



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regeneración *in vitro* de *Pelecocyphora strobiliformis* (Wendemann) Fric et Schelle (Cactaceae).

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

DIRECTOR DE TESIS:
DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

NOMBRE: JULIO CÉSAR FLORES SANCHEZ
FECHA: 29/E/04
FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
Regeneración in vitro de Pelecypora strobiliformis (Wendemann)
Fric et Schelle (Cactaceae)

realizado por Julio César Flores Sánchez

con número de cuenta 9336209-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Propietario

M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano

Propietario

Biól. Ana Claudia Sánchez Espinosa

Suplente

Dr. Martín Mata Rosas

Suplente

Dr. Angel Salvador Arias Montes

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



El desarrollo de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Avila.

El esqueleto de la ciencia son los hechos,
pero los músculos y los nervios son el
significado que se les confiere,
y el alma de la ciencia son las ideas.

- ***Ruy Perez Tamayo***
científico mexicano

Ciencia y humanismo han de
ser un brazo y no un muro que
separa razón y sentimiento.

Pablo Serrano

DEDICATORIA

A mis padres Elia Sánchez Varela y Miguel Flores Juárez, por su amor incondicional y apoyo; por enseñarme a luchar en la vida y a ganarme todo con mi trabajo; por darme la libertad y confianza de escoger mi camino en la vida; por todos los momentos tristes y felices que hemos pasado juntos.

A mi hermano Miguel A. Flores Sánchez por ser mi amigo y compañero, por sus consejos y ejemplo y por la felicidad de tener un hermano como tú.

A mi tía Carmen Sánchez Varela, por su cariño, apoyo y consejos; por estar siempre conmigo aún en la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, por su apoyo académico y personal en todo momento durante el desarrollo de esta tesis y por ser no solo mi mentor sino también mi amigo; al Dr. Martín Mata Rosas por su asesoría y comentarios sobre el trabajo escrito; al Dr. Angel Salvador Arias Montes por sus comentarios y recomendaciones acerca de este trabajo; a la M. en C. Mabel Hernández Altamirano por su apoyo académico y recomendaciones acerca de mi trabajo y por su amistad; a la Biól. Ana Claudia Sánchez Espinosa por sus comentarios y sugerencias sobre mi trabajo, por su amistad, por su apoyo en momentos difíciles, por su confianza y sinceridad. Al Dr. Robert Bye Boettler por su apoyo y permitir el uso de las instalaciones del Jardín Botánico IB-UNAM. Al Biól. Jerónimo Reyes y a la Biól. Araceli González por la donación del material biológico que se empleo en el presente estudio. A la Biól. Carmen Loyola y a Isabel Pineda por su apoyo en la toma y procesamiento de las fotografías que se presentan en este estudio (Figuras 6-13). A mis compañeros de Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales: Isaac Pérez, Fernando Rojas Briseño, Bárbara Estrada, Ximena García, Diana Barrera Vargas, Marco A. Téllez. Por su amistad y sinceridad, por todos los momentos divertidos que hemos compartido, por sus consejos y apoyo.

A mis amigos y compañeros de generación Octavio González Caballero, Allan Chavarría, Alberto Gómez Martínez, Fabian Reyes, por todo los momentos que compartimos a lo largo de todos estos años de estudio.

A mis compañeros del Jardín Botánico: M. en C. Esthela Sandoval, Biól. Gabriel Olalde y Biól. Teodolinda Balcázar, por su apoyo y amistad.

A todos mis amigos que han compartido un momento de sus vidas conmigo.

A mis maestros que me enseñaron a amar el estudio.

INDICE GENERAL

Indice de tablas	3
Indice de figuras	4
Abreviaturas	5
Resumen	6
Introducción	7
Antecedentes	10
▪ <i>Pelecypora strobiliformis</i> (Wendermann) Frič <i>et</i> Schelle	10
▪ Descripción botánica	11
▪ Distribución geográfica	11
▪ Situación actual	12
▪ Germinación de semillas de cactáceas	14
▪ Cultivo de tejidos vegetales	15
○ El uso de semillas como fuente de explantes	19
▪ Cultivo de tejidos vegetales en cactáceas	20
Justificación	25
Objetivos	26
Materiales y métodos	26
▪ Material biológico (Colecta de semillas)	26
▪ Desinfección y germinación	26
▪ Cultivo de secciones de plántulas	27
○ Explantes	27
▪ Inducción de respuestas morfogénicas	27
▪ Desarrollo y mantenimiento de cultivos	28
▪ Incubación de cultivos	28
▪ Aplicación de pruebas estadísticas	28
Resultados	29
▪ Germinación de semillas	29
▪ Cultivo de secciones de plántulas	32
○ Explantes	32
▪ Inducción de respuestas morfogénicas	36

○ Organogénesis directa	36
○ Callo	47
○ Organogénesis indirecta	48
Conclusiones	50
Bibliografía	52
Apéndices	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estado actual de conservación y propagación de las especies que conforman la línea “B” Strombocacti.	12
Tabla 2. Algunas especies de Cactáceas regeneradas <i>in vitro</i>	23
Tabla 3. Tratamientos con reguladores de crecimiento (BAP/ANA) para la inducción de respuestas morfogénicas en secciones longitudinales de plántulas de <i>P. strobiliformis</i> , cultivadas en medio MS, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 16h (PAR $50\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$).	27
Tabla 4. Porcentajes de germinación de semillas de <i>P. strobiliformis</i> sembradas en medio MS líquido en puentes de papel filtro, 5 semillas por frasco de medio de cultivo, se sembraron 30 semillas en el primer y segundo lote y 20 semillas en el tercer lote, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 h; $29.29\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ (PAR $50\mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$).	29
Tabla 5. Desarrollo de brotes (promedio) a partir de secciones longitudinales de plántulas de <i>P. strobiliformis</i> germinadas asépticamente.	36
Tabla 6. ANOVA del número total de brotes por tratamiento en el tercer subcultivo.	43
Tabla 7. Número total de brotes y porcentaje de brotes regenerados a partir de plántulas germinadas <i>in vitro</i> de <i>P. strobiliformis</i> mediante organogénesis directa e indirecta, por tratamiento durante cada periodo de cultivo (2 meses).	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Individuos adultos de <i>P. strobiliformis</i> en floración.	10
Figura 2. Plano de corte de las plántulas germinadas <i>in vitro</i> para la obtención de explantes (ápice, hipocótilo dividido longitudinalmente en 2 partes) en los ensayos iniciales.	33
Figura 3. Sección de hipocótilo con necrosis por oxidación, la cual resultó letal para todos los cultivos iniciales de estos explantes (7-10 días de cultivo).	34
Figura 4. Plano de corte de las plántulas germinadas <i>in vitro</i> para la obtención de explantes (2 secciones longitudinales) y así tratar de prevenir la oxidación de los tejidos.	34
Figura 5. Explante etiolado (a), explantes con oxidación en el hipocótilo (b,c), explante rojizo (d).	35
Figura 6. Desarrollo de nuevas areolas en el hipocótilo de los explantes después de 1 mes en medio de inducción, 1/0.1 (a), 2/0.1 (b), 0/0.1 (c).	37
Figura 7. Acercamiento de un explante que presentó la formación del halo que precedía a la formación de brotes por organogénesis directa (→), en <i>P. strobiliformis</i> .	38
Figura 8. Nuevos brotes en crecimiento a partir de las areolas del explante.	39
Figura 9. Brotes que abortaron su crecimiento y diferenciación.	39
Figura 10. Brotes regenerados vía organogénesis directa individualizados, 2/2 (a), 1/1 (b), 1/0.1 (c).	41
Figura 11. Aspecto de los brotes regenerados por organogénesis directa después de dos meses de haber sido subcultivados por segunda vez (tratamiento 0/0.5).	42
Figura 12. Explante con un ligero desarrollo de callo (a), explante sin desarrollo de callo (b), explante con desarrollo de callo de color rojo intenso después del primer subcultivo(c), callo friable después del segundo subcultivo (d).	48
Figura 13. Brotes generados por organogénesis indirecta.	49

ABREVIATURAS

2, 4-D	Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
2iP	2-Isopentil Adenina
ANA	Ácido α-naftalén acético
ABA	Ácido Abscísico
BAP	Benzilaminopurina
CITES	Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies en Peligro de Extinción de Flora y Fauna Silvestres
K	Kinetina (6-furanil amino purina)
MS	Medio Nutritivo Murashige Skoog (1962)
TDZ	Tidiazuron
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
Z	Zeatina

RESUMEN

“Regeneración *in vitro* de *Pelecyphora strobiliformis* (Wendermann) Frič et Schelle (Cactaceae)”.

Se germinaron semillas de *P. strobiliformis* en medio MS, provenientes de 15 plantas adultas que se conservan en el Área de Colecciones del Jardín Botánico IB-UNAM. Las semillas germinaron dentro de un periodo de 14 días, el porcentaje de germinación fue de 89.23%.

Plántulas germinadas *in vitro* de 1.5-2 meses de edad, fueron seccionadas longitudinalmente en dos partes y éstas cultivadas en medio de inducción durante 60 días en MS líquido con puentes de papel filtro Whatman No.1, adicionado de todas las posibles combinaciones de BAP (0, 1, 2, 3 mg/l) con ANA (0, 0.5, 1, 2 mg/l), sacarosa 30 g/l; bajo estas condiciones se logró la inducción de organogénesis (directa e indirecta).

Después de seis meses de iniciados los cultivos, no se encontraron diferencias significativas en el número de brotes producidos entre los tratamientos. No se encontró una correlación directa en cuanto a la producción de brotes y la presencia de alguno de los reguladores de crecimiento ensayados (BAP, ANA). Sin embargo el tratamiento que permitió una mayor regeneración de brotes fue el de 0/0.5 con un total de 99 brotes y un promedio de 24.75 brotes por explante, de éstos un 83.13% provino de organogénesis directa, el restante 16.83% fue resultado de organogénesis indirecta. El tratamiento que le siguió en la producción de brotes fue el de 3/2 con un total de 59 y un promedio de 14.75 brotes por explante, sin embargo la proporción entre brotes regenerados ya sea por organogénesis directa o indirecta fue diferente (57.62 y 42.38% respectivamente).

La obtención de plántulas completas se presentó al individualizar los brotes producidos en todos los tratamientos (siendo el tratamiento 0/0.5 el que presentó un mayor número de ellas), esto se dio mediante la generación de raíces de manera espontánea, sin embargo el número de plántulas con raíces fue bajo (menor al 10%). El tratamiento que presentó un mayor número de plántulas con morfología normal fue el de 0/0.5 (todas las plántulas generadas via organogénesis directa).

Estos resultados contribuyen al conocimiento de esta especie en alto riesgo de extinción, a su conservación y a planear su futuro aprovechamiento.

INTRODUCCIÓN

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 (WCMC, 1992 citado por Soberón y Llorente, 1993).

Enmarcados en la diversidad florística de México, la familia Cactaceae destaca por su amplia representatividad a nivel genérico y específico (Arias, 1993), concentrada en las zonas áridas y semiáridas del país, siendo mayor su distribución en las zonas del norte y centro (Reyes, 1994). La familia está conformada por alrededor de 100 géneros y 1500 especies, de las cuales el 68% se encuentra en México (Valles, 1997; Glass, 1998).

El uso de las cactáceas es muy variado en las poblaciones rurales de México, siendo utilizadas prácticamente todas las partes de la planta en cuestión ya sea como alimento (*Echinocactus grussonni*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Opuntia* spp.), forraje para el ganado (*Opuntia* spp.), materiales para construcción de casas y muebles (*Pachycereus marginatus*), para la manufactura de artesanías y la venta de las plantas vivas como ornamentales (*Pelecypora strobiliformis*, *Mammillaria* spp, *Astrophytum myriostigma*), hecho que ha ocurrido desde la colonización de México por los españoles, debido a la rareza de la forma del tallo, tamaño, color de flor, espinas, etc., abasteciendo mediante extracción ilegal, el mercado nacional e internacional.

Estas prácticas o usos han continuado en forma indiscriminada porque se ha considerado de manera equivocada que los recursos de la naturaleza son inagotables y se ha actuado sin mucha conciencia, movidos por intereses utilitarios y económicos.

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; y para aquellas especies de mayor importancia ornamental la sobrecolecta ilegal es el principal factor de amenaza (Reyes y Terrazas, 1991 citado por Reyes, 1994).

En los últimos años, el creciente aumento poblacional en México, el consecuente consumo de recursos y su impacto sobre el medio ambiente, han provocado un gran costo biológico, el cual se ve reflejado en la disminución de la diversidad, aunado a esto, se encuentra el hecho de que la mayoría de las especies de cactáceas, amenazadas o no, pertenecen a pequeñas poblaciones de

distribución restringida, o son especies que han sido descubiertas recientemente y por lo tanto se conoce muy poco de su biología y su conservación.

El nivel de degradación actual de los ecosistemas naturales donde se distribuyen y crecen las cactáceas es muy severo, además aunado al calentamiento a nivel global que se ha experimentado en los últimos años, ha provocado cambios en los patrones climáticos, presionando aun más a las especies más amenazadas. Por lo que es urgente emplear alternativas de rescate y conservación tales como el desarrollo de métodos eficientes de propagación de especies con problemas de supervivencia en el campo.

Por lo anterior, es claro que las acciones del hombre han ocasionado que muchas especies de cactáceas se encuentren en inminente peligro de extinción. Raven (1976 citado por Wochok 1981) resalta que las especies amenazadas o en peligro de extinción que desaparecen, tienen un efecto ecológico significativo en el hábitat que solían ocupar. Se estima que la desaparición de una planta puede afectar de 10 a 30 especies que dependen de ella, ya sean plantas, insectos u otros animales.

En 1974, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) creó el Comité de Plantas Amenazadas, con un secretario en Kew, Gran Bretaña. Este Comité reúne información por medio de especialistas regionales y jardines botánicos que se comprometen a propagar especies amenazadas. Se creó en 1975, en forma paralela, la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies en Peligro de Extinción de Flora y Fauna Silvestres (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 al CITES; el convenio fue publicado en el Diario Oficial de la Federación del día 24 del mismo mes (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

A nivel global las cactáceas se encuentran en crítica situación, 40 especies están incluidas en el Apéndice I de CITES, el más restrictivo, las restantes especies se encuentran en el Apéndice II (Guzmán *et al.*, 2003). Entre las especies de más aguda situación, dado su endemismo se encuentra *Pelecyphora strobiliformis*, perteneciente a la línea evolutiva Strombocacti (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). La mayoría de las especies pertenecientes a dicha línea evolutiva son ornamentales y su comercio está regulado con base en las disposiciones del Apéndice I de la CITES (Guzmán *et al.*, 2003).

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 y la abundancia 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 si la planta presenta una baja tasa de producción de semillas, si los intervalos de germinación son bajos, y su crecimiento es lento. Además si la planta tiene una baja densidad poblacional resultará poco probable la obtención de semillas.

El Cultivo de Tejidos representa una alternativa para el estudio, conservación y propagación de aquellas especies que se encuentran en peligro de extinción (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1982). Ha significado una herramienta importante para la micropropagación y mejoramiento genético de plantas alimenticias y ornamentales, un ejemplo de ello es que más de 500 millones de plantas se producen por estas técnicas cada año (Vasil, 1994), con una tasa de propagación mucho más rápida (Stuppy y Nagl, 1992), con un alto potencial para la preservación del germoplasma libre de patógenos y una producción homogénea (clonal) (Wochok, 1981). Esta alternativa es de gran utilidad para la investigación básica, ya que proporciona modelos para estudios bioquímicos, fisiológicos, anatómicos, de desarrollo, así como de genética molecular. El cultivo de tejidos vegetales ofrece alternativas para la conservación y aprovechamiento de especies amenazadas como es el caso de *P. strobiliformis*, la cual es objeto del presente estudio.

ANTECEDENTES

Pelecyphora strobiliformis (Wendermann) Frič *et* Schelle

Clasificación

(Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991)

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Embryophyta
SUBDIVISIÓN	Angiospermae
CLASE	Dicotyledoneae
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Cactoideae
TRIBU	Cacteae
SUBTRIBU	Thelocactinae
LINEA	Strombocacti
GÉNERO	<i>Pelecyphora</i>
ESPECIE	<i>Pelecyphora strobiliformis</i>
SINÓNIMOS	<i>Ariocarpus strobiliformis</i> ; <i>Encephalocarpus strobiliformis</i>
NOMBRE COMÚN	Peyotillo escamoso; Cacto piña de pino

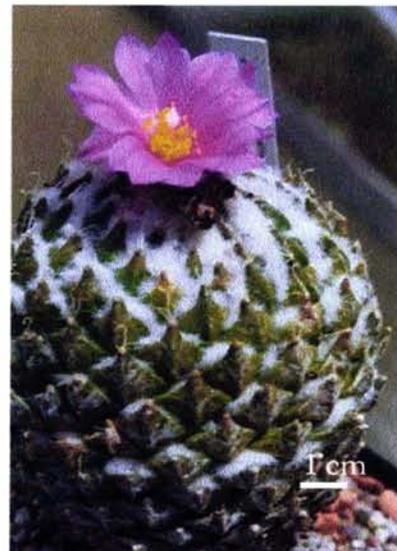


Figura 1. Individuos adultos de *P. strobiliformis* en floración.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Plantas cespitosas que forman grupos pequeños. Tallo globoso, más o menos obcónico, de alrededor de 3.5 cm de longitud y 8 cm de diámetro; ápice algo hundido, provisto de lana y cerdas cortas. Tubérculos numerosos, apretados, dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, escuamiformes, triangulares, curvos, aquillados, los jóvenes romboidales transversalmente, de 6 mm de longitud y 10 mm de anchura, de color verde grisáceo o verde amarillento. Areolas dimorfas, las espiníferas pequeñas, circulares hasta algo elípticas, conectadas con las areolas floríferas, las que están situadas en las axilas de los tubérculos, por medio de una banda de tricomas. Espinas sólo en los tubérculos jóvenes 10 a 12, setosas, suaves, pectinadas, las superiores más largas que las inferiores y conniventes sobre el ápice, de color amarillo hasta gris negruzco. Flores dispuestas en el ápice de la planta, brotan en la axila de los tubérculos jóvenes, de 3 a 3.5 cm de diámetro; pericarpelo pequeño y desnudo; tubo receptacular desnudo, largo y angosto, se expanden ampliamente hacia arriba; segmentos exteriores del perianto espatulados, acuminados, con el margen entero; todos de color purpúreo rojizo o magenta; estambres escasos, insertos desde casi la base del tubo; filamentos amarillos; estilo delgado; lóbulos del estigma 5. Fruto seco, escondido en la lana del ápice, donde después de un tiempo se desintegran dejando las semillas ocultas. Semillas pecunias, piriformes a la vez que muy encorvadas, algo aplanadas lateralmente; testa reticular, formada por células alargadas en el sentido longitudinal de la semilla, hilo y micrópilo en la región angostada. Tubérculos de las plantas prismáticos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

P. strobiliformis es endémica de México se ha reportado en la zona centro del estado de Tamaulipas, en las localidades de Juamave y Miquihuana, en el Sur de de Nuevo León, en la localidad de Doctor Arroyo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Glass 1998) y en el norte del Estado de San Luis Potosí, en la localidad de Venegas (Sotomayor *et al.*, 2000 citados por Arias-Azcona, 2002), con una densidad de población de un individuo adulto por cada 33 m², y una plántula por cada 20 m², en una superficie de estudio de 700 m², donde se abarcó la localidad tipo (Hernández, 1998). Se encuentra en cerros y lomas del sistema de sierra complejas de la subprovincia de la Sierra Madre Oriental (INEGI, 1983 citado por Hernández, 1998). Se encuentra en altitudes entre los 1,200 y los 1,860 msnm, en cerros y lomas de la Sierra Madre Oriental, en

pendientes de 0 a 20 %, en vegetación de matorral xerófito (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

SITUACIÓN ACTUAL

El mayor riesgo que corre *P. strobiliformis* es la extracción de individuos de las poblaciones silvestres. Un ejemplo es el que a principios de la década de 1960, un europeo (suizo, según los pobladores) llegó con un gran camión a la localidad de Tamaulipas y contrató a los habitantes para que colectaran todos los especímenes del monte. Colectas posteriores a lo largo de veinte años han destruido prácticamente la población de esta localidad (Anderson *et al.*, 1994).

Existe amplia evidencia de que la misma colecta ilegal de plantas ha ocurrido en una localidad en Nuevo León. Existen reportes de colecta extensiva por un europeo que decía vivir en Matehuala. Los habitantes de la localidad han confirmado que personas llegaban periódicamente a los montes con camiones para colectar gran número de cactáceas (Anderson *et al.*, 1994).

Arias-Azcona (2002) reporta que en visitas hechas a todas las zonas de distribución a lo largo del año 2002 no le fue posible encontrar un solo espécimen de *P. strobiliformis*.

El estado de conservación de esta especie según la Norma Oficial Mexicana publicada el 16 de octubre de 2000 en el Diario Oficial de la Federación (PROY-NOM-059-ECOL-2000), que determina las especies y subespecies de fauna y flora silvestres terrestres y acuáticas raras, amenazadas y en peligro de extinción y las sujetas a protección especial, la ubica en la categoría P (en peligro de extinción) y en el Apéndice I (el de mayor grado de protección). La dos especies pertenecientes al género *Pelecyphora* se encuentran en el Apéndice I CITES (Tabla 1).

Tabla 1. Estado actual de conservación y propagación de las especies que conforman la línea “B” Strombocacti (Basado en: Soltero, 1996 citado por Arias-Azcona, 2002).

GÉNERO	ESPECIE	END	NOM	CITES	RESULTADOS	REFERENCIA
<i>Aztekium</i>	<i>ritteri</i>	Si	A	Ap. I	Brotos	Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992
	<i>hintonii</i>	Si	R	Ap. II		
<i>Lophophora</i>	<i>williamsii</i>	No	Pr	Ap. II	Brotos axilares	Ortiz-Montiel y Alcántara, 1997
	<i>difusa</i>	Si	A	Ap. II		
<i>Turbincarpus</i>	<i>schmiedickeanus</i>	Si	A	Ap. I	Brotos axilares	Arias <i>et al.</i> , 2001
	<i>pseudopectinatus</i>	Si	R	Ap. I		
	<i>subterraneus</i>	Si	A	Ap. I		

	<i>valdezianus</i>	Si	A	Ap. I		
	<i>viereckii</i>	Si	A	Ap. I		
	<i>lophophoroides</i>	Si	A	Ap. I		
	<i>loui</i>	Si	A	Ap. I	Brotos axilares	Mata-Rosas <i>et al.</i> , 2001
	<i>pseudomacrochele</i>	Si	A	Ap. I	Brotos axiales	Soltero, 1996
<i>Ephithelantha</i>	<i>micromeres</i>	No	R	Ap. II	Brotos axilares	Velázquez, 1997; Velázquez y Soltero, 2001
	<i>bokei</i>	No	A	Ap. II		
<i>Strombocactus</i>	<i>disciformis</i>	Si	A	Ap. I	Brotos axilares	Soltero, 1996
<i>Obregonia</i>	<i>denegrii</i>	Si	A	Ap. I		
<i>Leuchtenbergia</i>	<i>principis</i>	Si	A	Ap. II	Brotos multiples	Starling, 1985
	<i>kotschoubeyanus</i>	Si	A	Ap. I	Brotos axilares Embriones somáticos	Moebius- Goldammer <i>et al.</i> , 2003
	<i>fissuratus</i>	No	A	Ap. II		
<i>Ariocarpus</i>	<i>retusus</i>	Si	R	Ap. I	Brotos axilares Embriones somáticos	Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994
	<i>agavoides</i>	Si	P	Ap. I		
	<i>bravoanus</i>	Si	A	Ap. I		
	<i>trigonus</i>	Si	A	Ap. I		
	<i>scapharostrus</i>	Si	P	Ap. I		
<i>Pelecypora</i>	<i>aselliformis</i>	Si	A	Ap. I	Brotos axilares	Giusti <i>et al.</i> , 2002; Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2002; Pérez- Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002
	<i>strobiliformis</i>	Si	P	Ap. I	Brotos axilares	Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002; Arias-Azcona, 2002
<i>Geohintonia</i>	<i>mexicana</i>	Si	R	Ap. II		

END= endémica de México.

NOM= estado de conservación de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000: A= Amenazada, R= rara, Pr= Protección Especial, P= En Peligro de Extinción.

Nota: los géneros y especies se presentan en orden filogenético (según Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN CACTÁCEAS

Para que una semilla germine requiere de ciertos factores internos controlados por su propia información genética, debe ser viable, es decir, el embrión debe estar vivo, y además requiere de condiciones ambientales adecuadas, tales como la presencia de agua, oxígeno, temperatura, luz y obscuridad (fotoblásticas positivas y negativas respectivamente), aunque algunas semillas se desarrollan mejor en presencia de luz (Hartmann y Kester, 1981; citados por Hernández, 1998).

En la naturaleza algunas semillas presentan diapausa o dormancia, que es un estado en el que el crecimiento se suspende y el metabolismo de la semilla se reduce a un nivel básico. Este letargo puede ser impuesto por factores ambientales desfavorables o bien por condiciones internas controladas por el mecanismo de su propio tejido (Hartmann y Kester, 1981; citados por Hernández, 1998). Esta dormancia constituye un mecanismo de control en la germinación de gran importancia en la naturaleza, ya que contribuye a la supervivencia y a la dispersión natural de las plantas, sobre todo aquellas que se desarrollan en regiones desérticas o frías, donde las condiciones ambientales no son adecuadas para la inmediata germinación (McDonoug, 1977; citados por Hernández, 1998).

La dormancia tiene un valor de supervivencia cuando las condiciones de germinación y establecimiento no son apropiadas. Las semillas de cactáceas se desarrollan en lugares donde la disponibilidad de agua es escasa por lo que se dice son quiescentes (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Tres tipos de dormancia han sido descritos: innata, forzada e inducida (Harper, 1957 citado por Murdoch y Ellis, 1992; Roberts, 1972). La dormancia innata (o dormancia primaria) previene la germinación de las semillas en la planta madre y por un tiempo antes de la dispersión; dormancia forzada es regulada por condiciones ambientales tales como luz y/o temperatura, las semillas están listas para germinar una vez que las limitaciones ambientales son removidas; y la dormancia inducida (o dormancia secundaria) es caracterizada por la persistencia de la condición de dormancia incluso cuando las semillas se encuentran en condiciones favorables para la germinación (Tran y Cavanagh, 1984). Para las semillas de cactáceas se ha encontrado la dormancia forzada e innata (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Existen diferentes factores que pueden ayudar a romper con la dormancia como la escarificación, la estratificación, fotoperiodo, hidratación o una combinación de todas estas. León (1991) realizó un estudio sobre la reproducción sexual de la pitaya agria *Stenocereus gummosus* y

encontró que dicha especie produce una gran cantidad de semillas viables, pero que al parecer sólo se propaga de forma vegetativa. Colectó semillas provenientes de frutos frescos y del excremento del carpintero de gila (una ave), las sometió a diferentes intervalos de fotoperiodo y de temperatura durante 11 días, después de este período, concluyó que el mayor porcentaje de germinación se dio al ser escarificadas a bajas temperaturas (Rioja y Romero 2002).

En muchos casos, especies de cactáceas como *Stenocereus thuberi*, *Pachycereus pecten-aboriginum* y *Ferocactus peninsulæ*, llegan a tener un vigor germinativo bajo, es decir, un lento proceso de germinación. En vista de que las semillas de dichas cactáceas, y de todas en términos generales, están en el suelo de zonas áridas, son sujetas a periodos de discontinua hidratación (Rioja y Romero, 2002), debido a las cortas temporadas de lluvias.

Dubrovsky (1996) realizó un estudio con las tres cactáceas mencionadas anteriormente, las sometió a diferentes periodos de hidratación (24, 48, 72 horas) seguidos por periodos de deshidratación (4,14,120,180 días), obteniendo como resultados la confirmación de la existencia de un fenómeno llamado “memoria de hidratación de la semilla”, es decir, la capacidad de las semillas de retener durante periodos de deshidratación aquellos cambios fisiológicos que resultan de la hidratación de la semilla, así, las semillas tratadas germinaron antes que los testigos. Con los datos de semillas totales y semillas germinadas se calculó el potencial de biomasa llevando a una mayor supervivencia en la germinación de las semillas tratadas que en aquellas que no lo fueron (Rioja y Romero 2002).

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El Cultivo de Tejidos es una técnica que se basa en la totipotencialidad celular lo que hace posible dividir un organismo en sus estructuras constituyentes como semillas, embriones, órganos, tejidos, células y/o protoplastos; para posteriormente cultivarlas asépticamente *in vitro* en condiciones controladas (medio nutritivo, pH, luz, temperatura, atmósfera, reguladores de crecimiento, etc.) permitiendo al investigador variar las condiciones del cultivo y/o el tipo de explante y de esta manera llegar a dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células.

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

Haberlandt (1902) fue el primero en intentar el cultivo sistemático *in vitro* de células somáticas de plantas superiores, a fin 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).

En general existen tres procesos morfogenéticos básicos para lograr la multiplicación *in vitro*:

- 1) Producción de brotes a partir de meristemos preexistentes.
- 2) Producción de brotes que surgen de meristemos *de novo* (organogénesis).
- 3) La formación de embriones somáticos (embriogénesis somática) (Stuppy y Nagl, 1992).

La organogénesis involucra dos procesos, la organogénesis directa y la organogénesis indirecta. La organogénesis directa se define como la formación de brotes adventicios directamente de los tejidos del explante sin que intervenga una fase previa de formación de callo, mientras que en la organogénesis indirecta los brotes adventicios se regeneran a partir de las células de callo que se formaron provenientes de los tejidos originales del explante (George y Sherrington, 1984).

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

El callo consiste de una masa amorfa de células parenquimáticas de pared delgada arregladas de manera laxa que surgen a partir de la proliferación de células provenientes del explante. Frecuentemente, como resultado de una herida, el callo se forma en la zona de corte de un tallo, raíz u hoja. El estímulo que involucra la iniciación del callo a partir de heridas se da a partir de las hormonas endógenas auxinas y citocininas (Dodds y Roberts, 1995). Usando técnicas de cultivo de tejidos, la formación de callo puede ser inducida en tejidos y órganos que usualmente no desarrollan callo en respuesta a una herida (Street, 1969).

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. Inducción de competencia morfogénica o fase de preinducción: las células adquieren o recuperan la capacidad de dividirse, como en sus etapas inmaduras, y resultan capaces de respuestas morfogénicas (de generar nuevos tejidos, órganos y/o embriones).

2. Fase de inducción o determinación: bajo las condiciones de cultivo las células pueden seguir una ruta morfogénica definida, organogénica o embriogénica).

3. Fase de expresión o de post-iniciación: ocurre el crecimiento y diferenciación de estructuras.

El inicio del desarrollo y los eventos morfogénicos en un explante aislado *in vitro* es asociado en las primeras etapas con la pérdida de control coordinado, correlativo e integrado. El aislamiento y daño del explante, la exposición a nuevas señales provenientes del medio de cultivo y la formación de nuevos gradientes, induce series de eventos moleculares y fisiológicos que llevan a la desdiferenciación. En la mayoría de las plantas estudiadas los eventos tempranos que siguen al aislamiento del explante, resultan en la división no organizada y el crecimiento de las células, seguido por la formación de callo. La reorganización comienza con una división celular más coordinada y la formación de centros de crecimiento meristemático. Cuando se establece una nueva correlación entre células dentro del meristemo, la expresión morfogénica organizada y rediferenciación sucede. Esto es seguido por la formación de estructuras unipolares o bipolares, órganos a través de la organogénesis o embriones a partir de embriogénesis somática (Smigocki y Owens, 1999).

La morfogénesis en plantas ya sea *in vivo* o *in vitro* es un complejo evento de desarrollo. La morfogénesis, como la define Wardlaw (1968), es un cambio fisiológico y/o morfológico que permite la especialización de una célula, tejido, órgano o una planta completa durante su desarrollo. La morfogénesis involucra el desarrollo de células diferentes de la célula madre y la diferenciación y arreglo de estas células en un orden definido como resultado de la división celular de acuerdo a un plan y secuencia específicos (Smigocki y Owens, 1999).

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 morfogénica 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). Skoog y Miller, en 1957 (citados por George y Sherrington, 1984), demostraron que los reguladores de crecimiento y los compuestos orgánicos,

pueden estimular, inhibir, o modificar diversos procesos fisiológicos de las plantas, constituyen junto con el tipo y estado de desarrollo del explante los factores más importantes en la determinación de las repuestas morfogénicas de los tejidos (Litz y Jaiswal, 1991).

Los reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo de tejidos vegetales son aquellos que promueven el crecimiento y el desarrollo, tales como las auxinas y las citocininas. Las auxinas estimulan la elongación celular, activan el crecimiento en espesor de los tallos y promueven la rizogénesis. Se sintetizan y se encuentran principalmente en los meristemos apicales y son transportados al resto de la planta, principalmente a la raíz, de manera basipétala.

Las citocininas tienen como efecto principal la diferenciación y división celular y retardan la senescencia de los órganos y tejidos, las citocininas se sintetizan principalmente en regiones de crecimiento activo, sobre todo en los meristemos apicales de las raíces, de donde son transportadas al resto de la planta mediante el transporte acropétalo.

En los tejidos cultivados *in vitro* generalmente una concentración alta de auxinas con respecto a las citocininas promueve la formación de callo y raíces y es promotora de la inducción de embriogénesis somática, en cambio una concentración alta de citocininas respecto a la de auxinas induce la formación de brotes, mientras que la formación de callo puede ocurrir en un amplio rango de concentraciones de ambos reguladores de crecimiento (George y Sherrington, 1984), es decir, los procesos morfogénicos que permiten la regeneración de nuevos individuos, ocurren bajo condiciones de cultivo más estrictas y precisas.

Thorpe (1980) reconoce por lo menos tres requerimientos fisiológicos: a) de diferenciación 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).

El cultivo de tejidos vegetales ha sido aplicado a aspectos tan diversos como: mejoramiento de plantas de interés alimenticio, hortícola, medicinal, 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 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 la 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 organogénesis indirecta puedan acumular cambios genéticos. 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 (planta madre), 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 endogamia, la variación somaclonal puede resultar una herramienta importante que incorpore una nueva variación que permitan a la especie tener una mayor oportunidad de sobrevivir (Sharp *et al.*, 1980; Bramwell, 1990; Jacobsen y Domen, 1990 citados por Fay, 1994) o bien obtener nuevos genotipos de interés ornamental agrícola o forestal.

EL USO DE SEMILLAS COMO FUENTE DE EXPLANTES

Las superficies de las plantas contienen un gran número de agentes microbianos y 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 cultivos resulta ser muy conveniente ya que tras una esterilización superficial pueden germinarse en condiciones asépticas *in vitro* y se obtienen plántulas libres de contaminación (bacterias, hongos, esporas) (George y Sherrington, 1984). Por lo general resulta más difícil la desinfección de material vegetativo debido a que puede ser susceptible a sufrir daños ocasionados por los agentes desinfectantes si se utilizan en altas concentraciones, en cambio las semillas al ser estructuras que por naturaleza tienen una gran resistencia pueden soportar un proceso de desinfección más enérgico y profundo. Si el fin de la micropropagación de especies escasas en la naturaleza es su conservación, la utilización de semillas es muy importante ya que se estarían iniciando los cultivos a partir de la unidad fundamental de variabilidad genética de las plantas.

CULTIVO DE TEJIDOS DE CACTÁCEAS.

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

Gracias a las técnicas de cultivo de tejidos se pueden llegar a superar algunas de las dificultades asociadas a la propagación convencional de especies escasas en la naturaleza y de aquellas difíciles de propagar. Desde finales de la década de 1950 se han reportado investigaciones utilizando el cultivo de tejidos como herramienta para el estudio de cactáceas; Sachar y Iyer (1959) investigaron los efectos de auxinas, citocininas y giberelinas en la formación de callo a partir de tejido placentar de *Opuntia dillenii*; Colomas (1971) estableció cultivos de tejidos a partir de fragmentos de tallo de *Pachycereus pringlei*; Minocha y Mehra (1974) encontraron que la inducción de callo en gran variedad de tejidos de *Mammillaria prolifera* era dependiente de la presencia de 2,4-D en el medio de cultivo (Fay y Gratton, 1992). En 1976 (Kolar *et al.*) se reportó por primera vez la regeneración vía cultivo de tejidos con *Mammillaria woodsii*; Mauseth (1979a) reportó por primera vez propagación vegetativa de cactáceas *in vitro* sin pasar por la fase de callo. La regeneración *in vitro* de especies de cactáceas raras o en peligro de extinción ha sido reportada por un gran número de autores (Tabla 2), entre éstas se encuentran *Cephalocereus senilis* (Nava-Esparza y Yáñez, 1984), *Mammillaria san-angelensis* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), y *Turbincarpus laui* (Mata Rosas *et al.*, 2001).

El tipo de explante utilizado para la micropropagación es un factor importante, se ha encontrado que distintos tipos de tejidos pueden ser óptimos en diferentes especies. En cactáceas, se ha utilizado principalmente el tallo de la planta, ya sea que provenga de plantas maduras o de plántulas germinadas *in vitro*, el cual ha sido disectado de diferentes formas para obtener secciones apicales, laterales o basales de tubérculos o sólo de areólas (Tabla 2).

Las cactáceas al igual que las demás angiospermas, tienen las yemas localizadas en el sitio donde la hoja se une al tallo (yemas axilares). Estas yemas en las cactáceas se denominan areólas y

es donde se forman las espinas (hojas modificadas) y los órganos florales. Las areólas normalmente son inactivas después de que han formado las espinas, sin embargo, pueden ser reactivadas *in vitro* para producir brotes (Mauseth, 1979b; Bonness *et al.*, 1993). Los tubérculos que contienen a las areólas son análogos a la base de las hojas de las demás plantas con flores (Johnson y Emimo, 1979b; Mauseth, 1979b).

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

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

Durante los últimos años se ha demostrado que la proliferación de brotes *in vitro* de cactáceas puede lograrse a través del rompimiento de la dominancia apical, y de esta forma activar la yemas axilares (areólas) con la adición de citocininas al medio de cultivo, o bien de la combinación de citocininas y auxinas en concentraciones muy bajas (Fay y Gratton, 1992). Los resultados obtenidos indican que esta interacción puede tener diferentes efectos dependiendo de la especie.

Clayton *et al.* (1990) llevó a cabo experimentos detallados de los requerimientos de cultivo de 11 especies raras y en peligro de extinción y encontraron que el medio MS o medio L2 (Phillips y Collins, 1979) son adecuados para un rango de especies. La Z mostró ser la citosina más efectiva para la inducción de proliferación de brotes en *Pediocactus*, *Sclerocactus* y *Toumeyia* spp (Fay y Gratton, 1992).

Dobckaussen *et al.* (1991) estudiaron los factores que afectan la activación de las areólas en *Sulcorbutia alba*, y encontró que el medio MS modificado (con macronutrientes a 1.5 veces que la

concentración normal y 0.25-1.0 mg/l de BAP) dio resultados óptimos (Fay y Gratton, 1992). Pelah *et al.* (2002) lograron la regeneración de brotes adventicios de *Selenicereus megalanthus* utilizando los cotiledones, hipocótilos y epicótilos en medio MS adicionado con TDZ.

Un avance importante es la inducción de embriogénesis somática en callo derivado de plántulas de *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992; Oguín, 1994). Moebious-Goldammer *et al.* (2003) reportan la formación de embriones somáticos de *A. kotschoubeyanus* en alrededor del 20% de los explantes cultivados en medio MS con combinaciones de BAP (2-5 mg/l) y ANA (0.1-1.0)

El cultivo de tejidos de cactáceas también ha sido utilizado para otros propósitos diferentes de la micropropogación. Seení y Graham (1980) usaron cultivos en suspensión de *Chamaecereus silvestrii* (*Echinopsis chamaecereus*) para estudiar la fotosíntesis CAM. Mauseth (1984) estudio *in vitro* la ultraestructura del ápice de tallo de *Opuntia polyacantha*, Paré *et al.* (1991) cultivos en suspensión de células para investigar la producción de fitoalexinas en *Cephalocereus senilis* (Fay y Gratton, 1992).

Son diversos los trabajos de regeneración *in vitro* enfocados a establecer condiciones para una micropropagación de cactáceas que se han llevado a cabo en México en los últimos años: *Echinocactus platyacanthus*, *Astrophytum capricorne* (Cárdenas y Torres, 1991), *Aztekium ritteri* (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992), *Melocactus bellavistensis* (Hernández *et al.*, 1993), *Ariocarpus retusus* (Olguín, 1994), *Heliocereus elegantissimus* var. *alegantissimus* (Ortiz-Montiel y Vargas-Figueroa, 1995), *Ferocactus hamatacanthus*, *Ferocactus pilosus*, *Coryphanta clavata*, *Astrophytum myriostigma* entre otras (Pérez *et al.*, 1995), *Strombocactus disiformis* y *Turbincarpus pseudomacroechele* (Soltero, 1996), *Ephitelantha micromeris* (Velázquez y Soltero, 2001), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebious-Goldammer *et al.*, 2003), por mencionar algunos, en donde el empleo del medio de cultivo MS y el método de propagación por regeneración de brotes axilares, resultó ser el más adecuado para la propagación éstas de cactáceas (Arias-Azcona, 2002). No obstante estos resultados, existen numerosas especies, que por su crítica situación resulta urgente realizar estudios dirigidos a su conservación antes de que desaparezcan de la naturaleza.

Tabla 2. Algunas especies de Cactáceas regeneradas *in vitro* (basado en Fay y Gratton, 1994).

ESPECIE	EXPLANTE	REFERENCIA
<i>Ariocarpus retusus</i>	Semillas	Stupy y Nagl, 1992
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	Tejidos de plántulas	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003
<i>A. trigonus</i>	Semillas	Starling y Hutson, 1984
<i>Astrophytum miriostigma</i>	Brotos laterales	Vyskot y Jára, 1984
<i>Cephalocereus senilis</i>	Tejidos de plántulas	Nava-Esparza y Yánez, 1994
<i>Echinocactus grusonii</i>	Tejidos de plántulas	Delgadillo-Reinoso, 1990
<i>Echinocereus dasyacanthus</i>	Tejidos de plántulas	Ault y Blackmon, 1985
<i>Echinopsis chamacereus</i> (<i>Chamacereus silvestrii</i>)	Brotos laterales	Mauseth, 1979
<i>E. spachianus</i> (<i>Trichocereus spachianus</i>)	Brotos laterales	Vyskot y Jára, 1984
<i>Epiphyllum chrysocardium</i>	Secciones de tallo	Gaiser <i>et al.</i> , 1981; Lazarte <i>et al.</i> , 1982
<i>Epiphyllum</i> (híbrido)	Yemas laterales	Mauseth, 1979
<i>Epithelantha micromeris</i>	Semillas	Ronse, com. pers.
<i>Escobaria missouriensis</i>	Tejidos de plántulas	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>E. robbinsorum</i>	Tejidos de plántulas	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Ferocactus cylindraceus</i>	Tejidos de plántulas	Ault y Blackmon, 1987
<i>F. covillei</i> , <i>F. wislizeni</i>	Tejidos de plántulas	Ault y Blackmon, 1987
<i>Hatiora salicornioides</i>	Yemas laterales	Mauseth, 1979
<i>Hylocereus calcaratus</i>	Yemas laterales	Johnson y Emino, 1979b
<i>Leuchtenbergia principis</i>	Tejidos de plántulas	Starling y Hutson, 1984; Starling 1985
<i>Lobivia binghamiana</i>	Yemas laterales	Mauseth, 1979
<i>Mammillaria carmenae</i>	Yemas laterales	Vyskot y Jára, 1984
<i>M. duwei</i>	Tejidos de plántulas	Delgadillo-Reynoso, 1990
<i>M. elongata</i>	Yemas laterales	Johnson y Emino, 1979a,b; Mauseth, 1979; Mehra y Cheema, 1980
<i>M. goldii</i> , <i>M. hernandezii</i> , <i>M. humboldtii</i>	Yemas laterales	Pocock, com. pers.
<i>M. huitzilopochtli</i>	Tejidos de plántulas	Rubluo <i>et al.</i> , 1990
<i>M. prolifera</i>	Yemas laterales	Vyskot y Jára, 1984
<i>M. san-angelensis</i>	Tejidos de plántulas	Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989
<i>M. woodsii</i>	Médula	Kolár <i>et al.</i> , 1976
<i>M. wrightii</i>	Ápices de tallo	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>M. sp.</i>	Óvulos	Corneanu <i>et al.</i> , 1990
<i>M. spp.</i> (21 spp.)	Tejidos de plántulas	Damiano <i>et al.</i> , 1986

<i>Oputia amyclaea</i>	Yemas laterales	Escobar A. <i>et al.</i> , 1986
<i>O. basilaris</i>	Yemas laterales	Mauseth, 1979
<i>O. echios</i> var. <i>gigantea</i>	Yemas laterales	Fay y Muir (1990)
<i>O. polyacantha</i>	Yemas laterales	Jonhson y Emينو, 1979b; Mauseth, 1979
<i>Opuntia</i> sp. (“ <i>Tephrocactus chilensis</i> ”)	Semillas	Krulik, 1980
<i>Pachycereus pringlei</i>	Yemas laterales	Mauseth, 1979
<i>Pediocactus bradyi</i>	Apices de tallo	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. despainii</i>	Ápices de tallo	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. knowltoni</i>	Tejidos de plántulas	Simerda, 1990
<i>P. paradinei</i>	Ápices de tallo	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. peeblesianus</i> spp. “ <i>fickeisenii</i> ”	Ápices de tallo	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. winkleri</i>	Tejidos de plántulas	Simerda, 1990
<i>Pereskia aculeata</i>	Apices de tallo	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Rebutia canigueralii</i>	Yemas laterales	Mauseth, 1979
<i>Rhipsalis teres</i>	Yemas laterales	Debekaussen <i>et al.</i> , 1991
<i>Selenicereus grandiflorus</i>	Yemas laterales	Jonhson y Emينو, 1979b
<i>Sclerocactus mesae-verdae</i>	Yemas laterales	Mauseth, 1979
<i>S. papyracanthus</i>	Ápices de tallo	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>S. spinsor</i>	Tejidos de plántulas	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Turbincarpus laui</i>	Tejidos de plántulas	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>T. lophophoroides</i>	Tejidos de plántulas	Mata-Rosas <i>et al.</i> , 2001
	Semillas	Ronse, com. pers.

JUSTIFICACIÓN

Existen muy pocos estudios sobre *Pelecypora strobiliformis* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Anderson *et al.*, 1994), éstos indican que las poblaciones naturales de la especie se encuentran muy amenazadas y que su hábitat se encuentra en un proceso de degradación debido a la actividad del hombre. Este desconocimiento hace imperativo que se realicen esfuerzos encaminados a la conservación de este recurso ecológico y genético antes de que desaparezca.

En cuanto a la información que sobre cultivo de tejidos se refiere, existen cuatro estudios (Arias-Azcona, 2002; Dávila-Figueroa y Pérez-Molphe-Balch, 2002; Giusti *et al.*, 2002; Santos-Díaz *et al.*, 2002) que reportan la inducción de organogénesis directa e indirecta a partir de plántulas germinadas *in vitro*. Los resultados obtenidos en estas investigaciones apuntan hacia el desarrollo de una metodología de micropropagación que puede ayudar a salvar a la especie del grave peligro en que se encuentra, sin embargo es necesario profundizar en estas investigaciones, debido a que los resultados que reportaron difieren entre si, para determinar las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento que permitan maximizar la producción de regenerantes en el menor tiempo.

OBJETIVOS

General

- Establecer condiciones experimentales para lograr la regeneración *in vitro* de *Pelecypora strobiliformis* (Wendermann) Frič *et* Schelle.

Particulares

- Explorar el potencial morfogenético de secciones de plántulas germinadas *in vitro*.
- Determinar los requerimientos de citocininas (BAP) y auxinas (ANA) promotores del desarrollo de brotes y/o embriones somáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO (COLECTA DE SEMILLAS)

Se colectaron 80 semillas de *P. strobiliformis* (Wendermann) Frič *et* Schelle a partir de 15 ejemplares que se conservan en el Área de Colecciones del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Para colectarlas se utilizaron pinzas de relojero y agujas de disección. Con la ayuda de las agujas se separaron los tubérculos del cuerpo de la planta y con las pinzas se tomaron las semillas que se encontraron entre la lana.

DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN

Las semillas se dividieron en dos lotes de 30 semillas cada uno y uno de 20 semillas, se desinfectaron superficialmente y sembraron con una diferencia de dos semanas entre cada lote de acuerdo a los siguientes pasos.

- Se lavaron en una solución de detergente comercial en agitación constante durante 15 minutos.
- Se enjuagaron con agua destilada.
- Se colocaron en alcohol etílico industrial al 70% durante 30 segundos en agitación constante.
- Posteriormente se desinfectaron con una solución de blanqueador comercial (NaOCl 6% de cloro activo) al 30% (v/v), adicionado con 2 gotas/100 ml de Tween 80 en agitación constante durante 20 minutos.
- Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se enjuagaron tres veces con agua bidestilada y esterilizada.

- Finalmente las semillas se sembraron en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad con 25 ml de medio de cultivo líquido y con puente de papel filtro Whatman No.1 , se colocaron 5 semillas por frasco. El medio utilizado fue Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa 30 g/l, el pH se ajustó a 5.7 con HCl y NaOH, 0.1-0.5 N previo a su esterilización en autoclave a 120°C y una presión de 1.5 Kg/cm² durante 17 minutos.
- El porcentaje de germinación se registró cada 7 días, durante dos meses.

CULTIVO DE SECCIONES DE PLÁNTULAS

EXPLANTES

Cuando las plántulas alcanzaron una altura de 1-1.5 cm (aproximadamente 1.5-2 meses de haber germinado) fueron divididas con un corte longitudinal y sembradas con el área del corte en contacto con el medio de inducción MS líquido con puentes de papel filtro Whatman No.1 adicionado con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento BAP/ANA y carbón activado 0.5 g/l.

INDUCCIÓN DE RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS

Para tratar de inducir respuestas morfogénicas se utilizó medio MS líquido con puente de papel filtro adicionado con todas las posibles combinaciones de BAP (0, 1, 2, 3 mg/l) y ANA (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/l) (Tabla 3). Se sembró un explante por frasco de cultivo con 4 repeticiones para cada tratamiento.

Se realizaron observaciones semanales durante seis meses registrando las posibles respuestas, como la formación de callo, raíces, brotes directos y/o indirectos así como la formación de embriones somáticos.

Tabla 3. Tratamientos con reguladores de crecimiento (BAP/ANA) para la inducción de respuestas morfogénicas en secciones longitudinales de plántulas de *P. strobiliformis*, cultivadas en medio MS, 25±2°C, fotoperiodo 16h (PAR 50µMol/m²/s).

BAP/ANA (mg/l)	0	0.1	0.5	1	2
0	0/0	0/0.1	0/0.5	0/1	0/2
1	1/0	1/0.1	1/0.5	1/1	1/2
2	2/0	2/0.1	2/0.5	2/1	2/2
3	3/0	3/0.1	3/0.5	3/1	3/2

DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Después de 8 semanas en el medio de inducción, los explantes se subcultivaron en medio MS 50%, sacarosa 30g/l, adicionado con carbón activado (1 g/l) y solidificado con agar bacteriológico (8.5 g/l). Se realizaron subcultivos cada dos meses (dos veces) de todos los tejidos en la misma formulación de medio MS 50% fresco para promover el desarrollo y maduración de los brotes regenerados.

INCUBACION DE LOS CULTIVOS

Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas, con una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas y una intensidad luminosa de $29.29\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ (PAR $50\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se cuantificó el número de brotes producidos por explante, regenerados por vía organogénesis directa y/o indirecta por cada uno de los 20 tratamientos con BAP/ANA, estos datos fueron capturados en EXCEL y se les aplicó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía utilizando el software SPSS. Finalmente se hizo una prueba de mínima diferencia significativa a fin de poder discriminar las diferencias entre los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Bajo las condiciones de cultivo ensayadas se logró la germinación de las semillas, los porcentajes de germinación obtenidos para semillas de *P. strobiliformis* en medio MS líquido con puentes de papel filtro fueron de 85.71%, 86.66% y 93.33% (89.23% de germinación total de los tres lotes) en un período de 7-14 días (Tabla 4); sólo ocurrió contaminación fúngica en el segundo lote y fue del 6.6%, estos valores no variaron al término de los dos meses de cultivo. Después de 14 días ninguna de las semillas restantes germinó.

Tabla 4. Porcentajes de germinación de semillas de *P. strobiliformis* sembradas en medio MS líquido en puentes de papel filtro, 5 semillas por frasco de medio de cultivo, se sembraron 30 semillas en el primer y segundo lote y 20 semillas en el tercer lote, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h $29.29\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ (PAR $50\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$). Resultados después de 14 días de cultivo.

LOTE	7 DÍAS (%)	14 DÍAS (%)	CONTAMINACIÓN (%)
1	85.71	85.71	0
2	75.56	86.66	6.6
3	73.45	93.33	0

Mata-Rosas *et al* (2001) reportaron para *Turbinicarpus laui* porcentajes de germinación del 41.7% y 28.1% en medio MS y MS50% respectivamente; Olgúin (1994) trabajó con *Aricarpus retusus* y obtuvo 66.3%, 63.8% y 33% en MS, MS50% con 15 g/l de sacarosa y MS50% con 30 g/l de sacarosa respectivamente; Moebius-Goldammer *et al.* (2003) reportan alrededor del 70% de germinación de semillas sembradas *in vitro* de *A. kotschoubeyanus*. Giusti *et al* (2002) lograron una germinación del 46% con semillas de *P. aselliformis* utilizando como método de germinación puentes de papel filtro en cajas Petri adicionando agua destilada y esterilizada, Pérez-Molphe-Bach y Dávila-Figueroa (2002) reportan porcentajes de germinación de alrededor del 50% para *P. aselliformis* y *P. strobiliformis* en medio MS. Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos con *P. strobiliformis* en el presente estudio pueden depender sobre todo del estado fisiológico de las semillas al momento de ser sembradas y de la composición del medio utilizado para la germinación.

Las semillas de *P. strobiliformis* fueron colectadas de distintos individuos a distintos tiempos y germinaron en altos porcentajes dentro de las dos primeras semanas de cultivo,

probando con ello su quiescencia, sin embargo no germinó el 100% de ellas, lo cual se puede interpretar como una adaptación de la especie para asegurar su sobrevivencia, lo que implica posiblemente algún tipo de dormancia. En el presente estudio las plantas de las que se extrajeron las semillas de *P. strobiliformis* provenían de campo y habían pasado varios años en invernadero, donde eran sometidas a un riego controlado y aplicado con regularidad lo que pudo haber estimulado el fenómeno de “memoria de hidratación de semilla” y por consiguiente el elevado porcentaje de germinación obtenido, a diferencia de la mayoría de los demás estudios de cultivo *in vitro* que se mencionaron anteriormente (Mata-Rosas *et al.*, 2001; Olguín, 1994; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Gusti *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Bach y Dávila-Figueroa, 2002) para los que las semillas provenían de bancos de semillas o de colectas realizadas en el campo donde no hay los aportes de agua o son menos frecuentes. Otro factor que pudo influir en la elevada tasa de germinación fue el hecho de que las condiciones de germinación fueron diferentes a las de otros trabajos en los cuales las semillas fueron puestas a germinar en medio MS semisólido (a excepción de Gusti *et al.*, 2002) y debido a esto la disponibilidad del agua pudo ser relativamente menor en comparación con el medio líquido utilizado en el presente trabajo para el que se germinaron en medio MS líquido con puentes de papel filtro lo que probablemente favoreció la imbibición de las semillas y por consiguiente se pudo establecer una mejor condición para la hidratación de las mismas. Esta condición es necesaria para romper la dormancia de las semillas en la mayoría de las cactáceas (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000; Rioja y Romero 2002).

La madurez del embrión es otro factor que puede causar la dormancia innata, las semillas necesitan un período de tiempo posterior a la maduración para germinar (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Esto ha sido reportado para *Eriocereus bonplandii* y *Mammillaria zeilmanniana*, cuyas tasas de germinación se incrementan con la edad (Zimmer, 1967, 1969b). Sin haber podido establecer la edad de las semillas utilizadas en este estudio con *P. strobiliformis* éstas tenían más de un cinco años de edad ya que son los años que tienen las plantas de *P. strobiliformis* en el Jardín Botánico IB-UNAM y durante ese periodo de tiempo no se presentó una floración sincrónica de los individuos que permitiera realizar la polinización cruzada, los frutos no provenían de los tubérculos apicales donde se lleva a cabo la floración más reciente, por lo que los embriones estuvieran viables y maduros en el momento de ser sembrados.

La temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) en combinación con la edad (más de 5 años) pudo influir en los porcentajes de germinación de las semillas de *P. strobiliformis*. En estudios de germinación

efectuados con semillas jóvenes de *Ferocactus latispinus* var. *spiralis* se obtuvieron porcentajes de germinación por debajo del 50% y no germinaron entre 20 y 35°C, sin embargo semillas de 45 meses de edad germinaron sobre el 80% en un intervalo de 20-35°C (Zimmer, 1980). Esto también se ha demostrado en semillas de *Opuntia rastrera* (Mandujano *et al.*, 1997).

Las cactáceas tienen un amplio intervalo de respuesta a la temperatura, para la mayoría de las especies los rangos van de 17 a 34°C, con valores óptimos frecuentemente de 25°C (Nobel, 1988). De los estudios de Zimmer (1967, 1968a, 1969a,b, 1970, 1971, 1973a,b), Fern (1974, 1981), Kwack y Zimmer (1978) y Nobel (1988), se pueden hacer las siguientes observaciones sobre el efecto que la temperatura puede tener en la germinación de las semillas de cactáceas:

1. Temperaturas extremas no favorecen la germinación, siendo éstas debajo de 12°C y sobre 28°C. Una temperatura de 20±2°C promueve óptimas tasas de germinación en un gran número de especies.
2. Diferentes especies tienen diferentes respuestas a la temperatura.
3. El tiempo para completar la germinación decrece cuando la temperatura se incrementa (ej. *Astrophytum myriostigma* y *Gymnocalycium mihanovichi*).
4. La respuesta a la temperatura depende de la edad de la semilla (Ej. la temperatura óptima de las semillas de *Parodia chrysacanthion* es menor cuando tiene 1 año de edad que para las de 7 años).
5. Semillas muy viejas toman más tiempo en germinar que las semillas jóvenes (Ej. *Maihuenia poeppigii*) (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Bregman y Bouman (1983) estudiaron patrones de germinación en relación a líneas de desarrollo morfológicas y filogenéticas, encontrando que la mayoría de las semillas de cactáceas germinan dentro de un período de una semana, como pudo observarse en el presente estudio con las semillas de *P. strobiliformis*, pero en la subfamilia Opuntioideae puede tomar algunos meses. Debido a que estas semillas son inoperculadas y tienen un arilo esclerificado, que les permite sobrevivir al paso por el tracto digestivo de los pájaros (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

En el presente estudio, las semillas de *P. strobiliformis*, germinaron mostrando primero la emergencia de la radícula y a continuación aparecieron los cotiledones, al término de 1.5-2 meses desarrollaron 1-2 tubérculos apicales, en raras ocasiones se presentaron 3 e incluso 4 tubérculos apicales, éstos poseían espinas setosas que rodeaban a la areola, tenían una coloración verde olivo. Su morfología y consistencia por lo general era similar al de una plántula germinada en

condiciones naturales aunque en ocasiones algunas plántulas se hiperhidrataron ligeramente adquiriendo un color verde pálido y se volvieron translúcidas. En algunos casos la hiperhidratación del tejido propició que la plántula se reventara (2.5). En general las plántulas presentaron una raíz ramificada de 0.5-1.5 cm de longitud, en muy raras ocasiones no se desarrolló una raíz sino solamente una pequeña radícula al momento de la germinación que posteriormente no continuó su crecimiento.

CULTIVO DE SECCIONES DE PLÁNTULAS

EXPLANTES

Después de un período de mes y medio a dos meses a partir de la germinación de las semillas *in vitro*, las plántulas alcanzaron una talla de 1-1.5 cm y formaron 2-3 tubérculos. Los cultivos iniciales se establecieron al dividir las plántulas en tres secciones, ápice y dos mitades del hipocótilo (Figura 2). En un principio sólo se sembraron los tratamientos 0/0, 0/0.1, 0/.5, 0/1, 0/2, 1/0, 1/0.1, los ápices manifestaron una capacidad muy superior a la de las secciones de hipocótilo para recuperarse del corte, controlar la oxidación, sobrevivir y generar nuevas estructuras, sin embargo las secciones del hipocótilo presentaron una oxidación masiva resultando en la muerte de todos los explantes dentro de los primeros 10 días de cultivo (Figura 3), a pesar de que fueron puestos en oscuridad al tercer día de iniciado el cultivo. En los tratamientos sembrados, el ápice mostró como respuesta el crecimiento y generación de nuevos tubérculos, las respuestas de estos tratamientos fueron registradas, pero no fueron utilizadas en el análisis de datos que se presenta en este estudio.

Las cactáceas generan muchos compuestos fenólicos de manera natural, la oxidación ocurre por la acción de enzimas tales como polifenol oxidasa y tirosinasa (Lerch 1981) que son liberadas o sintetizadas y expuestas a condiciones oxidativas cuando los tejidos son dañados. Los sustratos para dichas enzimas varían dependiendo de los tejidos, siendo comúnmente tirosina y o-hidroxi-fenoles tales como el ácido clorogénico. Generalmente los sustratos y las enzimas son almacenados en distintos compartimientos dentro de la célula y se unen cuando la célula es dañada o se encuentra moribunda (George y Sherrington, 1984). El daño sufrido por las plántulas de *P. strobiliformis* al ser seccionadas en tres partes resultó ser demasiado grande y posiblemente provocó la liberación de muchos compuestos fenólicos que resultaron ser muy tóxicos para las secciones de hipocótilo. La toxicidad de los fenoles se debe probablemente a que rompen los

enlaces de hidrógeno de las proteínas (George y Sherrington, 1984), debido a que las plántulas de *P. strobiliformis* eran muy pequeñas esta respuesta pudo derivar en una necrosis masiva y muerte de todo el tejido. Una inhibición irreparable del crecimiento sucede cuando los fenoles son oxidados a compuestos de quinona altamente activos, los que ciclizan, polimerizan y/o oxidan proteínas para formar compuestos melánicos (George y Sherrington, 1984).

Se puede prevenir la oxidación de diferentes maneras:

- Removiendo los compuestos fenólicos: mediante lavados con agua destilada y esterilizada en el momento de la siembra, subcultivando periódicamente para evitar que los compuestos fenólicos se acumulen, absorción de los compuestos fenólicos con carbón activado o polivinilpirrolidona (George y Sherrington, 1984).
- Modificando el potencial redox: añadiendo agentes reductores, reduciendo la disponibilidad de oxígeno disectando bajo agua estéril o agua de coco (Lindemann *et al.*,1970 citado por George y Sherrington, 1984), o iniciando los cultivos de manera estacionaria en lugar de agitarlos (George y Sherrington, 1984).
- Inactivando la acción de las enzimas fenol oxidasas: agregando agentes quelantes, disminuyendo el pH mediante baños con ácido ascróbico o ácido cítrico, colocando los explantes en oscuridad (George y Sherrington 1984).

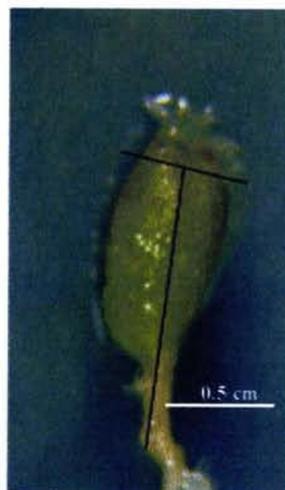


Figura 2. Plano de corte de las plántulas germinadas *in vitro* para la obtención de explantes (ápice, hipocótilo dividido longitudinalmente en 2 partes) en los ensayos iniciales.

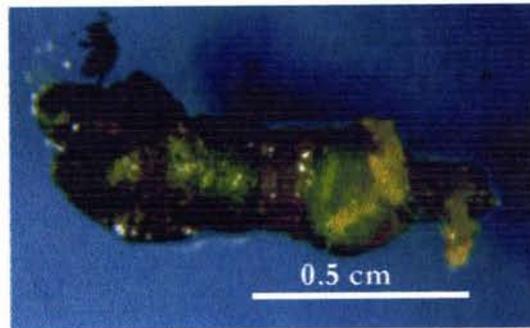


Figura 3. Sección de hipocótilo con necrosis por oxidación, la cual resultó letal para todos los cultivos iniciales de estos explantes (7-10 días de cultivo).

Para disminuir el daño ocasionado a los explantes y por lo tanto una severa respuesta de oxidación que pudiera resultar letal se realizó sólo un corte longitudinal (Figura 4), los explantes resultantes fueron dos secciones longitudinales de la plántula, se procuró que cada sección tuviera al menos un tubérculo apical, sin embargo la raíz solamente era conservada por uno de los explantes. De esta manera se pretendió aprovechar el escaso material con el que se contaba, aún así no se pudo completar el esquema de tratamientos (Tabla 3.) que se proyectó por lo que los tratamientos 3/0.5 y 3/1 no fueron sembrados.



Figura 4. Plano de corte de las plántulas germinadas *in vitro* para la obtención de explantes (2 secciones longitudinales) y así tratar de prevenir la oxidación de los tejidos.

Después de cuatro días de haber sido sembrados, los explantes comenzaron a mostrar señales de oxidación en la zona del corte por lo que fueron colocados en oscuridad total por un período de dos a tres semanas con el fin de disminuir la oxidación causada posiblemente por

compuestos fenólicos debido a que la actividad de las enzimas que los oxidan es estimulada por la radiación luminosa. Una vez pasado este periodo, los explantes se regresaron a las condiciones iniciales de incubación, la oxidación disminuyó en la mayoría de ellos y sobrevivieron, excepto en el tratamiento adicionado únicamente con 1 mg/l de BAP donde todos los explantes murieron a causa de la oxidación. Aún así todos los explantes sobrevivientes tomaron poco a poco un tono rojizo pero sin presentar necrosis generalizada de los tejidos (Figura 5).

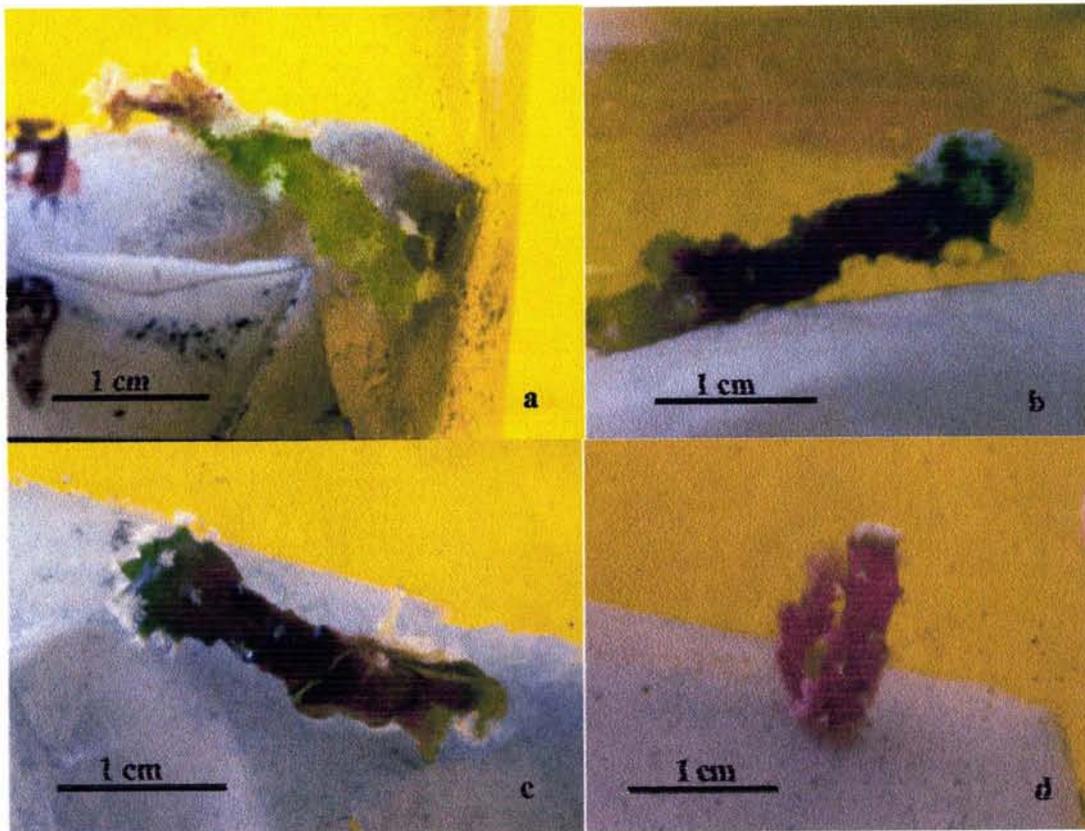


Figura 5. Explante etiolado (a), explantes con oxidación en el hipocótilo (b,c), explante rojizo (d).

Existen ventajas al usar plántulas germinadas *in vitro* como fuente de explantes, debido a que los tejidos jóvenes presentan una mayor capacidad regenerativa (Vyskot y Jara, 1984). Algunos estudios sugieren que los tejidos que provienen de meiosis reciente (anteras, secciones de plántulas, embriones) responden mejor a la regeneración *in vitro*, 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).

INDUCCIÓN DE RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS
ORGANOGENESIS DIRECTA

La tabla 5 muestra una relación del promedio de brotes por explante en cada tratamiento, al término de cada etapa de cultivo (2 meses en cada una).

Tabla 5. Desarrollo de brotes (promedio) a partir de secciones longitudinales de plántulas de *P. strobiliformis* germinadas asépticamente.

(BAP/ANA mg/l)	MEDIO DE INDUCCIÓN (2 MESES)		PRIMER SUBCULTIVO (4 MESES)		SEGUNDO SUBCULTIVO (6 MESES)	
	PROMEDIO	E.S.	PROMEDIO	E.S.	PROMEDIO	E.S.
0/0	0.5 *	0.5	1.25*	0.5	1*	0
0/0.1	2.25*	2.0	2.5*	1.9	8+	15.3
0/0.5	2.5+	3.0	6.75+	4.0	24.75+	20.4
0/1	0†	0	0†	0	0†	0
0/2	2.5*	2.5	3.5+	4.4	8+	7.6
1/0	1*	0	2.75+	2.3	8+	15.4
1/0.1	3.75*	3.4	1+	0.8	1++	1.1
1/0.5	0.75*	1.5	0.75+	1.5	8++	12.3
1/1	1.75+	0.9	1.25+	1.2	2.25++	2.5
1/2	1.5*	1	1.75+	0.9	2.75++	3.5
2/0	1.25*	1.8	1.5+	1.7	9.75+++	16.3
2/0.1	0.25*	0.5	0.25+	0.5	0.25++	0.5
2/0.5	2+	1.8	1+	1.1	8++	10.9
2/1	0.25*	0.5	0.75*	0.5	6++	6.6
2/2	0.5*	0.5	3.75+	4.3	3.25+	3.9
3/0	1.25+	1.2	1.5+	1.2	9.75+++	10.7
3/0.1	0.75+	0.5	1.75+	1.7	2+++	4.0
3/2	0.25+	0.5	0.5++	0.5	14.75++++	10.1

Callo:*ausencia, +escaso, ++regular, +++abundante, ++++muy abundante; † explantes perdidos por oxidación. Medio de inducción: MS líquido con puentes de papel filtro; Subcultivos: MS 50%, sacarosa 30 g/l, 8.5 g/l de bactoagar. E.S.= error estándar.

Eventos en la etapa de inducción

A partir de la segunda semana de haber sido sembrados en el medio de inducción los explantes de todos los tratamientos comenzaron a mostrar señales de la formación de nuevas areólas a lo largo del hipocótilo (Figura 6), siendo los tratamientos 0/0.5, 0/2, 1/0, 2/2 (Tabla 5) los que desarrollaron un mayor número de ellas, los explantes del control no desarrollaron ninguna areola. En un principio se formó una pequeña protuberancia que posteriormente desarrolló pequeñas espinas setosas, el diámetro de la areola era de 1 mm aproximadamente. Finalmente dichas protuberancias se desarrollaron conformando una areola bien definida (Figura 6).

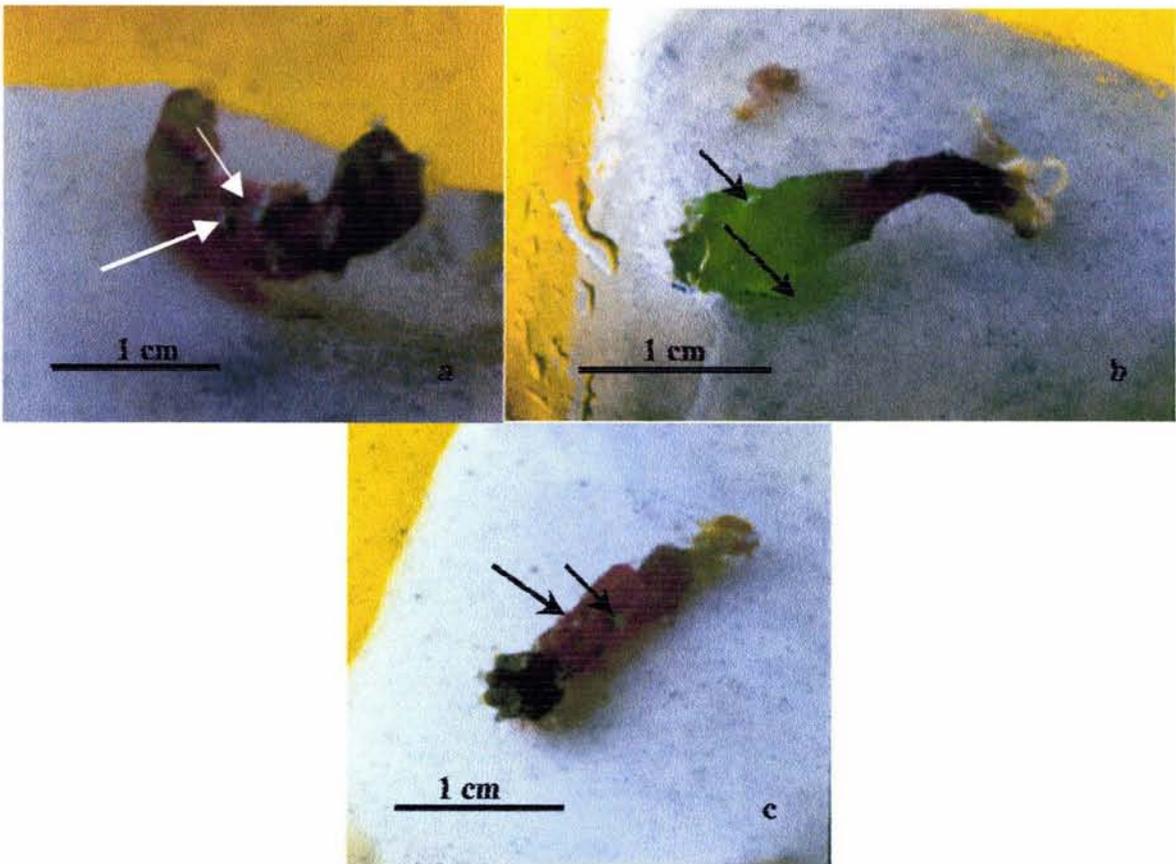


Figura 6. Desarrollo de nuevas areolas (→) en el hipocótilo de los explantes después de 1 mes en medio de inducción, 1/0.1 (a), 2/0.1 (b), 0/0.1 (c).

La mayoría de las areolas no mostraron desarrollo alguno después de llegar a ese estado mientras permanecieron en el medio de inducción, pero algunas de ellas continuaron creciendo formando una protuberancia de 2-3 mm de altura, en muchos casos se formaba un halo de color

naranja (solo visible en los explantes que conservaban el color verde) alrededor de las espinas (rodeando la areola propiamente dicha) (Figura 7), en todos los casos en los que se formó dicho halo se desarrolló un brote a partir de la areola, este proceso se presentó en de todos los tratamientos sin que se observará uno en el cual fuera un proceso dominante. Sin embargo, se observó la formación de nuevos brotes en areolas que no presentaron el halo en todos los tratamientos.

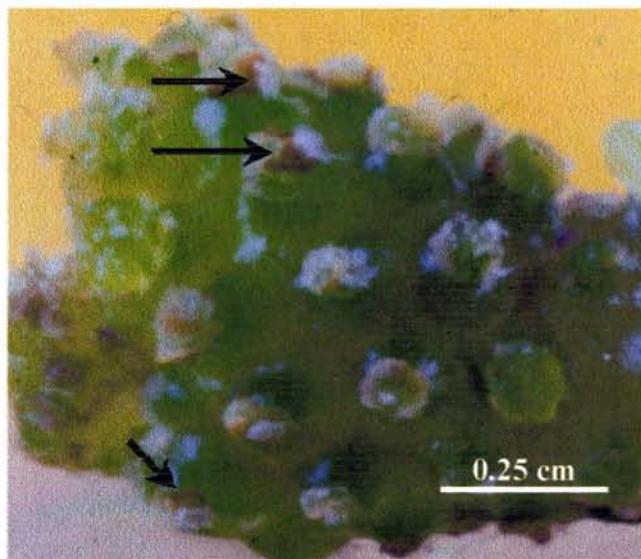


Figura 7. Acercamiento de un explante que presentó la formación del halo que precedía a la formación de brotes por organogénesis directa (→), en *P. strobiliformis*.

Tanto en los brotes que crecieron a partir de areolas que presentaban el halo como en las que no lo presentaron el desarrollo fue similar, sin que se presentaran diferencias que apuntaran hacia un origen diferente de los regenerantes. Los nuevos brotes en el medio de inducción comenzaron a desarrollarse a partir de la cuarta semana de iniciados los cultivos, primero se formó una masa esférica (nódulo) sobre la areola, subsecuentemente ésta creció y comenzó a mostrar indicios de que se trataba de un brote y no sólo una masa de células en crecimiento desordenado, comenzando con la aparición de protuberancias menores a 1 mm de diámetro y en el centro de éstas el tejido se tornaba ligeramente más oscuro que el resto del brote, constituyéndose como areolas. El brote continuó su crecimiento y cuando alcanzó una talla de 4-5 mm de diámetro se presentó la formación de pequeñas espinas setosas (Figura 8), provenientes de las zonas que tenían

un color más oscuro. En muchas ocasiones, en los brotes provenientes de los tratamientos con altas concentraciones de BAP, no se formaban espinas o éstas se desarrollaban cuando el brote había alcanzado una talla mayor (6-7 mm altura).

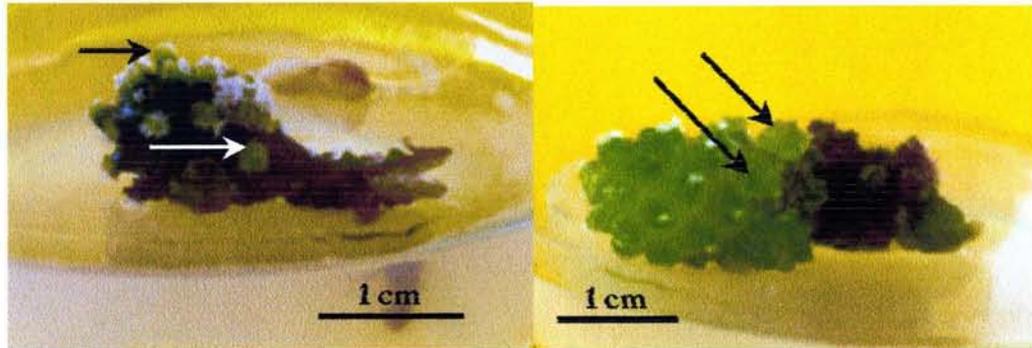


Figura 8. Crecimiento de los nuevos brotes a partir de las areolas del explante (→).

Los brotes continuaron creciendo y permanecieron unidos al explante. Muchos adquirieron pronto una morfología normal y posteriormente su crecimiento se volvió lento cuando alcanzaron una longitud de 1-1.5 cm. Otros brotes detenían su crecimiento cuando alcanzaban una talla de 4-5 mm de diámetro y no desarrollaban espinas pero sí tubérculos, generalmente estos brotes se hiperhidrataron y reventaron o simplemente se desdiferenciaron y formaron masas esféricas de callo (Figura 9).

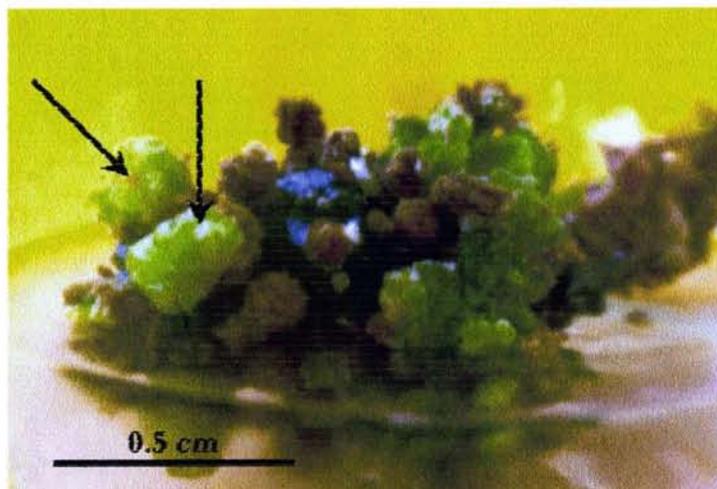


Figura 9. Brotes que abortaron su crecimiento y diferenciación (→).

Eventos en el periodo del primer subcultivo

Después de dos meses en el medio de inducción se realizó el primer subcultivo a medio fresco (MS 50 % semisólido). Al realizar el subcultivo algunos de los brotes se desprendieron del explante, éstos no presentaban raíces y la zona donde se encontraban había perdido la morfología externa normal de una areola y no poseía espinas. El crecimiento de todos los brotes se aceleró después de dos semanas de haber sido subcultivados e individualizados, esta respuesta ocurrió en todos los tratamientos, a excepción de los que contenían altas concentraciones de BAP (tratamientos 3/0, 3/0.1, y 3/2). En un principio los brotes de estos tratamientos comenzaron a hiperhidratarse, y al igual que los explantes los brotes se hincharon hasta reventar, los brotes tomaron la forma de un tonel con el centro hueco y la pared formada por restos de tejido parenquimatoso y la epidermis. Aún así la formación de callo en estos tratamientos fue baja. En el resto de los tratamientos algunos brotes se perdieron por hiperhidratación pero la gran mayoría continuó desarrollándose.

Después de 4 semanas de haber sido subcultivados, los brotes de algunos tratamientos (sobre todo en 0/0.1, 0/0.5, 0/2 y 2/0) presentaron el mismo patrón de desarrollo organogénico que los explantes originales es decir, sus tubérculos comenzaron a crecer hasta alcanzar unos 2-3 mm de altura, a partir de la quinta semana se formó alrededor de muchas de estas areolas el mismo halo de color naranja, y después de la sexta semana se observó el comienzo de la generación de nuevos brotes a partir de estas areolas. Esto se repitió en los explantes, donde las areolas que originalmente no habían producido brotes los generaron, pero en muy baja proporción en todos los tratamientos.

Eventos en el periodo del segundo subcultivo

Después de 8 semanas de cultivo en medio sin reguladores de crecimiento (término del primer subcultivo) los explantes y brotes fueron subcultivados por segunda vez a medio fresco, para entonces muchos de los nuevos brotes habían alcanzado una longitud de 1-2 cm, sin embargo la mayoría seguían unidos al tejido del explante por lo que fueron separados e individualizados para tratar de promover la generación de raíces (Figura 10).

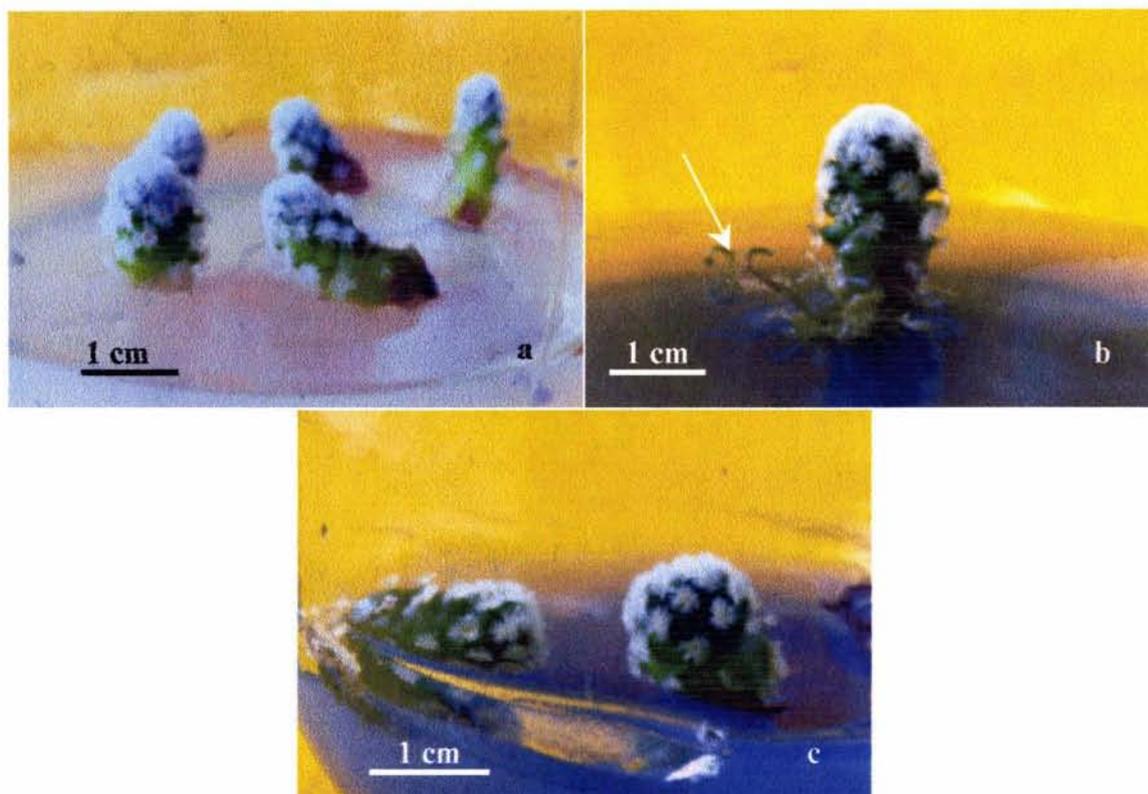


Figura 10. Brotes regenerados vía organogénesis directa individualizados, 2/2 (a), 1/1 (b) raíz (→), 1/0.1 (c).

Durante el segundo subcultivo la producción de brotes por organogénesis directa disminuyó significativamente en la mayoría de los tratamientos con excepción de los tratamientos 0/0.5 y el de 2/0. Los brotes del tratamiento de 0/0.5 que continuaban unidos al explante crecieron hasta alcanzar una talla de 2-3 cm (Figura 11).

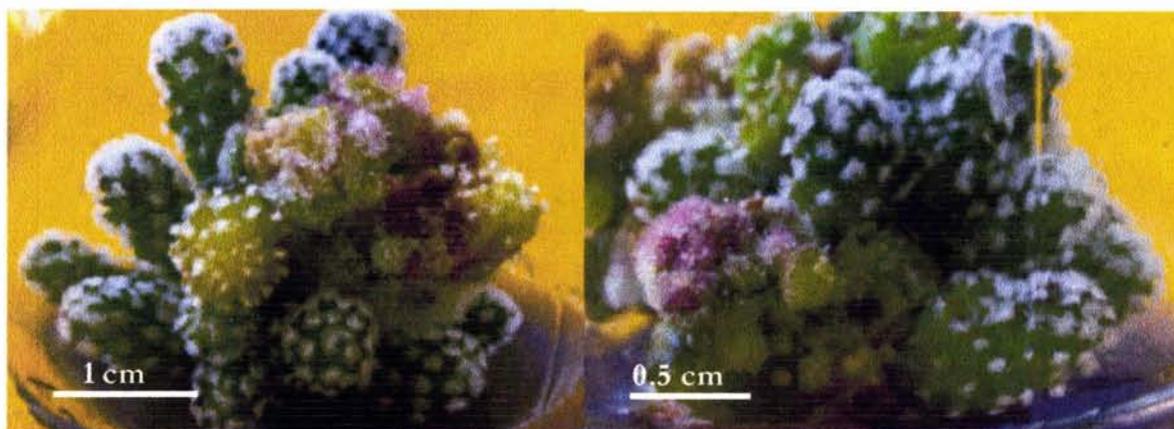


Figura 11. Aspecto de los brotes regenerados por organogénesis directa después de dos meses de haber sido subcultivados por segunda vez (tratamiento 0/0.5).

La organogénesis tiene lugar a través de eventos de desdiferenciación y rediferenciación. Estos eventos dependen de la renovación de la actividad meristemática en células maduras y diferenciadas o en un tejido desorganizado como el callo (Smigocki y Owens, 1999). Esto se pudo observar durante la formación de brotes axilares en los explantes de *P. strobiliformis*, siendo que las células del hipocótilo primero se rediferenciaron para lograr la formación de areolas, que después produjeron brotes. Es muy probable que debido a que los explantes utilizados provenían de plántulas de muy corta edad el proceso de formación de nuevas areolas y brotes se debiera en algunos casos a la presencia de células no especializadas o no comprometidas con alguna vía de regeneración dentro de los tejidos de dichas plántulas.

La activación de un tejido lo vuelve predispuesto a recibir las señales apropiadas. Estas señales reprograman a las células somáticas que han sido definidas morfogénicamente para revertirse *in vitro* a un estado meristemático, dividirse, diferenciarse, reorganizarse y expresar su totipotencialidad. Se sabe que existen varias señales de desarrollo que afectan la morfogénesis *in vitro* tal y como lo hacen *in vivo*, éstas incluyen niveles de nutrientes, gradientes fisiológicos, factores ambientales, receptores en un tejido blanco y fuerzas físicas tales como el estrés direccional (Steward *et al.*, 1970). Es por lo que en el presente estudio los cambios de medio y el tiempo que los explantes permanecieron en él produjeron respuestas diferenciales y la aparición de nuevos patrones de desarrollo, como se observó al realizar los subcultivos, siendo que durante la fase de inducción no se produjeron muchos brotes pero sí se desarrollaron nuevas areolas, una vez que se transplantaron los explantes los niveles de nutrientes y las condiciones del medio aunados a la adquisición de competencia por las células produjeron un incremento en el desarrollo de brotes adventicios.

El análisis de varianza (Tabla 6) del número total de brotes regenerados en cada tratamiento al final del segundo subcultivo (Tabla 7) dió como resultado que no hubo diferencias significativas en los tratamientos. Este resultado es debido muy probablemente al reducido número de repeticiones que se ensayaron en cada tratamiento y a la variabilidad de respuesta que presentan individuos con genotipos distintos a un estímulo dado.

Tabla 6. ANOVA del número total de brotes por tratamiento en el tercer subcultivo.

Variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F	P
Tratamiento	52.676455	16	3.292278	1.165448	0.326214
Error	144.070138	51	2.824905		

Tabla 7. Número total de brotes y porcentaje de brotes regenerados a partir de plántulas germinadas *in vitro* de *P. strobiliformis* mediante organogénesis directa e indirecta, por tratamiento durante cada periodo de cultivo (2 meses).

(BAP/ANA mg/l)	MEDIO DE INDUCCIÓN			PRIMER SUBCULTIVO			SEGUNDO SUBCULTIVO		
	# DE BROTOS	% O.D.	% O.I.	# DE BROTOS	% O.D.	% O.I.	# DE BROTOS	% O.D	% O.I
0/0	1	100	0	5	100	0	4	100	0
0/0.1	9	100	0	10	100	0	32	100	0
0/0.5	10	100	0	26	100	0	99	83.83	16.17
0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0/2	10	100	0	14	100	0	32	Nd	Nd
1/0	4	100	0	11	100	0	32	100	0
1/0.1	15	100	0	4	100	0	4	100	0
1/0.5	3	100	0	3	100	0	32	81.25	18.75
1/1	7	100	0	5	100	0	10	100	0
1/2	6	100	0	7	100	0	11	100	0
2/0	5	100	0	6	100	0	36	Nd	Nd
2/0.1	1	100	0	1	100	0	1	100	0
2/0.5	7	100	0	4	100	0	32	Nd	Nd
2/1	1	100	0	4	100	0	23	Nd	Nd
2/2	2	100	0	15	100	0	13	100	0
3/0	5	100	0	6	100	0	39	Nd	Nd
3/0.1	3	100	0	7	100	0	8	32.5	67.5
3/2	1	100	0	2	100	0	59	57.62	42.38

Nd=no determinado.

En el presente estudio el tratamiento 0/0.5 (Tabla 7) con un número total de 99 brotes regenerados y un promedio de 24.5 brotes por explante fue el que presentó una mayor respuesta en cuanto a la formación de brotes, a pesar de que éste no contenía citocinina exógena (BAP), regulador de crecimiento que tiene como uno de sus efectos promover la diferenciación y desarrollo celulares, y que en muchas de las investigaciones que se han hecho en cultivo de tejidos con cactáceas los mejores resultados que se obtienen para la regeneración de brotes provienen de tratamientos con concentraciones medias y altas de citocininas. Moebius-Goldammer *et al.* (2003) reportaron que su mayor producción de brotes en *Ariocarpus kotschoubeyanus* fue utilizando BAP (1 mg/l) y BAP en combinación con ANA (3 mg/l y 1 mg/l respectivamente) con un promedio de 34 brotes por explante, Mata-Rosas *et al.* (2001) lograron la máxima regeneración de brotes de *Turbincarpus laui* en concentraciones de BAP de 2 y 3 mg/l en combinación con ANA (0 y 0.1 mg/l). 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 1 mg/l 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). Ahora bien el tratamiento que presentó el segundo mayor número de brotes regenerados (59) fue el de 3/2 donde los niveles de ambos reguladores de crecimiento (BAP y ANA) eran los más altos, el promedio de brotes por explante fue de 14.75. Esto nos indica que existe un gran rango de respuesta dentro de la especie. Se han determinado empíricamente y publicado numerosos métodos para la regeneración de plantas específicas, sin embargo, existe un gran problema y es que muchos de ellos no son aplicables a otras especies o cultivares, incluso distintos explantes de la misma planta, aún cuando estén estrechamente relacionadas genéticamente (Smigocki y Owens, 1999).

Es evidente que las concentraciones de reguladores de crecimiento que resultan efectivas para la regeneración de plantas varían de especie en especie, e incluso dentro de una misma especie, de genotipo en genotipo, George (1993) sugiere que las concentraciones de reguladores de crecimiento deberán ajustarse dependiendo del genotipo, del tipo de tejido y de la naturaleza del método de micropropagación.

Los resultados que se obtuvieron en presente estudio no reflejan una relación clara con respecto a la respuesta de los explantes y la concentración o presencia de alguno de los reguladores

de crecimiento. Se presentaron 5 tratamientos con un promedio de 8 brotes por explante (0/0.1, 0/2, 1/0, 1/0.5 y 2/0.5), dos tratamientos con promedios de 9.75 brotes por explante (2/0 y 3/0), además los dos mejores tratamientos fueron 3/2 y 0/0.5 con promedios de 14.75 y 24.75 respectivamente.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros cuatro estudios realizados en paralelo con la presente investigación donde se trabajó con las dos especies que pertenecen al género *Pelecyphora*. Giusti *et al.* (2002) reportaron la producción de brotes en *P. aselliformis* en presencia de TDZ (2.27 μM) con ANA (0 y 0.5 μM) con promedios de 3.10 y 3 brotes por explante respectivamente, BA (22.20 μM) con ANA (0.05 μM) con un promedio de 2 brotes por explante y KIN (23.23 μM) con ANA (0.05 μM) donde se presentó la mayor producción de brotes con 10.2 como promedio por explante, Arias-Azcona (2002) obtuvo su mayor producción de brotes en *P. strobiliformis* utilizando muy altas concentraciones de los reguladores de crecimiento KIN (6 mg/l) y 2iP (6 mg/l) con promedios de 5 y 2.75 respectivamente. Ninguno de estos dos trabajos obtuvo medias de producción de brotes tan altas como las obtenidas en el presente estudio, en sus resultados se observa que la respuesta organogénica fue promovida por la presencia de altas concentraciones de citocininas (KIN, TDZ y 2iP) sin que, al parecer, las auxinas (ANA) tengan un papel relevante en la inducción de la respuesta. Esto difiere con los resultados aquí presentados donde la mayor producción de brotes se dio en presencia de auxinas (ANA 0.5 y 2 mg/l).

Santos-Díaz *et al.* (2002) obtuvieron un máximo de 4.97 y 4.93 brotes por explante (8.8 μM de BAP y 4.6 μM de KIN respectivamente) después de 120 días de cultivo, mientras que Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa (2002) reportaron la producción de 122.27 y 128.07 brotes promedio por explante (4.4 y 8.8 μM de BAP respectivamente) con *P. aselliformis* y 133.33 y 129.0 brotes promedio por explante (180 días de cultivo) en *P. strobiliformis* con las mismas concentraciones de BAP utilizadas en *P. aselliformis* (4.4 y 8.8 μM de BAP), en los dos últimos estudios sólo probaron las respuestas a diferentes concentraciones de citocininas.

A pesar de que los resultados presentados indican que la producción de brotes axilares en el género *Pelecyphora* es promovida en presencia de una amplia variedad de citocininas (KIN, 2iP, TDZ, BAP), no se puede descartar que las auxinas (ANA) pudieran jugar un papel importante en dicha respuesta (como sugiere el presente estudio). Además el hecho de que en dos de los trabajos mencionados no utilizarán ninguna auxina (Santos-Díaz *et al.*, 2002; Pérez-Molphe-Bach y Dávila-

Figuroa, 2002) crea un sesgo y no se puede demostrar de manera tácita que no se deban de utilizar auxinas para inducir la regeneración de brotes en este género de cactácea.

La inducción de organogénesis directa e indirecta está dada por la interacción entre hormonas. Estudios fisiológicos han indicado que casi todos los aspectos del desarrollo de las plantas están influenciados por ellas. La naturaleza, ocurrencia, transporte y efectos de los mayores grupos de hormonas han sido estudiados preferentemente mediante observaciones hechas cuando se aplican exógenamente a cultivos de células, tejidos y órganos (Smigocki y Owens, 1999).

Sin embargo, en los últimos años se ha observado que existen complejas interacciones entre varios tipos de hormonas y que el crecimiento y desarrollo es el resultado del efecto neto del balance hormonal (Davies, 1987). Por ejemplo se dice que es la proporción de citocininas y auxinas en el medio de cultivo lo que finalmente determina si se produce una mayor cantidad de brotes o raíces, pero esto no es completamente cierto debido a que no solo es la interacción de éstas dos hormonas vegetales en el interior de la célula la que determina la respuesta, sino que ésta es influenciada por muchos otros factores que apenas se están estudiando *in vivo* e *in vitro*, tal es el caso del etileno y poliaminas (Pua, 1999).

Se ha documentado que la respuesta morfogenética puede ser modulada por otras hormonas tales como el ácido giberélico que interviene en el desarrollo de embriones somáticos de la soya, el etileno en la inhibición de la organogénesis de tallos a partir de cultivos de hojas de papa, y el ABA en la prevención de la germinación precoz en cultivos de embriones muy jóvenes (DeBlock 1988; Christou y Yang, 1989).

A pesar de los muchos años de investigación, nuestro conocimiento de los mecanismos de acción hormonal son limitados. Un aspecto importante de dilucidar el modo de acción de las hormonas vegetales ha sido la necesidad de determinar su concentración exacta y la localización dentro de los individuos, células, tejidos y órganos (Smigocki y Owens, 1999). Con el advenimiento de nuevas tecnologías, la determinación de cantidades diminutas de hormonas en células en diferenciación es ahora posible. Adicionando esta tecnología con estudios fisiológicos y de genética molecular es posible que nuestros actuales conocimientos sobre la biología y bioquímica de las hormonas vegetales se incrementen (Klee y Estelle, 1991; Hobbie *et al.*, 1994).

El estudio del efecto hormonal mediante la aplicación exógena de hormonas tiene sus limitantes referente a cómo las células vegetales perciben la adición de hormonas en términos de absorción, secuestro y metabolismo (Smigocki y Owens, 1999). Actualmente, muchos

laboratorios están utilizando la genética como una herramienta para resolver el problema de la actividad hormonal (Binns, 1994; Hobbie y Estelle, 1994).

Basados en los trabajos con aplicaciones exógenas de hormonas, no resulta sorprendente que las respuestas hormonales en casi todos los mutantes identificados a la fecha parezcan ser moduladas por una o más de otras hormonas. Este fenómeno enfatiza la complejidad de acción y la interacción de las hormonas vegetales (Smigocki y Owens, 1999).

CALLO

El desarrollo de callo durante los dos primeros meses de iniciados los cultivos fue muy escaso, presentándose sobre todo en la zona del corte de los explantes en todos los tratamientos (Figura 12 a,b). El callo presentaba una consistencia semicompacta (no friable) pero sin llegar a ser muy duro y solamente se extendía unos pocos milímetros ($1-2 \text{ mm}^2$) a partir de la herida, en general el callo era de color verde oscuro, rojizo llegando a ser rojo intenso e incluso hialino. Después del primer subcultivo a medio MS 50% el callo aumentó ligeramente en volumen, siendo también escaso ($1-3 \text{ mm}^2$) (Figura 12 c). Los explantes de los tratamientos con las concentraciones más altas de citocininas (3/0, 3/0.5 y 3/2) comenzaron a formar callo a partir de los brotes que se habían desarrollado, produciendo la pérdida de muchos brotes por desdiferenciación (Figura 6). El callo formado en todos los tratamientos durante los dos meses que pasaron hasta el nuevo subcultivo (a cuatro meses de iniciados los cultivos) tenía una consistencia friable y presentaba colores como el amarillo, verde pálido, verde intenso, rojo y púrpura.

Al realizar el segundo subcultivo se incrementó de manera notable el desarrollo del callo en todos los tratamientos ($1-2 \text{ cm}^3$) (Figura 12 d), excepto en los que presentaban bajas concentraciones de auxinas y citocininas (tratamientos 0/0, 0/0.1, 0/0.5, 1/0, 1/0.1 y 1/0.5). La consistencia y color del callo eran similares a las que presentaron durante el primer subcultivo. El aumento en la cantidad de callo se dio de manera directa con el aumento del desarrollo de brotes ya que el callo provenía en su mayor parte de la desdiferenciación de los brotes que se habían desarrollado por organogénesis directa e indirecta. Por lo general se requiere de la incorporación de una auxina 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).

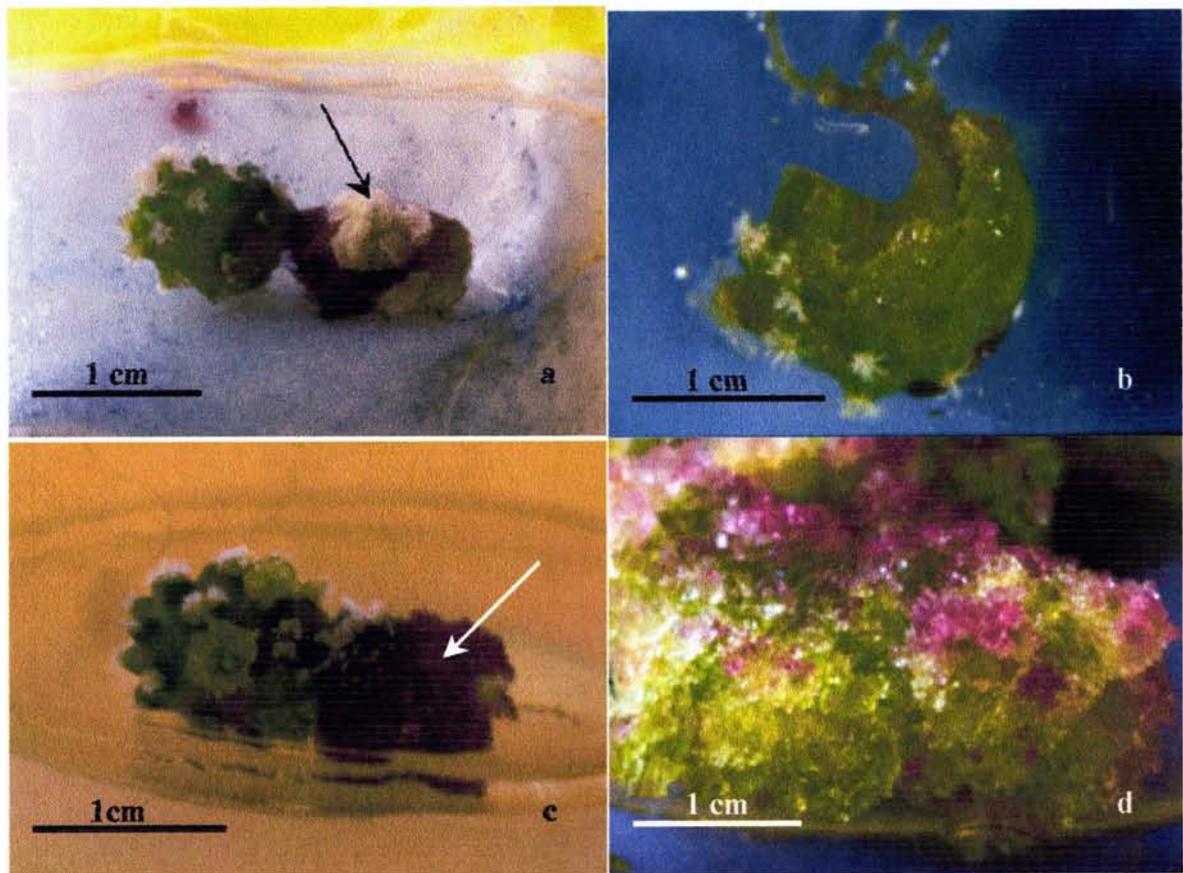


Figura 12. Explante con un ligero desarrollo de callo (a), explante sin desarrollo de callo (b), explante con desarrollo de callo de color rojo intenso después del primer subcultivo(c), callo friable después del segundo subcultivo (d). Callo (→)

ORGANOGENESIS INDIRECTA

Eventos en el periodo del primer subcultivo

Al término del periodo de inducción, una vez realizado el primer subcultivo de los explantes, la producción de callo aumentó debido al crecimiento de tejido nuevo a partir del explante y por la dediferenciación de algunos brotes.

Eventos en el periodo del segundo subcultivo

A partir de este callo ocurrió la diferenciación de nuevos brotes, es decir el callo fue organogénico bajo las condiciones de cultivo ensayadas. En el periodo del segundo subcultivo fue donde se produjo el desarrollo de brotes por organogénesis indirecta, sobre todo en los tratamientos con altas concentraciones de BAP (3/0.1 y 3/2) (Figura 13). En un principio se formó una masa esférica de callo (nódulo) que posteriormente adquirió una consistencia más firme, y en

su superficie se empezó a notar la formación de pequeños tubérculos, la mayoría de estos brotes estaban hiperhidratados (suculentos, con un brillo vítreo) y presentaron espinas setosas muy pequeñas, los tubérculos eran pequeños y el tejido era de color verde claro, amarillento o incluso rojizo. Algunos de estos brotes se desarrollaron y consolidaron en una planta con una morfología similar a la de los brotes producidos por organogénesis directa, sin embargo la gran mayoría se hiperhidrataban más aún y reventaban, a partir del callo formado de éstos comenzaba la diferenciación de nuevos brotes, repitiendo estos ciclos regenerativos.

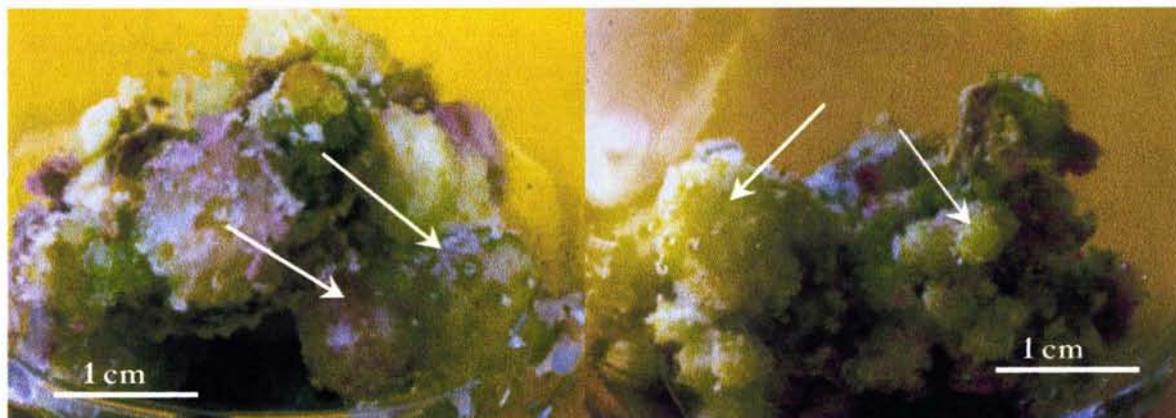


Figura 13. Brotes generados por organogénesis indirecta (→).

El tratamiento que presentó la mayor producción de brotes producidos por organogénesis indirecta fue el de 3/2, aunque la mayoría de ellos no adquirió una morfología normal, algunos de los brotes continuaron su crecimiento y desarrollo. En algunos tratamientos (0/2, 2/0, 2/0.5, 2/1 y 3/0) no fue posible determinar de manera precisa si los brotes producidos al final del segundo periodo de subcultivos provenían de organogénesis directa o indirecta, debido a que los brotes que se hiperhidrataron y reventaron conservaron sus areolas, en ocasiones dichas areolas quedaron ocultas por el callo que creció al alrededor de ellas, por lo que fue muy difícil observar de donde se originaron los nuevos brotes.

CONCLUSIONES

- ❖ La germinación de semillas de *P. strobiliformis* en medio MS líquido con puentes de papel filtro resultó ser altamente efectiva, obteniendo un porcentaje total de germinación de 89.23% dentro de los primeros 14 días de cultivo, para tres lotes de distinto origen y tres tiempos diferentes de siembra.
- ❖ Las secciones longitudinales de plántulas utilizadas como explantes mostraron una gran capacidad regenerativa de brotes vía organogénesis directa. Explantes semejantes pero sin la región apical sufrieron una fuerte (oxidación) necrosis letal y no sobrevivieron. En tanto que el ápice fue regenerativo por si solo.
- ❖ El medio de inducción (MS 50% con puentes de papel filtro) adicionado con diferentes concentraciones de BAP/ANA resultó ser efectivo, obteniéndose las siguientes respuestas morfogénicas: 1) organogénesis directa: se formaron brotes de consistencia y morfología semejantes a las de plántulas desarrolladas en condiciones naturales; 2) organogénesis indirecta: se formaron brotes de consistencia suave e hiperhidratados que surgieron de un callo friable de color verde pálido o rojizo y también se regeneraron algunos brotes con las mismas características que los obtenidos mediante organogénesis directa provenientes de un callo compacto de color verde olivo.
- ❖ La inducción y desarrollo de los brotes ocurrió en los medios iniciales por lo que no fue necesario un segundo medio de inducción, sin embargo el crecimiento de los brotes se vio promovido por el subcultivo en medio MS 50% semisólido sin reguladores de crecimiento.
- ❖ En el tratamiento control también hubo regeneración de brotes pero un número muy bajo; los tiempos fueron menores cuando estuvieron presentes en el medio de cultivo los reguladores de crecimiento BAP y ANA.
- ❖ No hubo diferencias estadísticas entre la utilización de diferentes concentraciones de citocininas (BAP) y/o auxinas (ANA) para la promoción de la morfogénesis, sin embargo el mayor número de regenerantes se obtuvo en ausencia de citocininas y a una baja concentración de auxinas (0/0.5), produciéndose 99 brotes a partir de los tejidos de sólo dos plántulas (4 explantes), proviniendo la mayor parte de éstos de organogénesis directa (83.83%).

- ❖ Los resultados aquí presentados apuntan hacia el desarrollo de una metodología de micropropagación que podría permitir la regeneración de plantas de *P. strobiliformis*, al mismo tiempo se evitaría la pérdida de este recurso genético al propagarlo masivamente con fines de comercialización y remover la presión que se ejerce en las poblaciones naturales.
- ❖ Para alcanzar dichas metas es necesario llevar las plantas regeneradas *in vitro* a *ex vitro*, por lo que para completar el presente estudio, es necesario inducir la generación de raíces en los brotes producidos para su posterior trasplante a suelo y aclimatización en invernadero de las plantas regeneradas.
- ❖ Este estudio puede ayudar al establecimiento de un banco de germoplasma que posteriormente podría utilizarse para la reintroducción de organismos de esta especie en las poblaciones naturales.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, E.F., S. Arias, N.P. Taylor and A. Cattabriga. (1994). Threatened Cacti Of México. Royal Botanical Garden, Kew.
- Arias, M.S. (1993). Cactáceas: Conservación y Diversidad en México. *Rev. Soc. Hist. Nat.* **44**:109-115.
- Binns, A.N. (1994). Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic, and molecular approaches. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**:173-196.
- Bonnes, M.S., P.W. Pare and T.J. Mabry. (1993). Novel callus and suspension cultures of the "old man" cactus (*Cephalocereus senilis*). *Cact. & Succ. J. (US)* **55**(3):144-147.
- 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.
- Christou, P. and N-S Yang (1989). Developmental aspect of soybean (*Glycine max*) somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* **64**:225-234.
- Clayton, P.W., J.F. Hubstenberger and G.C. Phillips. (1990). Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **115**(2):337-343.
- Davies, P.J. (1987). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Kluwer Academic Publishers. Boston.
- De Block, M. (1988). Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* **76**:767-774.
- Dodds, J.H. (1991). Conservation of plant genetic resources, the need for tissue culture. pp. 10. In: J.H. Dodds (Ed.). *In vitro* Methods of Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall, London. 239p.
- Donnelly, D.J. and W.E. Vidaver. (1988). Glossary of Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge. 178p.
- 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.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiochetti, G. Colla, F. Saccardo and M. Tucci. (2002). *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *HortScience* **95**:319-332.
- Glass, Ch.E. (1998). Guía para la Identificación de Cactáceas Amenazadas de México. Fideicomiso Fondo para la Biodiversidad. México, D.F., s/p.
- Guzman U., S. Arias y P. Davila. 2003. Catálogo de cactaceas mexicanas. Universidad Nacional Autonoma de Mexico y Comision Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Mexico D.F.
- Hernández, B.T. (1998). Notas Referentes al Estudio de Conservación de *Pelecypora strobiliformis* (Wendermann) Fric et Schelle. *Cact. Suc. Mex.* **43**(2):36-39.
- Hernández, O. (1998). Evaluación de seis tratamientos pregerminativos en semillas de noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore). Tesis profesional. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. 56pp.
- Hobbie, L., C. Timpte and M. Estelle. (1994) Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant. Mol. Biol.* **26**:1499-1519.
- Hobbie, L. and M. Estelle. (1994). Genetic approaches to auxin action. *Plant Cell and Environ.* **17**:525-540.
- Höxtermann, E. (1997). Cellular “elementary organism” *in vitro*. The early version of Gottlieb Haberlandt and its realization. *Physiol. Plant* **100**:716-728.
- Hu, C.Y. and P.J. Wang. (1983). Mersitem, shoot tip and bud culture, pp. 177-227. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). Handbook of plant cell culture. Vol. 1. MacMillan, New York.
- Johnson, J.L. and E.R. Emino. (1979). Tissue culture propagation in the Cactacea. *Cact. Succ. J. (U.S.)* **51**:275-277.
- Klee, H. and M. Estelle. (1991). Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **42**:529-551.
- Kolar, Z., J. Bartek and V. Vyskot. (1976). Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig. Through tissue culture. *Experientia.* **32**:668-669.

- 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.
- Lazarte, J.E., M.S. Gaiser and O.R. Brown. (1982). *In vitro* propagation of *Epiphyllum crisocardium*. *HortScience.* **17**(1):84.
- Litz, R.E. and V. Jaiswal. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. pp. 247-263. In: P.C. Debergh and Zimmerman (Eds.). *Micropropagation Technology and Application*. Kluwer Academic Press Publishers, Dordrecht.
- Mata-Rosas, M., M.A. Monroy de la Rosa, K.G. Moebius-Goldammer and V.M. Chávez-Avila. (2001). Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **37**:400-404.
- Martínez-Vázquez, O. and A. Rubluo. (1989). *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *J. Hortic. Sci.* **64**(1):99-105.
- Mauseth, J.D. (1979a). Cytokinin-elicited formation of the pit-rib meristem and other effects of growth regulators on morphogenesis of *Echinocereus* (Cactaceae) seedlings shoot apical meristems. *Amer. J. Bot.* **66**:446-451.
- Mauseth, J.D. (1979b). A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. & Succ. J. (US)* **51**:186-187.
- Moebius-Goldammer, K.G., M. Mata-Rosas and V.M. Chávez-Avila. (2003). Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), and endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **39**:388-393.
- Mohamed-Yaseen, Y., S.A. Barringer, W.E. Splittstoesser and R.J. Schenell. (1995). Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **42**:117-119.
- Murashige, T and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**:473-493.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **25**:135-166.
- Murashige, T. (1978). The Impact of Plant Cell Tissue Culture on Agriculture. pp. 15-26. In: NG, S.Y.C. and N.Q. NG. (1991). *Reduced growth storage of germplasm.* pp 11-40.

- In: J.H. Dodds (Ed.). *In vitro* Methods of Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall, London. 239p.
- Nava-Esparza, V.C. and L.L. Yáñez (1984). Propagación de *Cephaelocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cact. Suc. Mex.* **29**:3-7.
 - NG, S.Y.C. y N.Q. NG. (1991). Reduced growth storage of germoplasm. pp 11-40. In: J.H. Dodds (Ed.). *In vitro* Methods of Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall, London. 239p.
 - Oldfield, S. (1985b). Whither International Trade in Plants? *New Scientist.* **106**:10-11.
 - Olguín, 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.
 - Ortíz-Montiel, J.G. y M. Vargas-Figueroa. (1995). Propagación *in vitro* de *Heliocereus elegantissimus* (Britton *et* Rose) var. *elegantissimus* (Cactaceae). *Cact. Suc. Mex.* **40**(2):41-46.
 - Pelah, D., R.A. Kaushik, Y. Mizrahi and Y. Sirit. (2002). Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalnathus* using thidiazuron. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **71**:81-84.
 - Pérez-Molphe-Bach, E. and C.A. Dávila-Figueroa. (2002). *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg y *P. strobiliformis* Wendermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **38**:73-78.
 - Phillips, C.G. and C.B. Collins. (1979). *In Vitro* Tissue Culture of Selected Legumes and Plant Regeneration from Callus Culture of Red Clover. *Crop. Sci.* **19**:59-64.
 - Pua, E.-C. (1999). Morphogenesis in cell and tissue cultures: Role of ethylene and polyamines. pp. 255-303. In: W.Y. Soh and S.S. Bhowjwani (Eds.). *Morphogenesis in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers.
 - Reyes, S.J. (1994). Propagación de Cactáceas Mexicanas: una alternativa para la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción. pp. 108-109. In: Encuentro Internacional sobre el Impacto de la Biotecnología en el Desarrollo Sustentable. PROMESUP, OEA.
 - Rodríguez-Garay, B. and A. Rubluo. (1992). *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Broedker). *Cact. Succ. J. (U.S.)* **64**(3):116-119.

- Rojas-Aréchiga, M. and C. Vázquez-Yañez. (2000). Cactus seed germination: a review. *44*:85-104
- Santos-Díaz, M.S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez and M. L. Santos-Díaz. (2003). *In vitro* organogenesis of *Plelecyphora aselliformis* Ehrenberg (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **39**:480-484.
- Smith, R.H., P.J. Burdick, J. Anthony and A.A. Reilley. (1991). *In vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. *HortScience*. **26**(3):315.
- Smigocki, A.C, and L.D. Owens. (1999). Regulation of morphogenesis by bacterial auxin and cytokinin biosynthesis transgenes. pp. 305-326. In: W.Y. Soh and S.S. Bhowjwani (Eds.). *Morphogenesis in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers.
- Soberón, M.J. y J. Llorente. (1993). La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). *Rev. Soc. Hist. Nat.* **44**:3-17.
- Starling, R.J. (1985). *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. & Succ. J. (US)* **57**:114-115.
- 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. In: M.R. Ahuja (Ed.). *Micropropagation of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Valles, S.C. (Ed). (1997). *Suculentas Mexicanas, Cactáceas*. CVS Publicaciones. México, D.F. pp.9.
- 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.

APÉNDICE

Apéndice 1. Componentes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

MACROELEMENTOS		
SAL	FÓRMULA	CANTIDAD (mg/l)
Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	1,650
Nitrato de Potasio	KNO_3	1,900
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Fosfato de Potasio	KH_2PO_4	170
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
MICROELEMENTOS		
SAL	FORMULA	CANTIDAD (mg/l)
Sal Sódica EDTA	Na_2EDTA	37.3
Sulfato Ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Ácido Bórico	H_3BO_3	6.20
Sulfato de Manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.89
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Yoduro de Potasio	KI	0.83
Moibdato de Sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato Cúprico	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cloruro de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
COMPUESTOS ORGÁNICOS		
NOMBRE	CANTIDAD (mg/l)	
Myo-Inositol	100	
Tiamina HCl	0.1	
Ácido Nicotínico	0.5	
Piridoxina	0.5	
Inositol	100	

Sacarosa	30,000
Agar	8,000