



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Regeneración in vitro de Ariocarpus bravoanus, Hernández y
Anderson (CACTACEAE), especie endémica mexicana en peligro
de extinción**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G O
P R E S E N T A :**

Ricardo Gómez Jacinto



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Víctor Manuel Chávez Avila
2008**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila que me brindo la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por sus enseñanzas y paciencia.

Al Dr. Robert Arthur Bye Boettler, por la oportunidad que me dio y por su amistad.

A la Biol. Bárbara Estrada, por todo su apoyo, sus enseñanzas y su orientación que hicieron posible este trabajo.

Al Biol. Gabriel que con su amplia experiencia en Cactáceas me brindó su apoyo en el momento oportuno.

Al Dr. Martín Mata Rosas, al Dr. Angel Salvador Arias Montes y a la M. en C. Estela Sandoval Zapotitla por su amistad y por sus comentarios y correcciones en la revisión de este trabajo.

A todos mis maestros y maestras que he tenido en toda mi vida.

Al personal del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM que también contribuyeron con su labor a la realización de este trabajo.

*A mi esposa con todo mi amor porque sin ella no hubiera sido posible lograrlo,
esperando que en algo recompense su esfuerzo y sacrificio, gracias.*

A mis hijos, como estímulo y fuente de inspiración constante.

A mi madre, que me dio el ser y me enseñó el camino a seguir

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	2
Resumen	3
I. Introducción	4
I.1.- Descripción de <i>Ariocarpus bravoanus</i>	12
Clasificación Botánica	12
Descripción Botánica	13
Hábitat	13
Distribución geográfica	15
Usos	15
Situación actual	17
I.2.- Métodos de Propagación	17
I.3.- Técnicas de Micropropagación	19
I.4.- Reguladores de Crecimiento	22
Auxinas	23
Citocininas	25
I.5.- Objetivos	27
II. Materiales y Métodos	28
III. Resultados y Discusión	33
IV. Conclusiones	57
V. Bibliografía	58
VI. Apéndices	65

ABREVIATURAS

MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
MS50	Medio Murashige y Skoog al 50 %
IBA (AIB)	Ácido 3-indol-butírico
ANA	Ácido 1-naftalén-acético
KIN	Kinetina/ Furfurilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético
BA (BAP)	6-Benzilaminopurina
CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies en Peligro de Extinción de Fauna y Flora Silvestres
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

RESUMEN.

Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus* Hernández y Anderson (CACTACEAE), especie endémica mexicana en peligro de extinción.

Ariocarpus bravoanus, especie endémica de México, se encuentra en serio peligro de extinción en virtud de las colectas ilegales que ha sufrido, que aunado al limitado conocimiento que de ella se tiene, hacen urgente realizar estudios encaminados a su conservación. Una alternativa es la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos para lograr un método de micropropagación eficiente que permita reducir la presión sobre esta especie y contribuir a su conservación. A partir de 36 plántulas germinadas asépticamente y después de un tratamiento (30 semanas) en medio MS50 usando BAP (0-0.5 mg/l) + ANA (0-5 mg/l) y KIN (0-0.5 mg/l) + 2,4-D (0-5 mg/l) se logró la formación de tubérculos (337) y de brotes (120) sin lograr enraizamiento. A partir de los cultivos se disectaron 450 tubérculos individuales y se ensayaron seis tratamientos para inducir enraizamiento en medio de cultivo MS50 (8 semanas) suplementado con AIB (0-2 mg/l) + ANA (0-1 mg/l) obteniendo respuestas positivas. Se logró la regeneración *in vitro* de *A. bravoanus*, a partir de tubérculos y de brotes múltiples que se originaron de callo utilizando KIN (0.1 mg/l) + 2,4-D (1 mg/l) obteniendo 37 tubérculos. El desarrollo de raíces ocurrió vía organogénesis directa y se observó a las dos semanas aun en el medio de inducción con AIB (2 mg/l) + ANA (0.05 mg/l) obteniendo 27 tubérculos enraizados; los explantes que al principio del tratamiento desarrollaron callo en su porción lateral o apical, después de ocho semanas fueron los que formaron mayor cantidad de raíces; el porcentaje de enraizamiento de tubérculos fue de 30% y el porcentaje de formación de brotes fue de 11%, las raíces obtenidas fueron vigorosas y de 4-8 en cada tubérculo. Se adaptaron a condiciones de invernadero 4 plántulas en una mezcla de tierra negra, vermiculita y peat-moss 1:1:1 teniendo resultados positivos. Estos resultados permiten vislumbrar el establecimiento de un método efectivo para la regeneración y conservación de *A. bravoanus*.

Palabras clave: *Ariocarpus*, micropropagación, organogénesis, enraizamiento, ANA, AIB, Cactáceas, conservación.

I.- INTRODUCCIÓN.

Una de las familias botánicas más importantes dentro del mundo vegetal característica de zonas áridas y semiáridas lo constituyen las Cactáceas con aproximadamente 100 géneros y alrededor de 1500 especies (Barthlott y Hunt, 1993) y, paradójicamente, no obstante que son fuente de múltiples recursos, es uno de los grupos más amenazados y en mayor peligro de extinción por lo que es necesario realizar esfuerzos encaminados a su conservación. Una alternativa para lograrlo es el empleo del cultivo de tejidos para su regeneración *in vitro* y posteriormente llegar a niveles de propagación masiva.

En México, más de la mitad del territorio es árido o semiárido, motivo por el cual es posible encontrar gran diversidad de cactáceas, que son los elementos más prominentes en dichas tierras. En nuestro país encontramos 48 géneros y alrededor de 570 especies (Gómez-Hinostrosa y Hernández, 2000), aunque otros (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995) citan más de 850 especies y algunos hasta 925 especies (Soltero, 1999) lo que representaría el 45 % de diversidad conocido de la familia. Hernández y Godínez (1994) han estimado que el 35% (197 especies) están amenazadas o en peligro de extinción; Soltero (1999) señala que son 217 especies. Hernández (2006) señala más de 50 géneros y alrededor de 550 especies, de las cuales un tercio estaría amenazado.

Las cactáceas son autóctonas del continente Americano encontrándose en localidades que van desde el nivel del mar hasta altitudes cercanas a los 3600 msnm (INE, 2001), se distribuyen en zonas desérticas, selvas (*Rhipsalis* spp.) y hasta en zonas montañosas como los Andes (*Tephrocactus* spp.). Las cactáceas se caracterizan principalmente por su succulencia; cuentan con órganos especializados llamados aréolas que son las productoras de tallos, hojas, espinas y frutos. Asimismo, poseen diversas formas en su hábito de crecimiento tales como columnar, candelabros, raquetas, esféricas, etc., y pueden medir desde unos cuantos centímetros hasta doce metros de alto y un metro o más de diámetro (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

Son precisamente sus formas que a veces resultan caprichosas y hasta monstruosas lo que ha elevado su valor como plantas ornamentales, llegan a cotizarse en precios muy elevados sobre todo en países europeos, Norteamérica y Japón (INE, 2001), con lo que se ha provocado una grave problemática en cuanto a su conservación ya que sus poblaciones están siendo sistemáticamente saqueadas (Franco, 1997). Sumado a cambios bruscos en el suelo por el uso extensivo agrícola o la creación de nuevas carreteras, la construcción de presas, vías para cables de electricidad y teléfono, urbanización, ganadería y los drásticos cambios ambientales, han puesto en grave peligro la supervivencia de muchas especies (Sotomayor, 1999).

En México, el uso de las cactáceas es y ha sido muy importante y se encuentran ligadas al desarrollo y a la cultura de nuestro país, una especie del género *Opuntia* está representada en el escudo nacional, el cual es utilizado en documentos oficiales, monedas y billetes. Las plantas del género *Opuntia* fueron utilizadas desde tiempos prehispánicos como sustrato para cultivar un insecto del género *Dactyloplus* spp., conocido como “cochinilla del nopal” utilizado para obtener un tinte. Varias especies de cactáceas son consideradas como fuente de alimento por sus frutos y tallos, entre los que se conocen las tunas y nopalitos (*Opuntia ficus-indica*) o biznagas (*Ferocactus pilosus*). *Lophophora williamsii* o “peyote” que por sus propiedades alucinógenas se usa en ritos religiosos por varios grupos étnicos como los huicholes, tarahumaras, coras y tepehuanes (Becerra, 2000), aunque en grandes cantidades es considerado tóxico. Determinadas fibras de los *Cephalocereus* spp. o *Pilosocereus* spp. se utilizan para tejer o rellenar cojines. Otras cactáceas sirven como leña o como madera para la fabricación de muebles (*Trichocereus pasacana*, *Opuntia alcaches*). Incluso se han utilizado las espinas como anzuelos de pesca (*Mammillaria* spp.). Los indios Cahita utilizan el *Pachycereus pecten-aboriginum* como peine e incluso se les ha utilizado como amuletos (*Epithelantha micromeris*) (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

El uso indiscriminado de las cactáceas ha amenazado su sobrevivencia en estado silvestre y ha motivado que en nuestro país se les proteja desde 1930 (INE, 2001), fecha en que se firmó un reglamento para la recolección y explotación de plantas, frutos y semillas de cactáceas; recientemente se emitió la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. En esta norma están incluidas un número importante de las especies de cactáceas que existen en nuestro país (284 especies), lo que es concordante con otras leyes y reglamentos internacionales, como la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies en Peligro de Extinción de Fauna y Flora Silvestres (CITES) o la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) que manejan diferentes categorías y estados de riesgo de acuerdo a las condiciones en que se encuentren las especies y a las que nuestro país está adherido, esto permite regular el comercio y proteger las plantas silvestres así como estimular el conocimiento de aquellas especies que se encuentran amenazadas (Franco, 1994; Oldfield, 1997; Lucas y Synge, 2007). En este sentido, la familia entera de cactáceas se encuentra en el apéndice II de la CITES y en la lista roja de la UICN (2006) se incluyen 66 especies de cactáceas mexicanas.

A este respecto, un estudio reciente (Arias *et al.*, 2005) ha permitido comparar y homologar los nombres de las cactáceas mexicanas incluidas en las tres referencias de especies protegidas actualizando los datos y sirviendo de referencia para evitar confusiones. Ver Anexo 1.

Como resultado de dicha protección y gracias a los acuerdos internacionales se ha logrado aplicar la ley y llevar a cabo algunos decomisos tendientes a desanimar la práctica del saqueo, la cual aumenta considerablemente debido a que producir una cactácea desde semilla hasta su etapa adulta cuando puede ser puesto a la venta puede tardar hasta un año y medio en el mejor de los casos (Orellana, 1998), lo que provoca conductas de saqueo de los mismos pobladores y de coleccionistas profesionales y aficionados. El saqueo se ha calculado en más de 100,000 ejemplares al año; de 1984 a 1986 se reportaron exportaciones de cactáceas hacia los E.U. de 800 mil cactáceas, aunque la mayoría colectados del medio silvestre (Franco, 1997). En marzo del 2000 se recuperaron 927 ejemplares de cactáceas que habían sido saqueados de nuestro país y que intentaban ser introducidos a Holanda. Entre las especies recuperadas se encontraban 82 ejemplares de *A. bravoanus*, recientemente descrita, y que una vez regresados a nuestro país se enviaron a Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) autorizadas por el Instituto Nacional de Ecología (PROFEPA, 2000).

Estudios más completos estiman que entre 1998 y 2001, cerca de 100 000 plantas suculentas, en su mayoría cactáceas, fueron colectadas de poblaciones silvestres (Robbins y Bárcenas (2003) en Hernández, 2006).

La pérdida de biodiversidad en nuestro país se ha agravado en los últimos años (WWF, 2003), en gran medida por la propia actividad del hombre (deforestación, actividades ganaderas, actividades agrícolas, construcción de carreteras, contaminación, etc.) que sumada a las propias presiones ecológicas como la erosión, inundaciones, cambios en los ciclos hidrológicos han provocado un desequilibrio en las poblaciones silvestres y la desaparición de innumerables especies.

Se calcula que existen alrededor de 250,000 especies de plantas vasculares en el mundo, de las cuales 60,000 se habrán extinguido o estarán en peligro de extinción al llegar el año 2050 (Raven, 1986). En nuestro país, de las casi 30,000 especies que existen (Rzedowski, 1991) el 15% se considera en peligro de extinción.

Existe en nuestro país una zona conocida como el Desierto Chihuahuense que comprende una superficie aproximada de 630,000 kilómetros cuadrados compartidos con los Estados Unidos de Norteamérica; en México se extiende a través de San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León,

Zacatecas, Durango, Coahuila y Chihuahua (Gatica-Colima, 2003). Está flanqueado por montañas que impiden el paso de la humedad del mar. Lo conforman planicies aluviales, laderas y montañas dispersas; casi el 80% de sus suelos son calcáreos. Se considera una de las zonas áridas y semiáridas más grandes del mundo y la tercera con mayor diversidad biológica en el mundo después de Namib-Karoo de África y el Gran Desierto Arenoso de Australia. Aquí se encuentran especies animales y vegetales únicas (endémicas) que no se encuentran en ningún otro lugar (Hernández, 2006; PRONATURA, 2003).

En esta zona crecen aproximadamente 318 especies de cactáceas agrupadas en 40 géneros diferentes (Hernández, 2006), lo que representa aproximadamente el 20% de las que hay en el mundo y se siguen descubriendo nuevas especies únicas; entre otras *Ariocarpus bravoanus* que es una de las especies más restringidas geográficamente (Hernández y Barcenás, 1996). Otras especies como *A. retusus*; *A. agavoides*; *Strombocactus disciformis* o *Aztekium hintonii* tienen prohibiciones totales de comercio por lo amenazado de sus poblaciones. Las cactáceas del Desierto Chihuahuense están siendo saqueadas de manera indiscriminada y si no se toman medidas inmediatas se corre el riesgo de perder especies y alterar el delicado equilibrio de la zona. Una gran variedad de habitantes del desierto

desde colibríes hasta los leones de montaña dependen de las cactáceas, perderlos puede ser tan impactante para el ecosistema como lo sería cortar totalmente un bosque.

En el presente estudio se describe la regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus* a partir de semillas, tubérculos y brotes, como una alternativa para incrementar el conocimiento de esta especie, así como contribuir a su conservación, a través de su regeneración a partir de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

I.1.- DESCRIPCIÓN DE *Ariocarpus bravoanus* Hernández y Anderson.

Clasificación Botánica

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Embryophyta
SUBDIVISIÓN	Angiospermae
CLASE	Dicotyledonae
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Cactoideae
TRIBU	Cacteae
SUBTRIBU	Thelocactinae
LÍNEA	Strombocacti
GÉNERO	<i>Ariocarpus</i>
SUBGÉNERO	<i>Roseocactus</i>
ESPECIE	<i>Ariocarpus bravoanus</i> Hernández y Anderson

Se reconocen dos subespecies: subsp. *bravoanus*

subsp. *hintonii* (Stuppy & N.P.Taylor) E.F.

Anderson & W.A. Fitz Maurice

Se conoce con el nombre común de Biznaga peyotillo

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA (basada en descripción original Hernández y Anderson, 1992).

Planta arrosetada, sésil. **Tallo** reducido, sin espinas, casi enterrado (Fig. 1), con una marcada depresión central, de 6 – 8.5 cm de diámetro, con un extenso sistema mucilaginoso, tubérculos ascendentes color verde olivo o verde gris, con papilas irregulares en el ápice, algunas veces las papilas se encuentran formando uno o dos surcos laterales. **Aréolas** centrales de 8 – 14 mm. **Flores** de 2.5 cm de longitud, filamentos blancos, anteras amarillas, pistilo blanco. **Semillas** de 1-1.5 x 0.7-1.5 mm (Fig. 2), piriformes o sacciformes, negras, tuberculadas.

HABITAT.

Se localiza en la región del Desierto Chihuahuense en el estado de San Luis Potosí, México, en el área de Huizache a una altitud de 1500 msnm (Hernández y Barcenás, 1996); considerada como zona de desierto caliente, en suelos calcáreos, clasificada como matorral desértico micrófilo (Rzedowsky, 1978; Hernández, 2006), y se encuentra asociada con plantas de *Agave* spp., *Hechtia* spp., *Yucca* spp. y *Calliandra eriophylla* (Hernández y Anderson, 1992).



Fig. 1.- Planta adulta de *Ariocarpus bravoanus*. (Tomado de Bradleya, Hernández y Anderson, 1992).

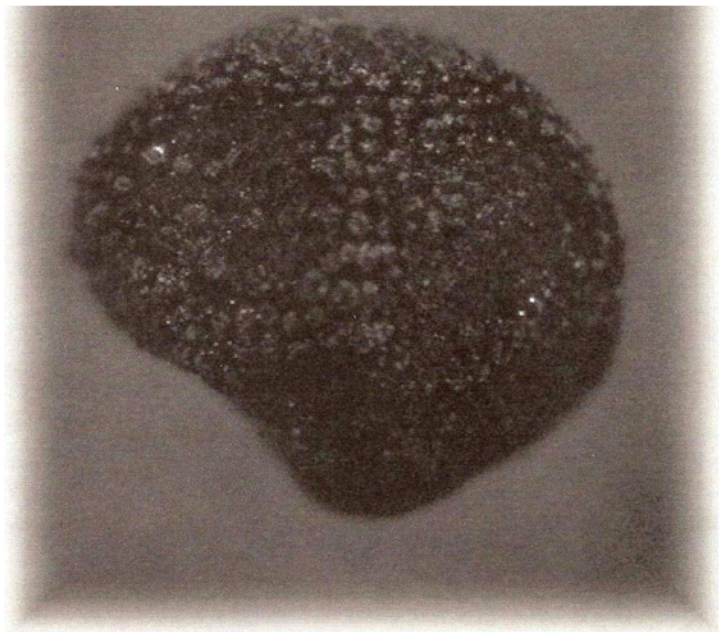


Fig. 2.- Semilla de *Ariocarpus bravoanus* mostrando ornamentaciones. Tamaño máximo de 1-1.5 x 0.7-1.5 mm, coloración negra.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Las plantas del género *Ariocarpus* que comprende 6 especies conocidas son todas endémicas de México a excepción de *A. fissuratus* que también se encuentra en los Estados Unidos (Mitich y Bruhn, 1977; Peterson, 1993). *A. bravoanus* está limitada a una localidad en el estado de San Luis Potosí (Fig. 3) en la región conocida como Huizache, en poblaciones pequeñas de escasos individuos. El área de distribución es de aproximadamente 6 km², con una ocupación menor a 2 hectáreas, con una densidad de 2500 plantas adultas (Sotomayor, 1999). La localidad fue bien conocida por los colectores y ha sufrido saqueos continuos. Sin embargo, estudios recientes de campo han mostrado que dichas poblaciones han empezado a recuperarse (Sotomayor *et al.*, 2001).

USOS.

Las especies de *Ariocarpus* son consideradas como plantas de un alto valor ornamental y por ello en gran medida son colectadas a partir de sus poblaciones silvestres (Peterson, 1993). Adicionalmente pueden tener un valor medicinal y cultural (UICN, 2006), debido a que los Tarahumaras llaman a las otras especies del género “peyotes” que los utilizan de manera ceremonial por los efectos de alcaloides psicoactivos como la ordenina.

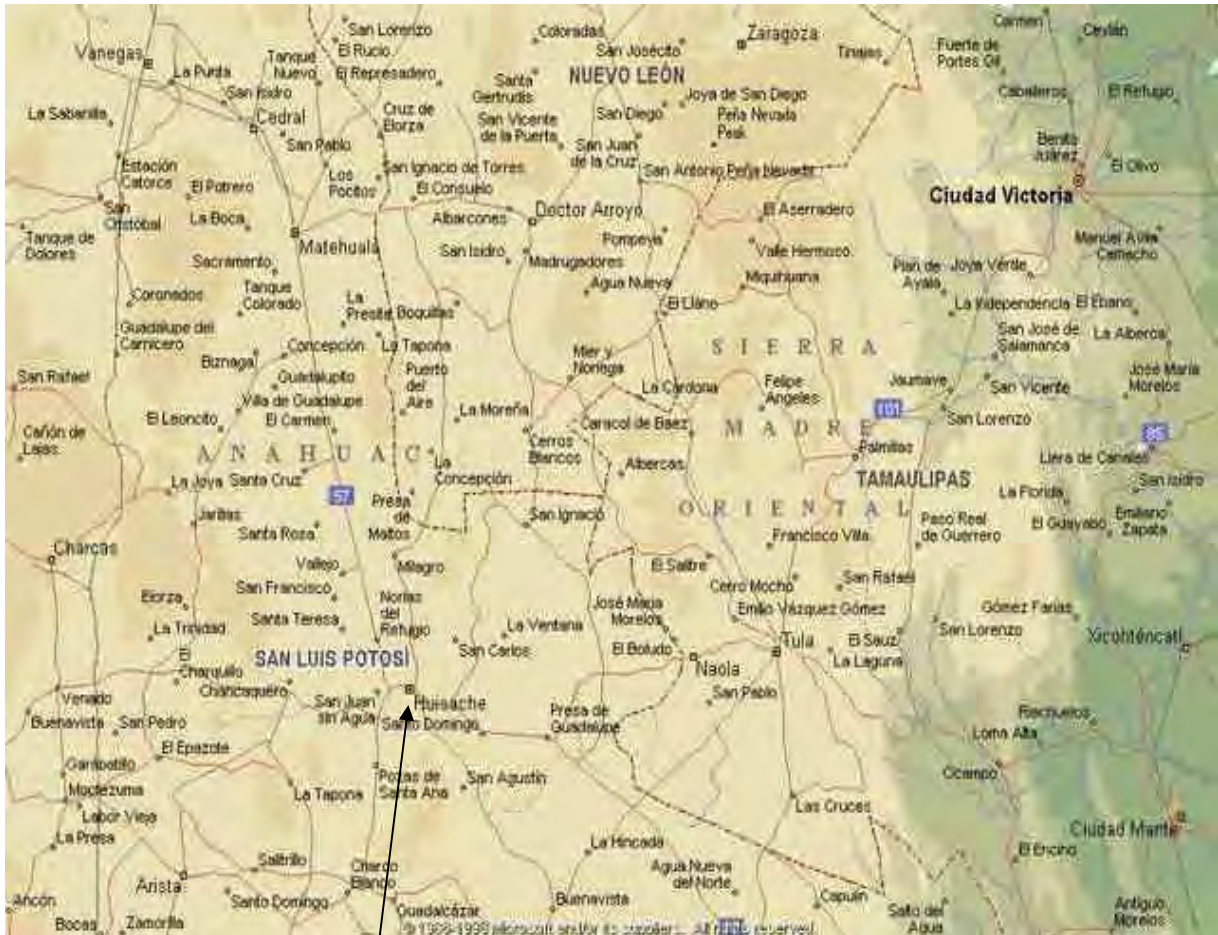


Fig. 3.- Zona de distribución geográfica de *Ariocarpus bravoanus* Hernández y Anderson en la República Mexicana –ver flecha (Encarta, 2002).

SITUACIÓN ACTUAL.

No obstante que *Ariocarpus bravoanus* es una especie en peligro de extinción y está sujeta a protección especial por organismos nacionales (SEMARNAT, PROFEPA) e internacionales (CITES, 2005; UICN, 2006) el alcance de dicha protección se ve rebasado por la gente que promueve o realiza el saqueo deliberado de las poblaciones silvestres. La mayor amenaza para la especie son los saqueos ilegales y las colectas de las poblaciones indígenas (UICN, 2006). Las estrategias de conservación recomendadas incluyen políticas y legislaciones más estrictas; estudios de poblaciones, ecología, biología, hábitat, mantenimiento, conservación y áreas protegidas entre otras.

I.2.-MÉTODOS DE PROPAGACIÓN.

Los métodos tradicionales de propagación aplicados a las cactáceas han demostrado su efectividad (Reyes, 1994; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995), utilizándose sobre todo la siembra directa de semillas (*Opuntia*), la reproducción por vástagos o retoños (*Echinopsis*), por estacas, por injertos que pueden ser intergénicos o interespecíficos entre los más conocidos pero con una gran limitante: el tiempo. Estos métodos tradicionales pueden tardar mucho en la propagación, sobre todo de aquellas especies raras y de alto valor comercial que enfrentan un mercado creciente y demandante, lo que motiva a

buscar nuevas alternativas para su propagación y conservación (Orellana, 1993).

Una de las alternativas más eficaces en los últimos 30 años, ha sido la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos que han probado ser una herramienta eficiente en la propagación de miles de plantas en un período de tiempo relativamente corto (Fay y Gratton, 1992)

Estas técnicas han permitido un gran avance en el conocimiento básico de las plantas y han repercutido de manera directa tanto en aspectos de investigación aplicada como en aspectos comerciales en industrias químico-farmacéutica, agrícola y hortícola entre otras tantas aplicaciones llegando a cubrir las necesidades de la población. La aplicación de estas técnicas se ha centrado en gran medida en la producción de plantas ornamentales, llegando a constituir el 74 % de plantas producidas mediante dichas técnicas (Kitto, 1997).

El cultivo de tejidos vegetales consiste básicamente en aislar una parte de la planta y darle los suministros necesarios para su crecimiento y desarrollo hasta obtener una planta completa. El material vegetativo inicial para el cultivo puede obtenerse por germinación *in vitro* de semillas; por corte y desinfección de ápices o partes de tallos con yemas axilares de una planta

adulta para lograr la regeneración de nuevos individuos (Soltero, 1999). Sin embargo, la recomendación general es cultivar material vegetativo preferentemente inmaduro y que presente estructuras meristemáticas preformadas, ya que estas estructuras serán más fáciles para inducir su morfogénesis (George y Sherrington, 1984). El origen del material vegetativo es importante porque de ello dependerá el grado de variabilidad genética, lo cual determinará el fin de los cultivos que se logren, es decir, serán de importancia hortícola o de importancia para efectos de conservación de la especie.

I.3.-TECNICAS DE MICROPROPAGACIÓN.

Se considera que existen tres vías de regeneración de plantas *in vitro*:

- a) Por desarrollo de yemas preformadas.- Significa continuar el desarrollo de meristemas, yemas, ápices y su posterior enraizamiento.
- b) Organogénesis.- Comúnmente es el desarrollo de (órganos) brotes, su posterior individualización y enraizamiento.
- c) Embriogénesis somática.- Es la formación de embriones adventicios originados de forma asexual. Los embriones somáticos son semejantes estructural y bioquímicamente a los embriones cigóticos.

La organogénesis y la embriogénesis pueden ocurrir vía indirecta, es decir con mediación de una fase de callo en el que ocurren divisiones celulares que hacen posible la redeterminación genética de las células que regenerarán nuevos individuos; o bien vía directa, sin mediación de callo, directamente de células competentes ya presentes en el explante y que solo requerían del estímulo inductor de las condiciones *in vitro*. La micropropagación vía organogénesis usando yemas axilares es conocido como el método más confiable, repetible, sin alteraciones genéticas y libre de agentes contaminantes (Pérez-Ponce, 1998).

Murashige (1974) propuso 3 fases para la micropropagación aunque en la actualidad se distinguen y reconocen 5 fases:

- (0) fase preparativa (Debergh y Maene, 1981), en la que se obtiene el material inicial de estudio y se prepara para su cultivo
- (1) establecimiento en condiciones asépticas,
- (2) proliferación de tejidos y obtención de respuestas múltiples,
- (3) inducción de raíces en brotes y tubérculos,
- (4) aclimatización (Krikorian, 1991) para su establecimiento en suelo.

En cada una de estas fases se pueden mantener los cultivos realizando subcultivos hasta donde la especie lo permita involucrando lo que se conoce

como edad *in vitro* y que puede cambiar la reacción de los explantes. A mayor número de subcultivos, puede ocurrir un incremento en la formación de yemas adventicias y con ello un mayor número de brotes por explante (Debergh y Maene, 1981; Rancillac *et al.*, 1987). Debe considerarse que un gran número de subcultivos sobre todo en presencia de altas concentraciones de reguladores de crecimiento puede provocar variaciones somaclonales, cambios genéticos, ausencia o poca rizogénesis e incluso deformaciones, por lo que no se recomienda un número ilimitado de subcultivos debiendo renovar los explantes cada cierto número de subcultivos (Orellana *et al.*, 1991; Fay y Gratton, 1992), de acuerdo a la especie y al tipo de explante de que se trate, lo que también determinará los requerimientos físico-químicos para asegurar el desarrollo de los cultivos.

El éxito de estas técnicas permite obtener miles de plantas a partir de un pequeño explante del tejido original. Para lograr dicho éxito se deben superar limitaciones propias de cada especie, tales como lento desarrollo, falta de respuesta morfogénica, oxidación, dificultades para el enraizamiento, entre otros, lo cual retarda el éxito de la propagación a través del uso de estas técnicas en la gran mayoría de plantas. Sin embargo, su aplicación en especies en peligro o amenazadas es prioritaria si consideramos el mismo status de algunas especies en peligro de extinción (Hubstenberger *et al.*, 1992; Bonnes

et al., 1993), tales como orquídeas (*Oncidium*, *Bletia*); coníferas (*Picea chihuahuana*); cactáceas *Cephalocereus senilis* (Corona y Yáñez, 1984, *Mammillaria san-angelensis* (Martínez Vázquez y Rubluo, 1989), *Mammillaria huitzilopochtli* (Rubluo *et al.*, 1990), *Aztekium ritteri* (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992; Calderón, 2007), 21 especies de cactáceas mexicanas (Pérez-Molphe *et al.*, 1998), *Turbinicarpus laui* (Mata *et al.*, 2001). En el caso de especies del género *Ariocarpus* también se han reportado trabajos que utilizan dichas técnicas, como en *Ariocarpus trigonus* (Starling y Hutson, 1984); *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992; Olguin, 1994); *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

I.4.-REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Muchas de las respuestas morfogénicas obtenidas a partir del cultivo de tejidos vegetales son mediadas por reguladores de crecimiento o fitohormonas. Son moléculas orgánicas que se producen naturalmente en la planta y que se han sintetizado químicamente facilitando su uso; se encargan de iniciar, terminar, acelerar o desacelerar los procesos vitales de las plantas. Sus efectos los producen a bajas concentraciones y los más utilizados son: auxinas y citocininas, cada uno con su estructura particular y que de acuerdo a la concentración usada tienen efecto en las plantas ya sea inhibiendo, promoviendo o modificando algún proceso fisiológico (Bidwell, 1993;

Salisbury y Ross, 1994). Dichos reguladores interactúan molecularmente con los sistemas vegetales dando por resultado una respuesta fisiológica o bioquímica particular (Moore, 1979).

AUXINAS.

En el caso de las auxinas tienen efectos en la relajación de la pared celular, en el crecimiento, en la síntesis de RNA y de las proteínas, en el metabolismo, en el transporte de nutrientes, entre otros., La síntesis de auxinas a partir del triptófano se lleva a cabo en ápices en desarrollo, en las hojas en expansión y en tejidos con actividad meristemática (Bidwell, 1993; Salisbury y Ross, 1994).

El uso de las auxinas (Street y Shillito, 1977) va en aumento ya que se ha comprobado su eficacia en los resultados buscados en el cultivo *in vitro* (Hartmann y Kester, 1992; Klopfenstein y Kerl, 1995; Braz de Oliveira y Pires Da Silva, 2003). Roy *et al.* (1975) señalaron que las auxinas endógenas aumentan la capacidad de utilizar carbohidratos en la zona de formación de raíces; García y Carballo (1987) propagaron violeta africana y utilizaron AIA y KIN; Villegas y Barrientos (1987) utilizaron AIB mas fluoroglucinol lo que les dio por resultado 100% de enraizamiento; Martínez (1991) utilizó BA, GA3 y ANA en especies de orquídeas en peligro de extinción logrando su

enraizamiento; Hartmann y Kester (1992) reportaron que las auxinas se han utilizado para aumentar el porcentaje de enraizamiento porque aceleran la iniciación radical además de aumentar el número y calidad de las mismas en estacas; Villanueva *et al.* (1998) con el uso de auxinas comerciales lograron el enraizamiento de estacas apicales de 4 cm de largo; Marks y Simpson (2000) reportan el uso de AIB para inducir el enraizamiento; Rodríguez *et al.* (2001) utilizaron ANA en altas concentraciones (1, 5 y 10 mg/l) para propiciar altos porcentajes de enraizamiento de vástagos de *Gleditsia amorphoides*; Castillo de Meier *et al.* (2002) aplicaron AIB durante 15 días y lograron enraizamiento de vástagos de *Prosopis alba* con porcentajes de hasta 90%.

En Cactáceas (ver Anexo 2) las auxinas han sido utilizadas también con éxito: Corneanu (1994) utilizó AIA y KIN para inducir enraizamiento en *Aztekium ritteri* y obtuvo 60% de éxito en plántulas de 3-4 mm de diámetro; Pérez Molphe *et al.* (1998) utilizaron AIA y BA en el enraizamiento de 21 especies de cactáceas mexicanas; Garrido (1998) utilizando KIN y ANA obtuvo enraizamiento a los 35 días en brotes de *Rhipsalidopsis rosea*, *Chamaecereus silvestrii* y *Epiphyllum crenatum* y en medio fresco con ANA obtuvo respuestas en 15 días; Arias (2001) utilizó tres auxinas (ANA, AIA y AIB) para inducir enraizamiento en brotes axilares de *Peleciphora strobiliformis* usándolas en forma separada y en bajas concentraciones;

Santos-Díaz *et al.* (2003) utilizaron BA para inducir la germinación de semillas en *Pellecyphora aselliformis*; Moebius-Goldammer *et al.* (2003) utilizaron BA + ANA para inducir formación de brotes en *Ariocarpus kotschoubeyanus*; Dávila-Figueroa *et al.* (2005) utilizaron BA para la activación de aréolas y lograr respuestas de brotación múltiple en 8 especies de *Turbinicarpus* y para lograr respuestas de enraizamiento utilizaron AIB; Ramírez-Malagon *et al.* (2007) utilizaron AIA + KIN para la proliferación de brotes en 10 especies de *Mammillaria*.

No siempre el uso de las auxinas es necesario para obtener enraizamiento, su formación depende del tipo de planta y de su estado de desarrollo. Mata *et al.* (2001) no utilizaron auxinas para el enraizamiento de *Turbinicarpus laui* aunque para el desarrollo de brotes adventicios si usaron BA y ANA; Saucedo (2006) obtuvo enraizamiento sin el uso de auxinas en tres especies de cactáceas. Sin embargo, se ha comprobado que raíces adventicias pueden crecer de cada tipo de explante (raíz, hoja, tallo) especialmente cuando el medio de cultivo es enriquecido con ANA ó AIB (Berardi *et al.*, 1994).

CITOCININAS.

Las citocininas son derivados de la adenina, y se forman en las raíces siendo transportadas por el xilema hacia las hojas y los tallos y pueden usarse para inhibir el desarrollo de raíces laterales, romper la latencia de las yemas axilares, promover la organogénesis en los callos, promover el desarrollo de cloroplastos, aumentar la altura de los retoños, aumentar la longitud de los entrenudos, evitar la senescencia de las hojas, inducir la floración, entre otras (Bidwell, 1993; Salisbury y Ross, 1994; Tiukavin y Valderrama, 2003). Para intentar obtener una respuesta con la aplicación de reguladores de crecimiento un mayor número de investigaciones con éxito han utilizado concentraciones de auxinas en 0-3 mg/l y de citocininas 0-2 mg/l y se ha observado que en ocasiones a mayor concentración menor tiempo de respuesta; las citocininas tienen un efecto estimulante en el contenido auxinico estimulando su síntesis, el uso de una mayor concentración también disminuye la aparición de callo en algunas especies (Goyal y Arya, 1984). Sin embargo, no siempre es así, y la aplicación de altas concentraciones promueve la formación de callo y la aparición de cambios genéticos no deseados. La recomendación general ha sido evitar este tipo de cultivo (callo) y establecer cultivos más estables, por ejemplo, cultivo de embriones, de ápices y de yemas axilares, cuando el enfoque del estudio sea éste. La condición de estabilidad genética en las

plantas regeneradas es particularmente importante en los estudios de conservación (Fay y Gratton, 1992).

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, se han venido realizando esfuerzos por regenerar *in vitro* *Ariocarpus bravoanus* habiéndose logrado la formación de brotes y callo pero sin haber obtenido respuestas de enraizamiento, por lo que para el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos.

I.5.- OBJETIVOS.

General.

Determinar las condiciones para la regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus*.

Particulares.

- 1.- Obtener germinación a partir de semillas para establecer cultivos *in vitro*
- 2.- Explorar el potencial morfogénético de tubérculos de *A. bravoanus*.
- 3.- Promover respuestas de enraizamiento *in vitro* de tubérculos y brotes (rosetas) de *A. bravoanus* por medio de tratamiento con distintas auxinas.
- 4.- Establecer las plántulas de *A. bravoanus* en suelo bajo condiciones de invernadero.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS.

GERMINACIÓN.

En un primer ensayo un lote de 15 semillas (Fig. 2) proporcionadas por el Dr. Héctor Hernández, IB-UNAM obtenidas en la población original a 1540 msnm, fueron sembradas en medio Murashige y Skoog (1962) al 50 % de su concentración (MS50), sacarosa 30 g/l. Las semillas fueron lavadas en detergente (Soilax© al 2 %) 15 minutos, enjuagadas con agua destilada, escarificadas con ácido sulfúrico (30 seg) y desinfectadas 30 minutos con hipoclorito de sodio (6 %) y bajo condiciones asépticas fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada esterilizada.

Para todos los medios de cultivo, previo a la adición del gelificante, el pH se ajustó a 5.7 con NaOH y HCl 0.1N y posteriormente fue esterilizado en autoclave a 1.5 kg/cm² por 15 minutos a 121°C; los cultivos fueron incubados a 25± 2°C, fotoperíodo 16 h, luz blanca fría fluorescente 50µMol·m⁻¹·s⁻¹.

CULTIVO DE TUBÉRCULOS.

A partir de las plántulas obtenidas, se disectaron sus tubérculos, así como fragmentos del callo (Fig. 3) y se subcultivaron en medio MS50 adicionado con sacarosa (30 g/l) en distintos tratamientos con la combinación de dos juegos de reguladores del crecimiento BAP/ANA Y KIN/2,4-D

(Tabla 2) para promover la formación de brotes. El periodo de inducción fue de 8 semanas. Posteriormente los brotes obtenidos se individualizaron y se subcultivaron al mismo medio pero sin reguladores del crecimiento.

Tabla 2.- Cultivo de tubérculos. Combinaciones de reguladores de crecimiento aplicadas 8 semanas a **tubérculos** de *A. bravoanus* en medio MS50, sacarosa 30 g/l, 8.5 g de bacto-agar (n=3 tubérculos por frasco).

BAP/ANA KIN/2,4-D mg/l	0	1	3	5
0	0/0	1/0	3/0	5/0
0.1	0/0.1	1/0.1	3/0.1	5/0.1
0.5	0/0.5	1/0.5	3/0.5	5/0.5

ENRAIZAMIENTO DE BROTES.

Brotos consolidados (11 brotes por tratamiento) fueron utilizados para inducir el desarrollo de raíces adventicias, para lo cual fueron subcultivados (Tabla 3) y permanecieron durante 4 semanas en medio MS50 adicionado con AIB y ANA (0.5 mg/l) en forma separada, además se ensayaron dos tipos de agar para cada tratamiento: gel-rite (4.5 g/l) y agar bacteriológico (10 g/l). Posteriormente se mantuvieron los cultivos en medio fresco MS50 sin reguladores del crecimiento.

Tabla 3.- Enraizamiento de brotes. Tratamiento con reguladores de crecimiento aplicados a **brotes** de *A. bravoanus* en medio MS50, sacarosa 30 g/l y dos tipos de gelificantes. n=11 (1 tubérculo por frasco)

REGULADOR/ GEL	BACTO-AGAR (10 g/l)	GEL-RITE (4.5 g/l)
AIB (0.5 mg/l)	11	11
ANA (0.5 mg/l)	11	11
TOTAL	22	22

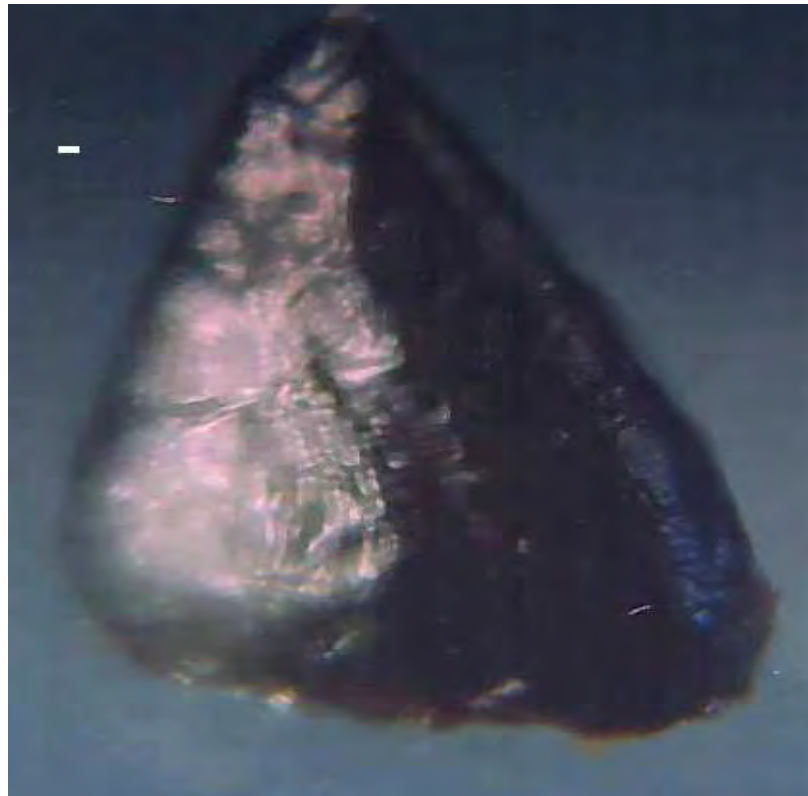


Fig. 3.- Tubérculo disectado de *A. bravoanus* antes de su cultivo.

ENRAIZAMIENTO DE TUBÉRCULOS.

Con el fin de promover enraizamiento, se disectaron tubérculos de entre 0.5 a 1.5 cm de longitud los cuales fueron sembrados en medio de inducción MS50 adicionado con sacarosa 30 g/l y 8.5 g de agar bacteriológico conjuntamente con las posibles combinaciones de AIB (0, 0.1, 0.2, 1, 2 mg/l) y ANA (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/l). Se sembraron 3 tubérculos por frasco, un total de 25 frascos por tratamiento (Tabla 4). Se mantuvieron los cultivos durante ocho semanas.

Tabla 4.- Tratamiento con reguladores de crecimiento aplicados en forma conjunta a **tubérculos** de *A. bravoanus* durante ocho semanas en medio MS50, sacarosa 30 g/l, bacto-agar 8.5 g/l, n=75 (3 tubérculos por frasco).

	AIB mg/l	ANA mg/l
TESTIGO	0	0
1	0.1	0.1
2	0.2	0.05
3	2	0.5
4	1	0.1
5	1	1

PERIODO DE MANIFESTACIÓN.

Pasado el período de inducción, el material biológico (tubérculos y brotes) se subcultivó a medio fresco MS50, sacarosa 30 g/l y 9 g de agar bacteriológico y se registraron resultados durante las siguientes doce semanas. Posteriormente los cultivos se dejaron envejecer (deshidratar) hasta que el

medio se agotara para permitir que los efectos del período de inducción se manifestaran.

ACLIMATIZACIÓN.

De los tubérculos enraizados se seleccionaron los que presentaron mejor respuesta (raíces vigorosas y bien desarrolladas) para su siembra y adaptación en suelo. Se empleó una mezcla de suelo tierra negra, Sphagnum y vermiculita (1:1:1), esterilizada en horno de microondas por 20 minutos. Se aplicó un fungicida (captan 3 g/l) a las raíces como tratamiento fungicida preventivo y Furadan© como insecticida haciendo una segunda aplicación a los 15 días. Se aplicaron riegos cada semana. Los tubérculos se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C) por ocho semanas en un lugar protegido; posteriormente se introdujeron a un invernadero.

III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

GERMINACIÓN.

Las semillas que fueron sembradas tenían un tiempo de colecta menor a un año. Sólo 13 (86.6 %) de las 15 semillas germinaron dentro de los primeros 25 días. Las primeras 3 semillas en germinar (Fig. 4) lo hicieron a los 10 días y las últimas a los 25 días. En todas ellas, primero emergió el ápice de la radícula, creció el embrión y salió de la testa, sin embargo su posterior desarrollo fue inhibido y las plántulas no elongaron su raíz. Su desarrollo fue lento y sin formar raíces. Fue hasta las 16-20 semanas de cultivo cuando habían formado callo y los brotes presentaban de 2 a 3 tubérculos, momento en el que se decidió disectar éstos y someterlos a tratamientos que pudieran promover el desarrollo de más brotes.

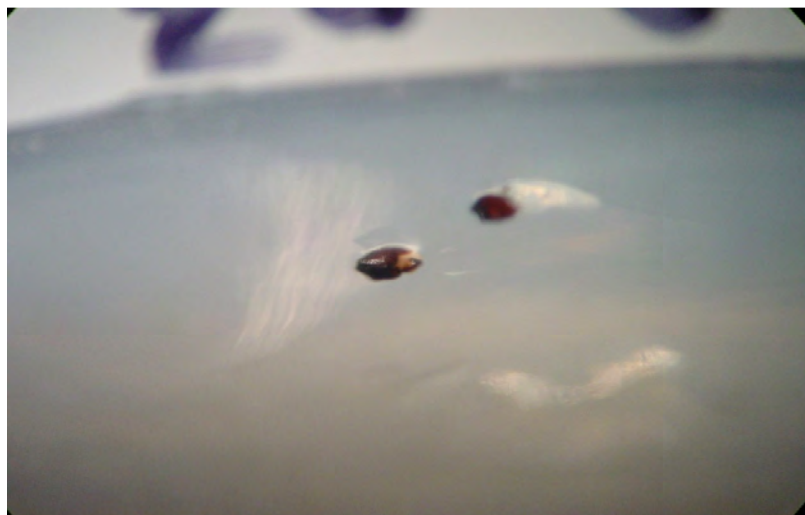


Fig. 4.- Germinación de semillas de *A. bravoanus* (rompimiento de testa).

Moss (1993) realizó ensayos para la regeneración *in vivo* de semillas de *Ariocarpus* y encontró que las semillas recién colectadas germinaban dentro de los primeros 10 días, en tanto que Moretón (1992) señaló que podían tardar entre 10-15 días. Mata *et al.* (2001) reportaron para *Turbinicarpus laui*, una germinación de 41.7 % en MS y 28 % en MS50 al cabo de 5 semanas; el mismo medio MS50 para *A. retusus* también fue reportado que rindió un alto porcentaje de germinación (33-63.8 %) pero con resultados registrados después de 50 días (Olguin, 1994). Para *A. kotschoubeyanus* se reportó un 70 % de germinación a los 50 días en MS50 encontrándose las primeras respuestas a los 8 días. Al cabo de 13-15 semanas después de la germinación las plántulas habían desarrollado 1-2 tubérculos (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003). Saucedo (2006) utilizó medio MS50 adicionado con BAP/ANA y obtuvo 32 % de germinación en 7 semanas en su estudio con *Cephalocereus apicicephalium* y para *Echinocereus pentaloophus* obtuvo 98 %.

La germinación gradual en las cactáceas parece ser una estrategia adaptativa a condiciones cambiantes del medio, así los estudios *in vitro* revelan que las más altas frecuencias de germinación se encuentran entre las primeras tres semanas para *A. kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003); *A. retusus* (Olguin, 1994); *Mediocactus coccineus* (Infante, 1992) y *Turbinicarpus laui* (Mata *et al.*, 2001). En el caso de *A. bravoanus* se

requirieron de 4-5 semanas lo que estaría indicando una primera diferencia en cuanto al comportamiento de la especie.

Para *A. bravoanus* a las 18-20 semanas las plántulas tenían 2-3 tubérculos (un proceso todavía más lento que en *A. kotschoubeyanus*), lo cual indica el tiempo de desarrollo de las especies de este género y hace evidente que los procesos de esta especie podrían ser todavía más lentos en la naturaleza. Estos conocimientos generados en el presente estudio resaltan la necesidad de un mayor conocimiento de la especie ya que se contrasta con la necesidad de contar con un procedimiento que pudiera acelerar el crecimiento de los individuos con la obtención de un mayor número de brotes y tubérculos.

CULTIVO DE TUBÉRCULOS.

Del ensayo para obtener brotación múltiple, al término de ocho semanas los tubérculos mostraron hiperhidratación en la base y una tonalidad verde claro en los tejidos, con aspecto vítreo. Se obtuvo un total de 78 tubérculos y 1 brote múltiple (Tabla 5) del lote en que se utilizó BAP/ANA; en el tratamiento con 1 mg/l de ANA y en ausencia de BAP se generaron 16 tubérculos y en el tratamiento con 0.1 mg/l de BAP + 1 mg/l de ANA 37 tubérculos.

En el lote en que se utilizó KIN/2,4-D se generó un total de 101 tubérculos: el mayor número en 0.5 mg/l de KIN + 1 mg/l de 2,4-D y en el

lote testigo con 35 y 24 tubérculos respectivamente. Respecto a los brotes generados sólo se formaron 11.

El hecho de que los tubérculos proliferaran aun en el control, indicó que los tejidos inmaduros tuvieron células que expresaron plasticidad morfogénica a través de una competencia organogénica. Esta capacidad no es desconocida; se ha reportado la formación de brotes en los cultivos control de: *Mammillaria san-angelensis* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989) y por vía indirecta en *Mammillaria prolifera* (Minocha y Mehra, 1974).

Tabla 5.- Desarrollo de tubérculos { } y de brotes en MS50, sacarosa 30 g/l, BAP/ANA y KIN/2,4-D (negritas). Resultados a las 8 semanas de iniciados los cultivos.

BAP/ANA KIN/2,4-D mg/l	0	1	3	5
0	{0}-0 {24}-0	{16}-0 {5}-0	{6}-1 {11}-0	{0}-0 {2}-1
0.1	{0}-0 {0}-0	{37}-0 {9}-6	{1}-0 {0}-0	{0}-0 {3}-2
0.5	{5}-0 {10}-0	{0}-0 {35}-2	{0}-0 {2}-0	{13}-0 {0}-0

Después de las ocho semanas de haber individualizado los tubérculos, se observó mayor consolidación de los tejidos en su base, cambiando su

coloración a un verde oscuro; proliferó callo esponjoso de color rosado en todo el tubérculo, de consistencia firme y se obtuvo un mayor número de brotes y de tubérculos. Los tubérculos y brotes (rosetas) se observaron en sus primeras etapas, como pequeños nódulos individuales (tubérculos aislados) o en grupo (rosetas) emergiendo de la superficie del callo (Fig. 5). Esta manifestación de la morfogénesis fue evidentemente una organogénesis indirecta. En algunos tubérculos ocurrió organogénesis directa, es decir sin mediar una fase de callo. Esta ocurrió directamente de la aréola del ápice de los tubérculos.

El desarrollo de tubérculos tuvo mejor respuesta en presencia de KIN/2,4-D (0.5/1 mg/l) incluyendo los brotes aunque el tiempo de desarrollo fue muy extenso (30 semanas). Al final de 30 semanas de cultivo se obtuvo un total de 337 tubérculos individuales, 120 brotes con un máximo de 6 tubérculos en distribución arrosada, sin embargo la mayoría tuvieron 2-4. Asimismo se registró el desarrollo de 9 raíces vía organogénesis indirecta a partir del callo formado aunque éstas fueron individuales, muy delgadas y no estuvieron ligadas a tubérculos ni a brotes.

El cultivo de tubérculos de *A. kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) no tuvo respuesta en ausencia de reguladores de crecimiento, pero en presencia de BAP/ANA se lograron mejores resultados en cuanto a la

regeneración de brotes que con KIN/2,4-D. Los cultivos de secciones de plántulas de *A. retusus* (Olguin, 1994) en presencia de KIN/AIA sólo llegaron a formar callo no morfogenético; al utilizar BAP/ANA en explantes centrales, laterales y tubérculos si hubo formación de brotes; un mayor número de tubérculos fueron regenerativos en presencia de un balance favorable de BAP en relación a ANA o mejor aún en ausencia de la auxina (BAP 2 y 3 mg/l). Anicua (2000) al ensayar con KIN/BAP obtuvo brotación múltiple en *Mammillaria carmenae* y *M. bocasana* pero solo callo en *Echinocactus grusonii*. Saucedo (2006) obtuvo altos porcentajes de brotación múltiple utilizando ANA (0.5 mg/l) + BAP (3 mg/l) en *Echinocereus pentalophus*.

En *A. bravoanus* se establece otra diferencia porque en presencia de BAP/ANA los tubérculos no mostraron la misma capacidad regenerativa aún cuando en este caso las concentraciones usadas fueron menores (BAP 0-0.5 mg/l + ANA 1, 3 y 5 mg/l).



Fig. 5.- Desarrollo de tubérculos de *A. bravoanus* emergiendo del callo.

ENRAIZAMIENTO DE BROTES.

Al cabo de cuatro semanas se obtuvo un total de 23 brotes formando una roseta y 115 tubérculos individuales, no se registró el desarrollo de raíces en ninguno de los tubérculos provenientes de los tratamientos aplicados. En 12 brotes tratados con AIB y en 14 brotes con ANA se hiperhidrataron primero en su base para después formar callo y perdieron su característica forma de roseta. No hubo diferencias en el uso de los agentes gelificantes (Tabla 6).

Cuando se intentó favorecer las respuestas de enraizamiento en brotes utilizando dos auxinas AIB y ANA (Tabla 6) en forma separada no se obtuvo ninguna respuesta favorable ni siquiera después en medio basal donde se

supondría que se manifestarían los efectos de las auxinas utilizadas, lo que contrasta con lo reportado por Corneanu (1994) con *Aztekium ritteri* que obtuvo un 60 % de éxito utilizando AIA y KIN; Pérez-Molphe *et al.* (1998) con 21 especies de cactáceas mexicanas lograron hasta 70 % de éxito, utilizando AIB (0.5-1.0 mg/l) y AIA (0.5-1.0 mg/l); Arias (2001) con *Pelecyphora strobiliformis* utilizó auxinas (ANA, AIB y AIA) en forma individual; Giusti *et al.* (2002) con tres especies de cactáceas (*Mammillaria pectinifera*, *Escobaria minima* y *Pelecyphora aselliformis*) usando BA y ANA.

Tabla 6.- Respuestas morfogénicas observadas en brotes de *A. bravoanus* después de 4 semanas de cultivo en presencia de reguladores de crecimiento (n= 11).

	BROTOS	TUBÉRCULOS	RAÍCES
AIB (0.5 mg/l)	13	50	0
ANA (0.5 mg/l)	10	65	0
TOTAL	23	115	0

La eficacia de las auxinas sintéticas ha sido ampliamente probada y demostrada pero utilizadas siempre en forma separada.

En el presente estudio se obtuvieron buenas respuestas de brotes y tubérculos (Tabla 6) pero ninguna respuesta de enraizamiento. Debemos considerar el aspecto de la edad *in vitro* de los tubérculos así como el tamaño

de los mismos (Debergh y Maene, 1981; Rancillac *et al.*, 1987; Angeloni *et al.*, 1992). Es de hacer notar el hecho de que las cactáceas responden de manera diferente a diferentes tipos de reguladores de crecimiento (Johnson y Emino, 1979; Giusti *et al.*, 2002), así mismo las respuestas obtenidas dependen de tres factores: el medio de cultivo, la edad fisiológica del explante y la carga genética del explante que después de algún tiempo de cultivo puede empezar a presentar malformaciones.

ENRAIZAMIENTO DE TUBÉRCULOS.

A partir de la segunda semana en medio de inducción, se logró que 7 tubérculos desarrollaran raíces en tres diferentes tratamientos, presentándose 5 en el tratamiento marcado como testigo y 1 en cada uno de los tratamientos: 3 y 5 (Tabla 7). En la tercer semana se obtuvo enraizamiento en 10 tubérculos siendo el principal el tratamiento marcado con el número 2 (0.2 mg/l de AIB + 0.05 mg/l de ANA). Lo más notable de estos registros es que las raíces obtenidas se formaron por organogénesis directa lo cual parecería indicar una unión anatómica entre los correspondientes sistemas vasculares, situación que es necesario evidenciar a través de estudios histológicos; se desarrollaron con bastante vigor y en número de más de dos por cada tubérculo (Fig. 6), excepto en las del testigo que fueron raíces individuales y de menor longitud. Durante la quinta y sexta semana el desarrollo de raíces se presentó principalmente en

el testigo, con 7 tubérculos enraizados y en el tratamiento 5 con raíces en 7 tubérculos lo cual evidenció que el proceso de formación de raíces ocurre de manera independiente de fitoreguladores exógenos, no obstante estos pueden incrementar su formación o aún inhibirla. En la séptima semana se desarrollaron raíces en forma notoria en los tratamientos 3 y 4 donde se obtuvieron 20 y 18 tubérculos enraizados.

Dentro de la semana 8 de cultivo fue notoria aunque escasa la presencia de callo en el ápice de algunos tubérculos y principalmente en la porción basal mostrando un callo de consistencia sólida y de color rosado y claro, incluso se presentó la formación de callo en la periferia de la base en algunos tubérculos enraizados, no observándose regeneración a partir del callo.

Asimismo ocurrió el rompimiento de la porción lateral de algunos tubérculos por el crecimiento interior de callo lo que resultó en deformación en unos por el hinchamiento de tejidos e hiperhidratación, no obstante, esto llevo a la formación de brotes en esas áreas.

Después de ocho semanas en presencia de los reguladores de crecimiento se obtuvo enraizamiento en 96 tubérculos lo que representó poco más del 20 % del total, con la mejor respuesta en los tratamientos con 2.0 mg/l de AIB + 0.5 mg/l de ANA con 27 tubérculos y 1.0 mg/l de AIB + 0.1 mg/l de ANA con 23

tubérculos (Tabla 8). El desarrollo de raíces se dio por organogénesis directa, asimismo el desarrollo de areolas y espinas se dio aunque en menor número.



Fig. 6.- Desarrollo de raíces en tubérculos de *A. bravoanus* obtenidos a partir de la tercera semana de cultivo.

Tabla 7.- Formación de raíces en tubérculos de *A. bravoanus* en medio de inducción MS-50 %, sacarosa 30 g/l, AIB/ANA (mg/l). Resultados a las 8 semanas en presencia de los reguladores de crecimiento. .□ Sin respuesta. n= 75 (3 tubérculos por frasco).

Tratamiento/semana	1	2	3	4	5	6	7	8	total
Testigo		5			7	1			13
(1) 0.1/0.1								11	11
(2) 0.2/0.05			5	2				7	14
(3) 2/0.5		1	2				20	4	27
(4) 1/0.1			3				18	2	23
(5) 1/1		1				7			8
Total		7	10	2	7	8	38	24	96

Cabe hacer notar que la formación de callo esponjoso y de color rosado ocurrió en 176 tubérculos que representaron casi el 40 % del total sembrado. En esta etapa del tratamiento se formaron 30 nuevos brotes por vía directa representando el 6.6 % del total, principalmente en el testigo y en el tratamiento 4 cada uno con 7 brotes. Los nuevos brotes presentaban de 2-3 tubérculos en distribución arrosada. Al término del primer mes después de su aparición formaron raíces.

Al aplicar en una segunda etapa auxinas en forma conjunta y en bajas concentraciones, el porcentaje de enraizamiento se incrementó obteniendo respuestas a partir de la segunda semana, respuestas que además de rápidas mostraron raíces vigorosas y en un número mayor a dos, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Arias (2001), con la diferencia de que él uso auxinas (ANA, AIA y AIB) en forma separada; Garrido (1998) obtuvo enraizamiento a los 35 días en medio MS usando KIN (5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l) en tres especies de cactáceas; Dávila-Figueroa *et al.* (2005) obtuvieron elevados porcentajes de enraizamiento del 54 % al 94 % en ocho especies de *Turbinicarpus* utilizando AIB. La eficacia de las auxinas sintéticas como el AIB o ANA ha sido ampliamente probada y demostrada en algunos cultivos (Street y Shillito, 1977), pero siempre utilizando dichas auxinas en forma separada.

Tabla 8.- Respuestas morfogénicas a partir de tubérculos de *A. bravoanus* en MS50, sacarosa 30 g/l. Resultados a las 8 semanas de cultivo.

AIB/ANA mg/l	RAICES	CALLO	BROTOS
Testigo	13/75 (30.6 %)	9/75 (12 %)	7/75 (9.3 %)
(1) 0.1/0.1	11/75 (25.3 %)	26/75 (34.6 %)	5/75 (6.6 %)
(2) 0.2/0.05	14/75 (26.6 %)	22/75 (29.3 %)	1/75 (1.3 %)
(3) 2/0.5	27/75 (36 %)	36/75 (48 %)	7/75 (9.3 %)
(4) 1/0.1	23/75 (32 %)	35/75 (46.6 %)	6/75 (8 %)
(5) 1/1	8/75 (21.3 %)	48/75 (64 %)	4/75 (5.3 %)
TOTAL	96	176	30

Las respuestas de enraizamiento pueden ocurrir en el mismo medio de inducción: Ramírez-Malagon *et al.* (2007) trabajando con 10 especies de *Mammillaria* obtuvieron enraizamiento en los medios de inducción MS y MS50 adicionados con KIN + AIA. También cuando no se utilizan auxinas es posible obtener respuestas de enraizamiento, Mata *et al.* (2001) trabajando con *Turbinicarpus laui* obtuvieron enraizamiento en brotes después de 2 semanas de cultivo en medio MS50 sin el uso de reguladores de crecimiento; Moebius-Goldammer *et al.* (2003) obtuvieron enraizamiento en *A. kotschoubeyanus* sin el uso de reguladores de crecimiento; Santos-Díaz *et al.* (2003) obtuvieron enraizamiento en *Pelecypora aselliformis* sin el uso de reguladores de crecimiento pero tardaron 10 meses en lograr un sistema radicular vigoroso.

El tratamiento inicial con citocininas (KIN/2,4-D) para buscar respuestas de brotación múltiple dio resultados positivos y en gran cantidad, lo que explicaría lo obtenido en la etapa de enraizamiento porque estas respuestas se manifiestan, por lo general, en cultivos que utilizan primero citocininas y luego auxinas (O'Hara y Street, 1977).

El uso de tubérculos con determinada edad *in vitro* (Debergh y Maene, 1981; Rancillac *et al.*, 1987) también influye en las respuestas obtenidas ya que entre más jóvenes sean los tubérculos mejor será la respuesta (Barwani *et al.*, 1994; Orellana, 1995), porque los tubérculos jóvenes son una fuente rica de auxinas endógenas y presentan un mayor número de células con potencial morfogénico lo que trae como consecuencia respuestas de enraizamiento favorables. Se ha encontrado en los explantes en algunas especies, que las auxinas endógenas se concentran identificando las zonas de crecimiento dentro de las primeras 15 horas después del corte y su concentración empieza a disminuir hasta que tiene lugar la primera división celular (Barwanni *et al.*, 1994;), que puede ocurrir en las primeras 40 horas; esto parecería explicar la rapidez con la que obtuvimos respuestas positivas (2 semanas). En nuestros resultados influyeron los tratamientos previos y las concentraciones usadas de determinados reguladores.

El efecto de las auxinas es inducir y acelerar la iniciación radical que, en el caso de *A. bravoanus* se favoreció cuando se utilizaron dos auxinas conjuntas en el mismo medio de cultivo quizás porque la especie es más recalcitrante a responder en presencia de una sola auxina. Este comportamiento de *A. bravoanus* nos lleva a pensar que esta especie presenta diferencias muy grandes con respecto a otras cactáceas inclusive especies del mismo género *Ariocarpus* (Stuppy y Nagl, 1992, Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

PERIODO DE MANIFESTACIÓN MORFOGENÉTICA.

Cumplidas las ocho semanas se realizó un subcultivo en medio fresco, libre de reguladores de crecimiento. Dentro de las siguientes 12 semanas se obtuvo el enraizamiento en 40 tubérculos más (Tabla 9), siendo mayor la respuesta en el tratamiento marcado como testigo con 11 tubérculos; y en los tratamientos 1 y 5, con 8 tubérculos enraizados cada uno. Además, se formaron 21 brotes teniendo la mayor respuesta en los tubérculos procedentes de los tratamientos 3 y 4, con 5 y 7 brotes respectivamente. Se observó enraizamiento en casi todos los brotes obtenidos.

Tabla 9. Desarrollo de brotes y raíces a partir de tubérculos de *A. bravoanus* en MS50, sacarosa 30g/l, AIB/ANA obtenidos al término de 12 semanas después de la etapa de inducción.

Tratamiento/Respuesta	Raíces	Brotes	Contaminados
Testigo	11	3	1
(1) 0.1/0.1	8	2	1
(2) 0.2/0.05	6	1	0
(3) 2/0.5	4	5	0
(4) 1/0.1	3	7	1
(5) 1/1	8	3	0
Total	40	21	3

En esta etapa sólo se obtuvo enraizamiento en 40 tubérculos lo cual contrasta significativamente con lo obtenido en el medio de inducción (90 tubérculos) lo que permite suponer que es preferible mantener la presencia de los reguladores de crecimiento en el medio para acelerar un mayor porcentaje de respuesta. La capacidad de mantener la respuesta morfogenética después del período de inducción ha sido reportada con anterioridad por Minocha y Mehra (1974) en cultivos de *Mammillaria prolifera* hasta por 12 semanas después de dicho período; Moebius-Goldammer *et al.* (2003), reportaron el mismo efecto con tubérculos de *Ariocarpus kotschoubeyanus*. Esta respuesta se ha dado hasta por 15 años en *Ceratozamia* spp., *Zamia* spp. (Chávez *et al.*, 1998; y com. pers.). Estos reportes indican que las especies en cuestión pasaron por un período de inducción y posteriormente por un período de manifestación de la morfogénesis.

En el caso de *A. bravoanus*, el período de inducción tendría que ser más largo porque las respuestas se manifestaron desde la segunda semana del período, manteniéndose constantes y en aumento al menos por otras diez o doce semanas. El período de manifestación ó de desarrollo puede evitarse o reducirse a un período de mantenimiento cuando el medio muestre síntomas de agotamiento o un poco antes para evitar que se desencadenen respuestas no deseadas.

Pasado el período de manifestación morfogenética se dejaron envejecer los cultivos (Fig.7) lo que tuvo consecuencias funestas para la mayoría de los cultivos. Es decir, se deshidrataron los tubérculos, oxidándose y perdiéndose muchos ejemplares. Este procedimiento de “envejecimiento” o deshidratación de cultivos tiene como antecedentes a los cultivos de otras cactáceas y ha sido útil en la regeneración de algunas plantas como *Mammillaria san-angelensis*, *Turbinicarpus laui*, *T. pseudopectinatus*, *Ariocarpus retusus*, *A. kotschoubeyanus*; pero con las condiciones del presente estudio no se logró el desarrollo de los cultivos de *A. bravoanus* (Chávez com. pers.; Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Olguín, 1994; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003). Al dejar envejecer los cultivos, por experiencias propias en cultivos con *A. kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) y *A. retusus*, se buscaba que los ejemplares de *A. bravoanus* desarrollaran características mejor

definidas y hubiera un mayor crecimiento. A este respecto la respuesta de *A. bravoanus* al envejecimiento de los cultivos hizo notar otra diferencia con otras especies del mismo género que responden favorablemente a dicho proceso y que, en el caso de *A. bravoanus* no fue completamente así. Es decir, los tubérculos se oxidaron, se deshidrataron y llegaron a morir cuando el medio empezó a mostrar síntomas de escasez de nutrientes, lo que implicaría que la especie es más delicada y que no soportó tal estrés.

Estos resultados destacan por su importancia ya que una parte importante de la micropropagación *in vitro* es llegar a obtener altos niveles de enraizamiento que tratándose de especies poco conocidas es más difícil. Haber logrado este objetivo representa un gran avance en el conocimiento de *A. bravoanus* porque sienta las bases para continuar la búsqueda de un procedimiento completo más efectivo para su propagación masiva (con fines de conservación y/o comerciales) sin afectar las poblaciones silvestres, como se ha propuesto para ésta y todas las especies amenazadas que se estudian en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

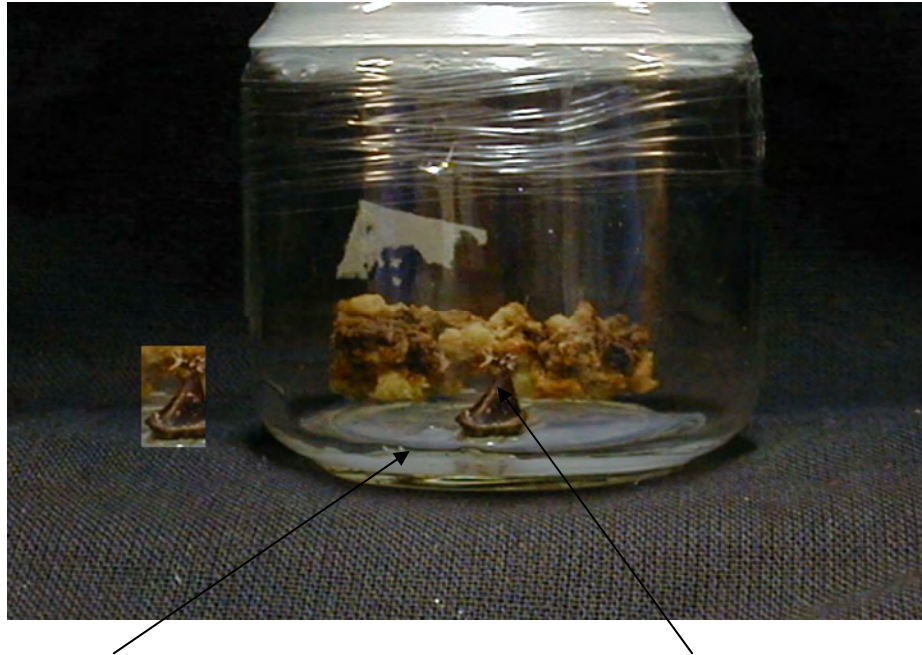


Fig. 7.- Envejecimiento del medio de cultivo y desarrollo de brotes en el ápice del tubérculo de *A. bravoanus* (ver flechas).

Para tratar de recuperar los cultivos se resembraron en medio fresco MS50 adicionando sacarosa 30 g/l y sin ningún regulador de crecimiento, dando como resultado que poco a poco se recuperaran los cultivos. Esta respuesta probablemente se vio favorecida por la presencia de sacarosa en el medio porque ésta permite manifestar el efecto de los reguladores de crecimiento aplicados en tratamientos anteriores, como fue reconocido por otros autores (Gautheret (1945) en Sharp *et al.*, 1979: "*el efecto de las auxinas se ve severamente afectado por otras fuentes como la sacarosa o azúcar utilizada, la iluminación y el régimen de temperatura utilizados*") y aunque el daño sufrido por la etapa de envejecimiento era mayor, se lograron reducir las

pérdidas; en el caso de callo que había perdido la coloración, se empezó a recuperar el color y la consistencia, los tubérculos que ya habían enraizado y que empezaban a sufrir oxidación ésta se vio interrumpida y revertido dicho proceso. En esta etapa de recuperación incluso se obtuvo enraizamiento en algunos tubérculos que no habían manifestado respuesta.

ACLIMATIZACIÓN.

Un aspecto importante y fundamental fue el intento de adaptación a suelo que se realizó y aunque únicamente se utilizaron 4 plántulas bien definidas, los resultados fueron satisfactorios y muy prometedores ya que se logró su adaptación al suelo pasadas 3 semanas. En esta etapa ocurrió contaminación por larvas de insectos por lo que se les aplicó Furadan© en polvo y se realizó una limpieza manual.

Como respuestas de adaptación al suelo se observó el desarrollo de 1-2 pequeños tubérculos en el centro de las plántulas, se formaron estrías y ornamentaciones, hubo rompimiento de cutícula y oxidación en la epidermis (Fig. 8); cumplidas ocho semanas, las plántulas se trasladaron a un invernadero en condiciones controladas de humedad y temperatura. El desarrollo en invernadero no fue del todo exitoso perdiéndose las 4 plántulas introducidas por ataque de cochinillas.

Resalta la importancia de la aclimatización obtenida porque en los cultivos *in vitro*, una fase que representa muchas limitantes es precisamente la adaptación a suelo (Krikorian, 1991) y que en muchos casos no siempre tiene éxito.



Fig. 8.- Respuestas de aclimatización en tubérculos de *A. bravoanus*.

El procedimiento desarrollado en el presente estudio demostró su viabilidad, permitiendo la regeneración *in vitro* para *A. bravoanus*. El tiempo empleado en este trabajo comprendió un período de 1.5 años que en términos de desarrollo biológico de la especie es muy corto. Sin embargo; todavía significa un gran espacio de tiempo si consideramos la alta demanda que

existe de esta planta, pero los resultados obtenidos permiten vislumbrar que se podrá reducir ese tiempo.

Las respuestas de *A. bravoanus* a la presencia de reguladores de crecimiento, el efecto del envejecimiento de los cultivos, la tolerancia a la humedad sólo podrán ser aclarados con base en estudios mas profundos y detallados. Al contar con ejemplares adultos en menos tiempo, se podrán llevar a cabo estudios anatómicos aplicando técnicas histológicas específicas para definir las zonas meristemáticas y el momento en que ocurren las divisiones celulares, entre otros estudios. El haber aplicado el cultivo de tejidos vegetales con éxito en una especie poco conocida o de nulos conocimientos sobre su desarrollo, nos lleva a confirmar la viabilidad de dichas técnicas en el rescate de especies en peligro de extinción. Aplicar esta tecnología en otras especies poco conocidas o cuya micropropagación ha sido difícil, permitirá un mayor avance científico y una conservación sustentada de los recursos naturales. Finalmente, el objetivo de estas técnicas deberá ser la conservación de los recursos naturales y la formación de recursos humanos eficientes para aplicar las técnicas de cultivo de tejidos y lograr un desarrollo sustentable de los recursos vegetales utilizados por el hombre, permitiendo el uso pero también la conservación de los recursos que nos brindan toda una

gama de servicios, entre otros el ecológico (oxígeno, fijación de suelo, albergue a fauna silvestre, alimenticio).

El desarrollo sustentable para salvaguardar el medio ambiente mediante el uso y promoción de tecnologías que no contaminen o que lo hagan en una cantidad mínima, concepto que desde 1972 se incorporó reconociendo la relación entre medio ambiente y desarrollo, plantea las estrategias que se deben aplicar en una política de respeto con la naturaleza. Estas políticas permitirán el control en el uso de los recursos naturales para llegar a satisfacer las necesidades de las generaciones actuales sin poner en riesgo a las generaciones futuras (Bolaños, 2000).

La alternativa de un desarrollo sustentable para *A. bravoanus* parece ser la única posibilidad viable. Detener el deterioro y la pérdida del hábitat de la especie a través de concientizar a la población local en donde crece la especie, de su valor botánico y de la importancia de preservarla, en lugar de depredar es la meta. La búsqueda de alternativas económicas para los lugareños, el desarrollo de nuevos proyectos *in situ* que permitan el crecimiento de la población y mejor conocimiento de la especie, el apoyo a programas de desarrollo y, en gran medida, la obtención de métodos eficaces de micropropagación *in vitro*, todos ellos permitirán cambiar el status actual de *A. bravoanus*.

Uno de los mayores impactos que sufren las especies amenazadas es el saqueo y explotación indiscriminados, lo que no permite que sus poblaciones silvestres se recuperen. Esto trae como consecuencia que los estudios de dichas especies muchas veces ni siquiera puedan llevarse a cabo por falta de material biológico o que queden en un estado inconcluso cuando el material colectado es escaso y raro, lo que dificulta su estudio.

Lograr disponer de un mayor número de ejemplares en un tiempo mas corto permitirá reducir las presiones en las poblaciones silvestres porque daría alternativas a la gente que obtiene recursos económicos de la explotación desmedida de dichas especies, que sumado a un mayor número de estudios de conservación nos permitirá ampliar el conocimiento de los recursos de la flora silvestre.

IV. CONCLUSIONES.

Se establecieron bases sólidas para la micropropagación *in vitro* de *A. bravoanus*.

Se lograron altos porcentajes de germinación (86.6 %) en 25 días.

Se obtuvieron respuestas de organogénesis directa en la formación de tubérculos y brotes (rosetas) así como en la formación de raíces. Las respuestas vía organogénesis indirecta, a partir de un callo friable y rosado, fueron menos ocurrentes y cuando se dieron, dichas respuestas mostraron tejidos y órganos (tubérculos y raíces) poco vigorosos, de aspecto anormal y poco consistente.

La mayor formación de tubérculos se obtuvo en los tratamientos con KIN (0.5 mg/l) + 2,4-D (1 mg/l) y BAP (0.1 mg/l) + ANA (1 mg/l) desarrollándose 35 tubérculos y 37 tubérculos respectivamente en ocho semanas.

La potencialidad de los tubérculos en cultivo para desarrollar raíces fue favorecida por su tamaño (de 0.8-1.2cm) y la edad del tubérculo (6 meses de edad). Las mejores respuestas de enraizamiento se obtuvieron en medio MS50 suplementado con AIB (2 mg/l) + ANA (0.5 mg/l) con 27 tubérculos y AIB (1 mg/l) + ANA (0.1 mg/l) con 23 tubérculos en ocho semanas.

La adaptación a suelo se logró empleando una mezcla de Peat-Moss, vermiculita y tierra negra (1:1:1) con resultados satisfactorios.

V. BIBLIOGRAFÍA.

- Angeloni, P.N., L.A. Mroginski, H.Y. Rey, E.A. Flachsand y M.C. Inda, 1992. Establecimiento *in vitro* de especies de los géneros *Gleditsia*, *Prosopis*, *Toona* y *Cedrela*. *FACENA* **9**:135-150.
- Anicua Farfan, Juana. 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción. (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis Licenciatura (Biología). UNAM-ENAP. México 68p.
- Arias, A.A., 2001. Micropropagación de *Pelecyphora strobiliformis* (Wedermann) Frič et Scheelle (CACTACEAE) especie mexicana en peligro de extinción. *Nakari* **12**(1):6-9.
- Arias, Salvador; Guzmán, Ulises; Mandujano, María C.; Soto Galván, Miriam y Golubov, Jourdan, 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **50**(4):100-125.
- Barthlott, W. y D. Hunt, 1993. Cactaceae pp.161-197. En: K. Kubitzki J. Rohwer and V. Bittrich, editors. The Families and genera of vascular plants. II. Dicotyledons. Springer-verlag. Berlin.
- Barwani, O., M. Lewis, A. Brackpool y D. Blakesley, 1994. Auxin and adventitious root initiation in *Eucalyptus globulus*. VIII Int. Congress of *Plant Tissue and Cell Culture*. Firenze, June 12-17, 1994.
- Becerra, R., 2000. Las Cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas* **32**:1-5.
- Berardi, G., G. Reuther y P. Rosati, 1994. Effects of growth regulators and light conditions on morphogenesis and callogenesis from vegetative explants in GF 677 peach x almond hybrid. VIII Int. Congress of *Plant Tissue and Cell Culture*. Firenze, June 12-17, 1994.
- Bidwell, R. G. S., 1993. Fisiología Vegetal. 1a. Ed. AGT. México, 784p.
- Bolaños, R., 2000. Desarrollo sustentable vs Desarrollo sostenido: paradigma de las políticas públicas y de la defensa legal del Medio Ambiente. *Plumeria* **8**:9-13.
- Bonnes, M. S., P. W. Paré, y T. J. Mabry, 1993. Novel callus and suspension cultures of the « old man » cactus (*Cephalocereus senilis*). *Cacti Succulent Journal* (U.S.) **65**:144-147.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar, 1995. El interesante mundo de las cactáceas. CONACYT. Fondo de Cultura Económica. México. 233p.
- Braz de Oliveira, A.J. y M.F. Pires da Silva., 2003. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **104**(2):149-155.

-Calderón Gil, Elisa Bani., 2007. Morfogénesis *in vitro* de *Aztekium hintonii* Glass y F. Maurice, *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada y *Mammillaria sánchez-mejoradae* González, cactáceas endémicas y en peligro de extinción. Tesis Maestría. UNAM. México. 67p.

-Castillo de Meier, G., M.V. Vega, A. Russo y A. Barcelo Muñoz, 2002. Regeneración de plantas a partir de segmentos uninodales de árboles de *Prosopis alba* Griseb. Novenas Jornadas Técnicas Forestales. INTA-FCF-MEYRNRYT-EL DORADO, Misiones, Argentina.

-CITES, 2005. Inskipp, T. y Gillet, H.J.(Eds.). Checklist of CITES species and Annotated CITES Appendices and reservations. Compiled by UNEPWCMC. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland and UNEP-WCMC, Cambridge, UK. 339pp.

-Corneanu, M., 1994. *In vitro* organogenesis in *Aztekium ritteri* Bod. (fam. Cactaceae) on media with or without magnetic fluids. VIII Int. Congress of *Plant Tissue and Cell Culture*. Firenze, June 12-17, 1994.

-Corona, N. V. y L. L. Yañez, 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cacti Succulent Journal*. **29**:3-7.

-Dávila-Figueroa, C.A., M.L. De la Rosa-Carrillo y E. Pérez-Molphe., 2005. *In vitro* propagation of eighth species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **41**:540-545.

-Debergh, P.L. y L.J. Maene, 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticultural* **14**:335-345.

-NOM-059-ECOL-2001. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo Diario Oficial de la Federación, Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México, D.F.

-Fay, M.F. y J. Gratton, 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* **10**:33-48.

-Franco Martínez, I.S., 1994. La convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES). Historia, Estructura y Aplicación. *Amaranto* **7**(1):1-18.

-Franco Martínez, I.S., 1997. Legislación y conservación. En: *Suculentas mexicanas/ Cactáceas*. Compendio de cactáceas. SEMARNAP, México. 143p.

-García, A. V. y A. Carballo. 1987. Propagación *in vitro* de variedades de Violeta africana generadas por hibridación. *Germen* **6**: 24-30.

- Garrido Gutiérrez, Margarita., 1998. Evaluación del metabolismo ácido de crasuláceas en tres especies de cactáceas cultivadas *in vitro* y durante su aclimatización a suelo. Tesis licenciatura (Biología) UNAM-IZTACALA, México. 124p.
- Gatica-Colima, A. B., 2003. El Desierto Chihuahuense. ¿Qué sabemos de él?. Centro de Estudios Biológicos. UACJ. En: <http://www.uacj.mx>
- George, E. F. y P. D. Sherrington, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Limited, England.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiochetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci, 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. Scientia Horticulturae. **1790**:1-14.
- Gómez-Hinostrosa, C. y H. Hernández. 2000. Diversity, geographical distribution and conservation of Cactaceae in the Mier y Noriega region, México. Biodiversity and Conservation **9**:403-418.
- Gonzalez Rodriguez, E., 2001. Micropropagación de *Mammillaria* spp. Tesis Profesional Ing. Agr. UNAM-FES-Cuautitlan. Cuautitlan Izcalli, Mexico 68p.
- Goyal, I. y H.C. Arya, 1984. Tissue culture of desert tree: I. Clonal multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture. Journal Plant Physiology **115**:183-189.
- Hartmann, H. y D. Kester. 1992. Propagación de plantas. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México. pp. 137-215.
- Hernández, H. M., 2006. La vida en los desiertos mexicanos. Fondo de Cultura Económica, México. (Colec. La Ciencia para todos; 213) 188p.
- Hernández, H. y E.F. Anderson. 1992. A new species of *Ariocarpus* (Cactáceae). Bradleya **10**:1-4.
- Hernández, H. y R. Bárcenas. 1996. Endangered Cacti in the Chihuahuan Desert: II. Biogeography and Conservation. Conservation Biology **10**(4):1200-1209.
- Hernández, H. y H. Godínez, 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas. Acta Botanica Mexicana **26**:33-52.
- Hubstenberger, J.F., P.W. Clayton y G.C. Phillips, 1992. Micropropagation of cacti (CACTACEAE). En: Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. High-tech and micropropagation IV Springer-Verlag Berlín, Heidelberg. **20**:49-58.
- INE, 2001. Especies prioritarias. Cactus. En: [http:// www.ine.gob.mx](http://www.ine.gob.mx).
- Infante, R., 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). Plant Cell Tissue Organ Culture **31**:155-159.

- UICN, 2006. 2006 UICN Red list of threatened species.<www.iucnredlist.org>.Downloaded on 20 august 2007.
- Johnson, J.L. y E. R. Emimo, 1979. Tissue Culture propagation in the cactaceae. *Cactus and Succulent Journal* **51**:275-277.
- Kitto, S.L., 1997. Commercial Propagation. *HortScience*. **32**(6):1-3.
- Krikorian, A.D., 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos teórico prácticos. Ed. Roca, W.M. y Mroginsky, L.A.. CIAT, Cali, Colombia. p. 95-126.
- Klopfenstein, N. B. y Kerl, 1995. *Agroforestry Systems*. **32**:29-44.
- Lucas, G. y H. Synge, 1978. The UICN plant red data book. Unwin brothers limited. The Gresham press. old working, Surrey, England. 540p.
- Marks, T. R. y S. E. Simpson. 2000. Interaction of explant type and indole-3-butyric acid during rooting *in vitro* in a range of difficult and easy-to-root woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **62**:65-74.
- Martínez, A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis Maestría. Fac. de Ciencias, UNAM. México 114 p.
- Martínez-Vásquez, O. y A. Rubluo, 1989. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal Horticulural Science* **64**: 99-105.
- Mata, M.R., M. A. Monroy, K. Moebius y V. M. Chávez, 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular Developmental Biol-Plant* **37**: 400-404.
- Minocha, S.C. y P.N. Mehra, 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *American Journal Botany* **61**:168-173.
- Mitich, L. y J. Bruhn. 1977. The genus *Ariocarpus* -a bibliography. *Cacti & Succulent Journal* (US).**49**:122-127.
- Moebius-Goldammer, K., M. Mata y V. M. Chávez, 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **39**:388-393.
- Moore, T., 1979. Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-Verlag, New York. 473pp.
- Moreton, R., 1992. On the germination of cactus seeds. *British Cacti Succulent Journal* **10**(3):78.

- Moss, B., 1993. *Ariocarpus* from seed. *British Cacti Succulent Journal* **2**(1):2-3.
- Murashige, T. y F.A. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* **15**:473-497.
- Murashige, T., 1974. Plant Propagation through tissue culture. *HortScience* **9**:2-3.
- O`Hara, J. y H. E. Street, 1977. Wheat callus culture: The initiation, growth, and organogenesis of callus derived from various explant sources. *Ann. Bot.*
- Oldfield, Sara (Comp.). 1997. Cactus and Succulent Plants. –Status Survey and Conservation Actino Plan. UICN/SSC Cactus and Succulent Specialist Group. UICN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Olguin, L.P., 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactáceae) especie en peligro de extinción. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 85pp.
- Orellana, P.P., J. Pérez Ponce, D. Agramonte, R. Gómez y E. Jiménez, 1991. La micropropagación de plátanos y bananos a escala comercial en Cuba. ACEVIV. Boletín Científico **3**(3):29-38.
- Orellana, P.P., 1995. Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis de Doctorado. IBP. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
- Orellana, P.A., 1998. Introducción a la propagación masiva. En: Pérez Ponce, J.N. (Ed). Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba. Pp. 125-133.
- Pérez-Molphe, E.B. y C.A. Dávila-Figueroa, 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg y *P. strobiliformis* Werdermann (Cactáceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* **38**:73-78.
- Pérez-Molphe, E. B., M. E. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. R. Morones y H. J. Lizalde, 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular Developmental Biol-Plant* **34**:131-135.
- Pérez Ponce, J. N., 1998. Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. 400 pp.
- Peterson, S., 1993. Temperature and flowering of *Ariocarpus*. C.& S. Society of América Inc. Newsletter. Supplement to *Cacti & Succulent Journal* (US).**65** (6):66.
- PROFEPA. Repatria la PROFEPA más de 900 ejemplares de Cactáceas confiscadas en Europa. Boletín PROFEPA/014/2000.
- PRONATURA Noreste, 2003. Desierto Chihuahuense. En: <http://www.pronaturane.org>

- Ramírez-Malagon, R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, J.L. Barrera-Guerra, H.G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo., 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology* **43**:660-665.
- Rancillac, M., J.G. Nourrisseau, C. Navatel y P. Roudillac, 1987. Influence de la multiplication *in vitro* sur le comportement du plant fraisee en France. *Acta Horticulture* **212**:55-59.
- Rasmuson, J., 1999. El cultivo de Cactáceas como estrategia de conservación. Circular *Guanabios* **1**(11):42.
- Raven, P., 1986. 60,000 plants under threat. *Threatened Plants Newsletter*. **16**:2-3
- Reyes, S. J., 1994. Propagación de Cactáceas Mexicanas: una alternativa para la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción. En: *Encuentro Internacional sobre el Impacto de la Biotecnología en el Desarrollo Sustentable*. PROMESUP, OEA. pp. 108-119.
- Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo, 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cacti Succulent Journal* **64**:116-119.
- Rodríguez, V. M., S.K. Vila, H. Rey y L. Mroginsky, 2001. Organogénesis *in vitro* de *Gleditsia amorphoides* (Leguminosae). *IBONE*. Argentina.
- Roy, C., S. Basu, R. Basu y C. Bhattacharya. 1975. Carbohydrate metabolism in relation to the rooting of bean cutting. *Plant Physiology* **76**:851-853.
- Rubluo, A., E. Arriaga, S. Arias, C. Pérez-Amador, D. Amor, E. Santos, E. Rojas y P. Elizalde, 1990. Tissue culture applications in the endangered *Mammillaria huitzilopochtli*, (Cactaceae). In: Abstracts VIIth Internacional Congreso on *Plant Tissue and Cell Culture*. Abs. No. **A3**-191, p 130.
- Rzedowsky, J., 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México.
- Rzedowsky, J., 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanegorámica de México. *Acta Botanica Mexicana* **14**:3-21.
- Salisbury, F. y C. Ross, 1994. Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamericana. México, 759p.
- Santos-Díaz, M.S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M L. Santos-Díaz., 2003. In Vitro organogeneis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **39**:480-484.
- Saucedo Gutierrez, Samantha., 2006. Regeneración *in vitro* de *Cephalocereus apiccephalum* y *Echinocereus pentalophus*, cactáceas nativas de México. Tesis Licenciatura (Biología). UNAM, México. 154p.

- Sharp, W. R., P. O. Larsen, E. F. Paddock y V. Raghavan. (Eds.). 1979. Plant Cell and Tissue Culture, Principles and Applications. Ohio State Univ. Press. 892p.
- Soltero, R.Q., 1999. La conservación de Cactáceas amenazadas. Circular Guanabios **1**(11):43.
- Sotomayor, M., 1999. Problemas de supervivencia de las especies de la familia Cactaceae del Estado de San Luis Potosí. Circular Guanabios **1**(11):40.
- Sotomayor, M., A. Arredondo y M. Martínez, 2001. *Ariocarpus fissuratus* ssp *bravoanus*. Situación actual. Succulents **24**(1):25-32.
- Starling, R.J. y R. Hutson, 1984. Sterile culture of succulent plants. British Cacti Succulent Journal **2**:69-70
- Street, H. E. y R. D. Shillito, 1977. Nutrient media for plant organ, tissue, and cell culture. En: M. Recheigl, Jr. (ed.), C. R. C. Handbook Series in Nutrition and Food. **4**:305-358. CRC Press, Cleveland.
- Stuppy, W. y W. Nagl, 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactáceae) via somatic embryogenesis. Bradleya **10**:85-88.
- Tiukavin, G.B. y A.S. Valderrama, 2003. Efecto de los reguladores de crecimiento *in vitro* en el desarrollo y crecimiento del Yacón (*Polimnia sonchifolia* Poepp y Endl.) *in vivo*. I Congreso Internacional de Científicos Peruanos.
- Villanueva, E., P. Sánchez, N. Rodríguez, E. Villanueva, E. Ortiz y J. Gutiérrez, 1998. Efecto de reguladores del crecimiento y tipo de sustrato en el enraizamiento de *Kalanchoe*. Terra **16**(1):33-41.
- Villegas, A.M. y F. Barrientos, 1987. Micropropagación de ciruelo mirabolano (*Prunus cerasifera* L.). Fitotecnia **10**:72-79.
- WWF, 2003. Desiertos. In: <http://www.wwf.org.mx>

VI.- APÉNDICES.

Anexo 1.- Categorías de riesgo de los ordenamientos que regulan y protegen a las cactáceas en el mundo. El número entre paréntesis indica el número de especies mexicanas en esa categoría. (Modificado de Arias *et al*, 2005).

NOM-O59ECOL-2001	UICN	CITES
E: Probablemente extinta	EX: Extinto	I (40)
P: En peligro de extinción (27)	EW: Extinto en estado silvestre (1)	II
A: Amenazadas (81)	CR: En peligro crítico (23)	
PR: Sujetas a protección especial (157)	EN: En peligro (11)	
	VU. Vulnerable (24)	
	NT: Casi amenazado (5)	
	LC: Preocupación menor	
	DD: Datos insuficientes (1)	
	NE: No evaluado	

Anexo 2.- Respuestas de cactáceas en cultivos in vitro. (La tabla contiene los datos de especie, tipo de explante o fuente, medio de cultivo y resultados obtenidos; la información presentada es producto de una búsqueda no exhaustiva y sirve de referencia a estudios posteriores).

ESPECIE	FUENTE	MEDIO DE CULTIVO	RESPUESTAS	REFERENCIA
<i>Mammillaria woodsii</i>	Callo	MS + AIA/KIN	Brotes, Enraizamiento	Kölar <i>et al.</i> , 1976 en Fay y Gratton, 1992
<i>Aztekium ritteri</i>		MS + KIN/2,4-D	Estructuras embrionarias	Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992
<i>Mediocactus coccineus</i>		MS + ANA	Embriones Somáticos	Infante, 1992
<i>Aztekium ritteri</i>	plántulas	MS + AIA/KIN	Enraizamiento	Corneanu, 1994
21 especies de cactáceas	Semillas, Brotes, yemas	MS, MS +BA/ANA, MS + AIA, MS + AIB	Brotes, Enraizamiento	Pérez-Molphe <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhipsalidopsis rosea</i> , <i>Chamaecereus silvestrii</i> <i>Epiphyllum crenatum</i>	aréolas	MS + ANA/KIN 12 h luz, 12 h oscuridad	Brotes, enraizamiento	Garrido, 1998
<i>Mammillaria bocasana</i> , <i>M. carmenae</i> y <i>Echinocactus grusonii</i>	aréolas	MS + BAP/KIN	Brotes, enraizamiento	Anicua, 2000
<i>Mammillaria</i> sp	ápices	MS + BA/AIB	Brotes y plántulas	González, 2001
<i>Turbincarpus laui</i>	Semillas germinadas	MS + BA/ANA	Brotes adventicios	Mata <i>et al.</i> , 2001
<i>Peleciphora</i>	Semillas germinadas,	MS,	Plántulas,	Arias, 2001

<i>strobiliformis</i>	Brotos axilares plántulas	MS + ANA/KIN, MS + 2iP MS + AIB, MS + AIA/KIN	raíces	
<i>Escobaria minima</i> , <i>Mammillaria pectinifera</i> y <i>Peleciphora aselliformis</i>	Semillas germinadas, Epicotilos, Brotos axilares	MS, MS + ANA/KIN, MS + BA MS + TDZ	Epicotilos, Brotos axilares, enraizamiento	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>Peleciphora aselliformis</i> y <i>P. strobiliformis</i>	Explantos apicales y Transversales, brotes	MS + BA MS + AIA/AIB	Brotos, enraizamiento	Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002
<i>Peleciphora aselliformis</i>	Semillas germinadas, brotos	MS + BA, MS + KIN, MS50 + PEG	Explantos, enraizamiento	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>		MS + BA/ANA	Brotos	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003
8 especies de <i>Turbincarpus</i>	Semillas germinadas	MS + BA/2iP	Brotos, enraizamiento	Dávila-Figueroa <i>et al.</i> , 2005
<i>Cephalocereus apicecephalum</i> , <i>Echinocereus pentalophus</i>	Semillas germinadas	MS50 + ANA/BAP	Brotos, enraizamiento	Saucedo, 2006
10 especies de <i>Mammillaria</i>	explantos	MS + AIA/KIN	Brotos, enraizamiento	Rámirez-Malagon <i>et al.</i> , 2007
<i>Aztekium hintonii</i> , <i>Mammillaria san- angelensis</i> y <i>M. sanchez- mejoradae</i>	callo	MS50, B5 + 2,4-D/KIN	Embriones somáticos	Calderón, 2007