



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MORFOGÉNESIS IN VITRO DE *Aztekium hintonii* Glass y F. Maurice, *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada, y *Mammillaria sanchez-mejoradae* González, CACTÁCEAS ENDÉMICAS Y EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

ELISA BANI CALDERÓN GIL

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2007



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.

RECONOCIMIENTOS:

Agradezco los apoyos recibidos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante la beca: 189660 y el financiamiento de la beca DGEP, como un complemento económico. Los cuales me permitieron dedicarme de tiempo completo a la investigación y desarrollo del presente trabajo.

Agradezco a cada uno de los Doctores, miembros del Comité Tutorial que me asesoraron con sus comentarios, críticas y correcciones en el presente trabajo de investigación. Así como las facilidades prestadas para el uso de sus laboratorios y reactivos.

DR. VÍCTOR MANEL CHÁVEZ ÁVILA

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GÚZMAN

DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN

DR. ALEJANDRO MARTÍNEZ PALACIOS

DR. SALVADOR ARIAS MONTES

**“Más a Dios gracias, el cual nos lleva siempre en triunfo en Cristo
Jesús...”**

Agradezco a mis papás Fernando y Teresa el apoyo incondicional, por su amor, y la confianza que siempre han depositado en mí.

A mis hermanos Yeya, Ruth, Omar[†] y Caleb, por haberme apoyado en momentos de decisión, por el gran amor que siempre nos ha unido.

A Yeya, Mafer, Alito y Alexo, por haberme hecho parte de su familia al venir a vivir a México.

A Rafa, por su paciencia, por su amor y confianza a pesar de la distancia. Y por apoyarme de manera incondicional.

A mis amigas Esther, Lenina, Daniela, Priscila y Keila, por brindarme su amistad sincera animándome en momentos de tristeza y necesidad espiritual.

Al Dr. Alejandro Martínez Palacios, por haber impulsado en mí el deseo de continuar preparándome, por su apoyo en la realización del proyecto y por su carácter humanitario.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, gracias por sus consejos y disposición a ayudar en todo momento.

Gracias Doctor por su carácter ético que anima.

A la M. C. Esthela Sandoval por su calidad humana. Por la ayuda en la interpretación de resultados, junto con todo el equipo de trabajo que le rodea: Alice, Conchita, Barbarita.

A Gabriel y Barbarita por su actitud servicial y de amistad.

A la Dra. Judith Márquez por permitirme conocerla, he incorporarme en su laboratorio. Por su colaboración en la realización de este trabajo.

A la Dra. Alicia Gamboa de Buen, por su tiempo en la revisión de este trabajo y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio en Morelia y D. F., por su amistad sincera y por el tiempo tan rico que compartimos juntos.

iiii GRACIAS !!!!!

INDICE**PAG.**

I.	Índice de Figuras.	
II.	Índice de Tablas	
III.	Índice del Apéndice.	
IV.	Abreviaturas.	
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	OBJETIVOS.....	3
3.	ANTECEDENTES.....	4
3.1.	Características Generales de la Familia Cactaceae.....	4
3.2.	Distribución Geográfica.....	5
3.3.	Uso y Aprovechamiento.....	7
3.4.	Estatus.....	8
3.5.	Principales Factores que Ponen en Riesgo a las Especies.....	10
3.6.	Descripción de Géneros.....	11
3.6.1.	<i>Aztekium</i>	11
3.6.2.	<i>Mammillaria</i>	11
3.7.	<i>Aztekium hintonii</i> Glass y F. Maurice.....	12
3.7.1.	Descripción Taxonómica.....	12
3.7.2.	Distribución y Hábitat.....	13
3.7.3.	Estatus.....	13
3.7.4.	Clasificación Taxonómica.....	13
3.8.	<i>Mammillaria san-angelensis</i> Sánchez-Mejorada.....	13
3.8.1.	Descripción Taxonómica.....	13
3.8.2.	Distribución y Hábitat.....	14
3.8.3.	Estatus.....	14
3.8.4.	Clasificación Taxonómica.....	15
3.9.	<i>Mammillaria sanchez-mejoradae</i> González.....	15
3.9.1.	Descripción Taxonómica.....	15
3.9.2.	Distribución y Hábitat.....	16
3.9.3.	Estatus.....	16

3.9.4. Clasificación Taxonómica.....	16
3.10. MORFOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	17
3.11. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	17
3.11.1. Generalidades.....	17
3.11.2. Diferencias entre embriones somáticos y cigóticos.....	18
3.11.3. Embriogénesis Somática <i>in vitro</i>	19
3.11.4. Factores de Inducción.....	22
3.11.4.1. Explante.....	22
3.11.4.2. Medio de Cultivo.....	22
3.11.4.3. Reguladores de Crecimiento.....	23
3.11.4.4. Papel de las Auxinas.....	23
3.11.4.5. Sacarosa.....	24
3.11.5. Perspectivas en la Embriogénesis Somática.....	25
3.11.6. Embriogénesis Somática en Cactus.....	25
3.12. ORGANOGÉNESIS.....	26
3.12.1 Generalidades.....	26
3.12.2 Anatomía de la Organogénesis.....	28
3.12.3 Factores de Inducción.....	29
3.12.3.1 Explante.....	29
3.12.3.2 Medio de Cultivo.....	29
3.12.3.3 Reguladores de Crecimiento.....	30
3.12.3 Organogénesis en Cactáceas.....	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1. Obtención del Material Vegetal.....	33
4.1.1. <i>Aztekium hintonii</i>	33
4.1.2. <i>Mammillaria san-angelensis</i>	33
4.1.3. <i>Mammillaria sanchez-mejoradae</i>	33
4.2. Embriogénesis Somática a partir de callo.....	33
4.3. Condiciones de Incubación.....	34
4.4. Análisis Estructural.....	34
4.5.1. Inclusión en Parafina.....	34
4.5.2. Inclusión en Resina LR-WHITE.....	34

5. RESULTADOS.....	35
5.1. Cultivo <i>in Vitro</i>	35
5.1.1. <i>Aztekium hintonii</i>	35
5.1.2. <i>Mammillaria san-angelensis</i>	35
5.1.3. <i>Mammillaria sanchez-mejoradae</i>	35
5.2. Análisis Estructural.....	38
5.2.1. <i>Aztekium hintonii</i>	38
5.2.2. <i>Mammillaria sanchez-mejoradae</i>	38
6. DISCUSIÓN.....	50
6.1. Cultivo <i>in vitro</i>	50
6.1.1. <i>Aztekium hintonii</i>	50
6.1.2. <i>Mammillaria san-angelensis</i> y <i>Mammillaria sanchez-mejoradae</i>	50
6.2. Análisis Estructural.....	51
6.2.1. <i>Aztekium hintonii</i>	51
6.2.2. <i>Mammillaria sanchez-mejoradae</i>	51
7. CONCLUSIONES.....	52
8. LITERATURA CITADA.....	53

Fig. 1. Distribución de géneros de la Familia Cactaceae en el Continente Americano, y su abundancia relativa en los diferentes centros de distribución (Tomado de Cullman *et al.*, 1986).....6

Fig. 2. *Aztekium hintonii* Glass y F. Maurice. Con flor color comúnmente rosa subido a magenta, abierta por completo durante la mañana y se cierra por la noche.....12

Fig. 3. *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. Floreando en invernadero y mostrando sus hermosas espinas blancas.....13

Fig. 4. *Mammillaria sanchez-mejoradae* González. La floración en invernadero se presenta en los meses de Noviembre a Febrero.....15

Fig. 5. Etapas de formación de la embriogénesis somática *inVitro* (Tomado de Komamine, 2005).....21

Fig. 6. Callo de *Aztekium hintonii* en medio MS con 0.5mg/l de 2,4-D y 0.1mg/l de K, en oscuridad a los 30 días de cultivo (a-b). Protuberancias emergiendo del callo (c), a los 56 días de cultivo. Callo deshidratado a los 64 días de cultivo (d).....36

Fig. 7. Callo de *Mammillaria san-angelensis* a los 2 meses de cultivo.....37

Fig. 8. Callo de *Mammillaria sanchez-mejoradae* a los 2 meses de cultivo en medio B5 modificado (Litz, 1985) enriquecido con 45 (a-b) y 60g/l de sacarosa (c-d).....37

Fig. 9. *Aztekium hintonii*, callo a los 30 días de cultivo. Centros meristemáticos emergiendo en la periferia del callo (a-c). Estructura embrionaria globular y un grupo de células en su base a partir de callo con deposiciones de mucílago (d). Meristemo apical de brote en la parte superior, con una pequeña depresión en el centro, células parenquimatosas isodiamétricas en el cuerpo (e). Epidermis bien pronunciada en la periferia delimitando las estructuras meristemáticas (f).....39

Fig. 10. Estructural globulares. Callo en *Linum usitatissimum* L., a las tres semanas de cultivo, barra= 0.9mm (a), hs= segmento de hipocotilo, ca= callo. Callo de *Aztekium hintonii* a los 30 de cultivo, barra= 0.9mm (b).....40

Fig. 11. Estructuras globulares. Hipocotilo de *Linum usitatissimum* L. con estructuras globulares a la periferia, barra= 300µm, hs= hipocotilo (a). Callo de *Aztekium hintonii*, con estructuras globulares en la periferia, barra=500µm (b).....40

Fig. 12. Estructuras embrionarias, secciones longitudinales. *Linum usitatissimum* L., barra=110µm (a). *Aztekium hintonii*, barra=250µm (b). *Pelargonium x hortorum* Bailey (x183), segmento de hipocotilo (c).....41

Fig. 13. Meristemo Apical de Brote. *Oraya peruviana*, división anticlinal, barra=100µm (a). *Mammillaria sanchez-mejoradae*, corte longitudinal, barra 50µm (b).....42

Fig. 14. Organogénesis. Órgano inmerso en células de callo de Olivo (x100) (a). *M. sanchez-mejoradae*, células de callo, barra=50µm (b).....42

Fig. 15. Procesos morfológicos en las células de callo de *Aztekium hintonii*. Callo colapsado como una respuesta al estrés hormonal y osmótico, con pequeñas deposiciones de suberina (a). Elementos traqueales con poca refringencia de lignina (b). Granos de almidón inmersos en las células de callo (c)..... 43

Fig. 16. *Aztekium hintonii* a los 56 días de cultivo. Centros meristemáticos con indicios de procambium y haces vasculares (a-c). Cortes transversales de un brote inmerso en el callo (d). Médula (m) en medio de haces vasculares laterales (e). Meristemo areolar (ma) con haces vasculares bien diferenciados y médula en medio.....44

Fig. 17. Organogénesis en *Mammillaria sanchez-mejoradae*. Meristemo apical de brote (a-c), células con núcleos grandes. Meristemo apical de raíz (d). Haces vasculares a lo largo del brote (e).....45

II. INDICE DE TABLAS

PAG

Tabla 1. Uso y Aprovechamiento de algunas especies de la familia Cactaceae (Haustein, 1988).....7

Tabla 2. Representantes de la Familia Cactaceae Altamente Vulnerables.....9

Tabla 3. Algunos ejemplos de plantas en donde la embriogénesis somática se ha inducido bajo condiciones *in vitro*.....18

Tabla 4. Diferencias entre la Embriogénesis Somática y Embriogénesis Cigótica.....	19
Tabla 5. Ejemplos de Embriogénesis Somática.....	20
Tabla 6. Explantes comúnmente utilizados en la Embriogénesis.....	22
Tabla 7. Explantes usados en la propagación de Cactus.....	29
Tabla 8. Medios Evaluados por Clayton <i>et al.</i> , 1990.....	30
Tabla 9. Reguladores de crecimiento usados en cactus en peligro (Clayton <i>et al.</i> , 1990).....	30
Tabla 10. Especies de cactus micropropagados exitosamente mediante la organogénesis.....	32
Tabla 11. Análisis de varianza en la generación de embriones somáticos a partir de segmentos de callo de <i>Aztekium hintonii</i> . Medio MS modificado con 2,4-D, K y sacarosa, a las 24 semanas de cultivo.....	46
Tabla 12. Respuesta a la inducción de la embriogénesis somática a partir de segmentos de callo en <i>Aztekium hintonii</i> . Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado con 2,4-D y K, con diferentes concentraciones de sacarosa, a las 24 semanas de cultivo.....	47
Tabla 13. Respuesta Morfológica a partir de segmentos de callo de <i>Mammillaria san-angelensis</i> en medio B5 modificado (Litz, 1985) suplementado con 2, 4-D y K, con diferentes concentraciones de sacarosa. A los 10 semanas de cultivo.....	48
Tabla 14. Respuesta a la inducción de la Embriogénesis somática a partir de segmentos de callo en <i>Mammillaria sanchez-mejoradae</i> en medio B5 modificado (Litz, 1985), modificado con 2,4-D y K, con diferentes concentraciones de sacarosa, a las 10 semanas de cultivo.....	49

II. INDICE DEL APÉNDICE	PAG
APÉNDICE 1. Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).....	64
APÉNDICE 2. Medio de Cultivo Litz (Litz 1985).....	65
APÉNDICE 3. Series modificadas de deshidratación con alcohol butílico terciario (ATB).....	66
APÉNDICE 4. Preparación de Alcoholes.....	66
 ANEXO. Preparación de reactivos.....	 67
1.- Fijadores.....	67
2.- Colorantes.....	67

III. ABREVIATURAS

ANA → Ácido Naftalenácetico.

BA → Benzil adenine.

BADH → Expresión de genes en plástidos Betaine Aldehyde Deshidrogenasa

CAM → Metabolismo Ácido Crasuláceo.

CITES → (siglas en Inglés) to the Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora.

K → Kinetina

MS → Murashige y Skoog.

2,4-D → 2, 4- Diclorofenoxiácetico.

1. INTRODUCCIÓN

México ocupa un territorio de 1 972 544 km², y dentro del mismo alberga una gran cantidad de organismos de muy diversas formas y tamaños comprendidos en taxa diferentes, ocupando el cuarto lugar en diversidad biológica en el mundo (Mittermeier, 1988), aún y cuando no alcanza los niveles de Australia, Madagascar y Sudáfrica, México ocupa el 12% del monto total de la flora en el mundo (Rzedowski, 1991).

Aunque originarias de Sudamérica, la familia Cactaceae ha definido en México su máxima diversidad, abundancia e importancia con las 900 especies estimadas (Rzedowski, 1991), de las cuales el 36% de los géneros y el 72% de las especies son endémicas (Rzedowski, 1991). En forma lamentable, alrededor de 21 especies son consideradas en peligro de extinción (Glass, 1998, Norma Oficial Mexicana, 2001) y 39 especies ubicadas en el Apéndice I de la CITES (CITES, 1995). Esta situación es debida principalmente a la colecta ilegal para su uso ornamental, y la destrucción de los hábitats naturales.

En diversas partes del mundo existe afición por coleccionar y poseer cactáceas, y en menor escala por el cultivo de estas plantas, no solo por su diversidad de formas, sino por la belleza de sus flores efímeras. Las cactáceas no sólo tienen importancia económica por sus cualidades como plantas ornamentales, las hay también alimenticias, forrajeras e industriales. Aparte de la importancia comercial que puedan tener, tanto para el desarrollo económico de las regiones donde abundan, es importante considerar las funciones ecológicas (fuente de agua, alimento, albergue para especies animales) que desempeñan. En los ecosistemas de las regiones áridas y semiáridas del continente americano, las cactáceas son cruciales en la estabilidad de los mismos, por eso es necesario investigar y desarrollar tecnologías que permitan su preservación, pues debido a sus características fisiológicas especiales, las cactáceas son susceptibles a la extinción cuando ocurren cambios bruscos en su medio. Con éstas tecnologías se puede proteger su diversidad y así preservar el recurso para su aprovechamiento.

Las cactáceas son comúnmente propagadas mediante semillas y brotes con raíz. Sin embargo, estos métodos convencionales son inadecuados para este tipo de especies con semillas en dormancia, bajos rangos de crecimiento, autoesterilidad, bajos rangos de germinación, o poca generación de brotes con raíz. Por todo lo anterior, el cultivo *in vitro* es una herramienta alterna para la producción de cactus, generando un gran número de individuos a partir de un solo explante y con crecimiento acelerado. Estos organismos tienen un crecimiento muy lento, ya que para alcanzar 1cm de altura requieren 2-3 años bajo condiciones de invernadero y más de 4 años en condiciones silvestres. El sistema de propagación *in vitro* se ha desarrollado en más de 35 especies de cactus, representando 20

géneros (Starling y Dodds, 1983; Hubstenberger *et al.*, 1989; Clayton *et al.*, 1990; Fay y Graton, 1992; Pérez-Molphe-Balch, 1998).

Entre las especies más amenazadas se encuentran:

Mammillaria sanchez-mejoradae es una especie en Peligro de extinción de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001; SEMARNAT, 2002), y ubicada dentro del Apéndice II del CITES (CITES, 1995). Representada por una pequeña población con distribución restringida o endémica para un área de menos de 5 hectáreas dentro del Estado de Nuevo León, requiere una urgente atención especial, ya que se ha reportado que en el hábitat natural podrían existir tan solo 1000 individuos (Glass, 1998).

La localidad tipo de *M. san-angelensis* ha sido severamente impactada por el crecimiento excesivo de la mancha urbana en la capital de la Republica Mexicana (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), y ha sido incluida en el Apéndice II de CITES (CITES, 1995), y en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, con categoría de Peligro de Extinción y Endémica (SEMARNAT, 2002).

Aztekium hintonii, es una especie con alto valor ornamental, por lo que está incluida en el Apéndice II de CITES (CITES, 1995), y en la NOM-059-ECOL-2001, con categoría de Rara y Endémica (SEMARNAT, 2002).

En el presente estudio, se reporta la regeneración *in vitro* de estas especies vía organogénesis y/o embriogénesis somática y, con un estudio estructural de los embriones somáticos generados. El sistema *in vitro* generó plantas en corto tiempo, que podría ser la base para una metodología de propagación. Su aplicación comercial en un futuro cercano permitirá reducir las presiones existentes por sobrecolecta de las poblaciones silvestres.

RESUMEN

Se indujo la embriogénesis somática y organogénesis a partir de tejido indiferenciado (callo) de 3 especies de cactus, *Aztekium hintonii*, *Mammillaria san-angelensis* y *Mammillaria sanchez-mejoradae*, cultivado en medio MS y B5 modificado (Litz, 1985), respectivamente. La embriogénesis somática se presentó en *A. hintonii* en los medios con 0.5mg/l de 2,4-D y 0.1mg/l de K y, altas concentraciones de sacarosa (60 y 70g/l). En *M. san-angelensis* la K en concentraciones de 0.1-0.5mg/l y en ausencia y/o bajas concentraciones de 2,4-D mantuvo el número de brotes más alto (10-8) con respecto al resto de los tratamientos.

Los tratamientos con 2mg/l de 2,4-D y 0.1mg/l de K y 45 y 60g/l de sacarosa, registraron la respuesta más favorable morfogénicamente, para *M. sanchez-mejoradae*.

ABSTRACT

One induced the somatic embryogenesis and organogenesis from tissue callus of 3 species of cactus, *Aztekium hintonii*, *Mammillaria san-angelensis* and *Mammillaria sanchez-mejoradae*, cultivated MS and modified B5 in the middle (Litz, 1985), respectively. The somatic embryogenesis appeared in *A. hintonii* in means with 0.5mg/l of 2, 4-D and 0.1mg/l of K and, discharges sucrose concentrations (60 and 70g/l). In *M. san-angelensis* K in concentrations of 0.1-0.5mg/l and absence and/or losses concentrations of 2,4-D it maintained the higher number of buds (10-8) with respect to the rest of the treatments. The treatments with 2mg/l of 2, 4-D and 0.1mg/l of K and 45 and 60g/l of sucrose, registered the most favorable answer morphogenetically, for *M. sanchez-mejoradae*.

2. OBJETIVO GENERAL

Establecer condiciones de cultivo *in vitro* para lograr la regeneración de *Mammillaria sanchez-mejoradae*, *Mammillaria san-angelensis* y *Aztekium hintonii*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar el efecto del 2,4-D y K en la inducción de respuestas morfogénéticas, tendientes principalmente a embriogenésis somática a partir de callo.
2. Evaluar el efecto de la sacarosa en la producción de embriones somáticos.
3. Realizar un análisis estructural (histológico) de la formación de embriones somáticos.

3. ANTECEDENTES

3.1. Características Generales de la Familia Cactaceae.

Las cactáceas son una familia de plantas que habitan generalmente en ecosistemas desérticos; suelen tener tallos gruesos y carnosos, hojas que en la mayoría de las especies la evolución transformó en espinas, flores delicadas, de brillantes colores, vistosas y efímeras que contrastan con la corpulencia de la planta, y frutos jugosos (Hubstenberger *et al.*, 1992). Sus peculiares características han fascinado a botánicos y especialistas, y sus extrañas y caprichosas formas han atrapado la atención de coleccionistas de todo el mundo. Las cactáceas son, hoy día, de las plantas más codiciadas del planeta (Olfield, 1997)

Cactus es el nombre latino del vocablo griego *Kaktos* que significa cardo. Con esta palabra se designa por lo común a las plantas que tienen espinas y tallos suculentos o jugosos, aunque no todas pertenecen a la familia botánica de las cactáceas (Arreola, 1990).

Las plantas de la familia Cactaceae son plantas dicotiledóneas, perennes, cuya vida dura más de dos años y por tiempo indefinido, según la especie. Los individuos más viejos llegan a vivir ciento cincuenta años o quizás más. Algunas especies alcanzan su madurez a los dos o tres años, mientras que otras les toman varios lustros (Haustein, 1988; Hubstenberger *et al.*, 1992). La mayoría de sus características morfológicas y fisiológicas están relacionadas con un uso muy eficiente del agua. Su forma globosa y robusta les permite almacenar el preciado líquido, al mismo tiempo que disminuye la superficie de la planta expuesta al sol. La existencia de una cutícula impermeable que cubre toda la planta evita la pérdida de agua por transpiración; la entrada y salida del agua está regulada por los estomas (Arreola, 1990; Hubstenberger *et al.*, 1992). Al igual que otras plantas como las crasuláceas y los agaves, realizan la fotosíntesis por medio de un mecanismo conocido como metabolismo CAM (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas) (Fay y Gratton, 1992). Éste les permite realizar la fotosíntesis con un desfase en el tiempo. Durante la noche, cuando la temperatura es menor, se abren los estomas para realizar el intercambio gaseoso, y el bióxido de carbono captado es almacenado en el tejido de la planta en forma de ácido málico (Cullman *et al.*, 1986; Arreola, 1990; Granados 1993). Durante el día cesa la transpiración y, aprovechando la luz solar, la planta realiza la síntesis de carbohidratos utilizando el bióxido de carbono almacenado durante la noche. Al no transpirar durante el día, la planta evita la pérdida excesiva de agua. Este proceso la obliga a producir grandes masas de tejido de almacenamiento, en el que además de acumular el ácido málico (manera en el que se fija el bióxido de carbono) se almacena agua (Granados 1993). La energía que la planta gasta en producir este tejido repercute directamente en su crecimiento, ya que la proporción entre el tejido de almacenamiento y el de crecimiento es mayor que en el de la mayoría de las plantas, motivo por el cual las cactáceas tienen un lento crecimiento (Haustein, 1986). La falta de hojas y la presencia de

espinas o pelos refrigerantes en algunas especies, ayuda a la planta a disminuir el calor provocado por la incidencia de los rayos solares (Hubstenberger *et al.*, 1992). No obstante, no es raro que el tallo alcance temperaturas muy elevadas, que en otras plantas las podrían llevar al atrofiamiento de sus tejidos. Estudios recientes han encontrado que algunas sustancias producidas por ciertas células vegetales pueden incrementar la tolerancia a las altas temperaturas; la presencia de dichas sustancias (proteínas de choque térmico) se ha comprobado en varias especies de cactus (Becerra 2000). Sin embargo, las mismas características que les han permitido ser tan exitosas en medios áridos, representan limitaciones en otros medios. La gran cantidad de agua presente en sus tejidos les impide sobrevivir en lugares donde la temperatura desciende por debajo de cero grados centígrados por periodos prolongados, ya que esto provocaría la muerte de sus tejidos por congelación; por ello, la distribución de las cactáceas se limita a las regiones tropicales (Cullman *et al.*, 1986).

3.2. Distribución Geográfica.

La familia Cactaceae es endémica de América; su distribución natural abarca prácticamente todo el continente, con excepción de las regiones por encima de los 5600 de latitud norte (Gibson y Nobel, 1986; Haustein, 1986; Leuenenberger, 1986). Después del descubrimiento de América algunas especies fueron introducidas en otros continentes. Aunque existen muy pocos registros fósiles de los cactus, estudios realizados por especialistas consideran la zona tropical seca de Sudamérica como el probable centro de origen de la familia (Cullman *et al.*, 1986) (Mapa 1). A partir de aquí los cactus se han diversificado y han invadido casi todos los ambientes naturales de América, desde las selvas húmedas de Centroamérica, hasta los desiertos más secos de Perú, pasando por las selvas caducifolias, los bosques templados y, algunas especies incluso han logrado establecerse en regiones que presentan nevadas durante el invierno (Arreola, 1990). Sin embargo, la mayoría de las especies, (alrededor de 70%), se distribuyen en regiones áridas y semiáridas, constituyendo en varias zonas elementos dominantes de la vegetación (Rzendowski, 1990). En México, una gran variedad de cactáceas ha conquistado los extensos territorios áridos del norte y centro del país, llegando a ser, probablemente, las plantas más características del paisaje mexicano. Se calcula que a nivel global la familia incluye alrededor de 110 géneros y cerca de 1 500 especies (Cullman *et al.*, 1986). En México existen alrededor de 52 géneros y 900 especies, por lo cual se le considera el país como el de mayor diversidad para la familia (Haustein, 1986; Rzendowski 1991). Algunas de las regiones de alta diversidad florística de cactáceas en México son el valle de Tehuacán-Cuicatlán, localizado en los Estados de Puebla y Oaxaca, el Altiplano Potosino y Sur de Nuevo León, los valles intermontanos de Hidalgo y Querétaro y los bosques deciduos y espinosos de Tehuantepec (Arias, 1993). Como centro de diversificación

de la familia, en México encontramos también un alto grado de endemismo: aproximadamente 36% de géneros y 72% de especies existen únicamente en nuestro país (Rzedowski, 1991).



Fig. 1. Distribución de géneros de la Familia Cactaceae en el Continente Americano, y su abundancia relativa en los diferentes centros de distribución (Tomado de Cullman *et al*, 1986)

3.3. Uso y Aprovechamiento.

La atracción del hombre por las cactáceas no es reciente. Ya en la época prehispánica eran plantas muy valoradas por su belleza. Se sabe que en los jardines de Nezahualcóyotl los cactus ocupaban un lugar importante y entre ellos se encontraban especies traídas de lugares muy lejanos. Cuando los españoles llegaron a México, la rareza y hermosura de estas plantas los sorprendieron de tal manera que inmediatamente comenzaron a colectarlas y enviarlas al viejo continente, iniciando así un comercio que a lo largo de los años las ha llevado a ser uno de los grupos de plantas más amenazados en nuestro país. Los primeros ejemplares que cruzaron el Atlántico llegaron a España a principios del siglo XVI, y a finales de ese mismo siglo se registraron en diversos jardines botánicos y colecciones particulares en Italia, Alemania y Holanda (Bravo-Hollis, 1978).

El uso de las cactáceas en México es muy variado (Tabla 1) y se remonta a épocas anteriores a la llegada de los españoles (Arreola, 1990). Diversas fuentes testifican la importancia que estas plantas tenían para las diferentes culturas que habitaban en nuestro territorio (Rosales, 1996). El consumo de los tallos y los frutos como alimento humano es, probablemente, el uso más común que los antiguos pobladores de México dieron a estos vegetales (Durán, 2002). Sin embargo, muchas especies tenían un uso medicinal o eran fuente de materias primas para la construcción y la elaboración de armas de caza y pesca, así como de diversas herramientas (Durán, 2002; Socha, 2002).

Tabla 1. Uso y Aprovechamiento de algunas especies de la familia Cactaceae (Haustein, 1988)

Alimento Humano:

<i>Opuntia ficus-indica</i>	Fruto
<i>O. streptacantha</i>	Fruto
<i>O. leucotricha</i>	Fruto
<i>Hylocereus guatemalensis</i>	Fruto
<i>H. triangularis</i>	Fruto
<i>H. undatus</i>	Fruto
<i>Carnegiea gigantea</i>	Fruto
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Fruto
<i>Echinocereus cinerascens</i>	Fruto
<i>Pereskia portulacifolia</i>	Fruto

Aromático:

<i>Ferocactus wislizeni</i>	Elaboración de dulces
-----------------------------	-----------------------

Construcción:

<i>Cereus spp.</i>	Cercas
<i>Pachycereus marginatus</i>	Cercas

Ceremonias Religiosas y/o Medicinal

<i>Lophophora williamsii</i>	Alucinógeno
<i>Trichocereus spp.</i>	Alucinógeno
<i>Selenicereus grandiflorus</i>	Alucinógeno

Algunas de ellas llegaron a tener un significado divino y se utilizaban en ceremonias religiosas. Tal es el caso del peyote (*Lophophora williamsii*), un pequeño cactus con propiedades alucinantes que hasta la fecha es importante dentro de las creencias y costumbres de varios grupos étnicos, como los huicholes, tarahumaras, coras y tepehuanes (Rosales, 1996). Prácticamente todas las partes de las plantas han sido utilizadas para el consumo humano. Actualmente los tallos de algunas especies de biznagas (nombre común que se da a los cactus de forma globosa) de los géneros *Melocactus*, *Echinocactus* y *Mammillaria*, se utilizan en la confección del tradicional dulce de acitrón, muy popular en el centro del país (Ortiz, 1999; Muñoz, 2002). Destaca, por supuesto, el consumo de varias especies del género *Opuntia*, cuyos tallos jóvenes, conocidos comúnmente como nopalitos, y frutos, conocidos como tunas, son cada vez más populares, incluso fuera de México (Arreola, 1990). Las conocidas pitayas, tunillos, teteches, garambullos y xoconoxtles, son otros frutos de cactus que tradicionalmente han sido recolectados por los habitantes de las zonas áridas del país (Ortiz, 1999; Muñoz, 2002). Además de su uso como alimento humano, las distintas especies de cactus se han utilizado para fines muy diversos, como cercos vivos, para retener el suelo, como forraje, como fuentes de mucílagos, gomas y pectinas, como colorantes, etc (Socha, 2002). Pero en la actualidad su uso más común, quizá sea como plantas ornamentales. No obstante que el saqueo de plantas ha sido constante desde entonces, es desde el siglo pasado cuando la cactofilia se ha convertido en una seria amenaza para esta familia.

3.4. Estatus.

El saqueo ha sido brutal, miles de toneladas de plantas han sido arrancadas de su hábitat natural para ir a formar parte de jardines y colecciones privadas en todo el mundo (Benítez y Dávila, 2002). La demanda internacional se ha abastecido fundamentalmente con la extracción de plantas y semillas de su hábitat natural. La afición de muchos coleccionistas por adquirir plantas exóticas representa una presión para las poblaciones silvestres (Arias, 1993). Esta situación ha llevado al desarrollo de una compleja red de comercio ilegal que ha afectado de manera determinante las poblaciones naturales y ha colocado a muchas especies en situación de riesgo (Fay y Gratton, 1992; Hubstenberger *et al.*, 1992).

La Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001), en la que se establecen especificaciones para la protección de las especies de flora y fauna silvestres, incluye 257 especies de cactáceas en alguna categoría de riesgo, 24 en peligro de extinción, 96 amenazadas, 135 raras y 2 sujetas a protección especial, es decir, cerca de la tercera parte de la flora cactológica del país se encuentra amenazada (SEMARNAT, 2002).

Del total de estos cactus, 72% (648 especies) son endémicos de México (Rzendowski, 1991). La problemática de la protección y conservación de

las cactáceas es muy compleja. La mayoría de las especies que se encuentran amenazadas pertenecen a poblaciones pequeñas, de distribución restringida (Tabla 2), o son especies recientemente descubiertas por la ciencia, por lo que se conoce muy poco de su biología (Glass, 1998).

Tabla 2. Representantes de la Familia Cactaceae Altamente Vulnerables.

Nombre Científico	Clasificación
	NOM-059-ECOL-2001
<i>Aporocactus leptophis</i>	Peligro de Extinción
<i>Ariocarpus agavoides</i>	Peligro de Extinción
<i>Ariocarpus scapharostrus</i>	Peligro de Extinción
<i>Astrophytum asterias</i>	Peligro de Extinción
<i>Aztekium hintonii</i>	Rara
<i>Coryphantha gracilis</i>	Peligro de Extinción
<i>Coryphantha werdermannii</i>	Peligro de Extinción
<i>Echinocactus grusonii</i>	Peligro de Extinción
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	Protección Especial
<i>Echinocereus lindsayi</i>	Peligro de Extinción
<i>Lophophora williamsii</i>	Protección Especial
<i>Mammillaria carmenae</i>	Peligro de Extinción
<i>Mammillaria herrerae</i>	Peligro de Extinción
<i>Mammillaria laui laui</i>	Peligro de Extinción
<i>Mammillaria laui dasyacantha</i>	Peligro de Extinción
<i>Mammillaria laui discata</i>	Peligro de Extinción
<i>Mammillaria san-angelensis</i>	Peligro de Extinción
<i>Mammillaria sanchez-mejoradae</i>	Peligro de Extinción
<i>Pachycereus gaumeri</i>	Peligro de Extinción
<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	Peligro de Extinción
<i>Turbiniacarpus pseudomacrochele</i>	Peligro de Extinción
<i>Turbiniacarpus schmiedickeanus gracilis</i>	Peligro de Extinción

A esto se agrega el hecho de que la mayoría presenta un lento crecimiento y tiene ciclos de vida muy largos. Vemos pues que sus características tanto biológicas como ecológicas hacen de las

cactáceas un grupo altamente vulnerable. Actualmente la legislación mexicana contempla la protección de muchas especies silvestres consideradas como amenazadas. Las 257 especies amenazadas también se encuentran inscritas en los apéndices I, II y III de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres), organización que regula, en el ámbito internacional, el comercio de plantas y animales silvestres consideradas en peligro, mediante un sistema de permisos (CITES, 1995). Muchos son los esfuerzos que se han hecho por proteger estas codiciadas plantas; dentro de ellos destaca el valioso trabajo realizado por diversos jardines botánicos, así como por varios centros de investigación y asociaciones civiles. Algunos investigadores se han dado a la tarea de estudiar la distribución y biología de las cactáceas, al mismo tiempo que se han creado centros de propagación y distribución de cactus como una medida que ayude a disminuir la presión sobre las poblaciones naturales (Clayton *et al.*, 1990; Hubstenberger *et al.*, 1992; Fay y Gratton, 1992; Rubluo *et al.*, 1993). Dentro de estos centros se llevan a cabo programas de educación y difusión sobre técnicas de cultivo. No obstante todos los esfuerzos por proteger la flora cactológica, poco se ha logrado para desanimar la sobrecolecta. Existe una gran falta de conocimiento y entendimiento de la problemática por parte del público en general, e incluso muchas personas involucradas en el comercio, sobre todo recolectores, no saben que al coleccionar plantas del campo incurren en un delito. El futuro de muchas especies depende de la capacidad que tengamos para lograr revertir el proceso de saqueo y, el gusto por la colección de cactus deje de ser una actividad destructiva para convertirse en el mecanismo que los proteja y conserve (Oldfield, 1997).

3.5. Principales Factores que Ponen en Riesgo a las Especies.

Entre 1986 y 1988, se realizó un estudio para reconocer el grado de amenaza en 28 especies de cactáceas endémicas de México de las cuales se sabía que presentaban serios problemas de supervivencia en su hábitat natural (Sánchez-Mejorada *et al.* 1986; Anderson, 1990). Fueron tres las principales causas reconocidas: (1) Sobrecolecta del recurso, (2) Destrucción y modificación del hábitat, y (3) Factores naturales (Arias, 1993).

Mammillaria sanchez-mejoradae y *M. san-angelensis* especies en Peligro de extinción y Endémicas (NOM-059-ECOL-2001; SEMARNAT, 2002), sus hábitats altamente afectados por la sobrecolecta, y extendimiento de la mancha urbana mantienen una pequeña población. *Aztekium hintonii*, especie con alto valor ornamental, por lo que está incluida en el Apéndice II de CITES (CITES, 1995), y en la NOM-059-ECOL-2001, con categoría de Rara y Endémica (SEMARNAT, 2002), planta de reciente descubrimiento que junto con *Aztekium riterii*, son representantes únicos del género (Glass, 1998). Las especies antes mencionadas son organismos altamente vulnerables a la extinción por la sobrecolecta y pérdida de hábitat, por lo que requieren de atención especial y su

conocimiento científico, es por ello que en el presente estudio se desarrollan estrategias de desarrollo *in vitro*.

3.6. DESCRIPCIÓN DE GÉNEROS.

3.6.1. *Aztekium* (Tomado de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Plantas pequeñas más o menos cespitosas. Tallos globosos aplanados, de color verde grisáceo, o con ápice lanoso, provisto de costillas y falsas costillas. Costillas en número variable, integradas por tubérculos triangulares muy numerosos y apretados longitudinalmente; la compresión lateral de la base de los tubérculos ejercida entre una y otra costilla da origen a las falsas costillas que son más angostas e interpuestas entre las primarias. Aréolas muy próximas entre sí, algo lanosas. Espinas sólo en las aréolas apicales, pequeñas y algo aplanadas. Flores en el ápice del tallo, en la región florífera de las aréolas jóvenes; pericarpelo cortamente cilíndrico; receptáculo infundibuliforme, con el tubo largo y angosto; segmentos del perianto de color rosa claro; estambres escasos, los primarios insertos en la parte superior del tubo receptacular; estilo largo, lóbulos del estigma 4 o 5. Fruto pequeño, claviformes, blanquecino con tinte rosado, membranoso cuando madura, quedando incluido en la lana del ápice, donde revienta. Semillas globosas hasta piriformes, de 0.5mm de longitud, con testa negra y gruesamente tuberculada; hilo basal amplio; arillo muy grande.

3.6.2. *Mammillaria* (Tomado de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Plantas pequeñas hasta muy pequeñas, simples o cespitosas. Tallos globoso-aplanados, globosos, cortamente cilíndricos o hasta ocasionalmente cilíndricos, generalmente erectos, rara vez rastreros o pendulosos, ramificándose por brotes basales o laterales y, a veces, por dicotomía apical, con jugo acuoso, semilechoso o lechoso. Tubérculos dispuestos en series espiraladas, 3 y 5, 5 y 8, 8 y 13, 13 y 21 o 21 y 34, más o menos numerosos, cónicos, cónico-cilíndricos, cónico-piramidales, piramidales o poliédricos, duros o suaves, sin surco areolar ni glándulas. Aréolas dimorfas, las espiníferas situadas en el ápice de los tubérculos, con lana, con cerdas o desnudas. Espinas generalmente diferenciadas en centrales o sólo radiales, variables en número, forma, dimensiones y color; aciculares, tubuladas o aplanadas; rectas, curvas, retorcidas y en ocasiones, con la punta uncinada; dispuestas en las aréolas en formas diversas. Flores generalmente dispuestas en corona cerca del ápice, pequeñas hasta algo grandes; infundibuliformes o campanuladas, de color blanco, amarillo, rosado, rojo o púrpura; pericarpelo normalmente sin escamas; tubo receptacular corto en la mayoría de los casos, normalmente también sin escamas, pero ocasionalmente con algunas cuantas muy pequeñas; segmentos del perianto escasos, incluidos, insertos a partir del límite superior del anillo nectarial hasta la garganta;

estilo delgado, incluido; lóbulos del estigma lineares. Fruto una baya pequeña, claviforme o casi así, normalmente sin escamas, con el pericarpelo delgado, de color rosado purpúreo hasta escarlata, a veces verdoso, conserva adheridos los restos secos del perianto. Semilla pequeña, más o menos globosa, ovoide o periforme; hilo basal o sub-basal, sin o con estrofolo; micrópilo en un extremo del hilo, dentro del mismo o muy próximo al borde; testa con estructura reticulada y de color castaño más o menos oscuro hasta foveolada y de color castaño rojizo oscuro hasta negro; embrión ovoide o algo cilíndrico, muy succulento, con cotiledones reducidos; perisperma reducido hasta ausente.



Fig. 2. *Aztekium hintonii* Glass y F. Maurice. Con flor color comúnmente rosa subido a magenta, abierta por completo durante la mañana y se cierra por la noche.

3.7. *Aztekium hintonii* Glass y F. Maurice.

3.7.1. Descripción Taxonómica (Tomado de Glass, 1998).

Aztekium hintonii es una planta de tallo solitario, globular, de 9cm de altura y 10cm de diámetro, algunas un tanto columnares, de color gris verdoso, opaco, con el ápice hundido y con abundantes y muy compactados pelos lanosos blancos (Fig. 2). Costillas, 10-15, 8 cuando son jóvenes, de 6-12mm de profundidad, suberosas; superficie estriada, densa. Aréolas un tanto cuadradas, muy juntas, donde aparecen espinas lanosas. Espinas, 3 hasta de 13mm de longitud, ganchudas, 0.6-0.7mm de espesor, suave, quebradiza, que muda a menudo. Flores desde el ápice de 1-3cm de diámetro, los colores varían entre el rosa subido al magenta (Fig. 2), abren por la mañana y se cierran por la noche, fruto parecido a la baya; se encuentra incluido en la lana del ápice; conserva adheridos los restos secos del perianto. Semillas de 0.8mm de longitud, incluyendo un estróbilo suberoso de 2mm; testa de color negro rojizo, gruesamente tuberculada. Planta de reciente descubrimiento que junto con *Aztekium riterii*, son representantes únicos del género (Glass, 1998).

3.7.2. Distribución y Hábitat.

Esta especie es endémica de Nuevo León. Se encuentra en las escarpadas laderas de yeso de algunos cerros al centro del estado, comparte el mismo hábitat con *Geohintonia mexicana* (Glass, 1998).

3.7.3. Estatus.

Se encuentra incluida en el Apéndice II de CITES (CITES, 1995), y en la categoría de rara en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002). La forma caprichosa de la planta y el color magenta de la flor, desde su publicación ha sido objeto de saqueos masivos, que de continuar con estas acciones, pondrán en grave peligro a la especie.

3.7.4. Clasificación Taxonómica (Tomado de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Familia: Cactaceae L.

Subfamilia: Cactoideae Suman

Tribu: Cacteeae Buxbaum

Subtribu: Thelocactinae Buxbaum

Género: *Aztekium* Boedeker ex Berger

Especie: *Aztekium hintonii* Glass y Fitz Maurice

Nombre común: Piedra del yeso.



Fig. 3. *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. Floreando en invernadero y mostrando sus hermosas espinas blancas.

3.8. *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada.

3.8.1. Descripción Taxonómica (Tomado de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Plantas generalmente simples, rara vez con ramificaciones basítonas. Tallo globoso hasta cortamente columnar, de alrededor de 6 a 12 cm de altura y 4 a 7 cm de diámetro; ápice ligeramente hundido, lanoso y

cubierto completamente por las espinas (Fig.3). Tubérculos apretadamente dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, prácticamente cónicos, con la base oscuramente romboide, de cerca de 7 mm de altura y 4 mm de diámetro basal, de color verde más bien claro, con jugo acuoso, ocultos por las espinas. Axilas de los tubérculos jóvenes provistas de abundante lana blanquecina, caduca con el tiempo. Aréolas ovaladas, pequeñas, cuando jóvenes llevando copiosa lana pálida amarillenta, caduca. Espinas radiales 18 a 20, finamente aciculares, de alrededor de 5 a 7mm de longitud, ligeramente encorvadas hasta retorcidas, lisas semiflexuosas, de color blanco vítreo, traslúcidas, con la base ligeramente ensanchada, amarillenta, horizontalmente extendidas hasta algo adpresas; las 3 inferiores horizontalmente divergentes; las laterales, 6 o 7 a cada lado de la areola, dispuestas en forma casi pectinada; 1 a 3, dispuestas en el ápice de la areola, divergentes y algo ascendentes. Espinas centrales generalmente 2, rara vez 1, delgadamente subulada, de cerca de 5 a 6 mm de longitud, lisas, tiesas, rectas, con la base ligeramente bulbosa, de color amarillo intenso, la superior porrecta o casi así, la inferior reflejada, de color blanco vítreo, a veces con la punta de color pardo hasta negruzco. Flores campanuladas, pequeñas de unos 12 a 14mm de longitud, brotando en corona en la zona de transición de la parte cilíndrica del tallo a la redondeada del ápice; segmentos exteriores del perianto oblanceolados, agudos, enteros, de color castaño rosado con tintes verdosos hacia la base y purpúreos hacia el ápice, con la línea media más oscura (Fig. 3); segmentos interiores del perianto linear oblongos, enteros, con el ápice desde obtuso hasta brevemente acuminado, de color carmesí rosado; filamentos blanco amarillentos; anteras amarillas; estilo blanco amarillento, a veces con tinte rosado; lóbulos del estigma 3 o 4, blanco amarillentos. Fruto claviforme, rojo. Semilla encorvada periforme, testa de color castaño amarillento.

3.8.2. Distribución y Hábitat.

Es endémica del Distrito Federal, se distribuye en la parte Sur del Valle de México. La localidad tipo es el Pedregal de San Ángel, donde crece en rocas basálticas del derrame de lava del Volcán Xitle (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Asociada a *Mammillaria magnimamma*, *Senecio praecox*, *Selaginella lepidophylla*, etc.

3.8.3. Estatus.

Se encuentra incluida en el Apéndice II de CITES (CITES, 1995), y en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, con categoría de Peligro de Extinción y Endémica (Anónimo, 2002).

3.8.4. Clasificación Taxonómica (Tomado de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Familia: Cactaceae L.

Sub-familia: Cactoideae K. Schumann

Tribu: Cacteae F. Buxbaum

Sub-tribu: Cactinae F. Buxbaum

Género: *Mammillaria* Hawort

Especie: *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada

Nombre Común: Biznaguita.



Fig. 4. *Mammillaria sanchez-mejoradae* González. La floración en invernadero se presenta en los meses de Noviembre a Febrero.

3.9. Mammillaria sanchez-mejoradae González.

3.9.1. Descripción Taxonómica (Tomado de Glass, 1998).

Es una planta que presenta un tallo simple, semigloboso, ligeramente depresso, 30 mm de diámetro (Fig. 4). La parte subterránea de globosa a cónica, 18 mm de longitud por 17 mm de diámetro; la parte aérea de 25 mm de longitud por 15 mm de diámetro, sin contar los tubérculos; ápice aplanado ligeramente deprimido. Raíces fibrosas, de unos 30 mm de longitud y 5 mm de anchura. Tubérculos imbricados, ascendentes, dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, cónicos, 7 mm de diámetro y 5 mm de altura, con la base más gruesa, ligeramente más estrechos en el ápice, color verde oscuro brillante, con jugo acuoso. Axilas desnudas. Aréolas de 1.3 mm, apicales, elípticas sin lana, amarillentas. Espinas de 30-40 pectinadas, todas radiales, setáceas, rígidas de color blanco, amarillo pálido en la base; las superiores más grandes que las inferiores, 2 mm y 1.5 mm respectivamente, de adpresas a un tanto reflexas hacia la base del tubérculo, imbricadas; generalmente cubren el cuerpo de la planta.

Las flores son pequeñas, subapicales, campanuladas, por lo común una sola flor abierta por ejemplar, aproximadamente 16mm de longitud, 20mm de diámetro, en la base, el margen blanco, con una franja media amplia, rosada, a veces verdusca (Fig. 4); segmentos exteriores del

perianto ascendentes, oblongo-ovados, el ápice lanceolado, 9mm de longitud y 5mm de diámetro, blanco, con una línea media café rosada; segmentos interiores del perianto recurvados en floración, dispuestos en dos series, obtusos, acuminados, con el margen entero, 10mm de longitud y 5mm de diámetro. En la parte superior, a veces con una fisura en o cerca del ápice, blancos, con una línea media delgada, notable, de tono rosado; filamentos erectos, delgados, atenuados hacia el ápice, color blanco amarillento, 7-8mm de longitud; anteras pequeñas de color crema; pericarpelo obovado; estilo marcadamente emergente sobre los estambres, 12mm de longitud, de color verde limón, se obscurecen hacia el ápice; lóbulos del estigma, 4, triangulares, 1mm, forman una cabeza de 2mm de diámetro, color amarillo verdoso.

El fruto es globoso, 3-8mm de diámetro, completamente enterrado dentro del cuerpo de la planta; madura un año después de la floración, luego emerge 1-2mm sobre la axila del tubérculo adyacente. Semillas negras, 20-40 por fruto.

3.9.2. Distribución y Hábitat.

Se conoce solo de su localidad original en la región central de Nuevo León, en la parte alta de un cerro, en el municipio de Galeana. Se estima que debe de haber entre 500 y 1000 individuos en la localidad (Glass, 1998).

3.9.3. Estatus.

Actualmente se le ubica en el Apéndice II de CITES (CITES 1995) y en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, en la categoría de en Peligro de Extinción y Endémica (Anónimo, 2002). La cual junto con otras 8 especies diferentes del mismo género comparte la misma categoría.

3.9.4. Clasificación Taxonómica (Tomado de Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Familia: Cactaceae L.

Sub-familia: Cactoideae K. Schumann

Tribu: Cacteae F. Buxbaum

Sub-tribu: Cactinae F. Buxbaum

Género: *Mammillaria* Hawort

Especie: *M. sanchez-mejoradae* González

Nombre Común: Biznaguita.

3.10. MORFOGÉNESIS IN VITRO.

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogenéticos (Fig. 5) muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales (George, 1993). La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión cigótico sin que medie la fertilización, mientras que en la organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces y/o flores (Dodds y Roberts, 1982; Kartha, 1982, y Widholm *et al.*, 1985). La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases, De Klerk y colaboradores en 1997 denominaron a estas diferentes fases como: fase de adquisición de la competencia, en donde las células no responden al estímulo organogénico pero adquieren esa competencia durante la fase de desdiferenciación. Fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa entre el tipo, la concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar, y fase de realización; la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado.

3.11. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

3.11.1. GENERALIDADES.

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno; estas estructuras son capaces de crecer y formar plantas (Sharp *et al.*, 1980; Gómez, 1998), en donde el desarrollo es similar al de la embriogénesis sexual, con la diferencia que éstas se generan de la fusión de dos gametos (masculino y femenino) y los otros parten de la división de una célula o un grupo de células somáticas (Tisserat *et al.*, 1979; Margara, 1988), ambos tipos de embriones para el caso de zanahoria se han descrito como estructural y bioquímicamente idénticos (Ammirato, 1989).

La embriogénesis somática *in vitro* es posible gracias a que cualquier célula o tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencialidad) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento (Komamine *et al.*, 2005).

Entre las ventajas que ofrece la producción de embriones somáticos están: la posibilidad de producir una gran cantidad de embriones (alta eficiencia de producción); la característica de bipolaridad que distingue a los embriones como plantas individuales; la similitud en diferentes niveles de organización (morfológico, fisiológico y bioquímico) con sus contrapartes sexuales y su capacidad para producir una planta nueva durante los procesos de germinación (Zimmerman, 1993; Komamine *et al.*, 2005).

Pero la característica sobresaliente de los embriones somáticos es que se desarrollan de células somáticas y por lo tanto presentan la potencialidad de producir duplicados de un genotipo específico (Sharp *et al.*, 1980; Gómez, 1998; Komamine *et al.*, 2005). Esta característica no

solo permite la propagación clonal, tanto en especies propagadas vegetativamente como por semillas; sino también la multiplicación de células somáticas a las cuales se les han introducido genes específicos por ingeniería genética. Los individuos genéticamente modificados pueden ser multiplicados en forma segura y eficiente, evitando los riesgos de la incorporación de genes extraños meioticamente inestables en el resto del germoplasma (Gray y Purohit, 1991; Berleth y Chatfield, 2002; Komamine *et al.*, 2005).

La propagación de plantas, a través de la embriogénesis somática, representa el método más eficiente de multiplicación clonal de plantas que se ha desarrollado hasta la fecha (Sharp *et al.*, 1980; Mc Kersie y Brown, 1996; Gómez, 1998) (Tabla 2). Se puede emplear tanto en especies que se reproducen por semillas como en aquellas de propagación vegetativa (Gray, 1997).

Tabla 3. Algunos ejemplos de plantas en donde la embriogénesis somática se ha inducido bajo condiciones *in vitro*.

Especie	Cita
<i>Eleutherococcus koreanum</i>	So-Young <i>et al.</i> , 2005
<i>Nelumbo nucifera</i> Geartn.	Arunyanart y Chaitrayagun, 2005
<i>Morus alba</i> L.	Agarwal <i>et al.</i> , 2004
<i>Solanum melongena</i> L.	Kantharajah y Golegaonkar, 2004
<i>Persea americana</i> Mill.	Perán-Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Chengalrayan <i>et al.</i> , 2001
<i>Lycopodiella inundata</i> L.	Atmane <i>et al.</i> , 2000
<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	Rout <i>et al.</i> , 2000
<i>Cicer arietinum</i> L.	Sagare <i>et al.</i> , 1995
<i>Gladiolus hort.</i>	Stefaniak, 1994

3.11.2. DIFERENCIAS ENTRE EMBRIONES SOMÁTICOS Y CIGÓTICOS.

Algunas diferencias entre embriones cigóticos y somáticos son: 1) sus sistemas de iniciación, 2) genético y, 3) la falta de la fase de quiescencia en embriones somáticos (Tabla 3) (Gray, 1997; Gómez, 1998; Berleth y Chatfield, 2002).

Sin embargo, tanto los embriones cigóticos como somáticos comparten similar ontogenia. Ambos embriones pasan por el estado globular, acorazonado y torpedo en especies dicotiledóneas y coníferas (Ammirato, 1987; Berleth y Chatfield, 2002).

No obstante, existen diferencias significativas que limitan su uso como método de propagación. Por ejemplo, especies que son monoembriónicas y producen embriones cigóticos vía un suspensor, generalmente dan origen a embriones somáticos por un sistema evolutivo poco desarrollado donde se forma una masa de tejido embrionario (denominado proembrional) con múltiples embriones somáticos. Las razones por este retroceso hacia un tipo de desarrollo primitivo son desconocidas (Gray y Purohit, 1991). Dicha masa de

embriones somáticos se desarrolla en forma asincrónica, de tal forma que múltiples estados de desarrollo embrionario están presentes en el cultivo en cualquier momento. Al desarrollarse en diferentes momentos están sujetos a cambios en el régimen nutricional del medio de cultivo. En este ambiente fluctuante desde el punto de vista nutricional, los embriones se vuelven desorganizados, forman nuevas células embriogénicas y de esta manera contribuyen a la asincronía (Sharp *et al.*, 1980).

Tabla 4. Diferencias entre la Embriogénesis Somática y Embriogénesis Cigótica.

DIFERENCIAS	EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA
HISTOLOGÍA	Origen de células vegetativas de un único individuo.	Formación a partir de la Unión de gametos
SEMILLA	Ausencia de la fase de quiescencia	Al llegar la madurez , los embriones cigóticos entran en un periodo de quiescencia
GENÉTICA	Misma combinación genética de la planta madre	Nuevo grupo de genes a partir de la unión de gametos en un proceso de meiosis

También ocurre una germinación precoz, donde dichos embriones forman solo raíces o tallos; no es una germinación que de origen a una plántula normal.

Otro problema es que los embriones somáticos generalmente muestran anomalías estructurales como cotiledones extras y meristemos apicales pobremente desarrollados (Ammirato, 1987).

Todos estos problemas se deben a las condiciones de cultivo y no a factores intrínsecos de los embriones somáticos, ya que embriones cigóticos inmaduros al ser removidos de las semillas y cultivados *in vitro* presentan similares irregularidades (Norstog, 1965).

3.11.3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA IN VITRO.

LaRue (1948), es el primero en describir estructuras semejantes a embriones obtenidos de tejido haploide (megagametofitos) en *Ceratozamia mexicana*, *Cycas revoluta* y *Encephalartos umbeluziensis*. Desde los primeros esfuerzos que de manera independiente se llevaron a cabo en la formación y desarrollo de embriones somáticos *in vitro* por Steward (1958) y Reinert (1958) a partir de tejidos de zanahoria, a esta especie modelo para el estudio de la embriogénesis somática se han añadido hasta la fecha un gran número de especies (Tabla 4), algunas tan importantes como la alfalfa y leñosas forestales, se multiplican comercialmente por este método (Steward *et al.*, 1958; Raghavan, 1976; Narayanswamy, 1977; Litz y Gray, 1992).

Se pueden obtener embriones somáticos de muy diversas partes de la planta (Steward *et al.*, 1958), así podemos utilizar como explantes: ápices radicales y caulinares, hipocótilos, peciolo, pedúnculo, hojas jóvenes y en general tejidos y órganos con características embrionarias, meristemáticas o reproductivas (embriones e inflorescencias inmaduras, secciones de escutelo, nucela y endospermo, óvulos, tejido ovárico) (Kohlenbach, 1978).

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa e indirecta (Sharp *et al.*, 1980; George, 1993).

La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica, y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (Sharp *et al.*, 1980; George, 1993; Gómez, 1998). La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa de callo y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis (Fig. 5) (Sharp *et al.*, 1980; George, 1993; Gómez, 1998). El proceso ocurre en varias etapas (Fujimora y Komamine, 1980; Komamine *et al.*, 2005): En la primera fase células competentes aisladas en medios ricos en auxinas forman grupos de células embriogénicas (Fig. 5) (Reinert, 1973; Gómez, 1998; Komamine *et al.*, 2005).

Tabla 5. Ejemplos de Embriogénesis Somática.

FAMILIA	ESPECIE	AUTOR
Coníferas	<i>Biota orientalis</i>	Konar y Oberol, 1965
“	<i>Picea glauca</i>	Durzan y col., 1973
“	<i>Pinus strobus</i>	Izikawa y col., 1973
Crasulaceas	<i>Kalanchoë pinnata</i>	Wadhi y Moham Ram., 1964
Cicadaceas	<i>Zamia integrifolia</i>	Nostog y Rhamtine, 1967
“	<i>Zamia fischeri</i>	Chavéz y col., 1992
“	<i>Zamia furfuracea</i>	Chavéz y col., 1992
“	<i>Zamia pumila</i>	Chavéz y col., 1992
“	<i>Ceratozamia hildae</i>	Chavéz y col., 1992
“	<i>Ceratozamia mexicana</i>	Chavéz y col., 1992
Orquidaceas	<i>Cymbidium</i>	Steward y col., 1970
Agavaceas	<i>Agave victoriae-reginae</i>	Martínez-Palacios y col., 2003
“	<i>Agave tequilaza</i> var. Azul	Arizaga y Ezcurra, 1995

En la fase dos, una vez replicados los centros embriogénicos a un medio sin auxinas, proliferan de forma lenta e indiferenciada (Fujimora y Komamine 1980; Chávez, 2003).

Luego se producen una serie de rápidas y sucesivas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico y se conforman embriones globulares, que al crecer pasando por los estados de corazón y torpedo y tras una fase de maduración y germinación darán lugar a plantas completas (Fig. 5) (Street y Withers, 1974; McWilliam *et al.*, 1974; Ammirato, 1989; George, 1993; Komamine *et al.*, 2005).

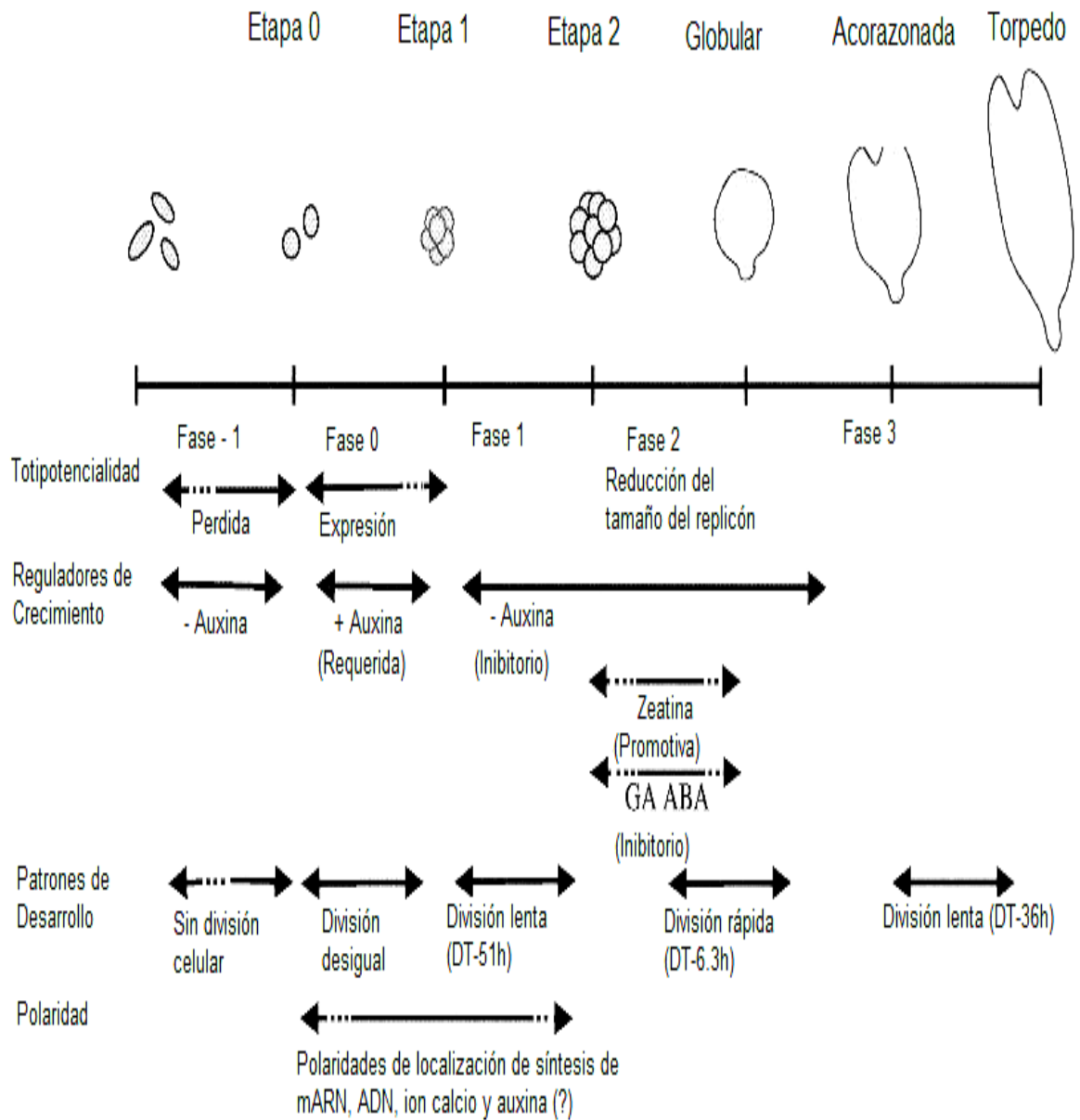


Fig. 5 Etapas de Formación de la Embriogénesis Somática *In Vitro* (Tomado de Komamine, 2005)

3.11.4. FACTORES DE INDUCCIÓN.

3.11.4.1. EXPLANTE.

Teóricamente, todos los tejidos vegetales tienen la capacidad para formar callos *in vitro* (Thorpe, 1995; Lakshmanan y Taji, 2000); sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos (Tabla 5) (Kohlenbach, 1978; Ammirato 1989), estos explantes se han usado con éxito para obtener callos embriogénicos en varias especies de la mayoría de las familias de plantas.

Tabla 6. Explantes comúnmente utilizados en la Embriogénesis.

EXPLANTE:

Cotiledones

Hipocótilos

Embriones

Ápices caulinares

Segmentos de: Tallos, Hojas, Raíces

Inflorescencias inmaduras

La respuesta embriogénica del callo depende del genotipo de la planta (Gómez, 1998; Komamine, 2005). Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio (Litz, 1985). Puede presentarse que los embriones generados a partir de una primera generación se desarrollen de forma espontánea (Thomas *et al.*, 1976). Los tejidos de raíz, de tallo, de pecíolos y de hojas se han utilizado (Maheshwari y Gupta, 1965; Vasil y Hidebrand, 1966; Wilmar y Hellendoorn, 1968; Chavez *et al.*, 2003; Martínez-Palacios, *et al.*, 2003). En tejidos florales también ha sido posible la formación de embriones (Raman y Greyson, 1974; Margara y Leydecker, 1978). La gran variedad de tejidos que generan embriones somáticos, podría sugerir que los factores esenciales de la embriogénesis somática son probablemente desconocidos o indeterminados (Margara, 1988).

3.11.4.2. MEDIO DE CULTIVO.

Generalmente se ha usado el medio MS generado para el cultivo de callo de tabaco (Murashige y Skoog, 1962) o la modificación de esta formulación (Litz, 1985); la concentración alta de sales de este medio (MS) parece ser muy benéfica para el crecimiento de embriones somáticos (Sharp *et al.*, 1980).

Wetherell (1984) ha demostrado que es posible aumentar el potencial embriogénico de los callos de zanahoria exponiéndolos a niveles altos de sacarosa o de manitol; la sacarosa se usa en concentraciones de 2% a 3% y hasta 12%. El nitrógeno, suministrado como nitrato o como ion amonio, es esencial (Sharp *et al.*, 1980; Margara, 1988); el nitrógeno orgánico provisto por la glutamina, alanina, la caseína hidrolizada, es

también benéfico (Litz, 1985) y puede remplazar el nitrógeno inorgánico en el medio (Sharp *et al.*, 1980). El hierro es también esencial para la embriogénesis somática ya que en ausencia de este elemento, los embriones somáticos globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez (Sharp *et al.*, 1980; Margara, 1988). Los altos niveles de sacarosa pueden tener un efecto comparable al producido por el ácido abscísico, las concentraciones altas estimulan la formación de callos embriogénicos (Norreel y Nitsch, 1968; Chávez, 1993), y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo tales como la formación de embriones secundarios, y la formación de policotiledones; también inhiben la germinación precoz (Nitsch y Nitsch, 1969; Sharp *et al.*, 1980).

3.11.4.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO.

De acuerdo con Evans y col. (1981) la mayoría de los sistemas embriogénicos requieren, para la inducción de los embriones, de una concentración alta de auxina (generalmente 2,4-D) en el medio (Fig. 5). La concentración usual de 2,4-D está dentro del rango de 0.5-27.6 μM (Margara, 1988). Otras auxinas sintéticas tales como el piroclam, el 2, 4,5-T, el ácido 2-benzotiazol acético, y el ácido paraclorofenoxiacético han demostrado ser bastante efectivas (George, 1993).

El papel de las citocininas en el medio inductor de embriones somáticos no es claro. Su toxicidad fue reportada por Halperin (1964), algunos medios sólidos enriquecidos con citocininas han demostrado mantener potencialmente la formación de embriones (Halperin, 1966; Calderón-Gil, 2003).

El ácido giberélico (GA_3) también se ha incorporado al medio con el fin de ayudar a la maduración normal y a la germinación de los embriones somáticos (Nitsch y Nitsch, 1969; Sharp *et al.*, 1980; Merkle *et al.*, 1996).

3.11.4.4. PAPEL DE LAS AUXINAS.

El nombre auxina significa en griego "crecer" y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación (Reinert, 1973).

Los aspectos cualitativos y cuantitativos de los reguladores de crecimiento en el microambiente de las células embriogénicas son importantes durante la etapa mitótica (Tisserat y Murashige, 1977).

El ácido indolacético (AIA) es la forma predominante, sin embargo, evidencias recientes sugieren que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas. La auxina es miembro de un grupo de hormonas vegetales; son sustancias naturales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal (Margara, 1988). Afectan al crecimiento del tallo, las hojas, las raíces y al desarrollo de ramas laterales y frutos. Las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución (Margara, 1988; George, 1993).

Se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de un callo embriogénico. Usualmente se emplea el 2,4-D, el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo (Fig. 5) (Denchev y Atanassov, 1989; Denchev *et al.*, 1990); sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurren en presencia de 2,4-D (Margara, 1988; Chávez, 1993), en consecuencia, hay que remover la auxina, o usarla en concentraciones muy bajas (Fig. 5). Contrario al modelo anterior, en agaves los embriones somáticos pueden germinar directamente en el callo y medio inductor (Martínez-Palacios *et al.*, 2003). Gómez (1998) reporta que si se presenta un nivel bastante alto de auxina, un nuevo ciclo de producción de embriones somáticos es iniciado.

Tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes de los embriones depende de la presencia de nitrógeno reducido (Margara, 1988); aun cuando para Reinert (1973), la interacción entre auxina y nitrógeno son los factores químicos más importantes involucrados en la inducción a la embriogénesis somática.

Se cree que dentro de un explante ciertas células están precondicionadas para los eventos morfogenéticos que llevan a esta embriogénesis (Thorpe, 1980). Por tal razón, la presencia de reguladores exógenos de crecimiento, usualmente el 2,4-D, inicia el desarrollo de los embriones somáticos (Sharp *et al.*, 1980).

El papel exacto de la auxina en el estímulo y proliferación en el desarrollo del embrión es aún poco explorado, pues quedan muchas interrogantes al respecto (Gómez, 1998).

3.11.4.5. SACAROSA.

Los tejidos en cultivo *in vitro* son ampliamente heterotróficos con respecto al carbono, debido a la ausencia o insuficiencia de su asimilación (Margara, 1988). Por lo que resulta indispensable añadir glúcidos al medio de cultivo. Podrían aportarse diversos azúcares pero los dos más utilizados son sacarosa y glucosa (George, 1993).

Las concentraciones óptimas de azúcares en el medio no son fáciles de determinar con exactitud, pues estas dependerán de cada especie, sin embargo estudios realizados al respecto en *Zea mays* L, varía entre 2 y 8%, según se evalúe el crecimiento en materia fresca o en materia seca (Gautheret, 1966).

El aporte de azúcares al medio no solo cumple la función de optimizar el crecimiento de los tejidos, sino que además puede orientar la organogénesis ya que la falta de azúcares es, con frecuencia, un factor limitante (Margara, 1988). Concentraciones relativamente altas de sacarosa (5-6%) han resultado óptimas para la embriogénesis somática en diversas especies como *Citrus* (Murashige y Tucker, 1969), *Mangifera indica* L. (DeWald *et al.*, 1989), *Carica papaya* (Litz y Conover, 1983), *Daucus carota* (Wetherell, 1984, y, *Ceratozamia mexicana* (Chávez *et al.*, 2003). Parecería, que la acción del azúcar es a la vez metabólica y osmótica (Margara, 1988; Steeves y Sussex, 1989). Los tejidos en

soluciones con altos potenciales osmóticos podrían causar en las células plasmolisis, induciendo el rompimiento de las interconexiones citoplásmicas (plasmodesmos) entre las células adyacentes (Wetherell, 1984), lo cual permite que la célula y grupos celulares de plantas superiores aisladas por este proceso, sean capaces de desarrollarse independientemente, y expresar su totipotencialidad (George, 1993).

3.11.5. PERSPECTIVAS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Desde los primeros trabajos con zanahoria, la embriogénesis somática ha ido desarrollándose conforme avanzan los estudios en plantas, gracias a las ventajas que ésta representa. Debido a ello hoy en día se han ido perfeccionando las técnicas para obtener embriones somáticos.

En *Eryngium foetidum* L., se obtuvo una alta producción de embriones en cultivo *in vitro* suplementado con 2,4-D, lo que permitió propagarla, ya que su importancia farmacéutica va en aumento (Martín, 2004).

Argalwal y col. (2004), reportan para *Morus alba*, árbol explotado en la industria de la sericultura; además importante por ser fácilmente transformable genéticamente, lo cual muestra la necesidad del uso de la embriogénesis somática como un sistema eficiente de regeneración *in vitro*.

Actualmente se llevan a cabo investigaciones sobre la localización, estructura y función de varios genes vegetales. Para ello se utilizan frecuentemente plantas generadas mediante embriogénesis somática, como una herramienta experimental que permite estudiar directamente la acción de algunos genes. Entre otros, aquellos que inciden en la capacidad de asociación con otros organismos, la tolerancia a la sequía, la síntesis de pigmentos, etc. (Komamine *et al.*, 2005). Tal es el caso en cultivo de células de zanahoria, en donde se reportan altos niveles de expresión de BADH (Expresión de genes en plástidos Betaine Aldehyde Deshidrogenasa), vía ingeniería genética de plástidos. Basados en la generación de embriones somáticos, generan plantas transgénicas que tienen la característica de ser tolerantes a altos niveles de salinidad.

También se busca localizar y “etiquetar” otros genes con efectos en el metabolismo, el desarrollo y la interacción con el ambiente utilizando técnicas de “barrido genómico” (genome scanning); esta labor puede contribuir a conocer y preservar mejor nuestra diversidad biológica y a generar variedades de diversos cultivos adaptados a nuestros recursos y necesidades (Komamine *et al.*, 2005).

3.11.6. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CACTUS.

En Cactáceas existen pocos reportes, y uno de los más notables se generó en *Ariocarpus retusus*, se presenta mediante la embriogénesis somática indirecta en medio MS con agua de coco, se generó callo, después se subcultivó en medio MS con 15% de agua de coco, dando como resultado embriones somáticos (Stuppy y Nagl, 1992). En

Mediocactus coccineus se generó callo embriogénico (color café pálido con estructuras globulares) en medio MS con 2.7 o 5.4 μ M de ANA el cual fue sub-cultivado en medio MS sin reguladores de crecimiento, después de una semana se generó el primer embrión somático (Infante, 1992). Para *Mammillaria san-angelensis* (Marín-Hernández *et al.*, 1998) se reportan las primeras etapas de la embriogénesis somática en donde fueron generadas en medio Litz con 4mg/l de 2,4-D y 2mg/l de K, sin embargo los cultivos no tuvieron éxito en el medio *in vitro*, se interrumpió el desarrollo al necrozarse los cultivos. Para *Aztekium riterri* se describe las etapas primarias en la ontogénesis de embriones somáticos, generándose callo y mediante el cultivo en suspensión en medio MS con vitaminas (L2) y 3mg/l de 2,4-D, más 2mg/l de ANA y 2mg/l de K (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992). Vélez-Gutiérrez y Rodríguez-Garay (1996) analizaron el origen y desarrollo de la poliembriónía en *Opuntia ficus-indica*, presentando etapas normales como un embrión cigótico, debido a la presencia de un suspensor típico. Recientemente, Torres-Muñoz y Rodríguez-Garay (1996) reportaron la regeneración en *Turbiniacarpus pseudomacrolele* mediante la embriogénesis somática indirecta sobre medio MS sólido enriquecido con vitaminas L2, 3mg/l de 2,4-D, 2mg/l de ANA, 2mg/l K, 500mg/l L-glutamina, 250 mg/l de hidrolizado de caseína y solidificado con 8g/l de agar.

Calderón-Gil (2003) reporta estructuras embrionarias en *Mammillaria sanchez-mejoradae* a partir del cultivo de callo en medio B5 modificado (Litz, 1985) con 2,4-D con o sin K.

En otro grupo de plantas, como la Familia Agavaceae del desierto Chihuahuense, reportan en *Agave victoriae-reginae* la inducción de embriones somáticos vía callo al aplicar al medio MS 0.5 – 0.1mg/l de 2,4-D sin la presencia de BA (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

En *Agave tequilana* var. Azul el cual es utilizado para la elaboración del tequila (Consejo Regulador del Tequila, 1997), es de gran importancia su mejoramiento genético, por lo que se ha propagado clonalmente mediante la embriogénesis somática, lo cual ha permitido la selección de células, la transformación genética, y la domesticación (Arizaga y Ezcurra, 1995).

A pesar de los reportes antes mencionados, el trabajo en la familia Cactaceae en el estudio y generación de la embriogénesis somática es muy escaso, por lo que los esfuerzos realizados en este proyecto de investigación son de gran valor. Además de la continuidad que se le pueda dar a este tipo de investigaciones.

3.12. ORGANOGÉNESIS.

3.12.1. GENERALIDADES.

En la aplicación de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales, es más común obtener organogénesis que embriogénesis somática. La organogénesis es un proceso complejo, el cual incluye múltiples factores internos y externos (Joy Iv y Thorpe, 1980). Estudiar cada uno de estos factores implica el uso de un gran número de técnicas como:

microcirugía, inhibidores, aplicación de reguladores de crecimiento externos para diferentes áreas de la planta a nivel fisiológico y farmacológico, análisis de mutantes (por ejemplo *Arabidopsis*), cultivo de tejidos vegetales y biología molecular (Thorpe, 1980; 1993; Lyndon, 1990; 1994; Steeves y Sussex, 1989; Pyke, 1994).

Mediante la organogénesis se pueden obtener tallos, raíces o flores (George, 1993). Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división (Joy Iv y Thorpe, 1995).

George (1993) describe que los métodos de propagación son básicamente: por la generación de brotes a partir de brotes axilares; por la formación de brotes adventicios, y/o embriones somáticos adventicios ya sea de manera directa (sobre el explante proveniente de la planta madre), o indirectamente de células desorganizadas (callo).

Organogénesis Directa. El proceso de iniciación de brotes se da a partir de adicionar al medio de cultivo citocininas, ejemplo; Benciladenina (BA), sola o acompañada de una auxina (en bajas concentraciones), por ejemplo ácido naftalenacético (ANA), con lo que se induce la diferenciación de brotes (Karth, 1982). La etapa de enraizamiento puede darse junto con la propagación de brotes, sin embargo los factores que aceleran dicho proceso son auxinas (IBA, IAA, etc.), carbohidratos y fotoperiodo (Gautheret, 1966). Por lo cual, generalmente los brotes se separan del tejido madre y se pueden subcultivar individualizados en un medio sin reguladores o con IBA, auxina de las más reportadas para enraizamiento *in vitro* (Escobar *et al.*, 1986; George, 1993).

Organogénesis Indirecta. Incluye la fase de callo, la cual está integrada por células meristemáticas (meristemoides) antes de formar órganos en el explante (Dodds y Roberts, 1982), las células que van a inducir la organogénesis estarán localizadas en la superficie del explante además de estar en contacto con el medio nutritivo (Widholm *et al.*, 1985). Se inicia induciendo el tejido para que se presente la fase de callo, lo cual se logra con altas concentraciones de auxina y bajas concentraciones de citocininas. El callo cuenta con diferentes tipos de células (en tamaño y tipo); cuando éstas están bien establecidas, en el medio empieza haber actividad meristemática ya sea por una sola célula o por un grupo de células del callo; estas células serán precursoras de órganos como raíz y brotes (Widholm *et al.*, 1985).

3.12.2. ANATOMÍA DE LA ORGANOGÉNESIS.

En general la iniciación del desarrollo organizado en plantas incluye una interacción entre el tejido, el medio y el ambiente físico. La formación del órgano es un proceso que ha sido discutido a detalle debido a la importancia de la organogénesis en la propagación clonal (Murashige, 1974; Thorpe, 1980; Evans *et al.*, 1981; Tran Thanh Van y Trinh, 1990).

En *Pinus radiata*, se sembraron cotiledones en medio Shenk y Hildebrandt, con 3% de sacarosa y 25 μ M N⁶-benciladenina (BA) (Reilly y Washer, 1977). Se observaron grandes y prominentes núcleos, el citoplasma tiño densamente, y las sustancias de reserva fueron abundantes, con numerosos granos de almidón y cuerpos proteicos (Aitken *et al.*, 1981). En tejido no organogénético (control), la actividad mitótica se detuvo en el segundo día de cultivo. Durante los primeros días de cultivo en el tejido organogénico, los productos de almacenamiento de cotiledones fueron muy reducidos. Las proteínas desaparecieron en el día 2, y los plastidos aumentaron, mientras los almidones se redujeron. Los cloroplastos se desarrollaron completamente en el día 3. Los complejos estomatales se comenzaron a diferenciar en el primer día y se desarrollaron completamente en el día 5 de cultivo (Douglas *et al.*, 1982; Villalobos *et al.*, 1982; 1985). Pequeñas vacuolas, probablemente derivadas de los cuerpos de proteínas, gradualmente fusionados, se convirtieron en grandes vacuolas. Espacios aéreos intercelulares aparecieron gradualmente en el mesófilo, lo cual provocó que los cloroplastos y citoplasma se acomodaran a la periferia de las células (Villalobos *et al.*, 1982).

La inducción a la organogénesis en *Nicotiana tabacum*, se llevo a cabo sembrando callo en medio MS adicionado con, 10 μ M de K (Thorpe y Murashige, 1970). El proceso no fue sincrónico pero aproximadamente a los 8 días de cultivo, la división celular en el tejido organogénético produjo visibles zonas de alta actividad mitótica (Joy Iv y Thorpe, 1995). Estas regiones produjeron centros meristemáticos o meristemoides conteniendo células densamente plasmáticas a los 8-14 días de cultivo (Thorpe y Murashige, 1970; Ross *et al.*, 1973; Maeda y Thorpe, 1979). Los meristemoides son masas esféricas de células meristemáticas, pequeñas, isodiamétricas con un citoplasma denso y un radio grande núcleo-citoplasma. Estas células son microvacuoladas, contienen un alto contenido de organelos, y el núcleo contiene mucho material nuclear (Ross *et al.*, 1973; Asbell, 1977). Los meristemas son inicialmente apolares pero rápidamente muestran dirección y actividad divisoria para formar un primordio unipolar (Thorpe, 1980). El primordio emerge de la base del callo a los doce días de cultivo (Ross *et al.*, 1973; Thorpe, 1979).

3.12.3. FACTORES DE INDUCCIÓN.

3.12.3.1. EXPLANTE.

A partir de los primeros trabajos de cultivo de cactus, se han utilizado una variedad de explantes (Tabla 6) (Clayton *et al.*, 1990).

Tabla 7. Explantes usados en la propagación de Cactus.

EXPLANTES USADOS:
Tubérculos
Aréolas (meristemos axilares)
Ápices de Tallos inmaduros de plántulas de invernadero
Ápices de tallos maduros de plantas silvestres
Epicótilos de plántulas germinadas *in vitro*

El uso de epicótilos asépticos de plantas germinadas *in vitro* de semilla ha presentado ventajas con respecto a la eliminación de agentes contaminantes (microbios) (Hubstenberger *et al.*, 1992). Este explante se ha utilizado de manera exitosa para especies raras o cuando su colecta en campo es imposible y/o cuando los meristemos laterales no están disponibles. Si bien, los rangos de germinación de algunos cactus son muy lentos, y el tamaño tan pequeño de los explantes generalmente da como resultado una lenta respuesta a la etapa de regeneración de brotes, es por ello que explantes de epicótilo pueden representar una vía segura de iniciación de especies raras o la progenie de cruza intergenéricas (Hubstenberger *et al.*, 1992).

Es importante tomar el explante de la planta sin destruir a la planta madre, sobre todo cuando se trata de especies con algún riesgo de extinción. Havel y Kolar, (1983), desarrollaron un método para tomar una muestra de la planta sin destruirla, removiendo una pequeña cantidad de tejido areolar con una jeringa estéril; sin embargo, en estos casos solo se ha obtenido crecimiento de callo. La remoción de un tubérculo y/o areola entera es un método más efectivo cuando los meristemos laterales son liberados de la dormancia apical (Clayton *et al.*, 1990).

3.12.3.2. MEDIO DE CULTIVO.

El medio basal Murashige y Skoog (1962) ha sido usado frecuentemente en la micropropagación de cactus (Johnson y Emino, 1979; Sluis y Wochok, 1980; Ault y Blackmon, 1985; Escobar *et al.*, 1986; Rubluo *et al.*, 1986).

Clayton y col. (1990) hicieron un estudio comparativo de cinco diferentes medios para la proliferación de brotes axilares (Tabla7). El medio L2 fue superior a los demás medios (MS, SH, B5). Mientras que el medio con baja cantidad de sales (MMS), tuvo una respuesta menos satisfactoria que los otros cuatro medios con mayor cantidad de sales.

El medio L2 contiene altos niveles de iones calcio y magnesio, los cuales son importantes en la nutrición de los cactus

Tabla 8. Medios Evaluados por Clayton *et al.*, 1990.

MEDIOS EVALUADOS:	ABREVIATURA:
Murashige y Skoog (1962)	MS
MS con mitad de sales (Gladfelter y Phillips, 1987)	MMS
Schenk y Hildebrandt (1972)	SH
Gamborg <i>et al.</i> , 1968	B5
B5 modificado (Dunstan y Short, 1977)	B5 modificado
Phillips y Collins (1979)	L2

3.12.3.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Fitohormonas y otras sustancias que aceleran el crecimiento se incluyen en el medio y son importantes en la iniciación y regulación del desarrollo organizado (Joy Iv y Thorpe, 1995).

Muchas especies de plantas, como el tabaco, requieren tanto auxina como citocinina para la formación de órganos (Chandler y Thorpe, 1986). La BA o K (0.005-46µM) son las citocininas usadas para el 75% de tejidos organogénéticos, y las auxinas más comúnmente usadas son AIA y ANA (0.06-27µM) (Evans *et al.*, 1981). En algunos casos, una mezcla de dos auxinas o dos citocininas es más efectiva en la inducción de órganos que una sola (Evans *et al.*, 1981).

Tabla 9. Reguladores de crecimiento usados en cactus en peligro (Clayton *et al.*, 1990)

TAXA	AUXINA (mg/l)	CITOCININA (mg/l)
<i>Ancistrocactus tobuschii</i> W. T.	Ninguna	2-ip (5)
<i>Ariocarpus agavoides</i>	Ninguna o AIA (2)	2-ip (5) o K (4)
<i>Arrojadoa penicillata</i> var. <i>spinosior</i>	AIA (2)	K (4)
<i>Echinocactus fendleri</i> var. <i>kuenzleri</i>	Ninguna	2-ip (5)
<i>E. poselgeri</i>	AIA (2)	K (4)
<i>E. schmollii</i>	AIA (2)	K (4)
<i>E. viridiflorus</i> var. <i>davissi</i>	Ninguna	2-ip (5)
<i>Echinofossulocactus violaciflorus</i>	AIA (2)	K (4)
<i>Echinomastus intertextus</i> var. <i>dasyacanthus</i>	Ninguna	2-ip (5)
<i>Epithelantha micromeris</i>	Ninguna	2-ip (5)
<i>Escobaria minima</i>	ANA (0.05)	BA (1)
<i>E. missouriensis</i>	AIA (2)	K (4)
<i>E. organensis</i>	AIA (2)	K (4)
<i>E. sneedii</i>	Ninguna o AIA (2)	2-ip (5) o K (4)

<i>Pediocactus bradyi</i>	Ninguna	2-ip (5)
<i>P. knowhonii</i>	ANA (0.05)	BA (1)
<i>P. peeblesianus</i>	AIA (2)	K (4)
<i>P. Sileri</i>	AIA (2)	K (4)
<i>P. simpsonii</i>	Ninguna	2-ip (10)
<i>P. simpsonii</i> var. <i>robustion</i>	Ninguna	2-ip (5)

Trabajos recientes en la micropropagación de cactus sugieren que los reguladores de crecimiento o la combinación de estos requeridos para la formación de órganos son únicos para cada especie (Johnson y Emino, 1979). Subsecuentes investigaciones (Tabla 8) han confirmado que la adición de auxina y citocinina es necesaria para la óptima proliferación de órganos interactuando fuertemente con las especies (Clayton *et al.*, 1990). En general, bajos niveles de auxina o ausencia de auxina, en combinación con altos niveles de citocinina, son necesarios para la obtención de brotes (Clayton *et al.*, 1990). Muchas especies de cactus tienen la capacidad de producir en exceso auxina en condiciones *in vitro*. El exceso de auxina a menudo estimula la producción de callo, lo que puede ser un problema en un sistema de micropropagación (Clayton *et al.*, 1990)

3. 12. 3. ORGANOGÉNESIS EN CACTÁCEAS.

En la familia Cactaceae, a diferencia de los avances de embriogénesis, la organogénesis se ha establecido en un mayor número de especies y con resultados más sobresalientes (Tabla 5). Mauseth (1979), fue uno de los primeros en reportar la propagación *in vitro* sin la fase de callo (organogénesis directa) de 10 especies, se indujo la brotación mediante la adición al medio de BA (benciladenina de 1-10 mg/l), para después enraizarlas en un medio que contenía altas concentraciones de auxina (10 mg/l ANA). Posteriormente esta vía se logró con más especies de esta misma familia; para *Opuntia amyclaea*, se utilizó BA (10⁻⁵ M) en cortes transversales y longitudinales (Escobar *et al.*, 1986). En *Mammillaria san-angelensis* se reportó el desarrollo de la organogénesis directa mediante tejido de ápice y tallo con la adición al medio de BA y ANA a diferentes concentraciones (0.1 y 1.0 mg/l de BA y 0.01, 0.001 mg/l de ANA o en ausencia de la auxina) (Martínez-Vázquez y Rublo, 1989). Clayton y col. (1990), reportaron la propagación *in vitro* de 11 especies de cactus de los géneros *Escobaria*, *Mammillaria*, *Pediocactus*, *Sclerocactus* y *Toumeyia*. La citocinina ha sido empleada en concentraciones medianamente altas con el fin de provocar la generación de brotes; la auxina cuando es necesaria se aplica a más bajas concentraciones (Cooke y Cohen, 1993). En *Mammillaria woodsii*, se estableció la organogénesis indirecta, a partir de una previa desdiferenciación del tejido (callo), en medio MS con 2 mg/l de AIA (ácido indolacético) (Kólar *et al.* 1976). Johnson y Emino (1977a,b) describieron la formación de órganos en callo, a través de la

diferenciación, en *Mammillaria elongata* cultivada en medio MS con 10mg/l de 2iP y 1mg/l de ácido indolacético.

Tabla 10. Especies de cactus micropropagados exitosamente mediante la organogénesis.

Especies	Referencia
<i>Astrophytum myrostrigma</i> Lem.	Vyskot y Jara, 1984
<i>Chamaecereus sylvestrii</i> (Speg.)	Mauseth, 1979
<i>Coryphantha macromeris</i> (Engelm.)	Smith <i>et al.</i> , 1991
<i>Echinocereus engelmannii</i> (Parry)	Ault y Blackmon, 1985
<i>E. pectinatus</i> (Scheidw.)	Ault y Blackmon, 1985
<i>Epiphyllum hybrid</i>	Mauseth, 1979
<i>Escobaria missouriensis</i> (Sweet)	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>E. robbinsorum</i> (Earle)	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Ferocactus acanthodes</i> (Lem.)	Ault y Blackmon, 1987
<i>F. covillei</i> Br. & R.	Ault y Blackmon, 1985
<i>F. wislizenii</i> Br. & R.	Ault y Blackmon, 1985
<i>Hatiora salicornioides</i> (Haw.)	Mauseth, 1979
<i>Hylocereus calcaratus</i> (Web.)	Jhonson y Emino, 1979
<i>Leuchtenbergia principis</i> Hooker	Starling, 1985
<i>Lobivia binghamiana</i> Bckbg.	Mauseth, 1979
<i>Mammillaria carmenae</i>	Vyskot y Jara, 1984
<i>M. elongata</i> D. C.	Johnson y Emino, 1979; Mauseth, 1979
<i>M. prolifera</i> (Miller)	Vyskot y Jara, 1984
<i>M. san-angelensis</i>	Rubluo <i>et al.</i> , 1986
<i>M. wrightii</i> Engelm.	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Opuntia amyclaeae</i> Tenore	Escobar <i>et al.</i> , 1986
<i>O. basilaris</i> Engelm. & Big.	Mauseth, 1979
<i>O. polycantha</i> Haw.	Johnson y Emino, 1979
<i>Pachycereus pringlei</i> (S. Wats.)	Mauseth, 1979
<i>Pediocactus bradyi</i> L.	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. despainii</i> Welsh & Goodrich	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. knowltonii</i> L.	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. paradinei</i> B. W. Benson	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>P. winkleri</i> Heil	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Pereskia aculeata</i> Miller	Mauseth, 1979
<i>Rhipsalis teres</i> (Vellozo)	Johnson y Emino, 1979
<i>Sclerocactus mesae-verdae</i>	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>S. spinosior</i> (Engelm.)	Clayton <i>et al.</i> , 1990
<i>Selenicereus grandiflorus</i> L.	Mauseth, 1979

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Obtención del Material Vegetal.

4.1.1. *Aztekium hintonii*.

El tejido calloso fue tomado del Laboratorio de Biotecnología y Genética del Instituto de Investigación sobre los Recursos Naturales (INIRENA) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). El material inicial se mantuvo *in vitro* en medio MS (Apéndice 1) con 2,4-D y K; por un período de 24 meses; subcultivados por períodos de 3 meses.

4.1.2. *Mammillaria san-angelensis*.

El tejido calloso fue tomado del material existente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de la UNAM, los cuales eran sub-cultivados por períodos de siete meses en 25 ml de medio MS sin hormonas (Apéndice 1).

4.1.3. *Mammillaria sanchez-mejoradae*.

El callo fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología y Genética del INIRENA de la UMSNH, previamente fue sujeto a diferentes concentraciones de 2,4-D y K (Apéndice 6) por un periodo de 2 meses estando en oscuridad y a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, para inducir la embriogénesis somática (Calderón-Gil, 2003). Posteriormente el material fue subcultivado en medio MS libre de hormonas (Apéndice 1) por un período de 4 meses, para después someterlo a los diferentes tratamientos en la generación de embriones somáticos (0, 0.1, 0.5, 1 y 2mg/l de 2,4-D y 0, 0.1y 0.5mg/l de K); con las medias más altas registradas por Calderón-Gil (2003).

4.2. Embriogénesis Somática a partir de callo.

Los explantes de callo (1cm^3) fueron subcultivados sobre medio MS (Apéndice 1) para *A. hintonii*, con 0.1 y 0.5mg/l de 2,4-D y 0.1 y 0.5mg/l de K y 20, 30, 45 60 y 75 g/l de sacarosa; haciendo un total de 20 tratamientos, con 10 repeticiones cada uno. Para *M. san-angelensis* se crearon 60 tratamientos, con 5 repeticiones cada uno y en cada repetición 1 explante de callo (1cm^3), en medio B5 modificado (Litz, 1985) (Apéndice 2) añadiendo 0, 2, 4 y 6 mg/l de 2,4-D en combinación con 0, 0.1, 0.5, 1 y 2 mg/l de K (Marín-Hernández *et al.*, 1998); y 45, 60 y 70 g/l de sacarosa.

De los tratamientos más significativos reportados para *M. sanchez-mejoradae* por Calderón-Gil (2003) en la generación de embriones somáticos (0, 0.1, 0.5, 1 y 2mg/l de 2,4-D y 0, 0.1y 0.5mg/l de K); se subcultivaron explantes de callo (1cm^3) en medio B5 modificado (Litz, 1985) (Apéndice 2), en combinación de 45, 60 y 70g/l de sacarosa, haciendo un total de 45 tratamientos con 5 repeticiones cada uno.

Los medios de cultivo fueron solidificados con Agar Bacteriológico 8g/l, los cuales se encontraban contenidos en frascos de vidrio de 120ml, con boca ancha y tapa de plástico sellados con Ega-pack. El pH fue

ajustado a 5.7-5.8 (con KOH y/o HCl 0.1 y 0.5N) previo a la adición de agar y a la esterilización en autoclave a 121°C, 1.1Kg/cm², 15min.

4.3. Condiciones de Incubación.

Todos los cultivos se incubaron en un cuarto de cultivo bajo condiciones ambientales controladas, a una temperatura de 27±2°C en oscuridad total.

4.4. Análisis Estructural.

4.4.1. Inclusión en Parafina.

Se tomaron muestras de callo de aproximadamente 1cm³, de *A. hintonii* con 2, 5, 10, 43 y 52 días de haber iniciado los cultivos, y muestras de 2 meses en *M. sanchez-mejoradae* en el medio inductor fueron fijadas en CRAF III, durante 24h, posteriormente se lavaron las muestras a chorro de agua suave durante 3h. Los explantes se sometieron a una deshidratación gradual con una mezcla de alcohol terbutílico- etanol-H₂O (TBA) (Apéndice 3), y fueron infiltrados con parafina. Se hicieron secciones de 9-10µm usando un micrótopo de rotación Leica RM2125RT y teñidas con safranina y contrastadas con verde rápido (Johansen, 1940). Las preparaciones permanentes fueron montadas en resina sintética.

4.4.2. Inclusión en Resina LR-WHITE.

Las muestras de callo de *A. hintonii* de aproximadamente 0.5cm³, con 43 y 52 días y de 2 meses en *M. sanchez-mejoradae* en el medio inductor fueron fijados en FAA, durante 48 h, posteriormente se inició el proceso de deshidratación gradual en alcoholes (Apéndice 4), con un lapso de 1h cada cambio. Una vez terminado el proceso de deshidratación se incluyeron las muestras en la resina LR-WHITE de manera gradual (25, 50 y 75%) durante una hora cada cambio, finalmente se hicieron tres cambios en resina pura (100%) los dos primeros por una hora cada uno y el tercero durante 24h, pasando las muestras en cápsulas que contenían LR-WHITE puro, dejando las muestras en la estufa por 4h a 56°C para permitir que la resina se polimerizara.

Se hicieron secciones de 1.7 µm usando un ultramicrótopo y teñidas con azul de toluidina (Ruzin *et al.*, 1999).

5. RESULTADOS

5.1. Cultivo *in vitro*.

5.1. 1. *Aztekium hintonii*.

El desarrollo de callo se mantiene uniforme (abundancia) en todas las concentraciones hormonales y en todos los porcentajes de sacarosa en el medio (Tabla 2). Sin embargo, la inducción de embriones somáticos se presentó en los medios con 0.5mg/l de 2,4-D y 0.1mg/l de K y, altas concentraciones de sacarosa (60 y 70g/l) fueron necesarias (Fig. 6 a). La coloración del callo es amarillo en los dos tratamientos estadísticamente significativos (0.5mg/l de 2,4-D y 0.1mg/l de K con 60 y 70g/l de sacarosa) en la respuesta a la embriogénesis somática; a excepción del tratamiento con 20g de sacarosa en donde la coloración es igual (callo amarillo), pero la respuesta no se presenta (Tabla 2). Existieron diferencias significativas entre tratamientos, y el análisis estadístico de Tukey con un nivel de confianza del 95% muestra una diferencia significativa para los dos tratamientos con las medias de embriones más altas (8 y 6.5) (Tabla 1). En el callo a los 56 días de cultivo se observó la presencia de pequeñas masas de células elongadas, de aproximadamente 3-4mm de longitud (Fig. 6b).

A partir de los 64 días, el tejido que fue subcultivado en el medio inductor, se observó deshidratado (Fig. 6c); sin embargo al subcultivarlo en el medio inductor la respuesta continuó presentándose.

5.1.2. *Mammillaria san-angelensis*.

La respuesta morfológica se presenta a los 2 meses de cultivo en los medios con las diferentes concentraciones hormonales (Fig. 7). Las concentraciones de sacarosa están directamente relacionadas con la apariencia y oxidación del callo (Tabla 3). Los tratamientos con altas concentraciones de 2,4-D mantienen un tejido indiferenciado, en cambio los tratamientos en los que las concentraciones de K son altas y/o el 2,4-D se encuentra ausente hay generación de brotes en el explante (Fig. 2) (Tabla 3). La K en concentraciones de 0.1-0.5mg/l y en ausencia y/o bajas concentraciones de 2,4-D mantiene el número de brotes más alto (10-8) con respecto al resto de los tratamientos (Tabla 3).

5.1.3 *Mammillaria sanchez-mejoradae*.

El desarrollo de callo no muestra una respuesta clara en cuanto a la concentración hormonal, si se compara con el tratamiento control el cual (medio sin hormona) registró uno de los más altos incrementos de callo (Tabla 4). La respuesta morfogenética del tejido se hizo visible a los dos meses de cultivo, generando callo laxo, con brotes incoloros elongados (Fig. 8).

Los tratamientos con 2mg/l de 2,4-D y 0.1mg/l de K y 45 (Fig. 8a) y 60g/l (Fig. 8b) de sacarosa, registraron la respuesta más favorable morfogenéticamente. Sin embargo, en el tratamiento sin reguladores de crecimiento con 60g/l de sacarosa se generaron 4 brotes a los dos

meses de cultivo. No fue posible realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos, ya que la respuesta a las diferentes concentraciones hormonales y de sacarosa se vio interrumpida de manera continua por un microorganismo posiblemente sistémico en el tejido impidiéndole el crecimiento y causando posteriormente la muerte.

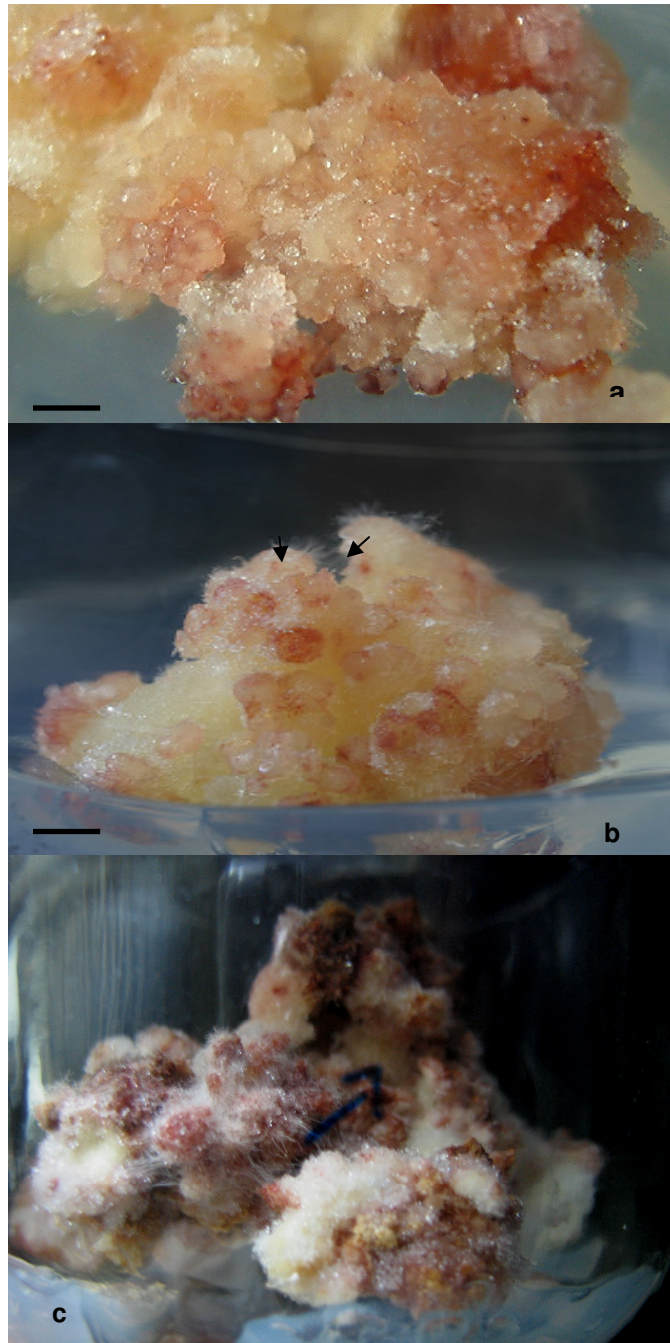


Fig. 6. Callo de *Aztekium hintonii* en medio MS con 0.5mg/l de 2,4-D y 0.1mg/l de K, en oscuridad. A los 30 días de cultivo (a). Protuberancias emergiendo del callo (b), a los 56 días de cultivo. Escala: 1cm (a-b). Callo deshidratado a los 64 días de cultivo (c).

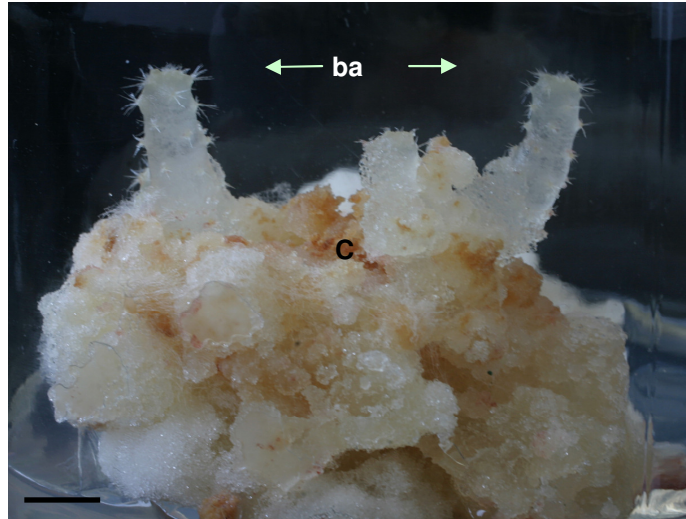


Fig. 7. Callo (C) y brotes adventicios (ba) de *Mammillaria san-angelensis* a los 2 meses de cultivo. Escala: 1cm

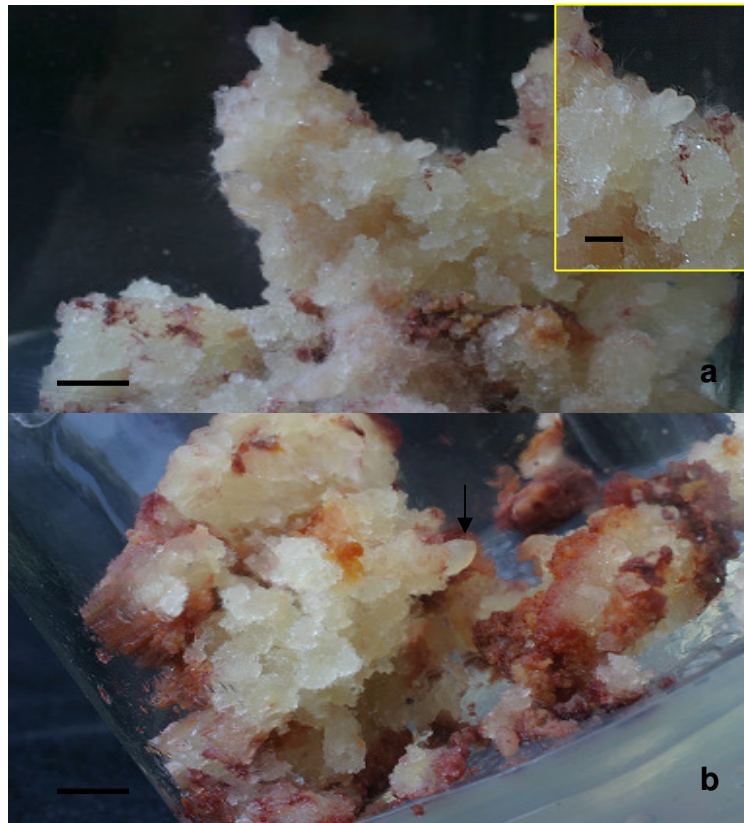


Fig. 8. Callo de *Mammillaria sanchez-mejoradae* a los 2 meses de cultivo en medio B5 modificado (Litz, 1985), enriquecido con 45 (a) y 60g/l de sacarosa (b), con estructuras morfogénicas que regeneran plantas. Escala: 1cm (a-b), 0,5 cm. (recuadro a)

5.2. Análisis Estructural.

5.2.1. *Aztekium hintonii*.

A los 30 días de cultivo las células presentaron respuesta favorable a la morfogénesis, con formación de centros meristemáticos en la superficie del callo, delimitados por una epidermis bien definida en la periferia (Fig. 9a-c). Las células que forman estas estructuras se caracterizan por sus núcleos grandes con respecto al tamaño de la célula, se tiñen más oscuros y se intuye que existe la división celular. Las células que forman el cuerpo de estas estructuras son isodiamétricas y parenquimatosas (Fig. 9e), sus núcleos en la periferia de la célula con grandes vacuolas y poco contenido celular. Células de callo colapsadas en algunas secciones y pequeñas deposiciones de lignina, como respuesta al estrés hormonal y osmótico (Fig. 10a). Formación de tejido vascular de novo inmerso en las células de callo, con poca refringencia de verde rápido por la poca deposición de lignina (Fig. 10b). Dentro de las células de callo se presentan granos de almidón y mucílago como sustancias de reserva en el tejido (Fig. 10c).

A los 56 días de cultivo el tejido muestra etapas de desarrollo avanzado en donde se observan centros meristemáticos inmersos en el callo alimentados por haces vasculares que se generaron en el callo (Fig. 11a-c). Células de meristemas apicales de brote, pequeñas, de paredes delgadas y gran núcleo. Células epidérmicas delimitando la organización celular de órganos bien desarrollados en donde se observa la médula al centro del cuerpo del mismo con sus meristemas areolares (Fig. 11a).

5.2.2. *Mammillaria sanchez-mejoradae*.

A los dos meses de cultivo el tejido presentó células de meristemo apical de brote, pequeñas, con núcleos grandes con respecto al tamaño de la célula, en donde los nucleolos son pronunciados por la tinción (Fig. 12 a-b). Haces vasculares bien desarrollados a lo largo de las estructuras desarrolladas (Fig. 12d). El meristemo apical de raíz, bien desarrollado en el extremo inferior, por lo que ambos polos se encontraron definidos completamente (Fig. 12 c).

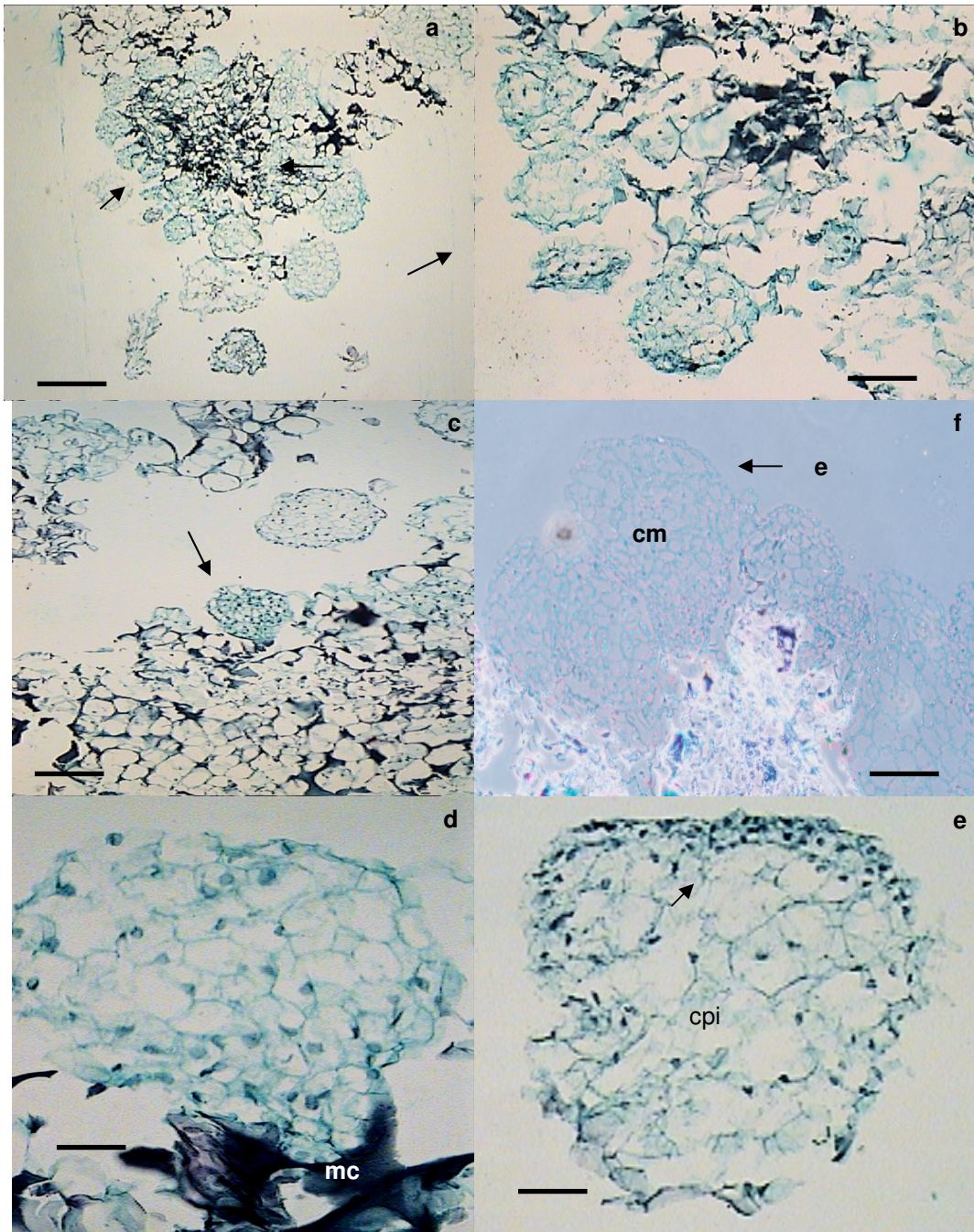


Fig. 9. *Aztekium hintonii* callo a los 30 días de cultivo. Centros meristemáticos emergiendo en la periferia del callo (a, b y c), barra= 500 μm (a-c), 250. μm (b). Estructura embrionaria globular y un grupo de células en su base a partir de callo con deposiciones de mucílago (mc), (d). Meristemo apical de brote en la parte superior, con una pequeña depresión en el centro, células parenquimatosas isodiamétricas (cpi) en el cuerpo (e), barra= 50 μm (d-e). Epidermis (e) bien pronunciada en la periferia delimitando las estructuras meristemáticas (cm), (f), barra: 250 μm .

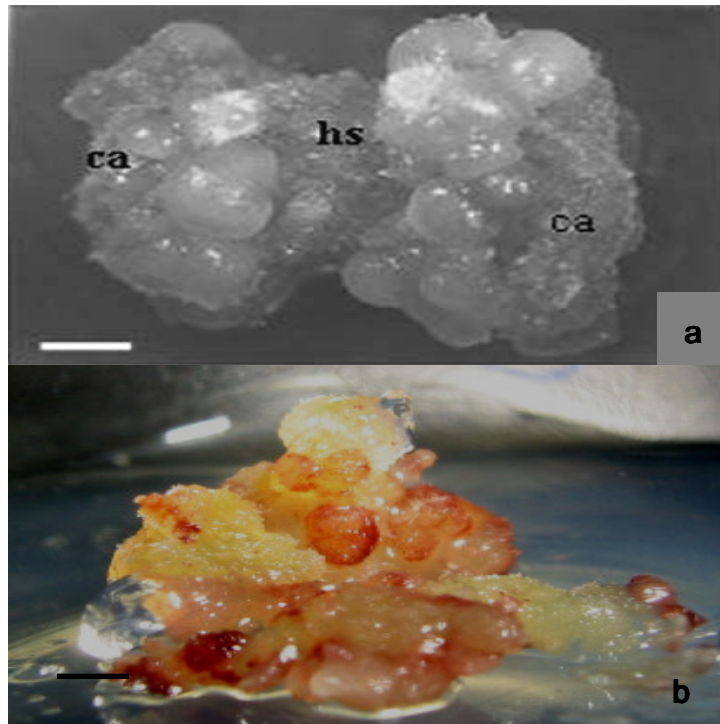


Fig. 10. Estructural globulares. Callo en *Linum usitatissimum* L., a las tres semanas de cultivo, barra= 0.9mm (a), hs= segmento de hipocotilo, ca= callo. Callo de *Aztekium hintonii* a los 30 de cultivo, barra= 0.9mm (b).

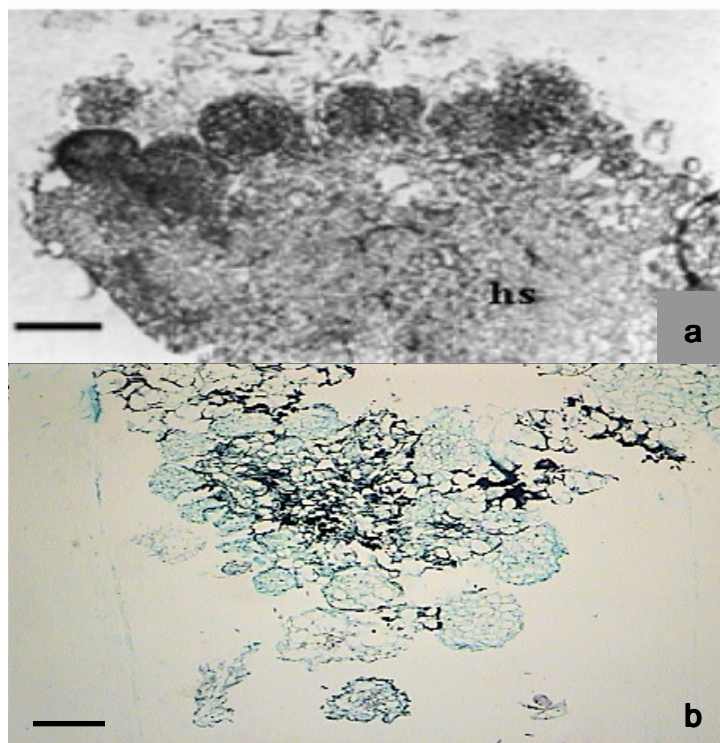


Fig. 11. Estructuras globulares. Hipocotilo de *Linum usitatissimum* L. con estructuras globulares a la periferia, barra= 300 μ m, hs= hipocotilo (a). Callo de *Aztekium hintonii*, con estructuras globulares en la periferia, barra=500 μ m (b).

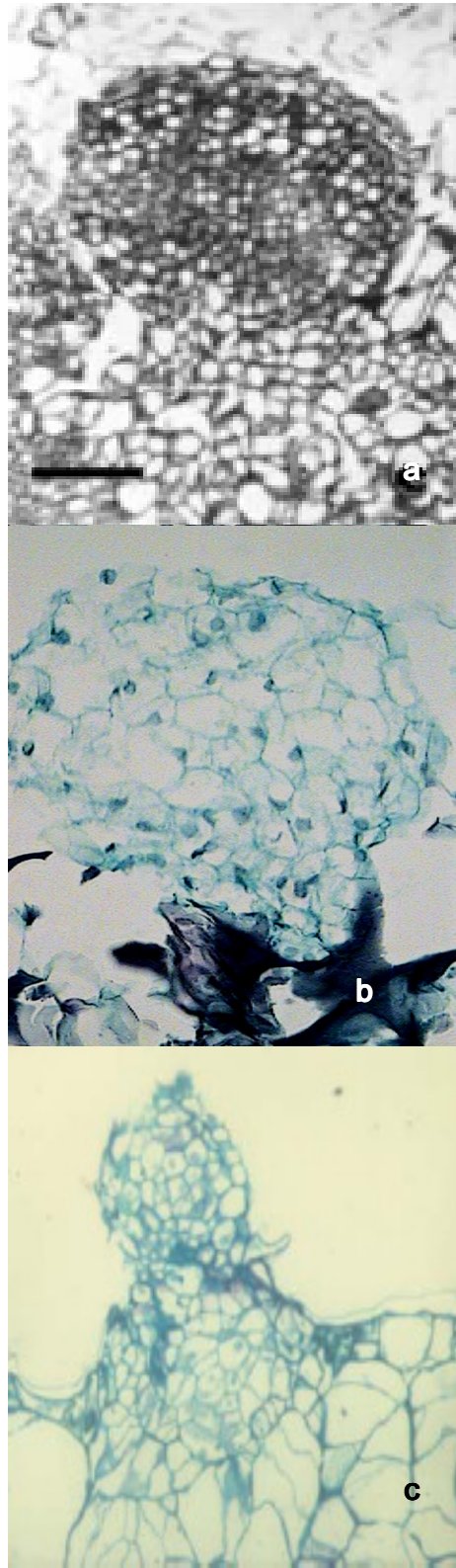


Fig. 12. Estructuras embrionarias, secciones longitudinales. *Linum usitatissimum* L., barra=110 μ m (a). *Aztekium hintonii*, barra=250 μ m (b). *Pelargonium x hortorum* Bailey (x183), segmento de hipocotilo (c).

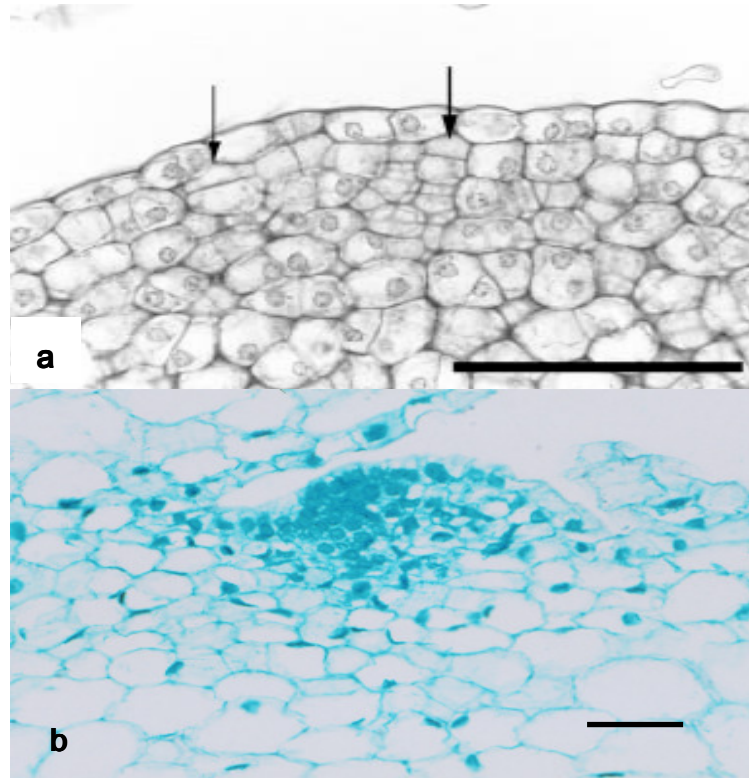


Fig. 13. Meristemo Apical de Brote. *Oraya peruviana*, división anticlinal, barra=100µm (a). *Mammillaria sancjez-mejoradae*, corte longitudinal, barra 50µm (b).

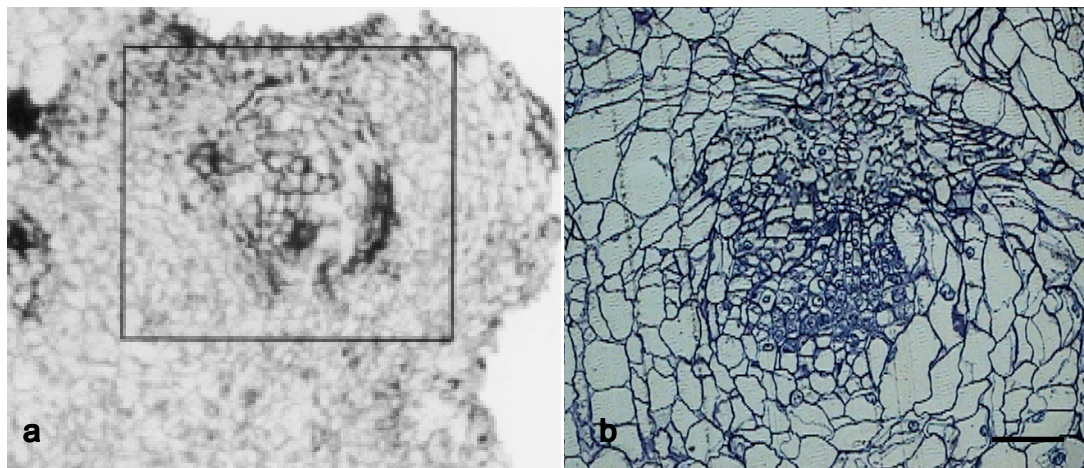


Fig. 14. Organogénesis. Órgano inmerso en células de callo de Olivo (x100) (a). *M. sancjez-mejoradae*, células de callo, barra=50µm (b).

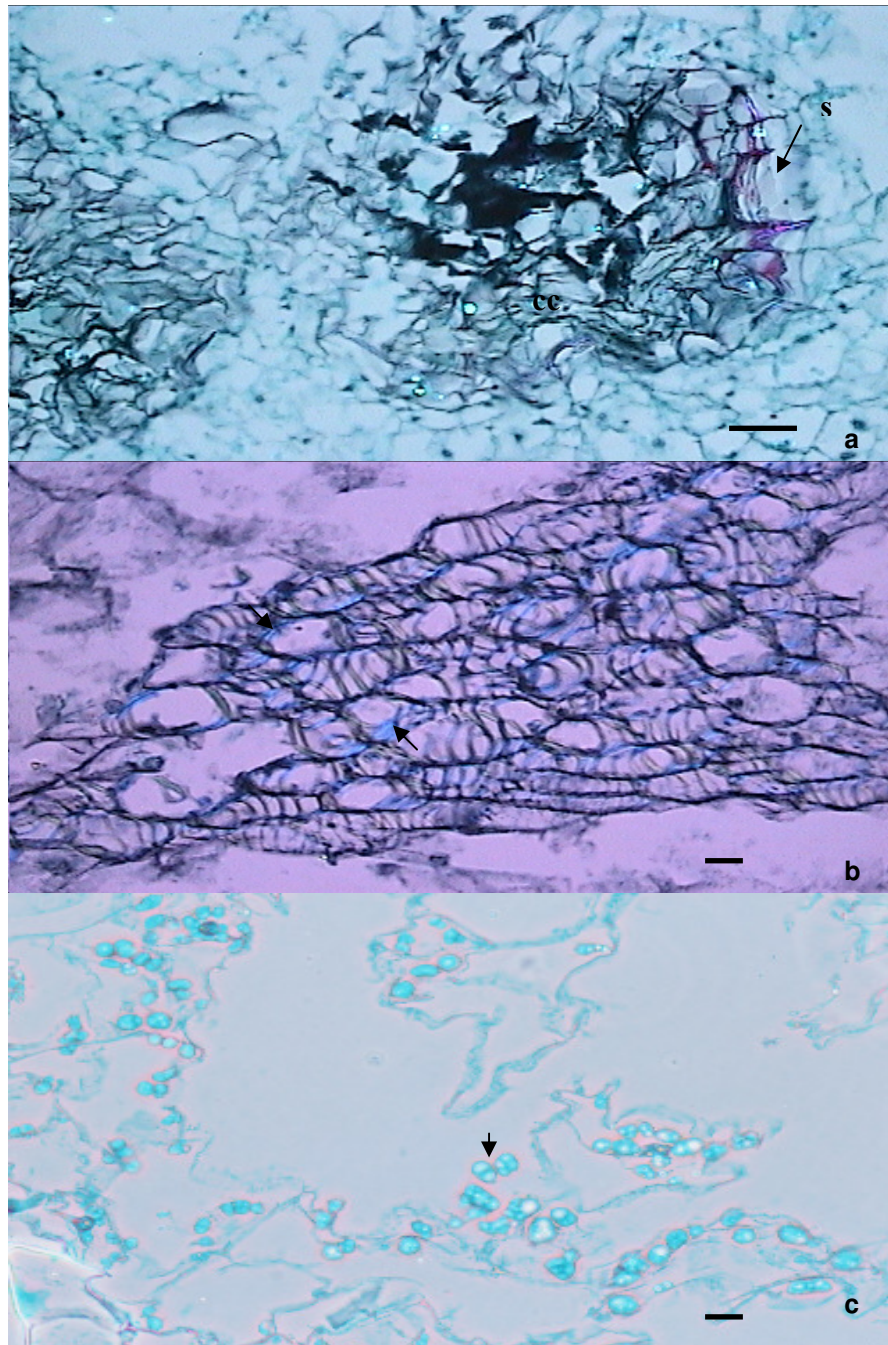


Fig. 15. Procesos morfológicos en las células de callo de *Aztekium hintonii*. Callo colapsado (cc) como una respuesta al estrés hormonal y osmótica, con pequeñas deposiciones de suberina (s) (a), barra= 50 μ m. Elementos traqueales con poca refringencia de lignina (b). Granos de almidón inmerso en las células de callo (c), barra= 30 μ m.

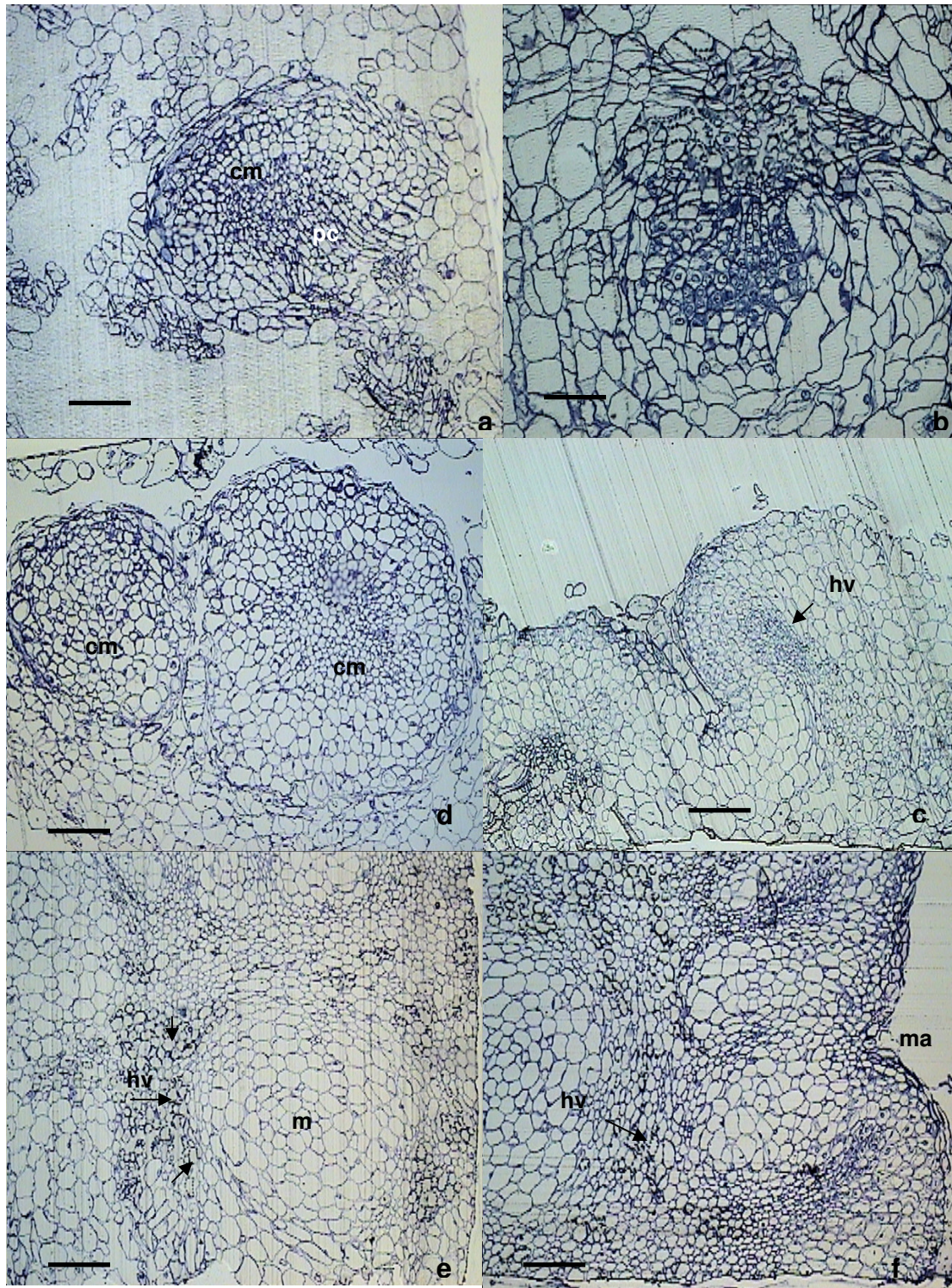


Fig. 16. *Aztekium hintonii* a los 56 días de cultivo. Centros meristemáticos (cm), con indicios de procambium (pc) y haces vasculares (hv) (a-c), barra= 50 μ m (a); 30 μ m (b); 70 μ m (c). Corte transversal de un brote inmerso en el callo (d). Médula (m) en medio de haces vasculares laterales (e). Meristemo areolar (ma) con haces vasculares bien diferenciados y medula en medio (f), barra= 50 μ m.

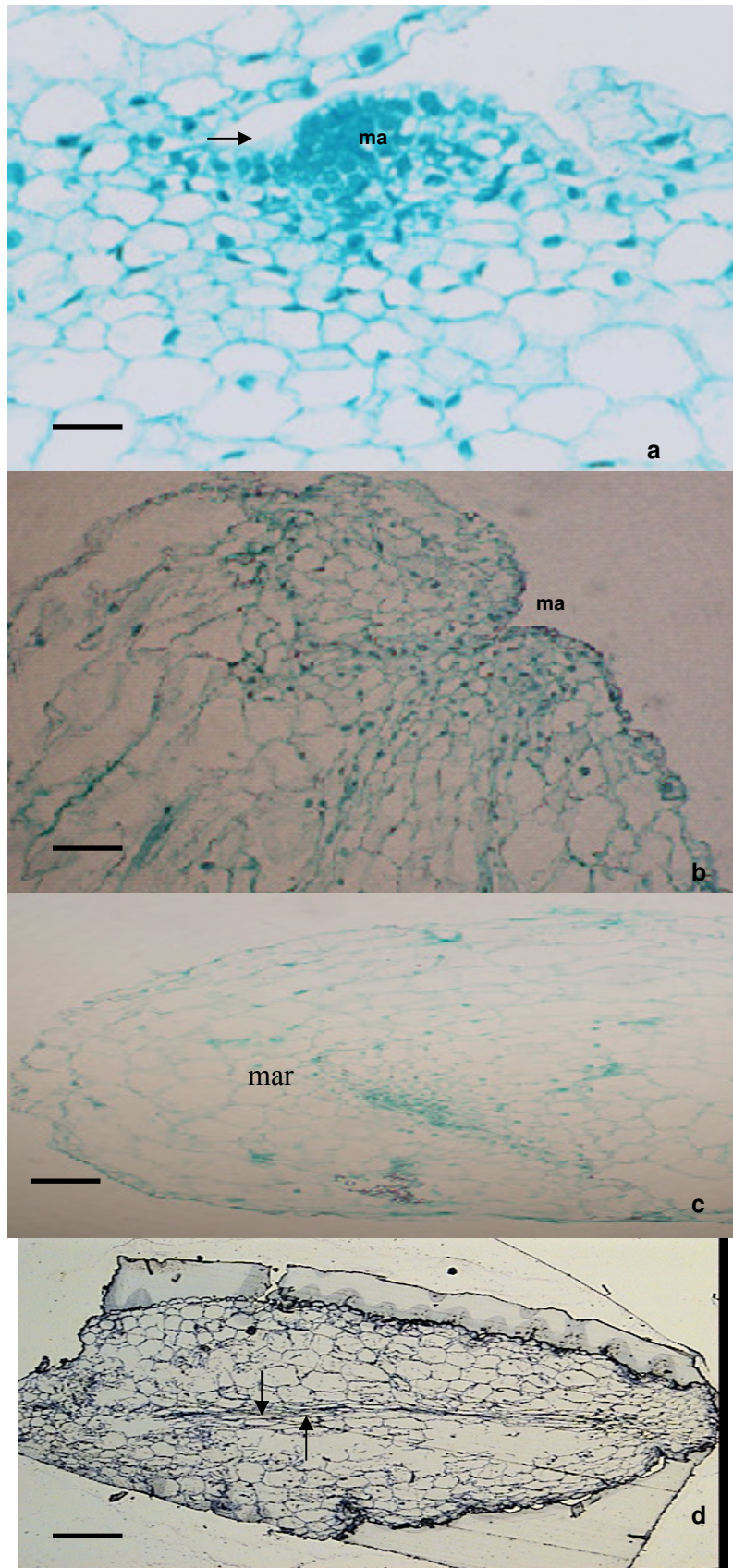


Fig. 17. Organogénesis en *Mammillaria sanchez-mejoradae*. Meristemo apical (ma) de brote (a-b), células con núcleos grandes. Meristemo apical de raíz (mar) (c), barra= 50 μ m. Haces vasculares a lo largo del brote (d), barra= 30 μ m.

Tabla 11. Análisis de varianza en la generación de embriones somáticos a partir de segmentos de callo de *Aztekium hintonii*. Medio MS modificado con 2,4-D, K y sacarosa, a las 24 semanas de cultivo.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	GL	CM	F	P
2,4-D	4.556	1	4.556	13.322	0.000
K	11.547	1	11.547	33.766	0.000
Sacarosa	20.181	4	5.045	14.753	0.000
2,4-D/K	2.67	1	2.670	7.808	0.006
2,4-D/Sacarosa	5.323	4	1.331	3.891	0.005
2,4-D/K/Sacarosa	2.915	4	0.729	2.131	0.081
ERROR	42.747	125	0.342	2.131	

SC= Suma de Cuadrados, GL= Grados de Libertad, CM= Cuadrado medio, F= F de Fisher, P= Significancia

Tabla 12. Respuesta a la inducción de la embriogénesis somática a partir de segmentos de callo en *Aztekium hintonii*. Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado con 2,4-D y K, con diferentes concentraciones de sacarosa, a las 24 semanas de cultivo.

2,4-D/K MG/L	SACAROSA G/L	N	MEDIA DE EMBRIONES	TUKEY	DESVIACIÓN ESTÁNDAR+/-	ERROR ESTANDAR	ABUNDANCIA DE CALLO	COLOR DE CALLO
0.5/0.1	60	6	8.00000	a	11.0091	4.4944	+++	amarillo-café
0.5/0.1	75	8	6.50000	ab	7.0912	2.5071	+++	amarillo-blanco
0.1/0.1	75	6	1.16667	cd	1.1690	0.4773	+++	blanco-café
0.5/0.1	45	8	0.00000	e	0.00000	0.00000	+++	blanco-amarillo
0.5/0.5	75	6	0.33333	ef	0.8165	0.3333	+++	marrón-amarillo
0.1/0.1	60	8	0.25000	f	0.7071	0.2500	+++	blanco
0.1/0.1	30	9	0.11111	f	0.3333	0.1111	+++	blanco
0.5/0.5	60	10	0.10000	f	0.8165	0.1000	+++	blanco-marrón
0.1/0.1	20	8	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	café
0.1/0.1	45	8	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	blanco-amarillo
0.1/0.5	20	7	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	café-marrón
0.1/0.5	30	7	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	blanco-marrón
0.1/0.5	45	7	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	blanco-marrón
0.1/0.5	60	5	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	blanco-marrón
0.1/0.5	75	7	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	café-marrón
0.5/0.1	20	9	0.00000	g	0.0000	0.0000	++	amarillo-café
0.5/0.1	30	7	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	marrón-blanco
0.5/0.5	20	9	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	café-amarillo
0.5/0.5	30	9	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	café-marrón
0.5/0.5	45	8	0.00000	g	0.0000	0.0000	+++	café-marrón

Tabla 13. Respuesta Morfológica a partir de segmentos de callo de *Mammillaria san-angelensis* en medio B5 modificado (Litz, 1985) suplementado con 2, 4-D y K, con diferentes concentraciones de sacarosa. A los 10 semanas de cultivo.

2,4-D/K MG/L	SACAROSA G/L	N	OXIDACIÓN	NÚMERO DE BROTOS
2.0/0	45	7	+	-
4.0/0	45	7	+	-
6.0/0	45	7	+	-
0.0/0.1	45	7	+	9
4.0/0.1	45	7	++	-
6.0/0.1	45	7	++	-
0.0/0.5	45	7	++	5
0.0/0.0	60	7	+++	7
2.0/0.0	60	7	+++	2
4.0/0.0	60	7	+	-
6.0/0.0	60	7	++	-
0.0/0.1	60	7	++	8
2.0/0.1	60	7	++	9
4.0/0.1	60	7	+++	-
6.0/0.1	60	7	+	-
0.0/0.5	60	7	++	-
0.0/1.0	60	7	++	5
0.0/2.0	60	7	+++	-
0.0/0.0	70	7	+++	2
2.0/0.0	70	7	++	5
4.0/0.0	70	7	++	-
6.0/0.0	70	7	+	5
0.0/0.1	70	7	++	10
4.0/0.1	70	7	+	8
6.0/0.1	70	7	+	5
0.0/0.5	70	7	++	4
0.0/1.0	70	7	+++	3
0.0/2.0	70		++	7

+++ 90% de oxidación, ++ 50% de oxidación, + 10% de oxidación

Tabla 14. Respuesta a la inducción de la Embriogénesis Somática a partir de segmentos de callo en *Mammillaria sanchez-mejoradae* en medio B5 modificado (Litz, 1985), modificado con 2,4-D y K, con diferentes concentraciones de sacarosa, a los 10 semanas de cultivo.

2,4-D/K MG/L	SACAROSA G/L	N	OXIDACIÓN	CRECIMIENTO DEL CALLO
0.0/0.0	45	5	++	***
0.1/0.1	45	5	+	***
0.1/0.5	45	5	++	***
2.0/0.1	45	5	++	***
0.0/0.0	60	5	+	***
0.1/0.1	60	5	+	
0.1/0.5	60	5	++	*
2.0/0.1	60	5	++	***
0.0/0.0	70	5	+	***
1.0/0.1	70	5	+++	-
2.0/0.1	70	5	++	*

+++ 90% de oxidación, ++ 50% de oxidación, + 10% de oxidación
 *** 3-5 cm³, * 1-2.9cm³, - sin crecimiento

6. DISCUSIÓN

6.1. Cultivo *in vitro*.

6.1.1. *Aztekium hintonii*.

La inducción a la embriogénesis somática *in vitro*, parece ser similar en el grupo de Cactáceas. La presencia de 2,4-D es un factor común en la formación de masas embriogénicas que posteriormente se diferenciarán en embriones somáticos; tal es el caso de *Aztekium ritteri* en donde se generaron las etapas primarias de la embriogénesis somática en el cultivo en suspensión en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979) además de 3mg/l de 2,4-D, 2mg/l de ANA y 2mg/l de K (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992); una respuesta similar fue observada en *Turbinicarpus pseudomacrolele* en medio sólido MS suplementado con vitaminas L2, 3mg/l de 2,4-D, 2mg/l de ANA y 2mg/l de K, 500mg/l de L-glutamina, 250mg/l de hidrolizado de caseína y solidificado con 8g/l de agar (Torres-Muñoz y Rodríguez-Garay, 1996). Marín-Hernández y col., (1998) reportan las primeras etapas embrionarias en *Mammillaria san-angelensis*, generadas en medio B5 (modificado Litz, 1985) con 4mg/l de 2,4-D y 2mg/l de K. Calderón-Gil (2003) reporta estructuras embrionarias en *Mammillaria sanchez-mejoradae* a partir del cultivo de callo en medio B5 (modificado Litz, 1985) con 2,4-D con o sin K.

La formación de estructuras globulares a los 56 días de cultivo en *A. hintonii*, es una respuesta similar a la presentada por *Mediocactus coccineus* al generar callo embriogénico (color café pálido con estructuras globulares) en medio MS con 2.7 o 5.4µM de ANA el cual fue sub-cultivado en medio MS sin reguladores de crecimiento, después de una semana se generó el primer embrión somático (Infante, 1992).

La presencia de K en la respuesta a la embriogénesis somática puede estar relacionada a que las citocininas por si solas, y a baja concentración pueden inducir la embriogénesis somática (Sharp et al., 1980). El requerimiento de porcentajes relativamente altos (6-7%) de sacarosa en el medio para inducir a la embriogénesis somática en *A. hintonii* es similar en diversas especies como *Citrus* (Murashige y Tucker, 1969), *Mangifera indica* L. (DeWald et al., 1989), *Carica papaya* (Litz y Conover, 1983), *Daucus carota* (Wetherell, 1984, y, *Ceratozamia mexicana* (Chávez et al., 2003); en donde la adición de sacarosa al medio varía entre 5-6% de sacarosa. En *Eleutherococcus koreanum* se promovió la embriogénesis somática, cuando se añadió 60g/l al medio (So-Young Park et al., 2005).

6.1.2. *Mammillaria san-angelensis* y *Mammillaria sanchez-mejoradae*.

En ambas especies se mantiene el mismo patrón de respuesta morfogénica, ya que bajas concentraciones o ausencia de auxina son requeridas en combinación con altos niveles de citocininas para la proliferación de brotes axilares (Hubstenberg et al., 1992). En *Mammillaria elongata* el mejor tratamiento en medio MS contenía

10mg/l de 2iP y 1mg/l de IBA (Johnson y Emino, 1979). Para *Leuchtenbergia principis*, hubo una producción de 25 brotes con secciones apicales, cuando el medio contenía 10mg/l de BAP y 0.1mg/l de ANA (Starling, 1985).

En *Opuntia amyclaea* cada sección longitudinal de tallo generó 15 brotes en 30 días en medio MS con 10^{-5} M de BA (Escobar et al., 1986). En *Mammillaria san-angelensis* mediante explantes longitudinales obtuvieron 21-35 brotes/explante en medio MS con 10mg/l de BA (Martínez-Vazquez y Rubluo, 1989). Clayton y col. (1990), induce la multiplicación de brotes de 11 especies de la familia Cactaceae siendo el mejor tratamiento el que contenía $45.6\mu\text{M}$ de zeatina y $1.1\mu\text{M}$ de ANA. Ortiz (2003) en *Astrophytum myriostigma* obtuvo una media de 12.64 brotes/explante (secciones longitudinales) en medio MS con 6mg/l de BA y 0.1mg/l de ANA.

6.2. Análisis Estructural.

6.2.1. *Aztekium hintonii*.

La formación de centros meristemáticos en la superficie del tejido de callo, delimitados por una epidermis bien pronunciada en la periferia (Fig. 9a-c), es lo que Profumo y col., (1986) en *Aesculus hippocastanum* llaman “células precursoras de callo embriogénico”; sin embargo estructuras similares reportadas por Vidal y col., (2000) en *Musa sp.*; Haensch (2004) en *Pelargonium x hortorum* y en *Linum usitatissimum* L. (Salajal et al., 2005), son llamadas proembriones esféricos.

Las células ubicadas en la superficie del callo muestran características específicas: amplio radio nucleoplasmático, citoplasma rico en proteínas y núcleo prominentemente central con nucleolo voluminoso (Fig. 9e), lo cual se manifiesta de igual forma en *Gladiolus hort.* (Stefaniak, 1994), *Cicer arietinum* L. (Sagare et al., 1996), *Licopodiella inundata* L. (Atmane et al., 2000) y, *Arachis hypogaea* L. (Chengalrayan et al., 2001)

Dentro de las células de callo se presentan granos de almidón y mucílago como sustancias de reserva en el tejido (Fig. 10c), también reportado para *Dactylis glomerata* (Vasilenko et al., 2000), lo que Chengalrayan y col. (2001), mediante un estudio ultraestructural reportan podría ser gránulos de lípidos, proteínas y/o almidón

A los 56 días de cultivo el tejido mostró etapas de desarrollo avanzado en donde se observan centros meristemáticos inmersos en el callo alimentados por haces vasculares que se generaron en el callo (Fig. 11a-c), lo mismo que para *Musa sp.* (Vidal et al., 2000).

6.2.2. *Mammillaria sanchez-mejoradae*.

La presencia de células meristemáticas de brote (pequeñas, con núcleos grandes con respecto al tamaño de la célula, en donde los nucleolos son pronunciados por la tinción) a los dos meses de cultivo (Fig. 12 a-b), es similar a lo reportado por Chengalrayan y col. (2001) para *Arachis hypogaea* L. y, Pritsa y Voyiatzis (2004) en Olivo.

7. CONCLUSIONES.

Se establecieron condiciones de cultivo in vitro, que permiten la regeneración de *Aztekium hintonii*, *Mammillaria san-angelensis* y *Mammillaria sanchez-mejoradae*, que podrían ser utilizados como herramientas para el estudio, conservación y aprovechamiento de las poblaciones silvestres.

La inducción de embriones somáticos en *A. hintonii* se presentó en los medios con 0.5 mg/l de 2, 4-D y 0.1 mg/l de K, y altas concentraciones de sacarosa (60 y 70 g/l) fueron necesarias.

El análisis estructural a los 30 días de cultivo, presenta células con respuesta favorable a la morfogénesis, con formación de centros meristemáticos en la superficie del callo, delimitados por una epidermis bien definida en la periferia.

En *M. san-angelensis* la K en concentraciones de 0.1-0.5 mg/l y en ausencia y/o bajas concentraciones de 2,4-D mantiene el número de brotes más alto (10-8) con respecto al resto de los tratamientos.

Los tratamientos con 2 mg/l de 2, 4-D y 0.1 mg/l de K y 45-60 g/l de sacarosa, registraron la respuesta más favorable morfogénicamente en *M. sanchez-mejoradae*.

A los dos meses de cultivo el tejido de *M. sanchez-mejoradae* presentó células de meristemo apical de brote, haces vasculares a lo largo de las estructuras desarrolladas. El meristemo de raíz, bien desarrollado en el extremo inferior.

La metodología podría ser adecuada para la regeneración de otras cactáceas en condiciones similares.

8. LITERATURA CITADA.

Agarwal S., Kanwar K., and Sharma D. R. 2004. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation en *Morus alba* L. *Scientia Hort.* 102: 359-368.

Aitken J., Horgan K. J., and Thorpe T. A. 1981. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.* 11: 112-117.

Ammirato, P. V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green, C.E., Somers, D. A., Hackett, W. P., Biesboer, D. D. (Eds.), *Plant Tissue and Cell Culture*, vol. 3. Alan R. Liss. New York, pp. 57-81.

Ammirato P. V., 1989. Recent Progress in Somatic Embryogenesis. *Newsletter IAPTC No. 57: 2-16.*

Anderson, E. F. (ed.) 1990. Succulent plant conservation studies and training in Mexico: Stage 1, part 2 and Stage 2. *World Wildlife Found-U.S.* Reporte interno.

Anónimo, 2002. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2001, "Protección ambiental-especies de flora y fauna silvestres de México-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo". SEMARNAP. *Diario Oficial de la Federación.* 1-60.

Arias, M. S., 1993. Cactáceas: Conservación y Diversidad en México. *Rev. Soc. Mex. Hist.Nat.* (XLIV): 109-115.

Arizaga, S., and E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia.* 101: 329-334.

Arreola, H. J., 1990. Inventario de las cactáceas de Jalisco y su distribución. *Cact. Suc. Mex.* 35: 3-12.

Arunyanart S., and M. Chaitrayagun. 2005. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). *Scientia Horticulturae.* 105: 411-420.

Asbell C. W. 1977. Ultrastructural modifications during shoot formation *in vitro*. *In Vitro* 13: 180.

Atmane N., A. S. Blervacq, N. Michaux-Ferriere, and J. Vasseur. 2000. Histological analysis of indirect somatic embryogenesis in the Marsh clubmoss *Lycopodiella inundata* (L.) Holub (Pteridophytes). *Plant Science*. 156: 159-167.

Ault J. R., and W. J. Blackmon. 1985. In vitro propagation of selected native cacti species. *Hort. Science*. 20: 541.

Ault J. R., and W. J. Blackmon. 1987. In vitro propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *Hort. Science*. 22: 126-127.

Becerra R. 2000. Las Cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. 6 (32), en: <http://www.conabio.gob.mx>.

Benítez H., y P. Dávila. 2002. Las Cactáceas Mexicanas en el contexto de la CITES. 6 (40), en: www.conabio.gob.mx.

Berleth T., and S. Chatfield. 2002. Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *American Society of Plant Biologists*. 1-22 pp. *Arabidopsis Book*.

Bravo-Hollis H. 1978. Las Cactáceas de México: I. UNAM. México.

Bravo-Hollis H. y R. H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las Cactáceas de México: II. UNAM. México.

Calderón-Gil. 2003. Micropropagación de *Mammillaria sanchez-mejoradae* González (Cactaceae). Endémica y en Peligro de Extinción. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, UMSNH. México.

Chandler S. F., and Thorpe T. A. 1986. Hormonal regulation of organogenesis *in vitro*. In: Purohit, S. S. (ed) *Hormonal Regulation of Plant Growth and Development*. 3:1-27. Agro-Botanical Publ., India.

Chávez A. V. 1993. Embriogénesis Somática a partir de Foliolos jóvenes de Plantas Maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (MIQ) Dyer (Zamiaceae). Especie en Peligro de Extinción. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Chengalrayan K., S. Hazra, and M. Gallo-Meagher. 2001. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.) *Plant Science*. 161: 415-421.

CITES. 1995. Appendices I, II y III to the convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. US Fish & Wildlife Service, Washington, DC.

Clayton P. W., J. F. Hubstenberger and G. C. Phillips. 1990. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sc. 115: 2.

Consejo Regulador del Tequila, A. C. 1997. Estadísticas de producción, exportación y consumo de materias primas para la elaboración de tequila. Guadalajara Jalisco. México.

Cullmann W., E. Götz, and G. Gröner. 1986. The Encyclopedia of Cacti. Ed. Timber Press.

De Klerk, G. J., Arnholdt-Schmitt B., Lieberei R. and Neumann K. H. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39 (1): 53-66.

Denchev, P and Atanassov, A. 1989. Effect of atrazine on the viability and embryo formation. European Societies of Plant Physiology. Yugoslavia.

Denchev; Velcheva, M.; Dragijska, R.; Kuklin, A. and Atanassov, A. 1990. Somatic embryogenesis in *Medicago*. *Biotekhnol. Biotekh.*

DeWald, S. G., Litz, R. E., Moore, G. A., 1989. Optimizing somatic embryo production in mango. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 144: 712-716.

Dodds J. H. and Roberts. 1982. *Experiment in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. Cambridge: 79-95.

Douglas T. J., Villalobos V. M., Thompson M. R., and Thorpe T. A. 1982. Lipid and pigment changes during shoot initiation in cultured explants of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* 55: 470-477.

Dunstan D. I., and K. C. Short. 1977. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41:70-72.

Duran R. G. 2002. Usos del Cactus; <http://www.lemonlovers.de/pitaco.html>.

Escobar, H. A., Villalobos, V. M., Villegas, A. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 7: 269-277.

Evans, D.; Sharp, W. and Flick, C. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. Pp 45-113, In: T. Thorpe (ed), *Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture*. Academic Press. New York

Fay M. F. and J. Gratton. 1992. Tissue Culture of Cacti and Other Succulents: A Literature Review and a Report on Micropropagation at Kew. Micropropagation Unit, Royal Botanic Gardens. Kew, Richmond, Surrey, TW93AB, U. K. : 33-48.

Fujimora, T. and Komamine, A. 1980. The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *New Physiol.* 64: 162-164.

Gamborg O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.

Gautheret R. J. 1966. Factors affecting differentiation of plant tissues grown *in vitro*. Pag. 55-71, en: W. Beerman (ed), *Cell differentiation and morphogenesis*. North Holland Publishing Co. Amsterdam.

George F. E. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. (Part 1). Segunda Edición. Ed. Exegetics Limited. London.

Gibson, A. C. and P.S. Nobel. 1986. *The cactus primer*. Harvard University Press, Cambridge. 286pp.

Gladfleter H. J., and G. C. Phillips. 1987. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *in vitro*. I. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. *Plant Cell Rep.* 6:163-166.

Glass E. C. 1998. *Guía para la identificación de Cactáceas Amenazadas de México*. Vol. 1. Ed. CONABIO. México.

Gómez K. R. 1998. Embriogénesis Somática. Pp. 57-79; en Pérez, P. (ed.), *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.

Granados S. D. 1993. *Los Agaves en México*. Universidad de Chapingo. México.

Gray, D. and Purohit, A. 1991. Somatic embryogenesis and development synthetic seed technology. *Critical reviews in Plant Sciences.* 10: 33-61.

Gray, D. J. 1997. Synthetic Seed for clonal Production of Crop Plants. Pp. 29-45; in: R. B. Taylorson (ed.), *Recent Advances in the Development and Germination of Seeds*.

Halperin, W. 1964. Population density effects in embryogenesis in carrot cell cultures. *Exp. Cell Res.* 48: 179-183.

Halperin, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Amer. J. Bot.* 53: 443-453.

- Haustein. 1988. The Cactus Handbook. Chartwell Books, Inc. 320 pp.
- Hubstenberger, J.; Clayton, P.; Phillips, G. 1989. Micropropagation of cacti. In: Bajaj, Y. P. S. (ed). Biotechnology in agriculture and forestry. Heidelberg: Springer-Verlag; 1-37.
- Hubstenberger J. F., P. W. Clayton and C. G. Phillips. 1992. Micropropagation of Cacti (Cactaceae): Biotechnology in agriculture and Forestry. 20: 49-68.
- Infante R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 155-159.
- Johansen, D. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- Johnson, J. L. and E. R. Emino. 1977a. Tissue culture propagation of *Opuntia polyacantha* as influenced by plant growth regulators. Hort. Science. 12:239.
- Johnson, J. L. and E. R. Emino. 1977b. Tissue culture propagation of *Mammillaria elongata* as influenced by plant growth regulators. Hort. Science. 12: 394.
- Johnson J. L., and E. R. Emino. 1979. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. Hort. Science. 14: 605-606.
- Joy Iv R. W., and T. A. Thorpe. 1995. Shoot Morphogenesis: Structure, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. pp. 171-214, in: Thorpe, T. A (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kanharajah A. S., and P. G. Golegaonkar. 2004. Somatic embryogenesis in eggplant. Scientia Hort. 99: 107-117.
- Kartha K. K. 1982. Organogenesis and Embryogenesis. Pp 10-15, in: Wetter L. R. y F. Constabel (eds) Plant Tissue Culture Methods. Prairie Regional Laboratory Saskatoon. Canada.
- Kohlenbach, H. W. 1978. Regulation of embryogenesis *in vitro*. Pp 236-251; in: H. R. Schutte y D. Gross (eds.), Regulation of development processes in plant. VEB Kongress-und Werbedruck, Oberlungwitz.
- Kolár, Z., Bártek. J., and Vyskot, B. 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii*. Craig through tissue cultures. In Experimentia. 32: 668-669.

Komamine A., N. Murata and K. Nombra. 2005. 2004 SIVB Congress Symposium Proceeding: Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures-morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 41:6-10.

LaRue C. D. 1948. Regeneration in the gametophyte of *Zamia floridana*. *Bull. Torrey Bot. Club* 75: 597-603.

Lakshmanan, P. and Taji, A. 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biol.* 2: 136-148.

Leunenberger, B. E. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). *Mem. New York Bot. Gard.* 41: 1-141.

Lindon R. F. 1990. *Plant development: The cellular basis*. Unwin Hyman, London.

Lindon R. F. 1994. Control of organogenesis at the shoot apex. *New Phytol.* 128:1-18.

Litz, R. E. and R. A. Conover. 1983. High frequency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. *Ann. Bot.* 51: 683-686.

Litz, R. E. 1985. Somatic Embryogenesis in Tropical Fruit Trees. Páginas 179-193, en: Henke R. R., K. W. Hughes, M. P. Constantin y A. Hollaender (eds) *Tissue Culture in Forestry and agriculture*, Plenum, New York.

Maeda E., and Thorpe T. A. 1979. Shoot histogenesis in tobacco callus cultures. *In Vitro* 15: 415-424.

Margara J. 1988. *Multiplicación Vegetativa y Cultivo in vitro, los meristemas y la organogénesis*. Editorial Mundi-Prensa, Madrid.

Marín-Hernández, T. J. Márquez-Guzmán, B. Rodríguez-Garay and A. Rubluo. 1998. Early stages in the development of somatic embryogenesis in *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae) a severely endangered species. *Pyton.* 62(1/2): 181-186.

Martínez-Palacios A., L. E. Eguiarte and G. R. Furnier. 1999. Conservation genetics of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahua desert. *Am. J. Bot.* 86: 1093-1098.

Martínez-Palacios A., M. P. Ortega-Larrocea, V. M. Chávez and R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 135-142.

Martínez-Vazquez. O. and A. Rubluo. 1989. *In vitro* Mass Propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. Journal of Horticultural Science. 64(1): 97-103.

Mauseth, J. D. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. In Cact. Succ. J. (US) 51: 186-187.

McWilliam A. A., S. M. Smith, and H. E. Street. 1974. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). Ann. Bot. 38: 243-250.

McKersie, B. D. and D. C. W. Brown. 1996. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. Seed Science Research 6: 109-126.

Merkle, S.; Parrot, W. and Flinn, B. 1996. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis, in: T. Thorpe (ed), Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture. Academic Press. New York.

Mittermeier R. A. 1988. Primate diversity and tropical forest: case studies from Brazil and Madagascar and the importance of the megadiversity countries, in: E. Wilson (ed), Biodiversity. National Academic Press, Washington, D. C.

Muñoz F. J.R. 2002. La Pitahaya; <http://www.liberia.co.cr/promo/pitahaya.htm>.

Murashige T. and K. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 5: 473-497.

Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Reinert, J. and Bajaj, Y. P. S., (eds.), Springer-Verlag, New York, 179-248.

Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85-87.

Norstog, K. 1965. Development of cultured barley embryos. Am. J. Bot. 52:538-540.

Norreel, G. and J. P. Nitsch. 1968. La formation d` "embryons végétatifs" chez *Daucus carota* L. Bul. Soc. Bot. Fr. 115 : 501-514.

Oldfield, Sara (comp.) 1997. Cactus and Succulent Plants. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC. Cactus and Succulent Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

Ortiz H. Y. D. 1999. Pitahaya : un nuevo cultivo para México; Limusa. México.

Perán-Quesada R., Sánchez-Romero C., Barceló-Muñoz A., and Pliego-Alfaro F. 2004. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulture*. 102: 61-73.

Pérez Molphe-Balch, E.; Pérez-Reyes, M. E.; Villalobos-Amador, E.; Meza-Rangel, E.; Morones-Ruiz, L. R.; Lizalde Viramontes, H. J. 1988. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 131-135.

Phillips G. C., and G. B. Collins. 1979. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop. Sci.* 19:59-64.

Pyke K. 1994. *Arabidopsis* - its use in the genetic and molecular analysis of plant morphogenesis. *New Phytol.* 128: 19-37.

Raghaven, V. 1976. Role of the generative cell in androgenesis in henbane. *Science* 191: 388-389.

Reilly K. J., and Washer J. 1977. Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture; plantlet formation from embryonic tissue. *N. Z. J. For. Sci.* 7: 199-206.

Reinert J. 1958. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.* 71:15.

Reinert J. D., Gregor, and H. Matsumoto. 1973. Studies on the chromatin of carrot cell cultures growing in the presence and absence of auxine. Pp 539-548; en: *Proc. Eighth Intern. Conf. Plant Growth Substances*, Tokyo. Hirokawa Publishing Co., Tokyo.

Rodríguez-Garay, B., A. Gutierrez-Mora, and B. Acosta Dueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 85-87.

Rosales M. O. 1996. *La vida de las Zonas Áridas*; Editorial Oceánica. México. Socha A. M. 2002. The New York Botanical Garden; <http://www.nybg.org/bsci/herb/cactaceae1.html#Morphology>.

Ross M. K., Thorpe T. A., and Costerton J. W. 1973. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. *Amer. J. Bot.* 60: 788-795.

Rout G. R., S. Samantaray, and P. Das. 2000. In vitro somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae.* 86: 71-79.

Rubluo A., V. Chavez, O. Martinez, and A. Martinez. 1986. The recovery of endangered Mexican plant population through tissue culture. VI Int.

Congr. on Plant tissue and Cell Cult Abstr. Univ. Minnesota, Minneapolis, M. N., p 428.

Rubluo, A., V. M. Chávez. P. A. Martínez. O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. *Biol. Conserv.* 63: 1232-1237.

Rzedowski J. 1991. El Endemismo en la Flora Fanerogámica Mexicana: Una Apreciación Analítica Preliminar. *Acta Botánica Mexicana.* 15: 47-64.

Rzedowski J. 1998. Diversidad y Origen de la Flora Fanerogámica de México. Pp 129-144, en: Ramamoorthy T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds) *Diversidad Biológica de México.* UNAM. México.

Sagare A. P., K. Sushasini, and K. V. Krishnamurthy. 1995. Histology of somatic embryo initiation and development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Science.* 109: 87-93.

Sánchez-Mejorada , E. F., Anderson, N. P. Taylor and R. Taylor. 1986. Succulent plant conservation studies and training in Mexico: Stage 1, part 1. World Wildlife Found-U. S.

Schenk R. U., and A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.

Sharp W. R., M. R. Sondahl, L. S. Caldas, and S. B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Páginas 268-310 in: Janick J (ed) *Horticultural Reviews* Vol. 2, Purdue University, Avi Publishing Co, Westport.

Smith R. H., P. J. Burdick, J. Anthony, and A. A. Reilley. 1991. In vitro propagation of *Coryphanta macromeris*. *Hort. Science.* 26:315.

So-Young P., Jin-Kwon A., Wi-Young L., Hosakatte N. M., and Kee-Yoeup P. 2005. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Science.* 168: 1221-1225.

Starling R. J. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cactus and Succulent Journal,* 57: 114-115.

Starling, R. J. and J. H. Doods. 1983. Tissue culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya,* 1: 84-90.

Steeves T. A. and Sussex I. M. 1989. *Patterns in Plant Development.* Camb. Univ. Press, New York.

Stefaniak B. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Gladiolus* (*Gladiolus hort.*). *Plant Cell Reports*. 13: 386-389.

Steward F. C., M. O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45: 705-708.

Street H. E. and L. A. Withers. 1974. The anatomy of embryogenesis in culture. Páginas 71-100, in: H. E. Street (ed), *Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press. London.

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

Socha A. M. 2002. The New York Botanical Garden; <http://www.nybg.org/bsci/herb/cactaceae1.html#Morphology>.

Thomas, E. F. Hoffman, I. Potrykus, and F. Wenzel. 1976. Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenetic rape. *Molec.Gen. Genet.* 1945: 245-247.

Thomas, E., P. J. King, and I. Potrykus. 1977. Shoot and embryo-like structure formation from cultured tissues of *Shorgum bicolor*. *Naturwiss* 64: 587.

Thorpe, T. A., and Murashige T. 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus culture. *Can. J. Bot.* 48: 277-285.

Thorpe, T. A. 1979. Regulation of organogenesis *in vitro*. In: Hughes, K. W. *et al.*, (eds) *Propagation of Higher Plant Through Tissue Culture. A Bridge Between Research and Application*. US Tech. Inf. Serv. Pp. 87-101.

Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological and biochemical aspects. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11: 71-111.

Thorpe, T. A. 1993. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: Physiological biochemical aspects. In: Roubelakis-Angelakis, K. A., and Tran Thanh Van, K. (eds) *Markers of Plant Morphogenesis*. Pp. 19-38.

Tisserat, B. and T. Murashige. 1977. Repression of asexual embryogenesis *in vitro* by some plant growth regulators. *In Vitro*. 13:799-805.

Tisserat, B., E. B.. Esan, and T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Pp 1-78, in: J. Janick (ed.), *Horticultural reviews, volume I*. AVI Publishing, Westport, Conn.

Tokin B. 1964. Regeneration and somatic embryogenesis. Pp 9-46, in: Regeneration and wound healing. Akad. Kiado Budapest.

Torres-Muñoz, L. and B. Rodríguez-Garay. 1996. Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbinicarpus pseudomacrolele* (Buxbaum & Backerberg). J. PACD. 1: 36-38.

Tran Thanh Van K., and Trinh T. H. 1990. Organogenetic differentiation. In: Bhojwani, S. S. (ed) Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Pp. 34-53. Elsevier, Amsterdam.

Vasil, I. K. and A. C. Hildebrandt. 1966. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures I. *Cichorium endivia*. *Amer. J. Bot.* 53: 860-869.

Vélez-Gutiérrez, C. and B. Rodríguez-Garay. 1996. Microscopic analysis of polyembryony in *Opuntia ficus-indica*. J. PACD. 1: 39-48.

Villalobos V. M., Yeung E. C., and Thorpe T. A. 1982. Autoradiographic and ultrastructural examination of shoot initiation in radiata pine cotyledon explants. In: Fujiwara, A. (ed) Plant Tissue Culture. pp. 41-42. Japanese Assoc. Plant Tissue Cult., Tokyo.

Villalobos V. M., Yeung E. C., and Thorpe T. A. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* 63: 2172-2176.

Vyskot B., and Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *J. Hortic. Sci.* 59: 449-452.

Wetherell, D. F., 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of culture wild carrot cells. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3: 221-227.

Widholm J. M., L. A. Withers and K. R. Wood. 1985. Plant cell culture a practical approach. Ed. IRL Press. U. S. A.

Wilmar, C. and M. Hellendoorn. 1968. Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured *in vitro*. *Nature* 217: 369-370.

Zimmerman, J. L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.

APÉNDICE 1. Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

STOCK	CANTIDAD		10X
No.	Nutrientes	mg/l	g /10lts.
I	MACRONUTRIENTES		
	Nitrato de Amonio (NH ₄ NO ₃)	1650.0	16.5
	Nitrato de Potasio (KNO ₃)	1900.0	19.0
	Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ · H ₂ O)	370.0	3.7
	Fosfato Monobásico de Potasio (KH ₂ PO ₄)	170.0	1.7
II	Cloruro de Calcio (CaCl ₂ · 2 H ₂ O)	440.0	4.4
III	Sulfato Ferroso (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	27.8	0.278
	Na ₂ EDTA	37.3	0.373
IV	MICRONUTRIENTES		
	Yoduro de Potasio (KI)	0.83	0.0083
	Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	6.2	0.062
	Sulfato de Manganeso (MnSO ₄ · H ₂ O)	16.9	0.169
	Sulfato de Zinc (ZnSO ₄ · 2H ₂ O)	8.3	0.083
	Molibdato de Sodio (NaMoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25	0.0025
	Sulfato Cúprico, Anhídrido (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.025	0.00025
	Cloruro de Cobalto (CaCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025	0.00025
V	Inositol	100.0	1.00
VI	VITAMINAS		
	Ácido Nicotínico	0.5	0.005
	Piridoxina HCl	0.5	0.005
	Tiamina HCl	0.1	0.001
	Sacarosa	30 000	30
	Agar Bacteriológico	8 000	8

APÉNDICE 2. Medio de Cultivo B5 modificado (Litz, 1985).

MACRONUTRIENTES		mg/l
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
Fosfato de Sodio	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150
Nitrato de Potasio	KNO_3	2500
Sulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134
MICRONUTRIENTES		mg/l
Yoduro de Potasio	KI	0.83
Ácido Bórico	H_3BO_3	6.3
Sulfato Manganoso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Molibdato 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
EDTA sal di sódica	Na_2 EDTA	37.3
Sulfato Ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
COMPUESTOS ORGANICOS		mg/l
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2
Myo-inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100
Tiamina (vit. B1)	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	0.1
Piridoxina (vit. B6)	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	0.5
Ácido Nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.5
L-Glutamina	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	400
Ac. L-Ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	100
Hidrolizado enzimático de caseína		100
L-Argenina	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$	100
L-Asparagina	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100
Sacarosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	60000
Agar Bacteriológico		8500

APÉNDICE 3. Series Modificadas de Deshidratación con Alcohol Butílico Terciario (ATB).

ATB 100%(ml)	EtOH 100%(ml)	EtOH 95%(ml)	H ₂ O (ml)	Concentración final (%)	Tiempo recomendado(hrs)	
					Hoja	Tallo
5	0	30	65	35	12	24
10	0	40	50	50	12	24
15	0	45	40	60		
20	0	50	30	70	12	24
35	0	50	15	85	12	24
55	0	45	0	95		
75	25	0	0	100	12	24
100	0	0	0	100	12	24
100	0	0	0	100	12	24
100	0	0	0	100	12	24

APÉNDICE 4. Preparación de Alcoholes.

85%	88.5 ml de OH al 96% se aforaran en 100ml con Agua Destilada.
70%	73 ml de OH al 96% se aforan en 100 de Agua Destilada.
50%	52.1 ml de OH al 96% se aforan en 100 ml de Agua Destilada.
35%	31.2 ml de OH al 96% se aforan en 1000 ml de Agua Destilada.

ANEXO. Preparación de reactivos.

1. Fijadores.

CRAF III

Para 100ml:

Trióxido de cromo (sol. acuoso al 1%)	30ml
Ácido acético glacial al 10%	20ml
Formaldehído (37-40%)	10ml
Agua destilada	40ml

FAA

Para 100ml:

Formaldehído (37-40%)	10ml
Alcohol (96%)	50ml
Agua destilada	35ml
Ácido acético glacial	5ml

2. Colorantes.

Safranina "O" (IC 50240)

Safranina "O"	1g
Metilcelosolve	50ml
Alcohol 96%	25ml
Agua destilada	25ml
Acetato de sodio	1g
Formaldehído al 37%	2ml

Disolver la safranina en el metilcelosolve y agregar los reactivos en el orden marcado. Mezclar y filtrar la solución.

Verde rápido FCF (grado reactivo, IC 42053)

Solución "A"

Verde rápido	4g
Alcohol etílico absoluto	75ml
Metilcelosolve	25ml

Se disuelve el colorante en el alcohol y se agrega el metilcelosolve.

Solución "B"

Alcohol etílico absoluto	25ml
Aceite de clavo	75ml

Mezclar ambas soluciones y posteriormente filtrar la solución final.

Azul de toluidina O (IC 52040)

Azul de toluidina	1g
Bórax (tetraborato de sodio)	1g
Agua destilada aforar a 100ml	

Disolver los reactivos por separado con calor y en agitación, se mezclan y esta mezcla se hierve de 10 a 20 min., posteriormente se deja enfriar y reposar 24h, se filtra, el filtrado se almacena en botella ámbar.