

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 121

FACULTAD DE CIENCIAS

"Regeneración in vitro de Ariocarpus kotschoubeyanus (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), especie amenazada endémica de México".

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

KATJA GUADALUPE MOEBIUS GOLDAMMER



MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION I POLAR

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

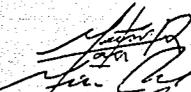
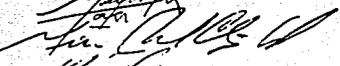
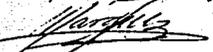
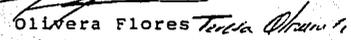
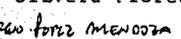
MAT. MARGARITA ELVIRA CHAVEZ CANO  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"Regeneración in vitro de Ariocarpus kotschoubeyanus  
(Lem. ) K. Schum. (Cactaceae), especie amenazada endémica  
de México".  
realizado por Katja Guadalupe Moebius Goldammer

con número de cuenta 9450285-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	M. en C. Martín Mata Rosas	
Propietario		
Co-Director	Dr. Víctor Manuel Chávez Avila	
Propietario		
Propietario	Dra. Gpe. Judith Márquez Guzmán	
Suplente	Ing. Agron. Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores	
Suplente	Biol. Sergio López Mendoza	

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología  
*Edna M. Suárez Díaz*  
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la U.N.A.M. bajo la dirección del M. en C. Martín Mata Rosas y el Dr. Víctor Manuel Chávez Avila.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Katja  
Mochiz

FECHA: 10. noviembre 2003

FIRMA: Katja Mochiz

**A Pirmin,  
Por dejar una huella tan importante en mi vida...**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en especial a mi madre por creer siempre en mí. Por guiarme sabiamente en el camino de la vida y por enseñarme a ser una mejor persona día a día. Gracias por escucharme siempre Mumi.

A mi padre, por haber fundado las bases de mi educación y por todo tu cariño y enseñanzas. Gracias papi.

A mis hermanos Elsa y Ernesto por tantos años de aventuras, recuerdos, risas... los quiero mucho.

Agradezco especialmente al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila por haberme recibido en su laboratorio desde un principio con los brazos abiertos. Gracias por ser mi maestro, por tus consejos, tu apoyo y sobre todo por tu amistad.

Martín, gracias por guiarme en el desarrollo de mi tesis con tus consejos, dedicación y por tu paciencia.

A la Maestra Magdalena por su confianza en mí. A Salvador Arias por sus consejos.

A la Dra. Judith Márquez, a la Ing. Agron. Ma. Teresa de Jesus Olivera y al Biól. Sergio López por compartir su tiempo conmigo y por creer en mí.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio: Alejandro Martínez, Barbariux, Gabriel, Linda, Angel, Claudia y Esthela. Gracias por su amistad y cariño.

Conchita e Iliana, gracias por el tiempo que me dedicaron para aclarar mis dudas.

A mi amiga y consejera de toda la vida Ute, por estar siempre disponible cuando te necesito, por filosofar conmigo tantas teorías de la vida, por ser tu... un abrazo muy especial...

A Christian, porque te amo.

Ale y Heidi, gracias por aventurarse conmigo a explorar el mundo, para ampliar nuestros horizontes, así como hemos ampliado el concepto de la amistad.

Janika, gracias por escucharme, por ayudarme a poner orden en mis ideas y sobre todo por tu amistad incondicional hacia mí y tu cariño sincero a toda mi familia.

A Katitis por ser una original compañerita viajera y una gran amiga.

A Valentina, Chofis y Diana, por haber hecho del inicio de mi carrera una sonrisa inagotable.

Chofis y Valentina, gracias por todas sus ocurrencias y por su amistad.

A la Pelecha y Helga por tantas sonrisas.

Efraín, muchas gracias por tu valiosa amistad y por compartir conmigo tantas risas y momentos divertidos.

A ti Toño, por ser mi maestro y aclararme tantas dudas académicas y sobre todo por tu apoyo y amistad.

Mauricio, por tantas ocurrencias y por tu especial amistad.

Korinas (qepd), gracias por todo lo que me enseñaste sobre la amistad y por tantos recuerdos agradables que dejaste en las páginas de mi memoria.

## INDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCION	3
II. ANTECEDENTES	8
Características de <i>Ariocarpus</i>	8
Descripción Botánica	9
Distribución Geográfica y Abundancia	10
Descripción de habitat	10
Usos	11
Situación actual	11
Cultivo de Tejidos Vegetales	12
Cultivo de Tejidos Vegetales en Cactáceas	15
Organogénesis	15
Embriogénesis somática	16
Embriogénesis somática en cactáceas	19
III. OBJETIVOS	20
IV. MATERIALES Y METODOS	21
V. RESULTADOS Y DISCUSION	28
Germinación de semillas	28
Fuente de explantes	31
Callo	33
Organogénesis	34
Organogénesis Directa	34
Organogénesis Indirecta	37

Rizogénesis	43
Embríogénesis somática	44
Inducción	44
Proliferación, maduración y germinación	47
Procesamiento histológico de embriones somáticos	55
Enraizamiento	57
VI. CONCLUSIONES	63
VII. LAMINAS	65
VIII. BIBLIOGRAFIA	67
IX. APENDICE	75

## ABREVIATURAS

2,4-D	Acido 2,4-Diclorofenoxiacético
ABA	Acido Abscisico
ANA	Acido Naftalenacético
AIB	Acido Indolbutírico
BAP	6-Bencilaminopurina
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
KIN	Kinetina; 6-Furfurilaminopurina
MS	medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
MS50	medio de cultivo MS a la mitad de su concentración
TBA	Alcohol Terbutílico

## RESUMEN

"Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), especie amenazada endémica de México."

En el presente estudio se logró la inducción de organogénesis (directa e indirecta) y de embriogénesis somática (directa e indirecta) a partir de tubérculos de plántulas de *Ariocarpus kotschoubeyanus* germinadas *in vitro* y se logró el desarrollo de los regenerantes hasta su establecimiento en suelo. El medio de inducción fue MS adicionado con 6-bencilaminopurina (0-5 mg/l) en combinación con ácido naftalenacético (0-1 mg/l). El mayor número de brotes se obtuvo en los tratamientos con BAP (1 mg/l) con un total de 44 brotes y BAP (3 mg/l) con ANA (1 mg/l) con 41 brotes. La fase de enraizamiento de los brotes regenerados se vio favorecida por el uso de "suncaps" (0.02 m disco de filtro). La respuesta de embriogénesis somática ocurrió con BAP (2 mg/l) en combinación con ANA (0.5 y 1 mg/l), BAP (3 mg/l) con ANA (0.1 mg/l) y KIN (5 mg/l) sola y con 2,4-D (0.1 mg/l). Aún cuando los embriones somáticos se indujeron y lograron cierto desarrollo en el medio inductor, su crecimiento y completa maduración sólo se logró en medio basal (libre de reguladores de crecimiento). La adición de carbón activado a medio MS y MS50 favoreció la germinación de los embriones somáticos. Mediante cortes histológicos de estructuras nodulares fue posible identificar las primeras etapas de división durante la embriogénesis, así como la formación de meristemas apicales.

El empleo de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro* provee una importante herramienta en el estudio, propagación, conservación y el rescate de esta especie amenazada.

## I. INTRODUCCION

México es un país en donde la diversidad de formas de vida es de excepcional magnitud, debido a que, además de ser una "zona de transición" o convergencia entre flora y fauna neártica y neotropical, tiene una larga y compleja historia de aislamiento en algunas regiones, lo que ha favorecido la evolución de un gran número de especies endémicas (Toledo, 1988).

La gran abundancia de endemismos en la flora de México, asociada a su notable diversidad, es indicadora de que el territorio del país ha sido lugar de origen y desarrollo de un gran número de grupos de plantas. Este proceso es particularmente espectacular en las zonas áridas y semiáridas, donde el endemismo a menudo no sólo atañe a grupos taxonómicos de rango elevado, sino también a formas biológicas; siendo así el responsable de la singularidad de su flora (Rzedowski, 1998).

Enmarcada en la diversidad florística de México, la familia Cactaceae destaca por su amplia representatividad a nivel de géneros y especies. A nivel específico existen 850 especies silvestres en el territorio nacional, lo que equivale a ca. del 42 % de las especies de la familia, de las cuales, el 85 % son endémicas (Arias, 1993), concentrándose en las zonas áridas y semiáridas del país, siendo mejor representada en el Norte y Centro (Reyes, 1994).

El creciente desarrollo económico que se ha observado sobre todo en los últimos años en México, ha provocado un gran costo biológico, el cual se ve reflejado en la disminución de la diversidad, ésta significa la desaparición irreversible de genotipos que son el resultado de procesos evolutivos desarrollados durante millones de años, e implica también una reducción sensible

en las probabilidades de utilización de la variabilidad vegetal (Caballero 1990 citado por Alvarez-Sánchez, 1993).

Las poblaciones naturales se han visto afectadas por la agricultura, ganadería (caprina y bovina), asentamientos humanos, desarrollo industrial, construcción de caminos y carreteras, tendidos de líneas eléctricas y telefónicas, extracción de materiales de construcción, construcción de presas, pero principalmente por la sobrecolecta del recurso (Reyes y Terrazas, 1991 citado por Reyes 1994), ya que las cactáceas resultan ser de alto valor entre los coleccionistas, quienes se ven atraídos por su rareza debida a la forma, tamaño, color de la flor, espinas, etc., y tanto el mercado nacional como el internacional se han abastecido en gran parte por medio de la extracción de ejemplares de su hábitat natural de manera ilegal (Arias, 1993). Los motivos anteriores han ocasionado que muchas especies de cactáceas se encuentren en inminente peligro de extinción

El número anual de cactáceas que son exportadas por México es alrededor de 50,000, de las cuales, menos del uno por ciento son reportadas como plantas propagadas. Teóricamente la exportación de individuos silvestres está prohibida desde hace unos 50 años, y muchas de las especies más deseadas se encuentran amenazadas, por lo que las cifras de exportación son alarmantes (Oldfield, 1997).

En 1974, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) creó el Comité de Plantas Amenazadas, con un secretariado en Kew, Gran Bretaña. Este Comité reúne información por medio de especialistas regionales y jardines botánicos que se comprometen a propagar las especies amenazadas. Se

creó, en forma paralela, la Convención sobre el Intercambio Internacional de Especies de la Flora y Fauna amenazadas (CITES), que trabaja para proteger las especies e impedir el saqueo de plantas silvestres o de sus semillas. El 18 de junio de 1991, México se anexó a CITES; el convenio fue publicado en el Diario Oficial del día 24 del mismo mes (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). Actualmente se incluyen 299 spp. de la familia Cactaceae con algún grado de amenaza en la lista de la IUCN y 215 spp. en la de SEDUE (ahora SEDESOL) (Arias, 1993).

En la situación actual, de degradación de los ecosistemas naturales donde se distribuyen y crecen las cactáceas, es urgente emplear alternativas de rescate y conservación, como es el desarrollo de métodos eficientes de propagación de especies con problemas de sobrevivencia en el campo (Mauseth, 1979a).

La propagación masiva de cactáceas mexicanas en riesgo de extinción resulta ser una alternativa para su conservación, ésta se puede llevar a cabo por semillas, vástagos, esquejes, injertos y por cultivo de tejidos, según las características de cada especie (Reyes, 1994).

Comúnmente la propagación suele hacerse por medio de semillas o de brotes que surgen de la planta madre, pero los métodos convencionales resultan inadecuados cuando se trata de especies que no producen brotes, o en donde los rangos de germinación son bajos y su crecimiento es demasiado lento (Clayton *et al*, 1990). Asimismo la obtención de semillas puede resultar difícil debido al bajo número de individuos (Mauseth, 1979a).

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) representa una excelente alternativa para el estudio, conservación y propagación masiva de aquellas especies que se encuentran en peligro de extinción (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Rodríguez-

Garay y Rubluo, 1992), ofreciendo la posibilidad de propagar estas especies a una tasa mucho más rápida (Stuppy y Nagl, 1992). Además, el CTV permite la preservación de germoplasma libre de patógenos (Wochok, 1981) y resulta de gran utilidad para la investigación básica, proporcionando modelos para estudios bioquímicos, fisiológicos, anatómicos, así como, de genética molecular (Olguín, 1994). Así, las aplicaciones de las técnicas de CTV van desde el mejoramiento de plantas (alimenticias y ornamentales), propagación masiva, hibridación somática, ingeniería genética para el mejoramiento de cultivos vegetales, biosíntesis de productos secundarios hasta el estudio de aspectos patológicos en plantas (Dodds, 1991). Más de 500 millones de plantas se producen por estas técnicas cada año (Vasil, 1994).

Estas técnicas consisten en cultivar sobre un medio nutritivo, en condiciones asépticas, cualquier estructura vegetal como semillas, embriones, órganos, tejidos, células y/o protoplastos (Pierik, 1990). En general, existen dos procesos morfogénéticos básicos para lograr la multiplicación *in vitro*: a) producción de brotes múltiples a partir de meristemos existentes o de brotes que surgen de meristemos *de novo* a partir de la formación de un callo o sin mediación de éste y b) a partir de la formación de embriones somáticos por vía directa o indirecta (Stuppy y Nagl, 1992).

Las técnicas de Cultivos de Tejidos pueden superar algunas de las dificultades asociadas a la propagación convencional de especies "raras" de cactáceas (Clayton *et al.*, 1990).

Entre las especies más apreciadas, interesantes y por desgracia amenazadas pero poco estudiadas se encuentran todas las especies del género

*Ariocarpus* y entre ellas *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum.. Esta especie es endémica de México y presenta una distribución desde el oeste de Saltillo, Coahuila hacia el sur en el estado de Querétaro (Anderson, 1965).

En marzo de 1992 fue incluido todo el género *Ariocarpus* en el Apéndice I de CITES por su crítica situación. Las especies que se agregaron en ese año fueron *A.kotschoubeyanus*, *A.fissuratus*, *A. retusus* y *A. bravoanus* (Hunt, 1992; Sajeva y Orlando, 1992 citados por Olguín, 1994). Asimismo, todas las especies del género se encuentran en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, bajo diferentes categorías, en donde *A. kotschoubeyanus* aparece como especie amenazada (Anónimo, 1994) ( Lámina 1.A).

## II. ANTECEDENTES

### CARACTERISTICAS DE *Ariocarpus*

Clasificación Botánica (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991)

REINO	Vegetal
DIVISION	Embryophyta
SUBDIVISION	Angiospermae
CLASE	Dicotyledonae
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Cactoideae
TRIBU	Cacteeae
SUBTRIBU	Thelocactinae
LINEA	Strombocacti
GENERO	<i>Ariocarpus</i>
SUBGENERO	<i>Roseocactus</i>
ESPECIE	<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>

Sinónimos: *Anhalonium kotschoubeyanum* Lem.

*Roseocactus kotschoubeyanus* (Lem.) Berger.

Nombre vulgar: Pezuña de venado, pata de venado, peyote cimarrón, chaute.

El nombre del género proviene del término *Ario*, fruto similar al de "Aria" (*Pyrus*) y de *carpus*, fruto. El epíteto *kotschoubeyanus* deriva del nombre del príncipe Kotschoubeyi, miembro de la realeza Rusa (Anderson, 1965).

**Historia:** En 1840, el botánico alemán Wilhelm Karwinsky von Karvin "Barón Karwinsky" la introdujo a Europa y regaló tres ejemplares a su protector el príncipe Kotschoubeyi.

## DESCRIPCION BOTANICA

*Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum.

in Engler et Prantl, Pflanzenf. Nachtr. 259, 1897

Planta simple, tallo sin espinas de color verde olivo o grisáceo, casi enterrado, con la porción aérea apenas emergiendo de la superficie del suelo, de unos 7 cm de diámetro; porción subterránea ampliamente napiforme, casi globosa, gruesa y carnosa, con algunas raíces gruesas y fibrosas. **Tubérculos** triangulares dispuestos en 5 y 8 series espiraladas, aquillados dorsalmente, con la superficie ventral aplanada y rugosa, agudos, relativamente pequeños para el género, casi tan largos como anchos, de 5 a 13 mm de longitud y 3 a 10 de anchura, llevando un surco longitudinal medio desde la punta hasta la base del tubérculo, lanoso; **Areolas** floríferas situadas en el surco areolar en la base de los tubérculos, provistas de abundantes tricomas largos y sedosos. **Flores** brotando de las areolas floríferas de los tubérculos jóvenes en el ápice del tallo, de 2.5 a 3 cm de longitud; pericarpelo y receptáculo desnudos; segmentos exteriores del perianto escasos, obtusos, verdosos con tinte castaño; segmentos interiores del perianto oblanceolados, obtusos o apiculados, a veces algo retusos, de cerca de 2 cm de longitud, de color rosa claro hasta carmín con la franja media más oscura; filamentos blancos; anteras pequeñas, amarillas; granos de polen entre 60 a 65 micras de diámetro; estilo blanco; lóbulos del estigma 4 a 6 blancos. **Fruto**

claviforme, de 5 a 18 mm de longitud y 1 a 3 mm de diámetro, rojizo hasta rosado.  
**Semillas** de 1mm de longitud, ovoides, negras, tuberculadas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

#### DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y ABUNDANCIA

Presenta una amplia distribución en México desde el oeste de Saltillo, Coahuila hacia el Sur en el estado de Querétaro; Moeller-Villar (1993) la reporta en la parte sureste del estado de Coahuila en La Sierra Paila; cubriendo una distancia de más de 600 km que incluye a los estados de San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León y Tamaulipas, en altitudes de 122 m. El conteo del número de individuos de las poblaciones actuales resulta extremadamente difícil, debido a que las plantas se encuentran muy escondidas, mimetizadas en su ambiente (Anderson *et al*, 1994).

#### DESCRIPCION DEL HABITAT

*A. kotschoubeyanus* se encuentra en el matorral xerófilo, dentro y en los márgenes de la comunidad vegetal conocida como el Desierto de Chihuahua (Henrickson y Strow, 1976 citado por Anderson *et al*, 1994). Se encuentra creciendo en planicies y colinas bajas, ya sea en suelos calcáreos y pedregosos o arcillosos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991), los cuales están esparcidos por toda la región. Algunas de estas zonas sufren inundaciones periódicas durante la temporada de lluvias en el verano, pero la raíz napiforme, carnosa y profunda le provee de un fuerte anclaje, así como de un buen almacenamiento de agua y nutrientes para mantener a la planta durante la época de sequía. Entre las plantas

asociadas a estas planicies se encuentran: *Larrea tridentata*, *Prosopis glandulosa*, *Lophophora williamsii*, *Echinocactus horizontalis* (Anderson et al, 1994). *Echinocereus delaetii*, *E. pentalophus*, *Grusonia braditana*, *Agave lechuguilla*, *Fouquieria splendens* (Moeller-Villar, 1993).

## USOS

Existe una demanda de varias especies de cactáceas debido a su uso tradicional medicinal, entre las que se encuentra *A. kotschoubeyanus*, que es usada como remedio para el dolor (Oldfield, 1997; Glass, 1997).

El cuerpo de la planta de todas las especies del género *Ariocarpus* contiene un sistema extenso de canales de mucilago y grandes reservorios centrales, lo cual es probablemente una característica única de este género (Anderson, 1960). Debido a esta característica peculiar, a todo el género se le conoce como "chauté", que significa pegamento, y que mana abundantemente de cualquier ligera herida (Glass y Foster, 1974). Este mucilago de calidad fina presente en *A. kotschoubeyanus* es usado como pegamento en la reparación de cerámica por algunos indígenas en México (Gibson y Nobel, 1990).

## SITUACION ACTUAL

Anderson et al. (1994) determinaron la existencia de serias amenazas para algunas poblaciones locales de esta especie debidas principalmente a actividades humanas. Tales como el desarrollo de la agricultura en las planicies donde habita la especie. Existen amplias zonas de cultivo en estos habitats en los estados de San Luis Potosí, Tamaulipas y Querétaro, en donde esta especie se ha visto

afectada (Oldfield, 1997). Aunado a esto, la expansión urbana y los vertederos de basura en sitios cercanos a los poblados son otra severa amenaza. La colecta ilegal de especímenes de *Ariocarpus kotschoubeyanus* para cubrir la demanda horticultural aún continúa siendo un gran problema, ya que desde hace tiempo, esta especie ha sido muy popular entre los coleccionistas debido a su tamaño y forma tan peculiar. Además de que florece fácilmente en cultivo lo cual incrementa su atractivo. Como todas las especies del género *Ariocarpus*, es de lento crecimiento a partir de semillas. Es por eso que la mayoría de las plantas dentro del comercio de cactáceas son colectadas directamente del campo (Anderson *et al*, 1994).

#### CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

La notable variedad de reproducción vegetativa que existe de manera natural, refleja el impresionante potencial que presentan las plantas para multiplicarse. Esta capacidad natural de reproducirse a sí mismas por métodos asexuales es la base para la multiplicación *in vitro* o Cultivo de Tejidos Vegetales. La clonación de plantas es una actividad que ha sido practicada quizá desde que el hombre ha cultivado plantas (Kyte, 1987).

El cultivo de tejidos es esencialmente otro método de clonación, pero difiere de los métodos tradicionales en que permite rangos mucho más rápidos y numerosos de multiplicación de plantas (Murashige, 1978).

Haberland en 1898 (publicado en 1902) fue el primero en intentar el cultivo sistemático *in vitro* de células somáticas de plantas superiores, a fin de tratar de determinar los requerimientos para el desarrollo óptimo de diferentes tipos

celulares (Höxtermann, 1997). Él planteó la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de una célula única. Pero no fue sino hasta medio siglo después que fue posible la regeneración de plantas completas a partir del cultivo de células aisladas (Dodds, 1991).

Existen dos vías morfogenéticas con dos modalidades a partir de las cuales pueden regenerarse plantas nuevas *in vitro*: a) organogénesis directa a partir de meristemos existentes e indirecta a partir de meristemos *de novo* pasando por una etapa de callo o por vía directa sin mediación de callo y b) embriogénesis a partir de la formación de embriones somáticos por vía directa y por mediación de callo. La organogénesis *de novo* en cultivo de tejidos *in vitro* está asociada con divisiones celulares localizadas en direcciones específicas y con la formación de centros bien definidos de actividad meristemática en los futuros sitios del desarrollo de los brotes (Thorpe y Kumar, 1993). En los eventos tempranos de la organogénesis *de novo* existen diferentes fases:

1. logro de competencia (comparable a la dediferenciación, no necesariamente involucra la proliferación de células para producir tejido de callo desorganizado) o fase de pre-inducción
2. fase de inducción o determinación
3. fase de expresión o de post-iniciación.

La respuesta de los tejidos a los reguladores de crecimiento puede ser diferente en cada fase. Una vez que las células son competentes, pueden ser inducidas a seguir una ruta morfogenética determinada. Esta inducción puede ser alcanzada por estímulos externos, tales como reguladores de crecimiento en el medio y/o un

balance entre los niveles endógenos y exógenos de las hormonas (Thorpe y Kumar, 1993).

Thorpe (1980) reconoce por lo menos tres requerimientos fisiológicos: a) dediferenciación celular, b) interacciones celulares y c) reacción a señales específicas. Los eventos que favorecen la formación de brotes están precedidos por cambios bioquímicos y biofísicos que resultan de la activación selectiva de genes (Thorpe y Kumar, 1993).

Para que pueda expresarse la totipotencialidad de las células de las plantas, se requiere que las células de los tejidos sean liberadas de las restricciones físicas y químicas impuestas por el organismo completo; que sean sujetas a estímulos químicos que las liberen del estado latente hacia un estado de crecimiento activo; y que se les provea de los estímulos adecuados que les permitan mostrar su potencial morfogénico (Sharp *et al*, 1979).

El CTV ha sido aplicado a aspectos tan diversos como: mejoramiento de plantas de interés alimenticio, horticultural, medicinal y forestal (George y Sherrington, 1984), propagación masiva de plantas, hibridación somática, ingeniería genética, biosíntesis de productos secundarios de las plantas, así como para propósitos de conservación (Dodds, 1991), preservando genomas individuales únicos y específicos (NG y NG, 1991). La aplicación de estas técnicas favorecen la obtención de plantas libres de patógenos, resultando en un mejoramiento en el vigor y la calidad de las plantas (Murashige, 1978).

Para fines de conservación es recomendable mantener la fidelidad genética, por lo que las plantas que derivan del desarrollo de meristemos preexistentes resultan adecuadas pues se les considera que son genéticamente

estables (Murashige, 1974; Hu y Wang, 1983). Mientras que cuando interviene una fase de callo (Fay y Gratton, 1992), existe la posibilidad de que ocurra lo que se conoce como variación somaclonal (Dodds, 1991), esto es, que los cultivos de células desorganizadas y de algunas estructuras organizadas pueden acumular células que hayan cambiado genéticamente. Esto puede causar que las características del cultivo se vean alteradas y puede significar que algunas plantas regeneradas a partir de estos cultivos no sean "idénticas" a las que les dieron origen (plantas madres), es decir, no son clones (George y Sherrington, 1984). Aunque para fines de conservación no es recomendable el uso de organogénesis indirecta como vía de regeneración (Dodds, 1991), en ciertas ocasiones, con plantas que se encuentran en una situación genética crítica de escasa variabilidad genética, la variación somaclonal puede resultar como una herramienta importante que incorpore una nueva variación que permita a la especie adaptarse a las condiciones del medio ambiente y sobrevivir (Sharp *et al.*, 1980)(Bramwell, 1990; Jacobsen y Dohmen, 1990 citados por Fay, 1994).

## CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN CACTACEAS

### ORGANOGENESIS

King (1957) reportó el primer intento exitoso para cultivar fragmentos de tallos de cactáceas, logrando promover la formación de callo en diferentes especies (Starling y Dodds, 1983; Vyskot y Jara, 1984). En un estudio sobre metabolitos secundarios, Steinhart (1962) logró obtener la formación de callo en *Trichocereus spachianus*, para estudiar la biosíntesis de alcaloides (Johnson y Emino, 1979a; Hubstenberger *et al.*, 1992). Minocha y Mehra (1974) obtuvieron la

formación de callo a partir de explantes de tallos y órganos florales de *Mammillaria prolifera* (*Neomammillaria*). Pero no fue sino hasta 1976 en que se reportó el primer resultado exitoso en la obtención de plantas de cactáceas por cultivo *in vitro*, este fue con *Mammillaria woodsii* (Kolar *et al*, 1976 citados por Vyskot y Jara, 1984; Hubstenberger *et al*, 1992). El primer reporte de organogénesis directa fue el de Mauseth (1979a) quien logró inducir la formación de brotes en 10 especies a partir de areolas cultivadas en presencia de BAP (1.0-10 mg/l).

No obstante el gran interés ecológico, comercial y de investigación que existe sobre el género *Ariocarpus*, son pocos los reportes que existen sobre su cultivo *in vitro*. Krulik (1980) cultivó secciones de tallo de *A. scaphiostriis* en medio MS, la única respuesta que reportó es la formación de callo y no se especifican los reguladores de crecimiento empleados ni sus concentraciones. Starling (1985) cultivó ápices de *A. trigonus* en medio MS, adicionado con BAP y ANA y eventualmente obtuvo brotes. Para *A. retusus* existen dos reportes, uno sobre la regeneración de plántulas vía embriogénesis somática (Stuppy y Nagl, 1992) y el de Olguín (1994), que reportó la obtención de plántulas a partir de organogénesis así como por embriogénesis somática.

## EMBRIOGENESIS SOMATICA

Los primeros cultivos de "embriones vegetativos" estaban enfocados hacia el estudio del comportamiento morfogénico y fisiológico de órganos aislados y los requerimientos nutricionales y ambientales para la regeneración completa y crecimiento normal (Höxtermann, 1997). Steward *et al* (1958) y Reinert (1959) fueron los primeros en reportar la iniciación y el desarrollo de embriones somáticos

*in vitro* en cultivos de zanahoria (*Daucus carota*) (Dodds y Roberts, 1985; Debergh, 1989; Vasil, 1994). A partir de entonces se ha logrado inducir la embriogénesis somática en un gran número de angiospermas (Ammirato, 1983). LaRue (1948) reportó la presencia de pequeñas plántulas en cultivos de megagametofitos de *Zamia floridana* A. DC. (= *Zamia pumila*) con brote y raíz semejantes a las obtenidas de semillas (Attree y Fowke, 1993). La embriogénesis asexual o somática se refiere al desarrollo de embriones a partir de células somáticas (no gaméticas) (Ammirato, 1983; Debergh, 1989) y por lo tanto potencialmente pueden ser usados para producir duplicados de un genotipo (Gray y Purohit, 1991). El desarrollo de los embriones somáticos es similar al de los embriones cigóticos a lo largo de casi toda la embriogénesis, sin embargo, difieren en cuanto a la fase de iniciación y en los eventos de la embriogénesis tardía (Chasan y Walbot, 1993). Las células embriogénicas que forman los embriones somáticos, son vistas como no determinadas; su compromiso hacia una ruta particular de desarrollo está fuertemente influenciada por factores ambientales y su comportamiento se apegan a principios de expresión diferencial de genes (Carman, 1990). Por lo tanto, se requiere de la inducción de competencia embriogénica en células que de manera natural no lo son (Dodeman *et al.*, 1997). La formación de embriones somáticos puede inducirse a partir de una variedad de explantes, incluyendo embriones inmaduros e inflorescencias, embriones maduros, ápices de tallos, así como meristemos intercalares y hojas jóvenes. La frecuencia de inducción depende de la fuente de explante, el estado o la condición fisiológica del explante y el genotipo (Carman, 1995). De acuerdo con Kohlenbach (1978), los embriones somáticos pueden surgir *in vitro* de tres diferentes fuentes

de células diploides cultivadas: 1. Células vegetativas de plantas maduras; 2. Tejidos reproductivos distintos del cigoto; 3. Hipocótilos y cotiledones de embriones y plántulas jóvenes sin la intervención de callo (Dodds y Roberts, 1985).

La embriogénesis somática puede ocurrir por vía directa, sin la intervención de una fase de callo, a partir de células "pre-embriogénicas" determinadas que han sufrido un arresto mitótico (Sharp *et al.*, 1980), que están programadas para la diferenciación embriogénica (Krikorian *et al.*, 1995), y requieren tan sólo de la síntesis de una sustancia promotora o la eliminación de una sustancia inhibidora para reanudar la actividad mitótica y el desarrollo embriogénico (Sharp *et al.*, 1980). Esta vía puede proveer una opción para la clonación fiel de plantas ya que la posibilidad de que ocurran alteraciones genéticas está reducida (Krikorian *et al.*, 1982).

La vía indirecta requiere de una fase previa de formación de callo, en donde los embriones somáticos se originan a partir de "células embriogénicas inducidas" dentro de ese callo (Sharp *et al.*, 1980). Estas células requieren entrar a un nuevo ciclo mitótico en el que son removidas las histonas que cubrían o impedían la expresión de genes necesarios para lograr la condición embriogénica.

Los embriones somáticos son estructuralmente similares a los embriones cigóticos que se encuentran en las semillas y poseen la capacidad de desarrollarse en plantas completas al germinar, sin necesidad de pasar por las fases separadas de formación de brotes y posterior enraizamiento (Gray y Purohit, 1991).

## EMBRIOGENESIS SOMATICA EN CACTACEAS

Hasta la fecha se conocen solamente siete especies de cactáceas en donde se ha logrado inducir la embriogénesis somática *in vitro*. El primer reporte fue el de Minocha y Mehra (1974), quienes describieron la formación de estructuras nodulares de color amarillo en explantes de *Neomammillaria prolifera* en medio MS en presencia de KIN (1 mg/l) con 2,4-D (10 mg/l) adicionado con agua de coco; Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) para *Aztekium ritteri* describieron "estructuras parecidas a embriones somáticos" en presencia de KIN (2 mg/l) y 2,4-D (2 mg/l); Infante (1992) logró inducir la formación de embriones somáticos en *Mediocactus coccineus* en medio MS adicionado con ANA (0.5-1 mg/l); Torrez-Muñoz y Rodríguez-Garay (1996) reportaron la formación de embriones somáticos en *Turbinicarpus pseudomacrolele*; Marín (1998) tuvo éxito en la inducción de etapas tempranas de embriones somáticos a partir de callo de *Mammillaria san-angelensis* adicionando 2,4-D (4 mg/l) con kinetina (2 mg/l) a medio B5 modificado por Norstog y Rhamstine (1962); Barrera (1998) obtuvo la producción masiva de embriones somáticos en *Obregonia denegrii*, a partir de meristemas apicales sometidos a combinaciones de BAP y ANA; para el género *Ariocarpus* existen dos reportes sobre *A. retusus*, el de Stuppy y Nagl (1992) quienes utilizaron agua de coco para promover esta respuesta y el de Olguín (1994) que obtuvo la formación de embriones somáticos en presencia de BAP (0.5 mg/l) con ANA (0.1 mg/l) y el desarrollo de una plántula en invernadero. Únicamente en *Neomammillaria prolifera*, *T. pseudomacrolele*, *A. retusus* y *Obregonia denegrii* fue posible la germinación de los embriones somáticos logrando regenerar plantas completas.

### III. OBJETIVOS

#### General

Establecer las condiciones experimentales para lograr la regeneración *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus*.

#### Particulares

Explorar el potencial morfogénico de tubérculos de plántulas germinadas *in vitro*.

Determinar los requerimientos de reguladores del crecimiento promotores del desarrollo de brotes y/o embriones somáticos.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

Tres lotes de semillas de *A. kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. donadas por el Area de Colecciones del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, se desinfectaron superficialmente previo a su siembra, para lograr su germinación *in vitro*, de acuerdo a los siguientes pasos:

Se lavaron en agitación constante en una solución de detergente comercial durante 15 minutos. Después de ser enjuagadas con agua destilada y esterilizada, se sumergieron en ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) en continuo movimiento durante 2 minutos para escarificarlas. Nuevamente se lavaron con agua destilada y esterilizada y se agitaron en alcohol etílico industrial al 70% (v/v) durante 1 minuto. Finalmente, se desinfectaron con una solución de blanqueador comercial (6% de cloro activo) al 30% (v/v) adicionado con 2 gotas/100 ml de Tween 80 durante 30 minutos en agitación constante.

Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se enjuagaron tres veces en agua destilada y esterilizada. Las semillas desinfectadas se sembraron en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad con 25 ml de medio, fueron colocadas cuatro semillas por frasco, el medio empleado fue MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30g/l, el pH se ajustó a 5.7 con HCl y/o NaOH 0.1N previo a la adición de Agar-Agar 5.5 g/l, fue esterilizado por autoclave a 120°C y a una presión de 1.5 kg/cm<sup>2</sup> durante 17 minutos.

#### CULTIVOS

Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas, con una temperatura de 26±2°C, fotoperíodo de 16 horas y una intensidad de 29.29  $\mu Es^{-1}m^{-2}$  (PAR 50  $\mu Mol/m^2/s$ ).

El porcentaje de germinación de las semillas se registró cada 15 días.

## EXPLANTES

Tubérculos (2-7mm longitud) de las plántulas germinadas *in vitro* fueron disectados desde su base y sembrados en medio de inducción MS con reguladores de crecimiento BAP/ANA y KIN/2,4-D. Se procuró dañar lo menos posible a las plántulas, para que éstas continuaran su desarrollo y pudieran formar más tubérculos, por lo que cada dos meses fueron subcultivadas a medio MS fresco.

## INDUCCION

Para tratar de inducir respuestas morfogenéticas se utilizó el medio MS adicionado con BAP (0, 1, 2, 3, 5 mg/l) en combinación con ANA (0, 0.1, 0.5, 1 mg/l) y KIN (0, 1, 2, 3, 5 mg/l) en combinación con 2,4-D (0, 0.1, 0.5, 1 mg/l) (Tabla 1).

De acuerdo al material biológico disponible, se sembraron dos explantes por frasco con tres repeticiones para cada tratamiento.

Se llevaron a cabo observaciones semanales registrando diferentes respuestas como la formación de callo, raíces, brotes directos y/o indirectos, así como la formación de embriones somáticos.

Tabla 1. Combinaciones de reguladores de crecimiento: a) BAP/ANA y b) KIN/2,4-D adicionados a medio MS para la inducción de respuestas morfogénicas en tubérculos de plántulas de *A. kotschoubeyanus* germinadas *in vitro*.

a)

BAP/ANA (mg/l)	0	1	2	3	5
0	1	2	3	4	5
0.1	6	7	8	9	10
0.5	11	12	13	14	15
1.0	16	17	18	19	20

b)

KIN/2,4-D (mg/l)	0	1	2	3	5
0	1	2	3	4	5
0.1	6	7	8	9	10
0.5	11	12	13	14	15
1.0	16	17	18	19	20

## DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Después de nueve semanas en el medio de inducción, los explantes se subcultivaron a medio MS basal. La cantidad de Agar se aumentó a 6 g/l para tratar de evitar la hiperhidratación de los brotes. Cada dos meses se subcultivaron

todos los explantes (tejidos) a medio MS fresco para tratar de promover el desarrollo y maduración de los brotes regenerados.

#### ENRAIZAMIENTO

Cuando los brotes nuevos alcanzaron una altura de 0.5-1.5cm, se individualizaron y subcultivaron a diferentes medios para tratar de inducir la formación de raíces. Fueron ensayados los siguientes medios:

MS y MS50 con y sin carbón activado 1 g/l, con tapa de polipropileno y con "suncaps". Adicionados con Agar 6 g/l. Se ensayó con brotes disectados y sembrados directamente, así como con brotes sometidos a tres días de secado en condiciones de baja intensidad luminosa en envases esterilizados y cubiertos con tapas de polipropileno.

#### APLICACIÓN DE PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Empleando los valores promedio de la producción de brotes regenerados por vía organogénesis directa y/o indirecta para cada uno de los 20 tratamientos con BAP/ANA, se hizo un ajuste para una distribución Poisson, estos datos fueron capturados en un paquete estadístico de software GLIM (Crawley, 1996) y a los datos se les aplicó la prueba de ANOVA de una sola vía utilizando el software Statgraphics, tomando como niveles de tratamiento a cada promedio de brotes de los 20 tratamientos. Finalmente se hizo una prueba de mínima diferencia significativa a fin de determinar en qué tratamientos estaban las diferencias.

#### ESTUDIO HISTOLOGICO DE EMBRIONES SOMATICOS

Estructuras nodulares de aspecto embriogénico se sometieron a procesamiento histológico para tratar de definir su identidad.

## FIJACION

Secciones de callo embriogénico de 0.5-1.0cm<sup>2</sup> fueron fijados con Navashin (Apéndice I) (Sass, 1961) en viales de 20 ml de capacidad durante 24 horas en agitación constante.

## DESHIDRATACION (con alcoholes graduales)

Una vez fijado el tejido se removió toda el agua de éste, reemplazándola con un líquido soluble en parafina. Se colocó el tejido en las siguientes soluciones de alcohol terbutílico TBA (Apéndice II) al 30, 50 y 70 % durante 2 horas respectivamente y posteriormente al 85, 95 y 100% durante 3, 24 y 5 horas respectivamente, seguidos de tres cambios de TBA puro 5, 24 y 2 horas respectivamente.

## INFILTRACION

La parafina se derritió lentamente y el TBA se evaporó, de tal manera que la transición de TBA a parafina pura fue gradual.

Durante intervalos de una hora se fueron agregando de una a dos pequeñas hojuelas de parafina en los viales tapados y colocados en el horno a 58-60°C. Cuando la parafina cubrió completamente el tejido (aprox. 7 horas) se propició la evaporación del TBA retirando las tapas de los viales, se agregó una hojuela de parafina cada media hora (durante 7-8 hrs ). Después permanecieron así 24 horas, transcurridas las cuales, y evaporado ya todo el alcohol, se retiró la parafina reemplazándola con parafina fundida nueva (dejándolo 48 hrs). Se virtió parafina fundida en pequeños recipientes de papel de unos 2x2.5cm<sup>2</sup> en los cuales se colocó el tejido cuidadosamente y se dejó enfriar.

## CORTES

Una vez sólidos los bloques, se montaron en bases de madera cortando el exceso de parafina alrededor del tejido y se realizaron cortes de 10-20 micras de espesor en un microtomo de rotación

Los listones obtenidos se colocaron sobre un baño de flotación en un cristalizador con agua a 23-25 °C y grenetina disuelta en su superficie, una vez extendidas las secciones, se recuperaron con un portaobjetos y se adhirieron a él a través de la evaporación del agua y secado durante 24 horas de las mismas.

## DESPARAFINACION

Se colocaron los portaobjetos de manera vertical en una canastilla de metal y se sumergieron en xilol durante 30 minutos seguido de un cambio en xilol:alcohol (1:1) por 30 minutos.

## REHIDRATACION

Se sumergió la canastilla con los portaobjetos durante 20 min en cada una de las siguientes soluciones: alcohol absoluto, alcohol al 95%, 70%, 50% y 30%.

## TINCION

Las preparaciones se tiñeron con safranina "O" al 1% (Apéndice III) durante una hora y media, después se lavó el exceso de colorante con agua corriente enjuagando varias veces y se dejaron secar 24 horas. Posteriormente, se deshidrataron con alcoholes graduales realizando dos cambios de alcohol al 30, 50, 70 y 95%, 2 minutos en cada uno. Durante este proceso se eliminó el exceso de safranina del tejido.

Se escurrió el excedente de alcohol al 95% y se cubrió el tejido con unas gotas de verde rápido alcohólico (Apéndice IV) para contrastar la tinción, el tiempo

se determinó experimentalmente, se probó con 2, 3 y 10 minutos, después se enjuagó con alcohol absoluto y con este mismo se aplicaron dos baños de 1 min cada uno, se escurrió el alcohol y se cubrió el tejido con aceite de clavo como agente mordente para lograr un realce de tonos, por 10 minutos, después se enjuagó con xilol y se bañó con este mismo dos veces por un minuto cada uno, se escurrió sin dejar secar para evitar que el tejido se hidratara con la humedad del ambiente. Finalmente se realizaron preparaciones permanentes con resina sintética.

Se colocaron las preparaciones por tres días en el horno a 58-60°C. Después se limpió el exceso de resina con xilol y se realizaron observaciones al microscopio.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### GERMINACION DE SEMILLAS

Las superficies de las plantas contienen un gran número de agentes microbianos contaminantes. La completa remoción de dichos contaminantes es un factor muy importante que determinará el éxito del establecimiento de los cultivos (NG y NG, 1991). El uso de semillas para iniciar los cultivos resulta muy conveniente pues tras una esterilización superficial pueden germinarse bajo condiciones asépticas *in vitro* y se obtienen plántulas libres de contaminación microbiana (bacterias y esporas de hongos) (George y Sherrington, 1984), y resultan ser una excelente fuente de obtención de explantes asépticos (Ault y Blackmon, 1987; Havel y Kolar, 1983; Molphe *et al*, 1998). Los problemas de contaminación son más frecuentes cuando se ensayan partes de plantas adultas como fuentes de explantes, debido a que en los dobleces del tejido pueden quedar agentes microbianos (Johnson y Emino, 1979a; Havel y Kolar, 1983; Ault y Blackmon, 1987). Además, cuando la propagación tiene fines de conservación, para maximizar la diversidad genética de las plantas producidas por técnicas de cultivo *in vitro*, el material preferido para la iniciación de los cultivos son las semillas (Fay y Gratton, 1992 y Fay, 1994).

Para *A. kotschoubeyanus*, en el primer y segundo lote se logró un 74 y 90% de germinación respectivamente en lapsos de 8-75 y 8-30 días, mientras que en el tercer lote, en donde se presentaron problemas de contaminación interna de las semillas por hongos, lo que ocasionó la pérdida de algunas de ellas, sólo se logró un 41% de germinación entre 10-45 días (Fig. 1). Gutiérrez (com pers.) obtuvo 75-80% de germinación en un lapso de 8-30 días con semillas de *A.*

*kotschoubeyanus* de un año de edad, sembradas en condiciones de invernadero. El porcentaje obtenido en el primer lote del presente trabajo parece coincidir con este rango mientras que el segundo lote lo supera. Sin que esto sea una conclusión, bajo condiciones *in vitro* se alcanzó un mayor porcentaje de germinación que por métodos convencionales. No se pudieron obtener datos exactos de la edad de las semillas de ninguno de los lotes, pero las semillas del tercer lote tenían más tiempo de almacenamiento que los dos primeros, los resultados parecen indicar que con el tiempo, la viabilidad de las mismas puede decrecer. Algunos mecanismos de latencia y longevidad de las semillas son factores que posiblemente tienen mayor influencia en la tasa de germinación, esto hace evidentes posibles estrategias que presentan las especies en la deposición de un banco permanente o temporal en el suelo, mostrando las posibles relaciones que guardan los frutos que permanecen en la planta y/o la ontogenia de las semillas con el rompimiento de la latencia (Guzmán y Dávila, 1997). Hubstenberger *et al* (1992) mencionan que las semillas de las cactáceas pueden exhibir varios grados de latencia y germinar a lo largo de muchos años, asegurando que en el hábitat permanezcan semillas viables por largos periodos de tiempo. Sin embargo, no es recomendable almacenar semillas de cactáceas por más de 3-4 años antes de procurar su germinación (Cattabriga, 1994).

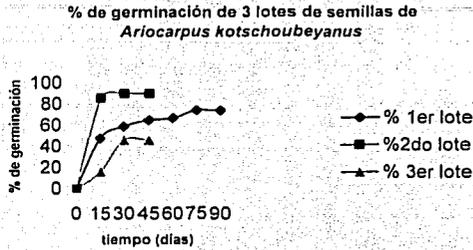


Figura 1. Porcentaje de germinación en relación al tiempo, de tres lotes de semillas de *A. kotschoubeyanus* bajo condiciones *in vitro*.

Clarke (1994) menciona tiempos de germinación para algunas especies del género *Ariocarpus*, como por ejemplo *A. agavoides* con 15-23 días, *A. fissuratus* con 11-55 días y para *A. retusus* de 11-45 días. Cabe mencionar que Olguín (1994) logró un 66.3% de germinación de semillas de *A. retusus* bajo condiciones *in vitro* en 5-50 días. Raya y Nava-Cedillo (1997) reportan la germinación bajo condiciones *ex vitro* de *A. agavoides* en un período de 10-23 días y en *A. retusus* de 11-40 días, tiempos que coinciden con los reportados por Clarke (1994).

El desarrollo de las plántulas de *A. kotschoubeyanus* fue similar al descrito por Olguín (1994) para *A. retusus*, a diferencia de que en *A. kotschoubeyanus* la aparición de los primeros tubérculos ocurrió hasta la cuarta semana aproximadamente, mientras que en *A. retusus* emergieron después de tres semanas.

Tradicionalmente las cactáceas son propagadas por métodos convencionales que emplean: semillas, vástagos, esquejes, injertos, que pueden presentar ciertas dificultades (Reyes, 1994), además de que no en todos los

géneros es posible llevarlas a cabo. Las plántulas de los cactus tienden a presentar niveles lentos de crecimiento y son altamente vulnerables a la desecación. En contraste, el desarrollo de las plántulas *in vitro* puede ser más rápido en comparación con las semillas germinadas en invernadero (Mauseth, 1979a).

Algunas cactáceas producen muchos vástagos que pueden ser individualizados y desarrollar raíces o pueden ser enraizados fácilmente a partir de esquejes, pero en muchas especies ninguno de estos métodos puede usarse debido a que no presentan la formación de vástagos o la presentan raramente, como por ejemplo en *A. kotschoubeyanus*, y la propagación debe ser por medio de semillas. Las semillas pueden ser difíciles de conseguir debido a la rareza de las plantas o a que pueden ser estériles.

#### FUENTE DE EXPLANTES (TUBERCULOS)

Al término de 13-15 semanas a partir de la germinación de semillas de *A. kotschoubeyanus in vitro*, las plántulas desarrollaron de 1-2 tubérculos (Lámina 1.B). El uso de tubérculos como fuente de explantes para tratar de inducir respuestas morfogénicas en *A. kotschoubeyanus*, resultó exitoso, pues las plántulas germinadas *in vitro* donadoras de los explantes, continuaron su desarrollo sin evidencias morfológicas adversas, el incremento en tamaño y el surgimiento de nuevos tubérculos tuvo lugar a la misma tasa que en un lote de plántulas germinadas *in vitro* a las que no se les disectó ningún tubérculo como control.

Para las especies que se encuentran amenazadas es importante realizar un muestreo no destructivo de la planta madre, por lo que la escisión de tubérculos completos (o areolas) es un buen método para dañar lo menos posible a las plántulas (Clayton *et al*, 1990).

Es recomendable reiniciar los cultivos periódicamente a partir de plantas madre genéticamente estables a intervalos regulares, evitando así el riesgo de continuar micropropagando plantas que pudieran haber sufrido cierto grado de variación genética (George, 1993). Y es que los cambios cromosómicos y genéticos pueden aumentar y acumularse con el tiempo de cultivo (Evans y Gamborg, 1982 citados por Debergh, 1989).

Es por eso que resulta de gran ventaja el hecho de mantener un lote de plantas de *A. kotschoubeyanus* germinadas *in vitro* de tal manera que puedan ser utilizadas como una fuente permanente de explantes, al disectar los explantes tratando de dañar lo menos posible a las plantas.

Es importante mencionar que entre las ventajas de usar explantes a partir de plántulas germinadas *in vitro*, se encuentra que los tejidos jóvenes presentan una mayor capacidad regenerativa (Vyskot y Jara, 1984). Algunos estudios sugieren que los tejidos que provienen de meiosis reciente (p. ej. anteras, secciones de plántulas) responden mejor con respecto a la regeneración *in vitro*, esto es debido probablemente a que la meiosis elimina ciertas restricciones epigenéticas sobre la regeneración que pueden existir en los tejidos de las plantas adultas (Halperin, 1986 citado por Kumar *et al*, 1998).

El hecho de que no todos los tubérculos respondieron de igual manera en un mismo tratamiento puede explicarse debido a que, no sólo las respuestas

morfogenéticas están influenciadas en gran manera por el genotipo, sino que también los niveles endógenos de las sustancias del crecimiento pueden influir, y esto es evidente cuando se toman explantes de diferentes plantas a distintos tiempos (George y Sherrington, 1984). No todos los tubérculos de *A. kotschoubeyanus* tenían la misma edad al iniciar los cultivos de inducción, y esto fue debido a que la germinación de las semillas ocurrió espaciadamente en un lapso de 8-75 días y las plántulas presentaban edades fisiológicas diferentes, además de que al provenir de diferentes semillas, era de esperarse diferencias por la variación genotípica.

## CALLO

El callo se define como un tejido amorfo y desorganizado, formado por la división vigorosa (activa) de células. Con el estímulo de sustancias de crecimiento endógenas o de reguladores de crecimiento exógenos, el metabolismo celular cambia de quiescente a metabólicamente activo (George y Sherrington, 1984).

A partir de la primera semana en el medio de inducción con reguladores de crecimiento BAP y ANA se manifestó la formación de callo que casi siempre en su etapa inicial fue de un tono amarillo, de aspecto más bien seco y compacto (muy distinto al característico que dio origen a los embriones somáticos que era de aspecto húmedo y con una coloración amarilla intensa) y surgía generalmente en la base de los tubérculos utilizados como explantes, conforme transcurría más tiempo, se tornaba a una condición que podía variar desde un verde claro, friable o hidratado hasta un verde olivo y más bien compacto, en ocasiones con zonas blanquecinas, algunos callos presentaban pequeñas zonas con pigmentación

rosada o rojiza, debidas probablemente a la presencia de betalainas (Molphe *et al*, 1998). En ocasiones, el callo inicial podía ser verde claro y friable. El aumento en volumen de la masa de callo fue más acelerado en general en el callo de color verde claro. Dentro de un mismo tratamiento el callo pudo variar de explante a explante. Y es que el efecto de los reguladores de crecimiento puede estar relacionado con el estado fisiológico del tejido, que puede alterar la sensibilidad del tejido a los reguladores de crecimiento adicionados (Thorpe y Kumar, 1993).

La formación de callo ocurrió en la mayoría de los tratamientos, a excepción del tratamiento control y de aquellos que, aunque presentaban ANA, carecían de BAP (tratamientos 6, 11 y 16). Esto no coincide con lo reportado por Molphe *et al* (1998), quienes mencionan que el crecimiento de callo para diferentes especies de cactáceas fue más evidente en presencia de ANA.

Por lo general se requiere de la incorporación de alguna auxina al medio para promover la formación de callo en los explantes. En muchas ocasiones se adiciona alguna citocinina al medio además de la auxina, para inducir el crecimiento de callo en explantes de dicotiledóneas (George, 1993).

## ORGANOGENESIS

### ORGANOGENESIS DIRECTA

Los tratamientos de KIN/2,4-D solo se trataron en la sección de embriogénesis somática, pues la producción de brotes ya sea por vía directa o indirecta no fue significativa. Dentro de las primeras respuestas morfogénéticas se registró la organogénesis directa. A partir de la quinta semana con los explantes aún en el medio de inducción, fue evidente la formación de

nuevos tubérculos que surgían de las areolas en los ápices de los tubérculos (explantes), primero se observó un ligero aumento en el diámetro de la areola (1-3 mm) con la consecuente aparición de "tricomas", que resultaba ser el ápice de los nuevos tubérculos que surgían a partir de los meristemos preexistentes, elongándose desde su base (Lámina 1.C). Esto ocurrió a la quinta semana en dos de los explantes del tratamiento 5 con BAP (5 mg/l) en ausencia de ANA, en uno de los explantes del tratamiento 12, BAP (1 mg/l) con ANA (0.5 mg/l) y en un explante del tratamiento 19, BAP (3 mg/l) con ANA (1.0 mg/l). Tras 10 semanas (ya en medio MS sin reguladores de crecimiento), fue mayor el número de explantes que se registraron con esta respuesta (Tabla 2). Tras 15 semanas, el tratamiento 2 con BAP (1 mg/l) en ausencia de auxina, fue el que produjo un mayor número de brotes, pero la  $\bar{x}$  tan baja de 1.17 se explica por el hecho de que fue un solo explante el que respondió formando un total de 7 rosetas (Tabla 3).

Tabla 2. Relación del número de explantes por tratamiento que respondieron con la respuesta de organogénesis directa a la semana 10 y 15 a partir de la inducción con reguladores de crecimiento BAP/ANA.

Tratamiento	BAP/ANA (mg/l)	No. explantes con respuesta (10 semanas)	No. explantes con respuesta (15 semanas)
2	1/0	1	1
3	2/0	1	2
4	3/0	2	2
5	5/0	3	3
7	1/0.1	0	3
10	5/0.5	1	2
12	1/0.5	3	3
13	2/0.5	1	2
14	3/0.5	1	1
17	1/1	2	2
19	3/1	1	1

Tabla 3. Número de brotes regenerados por vía de organogénesis indirecta así como por organogénesis directa para cada tratamiento, a partir de tubérculos de *A. kotschoubeyanus*, mostrando los promedios para cada respuesta con su ES.

O. I. = organogénesis indirecta; O. D. = organogénesis directa; ES = error estándar.

Tratamiento	BAP/ANA (mg/l)	No. total de brotes O. D.	total/6±ES	No. total de brotes O. I.	total/6±ES	TOTAL O. I. + O. D.	tot/6±ES
1	0/0	0	0	0	0	0	0
2	1/0	7	1.17±1.17	37	6.17±6.17	44	7.33±6.042
3	2/0	4	0.67±0.42	8	1.33±0.56	12	2±0.816
4	3/0	6	1±0.68	6	1±0.52	12	2±0.577
5	5/0	4	0.67±0.33	19	3.17±2.04	23	3.83±2.04
6	0/0.1	0	0	0	0	0	0
7	1/0.1	3	0.5±0.34	6	1±1	9	1.5±0.957
8	2/0.1	0	0	12	2±1.37	12	2±1.366
9	3/0.1	0	0	8	1.33±0.67	8	1.33±0.667
10	5/0.1	2	0.33±0.21	2	0.33±0.21	4	0.67±0.333
11	0/0.5	0	0	0	0	0	0
12	1/0.5	3	0.5±0.34	10	1.67±1.67	13	2.17±1.973
13	2/0.5	2	0.33±0.21	5	0.83±0.65	7	1.17±0.654
14	3/0.5	1	0.17±0.17	10	1.67±1.31	11	1.83±1.276
15	5/0.5	0	0	13	2.17±1.38	13	2.17±1.376
16	0/1	0	0	0	0	0	0
17	1/1..	1	0.17±0.17	0	0	1	0.17±0.167
18	2/1.	0	0	0	0	0	0
19	3/1.	3	0.5±0.5	38	6.33±5.57	41	6.83±5.48
20	5/1.	0	0	11	1.83±1.47	11	1.83±1.47

En los tratamientos 3 y 4 con BAP (2 y 3 mg/l), el 33% de los explantes respondió con un promedio de 0.67 y 1 respectivamente, mientras que en los tratamientos 5, BAP (5 mg/l) y 7, BAP (1 mg/l) con ANA (0.1 mg/l), el 50% de los explantes respondieron con un total de 4 y 3 brotes respectivamente (Fig. 2).

**% de explantes que respondieron (O.I y/o O.D)  
tras 15 semanas**

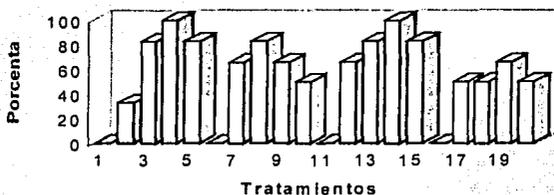


Figura 2. Porcentaje de explantes por tratamiento que respondieron con respuesta morfogénica de organogénesis directa y/o indirecta después de 15 semanas a partir de la inducción.

En términos generales, independientemente de la presencia o ausencia de auxina, la presencia de citocinina estuvo asociada a la respuesta de organogénesis directa.

Se considera que las plantas derivadas por vía de organogénesis directa son genéticamente estables por lo que esta vía es recomendable cuando la propagación tiene fines de conservación (Murashige, 1974; Hu y Wang, 1983).

### ORGANOGENESIS INDIRECTA

La respuesta morfogénica de organogénesis indirecta se observó a partir de la sexta semana (aún en el medio de inducción), siempre en presencia de BAP (1-5 mg/l) ya fuera en ausencia o con bajas o altas concentraciones de ANA (0.1-1.0 mg/l). Estos nuevos tubérculos surgieron a partir de callos que variaban en su aspecto desde compactos de un ligero verde olivo hasta un callo friable verde

claro. A partir de la séptima semana fue posible identificar verdaderas rosetas conformadas por los tubérculos formados *de novo* dispuestos de manera espiralada en torno al surgimiento de los tubérculos más jóvenes, que se reconocieron como brotes, éstos presentaron entre 3-5 tubérculos, con un diámetro que oscilaba entre 0.5-1.0 cm ( Lámina 1. D). Tras 15 semanas, la mayor cantidad de brotes se obtuvo en el tratamiento **19**, BAP (3 mg/l) con ANA (1.0 mg/l), con un total de 38 brotes (Tabla 3), pero sólo el 33% de los explantes mostró esta respuesta morfogenética, seguido del tratamiento **2**, BAP (1 mg/l) con un total de 37 brotes y una respuesta del 16% de los explantes.

En términos generales, se observó la formación de dos tipos de brotes morfológicamente diferentes: brotes de consistencia sólida, de aspecto similar a las plántulas de semillas germinadas *in vitro* (cabe aclarar que en referencia a la parte aérea únicamente) y brotes suaves de apariencia hiperhidratada, verde claro, de crecimiento más rápido, que invariablemente se desorganizaban hacia callo. En general, estos últimos surgían a partir de un callo verde claro de apariencia frías, a veces hidratado, mientras que los primeros provenían de un callo más bien compacto verde olivo. Esto concuerda con lo reportado por Ault y Blackmon (1987) para brotes de *Ferocactus acanthodes*. En *A. kotschoubeyanus* la tasa de crecimiento fue más acelerada para los brotes de consistencia suave pero los otros, aunque tardaban más en diferenciarse a partir del callo y presentaban un crecimiento más lento, lograban consolidarse en su mayoría. En los tratamientos **5** y **20**, BAP (5 mg/l) sólo y en combinación con ANA (1 mg/l), se formaron estructuras similares a brotes pero con una apariencia un tanto asimétrica (anormal). Dodds y Roberts (1985) mencionan que en ocasiones, en

algunos cultivos puede ocurrir un error en la programación del desarrollo para la organogénesis y entonces pueden formarse estructuras anormales.

La consistencia de los brotes se clasificó de la siguiente manera:

Co- compacto (de consistencia sólida)

SCo- semicompacto (que tiende hacia una apariencia suave)

H- hiperhidratado (que tiende a retener agua, con apariencia vítrea)

Re- reventando (revirtiéndose a callo)

La consistencia varió de tratamiento en tratamiento para los brotes regenerados vía organogénesis indirecta, mientras que los brotes de organogénesis directa fueron siempre compactos, de tamaños menores (0.3-0.5 cm de diámetro) que los primeros y de crecimiento más lento.

El subcultivo de todos los explantes tras 9 semanas en el medio de inducción a medio MS con 6 g/l de Agar, a fin de tratar de evitar la hiperhidratación de los brotes, pareció favorecer la consolidación de éstos en algunos tratamientos.

Los factores involucrados en la inducción y el control de la hiperhidratación pueden considerarse bajo las categorías del explante, el medio, el contenedor, la concentración de citocinina y el ambiente. Aumentando la concentración del agente gelificante puede ayudar a evitar este fenómeno (Debergh *et al*, 1992).

El hecho de que la formación de brotes ya sea por vía directa o indirecta tuvo lugar únicamente en presencia de citocinina (BAP) independientemente de la presencia o ausencia de auxina (ANA) puede explicarse porque, además de que las citocininas estimulan la división celular y tienen control sobre la morfogénesis, en los cultivos estos compuestos pueden vencer la dominancia apical y liberar a las yemas laterales del estado latente (a este respecto tienen un efecto contrario al

de las auxinas endógenas) (George, 1993). Esto difiere con lo reportado por Olguín (1994) quien menciona que en *A. retusus*, en ausencia de BAP fue posible promover la formación de brotes con ANA 0.1 y 1 mg/l. Para la propagación de *Sulcorebutia alba*, la presencia de citocinina fue necesaria para inducir la activación areolar (Dabekaussen *et al*, 1991). Como también Mauseth (1979b), Johnson y Emino (1979b) y Escobar *et al* (1986), consideran esencial a la citocinina para el desarrollo de brotes adventicios en cactáceas. Para lograr la regeneración de plantas en especies del género *Echinocereus* y *Ferocactus*, se requirió la adición de auxinas (ANA 1 mg /l) y citocininas (BAP 0.01-0.1 mg/l) al medio (Molphe *et al*, 1998; Ault y Blackmon, 1987), en tanto que para otras especies (p.ej. *Coryphantha clavata*, *Mammillaria craigii*, *M. candida* entre otras) bastó con la adición de citocinina (BAP 1 mg/l) (Molphe *et al.*, 1998).

No todos los explantes respondieron de igual manera dentro de un mismo tratamiento porque entre los factores que afectan la relación entre reguladores de crecimiento exógenos y la respuesta que promueven se pueden mencionar que:

1. La cantidad real agregada dependerá de: errores de medición, el rango y la extensión de absorción, la complejidad y composición del tejido, la distribución de los fluidos en los tejidos y el rango de metabolismo o degradación.
2. La intensidad del efecto o de la respuesta dependerá de: factores genéticos, factores patológicos, variables fisiológicas, interacción con los reguladores de crecimiento endógenos (agonistas/antagonistas), el desarrollo de tolerancia o

sensibilidad, habituación, interacción de los reguladores de crecimiento con receptores (Krikorian *et al*, 1995).

En los tratamientos **4** y **14**, BAP/ANA (3/0 mg/l) y (3/0.5 mg/l) se observó un 100% de explantes que respondieron con respuestas de organogénesis indirecta y/o directa (Fig. 2), con un total de 12 y 11 brotes respectivamente (Fig. 3).

En los tratamientos **4**, **9** y **19**, con 3 mg/l de BAP sólo o en combinación con ANA (0.1-1.0 mg/l) respondió el 50-100% de los explantes con organogénesis indirecta y/o directa. El número de brotes se incrementó con el aumento de la concentración de auxina, pero en el tratamiento **4**, BAP (3 mg/l) se observaron los brotes mejor consolidados. En términos generales, los promedios más altos para la producción de brotes de *A. kotschoubeyanus* por vía organogénesis directa y/o indirecta fueron: 7.33 con un 33% de respuesta de los explantes en el tratamiento **2**, BAP (1 mg/l); 6.83 con un 50% de respuesta en el tratamiento **19**, BAP (3 mg/l) con ANA (1 mg/l); 3.83 con un 66% de respuesta en el tratamiento **5**, BAP (5 mg/l) (Tabla 3).

**Promedio de producción de brotes por trat.(BAP/ANA)mg/l (tras 15 semanas)**

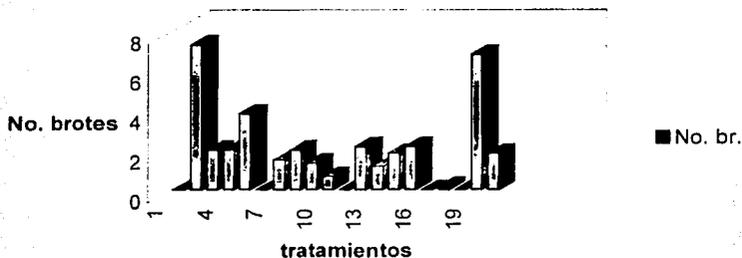


Figura 3. Relación entre los diferentes tratamientos con combinaciones de reguladores de crecimiento BAP/ANA y el promedio de brotes regenerados por vía organogénesis directa y/o indirecta 15 semanas después de la inducción.

En cuanto a los resultados de la mínima diferencia significativa, los tratamientos que se diferenciaron estadísticamente de los demás ( $p < 0.05$ ) fueron el 2, BAP (1 mg/l) y el 19, BAP (3mg/l) con ANA (1 mg/l), que presentaron un total de 44 y 41 brotes respectivamente, 37 de organogénesis indirecta y 7 de organogénesis directa para el primero y 38 de organogénesis indirecta y 3 de directa para el segundo (Tabla 3).

Lazarte *et al.* (1982) obtuvieron la mejor respuesta con BAP (1 mg/l) en combinación con ANA (0.1 mg/l) para propagar *Epiphyllum chrysocardium* con un promedio de 6 brotes por explante, mientras que para la propagación de *Opuntia ficus-indica*, fue necesario adicionar 0.9 mg/l más de BAP para obtener buenos resultados con un promedio de 8.6 brotes por explante (Mohamed-Yaseen *et al.*,

1995). Ortiz-Montiel y Vargas-Figueroa (1995) lograron propagar *Heliocereus elegantissimus* var. *elegantissimus* adicionando KIN (0.5 mg/l) y ANA (0.5 mg/l). Molphe *et al* (1998) establecieron métodos de propagación de 21 especies de cactáceas obteniendo un rango de promedios de 2.15 el más bajo para *Nyctocereus serpentinus* hasta 17.5 el más alto para *Mammillaria sphaclata*. Es evidente pues que las concentraciones de reguladores de crecimiento que resultan efectivas para la regeneración de plantas varían de especie a especie e incluso dentro de una misma especie de genotipo a genotipo, George (1993) sugiere que las concentraciones de los reguladores de crecimiento deberán ajustarse dependiendo del genotipo, del tipo de tejido y de la naturaleza del método de micropropagación utilizado.

## RIZOGENESIS

La formación de raíces ocurrió a partir de callo y a partir del ápice de los explantes (zona meristemática) (Lámina 2.A). La inducción de rizogénesis en los cultivos de callos por lo general requiere de un ajuste de los niveles de auxinas/citocininas necesarios para la iniciación y crecimiento de callo. Un balance adecuado entre estos reguladores es frecuentemente necesario. La rizogénesis suele surgir tras un tratamiento con mayor proporción de auxinas que de citocininas (George y Sherrington, 1984).

En el presente trabajo no se encontró ninguna correlación entre la presencia de auxina (ANA) y la formación de raíces, al contrario de lo que reportan Clayton *et al* (1990); Ortiz-Montiel y Vargas-Figueroa (1995) en donde sí se encontró una alta correlación. Aunque para *Heliocereus elegantissimus* var.

*elegantissimus* también se menciona la formación de raíces aun en medios basales, pero no en la misma proporción (Ortiz-Montiel y Vargas-Figueroa, 1995). En *A. kotschoubeyanus* esta respuesta se registró a la quinta semana incluso en el tratamiento control (sin reguladores de crecimiento) en donde se observó la formación de una raíz pivotal en la base de los tubérculos. Mauseth y Halperin (1975), Ault y Blackmon (1987) y Dabekaussen *et al.* (1991) encontraron la formación de raíces a largo plazo (tres semanas) aun en medios basales.

La iniciación de raíces a partir de callo suele ser tan esporádica como para poder ser utilizada en propósitos de experimentación (Dodds y Roberts, 1985).

#### EMBRIOGENESIS SOMATICA

INDUCCION: En el presente trabajo se logró promover la formación de embriones somáticos a partir de tubérculos de plántulas de *A. kotschoubeyanus* germinadas *in vitro* en los tratamientos en presencia de BAP (2-5 mg/l) solo o en combinación con ANA (0.1-1.0 mg/l) y en presencia de KIN (5 mg/l) sola o en combinación con 2,4-D (0.1 mg/l). El aspecto de los embriones somáticos de *A. kotschoubeyanus* fue similar en todos los tratamientos mencionados. Se presentaron como formaciones nodulares ( $\leq 1$  mm), de aspecto húmedo, con una coloración amarilla intensa y que fue cambiando gradualmente con el tiempo a blanco y después a verde. La respuesta de embriogénesis somática ocurrió por vía indirecta cuatro meses después de la fase de inducción, y esto fue para los tratamientos con BAP/ANA mientras que en presencia de KIN/2,4-D ocurrió por vía directa a partir del quinto mes (Lámina 2.B).

Para la inducción de la embriogénesis somática Minocha y Mehra (1974) en *Neomammillaria prolifera* así como Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) en *Aztekium ritteri*, utilizaron como reguladores de crecimiento KIN y 2,4-D (1/0 y 2/2 mg/l respectivamente). Olguín (1994) obtuvo la formación de embriones somáticos en presencia de BAP (0.5 mg/l) y ANA (0.1 mg/l) en callo derivado de tubérculos con una porción de hipocótilo de *A. retusus*, y para *Mediocactus coccineus* bastó con la presencia de ANA (0.5-1.0 mg/l) para promover esta respuesta (Infante, 1992).

Es sabido que generalmente la inducción de la embriogénesis somática ocurre en presencia de alguna auxina en concentraciones relativamente altas (1-3 mg/l), siendo la más frecuentemente utilizada el 2,4-D (Parrott *et al*, 1995). La embriogénesis somática requiere de la inducción de competencia embriogénica en células que no son embriogénicas de manera natural (Dodeman *et al*, 1997) y las auxinas pueden inducir esta determinación embriogénica en una proporción de las células en cultivos. En algunos casos, es frecuente la adición de citocininas (entre 0.1-0.5 mg/l) al medio a fin de favorecer la inducción (George, 1993). Se ha postulado que el transporte polar de la auxina juega un papel central en la embriogénesis. Fry y Wangerman (1976) fueron los primeros en proponer que la iniciación del transporte polarizado de la auxina en el embrión globular pudiera mediar la polaridad morfológica expresada en las etapas siguientes de la embriogénesis (Liu *et al*, 1993).

En el presente estudio fue posible inducir la respuesta de embriogénesis somática en *A. kotschoubeyanus* sin que la presencia de auxina exógena fuese esencial, como también lo reportaron Minocha y Mehra (1974) para *Neomammillaria prolifera*, adicionando KIN (1 mg/l).

Es importante mencionar que para *A. kotschoubeyanus*, la respuesta de embriogénesis somática se presentó solamente en uno de los seis explantes para cada tratamiento mencionado anteriormente, a excepción de KIN (5 mg/l) en donde dos de los explantes la presentaron. Esto puede deberse a que uno de los factores más importantes que influyen la morfogénesis *in vitro*, está determinado por el genotipo (George y Sherrington, 1984; Carman, 1995; Parrott *et al*, 1995). Komatsuda y Ohyama (1988) encontraron que las respuestas a la inducción de la embriogénesis somática en frijol de soya, *Glycine max*, eran diferentes, dependientes del genotipo. Brown (1988) en alfalfa y Tomes (1985) en algunos cereales, también detectaron un efecto genotípico sobre la embriogénesis somática (Debergh, 1989).

No sólo los niveles de auxinas y citocininas exógenos son determinantes, sino que también los niveles endógenos juegan un papel importante, así como la manera en que ambos interactúan. Estos niveles endógenos pueden ser diferentes incluso en diferentes genotipos y los explantes de una misma especie (George y Sherrington, 1984).

Street (1976) propone que los reguladores de crecimiento deben considerarse como agentes activadores para células pre-condicionadas a responder de cierta manera. Dependiendo de su concentración absoluta y relativa pueden suprimir, permitir o modificar bajo condiciones permisivas la morfogénesis o citodiferenciación en células totipotentes o capaces de continuar con un patrón de diferenciación (Sharp *et al*, 1980).

Uno de los factores clave para el éxito de la obtención de embriones a partir de células somáticas, radica en la selección adecuada de la fuente de explante

(Debergh, 1989). Los explantes reportados con mayor éxito para la inducción de la embriogénesis somática son los provenientes de partes reproductivas de la planta madre como embriones inmaduros o maduros, partes de la flor y óvulos (Tisserat *et al*, 1979 citado por Marín, 1998), pues reducen el potencial de variación genética en los cultivos y en las plantas obtenidas, los meristemos de las plantas suelen ser también de particular interés porque presentan una estabilidad genética inherente por el control estricto que ocurre en la replicación de ADN (Vasil, 1987 citado por Debergh, 1989). La obtención de regenerantes a partir de estructuras inmaduras es más frecuente que de tejidos maduros y son de gran valor en la clonación de individuos (Litz *et al*, 1998).

#### PROLIFERACION, MADURACION, GERMINACION:

Al subcultivar la masa embriogénica a medio fresco MS a intervalos regulares (4-6 semanas), se logró establecer la continua proliferación de embriones somáticos, con un incremento en el volumen del callo embriogénico de entre 10-30%, algunas zonas del callo, amarillo inicialmente, tomaron una coloración verde clara y una consistencia friable, en ocasiones con pequeñas zonas que mostraban indicios de oxidación. Una característica que predominó fue el aspecto húmedo general del callo. En algunas ocasiones, en el interior del callo fue posible encontrar embriones que tras haber pasado por una etapa de maduración, comenzaban a germinar en el medio proliferativo siguiendo un desarrollo morfológicamente similar al de los embriones cigóticos de las semillas de *A. kotschoubeyanus* germinadas *in vitro*. Pero otros embriones que presentaban una germinación precoz, llevaban a la obtención de embriones con

irregularidades morfológicas y sólo se desarrollaban hasta cierta etapa y después se detenían ahí permanentemente.

Algunos estudios sobre el comportamiento de los embriones somáticos en las primeras etapas, sugieren que no están fuertemente determinados, sino que delicadamente se dividen en meristemo apical (tallo) y subapical (raíz). Durante esta división (establecimiento de la bipolaridad), o histodiferenciación los embriones son extremadamente vulnerables a perturbaciones fisiológicas o bioquímicas. Estas alteraciones (teratismos) pueden incluir la formación de estructuras unipolares de tallo o de raíz, germinación precoz antes de que se complete la histodiferenciación, formación de cotiledones múltiples, embriones secundarios, complejos proembrionales o fusión de embriones, entre otros (Carman, 1990, 1995). En análisis histológicos de cultivos de embriones somáticos de uva (del tipo 41B), de embriones aberrantes, que no son capaces de continuar con su desarrollo, se observó que el meristemo apical estaba parcialmente organizado o incluso ausente (Dodeman *et al.*, 1997). Dodeman *et al.* (1997) mencionan que estas anomalías han sido reportadas para embriones somáticos de varias especies; en alfalfa por Dos Santos *et al* (1983) y en frijol de soya por Barwale *et al* (1986). La presencia de embriones somáticos teratogénicos *in vitro* sugiere que la ruta embriogénica es delicada, altamente plástica y sensitiva a estrés inducido por el medio de cultivo (Carman, 1990).

De manera general se describe el desarrollo de un embrión somático de *A. kotschoubeyanus* observado *in vitro*: Surge como una estructura globular de un color amarillo intenso y un aspecto húmedo (<1 mm), continuando su desarrollo

hasta consolidarse en una estructura globular compacta con una coloración blanquecina (etapa de histodiferenciación (Parrott *et al*, 1995)) en donde se hacen evidentes los cotiledones y una morfología de la etapa de corazón (ésto a través de divisiones que favorecen el crecimiento desigual del embrión precotiledonar a un embrión en etapa de corazón (Liu *et al*, 1993)), seguido de un incremento en el tamaño (debido a la expansión celular y acumulación de sustancias de reserva (Parrott *et al*, 1995)), pudo suceder que se elongara la estructura o que antes de elongarse tomase una coloración ligeramente verde, en un extremo se desarrollaba la raíz y en el extremo opuesto, de entre los dos cotiledones surgía un tubérculo. Para los subcultivos se utilizó de manera constante sacarosa porque parece ser la mejor fuente de energía para el cultivo de embriones (Collins y Grosser, 1984; Minocha y Mehra, 1974; Stuppy y Nagl, 1992; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992). También existen reportes como el de Strickland *et al* (1987), que mencionan que al sustituir sacarosa por maltosa (1.5%) durante las últimas etapas del desarrollo de los embriones, es posible mejorar la calidad de embriones somáticos de alfalfa y su germinación (Debergh, 1989). Li *et al* (1998) encontraron que la maltosa en combinación con polietilenglicol (PEG) como agente osmótico, favorecen la etapa de maduración de embriones somáticos en *Pinus taeda* L..

Por lo general, una vez que se logran obtener embriones somáticos de algún cultivo, es necesario el subcultivo de éstos a un medio libre de auxinas o con bajas concentraciones de éstas a fin de lograr su germinación. En *A. kotschoubeyanus* la presencia de auxina exógena no fue esencial para la inducción de la embriogénesis somática, es posible que los niveles endógenos de

auxinas en el explante en combinación con la citocinina exógena adicionada al medio, pudiesen haber favorecido esta respuesta.

La adición de carbón activado al medio ha facilitado la embriogénesis en algunos casos (Dodds y Roberts, 1985), y esto es porque el carbón activado puede adsorber residuos de reguladores de crecimiento que pudieran resultar inhibitorios (George, 1993), y favorecer así el normal desarrollo de los embriones y su maduración (Buchheim *et al*, 1989 citados por Parrott *et al*, 1995), aunque también puede adsorber sustancias promotoras (Ammirato, 1983). En el presente estudio el carbón activado no fue necesario para la etapa de inducción, sin embargo, a fin de procurar la maduración y posterior germinación de los embriones somáticos, la presencia de este compuesto pareció favorecer su germinación tanto en el medio MS como en MS50 (Tabla 4).

Tabla 4. Número de embriones somáticos de *A. kotschoubeyanus* que: G = germinaron; m = maduraron; PR = proliferaron en los diferentes medios ensayados; T = tapas de plástico; □ = suncaps; CA = carbón activado.

	MST	MS □	MS50T	MS50□	MSCAT	MSCA□	MS50CAT	MS50CA□
G	1					2	5	10
M	1				4		12	25
PR	++	+	++	+	++	+	++	+

+: poco; ++: medianamente.

Esto pudo deberse a que el carbón activado pudo haber adsorbido cualquier exceso de auxinas que no hubiesen sido metabolizados por los tejidos, así como sustancias de desecho de las plantas, pues es sabido que la presencia de auxinas puede prevenir la maduración y posterior germinación de los

embriones (Ammirato, 1983; Sharp *et al*, 1980), las auxinas pueden suprimir el desarrollo del meristemo apical posiblemente por mecanismos involucrados en el establecimiento de dominancia apical (Parrott *et al*, 1995).

Debido a que los embriones cigóticos disectados no siempre se desarrollan de manera normal en cultivo, puede inferirse que la presencia de los tejidos de la semilla es un factor que contribuye en el desarrollo normal de los embriones (Gray y Purohit, 1991).

La germinación requiere reservas de energía almacenadas que incluyen almidones, proteínas de almacenamiento, aceites y carbohidratos, ya sea en el endospermo (semillas endospermicas) o en el embrión mismo (semillas no-endospermicas), que son movilizadas durante la germinación (Bewley y Black, 1985 citados por Gray y Purohit, 1991).

Para muchas especies el endospermo natural (en las semillas) puede contener hormonas que influyen el crecimiento y desarrollo del embrión, y en los casos en donde éste está ausente (embriones somáticos *in vitro*), el medio de cultivo debe proveer las hormonas necesarias (Collins y Grosser, 1984).

Para *A. kotschoubeyanus*, se logró la continua proliferación de los embriones somáticos en todos los medios experimentados (Tabla 5), en algunos casos, en donde el callo creció tanto que consumió casi la totalidad del medio, pudo suceder que los embriones alcanzaron a almacenar sustancias de reserva completando así la etapa de maduración, y ya en un medio de cultivo agotado, pasaron por una etapa de deshidratación, de manera que al ser subcultivados a medio fresco germinaron. Otra opción fue que proliferaron en humedad, luego al ser transferidos a otro medio con "suncaps", en esas condiciones se llevaron a

cabo la etapa de maduración y deshidratación, para posteriormente lograr germinar en medio fresco, también con "suncaps", evitando un exceso de humedad en los envases.

La ausencia de una cubierta de tejidos en los embriones somáticos de *A. kotschoubeyanus* pudo haber influenciado el desarrollo de los mismos. La cubierta de la semilla ejerce una influencia física sobre el desarrollo del embrión alterando su morfología y por lo tanto su fisiología. Es posible que esta presión ejercida por la cubierta, contribuya al desarrollo normal, logro de la madurez y puesta en marcha de la latencia (Gray y Purohit, 1991).

Tal vez la diferencia más significativa del desarrollo entre embriones cigóticos y somáticos es que los segundos carecen de una etapa de reposo (Gray, 1987).

Las etapas tardías del desarrollo embriogénico están dedicadas hacia la preparación de la latencia y el evento de la germinación que le seguirá. Así, tarde en el desarrollo, el embrión sintetiza proteínas de almacenamiento y lípidos en grandes cantidades. El ácido abscísico, cuyos niveles se incrementan temprano en la fase de maduración, se piensa que activa la transcripción de genes para proteínas de almacenamiento en la semilla y proteínas que pudieran proteger al embrión durante la desecación (Chasan y Walbot, 1993). Pre-tratamientos con ABA suelen inducir un estado de tolerancia a la desecación (Senaratna *et al*, 1987 citado por Gray y Purohit, 1991).

La habilidad para lograr la tolerancia a la desecación y soportar la deshidratación parece ser una etapa crucial en el desarrollo del embrión. La falta de dicha fase del desarrollo en cultivos convencionales de embriones somáticos

podiera explicar los bajos rangos porcentajes de germinación logrados (Gray y Purohit, 1991).

En las semillas en desarrollo, el ácido abscísico ABA ha sido asociado con la inhibición de la germinación precoz, con la promoción de síntesis de proteínas de almacenamiento, tolerancia a la desecación, supresión de la movilización de reservas y la inducción de la latencia (Kermode, 1995 citado por Carrier *et al*, 1997). En el callo embriogénico de *A. kotschoubeyanus* se probaron tratamientos con la adición de ABA a fin de promover la maduración de embriones somáticos bajo condiciones de luz y en oscuridad pero no se obtuvieron resultados positivos, se obtuvo solamente un callo blanco friable.

Ya que los embriones somáticos de muchas especies presentan bajos porcentajes de germinación, es posible que posean procesos irreconocidos de latencia. Que con algunos tratamientos de deshidratación podrían incrementar estos rangos de germinación y recuperación de plantas (Gray y Purohit, 1991).

La desecación o deshidratación es una fase normal en el desarrollo de la semilla y parece ser un paso fundamental en la preparación del embrión para su posterior germinación (Debergh, 1989). En *A. kotschoubeyanus*, en algunas ocasiones, cuando se agotaba el medio proliferativo y se dejaban los cultivos en esas condiciones, ocurrió que al individualizar algunos embriones seleccionándolos de acuerdo a su morfología (coloración blanquecina, opacos y compactos) debidos a la posible acumulación de almidones como sustancias de reserva (Gray y Purohit, 1991), y una vez colocados en medio fresco, algunos de ellos germinaron de manera semejante a las semillas de *A. kotschoubeyanus*

germinadas *in vitro*, en donde el mayor porcentaje de germinación se dio en el medio MS50 con CA y suncaps (Tabla 4).

Cabe mencionar que el número de plantas que fue posible obtener a partir de embriones somáticos de *A. kotschoubeyanus* fue muy pequeño en relación al número de embriones que se obtuvieron, y esto es porque existen muchos aspectos en cuanto a la morfología y fisiología del desarrollo que faltan por estudiar y entender. Los métodos más prometedores para la identificación de los mecanismos regulatorios responsables de los eventos clave durante la embriogénesis provienen de análisis moleculares y genéticos (Dodeman *et al.*, 1997).

Uno de los principales obstáculos en la obtención de plántulas a partir de embriones somáticos, es que éstos frecuentemente se desarrollan a partir de "complejos proembrionales" en donde más de una etapa embrional puede estar presente (Gray y Purohit, 1991). Esto dificulta la maduración y posterior germinación sincrónica de un gran número de embriones para producir plantas (Gray, 1987; Klimaszewska y Smith, 1997). Y es que la maduración de los embriones comprende distintas fases como la de acumulación de sustancias de almacenamiento, períodos de desecación de los tejidos embriogénicos así como un arresto de la actividad metabólica (Klimaszewska y Smith, 1997). En los callos embriogénicos en proliferación de *A. kotschoubeyanus* fue frecuente encontrar embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo.

Se debe tener en cuenta que los rangos de maduración y germinación también están influenciados por los diferentes genotipos. En el trabajo de Parrot *et*

al. (1995) con frijol de soya, los rangos de germinación se vieron afectados por los diferentes genotipos.

Los embriones somáticos formados sin la intervención de callo, a partir de un grupo de células o células únicas tienen la ventaja de restringir el nivel de variación en cultivos, lo que provee una importante herramienta para estudios sobre la embriogénesis (Debergh, 1989). Hanna *et al* (1984) propusieron que el hecho de que existan menores rangos de variación somaclonal en embriones somáticos que en plantas regeneradas por vía de organogénesis puede deberse a que probablemente cualquier alteración ocasionada por cambios genéticos durante la ontogenia pueden impedir la recuperación de embriones somáticos (Parrot *et al*, 1995).

Las condiciones que favorezcan la maduración normal y mejor germinación de los embriones somáticos, serán aquellas que simulen las condiciones y cambios que ocurren en los embriones cigóticos en desarrollo (Debergh, 1989).

#### PROCESAMIENTO HISTOLOGICO DE LOS EMBRIONES SOMATICOS

Se requiere que los tejidos sean matados rápidamente para evitar la activación de mecanismos metabólicos celulares de supervivencia, el detenimiento de los procesos de vida celulares debe lograrse provocando un mínimo de cambios estructurales, esto es, que las estructuras celulares alteren lo menos posible su posición durante todo el procesamiento (Sass, 1961). Para estructuras de tejido delicado como lo son los embriones somáticos, el fijador Navashin resultó apropiado.

La técnica de tinción con safranina y verde rápido, elegida para los tejidos vegetales, incluye colorantes selectivos para determinadas estructuras: la safranina actúa como un colorante básico siendo selectivo para las estructuras nucleares, paredes celulares lignificadas y paredes cutinizadas, mientras que el verde rápido es un colorante ácido que tiñe estructuras citoplasmáticas y paredes celulósicas. Esta técnica dicrómica proporciona una doble coloración en los tejidos, logrando un buen contraste entre los mismos.

Al observar al microscopio los cortes histológicos de embriones somáticos de *A. kotschoubeyanus* fue posible identificar:

- a) embriones somáticos en etapa precotiledonar, con una epidermis bien diferenciada, protodermis, b) zonas de tejido vascular en donde eran evidentes indicios de deposición de lignina, c) centros meristemáticos, inmersos en tejido indiferenciado, típico de callo ( Lámina 2.C).

No fue posible identificar la presencia de un suspensor en los cortes histológicos que se observaron. Attree y Fowke (1993) mencionan que en todos los embriones cigóticos de las angiospermas está presente un suspensor. Sin embargo, bajo condiciones de cultivo, a menudo la morfogénesis de los embriones somáticos puede ocurrir sin el desarrollo normal de un suspensor, lo que sugiere que probablemente el suspensor no juega un papel crucial en el desarrollo, o que el medio de cultivo sustituye las interacciones llevadas a cabo entre el embrión y su suspensor (Dodeman *et al*, 1997).

## ENRAIZAMIENTO

En términos generales, en presencia de carbón activado hubo menos oxidación de los tejidos. El uso de "suncaps" redujo el porcentaje de plantas que reventaron y se revirtieron a callo. En los brotes sometidos a tres días de secado; a los 20 días eran evidentes los ápices de las raíces, hubo menor porcentaje de brotes que reventaron (Lámina 2.D).

Tabla 5. Comparación entre el porcentaje de sobrevivencia y enraizamiento de los brotes sometidos a tres días de secado y brotes sembrados directamente tras ser individualizados.

	Porcentaje de sobrevivencia	Porcentaje de enraizamiento
Brotos frescos	79	25
Brotos secados	97	30

Comparado con los resultados de Molphe *et al* (1998), los porcentajes de enraizamiento en el presente estudio resultan bajos, ellos reportan de 85 a 100% con AIB (0.5 mg/l) para *Coryphantha radians* y *Cephalocereus senilis* respectivamente y con AIB (1.0 mg/l) de 75 a 90% en *Astrophytum myriostigma* y *Stenocactus coplonogonus* respectivamente. Para *Ferocactus acanthodes* se logró entre 85-96.2% de enraizamiento variando la concentración de sacarosa en el medio, y con porcentajes de 90% de sobrevivencia en el suelo.

Es importante considerar que en el presente estudio no se desecharon los brotes con apariencia ligeramente hiperhidratada y todos se tomaron en cuenta

para el enraizamiento, pero muchos de ellos se revirtieron a callo, lo que generó un porcentaje muy bajo de los brotes que se lograron enraizar.

Molphe *et al* (1998) probaron enraizamiento *ex vitro* y tuvieron porcentajes ligeramente inferiores a los que reportan para el enraizamiento *in vitro*. Mohamed-Yasseen *et al* (1995) probaron el enraizamiento de *Opuntia ficus-indica* tanto bajo condiciones *in vitro* con AIB (1-2 mg/l) como *ex vitro*, en ambos tratamientos la totalidad de los brotes enraizó, pero mencionan que las plantas enraizadas *in vitro* reanudaron su crecimiento antes porque presentaban un sistema radicular mejor desarrollado que las plantas enraizadas *ex vitro*.

La adición de carbón activado en el medio de enraizamiento para *A. kotschoubeyanus* tanto en MS como en MS50, ya fuera en ausencia o con el uso de los "suncaps", pareció tener un efecto positivo en el enraizamiento pues la oxidación de los brotes en la parte herida que estaba en contacto con el medio fue menos evidente que en ausencia de este compuesto, pues en este último caso, sucedió que la oxidación de los tejidos en la parte inferior de los brotes retardó e incluso en algunos casos impidió la formación de raíces. Al contrario de Molphe *et al* (1998), quienes no encontraron ningún efecto del carbón activado sobre el enraizamiento, en el presente estudio si fue evidente la diferencia entre la presencia y la ausencia de este compuesto.

Vyskot y Jara (1984), Ault y Blackmon (1987) y Clayton (1990) también reportan oxidación de tejidos. Algunas plantas contienen altas concentraciones de sustancias fenólicas que se oxidan cuando los tejidos son dañados (heridos) o entran en senescencia. El resultado es que los tejidos se oscurecen y se detiene su desarrollo (George y Sherrington, 1984).

Se ha descubierto que los brotes de diferentes especies se logran enraizar más fácilmente *in vitro* cuando se adiciona carbón activado al medio, y en ocasiones la presencia de este compuesto puede mejorar el crecimiento de las raíces una vez iniciadas éstas. La estimulación del crecimiento de las raíces se asocia con la capacidad que tiene el carbón activado de absorber sustancias inhibitorias: previniendo el oscurecimiento de tejidos, absorbiendo el exceso de auxinas u oscureciendo el medio. Esto último porque en muchas plantas la inducción de raíces es promovida por la oscuridad o luz de baja intensidad, aparentemente porque los niveles naturales de auxinas aumentan en estas condiciones, mientras que bajo luz de alta intensidad suelen decrecer. Altas concentraciones de citocininas (0.5-10 mg/l) generalmente inhiben o retrasan la formación de raíces o incluso previenen su crecimiento y el efecto inductivo de las auxinas en la iniciación de las raíces (George y Sherrington, 1984).

Dentro de los brotes de *A. kotschoubeyanus* que fueron individualizados para tratar de inducir su enraizamiento y que reventaban, la capacidad regenerativa (plasticidad) continuaba en algunos de ellos pues nuevos brotes surgían a partir de los ápices de los tubérculos de los brotes reventados. Esta capacidad de regeneración se observó también en uno de cinco injertos que fue posible establecer con *Pereskiaopsis diguetii* como portainjerto, en donde se evidenció la formación de brotes por organogénesis directa a partir de tres tubérculos que se encontraban en la periferia. Esto pudo deberse a que en los brotes individualizados existían aún residuos de los reguladores de crecimiento adicionados y que probablemente éstos no habían sido metabolizados y estaban contenidos en células que adquirieron la capacidad de competencia e impulsadas

por el vigor de crecimiento debido al transporte de nutrientes del portainjerto, expresaron su totipotencialidad.

Los brotes de *A. kotschoubeyanus* que fueron sometidos a un proceso de secado por tres días bajo condiciones de oscuridad después de ser individualizados, no presentaron tantos problemas de oxidación. Dentro de los métodos convencionales de propagación, se recomienda para géneros como *Ariocarpus*, *Aztekium*, *Strombocactus*, entre otros, que antes de ser sometidos a procesos de enraizamiento, es importante cicatrizar con calor la base de los hijuelos, a fin de sellar los canales de muclago y favorecer así el enraizamiento (Reyes, 1994). El procedimiento de secado en el presente estudio pareció cumplir con el proceso de cicatrización, en cuanto a la condición de oscuridad, se conoce desde hace años que la etiolación de los brotes promueve la capacidad de éstos para enraizar (George y Sherrington, 1984). La promoción de raíces da mayor peso a la hipótesis de que la etiolación induce juvenilidad, y es que la facilidad de enraizar, es una de las características del material joven. Ortiz-Montiel y Vargas-Figueroa (1995) obtuvieron óptimos resultados al someter a procesos de etiolación secciones de tallos de *Hellocereus elegantissimus* var. *elegantissimus*.

En los cultivos de *A. kotschoubeyanus* no se llevaron a cabo mediciones de gases en el interior de los envases, pero especulativamente; puede decirse que el hecho de que los "suncaps" tuvieron un mejor efecto en el enraizamiento en comparación con las tapas, puede suponerse que los "suncaps" permitieron un balance de gases que favoreció esta respuesta de formación de raíces, o porque al no retener tanta humedad (el número de plantas que se revirtieron a callo fue menor), la fisiología de las plantas se modificó favorablemente y por lo tanto

también la concentración de gases (CO<sub>2</sub>, etileno), pero debido a la falta de datos en el presente estudio, se propone como una hipótesis sujeta a investigaciones posteriores.

El etileno es producido de manera natural por las plantas, tejidos u órganos cultivados (George y Sherrington, 1984). En ocasiones los niveles naturales de esta hormona pueden verse alterados por ejemplo como respuesta a heridas y en condiciones de estrés (Davies, 1990).

El papel que juega el etileno en la formación de raíces en cultivo de tejidos parece variar con el sistema de cultivo (Biddington, 1992). El etileno puede ser uno de los factores que afectan el enraizamiento (Kumar *et al.*, 1998). En algunos casos puede ser inhibitorio y en otros promotor (George y Sherrington, 1984). Liu *et al.* (1990) concluyeron que el etileno producido como una respuesta a heridas, fue la señal promotora clave para la formación adventicia de raíces en hipocótilos de semillas de girasol, cuyo sistema radicular había sido disectado (Kumar *et al.*, 1998). Marino y Ventura (1995) determinaron que para (*Prunus persica x Prunus amygdalus*) patrón híbrido de durazno GF 677, el uso de envases herméticos, que favorecían la acumulación de etileno en su interior, redujeron el tiempo de enraizamiento y en ocasiones se incrementó el porcentaje de éste. En general, una pequeña cantidad de etileno suministrada en el tiempo correcto de desarrollo promueve el enraizamiento, mientras que niveles elevados en el momento equivocado o por un período largo lo inhiben (Coleman *et al.*, 1980 citado por Marino y Ventura, 1995).

Dentro de las posibles ventajas que presenta el uso de "suncaps" se puede mencionar que pueden ayudar al establecimiento de la fase de aclimatización. Las

plantas *in vitro* tienen una alta capacidad para realizar la fotosíntesis, pero para alcanzar rangos adecuados que sostengan el crecimiento autótrofo, se requieren mayores niveles que los que se alcanzan en los cultivos, y un nivel de CO<sub>2</sub> que por lo menos se aproxime al encontrado en el aire que es de 0.035% ca. ó 359 vpm (en cuarto de cultivo ca. 400-800 vpm). Así pues, el uso de "suncaps" permite la difusión de gases (Incluido el CO<sub>2</sub>), por lo que probablemente las plantas de *A. kotschoubeyanus* tenderán a ser mixotróficas en vez de heterótrofas; lo que pudo haber favorecido el período de aclimatación para que pudieran llegar a ser autótrofas gradualmente, existe evidencia de que las plantas *in vitro* crecidas con mucha luz y poco CO<sub>2</sub>, crecen más rápido y sobreviven mejor que aquellas creciendo bajo condiciones mixotróficas, las plantas son menos propensas a infecciones microbianas (George, 1993).

## VI. CONCLUSIONES

Las secciones de plántulas, obtenidas a partir de semillas de *A. kotschoubeyanus*, utilizadas como fuente de explantes (tubérculos) mostraron una gran capacidad regenerativa bajo condiciones *in vitro*.

Fue posible inducir respuestas morfogénicas de dos tipos: 1a) organogénesis directa (con brotes de consistencia compacta); 1b) organogénesis indirecta (con brotes suaves de apariencia hiperhidratada que surgieron a partir de un callo friable verde claro y brotes de consistencia sólida provenientes de un callo de aspecto compacto con una coloración verde olivo; 2a) embriogénesis somática por vía indirecta y 2b) directa. La presencia de citocinina (2-5 mg/l) estuvo asociada a esta respuesta morfogénica.

En los tratamientos en ausencia de citocinina no fue posible promover la inducción de ninguna respuesta morfogénica.

Se logró favorecer la maduración en algunos de los embriones en etapa precotiledonar y su posterior germinación en plántulas, de aspecto similar a las que se obtuvieron a partir de la germinación de semillas.

En las condiciones ensayadas para las fases de maduración y germinación, la adición de carbón activado pareció favorecer estos procesos, eliminando del medio el exceso de reguladores de crecimiento exógenos que pudiesen resultar inhibitorios al haber quedado sin metabolizar.

El desarrollo de las técnicas de cultivo de embriones, provee una excelente oportunidad para estudios sobre la embriogénesis, incluyendo el estudio sobre los requerimientos hormonales para el crecimiento de los embriones, los efectos de

las fitohormonas, la nutrición y el metabolismo de los embriones, así como los efectos de las condiciones ambientales.

Los resultados de esta investigación contribuyen al conocimiento y conservación de esta especie mexicana en peligro de extinción y puede sentar las bases para su aprovechamiento sobre un método eficiente de propagación controlada.

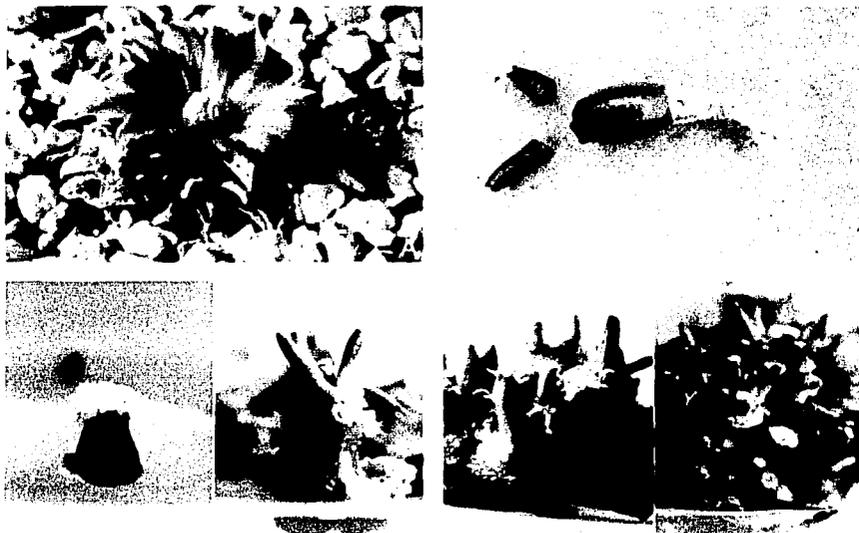


Lámina 1. A. *Ariocarpus kotschoubeyanus* con flor (barra: 0.71 cm). B. Disección de tubérculos en plántulas germinadas *in vitro* (barra: 0.17 cm). C. Organogénesis directa; aparición de tricomas en el ápice de un tubérculo tras cinco semanas en medio de inducción (izquierda) y crecimiento de un nuevo brote a las diez semanas (derecha) (barra: 0.11 cm). D. Organogénesis indirecta a partir de diferentes tipos de callo de aspecto compacto (izquierda) y de aspecto friable (derecha) (barra: 0.35 cm).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

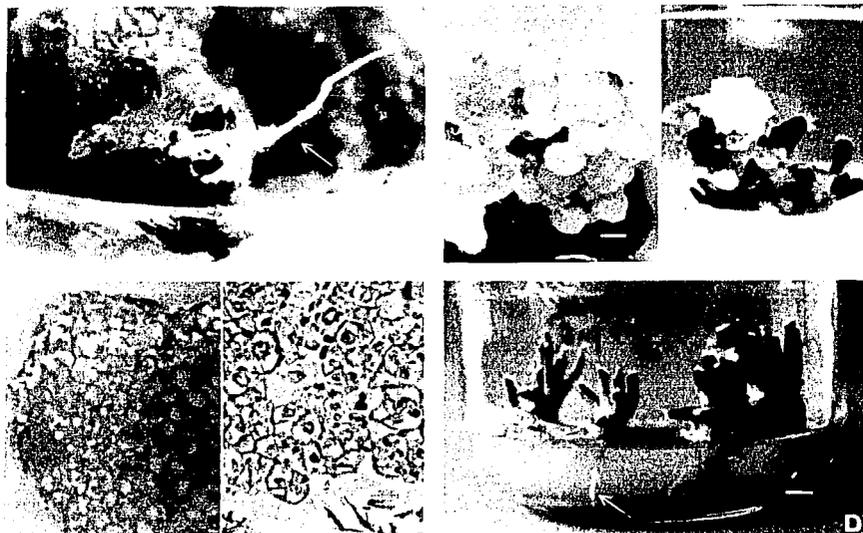


Lámina 2. A. Rizogénesis a partir de la areola de un tubérculo (barra: 0.21 cm). B. Embriogénesis somática, formación de estructuras nodulares en tratamiento con KIN/2,4-D (izquierda) (barra: 0.13 cm) y BAP/ANA (derecha) (barra: 0.3 cm). C. Corte histológico de embriones somáticos mostrando indicios de depositación de lignina (izquierda) y centros meristemáticos (derecha). D. Formación de raíces en brotes de *A. kotschoubeyanus* en medio con carbón activado (barra: 0.43 cm).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ-SANCHEZ, J. (1993). Contribución de la Sociedad Mexicana de Botánica a la Investigación y Conservación de la Biodiversidad. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. Vol. Esp. 44:51-57.
- AMMIRATO, P. V. (1983). Embryogenesis. pp. 82-123. En: D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada (eds.). Handbook of plant cell culture. Vol. 1. Macmillan, New York.
- ANDERSON, E. F. (1960). A Revision of *Ariocarpus* (Cactaceae) I. The Status of the proposed genus *Roseocactus*. Amer. J. Bot. 47:582-589.
- ANDERSON, E. F. (1965). A Taxonomic Revision of *Ariocarpus* (Cactaceae). Cact. Succ. J. of the Cact. Succ. Soc. Amer. 37(2):39-49.
- ANDERSON, E.F., S. Arias, N. P. Taylor and A. Cattabriga. (1994). Threatened Cacti of Mexico. Royal Botanical Gardens, Kew.
- ANONIMO. (1994). Norma Oficial mexicana NOM-CRN-001-ECOL/1993 que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres, terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial 16 de mayo de 1994. México, D. F.
- ARIAS, M. S. (1993). Cactáceas: Conservación y diversidad en México. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. Vol. Esp. 44:109-115.
- ATTREE, S. M. And L. C. Fowke. (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35:1-35.
- AULT, J. R. and W. J. Blackmon. (1987). *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience 22(1):126-127.
- BIDDINGTON, N. L. (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. Plant Growth Regulation 11:173-187.

BRAVO-HOLLIS, H. y H. Sánchez-Mejorada. (1991). Las Cactáceas de México. Vol. III. UNAM. México, D. F. 643p.

BRAVO-HOLLIS, H. y L. Scheinvar. (1995). El interesante mundo de las Cactáceas. CONACYT. Fondo de Cultura Económica, México. 233p.

BRUMMIT, R. K. And C. E. Powell. (1992). Authors of Plant Names. Royal Botanical Garden, Kew. Whitstable, Kent. 732p.

CARMAN, J. G. (1990). Embryogenic cells in Plant Tissue Cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 26:746-753.

CARRIER, D. J., CH. A. Bock, J. E. Cunningham, D. R. Cyr and D. I. Dunstan. (1997). (+)-Aba content and lipid deposition in interior spruce somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33:236-239.

CLARKE, M. (1994). Germination times for succulent plant seeds. *Cact. Succ. J. (U. S.)* 66:285-288.

CLAYTON, P. W., J. F. Hubstenberger y G. C. Phillips. (1990). Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115:337-343.

COLLINS, G. B. and J. W. Grosser. (1984). Culture of Embryos. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* 1:241-257.

CRAWLEY, M. J. (1996). GLIM for Ecologists. University Press, Cambridge. 379p.

CHASAN, R. and V. Walbot. (1993). Mechanisms of Plant Reproduction: Questions and Approaches. *The Plant Cell* 5:1139-1146.

DABEKAUSSEN, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. Van der Laken and J. H. Spaans. (1991). Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sucroebutia alba* Rausch. *Scientia Horticulturae* 46:283-294.

DAVIES, P. J. (1990). The plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Functions. En: P. J. Davies (ed.) *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

DEBERGH, P. (1989). Improving Micropropagation. *Newsletter IAPTC* (51):2-10.

- DEBERGH, P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. von Arnold, R. Zimmerman and M. Ziv. (1992). Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30:135-140.
- DODDS, J. H. (1991). Conservation of plant genetic resources, the need for tissue culture. pp 1-10. En: J. H. Dodds (Ed.) *In vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources*. Chapman and Hall, London, 239p.
- DODDS, J. and L. W. Roberts. (1985). *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge Univ. Press, U. S. A. 232p.
- DODEMAN, V. L., G. Ducreux and M. Kreis. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48(313):1493-1509.
- ESCOBAR, H. A., V. M. Villalobos and A. Villegas. (1986). *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7:269-277.
- FAY, M. F. (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biod. Cons.* 3:176-183.
- FAY, M. F. and J. Gratton. (1992). Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.
- GEORGE, E. F. (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited, England. 550p.
- GEORGE, E. F. and P. D. Sherrington. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetics Limited, England. 709p.
- GIBSON, A. C. and P. S. Nobel. (1990). *The Cactus Primer*. Harvard University Press, England.
- GLASS, C. and R. Foster. (1974). *Ariocarpus*. Living Rock Cactus. *Cact. Succ. J. (U. S.)*. 46:172-174.
- GRAY, D. J. (1987). Quiescence in Monocotyledonous and Dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration. *HortScience* 22(5):810-814.

- GRAY, D. J. and A. Purohit. (1991). Somatic Embryogenesis and Development of Synthetic Seed Technology. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10(1):33-61.
- HAVEL, L. and Z. Kolar. (1983). Microexplant isolation from Cactaceae. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2:349-353.
- HÖXTERMANN, E. (1997). Cellular "elementary organisms" *in vitro*. The early version of Gottlieb Haberland and its realization. *Physiol. Plant.* 100:716-728.
- HU, C. Y. and P. J. Wang. (1983). Meristem, Shoot tip and bud culture, pp 177-227. En: D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada (eds.) *Handbook of plant cell culture*. Vol. 1. Macmillan, New York.
- HUBSTENBERGER, J. F., P. W. Clayton and G. C. Phillips. (1992). Micropropagation of Cacti (Cactaceae). pp 49-58. En: Y. P. S. Bajaj, (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 20. High-Tech and Micropropagation. IV. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- INFANTE, R. (1992). *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 31:155-159.
- JOHNSON, J. L. and E. R. Emino. (1979a). *In Vitro* Propagation of *Mammillaria elongata*. *Hort. Sci.* 14(5):605-606.
- JOHNSON, J. L. and E. R. Emino. (1979b). Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cact. Succ. J. (U. S.)* 51:275-277.
- KLIMASZEWSKA, K. and D. R. Smith. (1997). Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol. Plant.* 100:949-957.
- KOHLNBACH, H. W. (1978). Comparative somatic embryogenesis. pp. 59-66. En: T. A. Thorpe. (Ed.). *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at the University of Calgary, Alberta, Canada, August 20-25, 1978.* 543p.

- KOMATSUDA, T. and K. Ohyama. (1988). Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 75:695-700.
- KRIKORIAN, A. D., K. Keely and D. L. Smith. (1995). Hormones in plant tissue culture and micropropagation. pp. 774-796. En: P. J. Davies (ed.) *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- KUMAR, P. P., P. Lakshmanan and T. A. Thorpe. (1998). Review. Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34:94-103.
- KYTE, L. (1987). *Plants from Test Tubes*. Timber Press, Oregon. 149p.
- LAZARTE, J. E., M. S. Gaiser and O. R. Brown. (1982). *In vitro* propagation of *Epiphyllum chrysocardium*. *HortScience* 17(1): 84.
- LI, X.-Y., F. H. Huang, B. Murphy and E. E. Gbur. (1998). Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34:22-26.
- LITZ, R. E., R. C. Hendrix, P. A. Moon and V. M. Chávez. (1998). Induction of Embryogenic mango cultures as affected by genotype, 2,2-D and embryogenic nurse culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53(1):13-18.
- LIU, Ch., Z. Xu and N. Chua. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5:621-630.
- MARÍN, H. T. (1998). Inducción de Respuestas Morfogenéticas *in vitro* en *Mammillaria san-angelensis* especie en peligro de extinción. Tesis Doctoral (Ciencias). Fac. Ciencias, U.N.A.M. México, D. F.
- MARINO, G. and M. Ventura. (1997). The influence of ethylene on *in vitro* rooting of GF 677 (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*) hybrid peach rootstock. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33:155-162.

- MARTINEZ-VAZQUEZ, O. and A. Rubluo. (1989). *In vitro* mass propagation of the near extint *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. J. Hortic. Sci. 64(1):99-105.
- MAUSETH, J. D. (1979a). A new method for the propagation of Cacti: sterile culture of axillary buds. Cact. Succ. J. (U.S.) 51:186-187.
- MAUSETH, J. D. (1979b). Cytokinin-elicited formation of the pith-rib meristem and other effects of growth regulators on the morphogenesis of *Echinocereus* (Cactaceae) seedlings shoot apical meristems. Amer. J. Bot. 66(4):446-451.
- MAUSETH, J. D. and W. Halperin. (1975). Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). Amer. J. Bot. 62:869-877.
- MINOCHA, S. C. and P. N. Mehra. (1974). Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). Amer. J. Bot. 61(2):168-173.
- MOELLER-VILLAR, G. (1993). Nota sobre La Sierra de La Paila (Listado de cactáceas y otras suculentas). Cact. Suc. Mex. 38:57-60.
- MOHAMED-YASEEN, Y., S. A. Barringer, W. E. Splittstoesser and R. J. Schnell. (1995). Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 42:117-119.
- MOLPHE, E. P., M. E. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones and H. J. Lizalde. (1998). Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 34:131-135.
- MURASHIGE, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:135-166.
- MURASHIGE, T. (1978). The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. pp 15-26. En: NG, S. Y. C. and N. Q. NG. (1991). Reduced growth storage of germplasm. pp 11-40. En: J. H. Dodds. (Ed.). *In Vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall, London. 239p.

- OLDFIELD, S. (comp.). (1997). Cactus and Succulent Plants-Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Cactus and Succulent Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 212p.
- OLGUIN, L. P. (1994). Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Fac. Ciencias, U.N.A.M. México, D. F.
- ORTIZ-MONTIEL, J. G. y M. Vargas-Figueroa. (1995). Propagación *in vitro* de *Heliocereus elegantissimus* (Britton y Rose) var. *elegantissimus* (Cactaceae). Cact. Suc. Mex. 40:41-46.
- PARROT, W. A., R. E. Durham and M. A. Bailey. (1995). Somatic embryogenesis in Legumes. En: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 31. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. (ed. By Y. P. S. Bajaj) Springer-Verlag, Berlin, p.199-227.
- PIERIK, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Mundi-prensa, Madrid. 326p.
- REYES, S. J. (1994). Propagación de Cactáceas Mexicanas: una alternativa para la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción. pp. 108-119. En: Encuentro Internacional sobre el Impacto de la Biotecnología en el Desarrollo Sustentable. PROMESUP. OEA.
- RODRIGUEZ-GARAY, B. and A. Rubluo. (1992). *In Vitro* Morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedecker). Cact. Succ. J. (U. S.) 64(3):116-119.
- RZEDOWSKI, J. (1998). Diversidad y Orígenes de la flora fanerogámica de México. pp 129-148. En: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (comp.). Diversidad Biológica de México. Orígenes y Distribución. UNAM, México, D. F.
- SASS, J. E. (1961). Botanical Microtechnique. Iowa Univ, Press, Iowa. pp 18.

- SHARP, W. R., M. R. Sondhal, L. S. Caldas and S. B. Maraffa. (1980). The Physiology of *In Vitro* Asexual Embryogenesis. pp 268-310. En: J. Janick. (Ed.). Horticultural Reviews. Vol. II, Purdue Univ., Avi Publishing Co., Westport.
- SHARP, W. R., P. O. Larsen, E. F. Paddock and V. Raghavan (Eds.). (1979). Plant Cell and Tissue Culture, Principles and Applications. Ohio State Univ. Press. 892p.
- SOBERON, M. J. y J. Llorente. (1993). La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). Rev. Soc. Hist. Nat. Vol. Esp. 44:3-17.
- STARLING, R. J. and J. H. Dodds. (1983). Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1:84-90.
- STUPPY, W. and W. Nagl. (1992). Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* 10:85-88.
- THORPE, T. A. and P.P. Kumar. (1993). Cellular control of morphogenesis. pp 11-29. En: M. R. Ahuja (Ed). Micropropagation of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- TOLEDO, V. M. (1988). La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo. No. 81 año 14:17-30.
- TORREZ-MUÑOZ, L. and B. Rodríguez-Garay. (1996). Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbinicarpus pseudomacrolele* (Buxbaum & Backeberg). J. Prof. Assoc. Cactus Dev. 1:36-38.
- VASIL, I. K. (1994). Automation of Plant propagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:105-108.
- VYSKOT, B. and Z. Jara. (1984). Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 59(3): 449-452.
- WOCHOK, Z. (1981). The Role of Tissue Culture in Preserving Threatened and Endangered Plant Species. *Biol. Cons.* 20:83-89.

## IX. APENDICE

### Apéndice I. Preparación de fijador Navashin:

Las partes A y B deben prepararse por separado y mezclarse justo antes de usar

- A) ácido crómico.....1g  
    ácido acético glacial....7ml  
    agua.....92ml
- B) formalin.....30ml  
    agua.....70ml

### Apéndice II. Preparación de soluciones de TBA:

Deshidratación en alcoholes graduales

H2O (ml)	EtOH 95% (ml)	TBA (ml)	EtOH 100% (ml)	% alcohol
65	30	5	0	30
50	40	10	0	50
30	50	20	0	70
15	50	35	0	85
0	45	55	0	95
0	0	75	25	100

Tabla que muestra las proporciones empleadas para la preparación de soluciones de TBA.

### **Preparación de colorantes**

#### **Apéndice III. Safranina:**

**Safranina "O".....1g**

**Metilcelosolve.....50ml**

**Alcohol 96%.....25ml**

**Agua destilada.....25ml**

**Acetato de sodio.....1g**

**Formol comercial.....2ml**

#### **Apéndice IV. Verde rápido:**

##### **Sol. A**

**Solución saturada de verde rápido en alcohol absoluto...1 parte**

**Metilcelosolve en igual cantida de alcohol absoluto.....1 parte**

##### **Sol. B**

**Alcohol absoluto.....25 partes**

**Aceite de clavo.....75 partes**

**Mezclar las soluciones**