm - 1.27 µm para el brazo corto y de 0.83 µm - 1.45 µm para el brazo largo (Cuadro 4).

La longitud total del genomio haploide fue de 23.06 µm (Cuadro 5).

### Morfología cromosómica

El complemento cromosómico de la especie *M. haageana* presentó como fórmula cromosómica 9m+2sm, es decir, nueve pares de cromosomas metacéntricos: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 y 11, y dos pares de cromosomas submetacéntricos, 4 y 9 (Cuadro 4, Figura 4C).

### Presencia de satélites

Se observaron satélites de forma esférica y de 0.33 µm en los dos brazos cortos del par cromosómico 2 metacéntrico (Cuadro 4, Figura 4C).

### Índice de asimetría (TF %)

El índice de asimetría (TF %), para el cariotipo de *M. haageana* fue de 42.71 % (Cuadro 5).

**Cuadro 4.** Longitud total, de brazo corto y largo, tamaño relativo (L%) y relación de brazos del complemento cromosómico de *Mammillaria haageana* del estado de Oaxaca.

Par cromosómico	Longitud $\mu\text{m}$			Tamaño relativo (L%)	Relación de brazos (r)	Clasificación cromosómica	
	Brazo corto	Brazo largo	Satélites				Total
1	1.27±0.08	1.42±0.08		2.69±0.11	11.67	1.12	M
2	1.08±0.07	1.25±0.07	0.33	2.66±0.11	11.53	1.16	M
3	1.09±0.07	1.27±0.07		2.36±0.10	10.23	1.17	M
4	0.74±0.06	1.45±0.07		2.19±0.10	9.50	1.96	<b>SM</b>
5	0.97±0.07	1.22±0.08		2.19±0.10	9.50	1.26	M
6	0.93±0.06	1.15±0.07		2.08±0.10	9.02	1.24	M
7	0.89±0.06	1.11±0.07		2.00±0.09	8.67	1.25	M
8	0.83±0.06	1.04±0.07		1.87±0.09	8.11	1.25	M
9	0.59±0.05	1.21±0.07		1.80±0.09	7.80	2.05	<b>SM</b>
10	0.78±0.06	0.93±0.06		1.71±0.09	7.42	1.19	M
11	0.68±0.05	0.83±0.06		1.51±0.08	6.55	1.22	M

M: cromosoma metacéntrico SM: cromosoma submetacéntrico.

**Cuadro 5.** Análisis del cariotipo de *Mammillaria supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*.

Especie	2n	Intervalo de la longitud de los cromosomas ( $\mu\text{m}$ )	Longitud del genomio haploide ( $\mu\text{m}$ )	Fórmula cariótica	Constricciones secundarias	Índice de asimetría (TF%)
<i>M. supertexta</i>	22	1.79-3.21	26.84	10m+1sm	1m	43.44
<i>M. crucigera</i>	22	1.63-2.74	23.81	10m+1sm	2m	42.55
<i>M. haageana</i>	22	1.51-2.69	23.06	9m+2sm	1m	42.71

## II. Comportamiento meiótico

En el análisis meiótico de células en MI, de *M. haageana* se observó un total de 11 bivalentes ( $n=11$ ), con tres combinaciones de anillo-cadena: 2IIa+9IIc, 3IIa+8IIc y 7IIa+4IIc, esta última se muestra en la figura 5.

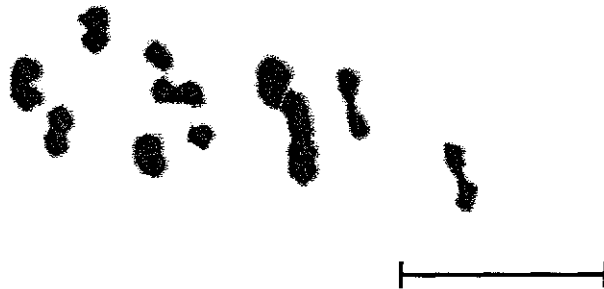
Se observó una frecuencia de quiasmas (Fq) por célula de 13.86 y una Fq por bivalente de 1.26. El índice de recombinación fue de 24.86 (Cuadro 6).

## III. Viabilidad de polen

Las tres especies, *M. supertexta*, *M. haageana* y *M. crucigera*, presentaron un alto porcentaje de polen viable. El polen en las tres especies es muy similar morfológicamente, se presenta únicamente el polen de *M. supertexta* como representativo de las tres especies (Figura 6).

De *M. supertexta* se analizaron 2993 granos de polen, de los cuales el 99.10 % (2967 granos) fueron viables. En *M. crucigera* de un total de 2992 granos de polen, el 97.66% (2922 granos) resultó viable. En *M. haageana* el resultado fue, de 2978 granos de polen observados, el 98.59 % (2936 granos) fue polen viable (Cuadro 7, Figura 6).

A pesar de que en las tres especies el porcentaje de viabilidad de polen fue alto, las especies *M. supertexta* y *M. crucigera* difieren respecto a ello, en un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .



**FIGURA 5.** Cromosomas meióticos de *Mammillaria haageana* en MI de una célula madre del polen en la que se observan: 11 bivalentes, 7 en anillo (7IIa) y 4 en cadena (4IIc) Escala igual a 10  $\mu$ m

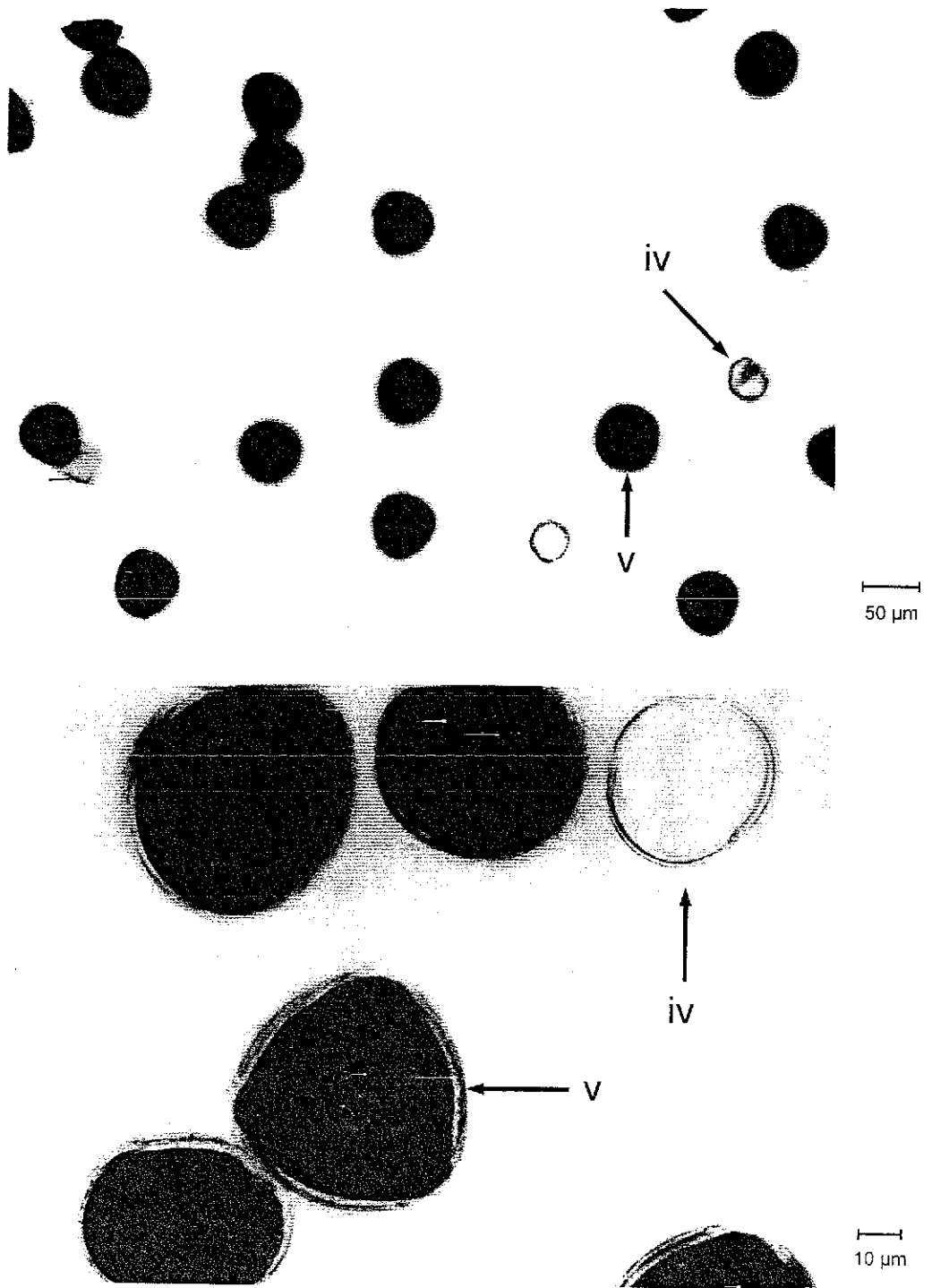


FIGURA 6. Granos de polen de *Mammillaria supertexta*: viables (v) e inviables (iv)



**Cuadro 6.** Análisis de bivalentes, formación de quiasmas por núcleo y por bivalente e índice de recombinación (IR) de *Mammillaria haageana*.

Número cromosómico		Bivalentes		Frecuencia de quiasmas		Índice de recombinación
n	2n	Anillo	Cadena	Célula	Bivalente	(IR)
11	22	2.86±0.10	8.14±0.62	13.86±0.18	1.26±0.05	24.86±0.24

**Cuadro 7.** Viabilidad de polen en tres especies de *Mammillaria*.

Especie	Total de granos de polen analizados	Porcentaje de polen viable
<i>M. supertexta</i>	2993	99.10
<i>M. crucigera</i>	2992	97.66
<i>M. haageana</i>	2978	98.59

#### IV Respuesta *in vitro*

Los resultados sobre germinación de semillas *in vitro* de las especies *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* se presentan en los cuadros 8 y 9. La respuesta morfogénica de explantes de las especies *M. supertexta* y *M. haageana* en el cuadro 10. La figura 7 muestra los principales resultados obtenidos en el cultivo *in vitro* de las especies mencionadas.

##### *M. supertexta*.

De esta especie se sembraron 30 semillas, de las cuales 6 se contaminaron y desecharon; de las 24 restantes, 23 germinaron, o sea el 95.83%, a los 15 días de su siembra y sólo una semilla no germinó (Cuadro 8). De las 23 semillas germinadas derivaron 23 plántulas cuyo tamaño osciló entre 1-15mm (Cuadro 9).

A partir de 12 plántulas de *M. supertexta* se obtuvieron 28 explantes que presentaron la siguiente **respuesta morfogénica**: 6 de 28 explantes, o sea el 21.4%, formaron brotes; 3 de 28 explantes, el 10.7%, originaron callo; 4 de 28 explantes, es decir el 14.3%, originaron callo y brote en forma simultánea y otro porcentaje igual, 14.3%, mostró brotes y raíz (Cuadro 10). Se observó que 11 de 28 explantes, esto es el 39.3%, se tornó color púrpura.

##### *M. crucigera*.

Las semillas de esta especie presentaron una respuesta poco satisfactoria en la germinación. Se sembraron 45 semillas; de éstas, 19 no germinaron y 26 semillas sí

germinaron, es decir, el 58%, aunque en forma tardía, ya que respondieron a los dos meses de su siembra, además de que 13 de ellas se contaminaron y las 13 restantes una vez que germinaron mantuvieron un crecimiento lento, después de 6 meses de cultivo, únicamente dos plántulas llegaron a medir poco más de 5 mm (Cuadros 8 y 9). Este comportamiento impidió obtener plántulas de tamaño y vigor óptimos en el tiempo estipulado para ser usadas como fuente de explante, por ello no fue posible el cultivo de explantes, y por tanto no se evaluó su respuesta morfogénica, sin embargo su crecimiento *in vitro* se ha continuado con la idea de obtener una talla adecuada para intentar su micropropagación *in vitro*.

#### ***M. haageana*** del Edo. de Oaxaca.

De esta especie se sembraron 50 semillas en dos periodos, 30 semillas en un periodo y 20 en otro. De las 50 semillas, 21 no germinaron, 9 se contaminaron y 20 semillas germinaron, lo que significa un 48.78% de germinación. Estas iniciaron la germinación un mes después de su siembra *in vitro*, se obtuvieron por lo tanto 20 plántulas de tamaño entre 1-15 mm, que mantuvieron un crecimiento moderado (Cuadros 8 y 9).

Para la evaluación de la **respuesta morfogénica** en los explantes de esta especie, se consideraron 5 plántulas, de las que se obtuvieron 14 explantes, que manifestaron respuesta a los 15 días de iniciado el cultivo.

La **respuesta morfogénica** fue la siguiente: 2 de 14 explantes, el 14.3%, originaron brotes, otro porcentaje igual, 14.3%, formó simultáneamente callo y brote, y 1 de 14 explantes, el 7.0%, originó brotes y raíz (Cuadro 10). Nuevamente fue mayor el número de explantes, 6 de 14 o bien el 43%, que mostraron únicamente coloración púrpura sin crecimiento ni diferenciación del explante.

#### ***M. haageana*** del Edo. de Puebla.

Para ***M. haageana*** del Edo. de Puebla, se sembraron 50 semillas, 30 en un periodo y 20 en otro. De las 50 semillas, 10 se contaminaron, de las 40 restantes 33 semillas germinaron, el 82.50%, a los 20 días de su siembra *in vitro*; las otras 7 semillas no germinaron (Cuadro 8).

Las plántulas obtenidas fueron 33 y su crecimiento fue rápido, después de 6 meses, el tamaño de 24 de las 33 plántulas fue mayor a 5mm (Cuadro 9).

De 9 plántulas, se obtuvieron 27 explantes cuya **respuesta morfogénica** fue diferente en relación a *M. haageana* del Edo. de Oaxaca: 9 de 27 explantes, esto es el 33.3%, originaron callo, a partir de brotes muy vitrificados, que por el exceso de agua contenida estallaron generando así callo; otro porcentaje igual, 33.3% de explantes, produjo tanto callos como brotes. En 2 de 27 explantes, o sea el 7%, se observó surgimiento de brotes y además raíz (Cuadro 10). En 7 de 27 explantes, un 26%, se observó coloración púrpura.

**Cuadro 8.** Germinación de semillas *in vitro* de tres especies de *Mammillaria* en medio MS.

Especie	No. de semillas sembradas	No. de semillas contaminadas	No. de semillas que no germinaron	Semillas germinadas		No. de plántulas
				No.	%	
<i>M. supertexta</i>	30	6	1	23	95.83	23
<i>M. crucigera</i>	45	13*	19	26	57.77	13
<i>M. haageana</i> (Oaxaca)	50	9	21	20	48.78	20
<i>M. haageana</i> (Puebla)	50	10	7	33	82.50	33

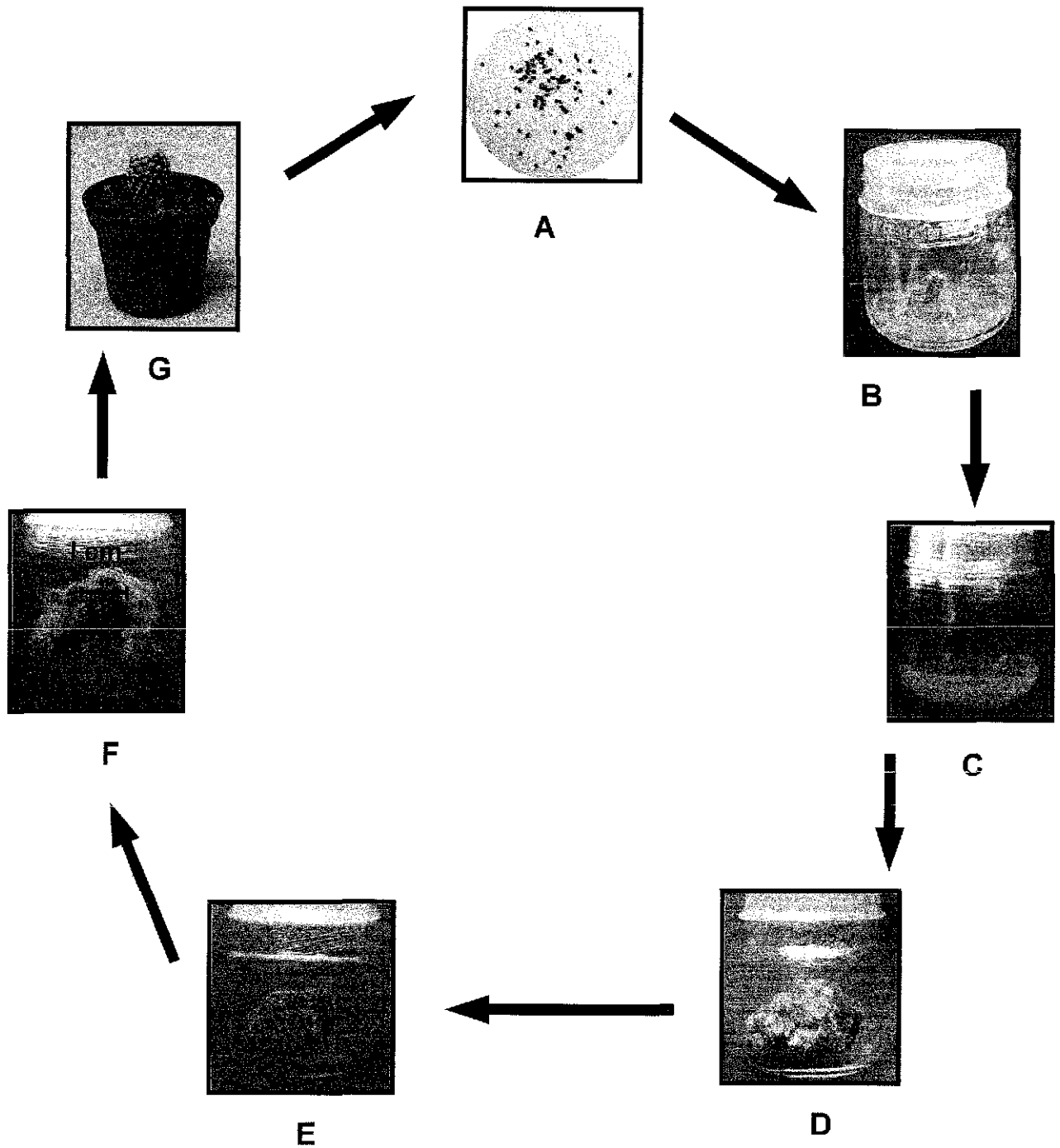
\* semillas que se contaminaron después de su germinación

**Cuadro 9.** Tamaño de las plántulas de tres especies de *Mammillaria*, al término de 6 meses de cultivo *in vitro*.

Especie	1-5 mm	6-10 mm	11-15 mm
<i>M. supertexta</i>	4	18	1
<i>M. crucigera</i>	11	2	0
<i>M. haageana</i> (Oaxaca)	9	8	3
<i>M. haageana</i> (Puebla)	9	22	2

**Cuadro 10.** Respuesta morfogénica de especies de *Mammillaria*, cultivadas *in vitro* en MS adicionado con BA (0.02mg/l).

Especie	Germinación <i>in vitro</i>		Respuesta <i>in vitro</i> . Explantes formando:			
	%	Tiempo (semanas)	callo	brote	callo y brote	brote y raíz
<i>M. supertexta</i>	95.83	2.5	3/28 (10.7 %)	6/28 (21.4 %)	4/28 (14.3 %)	4/28 (14.3 %)
<i>M. haageana</i> (Oaxaca)	48.78	4	-	2/14 (14.3 %)	2/14 (14.3 %)	1/14 (7.1 %)
<i>M. haageana</i> (Puebla)	82.50	3	9/27 (33.3 %)	-	9/27 (33.3 %)	2/27 (7.4 %)



**FIGURA 7.** Respuesta morfogénica observada en explantes cultivados en MS adicionado con BA (0.02mg/lit), obtenidos a partir de cortes laterales y apicales de tallo de plántulas de especies de *Mammillaria*. **A:** semilla, **B:** plántula, **C:** explante, **D:** callo, **E:** brote, **F:** callo y Brote, **G:** plantas a suelo. **A, B, F y G** corresponden a *M. supertexta*; **D, C y E** corresponden a *M. haageana*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### V Cálculo de $X^2$ para germinación de semillas y ANOVA para producción de brotes

Con la finalidad de detectar diferencia en la respuesta al cultivo *in vitro*, entre las especies *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*, se aplicó tratamiento estadístico a los resultados mediante el cálculo de la  $X^2$  para la germinación de semillas, y de ANOVA para la respuesta morfo genética, específicamente la producción de brotes.

El cálculo de la  $X^2$  con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  para todos los casos, indicó que: las especies *M. supertexta*, y *M. crucigera* mostraron diferencia en la germinación, el valor de  $X^2$  calculado fue de 9.24 y el de tablas fue de 3.84. Entre *M. supertexta* y *M. haageana* (Oaxaca), hubo diferencia en su germinación *in vitro*, la  $X^2$  calculada fue de 12.94, mayor a la de tablas, que fue de 3.84. Entre las especies *M. supertexta* y *M. haageana* (Puebla) no se observó diferencia en la germinación de semillas *in vitro*. Tampoco hubo diferencia entre las especies *M. crucigera* y *M. haageana* (Oaxaca). Las especies *M. crucigera* y *M. haageana* (Puebla) sí mostraron diferencia en la germinación de semillas, la  $X^2$  calculada fue de 7.32 y la de tablas de 3.84. Por último entre *M. haageana* (Oaxaca) y *M. haageana* (Puebla), el valor de  $X^2$  calculado fue de 11.72 y  $X^2$  de tablas de 3.84, lo que indicó diferencia en la germinación de semillas *in vitro* entre ambas localidades (Cuadro 11).

En relación a la evaluación de respuesta morfo genética, particularmente producción de brotes en los explantes de las plántulas de las especies *M. supertexta* y *M. haageana* (Puebla y Oaxaca), cuadro 12; el ANOVA aplicado indicó que no hay diferencia en la producción de brotes entre dichas especies, el **F** calculado fue de 0.04 y el **F** de tablas de 3.34 con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  (Cuadro 13).

**Cuadro 11.** Diferencias en la germinación de semillas *in vitro* de tres especies de *Mammillaria*, utilizando una  $X^2$ .

Especies	$X^2$ calculada	$X^2$ de tablas
<i>M. supertexta</i> vs <i>M. crucigera</i>	9.24*	3.84
<i>M. supertexta</i> vs <i>M. haageana</i> (Oaxaca)	12.94*	3.84
<i>M. supertexta</i> vs <i>M. haageana</i> (Puebla)	1.37	3.84
<i>M. crucigera</i> vs <i>M. haageana</i> (Oaxaca)	0.38	3.84
<i>M. crucigera</i> vs <i>M. haageana</i> (Puebla)	7.32*	3.84
<i>M. haageana</i> (Oaxaca) vs <i>M. haageana</i> (Puebla)	11.72*	3.84

\* diferencia significativa a un  $\alpha=0.05$

**Cuadro 12.** Producción de brotes en dos especies de *Mammillaria*.

<i>M. supertexta</i>	<i>M. haageana</i> (Puebla)	<i>M. haageana</i> (Oaxaca)
Frasco 1 = 0	Frasco 1 = 0	Frasco 1 = 13
Frasco 2 = 2	Frasco 2 = 17	Frasco 2 = 0
Frasco 3 = 1	Frasco 3 = 1	Frasco 3 = 4
Frasco 4 = 0	Frasco 4 = 14	Frasco 4 = 0
Frasco 5 = 1	Frasco 5 = 1	Frasco 5 = 4
Frasco 6 = 11	Frasco 6 = 0	Frasco 6 = 0
Frasco 7 = 0	Frasco 7 = 1	
Frasco 8 = 8	Frasco 8 = 0	
Frasco 9 = 10	Frasco 9 = 9	
Frasco 10 = 0	Frasco 10 = 2	
Frasco 11 = 1	Frasco 11 = 0	
Frasco 12 = 0	Frasco 12 = 1	
Frasco 13 = 4		

**Cuadro 13.** ANOVA para la producción de brotes en *M. supertexta* y *M. haageana*.

Origen de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de variación
Entre muestras	SC <sub>entre</sub> = 0.11	GL = 2	CM = 0.05	RV = 0.04 = F <sub>calculado</sub>
Dentro de muestras	SC <sub>dentro</sub> = 36.76	GL = 28	CM = 1.31	F <sub>tablas</sub> = 3.34
Total	SC <sub>total</sub> = 36.87	GL = 30		

Nivel de significancia  $\alpha=0.05$

## DISCUSIÓN

Es importante señalar que para las especies *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* (serie *Supertextae*), este trabajo es el primer informe de su número cromosómico  $2n$ , del análisis de sus cariotipos y del nivel de ploidía.

Las tres especies resultaron ser diploides ( $2n=2x=22$ ,  $x=11$ ) y  $n=11$  en *M. haageana*; el mismo número cromosómico básico ( $x=11$ ), indicó estabilidad cromosómica en las especies. Estas características concuerdan con las observadas en otras especies del mismo género y de la misma serie (*Supertextae*) como *M. vaupelii* (Remski, 1954), *M. lanata* (Gill y Goyal, 1984), *M. albilanata* (Mohanty *et al.*, 1996) y *M. san-angelensis* (Palomino *et al.*, 1999). Con estos resultados se corrobora el  $x=11$ , para el género *Mammillaria* y la familia Cactaceae (Sosa y Acosta, 1966; Johnson, 1980 y Palomino *et al.*, 1999).

Los géneros *Opuntia*, *Echinocereus* y *Mammillaria*, son considerados los más representativos de especies poliploides en cactáceas (Pinkava *et al.*, 1998). Del género *Mammillaria*, se ha reportado el número cromosómico a 155 especies, de las cuales 142 (91.61%) son diploides, las restantes 13 (8.39%) son especies poliploides. *Mammillaria ruestii*, de la serie *Supertextae*, es la única especie de esta serie reportada como poliploide ( $2n=4x=44$ ) por Remski (1954).

En la familia de las cactáceas, los estudios citogenéticos se han enfocado principalmente a la determinación del número cromosómico, y existe poca información respecto a las características cariotípicas, como son la longitud total de los cromosomas, su morfología, presencia o ausencia de satélites y la longitud de sus genomios.

### Cariotipos

La determinación de las características cariotípicas, en *Mammillaria supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*, indicó variación entre las especies.

En *M. supertexta*, se observaron los cromosomas de mayor longitud, 1.79 - 3.21  $\mu\text{m}$ , los cromosomas de *M. crucigera* mostraron una longitud intermedia, 1.63 - 2.74  $\mu\text{m}$ , y *M. haageana* presentó los cromosomas de menor longitud, 1.51 - 2.69  $\mu\text{m}$  (Cuadro 5).

En la especie *M. san-angelensis*, Palomino *et al.*, (1999) determinaron una longitud cromosómica de 0.80 - 1.70  $\mu\text{m}$ .

Con esto se confirma que las especies *M. supertexta*, *M. crucigera*, *M. haageana* y *M. san-angelensis* pertenecientes a la serie *Supertextae* muestran variación entre sus genomios y por lo tanto variación interespecífica.

Las diferencias en el tamaño de los cromosomas de especies diferentes del mismo género, son consideradas como evidencia de reestructuración de sus genomios y se

atribuyen a rearrreglos cromosómicos como deleciones, duplicaciones o translocaciones, que se sucedieron en las primeras etapas de su evolución (Palomino et al., 1988; Cota y Wallace, 1995; Cid y Palomino, 1996). Las inversiones cromosómicas también han participado en los cambios en el tamaño del cromosoma y han sido observadas por Pinkava et al., (1973) en *Opuntia curvospina*. También Pinkava et al., (1985) observaron translocaciones en *O. leptocaulis*.

Diferencias en el tamaño de los cromosomas a nivel interespecífico, han sido determinadas en otras especies de cactáceas como las del género *Nyctocereus*, cuyo intervalo de longitud de los cromosomas fue de 1.57 - 3.22  $\mu\text{m}$  (Palomino et al., 1988). En *Myrtillocactus geometrizans*, Cid y Palomino (1996) observaron variación intraespecífica en la longitud total de los cromosomas, 1.75 - 3.69  $\mu\text{m}$ .

El tamaño de los cromosomas en las tres especies estudiadas se correlacionó con la longitud total de sus genomios (LG), *M. supertexta*, presentó en dicha correlación, los valores mayores (LG = 26.84 y tamaño de los cromosomas 1.79 - 3.21  $\mu\text{m}$ ). *M. haageana* presentó los valores más bajos (LG = 23.06 y tamaño de los cromosomas 1.51 - 2.69  $\mu\text{m}$ ; Cuadro 5).

Al comparar el tamaño de los cromosomas y la longitud del genomio de las tres especies estudiadas, con *M. san-angelensis* (Palomino et al., 1999), los cromosomas de esta especie mostraron un menor tamaño (0.80 - 1.70  $\mu\text{m}$ ) y una LG = 13.83  $\mu\text{m}$ , menor a la observada en *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*. Estas variaciones en la longitud del genomio de las cuatro especies, confirman la variabilidad interespecífica en las especies de *Mammillaria* de la serie *Supertextae*, determinada anteriormente por la variación en longitud total de los pares cromosómicos.

En otras 34 especies de *Mammillaria* de diferentes series, reportadas en la literatura, donde se analizan sus cariotipos, también se ha observado variación en la longitud de sus genomios dentro del intervalo 20.86 - 51.28 en el que *M. geminispina* (serie *Leucocephalae*) presentó la longitud del genomio menor y *M. baumii* (serie *Archiebnerellae*) la mayor ( Das et al., 1998; Das et al., 1999 b y c, Cuadro 14). Los valores de LG obtenidos en *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* están incluidos dentro de dicho intervalo. *M. san-angelensis* presentó el valor más bajo de LG (13.83  $\mu\text{m}$ ) que se ha reportado para especies de *Mammillaria*.

En otros géneros y especies de cactáceas como *Nyctocereus* (Palomino et al., 1988), *Echinocereus* (Cota y Wallace, 1995), *Melocactus* (Das et al., 1998b y c) y *Ferocactus* (Das et al., 1999d) se ha observado una correlación del tamaño de los cromosomas y la longitud total del genomio.

La comparación de cariotipos de las especies *M. supertexta*, *M. haageana*, *M. crucigera* y *M. san-angelensis*, basada en los datos de tamaño relativo (L%) y relación de brazos (r) de sus respectivos complementos cromosómicos se presenta en el cuadro 15 y figura 8.



**Cuadro 14.** Características cariotípicas de especies de *Mammillaria*, diploides  $2n=22$ , Informadas en la literatura.

	Longitud total del genomio	Fórmula cariotípica	Número de satélites	Índice de asimetría	Autor
<i>M. armillata</i> * <sub>1</sub>	31.42	11m	2 Pares	45.71	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. asteriflora</i> * <sub>12</sub>	29.79	9m+2sm	1 par	42.57	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. auricantha</i> * <sub>12</sub>	26.78	8m+3sm	1 par	37.12	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. baumii</i> * <sub>2</sub>	51.28	6m+5sm	1 par	41.95	Das, <i>et al.</i> , 1999c
<i>M. bella</i> * <sub>12</sub>	47.38	7m+4sm	2 pares	41.25	Das, <i>et al.</i> , 1999c
<i>M. bocasana</i> * <sub>3</sub>	32.96	9m+2sm	1 par	43.80	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. boolii</i> * <sub>1</sub>	31.42	10m+1sm	3 pares	38.11	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. bombycina</i> * <sub>3</sub>	30.51	8m+3sm	1 par	39.77	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. bravoae</i> * <sub>12</sub>	34.51	7m+4sm	3 pares	38.61	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. brevispina</i> * <sub>12</sub>	33.99	11m	2 pares	42.72	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. carmenae</i> * <sub>4</sub>	30.90	8m+3sm	3 pares	35.90	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. celeriana</i> * <sub>12</sub>	24.72	9m+2sm	1 par	43.18	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. collinsii</i> * <sub>5</sub>	33.48	9m+2sm	2 pares	39.65	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. decipiens</i> * <sub>6</sub>	30.90	9m+2sm	1 par	49.19	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. elegans</i> * <sub>12</sub>	34.51	8m+3sna	2 pares	43.82	Das, <i>et al.</i> , 1999c
<i>M. elongata</i> * <sub>7</sub>	45.84	7m+4sm	3 pares	42.16	Das, <i>et al.</i> , 1999c
<i>M. geminispina</i> * <sub>8</sub>	20.86	9m+2sm	1 par	42.55	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. grandiflora</i> * <sub>12</sub>	32.45	9m+2sm	1 par	39.41	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. hahniana</i> * <sub>8</sub>	30.24	10m+1sm	2 pares	38.33	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. herrerae</i> * <sub>4</sub>	29.87	8m+3sm	1 par	37.57	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. humboldtii</i> * <sub>4</sub>	28.33	10m+1sm	1 par	39.84	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. klissingiana</i> * <sub>8</sub>	32.70	9m+2sm	2 pares	42.57	Das, <i>et al.</i> , 1999c
<i>M. leucantha</i> * <sub>3</sub>	26.83	10m+1sm	2 pares	41.81	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. matudae</i> * <sub>9</sub>	30.39	9m+2sm	2 pares	36.53	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. mystax</i> * <sub>5</sub>	32.96	9m+2sm	1 par	37.63	Das, <i>et al.</i> , 1999c
<i>M. occidentalis</i> * <sub>12</sub>	43.26	10m+1sm	1 par	42.20	Das, <i>et al.</i> , 1999c

**Cuadro 14.** Características cariotípicas ... (continua)

Especie	Longitud total del genomio	Fórmula cariotípica	Número de satélites	Índice de asimetría	Autor
<i>M. pectinifera</i> * <sub>10</sub>	27.81	10m+1sm	2 pares	38.63	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. plumosa</i> * <sub>4</sub>	30.90	8m+3sm	1 par	37.42	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. pseudoperbella</i> * <sub>12</sub>	29.36	8m+3sm	2 pares	38.39	Das <i>et al.</i> , 1999b
<i>M. sempervivi</i> * <sub>8</sub>	30.39	9m+2sm	3 pares	35.50	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. spinosissima</i> * <sub>9</sub>	29.87	5m+6sm	2 pares	36.99	Das, <i>et al.</i> , 1999c
<i>M. winteriae</i> * <sub>11</sub>	47.89	6m+5sm	2 pares	43.03	Das, <i>et al.</i> , 1999c
<i>M. woodsi</i> * <sub>12</sub>	27.81	10m+1sm	2 pares	39.84	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. zeilmanniana</i> * <sub>3</sub>	32.42	8m+3sm	1 par	41.38	Das, <i>et al.</i> , 1999b

\*<sub>1</sub> Especies incluidas en la serie *Ancistracanthae*

\*<sub>2</sub> Especies incluidas en la serie *Archiebnerellae*

\*<sub>3</sub> Especies incluidas en la serie *Stylothelae*

\*<sub>4</sub> Especies incluidas en la serie *Lasiacanthae*

\*<sub>5</sub> Especies incluidas en la serie *Polyedrae*

\*<sub>6</sub> Especie incluida en el subgénero *Pseudomammillaria*

\*<sub>7</sub> Especie incluida en la serie *Leptocladodae*

\*<sub>8</sub> Especies incluidas en la serie *Leucocephalae*

\*<sub>9</sub> Especies incluidas en la serie *Polyacanthae*

\*<sub>10</sub> Especie incluida en el subgénero *Solisia*

\*<sub>11</sub> Especie incluida en la serie *Macrothelae*

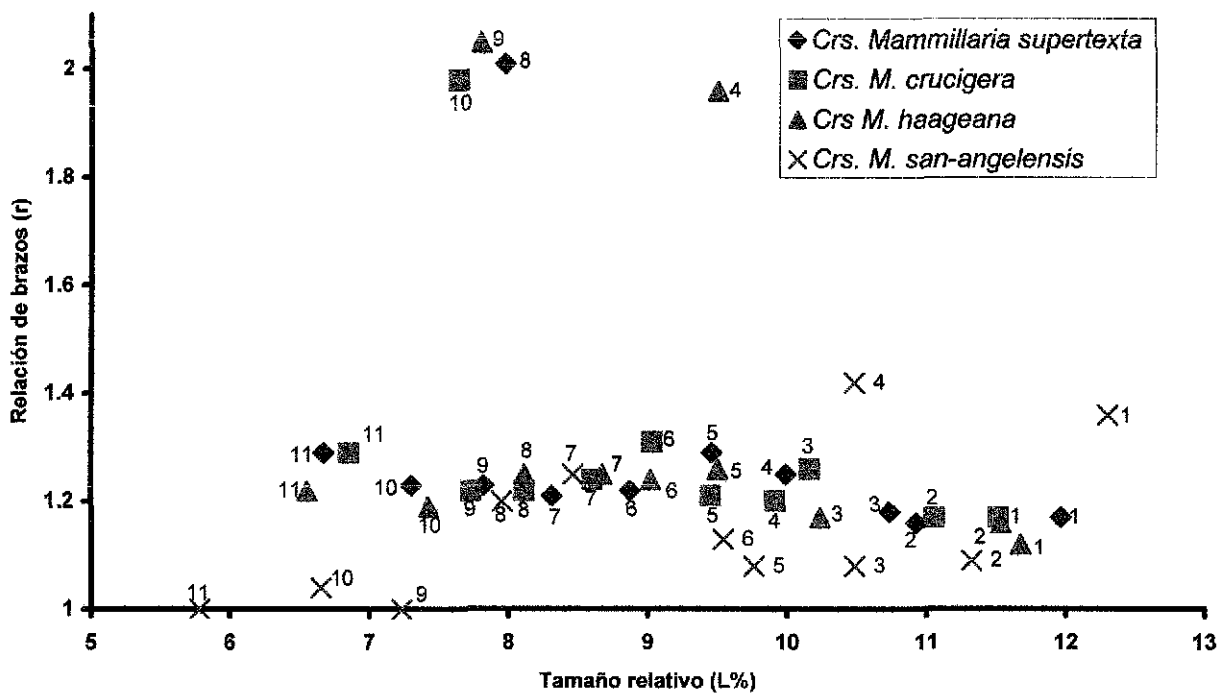
\*<sub>12</sub> Especies que no son reconocidas por Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, (1991b)

### Cromosoma 1

El L% de este cromosoma en *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* fue de 11.96, 11.51 y 11.67, respectivamente. Observándose una mayor diferencia en el L% entre las especies *M. supertexta* y *M. crucigera*; Sin embargo presentaron la misma r (r=1.17), que fue diferente y menor en *M. haageana* (r=1.12). En las tres el cromosoma fue metacéntrico. El cromosoma 1 de *M. san-angelensis* mostró un valor mayor en ambas características (L%=12.30 y r=1.36) al de dichas especies.

**Cuadro 15.** Tamaño relativo y relación de brazos del complemento cromosómico de las especies *M. supertexta*, *M. crucigera*, *M. haageana* y *M. san-angelensis*.

Par cromosómico	Tamaño relativo (L%)				Relación de brazos (r)			
	<i>M. supertexta</i>	<i>M. crucigera</i>	<i>M. haageana</i>	<i>M. san-angelensis</i>	<i>M. supertexta</i>	<i>M. crucigera</i>	<i>M. haageana</i>	<i>M. san-angelensis</i>
1	11.96	11.51	11.67	12.30	1.17	1.17	1.12	1.36
2	10.92	11.05	11.53	11.32	1.16	1.17	1.16	1.09
3	10.73	10.16	10.23	10.48	1.18	1.26	1.17	1.08
4	9.99	9.91	9.50	10.48	1.25	1.20	1.96	1.42
5	9.46	9.45	9.50	9.76	1.29	1.21	1.26	1.08
6	8.87	9.03	9.02	9.54	1.22	1.31	1.24	1.13
7	8.31	8.60	8.67	8.46	1.21	1.24	1.25	1.25
8	7.97	8.11	8.11	7.95	2.01	1.22	1.25	1.20
9	7.82	7.73	7.80	7.23	1.23	1.22	2.05	1.00
10	7.30	7.64	7.42	6.65	1.23	1.98	1.19	1.04
11	6.67	6.85	6.55	5.78	1.29	1.29	1.22	1.00



**FIGURA 8.** Tamaño relativo (L%) y relación de brazos (r) de los cromosomas somáticos de *M. supertexta*, *M. crucigera*, *M. haageana* y *M. san-angelensis*.

### Cromosoma 2

Este mostró un **L%** mayor en *M. haageana*,  $L\% = 11.53$ , y menor en *M. supertexta*,  $L = 10.92$ , pero ambas presentaron la misma **r** ( $r = 1.16$ ), que a su vez fue similar con la de *M. crucigera* ( $r = 1.17$ ) cuyo **L%** fue igual a 11.05. En las tres el cromosoma fue metacéntrico. El **L%** de éste cromosoma en *M. san-angelensis* ( $L\% = 11.32$ ) mostró más diferencia con el **L%** de *M. supertexta* y presentó una **r** menor ( $r = 1.09$ ) a la de las tres especies estudiadas.

### Cromosoma 3

El valor de su **L%** fue mayor en *M. supertexta*,  $L\% = 10.73$ , y menor en *M. crucigera*,  $L\% = 10.16$ , en *M. haageana* fue de  $L\% = 10.23$ . La **r**, fue muy similar entre *M. supertexta* ( $r = 1.18$ ) y *M. haageana* ( $r = 1.17$ ), y diferente y mayor en *M. crucigera* ( $r = 1.26$ ). Este cromosoma fue metacéntrico en las tres especies. El **L%** del cromosoma 3 en *M. san-angelensis* fue diferente ( $L\% = 10.48$ ) y su **r** fue menor ( $r = 1.08$ ) con respecto a las demás especies.

### Cromosoma 4

El **L%** del cromosoma 4 fue mayor en *M. supertexta*,  $L\% = 9.99$ , y en *M. crucigera*,  $L = 9.91$ , y la **r** fue similar en ambas ( $r = 1.25$  y  $r = 1.20$ , respectivamente), correspondiendo a un cromosoma metacéntrico. En *M. haageana* el **L%** fue menor,  $L\% = 9.50$ , y con un valor de  $r = 1.96$ , correspondiendo a un cromosoma submetacéntrico. En *M. san-angelensis* presentó un **L%** mayor ( $L\% = 10.48$ ) y su **r** ( $r = 1.42$ ) difirió más con la **r** de *M. haageana*.

### Cromosoma 5

El **L%** de éste cromosoma fue similar en las tres especies, *M. supertexta*,  $L\% = 9.46$ , *M. crucigera*,  $L\% = 9.45$ , y *M. haageana*,  $L\% = 9.50$ . Sin embargo se observó diferencia en la **r** entre ellas, principalmente entre *M. supertexta* ( $r = 1.29$ ) y *M. crucigera* ( $r = 1.21$ ). En las tres especies el cromosoma fue metacéntrico. Este cromosoma presentó en *M. san-angelensis* un **L%** mayor ( $L\% = 9.76$ ) pero una **r** menor ( $r = 1.08$ ) con respecto a las tres especies estudiadas.

### Cromosoma 6

Presentó un **L%** mayor en *M. crucigera*,  $L\% = 9.03$ , y similar con *M. haageana*,  $L\% = 9.02$ , en *M. supertexta* fue menor,  $L\% = 8.87$ . La **r** fue mayor en *M. crucigera* ( $r = 1.31$ ) y menor en *M. supertexta* ( $r = 1.22$ ), esta última fue similar con *M. haageana* ( $r = 1.24$ ). En las tres el cromosoma fue metacéntrico. En *M. san-angelensis* el **L%** del cromosoma 6 fue mayor ( $L\% = 9.54$ ) y su **r** fue menor ( $r = 1.13$ ) en comparación con las otras tres especies.

### Cromosoma 7

El **L%** del cromosoma 7 fue mayor en *M. haageana*,  $L\%=8.67$ , en *M. crucigera* fue de  $L\%=8.60$ ; ambas mostraron similitud en la **r** ( $r=1.25$  y  $r=1.24$ , respectivamente). El mismo cromosoma en *M. supertexta* mostró un **L%** y una **r** menor ( $L\%=8.31$  y  $r=1.21$ ). En las tres el cromosoma fue metacéntrico. En *M. san-angelensis* el **L%** del cromosoma 7 ( $L\%=8.46$ ) fue similar con *M. supertexta* pero su **r** ( $r=1.25$ ) fue igual a la de *M. haageana*.

### Cromosoma 8

Este cromosoma presentó en *M. crucigera* y *M. haageana* el mismo **L%** ( $L\% = 8.11$ ) y similar **r** ( $r=1.22$  y  $r=1.25$  respectivamente), en ambas el cromosoma fue metacéntrico. En *M. supertexta* fue menor el **L%**,  $7.97$  y su **r** fue mayor ( $r=2.01$ ) correspondiendo a un cromosoma submetacéntrico. En *M. san-angelensis* presentó un **L%** ( $7.95$ ) similar con *M. supertexta* y una **r** ( $1.20$ ) menor a las tres especies.

### Cromosoma 9

El **L%** del cromosoma 9 fue mayor en *M. supertexta*,  $L\%=7.82$ , y similar con *M. haageana*,  $L\%=7.80$ , en *M. crucigera* fue menor,  $L\% = 7.73$ . La **r**, fue similar en *M. supertexta* ( $r=1.23$ ) y *M. crucigera* ( $r=1.22$ ), en ambas el cromosoma fue metacéntrico, pero en *M. haageana* la **r** fue mayor ( $r=2.05$ ) correspondiendo a un cromosoma submetacéntrico. Este cromosoma en *M. san-angelensis* presentó un **L%** y una **r** menor ( $L\%=7.23$  y  $r=1.00$ ) a la de las especies estudiadas.

### Cromosoma 10

Este cromosoma presentó un **L%** y una **r** mayor en *M. crucigera* ( $L\%=7.64$ ,  $r= 1.98$ ), en esta el cromosoma fue submetacéntrico. En *M. haageana* el **L%** fue de  $7.42$ , y en *M. supertexta* fue menor,  $L\%=7.30$ ; la **r** fue de  $1.19$  y  $1.23$  respectivamente, en ambas el cromosoma fue metacéntrico. En *M. san-angelensis* el **L%** y la **r** de éste cromosoma fueron menores ( $L\%=6.65$  y  $r=1.04$ ) en comparación con las tres especies ya mencionadas.

### Cromosoma 11

En *M. crucigera* el **L%** fue mayor,  $L\%=6.85$ , en *M. supertexta* fue de  $6.67$ , y en ambas la **r** fue la misma ( $r=1.29$ ). En *M. haageana* tanto el **L%** como la **r** fueron menores ( $L\%=6.55$  y  $r=1.22$ ). En las tres el cromosoma fue metacéntrico. En *M. san-angelensis*, el cromosoma mostró **L%** y **r** menores ( $L\%5.78$  y  $r=1.00$ ) con respecto a *M. supertexta*, *M. haageana* y *M. crucigera*.

No obstante a que se aprecian diferencias en términos de **L%** y **r** de los 11 pares de cromosomas entre los cariotipos de las especies *M. supertexta*, *M. haageana*, *M. crucigera* y *M. san-angelensis*, puede notarse cierta uniformidad en el **L%** entre dichas especies, con excepción de los pares cromosómicos 1 y 4, 9, 10 y 11 de

*M. san-angelensis*; en la que los dos primeros mostraron un L% mayor y los tres últimos un L% menor; en estos pares es notable la diferencia en L% con respecto a las demás especies (Figura 8).

De igual manera, se observó cierta homogeneidad en términos de r, cuyos valores indicaron una predominancia de cromosomas metacéntricos, nuevamente los pares cromosómicos 1, 4, 9, 10 y 11 de *M. san-angelensis* se apartan del patrón de comportamiento de los restantes pares de cromosomas de las otras especies, sin embargo son también metacéntricos. Los pares cromosómicos 4 y 9 de *M. haageana*, 8 de *M. supertexta* y 10 de *M. crucigera* se apartan de los valores r de los cromosomas de las otras especies y son submetacéntricos (Figura 8). Estas diferencias en L% y r pueden atribuirse a cambios estructurales en los cromosomas como deleciones, duplicaciones y translocaciones que se han ido presentando durante la evolución de sus cariotipos.

Comparando *M. haageana* con *M. san-angelensis* se observó entre ellas una diferencia mínima en los cromosomas 2, 7 y 8 tanto en L% como en r, y una diferencia máxima en los cromosomas 1, 4 y 9. En *M. san-angelensis* los 11 pares de cromosomas fueron metacéntricos no hubo submetacéntricos, en tanto que en *M. haageana* los pares 4 y 9 fueron submetacéntricos (Figura 8).

Las **fórmulas cariotípicas** de *M. supertexta* y *M. crucigera* fueron similares entre sí, correspondiendo a  $10m+1sm$ . Sin embargo, el par submetacéntrico correspondió al par 8 en *M. supertexta* y al 10 en *M. crucigera*. A diferencia de estas dos especies en *M. haageana* se observaron  $9m+2sm$  (Cuadro 5).

Los cariotipos de *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* difieren con *M. san-angelensis*, la que, de acuerdo a Palomino *et al.*, (1999), mostró 11 cromosomas metacéntricos y ningún cromosoma submetacéntrico. Es evidente que las cuatro especies pertenecientes a la serie *Supertextae*, muestran variación en la proporción de cromosomas meta y submetacéntricos.

La diferencia en morfología cromosómica entre las especies, puede deberse a deleciones, duplicaciones y translocaciones entre los cromosomas, que se sucedieron en las primeras etapas de su evolución y que no se han detectado en el análisis de sus cromosomas meióticos, como lo sugieren Palomino *et al.*, (1988); Cota y Wallace, (1995); Cid y Palomino, (1996) para otras especies de cactáceas, y Das *et al.*, (1998), Das *et al.*, (1999b y 1999c) para otras especies de *Mammillaria*.

La fórmula cariotípica de 10 pares de metacéntricos y 1 par de submetacéntricos observada en *M. supertexta* y *M. crucigera*, ha sido determinada también, en otras especies de *Mammillaria* que no son de la serie *Supertextae* como *M. boottii*, *M. humboldtii*, *M. leucantha* y *M. woodsii*, (Das *et al.*, 1998, 1999 b). La fórmula cariotípica  $9m+2sm$  que presentó *M. haageana* ha sido reportada también en *M. bocasana*, *M. collinsii*, *M. mytax*, *M. geminispina*, *M. klisingiana*, *M. sempervivi* y *M. matudae*, especies que tampoco pertenecen a la serie *Supertextae* (Das *et al.*, 1998, 1999b y c; Cuadro 14).

El cuadro 14 muestra la variación en la proporción de cromosomas meta y submetacéntricos en especies de *Mammillaria*, donde predominan los cromosomas metacéntricos, como en las especies estudiadas, considerándose por tanto citológicamente homogéneas y con pequeñas variaciones en sus cromosomas. La variación de cariotipos en el número de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos se ha observado en especies de otros géneros de cactáceas como en: *Nyctocereus* (Palomino *et al.*, 1988), *Echinocereus* (Cota y Wallace, 1995) y *Myrtillocactus* (Cid y Palomino, 1996).

En las tres especies estudiadas se observaron **constricciones secundarias**, *M. supertexta* y *M. haageana* mostraron un par de satélites de forma esférica y pequeños de 0.40 y 0.33  $\mu\text{m}$  respectivamente, localizados en los brazos cortos del par cromosómico 2, metacéntrico; *M. crucigera* mostró dos pares de satélites esféricos de 0.4 $\mu\text{m}$  en ambos brazos cortos de los pares cromosómicos 1 y 4, metacéntricos. Palomino *et al.*, (1999), observaron en *M. san-angelensis*, al igual que en *M. crucigera*, 2 pares de satélites en el brazo corto, pero de los pares cromosómicos 1 y 3. Esta variación pudo deberse a la ocurrencia de deleciones, duplicaciones o translocaciones entre los cromosomas (Palomino *et al.*, 1988; Cota y Wallace, 1995; Cid y Palomino, 1996; Das *et al.*, 1998; Das *et al.*, 1999b y c).

Esta variación en el número y posición de satélites se ha reportado también en otras especies de *Mammillaria* que presentan de 1-3 pares de satélites en los cromosomas, observándose con mayor frecuencia 1 a 2 pares (Cuadro 15). Otros géneros de cactáceas como *Melocactus* (Das *et al.*, 1998 b y c) y *Ferocactus* (Das *et al.*, 1999 d) también presentan de 1 a 3 pares cromosómicos con satélites.

Además, la presencia de satélites es importante ya que son considerados como marcadores citogenéticos y han sido útiles en la caracterización de especies, como sucede en el género *Echinocereus* (Cota y Wallace, 1995).

Los valores obtenidos en el **índice de asimetría** (TF%) de *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* fueron: TF%=43.44, 42.55 y 42.71, respectivamente, presentan semejanza con los obtenidos en *M. geminispina* (TF%=42.55, Das *et al.*, 1998), *M. klissingiana* (TF%=42.57, Das *et al.*, 1999c), *M. winteriae* (TF%=43.03, Das *et al.*, 1999c) y *M. bocasana* (TF%=43.80, Das *et al.*, 1998), incluidas en el cuadro 14 junto con otras *Mammillarias* cuyo TF% varió en el intervalo de 35.50 a 49.19 y dentro del cual se ubican los valores de TF% obtenidos en *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*; todas ellas coinciden en presentar un cariotipo simétrico.

Especies de los géneros *Nyctocereus*, (Palomino *et al.*, 1988), *Echinocereus* (Cota y Wallace, 1995) y *Myrtillocactus* (Cid y Palomino, 1996) también muestran cariotipos simétricos y valores de TF% similares a los observados en *Mammillaria*. Por tanto, debido a que la familia Cactaceae, es un grupo de plantas especializado, con cariotipos que tienden a la simetría, Cota y Wallace (1995), la consideran una excepción a la hipótesis de Stebbins, (1971) quien menciona que en taxa especializados hay un incremento de asimetría, tendencia que no se observa en las cactáceas, siendo un grupo especializado.

Por su parte Jones, (1970) indica que ciclos de simetría y asimetría se presentan en la evolución de los cariotipos, lo que a veces dificulta la determinación de la secuencia evolutiva de los cariotipos entre especies relacionadas.

La determinación de las características cariotípicas en *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* confirmó lo ya reportado para otras especies de *Mammillaria* y otros géneros de cactáceas, donde el comportamiento cromosómico es uniforme, es decir, que en las cactáceas predominan cromosomas de pequeña longitud y de posición centromérica media, es decir, cromosomas metacéntricos, y donde los cambios en la evolución del cariotipo pudieran deberse principalmente a mutaciones génicas (Remski, 1954), más que a rearrreglos Robertsonianos, que a diferencia de las cactáceas, han sido evidenciados en otras familias de plantas, como las commelináceas: *Zebrina* y *Cymbispatha* y las asteráceas: *Crepis*, donde se muestra que las translocaciones Robertsonianas dan lugar a cambios en la estructura y simetría de los cariotipos, así como a los números básicos ( $x$ ) (García, 1985).

### Cromosomas meióticos

El **comportamiento meiótico** en *M. haageana* fue normal, presentó un total de 11 bivalentes (II) y mostró una **Fq** por célula de 13.86 y por bivalente de 1.26. El índice de recombinación (IR) fue de 24.86. Estos resultados difieren con los obtenidos por Palomino *et al.*, (1999) para *M. san-angelensis*, cuya **Fq** fue de 16.74 y el **IR** fue de 27.74. Dichos valores, al ser mayores, significan que *M. san-angelensis*, tiene más posibilidades de nuevas combinaciones genéticas en la progenie, y por tanto más oportunidades de adaptarse a cambios ambientales que *M. haageana*. Otra especie de la misma serie, *M. albilanata*, mostró diferente Fq, de 20.25 por célula y de 1.84 por bivalente, que se ubica dentro de los rangos 17.00-28.80 y 1.54-2.62, observados en otras especies de *Mammillaria* (Cuadro 16, Mohanty *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1997; Mohanty *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1998 y Das *et al.*, 1999a).

Cid, (1995) obtuvo resultados similares en *Myrtillocactus geometrizans*, estableciendo que los individuos con un IR mayor tiene una mayor variabilidad genética, que les permite ser más adaptables a cambios ambientales.

En los análisis citológicos realizados en este trabajo se evidencia que existe variación interespecífica en *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* y también con *M. san-angelensis* (Palomino *et al.*, 1999), especies incluidas en la serie *Supertextae* (figura 8). Hunt, (1987) considera sinónimo a *M. haageana* y *M. san-angelensis*. De acuerdo al análisis citológico realizado a estas dos especies, ambas difieren tanto en sus cariotipos como en el comportamiento meiótico: *M. haageana* mostró una longitud cromosómica mayor (1.51-2.69  $\mu\text{m}$ ) a la de los cromosomas de *M. san-angelensis* (0.80-1.70  $\mu\text{m}$ ), adicionalmente en *M. san-angelensis* los 11 pares de cromosomas fueron metacéntricos, mientras que en *M. haageana*, se observaron 9 pares metacéntricos y 2 pares submetacéntricos. También se observaron diferencias en sus genomios, en la presencia de cromosomas con satélite, donde *M. haageana* presentó 1 y



*M. san-angelensis* 2. Los valores de Fq e IR fueron menores en *M. haageana*, Fq=13.86 e IR=24.86 y fueron mayores en *M. san-angelensis*, Fq=16.74 e IR=27.74. Con base en estos resultados se establece una divergencia entre sus genomas, por tanto, es necesario la realización de estudios complementarios como: hibridación, citogenética molecular, etc para dilucidar la categoría taxonómica de ambas.

### Viabilidad de Polen

El porcentaje de viabilidad de polen fue mayor en *M. supertexta* (99.10%) y menor en *M. crucigera* (97.66%), ambas difieren en un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . En *M. haageana* fue de 98.59%. Otros autores también han reportado para otras especies del mismo género, altos porcentajes de polen viable, generalmente mayores al 80% (Mohanty *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1997; Mohanty *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1998; Das *et al.*, 1999a. Cuadro 16). Esto indica que son especies fértiles y muy probablemente de origen no híbrido. Se ha reportado en especies híbridas porcentajes de viabilidad o fertilidad de polen bajos, así por ejemplo *Opuntia x kelvinensis* de origen híbrido mostró un bajo porcentaje de viabilidad de polen (22-29%) y una predominancia de micropolen (Baker and Pinkava, 1987), el cual no se observó en *M. supertexta*, *M. haageana* y *M. crucigera*. En híbridos de otros géneros de plantas también se ha determinado bajo porcentaje de polen viable, como en especies de *Echeveria* (5-20% de polen viable; Uhl, 1994), de *Turnera* (12-20% de polen viable; Fernández y Arbo, 1996) y en especies de *Hypochoeris* (viabilidad de polen menor al 46%; Wulff, 1992).

Esto permite suponer que *M. supertexta*, *M. haageana* y *M. crucigera*, tienen un origen no híbrido. Sin embargo estudios posteriores, como cruzamientos interespecíficos, aclararán aún más su condición.

Las especies *M. supertexta*, *M. haageana* y *M. crucigera* mostraron polen viable, no deforme y de tamaño regular (micro y macropolen ausentes), esto permite inferir que el proceso meiótico en células madre del polen de estas especies es normal, como se comprobó en *M. haageana* mediante su análisis meiótico.

### Respuesta *in vitro*

Con base en los resultados obtenidos, la germinación de semillas *in vitro*, fue diferente entre las especies *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*. Las semillas de *M. supertexta*, respondieron más rápido a las condiciones de germinación, ésta ocurrió en menor tiempo (germinaron a los 15 días de su siembra), sin embargo, el ritmo de crecimiento de las plántulas fue mas rápido en la especie *M. haageana* del Edo. de Puebla. El porcentaje de germinación fue mayor en *M. supertexta* y *M. haageana* del Edo. de Puebla (95.83% y 82.50% respectivamente); en comparación con *M. haageana* del Edo. de Oaxaca y *M. crucigera*, éstas mostraron un porcentaje de germinación menor (48.78% y 57.77% respectivamente, Cuadro 8). En *M. crucigera* el ritmo de crecimiento de las plántulas fue muy lento, en ocasiones hasta nulo, al término de seis meses únicamente dos plántulas presentaban una longitud entre 6 y 10mm (Cuadro 9).

**Cuadro 16.** Promedio de quiasmas por célula y por bivalente en especies de *Mammillaria* diploides, n=11 informados en la literatura.

Especie	Número de quiasmas por célula	Número de quiasmas por bivalente	Polen inviable (%)	Autor
<i>M. albilanata</i> * <sub>12</sub>	20.25	1.84	17.84	Mohanty, <i>et al.</i> , 1996
<i>M. armillata</i> * <sub>1</sub>	22.60	2.05	18.95	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. asteriflora</i> * <sub>14</sub>	24.28	2.20	15.14	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. auricantha</i> * <sub>14</sub>	22.28	2.02	10.14	Das, <i>et al.</i> , 1999a
<i>M. baumii</i> * <sub>2</sub>	26.50	2.41	14.84	Mohanty, <i>et al.</i> , 1996
<i>M. bella</i> * <sub>14</sub>	22.98	2.09	14.23	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. bocasana</i> * <sub>3</sub>	20.20	1.84	20.83	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. boolii</i> * <sub>1</sub>	19.42	1.76	20.31	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. bombycina</i> * <sub>3</sub>	18.00	1.64	10.68	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. bravoae</i> * <sub>14</sub>	23.06	2.10	16.49	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. brevispina</i> * <sub>14</sub>	24.16	2.20	12.20	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. carmenae</i> * <sub>4</sub>	18.00	1.64	12.68	Mohanty, <i>et al.</i> , 1996
<i>M. celeriana</i> * <sub>14</sub>	24.00	2.18	17.52	Mohanty, <i>et al.</i> , 1996
<i>M. collinsii</i> * <sub>5</sub>	24.20	2.20	22.83	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. confusa</i> * <sub>5</sub>	26.40	2.40	27.12	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. decipiens</i> * <sub>6</sub>	24.25	2.20	09.02	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. elegans</i> * <sub>14</sub>	23.00	2.09	8.34	Mohanty, <i>et al.</i> , 1996
<i>M. elongata</i> * <sub>7</sub>	22.45	2.04	10.31	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. geminispina</i> * <sub>8</sub>	23.98	2.18	19.24	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. grandiflora</i> * <sub>14</sub>	21.76	1.98	16.49	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. hahniana</i> * <sub>8</sub>	20.55	1.87	11.23	Das, <i>et al.</i> , 1998

**Cuadro 16.** Promedio de quiasmas ... (continua).

Especie	Número de quiasmas por célula	Número de quiasmas por bivalente	Polen inviable (%)	Autor
<i>M. herrerae</i> * <sub>4</sub>	17.00	1.54	11.09	Mohanty, <i>et al.</i> , 1996
<i>M. klissingiana</i> * <sub>8</sub>	22.25	2.02	20.83	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. leucantha</i> * <sub>3</sub>	21.46	1.95	11.20	Das, <i>et al.</i> , 1999a
<i>M. matudae</i> * <sub>9</sub>	22.65	2.15	11.67	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. occidentalis</i> * <sub>14</sub>	24.05	2.18	32.83	Das, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. pectinifera</i> * <sub>10</sub>	19.26	1.75	7.83	Das, <i>et al.</i> , 1999a
<i>M. plumosa</i> * <sub>4</sub>	28.80	2.62	10.14	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. pseudoperbella</i> * <sub>14</sub>	18.45	1.68	8.31	Das, <i>et al.</i> , 1999a
<i>M. rhodantha</i> * <sub>13</sub>	22.65	2.05	11.68	Das, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. sempervivi</i> * <sub>8</sub>	26.32	2.39	09.88	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. spinosissima</i> * <sub>9</sub>	17.35	1.58	9.83	Das, <i>et al.</i> , 1999a
<i>M. winteriae</i> * <sub>11</sub>	26.30	2.39	12.30	Mohanty, <i>et al.</i> , 1997
<i>M. woodsii</i> * <sub>14</sub>	18.95	1.78	10.79	Das, <i>et al.</i> , 1998
<i>M. zeilmanniana</i> * <sub>3</sub>	26.26	2.38	9.12	Das, <i>et al.</i> , 1997

\*<sub>1</sub> Especies incluidas en la serie *Ancistracanthae*

\*<sub>2</sub> Especies incluidas en la serie *Archibnerellae*

\*<sub>3</sub> Especies incluidas en la serie *Stylothelae*

\*<sub>4</sub> Especies incluidas en la serie *Lasiacanthae*

\*<sub>5</sub> Especies incluidas en la serie *Polyedrae*

\*<sub>6</sub> Especie incluida en el subgénero *Pseudomammillaria*

\*<sub>7</sub> Especie incluida en la serie *Leptocladodae*

\*<sub>8</sub> Especies incluidas en la serie *Leucocephalae*

\*<sub>9</sub> Especies incluidas en la serie *Polyacanthae*

\*<sub>10</sub> Especie incluida en el subgénero *Solisia*

\*<sub>11</sub> Especie incluida en la serie *Macrothelae*

\*<sub>12</sub> Especie incluida en la serie *Supertextae*

\*<sub>13</sub> Especie incluida en la serie *Heteroclorae*

\*<sub>14</sub> Especies que no son reconocidas por Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, (1991b)

De acuerdo a la  $X^2$  calculada, las siguientes especies difieren en la germinación de semillas *in vitro*:

*M. supertexta* y *M. crucigera* ( $X^2_{calculada} = 9.24$ ), *M. supertexta* y *M. haageana* (Oaxaca) ( $X^2_{calculada} = 12.94$ ), *M. crucigera* y *M. haageana* (Puebla) ( $X^2_{calculada} = 7.32$ ). Para todas ellas la  $X^2_{calculada}$  siempre fue mayor a la  $X^2_{tablas}$ , que fue de 3.84 al nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  (Cuadro 11). El hecho de que éstas especies hayan respondido de manera diferente a las mismas condiciones de germinación *in vitro*, puede deberse a dos factores, uno de ellos, es el experimental, las semillas se sometieron a las mismas condiciones experimentales, y quizá cada especie requiere condiciones muy específicas, para tener una germinación exitosa y en menor tiempo, y el que requiera condiciones específicas se debe al segundo factor, que es el genético.

Además de la diferencia observada entre las especies, se observó también variación a nivel intraespecífico en *M. haageana*. El cálculo de la  $X^2$  corroboró esta diferencia, la  $X^2$  calculada fue 11.72 y la de tablas de 3.84 con  $\alpha=0.05$ . Además el ritmo de crecimiento de las plántulas fue más lento en las del Edo. de Oaxaca, al término de seis meses 8 plántulas presentaban un tamaño de 6-10mm, en tanto que del Edo. de Puebla, 22 plántulas se mantuvieron en dicho rango (Cuadros 8, 9 y 11). Esto se debió quizá a que el tamaño de muestra fue relativamente pequeño, es probable que al incrementarla, las diferencias intraespecíficas en germinación disminuyan.

Se ha informado que un gran número de semillas de cactáceas han sido germinadas *in vitro*, con un mayor porcentaje de germinación y sobrevivencia comparado con el método convencional. La germinación de semillas *in vitro* ha resultado benéfica, ya que a partir de las plántulas resultantes, se forman múltiples brotes usando citokininas, incrementando así el número de plantas (Fay y Gratton, 1992). Además, la germinación de semillas *in vitro*, es una manera de obtener tejido de plántula como explante, y se ha recomendado para emplearla en la estrategia de recuperación de cactáceas en peligro de extinción, condición a la que están propensas las especies de este trabajo (Rubluo *et al.*, 1993).

Durante la evaluación de respuesta morfogénica, se observó que un porcentaje mayor de explantes, adquiriría un color púrpura y no manifestaron crecimiento ni diferenciación, principalmente los explantes de *M. supertexta* (11 de 28 explantes, el 39.3%) y *M. haageana* de la localidad de Oaxaca (6 de 14 explantes, el 43%). Dicha coloración fue observada también por Kolar *et al.*, (1975), en *M. woodsii*, que a diferencia de las especies del presente trabajo, los explantes de *M. woodsii* formaron callo y la coloración púrpura o rojiza se fue desvaneciendo hasta adquirir un color ligeramente verde en los callos producidos.

Situación similar fue reportada por Vyskot y Jára (1984), quienes mencionan la liberación de sustancias como fenoles, a partir de los explantes. Martínez-Vázquez y Rubluo (1989), observaron la misma coloración en explantes de *M. haageana* y *M. san-angelensis*. Por tanto en *Mammillaria* es una reacción común al medio de cultivo, por

la presencia de sustancias químicas, que en el momento de tener contacto con el medio son liberadas en él. Mas aún en *M. huitzilopochtli* se ha generado en cultivo en suspensión una concentración considerable de esta sustancia rojiza sin poder precisar su naturaleza química (Robles, 1999).

La respuesta morfogénica observada en los explantes provenientes de plántulas de las especies *M. supertexta* y *M. haageana*, fue la siguiente:

Los explantes de la especie *M. supertexta* formaron callo, brote y raíz, en porcentajes distintos, predominando siempre la formación de brotes, ya sea en forma aislada o acompañados de callo y raíz, así, 6 de 28 explantes, o sea el 21.4% formaron brotes; otros 4 de 28 explantes, el 14.3%, originaron brotes y callos, y otro porcentaje igual 14.3%, produjeron brotes y raíces (Cuadro 10).

Los explantes procedentes de plántulas de *M. haageana* de la localidad del Edo. de Puebla respondieron de la misma manera, es decir, formaron callo, brote y raíz. En ésta predominó la formación de callo, ya sea aislado o acompañado con brotes, esto es, 9 de 27 explantes, o sea el 33% originaron callo, y otro porcentaje igual, 33.3%, originó callos y brotes (Cuadro 10).

En *M. haageana* de la localidad de Oaxaca, los explantes produjeron callo y brote: 2 de 14 explantes, o sea el 14.3% formaron brotes, y otro porcentaje igual, 14.3% de explantes, formaron callos y brotes simultáneamente, por tanto, fue más frecuente la producción de brotes, como sucedió en *M. supertexta* (Cuadro 10).

La respuesta morfogénica observada en los explantes de las plántulas de *M. supertexta* y *M. haageana*, como son la formación de callo, de brote y de raíz, es resultado de la interacción del explante con los componentes del medio de cultivo, principalmente con los reguladores de crecimiento; esto ha sido observado por Skoog y Miller (1957) quienes mencionan que las auxinas causan formación de raíz y las citokininas inducen formación de brote, mientras que el crecimiento de callo ocurre en un amplio rango de concentración de hormonas.

Para Steinhart (1962); Minocha y Mehra (1974) y Silverten *et al.*, (1983), la iniciación de callo se debe generalmente al tejido dañado durante el cultivo *in vitro*, particularmente bajo la influencia de auxinas.

Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) informaron que *M. haageana* produjo callo al utilizar la auxina 2,4-D, como regulador de crecimiento, mencionan además que la proliferación de callo esta influenciada por el origen del explante. Sin embargo en el presente trabajo *M. supertexta* y *M. haageana* formaron callo, utilizando BA, que es una citokinina, y el mismo tipo de explante (segmento lateral de tallo) que dichos autores.

Por tanto la formación de callo en explantes de *M. supertexta* y *M. haageana* puede atribuirse a la liberación de auxinas por parte del explante, y éstas inducen la formación del callo, como lo proponen Hubstenberger *et al.*, (1992) al mencionar que las cactáceas tienen la capacidad para producir exceso de auxinas *in vitro*, que influyen en la formación del callo.

La producción de brotes en explantes de *M. supertexta* y *M. haageana*, se debe a que la BA interrumpe la dormancia o inactividad de los brotes, lo que ocasiona que se produzcan muchos brotes a partir de un explante; como lo establecen Fay y Gratton (1992) y como fue observado también en *M. san-angelensis*, propagada por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) y cuya respuesta morfogénica fue producción de callo y principalmente brotes; ellos obtuvieron brotes individuales (30%) en explantes apicales y laterales, y callos con brotes múltiples (40%), también observaron formación de raíz.

En relación a la producción de brotes, en los explantes provenientes de plántulas de las especies *M. supertexta* y *M. haageana* (Puebla y Oaxaca), 38, 46 y 21 brotes en total respectivamente (Cuadro 12), estadísticamente no hay diferencia en la producción de brotes entre dichas especies, la aplicación de ANOVA, indicó un **F** calculado de 0.04 y un **F** de tablas de 3.34 con  $\alpha = 0.05$  (Cuadro 13).

Desafortunadamente, estos resultados no se consideran suficientes como para poder afirmar categóricamente que dichas especies difieren o no en su respuesta morfogénica al ser sometidas a las mismas condiciones de cultivo. Esto se atribuye a que el tamaño de muestra experimentado no fue el óptimo, esto debido a que en principio no se contó con material vegetal suficiente y a que tanto la germinación de semillas como el crecimiento de las plántulas fue muy irregular y por tanto no se obtuvo un mayor número de explantes ni se mantuvo constante el número de éstos entre las especies, lo que impidió tener un tamaño de muestra adecuado y en el tiempo establecido para ello; además de la nula variación en el tratamiento aplicado.

Lo que se esperaba obtener es que la respuesta morfogénica de los explantes provenientes de plántulas de *M. supertexta* y *M. haageana*, fuera diferente ante las mismas condiciones de cultivo *in vitro*, ya que en trabajos previos con cactáceas, particularmente del género *Mammillaria*, se ha sugerido que cada especie requiere un balance diferente de auxinas-citokininas para inducir la formación de brotes, puesto que la respuesta *in vitro* de explantes a partir de diferentes plantas, es en la mayoría de los casos altamente específica, aún en el nivel de variedad (Johnson y Emino, 1979a; Rubluo y Kartha, 1985).

Estas aseveraciones son acordes con lo reportado por Johnson y Emino (1979b) quienes obtuvieron resultados variables en especies de *Mammillaria*, así *M. elongata* fue propagada con éxito, formando desde callo, brote y raíz; *M. sphaerica* y *M. gracilis* produjeron únicamente una pequeña cantidad de callo, y *M. eichlamii* no mostró respuesta a las condiciones de cultivo ensayadas. Resultados similares fueron obtenidos por Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) en *M. haageana* y *M. san-angelensis*, en éstas especies la formación de callos y brotes fue variable; en *M. san-angelensis* predominó la formación de brotes múltiples. Esto es debido a que el factor genético, influye de manera importante en la expresión morfogénica de *Mammillarias* cultivadas *in vitro* (Rubluo, 1997).

Los resultados obtenidos en el análisis cromosómico indicaron variabilidad interespecífica a nivel cariotípico en *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*. En tanto en los resultados del cultivo *in vitro* de las especies *M. supertexta* y *M. haageana* no se observó diferencia en su respuesta morfogénica; sin embargo por el comportamiento cromosómico observado en estas especies se esperaría que su respuesta al cultivo *in vitro*, bajo las mismas condiciones experimentales fuera diferente, ya que generalmente esta es muy específica.

A pesar de que estos resultados pueden considerarse el inicio de una investigación más amplia a realizarse a futuro, muestran la potencialidad efectiva de la propagación *in vitro* como una alternativa prometedora para resolver problemas de especies de cactáceas en peligro de extinción.

Dentro de las ventajas de la propagación por el cultivo *in vitro* de las especies del presente estudio, esta la obtención masiva de plantas mediante esta vía, esto es particularmente importante en especies en extinción (Martínez y Vázquez y Rubluc, 1989), además los cultivos *in vitro* provenientes de tejido meristemático producen individuos clonados (Rubluc *et al.*, 1984). Estas dos características son consideradas importantes en términos de recuperación de las especies en extinción ya que servirán de base para estudios de inducción de variabilidad genética que ampliarán las posibilidades de éxito en la supervivencia de especies en extinción. Sin embargo en el cultivo *in vitro* es frecuente la aparición de alteraciones cromosómicas que pueden dar lugar a plántulas inviables o con cambios genéticos indeseables (Binarová and Dolezel, 1988) por lo que es imperativo conocer la estructura cromosómica de las especies que quieren propagarse por cultivo *in vitro* para poder planear experimentos que ayuden a la supervivencia de especies en extinción (Palomino *et al.*, 1999). Así, el estudio cromosómico de *M. supertexta* y *M. haageana* es una aportación importante de información, que además en complemento con otros estudios, reproductivos, geográficos, ecológicos, etc. será de gran utilidad en el rescate de especies en peligro de extinción.

## CONCLUSIONES

- *Mammillaria supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* fueron especies diploides, mostraron un  $2n = 22$  y un  $x = 11$  como en la mayoría de las especies de *Mammillaria*, lo que concuerda con el número básico de las cactáceas.
- Se observó variación interespecífica a nivel cariotípico entre *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana*:
- Se determinó en las tres especies una correlación entre el tamaño absoluto de los cromosomas y la longitud del genomio. Presentando *M. supertexta* los valores mayores y *M. haageana* los valores menores en dicha correlación.
- La fórmula cariotípica de  $10m+1sm$  se observó en *M. supertexta* y *M. crucigera* y la de  $9m+2sm$  en *M. haageana*.
- Se observó variación en el número de satélites y su posición, *M. supertexta* y *M. haageana* mostraron un par de satélites y *M. crucigera* mostró dos pares de satélites.
- En las tres especies los cariotipos fueron simétricos.
- De acuerdo a la comparación realizada entre los cariotipos de *M. haageana* y *M. san-angelensis*, se establece una divergencia entre sus genomios; por tanto, aunque Hunt (1987) las considera sinónimo, se necesitan estudios de morfología, de hibridación, citogenética molecular y otros, para dilucidar la categoría taxonómica de ambas.
- El comportamiento meiótico en *M. haageana* fue normal, con la presencia de 11 bivalentes.
- Las tres especies presentaron un porcentaje de polen viable superior al 95%, por lo que se infiere que son especies fértiles y probablemente de origen no híbrido.



La variación interespecífica definida por las diferencias en el tamaño de los cromosomas, en la morfología cromosómica y en el número y posición de satélites en *M. supertexta*, *M. crucigera* y *M. haageana* se atribuye a la ocurrencia de deleciones, duplicaciones, translocaciones e inversiones entre sus cromosomas que se han presentado a través de la evolución de sus cariotipos.

- *M. supertexta* y *M. haageana* mostraron diferencia en la germinación de semillas *in vitro*. En *M. supertexta* y *M. haageana* (Edo. de Puebla) los porcentajes de germinación fueron mayores (95.83% y 82.50%, respectivamente) y fueron menores en *M. crucigera* y *M. haageana* (Edo. de Oaxaca; 57.77% y 48.78% respectivamente). Estas diferencias en germinación indican que cada especie requiere condiciones experimentales específicas para tener una germinación exitosa, pero además se requiere incrementar el tamaño de muestra.
- La respuesta morfogenética mostrada por *M. supertexta* y *M. haageana* fue formación de callo, brote y raíz. Esta respuesta se debe a la interacción del explante con los reguladores de crecimiento, como las auxinas que causan la formación de callo y raíz y como las citokininas, en este caso BA que induce formación de brotes al interrumpir la dormancia de los mismos.
- De acuerdo al ANOVA realizado, *M. supertexta* y *M. haageana* no mostraron diferencia significativa en la formación de brotes.

## BIBLIOGRAFIA

- Arias, M. S. 1993. Cactáceas: Conservación y Diversidad en México. Vol. Esp. (XLIV) Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 109-115pp.
- Barlow, P. W. and Nevin, D. 1976. Quantitative karyology of some species of *Luzula*. Plant Syst. Evol. 125: 77-86.
- Beard, E. C. 1937. Some chromosome complements in the Cactaceae and a study of meiosis in *Echinocereus papillosus*. Bot. Gaz. 99: 1-21.
- Bennett, M. D. and Smith, J. B. 1991. Nuclear DNA amount in angiosperms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 334:309-345.
- Beversdorf, W. D. 1990. Micropropagation in Crop Species. In H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van der Plas and J. Van Aartrijk, Kluwer (Eds.): Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Academic Publishers. 3-12.
- Binarová, P. and Dolezel, J. 1988. Alfalfa embryogenic cell suspension culture: growth and ploidy level stability. J. Plant Physiol.. Vol. 133: 561-566.
- Bravo, H. H. 1978. Las Cactáceas de México. UNAM. 2a ed. Vol. 1. 755 pp.
- Bravo, H. H. y Sánchez Mejorada, H. 1991a. Las Cactáceas de México. Vol. II UNAM. México, D.F: 404 pp.
- Bravo, H. H. y Sánchez Mejorada, H. 1991b. Las Cactáceas de México. Vol. III UNAM. México, D.F. 643 pp.
- Bravo, H. y Scheinvar, L. 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica. 1 ed. 233 pp.
- Baker, M. A. and Pinkava, D. J. 1987. A cytological and morphometric analysis of a triploid apomict, *Opuntia x kelvinensis* (Subgenus *Cylindropuntia*, Cactaceae). Brittonia 39 (3): 387-401.
- Cid, J. R. 1995. Estudio Citogenético de *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console. Tesis de Maestría en Ciencias. Fac. Ciencias, UNAM. 60p.
- Cid, R. and Palomino, G. 1996. Cytotypes and Meiotic behavior in mexican populations of *Myrtillocactus geometrizans* var. *geometrizans* (Cactaceae). Cytologia 61: 343-348.

- Clayton, P. W., Hubstenberger, J., Phillips, G. and Butler-Nance, S. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **115**: 337-343.
- Conger, A. D. and Faircheld, L. M. 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Techn.* **28**: 281-283.
- Craig, R. T. 1945. *The Mammillaria Handbook*. Abbey Garden Press, Pasadena, California. 390 pp.
- Cota, J. H. and Wallace, R. S. 1995. Karyotypic studies in the genus *Echinocereus* (Cactaceae) and their taxonomic significance. *Caryologia* **48** (2): 105-122.
- Daniel, W. W. 1983. *Bioestadística: Base para el análisis de las Ciencias de la Salud*. Ed. Limusa, México, D.F. 485 pp.
- Darlington, C. D. 1937. *Recent Advances in Cytology*. 2nd edition Blakinstons: Mc Graw Hill Book Company, New York, 125p.
- Das, A. B., Mohanty, S. and Das, P. 1997. Meiotic behaviour and nuclear DNA variation in some species of *Mammillaria* (Cactaceae). *Cytologia* **62**: 253-257.
- Das, A. B., Mohanty, S. and Das, P. 1998a. Interspecific variation of nuclear DNA and structural changes in meiotic and mitotic chromosome in some species of *Mammillaria* (Cactaceae). *Caryologia* Vol. 51 (3-4): 289-301.
- Das, A. B., Mohanty, S. and Das, P. 1998b. Variation in karyotype and 4C DNA content in six species of *Melocactus* of the family Cactaceae. *Cytologia* **63**: 9-16.
- Das, A. B., Mohanty, S. and Das, P. 1998c. Interspecific variation in nuclear DNA content and chromosome analysis in *Melocactus*. *Cytologia* **63**: 239-247.
- Das, A. B., Mohanty, S. and Das, P. 1999a. Studies on chiasma frequency and nuclear 4C DNA amount in seven species of *Mammillaria*. *Cytobios* **97**: 95-101.
- Das, A. B., Mohanty, S. and Das, P. 1999b. Karyotype diversity in thirteen species of *Mammillaria* in the family Cactaceae. *Cytobios* **97**: 117-125.
- Das, A. B., Mohanty, S., Marrs, R. H. and Das, P. 1999c. Somatic chromosome number and karyotype diversity in fifteen species of *Mammillaria* of the family Cactaceae. *Cytobios* **97**: 141-151.
- Das, A. B., Mohanty, S. and Das, P. 1999d. 4C DNA variations and Karyotype diversity in nine species of *Ferocactus* B. and R. *Cytologia* **64**: 17-24.

- Delgadillo-Reynoso, M. G. 1990. A note on *in vitro* propagation of threatened and important economic cacti from Mexico. In Botanic Garden Microprop. Newsletter 1: 22.
- De fossard, R. A. 1976. Tissue culture for plant propagators. The University of New England Printery, Australia. 409 pp.
- Fay, M. F. and Gratton, J. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. Bradleya 10: 33-48.
- Fay, M. F. and Muir, H. J. 1990. The role of micropropagation in the conservation of European plants. In Hernández Bermejo, J. E., Clemente, M. and Heywood, V. (eds). Conservation Techniques in Botanic Gardens. Proc. Intl Conf. Conservation Techniques in Botanic Gardens (Córdoba, 1987). Koeltz Scientific Books.
- Fernández, A. y Arbo, M. M. 1996. Relaciones genómicas entre las especies diploides de flores blanco-azuladas de *Turnera* (Serie *Canaligerae*). Bonplandia 9 (1-2): 95-102.
- Gallagher, M. L. and Parfitt, B. D. 1982. In IOPB chromosome number reports LXXVII. Taxon 31: 761-762.
- García, V. A. 1985. Sistemas Robertsonianos: su papel en la evolución cromosómica en plantas superiores. In: Memorias del Seminario sobre la investigación genética básica, en el conocimiento y evolución de los recursos genéticos. Jardín Botánico del Instituto de Biología. UNAM. 41-53.
- García, V. A. 1990. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Colegio de Postgraduados. 3 ed. Talleres gráficos de la Nación, México D. F. 144 pp.
- George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited Eversley.
- George, E. F. Ph. D. 1993. Plant propagation by tissue culture the technology. Part 1. 2 ed. Exegetics Limited. England. 574 pp.
- Gibson, A. C. and Nobel, P. S. 1986. The Cactus Primer Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 286 pp.
- Gill, B. S. and Goyal, V. 1984. Cytology of some members of Cactaceae. Cell. Chromosome Rev. 7: 58-60.
- Gupta, R. and Gupta, P. K. 1978. Karyotypic studies in the genus *Crotalaria* Linn.

*Cytologia*, **43**: 357-369.

Harlan, J. R. and De Wet, J. M. J. 1975. On *Ö. Winge* and *A Prayer*: The origins of polyploidy. *The Botanical Review*. **41** (4): 361-390.

Hernández, M. H. y Godínez, A. H. 1994. Contribución al Conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* **26**: 33-52.

Hubstenberger, J. F., Clayton, P.W. and Phillips, G. C. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae). In: Bajaj YPS (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol.20. High-tech and micropropagation IV. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 49-68.

Hunt, D. 1987. A new review of *Mammillaria*. *Bradleya* **5**: 45-48.

Hunt, D. 1992. CITES. Cactaceae checklist. Ed. Royal Botanical Garden Kew and International Organization for Succulent Plant Study (IOS). 190 pp.

Johnson, M. A. 1978. Diploid cytotypes in *Mammillaria prolifera* and three other *Mammillaria* species. *Cact. and Succ. J. Gt. Brit.* **40**: 9-12.

Johnson, M. A. 1980. Further cytological investigation in *Mammillaria prolifera* and other *Mammillaria* species. *Cact. and Succ. J. Gt. Brit.* **42** (2): 43-47.

Johnson, J. L. and Emينو, E. R. 1979a. Tissue culture propagation of cacti. *Cact. Succ. J. (US)* **51**: 275-277.

Johnson, J. L. and Emينو, E. R. 1979b. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience* **14**: 605-606.

Jones, K. 1970. Chromosome changes in plants. *Taxon*, **19**: 172-178

Jones, K. 1978. Aspects of Chromosome Evolution in Higher Plants in H. W. Woolhodge (ed.): *Advances in Botanical Research*. Vol.6. Academic Press. London.

Katagiri, S. 1953. Chromosome numbers and polyploidy in certain Cactaceae. *Cact. Succ. J. Am.* **25**:141-142.

Kenton, A. 1986. Importancia de los cromosomas en la especiación y evolución, como base para el conocimiento y caracterización de especies vegetales con valor potencial. 11-36pp. In: G. Palomino H. (ed.) III Seminario Maximino Martínez. La aplicación de la citogenética en el conocimiento biológico de los recursos vegetales en México. Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM., México.

BIBLIOTECA DE LA UNAM

- Kolar, Z.; Bartek, J., and Vyskot, B. 1975. Vegetative propagation of cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue cultures. *Experientia* **32**: 668-669.
- Lacadena, J. R. 1988. Genética. Ed. AGESA, Madrid, España. 1303p.
- Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**: 201-220.
- Martínez-Vázquez, O. and Rubluo, A. 1989. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez - Mejorada. *J. of Hort. Sci.* **64** (1): 99-105.
- Minocha, S. C. and Mehra, P. N. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Am. J. Bot.* **61**: 168-173.
- Mohanty, S., Das, A. B. and Das, P. 1996. Analysis of chiasma frequency and nuclear DNA variation in some species of *Mammillaria*. *Cytobios* **88**: 173-181.
- Mohanty, S., Das, A. B. and Das, P. 1997a. Estimation of 4C DNA content and determination of chiasma frequency in eight species of *Mammillaria*. *Cytobios* **91**: 15-23.
- Mohanty, S., Das, A. B. and Das, P. 1997b. Studies on nuclear DNA and meiotic chromosome in 8 species on *Mammillaria*. *Cytologia* **62**: 331-336.
- Montes, J. 1978. Estrategia para la conservación de los recursos genéticos. En: T. Cervantes S. (ed.): Recursos Genéticos Disponibles a México. SOMEFI, México, 29-35.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**: 135-166.
- Nava - Esparza, V. C. y Yáñez, L. L. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cact. Suc. Mex.* **29**:3-7.
- Palomino, H. G., Zuleta, S. y Scheinvar, L. 1988. Estudios citogenéticos de dos especies y una variedad del género *Nyctocereus* (Cactaceae). *Bol. Soc. Bot. México.* **48**: 75-79.
- Palomino, H. G., Martínez, P., Bernal, C. y Sousa, M. 1993. Diferencias cromosómicas entre algunas especies de los géneros *Sophora* L. y *Styphnolobium* Schott. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **80**: 284-290.

- Palomino, H. G. 1995. Estudios citogenéticos de plantas mexicanas en Bermúdez K. T. y Jiménez P. A. (eds.): *Plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición*. 1-11 pp. COFAA-IPN. México.
- Palomino, G., Dolezel, J., Cid, R., Brunner, I., Méndez, I. and Rubluo, A. 1999. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long term *in vitro* culture. *Plant Science* **141**: 191-200.
- Palomino, H. G. 2000. Genome analysis of mexican flora. *Genetics and Molecular Biology*. **23**, 4: 921-924.
- Patil, B. C. and Chennaveeraiah, M. S. 1975. Cytological studies in *Crotalaria incana* L. and *C. mucrotanata*. Desv. *The Nucleus*, **18**: 141-146.
- Pérez, P. J. N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Vol.1. 390 pp.
- Pinkava, D. J. and McLeod, M. G. 1971. Chromosome numbers in some cacti of western North America, *Brittonia* **23**: 171-176.
- Pinkava, D. J., McLeod, M. G., McGill, L. A. y Brown, R. C. 1973. Chromosome numbers in some cacti of western North America-II. *Brittonia* **25**: 2-9.
- Pinkava, D. J., and Parfitt, B. D. 1982. Chromosome numbers in some cacti western North America IV. *Bull. Torrey Bot. Club* **109**: 121-128.
- Pinkava, D. J., Parfitt, B. D., Mohlebrock, M. W. and Worthington, R. D. 1985. Chromosome numbers in some cacti western North America V. *Syst. Bot.* **10**: 471-483.
- Pinkava, D. J., Rebman, J. P. and Baker, M. A. 1998. Chromosome numbers in some cacti of western North America VII. *Haseltonia*, **6**:32-41.
- Price, J. H. 1976. Evolution of DNA content in higher plants. *The Botanical Review*. **42**: 27-45.
- Radford, E. A., Dickison, C. W., Massey, R. J. y Bell, R. C. 1974. *Vascular Plant Systematics*. Harper and Row. New York. 891p.
- Ramírez, K. I. 1999. Comparación de cariotipos de cinco especies de dos subgéneros de *Datura* en México. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM. 46p.
- Remski, M. F. 1954. Cytological investigations in *Mammillaria* and some associated genera. *Bot. Gaz.* **116** (2): 163-171.

- Reyes, S. J. y Arias, S. 1995. Cactáceas de México: Conservación y Producción. Revista Chapingo. Serie Horticultura. Vol. 1 (3): 85-92.
- Rieger, R., Michaelis, A. y Green, M. 1982. Diccionario de genética y citogenética clásica y molecular. Ed. Alhambra, España. 647p.
- Robles, Z. R. E. 1999. Establecimiento del cultivo *in vitro* de *Mammillaria huitzilopochtli* para la obtención de metabolitos secundarios. Tesis Maestría. UNAM. 85 pp.
- Ross, R. 1981. Chromosome counts, cytology and reproduction in the Cactaceae. Am. J. Bot. 68: 463-470.
- Rubluo, A., Kartha, K. K., Mroginski, L. A., and Dyck, J. 1984. Plant regeneration from Pea Leaflets cultured *in vitro* and genetic stability of regenerants. J. Plant Physiol. Vol. 117: 119-130.
- Rubluo, A and Kartha, K. K. 1985. **In vitro** culture of shoot apical meristems of various *Phaseolus* species and cultivars. Plant Physiology, 119: 425-433.
- Rubluo, A., Arriaga, E., Arias, S., Pérez Amador, C., Amor, D., Santos, E. and Elizalde, P. 1990. Tissue culture applications in the endangered *Mammillaria huitzilopochtli*, (Cactaceae). Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Abs. No. A3-191, p. 130.
- Rubluo A., Chavez, V., Martínez, A. P. and Martínez-Vázquez, O. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. Biological Conservation 63: 163-169.
- Rubluo, A., Novak, F., Brunner, I., Van Duren, M., Marquez, J., Duval, K. and Marin, T. 1994. Conservation and regeneration of plant diversity through tissue culture in endangered species. VIII Int Congr Plant Tissue Cell Cult Abstr, Florence, 116
- Rubluo, A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae). In Y. P. S. Bajaj (Ed.): Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 40 High-Tech and Micropropagation VI. 193-205 pp. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rusell, J. P. 1992. Genetics. Ed. Harper Collins Publishers. 3 ed. 758 pp.
- Sáez, F. y Cardoso, H. 1978. Citogenética Basica y Biología de los Cromosomas. OEA. Whashington D. C. EUA.
- SEDESOL (1994). Norma Oficial Mexicana de Especies en Extinción. Diario Oficial de la Federación. Tomo CDLXXXVIII No. 10, p 10-13.



- Silverstein, S.P., Hauang, F. H. and Klingamaman, G. L. 1983. *In vitro* propagation of succulent *Euphorbia flanaganii* N. E. Br. Cact. and Succ. J. 55:80-83.
- Skoog, F. and Miller, C. C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118-131.
- Sinha, S. S. N. and Roy, H. 1979. Cytological studies en the Genus *Phaseolus* I. Mitotic analysis in fourteen species. Cytologia. 44: 191-199.
- Sosa, R. y Acosta, A. 1966. Poliploidía en *Opuntia* spp. Agrociencia. Vol. 1 (1): 100-106.
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Ed. Edward Arnold Ltd., London 216pp.
- Steinhart, C. E. 1962. Tissue culture of a cactus. Science, 137: 545-546.
- Uhl, H. CH. 1994. Chromosomes and hybrids of *Echeveria* (Crassulaceae) I. Haseltonia 2: 79-88.
- Vyskot, B. and Jára, Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. J. Hort. Sci. 59: 449-452.
- Walter, K. S. and Gillet, H. J. (Eds) (1998). 1997 IUCN Red list of threatened plants. Compiled by The World Conservation Monitoring Centre. IUCN-The World Conservation Union , Gland, Switzerland and Cambridge. U. K. Lxiv+867 pp.
- Weedin, J. F. and Powell, A. M. 1978. Chromosome number in Chihuahua desert Cactaceae. Trans Pecos Texas. Am. J. Bot. 65: 531-537.
- White, M. 1973. Animal Cytology and Evolution. Cambridge University (ed.), 961p.
- Wulff, F. A. 1992. Hibridación natural entre especies sudamericanas de *Hypochoeris* (Asteraceae). Darwiniana 31(1-4): 167-171.