



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regeneración *in vitro* y Conservación *ex situ* de
Mammillaria theresae Cutak

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

NERI RONQUILLO VÁZQUEZ



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Octavio González Caballero

2009



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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1.Datos del alumno</p> <p>Apellido paterno: Apellido materno: Nombre: Universidad Facultad o escuela: Carrera: No. De cuenta:</p>	<p>1.Datos del alumno</p> <p>Ronquillo Vázquez Neri Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098173109</p>
<p>2.Datos del tutor</p> <p>Grado: Nombre (s): Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2.Datos del asesor</p> <p>M en C. Octavio González Caballero</p>
<p>3.Datos del sinodal 1</p> <p>Grado: Nombre (s): Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3.Datos del sinodal 1</p> <p>Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila</p>
<p>4.Datos del sinodal 2</p> <p>Grado: Nombre (s): Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4.Datos del sinodal 2</p> <p>Dr. Martín Mata Rosas</p>
<p>5.Datos del sinodal 3</p> <p>Grado: Nombre (s): Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5.Datos del sinodal 3</p> <p>M en C. Claudia Sánchez Espinosa</p>
<p>6.Datos del sinodal 4</p> <p>Grado: Nombre (s): Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6.Datos del sinodal 4</p> <p>Biol. María Concepción Guzmán Ramos</p>
<p>7. Datos de la tesis.</p> <p>Título: No. De páginas: Año:</p>	<p>7. Datos de la tesis.</p> <p><i>Regeneración in vitro</i> y Conservación <i>ex situ</i> de <i>Mammillaria theresae</i> Cutak p. 114 2009</p>

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una educación de calidad.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Jardín Botánico, del Instituto de Biología de la UNAM por brindarme la oportunidad de realizar la presente investigación en sus instalaciones.

A los integrantes de mi comité tutorial, por las enseñanzas y apoyo brindado durante el desarrollo de ésta investigación:

- ♦ M en C. Octavio González Caballero
- ♦ Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
- ♦ Biol. María Concepción Guzmán Ramos
- ♦ M en C. Claudia Sánchez Espinosa
- ♦ Dr. Martín Mata Rosas

A la Dra. Mabel Hernández Altamirano por su asesoría en los inicios de ésta investigación.

Al Biólogo Gabriel Olalde por iniciarme en el maravilloso mundo de las cactáceas, por tu apoyo, consejos y sobre todo por tu amistad, eres una gran persona.

A la M en C. Estela Sandoval Z. por permitirme usar las instalaciones del Laboratorio Anatomía Vegetal del Jardín Botánico IB-UNAM.

Al laboratorio de microcine de la Facultad de Ciencias, en particular a la M.F.P. Ana Isabel Bieler Antolin por tomar las microfotografías de las semillas de *M. theresae*.

Al laboratorio de Fotografía del Instituto de Biología por el apoyo fotográfico del injerto de *M. theresae*, en particular a la Biól. Carmen Loyola y a su asistente Mónica Vázquez.

A la Biól. Barbará Estrada por tus sugerencias, apoyo y amistad, durante la realización de esta investigación conocí a la excelente persona que eres.

A la M. en C. Dalia Goldhaber por sus enseñanzas brindadas durante el desarrollo de esta investigación.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, con su amistad y unión, hicieron de éste lugar, un sitio confortable de apoyo y crecimiento.

A los Biols. Sergio Valente Martínez y Miguel Hernández Alva por apoyarme con el material vegetal de *M. theresae*.

A la Psic. Yolanda Rendón Maus por su apoyo, comprensión y orientación.

A mis queridos hermanos César y Adrian, por quererme y cuidarme siempre, son mi motivo para lograr mis metas y sin duda son los mejores hermanos que pude tener.

A David por tu compañía, enseñanzas y apoyo incondicional, fuiste y serás una persona muy importante en mi vida (siempre tendrás un lugar en mi corazón).

A mi mejor amiga Ma. Concepción Monreal, por los buenos tiempos, tan divertidos.

A mi abuelito Alfonso, por demostrarme de lo que somos capaces no importando el tiempo.

A Guillermo Trujillo por ser un gran apoyo para mi familia, sin duda, eres un ejemplo a seguir por tu fortaleza.

A todos y cada uno de mis amigos que han compartido un momento de su vida conmigo.

A ti Alejandro Margain por el apoyo técnico proporcionado durante esta investigación, pero sobretodo, te agradezco tú amor y tiempo, haz formado parte de mi felicidad.

Dedicatoria

Esta investigación la dedico con mucho amor y respeto a dos personas muy especiales:

A mi Madre por darme la vida, su amor y apoyo incondicional

y

A mi Asesor Octavio por compartirme tus conocimientos, tiempo y sobre todo por tu amistad invaluable.

Son y serán siempre un ejemplo a seguir, gracias.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	V
Resumen	VI
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
I.1 Generalidades de la Familia Cactaceae	4
I.2 Género <i>Mammillaria</i>	4
I.3 Importancia comercial y uso de las cactáceas en México	5
I.4 Importancia biológica y ecológica de la Familia Cactaceae	7
I.5 Conservación y legislación en cactáceas	8
I.5.1 CITES	8
I.5.2 UICN	8
I.5.3 NOM-059-ECOL-2001	9
I.5.4 Conservación del germoplasma	9
I.5.5 Métodos de conservación	10
I.5.6 Conservación <i>in situ</i>	10
I.5.7 Conservación <i>ex situ</i>	11
I.5.8 Jardines botánicos	11
I.5.9 Bancos de germoplasma	12
I.5.10 Propagación y cultivo de cactáceas en viveros	12
I.5.11 Técnicas convencionales en el cultivo de cactáceas	12
I.6 Cultivo de Tejidos Vegetales	13
I.6.1 Morfogénesis <i>in vitro</i>	16
I.6.1.1 Embriogénesis somática	16
I.6.1.2 Organogénesis directa	16
I.6.1.3 Organogénesis indirecta	17
I.6.2 Variación somaclonal	17
I.6.3 Factores involucrados en la organogénesis	18
I.6.4 Explantes	18
I.6.5 Componentes del medio de cultivo	19
I.6.6 Medio de cultivo Murashige y Skoog	19

I.6.7	Reguladores de crecimiento	19
I.6.7.1	Auxinas	20
I.6.7.2	Citocininas	20
I.6.8	Enraizamiento <i>in vitro</i>	20
I.6.8.1	Factores que inducen el enraizamiento de los regenerantes en cultivos <i>in vitro</i>	21
I.6.8.2	Carbón activado	21
I.6.8.3	Las auxinas en el enraizamiento	21
I.6.8.4	Potencial osmótico	22
I.6.8.5	Suncaps	22
I.6.8.6	Hiperhidratación	23
I.6.9	Propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales de la Familia Cactaceae	23
I.6.10	Propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales en el género <i>Mammillaria</i>	25
I.7	<i>Mammillaria theresae</i> (Cutak, 1967)	28
I.7.1	Clasificación taxonómica	28
I.7.2	Descripción botánica de <i>Mammillaria theresae</i> (Cutak, 1967)	29
I.7.3	Importancia ecológica	30
I.7.4	Distribución geográfica	30
I.7.5	Descripción del hábitat	32
II.	JUSTIFICACIÓN	34
III.	OBJETIVOS	35
III.1	Objetivo general	35
III.2	Objetivos particulares	35
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	36
IV.1	Material biológico	36
IV.1.1	Semillas	36
IV.1.2	Plantas	36
IV.2	Desinfección y siembra de semillas	37
IV.3	Desinfección y siembra de los ejemplares adultos	38
IV.4	Inducción morfogénica de los podarios	38
IV.5	Cultivo <i>in vitro</i> de bases y ápices de tallos	39
IV.6	Inducción de secciones del cuerpo de tallo	39
IV.7	Peso seco del callo	39
IV.8	Individualización y enraizamiento de los brotes regenerados	40

IV.9	Aclimatización	40
IV.10	Análisis estadístico	40
IV.11	Análisis estructural	43
IV.12	Pruebas histoquímicas	45
IV.12.1	Almidón	45
IV.12.2	Aceites y grasas	45
IV.12.3	Proteínas	45
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
V.1	Desinfección y germinación de semillas	46
V.2	Desinfección y siembra de los ejemplares adultos	48
V.3	Inducción de los brotes a partir de podarios	49
V.4	Tipos de brotes obtenidos	52
V.5	Cultivo <i>in vitro</i> de ápices de tallos	53
V.6	Cultivo <i>in vitro</i> de bases de tallos	56
V.7	Cultivo <i>in vitro</i> de secciones del cuerpo de tallo	59
V.8	Comparación entre los tres tipos de explante	62
V.9	Correlación entre el número de brotes y peso seco de callo	64
V.10	Regeneración a partir de raíces	65
V.11	Individualización y enraizamiento de los brotes regenerados	66
V.12	Aclimatización	69
V.13	Secuencia cronológica del desarrollo de <i>Mammillaria theresae</i>	72
V.14	Análisis estructural	73
V.14.1	Callo	73
V.14.2	Nódulos	75
V.14.3	Brotes en formación	76
V.14.4	Plántula	77
V.15	Pruebas histoquímicas	80
V.15.1	Almidón	80
V.15.2	Lípidos	81
V.15.3	Proteínas	82
V.16	Conservación <i>ex situ</i>	83
V.16.1	Parque Ecológico Huayamilpas	83
V.16.2	Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec	84
V.16.3	Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM	84

VI. CONCLUSIONES	87
VII. BIBLIOGRAFÍA	90
VIII. APÉNDICE	109

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABT	Alcohol butílico terciario
AIA	Ácido indol-3-acético
ANA	Ácido α -naftalen acético
BA	6-Benciladenina
CITES	Convención sobre el Tráfico Internacional de Especies de Flora y Fauna Amenazadas
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
EDC	Ecorregión del Desierto Chihuahuense
2iP	N-6 dimetil alil aminopurina
KIN	Kinetina
mEq/l	Miliequivalente por litro
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
MS 50%	Medio de cultivo Murashige y Skoog a la mitad de su concentración de sales inorgánicas
PPM	Plant Preservative Mixture®
QHAZ	Zona Árida Querétaro-Hidalguense
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales

Resumen

Mammillaria theresae Cutak (Cactaceae) es una especie endémica de la Sierra de Coneto (Durango), restringida a 2.5 km², sus poblaciones están disminuyendo debido a la ampliación de un camino entre Coneto y Nuevo Ideal (es un tramo de la carretera entre Torreón, Coahuila y Culiacán, Sinaloa) y al saqueo ilegal. En la NOM-059-ECOL-2001 está catalogada como amenazada (A) y no hay reportes de que se encuentre en la colección de algún jardín botánico de México. Por lo tanto, son requeridas acciones inmediatas que eviten su desaparición.

En esta investigación se exploró la germinación de semillas, a partir de un lote de 65 semillas maduras, al término de 2 meses sólo germinó 1 de ellas, lo que parece indicar que existen severas limitaciones en la germinación *in vitro* de la especie. A partir de 3 plantas adultas se exploró el potencial morfogénico de 4 tipos de explantes: podarios, cuerpo de tallo, secciones apicales y basales de tallos, éstos fueron sembrados asépticamente en medio MS adicionado con distintas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y 6-Benciladenina (BA) solas o en combinación. Al término de 8 meses de iniciados los cultivos respondieron con la formación de brotes vía organogénesis directa e indirecta; 1,866 brotes por vía directa y 1,495 por vía indirecta, dando un total de 3,361 brotes. A partir del explante lateral, el tratamiento que registró la respuesta más favorable, fue el 1 (0.1/2.0 ANA/BA mg/l) con 757 brotes, seguido del explante apical en el tratamiento 2 (0.1/3.0 ANA/BA mg/l) con un total de 367 brotes y para el cuerpo del tallo fue el tratamiento 4 (0.1/4.0 ANA/BA mg/l) con 90.33 promedio de brotes por explante. En todos los explantes existió una relación directamente proporcional entre el peso seco de callo generado y el número de brotes obtenidos por explante, por lo que se podría decir, que el cuerpo del tallo fue el explante que generó el mayor número de brotes, sin embargo, los brotes no presentaron una morfología normal debido posiblemente a la vía indirecta de regeneración y a los reguladores de crecimiento empleados durante la inducción. Por medio del análisis estructural fue caracterizado el desarrollo de los brotes a partir de callo. Las plantas obtenidas, fueron aclimatizadas, con un porcentaje de sobrevivencia del 86% al término de seis meses. Y al cabo de un año éstas florecieron.

Las plantas regeneradas se integraron en lotes de 25 plantas y 1 poster informativo de la misma, a tres Jardines Botánicos de la Ciudad de México.

La presente investigación tiene implicaciones directas en la conservación de *Mammillaria theresae*, así como de otras especies de cactáceas en serio riesgo de extinción.

I. INTRODUCCIÓN

La Familia Cactaceae, es originaria de América con excepción de algunas especies de *Rhipsalis* y *Opuntia*, que actualmente forman parte de la flora introducida en varias regiones de los restantes continentes (Arias, 1997). Las cactáceas se han diversificado en un considerable número de especies y formas de vida, adquiriendo varias adaptaciones morfológicas y reproductivas. Se han establecido en varios ecosistemas, aunque se postula que tal hecho fue favorecido por la aparición de zonas áridas y semiáridas, en las cuales se distribuye el 70% de esta Familia (Arias, 1997).

En el Continente Americano se reconocen dos centros principales de diversidad de las cactáceas (Robbins, 2003). Uno ubicado en Norteamérica que abarca la región Norte-centro de México al Suroeste de los Estados Unidos, que es la frontera general de la Ecorregión del Desierto Chihuahuense (EDC) y el segundo en Sudamérica, en la zona árida y semiárida del Suroeste de la región andina (Perú, Chile y Argentina) (Robbins, 2003). Para México se conocen principalmente dos regiones ricas en especies y alto grado de endemismo: las regiones Sureste y Este de la EDC y la Zona Árida Querétaro-Hidalguense. No obstante, existen otros centros de alta diversidad de cactáceas, como el Desierto de Sonora, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la Cuenca del Río Balsas cerca del Istmo de Tehuantepec (Hernández y Godínez, 1994).

El Desierto Chihuahuense es una región de 507 mil kilómetros cuadrados, que abarca territorios del Centro-Norte de México y una parte del Sur de los Estados Unidos, concentrando 329 especies de cactáceas, lo que representa casi 60% de las especies mexicanas y más de 20% del total continental. Los géneros mejor representados en términos de su número de especies son *Mammillaria* (79 spp.), *Opuntia s. str.* (46 spp.), *Coryphantha* (36 spp.) y *Echinocereus* (30 spp.) (Hernández *et al.*, 2004). Por ello, el Desierto Chihuahuense es el mayor centro de diversidad de México para éste grupo botánico, sin embargo, la riqueza cactológica no se distribuye de manera uniforme, sino que existen núcleos de concentración de especies o sitios altamente diversos, que son áreas muy pequeñas en relación con la extensión total de esta unidad geográfica. Casi invariablemente, la riqueza local en estos núcleos está determinada por las especies endémicas o microendémicas, lo que se traduce en una composición variada y única. La máxima concurrencia de especies de cactáceas amenazadas se da en la porción

Sureste del Desierto Chihuahuense, particularmente los estados de Coahuila (29 spp.), San Luis Potosí (26 spp.), Tamaulipas (25 spp.), Nuevo León (24 spp.) (Hernández-Oria *et al.*, 2007; Hernández y Godínez, 1994).

México es el más importante centro de concentración de cactáceas, con un total de 48 géneros, 684 especies (Hunt, 1999) y un endemismo de 77.9%. El endemismo en la Familia Cactaceae a nivel de especie parece ser un fenómeno generalizado, principalmente en los países de América en donde se presentan climas áridos, semiáridos o con precipitación altamente estacional.

No obstante la enorme riqueza en la cactoflora de las regiones áridas y semiáridas de la zona Norte-centro de México, éstas poseen las concentraciones más altas de cactáceas amenazadas del mundo (197 especies), las cuales representan 35% total de las especies mexicanas, pero desafortunadamente dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas están mal representadas. (Hernández y Godínez, 1994; Hernández y Bárcenas 1995, 1996). Existen 285 especies de la Familia Cactaceae, de las cuales 33 están en peligro de extinción, 88 amenazadas, 177 en protección especial y 249 endémicas. Toda esta Familia se encuentra en el apéndice II de CITES, es decir, son especies que no están necesariamente amenazadas de extinción, pero que podrían llegar a estarlo a menos que se controle estrictamente su comercio. Del género *Mammillaria* se enlistan 43 especies en la UICN y 2 en el apéndice I de CITES.

Las perturbaciones causadas por nuestras actividades, disminuyen el área de distribución de las especies y reducen a las poblaciones gradualmente. Cuando las poblaciones son pequeñas su riesgo a la extinción aumenta debido a diversos factores. Las poblaciones pequeñas son más susceptibles a desaparecer por fenómenos naturales como incendios, ciclones, sequías, etc.; son más susceptibles a la pérdida de variabilidad genética, ya que cada vez están más emparentados. Al ir perdiendo poblaciones de una especie, el tamaño de la población disminuye y se va perdiendo su variabilidad genética (Ceballos 2001), tal es el caso de *M. theresae* (López-Enríquez *et al.*, 2003).

Mammillaria theresae Cutak (Cactaceae), es una especie endémica de la Sierra de Coneto, localizada en el centro del estado de Durango (México) al oriente de la Sierra Madre Occidental y en el límite occidental del Desierto Chihuahuense. Por su condición de serranía aislada, la

Sierra de Coneto es de interés ecológico y fitogeográfico; *M. theresae* presenta una distribución restringida de 2.5 km², sus poblaciones están disminuyendo debido a la ampliación de un camino entre Coneto y Nuevo Ideal, en un tramo de la carretera entre Torreón, Coahuila y Culiacán, Sinaloa; debido a su distribución restringida, tamaño de población, disturbio y fragmentación de su hábitat, *M. theresae* califica en la categoría de en “peligro de extinción” (López-Enríquez *et al.*, 2003).

La conservación a través de la reproducción artificial y propagación masiva de plantas de gran demanda comercial es el instrumento más importante a favor de la preservación, lo que disminuirá la presión en la extracción de especies en el campo, para hacer incosteable el saqueo ilegal (Dehgan y Almira, 1990; Sánchez *et al.*, 1995; Vovides, 1995; Malda, *et al.*, 1999).

El Cultivo de Tejidos Vegetales es el conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales, el cual se basa en el principio de totipotencialidad celular postulado por Haberlandt (Pérez, 1998), la totipotencialidad es la capacidad de las células o tejidos para formar todo tipo de células y/o regenerar una planta completa (Pierik, 1990).

El Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, emplea esta técnica para la conservación de los recursos genéticos vegetales, y ha logrado la micropropagación de diferentes especies de cactáceas, orquídeas y cícadas mexicanas en peligro de extinción, sólo por citar algunas cactáceas están, *Mammillaria san-angelensis*, *M. luethyi*, *Turbincarpus pseudopectinatus* (Chávez y Rubluo, 1995; Vovides, 1995).

En el presente estudio se generaron nuevos conocimientos de la especie *Mammillaria theresae* (cactácea amenazada), la cual fue micropropagada *in vitro*, se estableció un protocolo de producción masiva, para satisfacer la demanda comercial y evitar o disminuir el saqueo de individuos silvestres, asimismo éste protocolo puede aplicarse a otras cactáceas amenazadas o en peligro de extinción, además de realizar su conservación *ex situ* en tres jardines botánicos de la Ciudad de México.

II. ANTECEDENTES

II.1. Generalidades de la Familia Cactaceae

La Familia Cactaceae comprende aproximadamente 2000 especies y se divide en tres subfamilias: 1) Subfamilia Pereskioideae, en ésta se agrupan las especies con los caracteres más primitivos de la familia. Se conocen dos géneros: *Pereskia* y *Maibuenia*. 2) Subfamilia Opuntioideae. 3) Subfamilia Cactoideae, es la que más especies presenta y comprende aproximadamente 110 géneros (Gibbons y Nobel, 1986; Bravo-Hollis, 1978).

México es el centro de diversificación más importante del mundo, presenta la concentración más alta de cactáceas con aproximadamente 55 géneros y 850 especies (Rzedowski, 1983), una revisión más reciente de Arias (1997) reporta alrededor de 100 a 110 géneros y más de 1500 especies.

Las cactáceas son un grupo de plantas con características biológicas y ecológicas particulares: crecimiento lento con ciclos de vida largos, tasas bajas de reclutamiento, poblaciones con muy baja densidad, patrones de distribución restringidos y habitan sitios con condiciones edáficas específicas, lo que ha propiciado altos niveles de endemismo, haciéndolas vulnerables a diversos factores de perturbación naturales y humanos (Hernández y Godínez, 1994; Godínez-Álvarez *et al.*, 2003). El hombre ha acrecentado este problema con el cambio de uso de suelo y la intensa sobrecolecta de las especies, ésta última tiene implicaciones serias para la conservación de aquellas especies cuyas poblaciones están ya extremadamente restringidas o amenazadas por otros factores (Hernández y Godínez, 1994; Robbins, 2003; Godínez-Álvarez *et al.*, 2003).

Uno de los géneros de cactáceas más amenazados que requiere ser estudiado y conservado es *Mammillaria*.

II.2. Género *Mammillaria*

El nombre proviene del griego *mamilla* = tubérculo o mamila; *Mammillaria* = planta portadora de mamilas o tubérculos (Scheinvar, 2004).

El género *Mammillaria* es ecológicamente uno de los grupos más diversos, con mayor número de especies (200) y en proporción, uno de los menos estudiados tanto desde el punto de vista taxonómico como ecológico (Gibson y Nobel, 1986). Bravo-Hollis (1991) describió

221 especies, E.F. Anderson (2001) reconoció 171 especies y Benítez y Dávila (2002) mencionan 350 especies.

México es el centro de diversificación de este género con 160 especies de las cuales 150 son endémicas de nuestro país, en el sur, suroeste de Estados Unidos se localizan 20 especies y en Centroamérica y las Antillas sólo tres especies (Arias, 1997; Hernández y Godínez, 1994).

II.3. Importancia comercial y uso de las cactáceas en México

Desde la época prehispánica principalmente en los pueblos regionales del territorio nacional, las cactáceas se han aprovechado en la dieta alimenticia de los seres humanos: frutos, tallos, flores, semillas y raíces (**Tabla 1**), ya que poseen un gran contenido de agua, azúcar y en menor cantidad fibra, proteínas, vitaminas, calcio, etc. (Sánchez-Mejorada, 1982; Viguera y Portillo, 2002). Actualmente son plantas de gran interés, por su uso y potencial como fuente de materia prima para la obtención de productos y subproductos en la industria químico-farmacéutica, alimenticia, del vestido, artesanal y ornamental, adquiriendo un importante valor comercial en mercados internacionales de países como: Alemania, Holanda, Francia, Italia, etc. (Franco, 1997).

Tabla 1. Usos de algunas Cactáceas Mexicanas (Basado en Sánchez-Mejorada, 1982 y Guzmán et al., 2003)

SEGMENTO EMPLEADO	USOS	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN EN MÉXICO
FRUTOS	Alimento	<i>Coryphanta erecta</i>	Gto, Hgo, Qro, SLP.
		<i>Ferocactus histrix</i>	Hidalgo, Qro, SLP.
		<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	Pbla, Oax.
		<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	Centro y sur de México
		<i>Cylindropuntia fulgida</i>	Sin, Son.
		<i>Cylindropuntia imbricata</i>	Norte y centro de México
		<i>Cylindropuntia arbuscula</i>	Sin, Son.
		<i>Opuntia robusta</i>	Chi, DF, Dgo, Gto, Hgo, Jal, Qro, SLP, Son, Zac, Mich.
		<i>Pereskiaopsis aquosa</i>	Dgo, Jal, Nay.
		<i>Polaskia chichipe</i>	Oax y Pbla.
		<i>Selenicereus spinulosus</i>	Hgo, NL, Pbla, Qro, SLP, Tam, Ver.
		<i>Stenocereus fricii</i>	Col, Gro, Jal, Sin, Mich.
		<i>Stenocereus griseus</i>	México
	Bebida alcohólica	<i>Carnegia gigantea</i>	Son.
<i>Pachycereus pringlei</i>		BCN, BCS, Son.	
<i>Stenocereus gummosus</i>		BCN, BCS, Son.	

		<i>Stenocereus thurberi</i>	BCN, BCS, Chi, Son, Sin.
TALLOS	Alimento	<i>Echinocactus platyacanthus</i>	Coa, Gto, Hgo, NL, Oax, Pbla, Qro, SLP, Tam, Zac.
		<i>Ferocactus histrix</i>	Ags, Dgo, Gto, Hgo, Jal, Mich, Qro, SLP, Zac.
	Forraje	<i>Cylindropuntia bigelovi</i>	BCN, BCS, Son.
		<i>Backebergia militaris</i>	Gro, Jal, Mich.
		<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	Chis, Oax.
	Construcción	<i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	Puebla
		<i>Stenocereus weberi</i>	Gro, Mich, Mor, Oax, Pbla.
	Medicinal	<i>Lophocereus schottii</i>	BC, BCS, Son, Sin.
		<i>Lophophora williamsii</i>	Chi, Coa, NL, SLP, Tam, Zac.
		<i>Mammillaria heyderi</i>	Chi, Coa, Dgo, NL, SLP, Son, Tam, Ver, Zac.
Ornamental	<i>Pelecyphora aselliformis</i>	SLP.	
	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hgo, Qro.	
	<i>Ariocarpus fissuratus</i>	Chi, Coah, Dgo, NL, SLP, Tam, Zac.	
Setos vivos	<i>Marginatocereus marginatus</i>	Ags, Col, Dgo, Edo Mex, Gto, Gro, Hgo, Jal, Mich, Mor, Oax, Pbla, Qro, SLP, Zac.	
Colorante (indirectamente)	<i>Opuntia tomentosa</i>	DF, Gto, Gro, Hgo, Jal, Edo Mex, Mich, Mor, Oax, Puebla, Qro, SLP.	
Veneno (peces) Jabón	<i>Stenocereus eruca</i> <i>Peniocereus greggii</i>	BC, BCS. Chih, Coah, Dgo, NL, Son, Zac.	
FLORES	Pegamento Alimento	<i>Stenocereus thurberi</i>	BC, BCS, Chih, Son, Sin
		<i>Ferocactus stainesii</i>	Coah, Dgo, NL, SLP, Tam, Zac.
		<i>Ferocactus wislizenii</i>	Chih, Sin, Son.
	Ornamental	<i>Cylindropuntia versicolor</i>	Son.
		<i>Opuntia auberi</i>	Chis, Gro, Oax.
	<i>Mammillaria theresae</i> <i>Pelecyphora strobiliformis</i>	Dgo. NL, SLP, Tam.	
RAÍCES	Alimento	<i>Neoevansia striata</i>	Son.
SEMILLAS	Alimento	<i>Ferocactus cylindraceus</i>	BC, Son.
		<i>Ferocactus emoryi</i>	Sin, Son.
		<i>Pachycereus pringlei</i>	BC, BCS, Son.
PELOS	Textiles	<i>Cephalocereus purpusii</i>	Sinaloa, Nayarit
ESPINAS	Peine	<i>Pachycereus pecten-aborigenum</i>	BCS, Chis, Chih, Col, Gro, Jal, Mich, Nay, Oax, Son, Zac.

Ags: Aguascalientes, BC: Baja California, BCS: Baja California Sur, Chi: Chihuahua, Chis: Chiapas, Coa: Coahuila, Col: Colima, Dgo: Durango, Edo Mex: Estado de México, Gro: Guerrero, Gto: Guanajuato, Hgo: Hidalgo, Jal: Jalisco, Mich: Michoacán, Mor: Morelos, Nay: Nayarit, NL: Nuevo León, Oax: Oaxaca, Qro: Querétaro, SLP: San Luis Potosí, Sin: Sinaloa, Son: Sonora, Tam: Tamaulipas, Ver: Veracruz, Zac: Zacatecas.

II.4. Importancia biológica y ecológica de la Familia Cactaceae

Las cactáceas son de gran importancia biológica y ecológica: 1) brindan oxígeno al medio, además su metabolismo ácido crasuláceo (CAM) les permite sobrevivir bajo condiciones de extrema desecación, 2) ante el alto grado de perturbación ambiental, las cactáceas se perfilan como una alternativa para evitar la degradación de los suelos deforestados, debido a su capacidad de adaptación a suelos infértiles y terrenos abruptos con pendientes, sus raíces forman una red que se extiende en ocasiones a muchos metros de distancia de la planta y a sólo unos pocos centímetros de profundidad en el suelo, lo cual ayuda a evitar la erosión de tipo eólico e hídrico (Bidwell, 1979; Bravo, 1937). 3) las interacciones con otras especies, como sitios de anidamiento de diversas especies de aves y mamíferos debido a la protección que brindan por su alta densidad de espinas, pero principalmente como fuente de alimento (forraje rico en agua, valioso en periodos de sequía) (Pimienta, 1997).

Por ejemplo, las nopaleras son un peculiar tipo de vegetación abundante y a veces predominante en grandes extensiones de la porción sur del Desierto Chihuahuense. Se estima que hoy en día las nopaleras naturales ocupan un área cercana a los tres millones de hectáreas, de las cuales 60% se localiza en Zacatecas, San Luis Potosí y Jalisco. Los frutos alimentan a diversas especies de animales, en el Norte del país los tallos y las tunas de los nopales son elementos importantes en la dieta de pecaríes, venados, pavos silvestres y tortugas de desierto (Hernández, 2006). En el Estado de Tamaulipas *Myrtillocactus geometrizans*, *Stenocereus griseus* y *Opuntia lindheimeri* constituyen la principal fuente de alimento en la dieta de 3 mamíferos *Lepus californicus* (liebre), *Spermophilus spilosoma* (ardilla de tierra) y *Bassaricus astutus* (cacomixtle) (Hernández, 1991). En el Desierto Sonorense las cactáceas columnares ejercen un fuerte efecto en el ecosistema debido a que proporcionan recursos abundantes a diversos insectos y mamíferos, atraídos por flores de colores brillantes, aromas y alimento: néctar, polen y frutos. Las flores de *Carnegiea gigantea* (saguaro), *Pachycereus pringlei* (cardón) y *Stenocereus thurberi* (pitayo dulce) son polinizados por murciélagos, colibríes y abejas melíferas, mientras *Pachycereus schottii* (sinita) ha desarrollado una relación mutualista con *Upiga virescens* (palomilla pirálida) para su polinización (Hernández, 2006).

II.5. Conservación y legislación en cactáceas

II.5.1. CITES

A nivel internacional la **CITES** es un organismo administrado por la Organización de las Naciones Unidas en el que participan 173 países (<http://www.cites.org>). Su función es regular a nivel mundial el comercio de las especies silvestres, animales y vegetales amenazadas de extinción, al mismo tiempo promover la conservación y el aprovechamiento sustentable de la vida silvestre (Glass, 1998; Álvarez *et al.*, 2003). Las especies están clasificadas en tres apéndices (I, II, III). El apéndice I incluye todas las especies silvestres en peligro de extinción y que no pueden ser extraídas con fines comerciales de sus hábitats, únicamente se permite el comercio de plantas propagadas y cultivadas en vivero; en el apéndice II están inscritas las especies que actualmente no se encuentran en riesgo de extinción pero que podrían estarlo si no se vigila y controla su comercio al permitirse su colecta y cultivo en viveros; y en el apéndice III se encuentran las especies silvestres de un país en particular, cuyo aprovechamiento está reglamentado por la legislación interna y que para su protección requiere la cooperación de los países que la integran (<http://www.cites.org>; Franco, 1997). La CITES incluye dentro de sus apéndices alrededor de 22,330 especies de plantas de todo el mundo. Las cactáceas son uno de los grupos de plantas más apreciados y su demanda en el mercado internacional de plantas ornamentales es de las más importantes. Se sabe que existe un intenso saqueo ilegal de estas plantas y semillas con el fin de satisfacer este mercado, especialmente hacia EUA, Japón y Europa (Benítez y Dávila, 2002). En consecuencia, toda la Familia Cactaceae se encuentra en el Apéndice II y 32 especies en el Apéndice I de los géneros *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Coryphantha*, *Disocactus*, *Echinocereus*, *Escobaria*, *Mammillaria*, *Melocactus*, *Obregonia*, *Pachycereus*, *Pediocactus*, *Pelecyphora*, *Sclerocactus*, *Strombocactus*, *Turbinicarpus* y *Uebelmannia* (Benítez y Dávila, 2002). La reproducción o propagación artificial de estas especies constituye una opción viable para satisfacer su demanda y contribuir a su conservación.

II.5.2. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), es la red ambiental de carácter global más grande y antigua del mundo (Robbins, 2003). La UICN es una unión democrática que reúne a más de 1,000 organizaciones gubernamentales y no gubernamentales, además de unos 11,000 científicos voluntarios y expertos en alrededor de 160 países (<http://www.iucn.org/>). La **Lista Roja** de la UICN es el inventario más completo del estado

de conservación de las especies de animales y vegetales a nivel mundial. Para evaluar el grado de peligro de un taxón, utiliza un conjunto de criterios biológicos y ecológicos, considerando determinantes clave el tamaño de la población y el rango geográfico. Estos criterios son aplicables a todas las especies del mundo. Este listado en el año 2008 presentó 157 especies de la Familia Cactaceae en estas categorías: 2 extintas del medio silvestre (*Mammillaria glochidiata* y *M. guillauminiana*), 33 en peligro crítico (*M. herrerae* y *M. marcosii*, sólo por citar algunas), 27 en peligro, 51 vulnerables, 14 cerca de estar en peligro, 10 con datos deficientes y 20 con bajo riesgo (<http://www.iucnredlist.org/>).

II.5.3. NOM-059-ECOL-2001

En México se han instrumentado diversas disposiciones legales tanto de carácter general y específico con incidencia de conservación, protección, aprovechamiento y comercio de la flora silvestre del país (Franco, 1997).

El 6 de marzo del 2002, fue publicado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), la Norma Oficial Mexicana (**NOM-059-ECOL-2001**), que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestre terrestre y acuáticas en peligro de extinción (P), amenazadas (A), sujetos a protección especial (Pr) y las extintas en el medio silvestre, y establece especificaciones para su protección. La **NOM-059-ECOL-2001** enlista 285 especies de la Familia Cactaceae de las cuales 33 están en peligro de extinción, 88 amenazadas, 177 en protección especial y 249 endémicas, del género *Mammillaria* se incluyen 118 especies de las cuales, 26 están amenazadas, 83 en protección especial y 9 en peligro de extinción (Diario Oficial de la Federación, 2002).

II.5.4. Conservación del germoplasma

Desde que el hombre primitivo aprendió a cultivar, se percató de la importancia de conservar semillas selectas o propágulos vegetales para las siguientes estaciones, esto se puede considerar como la primera práctica en la conservación del germoplasma (Razdan, 2003).

Actualmente actividades humanas como la tala indiscriminada para la agricultura, la industrialización, urbanización y todas las medidas tomadas para un desarrollo económico afectan al ecosistema de manera adversa. En estos procesos, existe un agotamiento de los recursos genéticos botánicos naturales. Tal es el daño que el rango de las plantas superiores que son raras, amenazadas o en el umbral de la extinción va de las 2000 a las 60000 especies a

nivel mundial. Indudablemente, algunos de los recursos genéticos importantes pueden ser perdidos a menos de que se tomen acciones coordinadas para la conservación de los stocks genéticos en el mundo (Razdan, 2003).

II.5.5. Métodos de Conservación

II.5.6. Conservación *in situ*

Este método de conservación se enfoca principalmente a la preservación de especies silvestres donde existe una diversidad genética (Razdan, 2003). Consiste en proteger los ecosistemas naturales manteniendo las poblaciones de las especies que los componen o recuperarlas si se han deteriorado. Entre estas estrategias se encuentran las áreas naturales protegidas, sitios legalmente protegidos, donde el medio no ha sufrido perturbaciones significativas a causa del hombre (Franco, 1997). Además se realizan actividades de reintroducción, cuando la viabilidad de las poblaciones está en riesgo, la propagación artificial de plantas contemplando la diversidad genética y su posterior reintroducción en los ambientes naturales, existiendo experiencias incipientes en ese sentido (Rivas, 2001; Baena *et al.*, 2003). Por mencionar algunos ejemplos de especies regeneradas *in vitro*, que posteriormente fueron reintroducidas están *M. san-angelensis* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), *Escobaria minima*, *M. pectinifera* y *Pelecypora aselliformis* (Giusti *et al.*, 2002) y *Pilosocereus spp.* (Quiala *et al.*, 2007).

México posee 168 áreas naturales protegidas, cabe destacar las que poseen ecosistemas de zonas áridas y semiáridas como la Reserva de la Biosfera de Mapimí, en Durango; El Cielo en Tamaulipas; El Pinacate, el Gran Desierto de Altar, la Reserva Especial de la Biósfera Cajón del Diablo, en Sonora; el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, en Nuevo León, el Cañón de Santa Elena en Chihuahua y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán entre Puebla y Oaxaca (<http://www.conanp.gob.mx/sig/>).

La conservación *in situ* de hábitats ha recibido una prioridad alta en los programas mundiales de estrategias de conservación desde 1980, sin embargo, este modo de conservación tiene sus limitaciones. Existe un riesgo de que el material genético se pierda debido a los peligros ambientales, además, los costos de mantenimiento de genotipos en áreas naturales protegidas pueden ser muy altos (Razdan, 2003).

II.5.7. Conservación *ex situ*

La conservación *ex situ* es aquella en la que separan a las especies de su hábitat natural para su preservación en bancos de germoplasma, jardines botánicos, colecciones en campo, colecciones *in vitro*, etc. Para que en un futuro puedan ser reintroducidos en su hábitat natural (Sánchez *et al.*, 1995).

La conservación *ex situ* es el modo principal para la conservación de recursos genéticos, y puede incluir material silvestre y domesticado. Generalmente, semillas o plantas en estado *in vitro* (pueden ser inclusive células, tejidos u órganos), son preservados bajo condiciones apropiadas para el almacenamiento por largo tiempo en bancos genéticos. Esto requiere un conocimiento considerable de la estructura genética de las poblaciones, de técnicas de muestreo, métodos de regeneración, y el mantenimiento de la variedad genética de las especies, particularmente de las plantas con polinización cruzada (Razdan, 2003).

II.5.8. Jardines botánicos

Son instituciones que mantienen colecciones de plantas vivas con fines de investigación científica, conservación y educación, permitiendo la preservación de muestras de la flora y su diversidad genética en pequeñas áreas, contribuyendo así a la protección y conservación de especies silvestres, especialmente raras y amenazadas por la extinción (Franco, 1997).

Los jardines botánicos mexicanos son potenciales centros en el conocimiento y desarrollo de métodos de propagación de especies silvestres amenazadas. Los listados de especies amenazadas han permitido a los jardines botánicos fijar metas de rescate y propagación de germoplasma. Por ejemplo, de acuerdo con un análisis de Vovides (1995), doce jardines botánicos mexicanos albergan por lo menos 35% de las plantas mexicanas que presentan algún riesgo de extinción (Vovides, 1988). Hoy existen líneas de investigación sobre la propagación y uso sustentable de plantas amenazadas Vovides *et al.*, 1997).

Hernández y Sánchez (2000) realizaron una investigación sobre la conservación de la Familia Cactaceae en las colecciones de 19 jardines botánicos de México, encontraron que de 384 especies, sólo 116 especies son propagadas y de estas 108 tienen alguna categoría en la NOM-ECOL-059-1994. Es evidente que los jardines botánicos ya están desempeñando un papel importante en el conocimiento de las especies en peligro de extinción, no obstante,

queda un mucho trabajo por hacer, en cuanto a la investigación, propagación, fenología y ecología de poblaciones de las especies amenazadas (Vovides, 1995).

II.5.9. Bancos de germoplasma

La creación de bancos genéticos representa una de las más importantes posibilidades para lograr la preservación de la riqueza genética en el mundo. La forma más eficiente es el almacenamiento de semillas, aunque en ciertos casos es difícil; por ejemplo las plantas con semillas recalcitrantes o especies de reproducción vegetativa. En esta situación, la implantación de bancos genéticos requiere de un fuerte apoyo de investigación en el campo de cultivo de tejidos vegetales (Blanco, 1985).

La preservación *in vitro* se puede efectuar por dos vías: corto-mediano plazo, en la que se limita el crecimiento de las plántulas *in vitro*, por ejemplo mediante bajas temperaturas o inductores de estrés osmótico. Y la vía del largo plazo, en la que los tejidos se almacenan a temperaturas muy bajas -190°C (Temperatura del nitrógeno líquido) (Rubluo 1985).

Los métodos *in vitro* son los más útiles para la conservación de las plantas propagadas por este método, especies con semillas recalcitrantes y organismos modificados genéticamente. Las ventajas de estos métodos son: el espacio reducido para el almacenaje de una gran cantidad de plantas clonadas, el mantenimiento de estas plantas en un medio aséptico, la protección a daños ambientales, la disponibilidad de una reserva de material para su propagación a gran escala, y la minimización de los obstáculos impuestos por leyes de cuarentena (Razdan, 2003).

II.5.10. Propagación y cultivo de cactáceas en viveros

Otra estrategia de conservación *ex situ* es la propagación y cultivo de cactáceas en viveros. Son unidades de producción que actúan como reservorios de germoplasma conservando una parte de la variabilidad genética de la diversidad vegetal. La propagación y cultivo de cactus contribuye a disminuir presiones de colecta sobre las poblaciones silvestres. La propagación en viveros se lleva a cabo por vía sexual y asexual (Franco, 1997).

II.5.11. Técnicas convencionales en el cultivo de cactáceas

Las plantas suculentas se multiplican por dos vías distintas, la reproducción sexual mediante semillas y la propagación vegetativa mediante esquejes, vástagos e injertos (Reyes, 1997).

La semilla es un órgano vegetal que cumple una serie de funciones importantes como: reproducción, diseminación en el hábitat y dispersión a nuevos sitios colonizables (Vázquez y Rodríguez, 1995). La propagación por semilla es el más importante debido a la variación genética que presenta, sin embargo, el problema de la propagación de cactáceas por semillas es que se requiere de condiciones específicas, ya que el porcentaje de germinación puede depender de la especie y edad de la semilla, así como de la temperatura, humedad y las condiciones de luz (Beristain, 1997).

La propagación vegetativa en cactáceas se puede facilitar debido a que son plantas articuladas, es decir, cuando la planta da lugar a nuevos brotes, se forma un tallo o segmento, el cual es capaz de enraizar y desprenderse del cuerpo originando un nuevo individuo, sin embargo, no todas las especies son capaces de multiplicarse vegetativamente, algunas sólo lo hacen a partir de semilla como *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Turbiniacarpus*, etc. (Arreola, 1997).

Los vástagos o hijuelos son brotes que proliferan en algunas cactáceas globosas como *Mammillaria*, *Epithelantha*, *Echinocereus*, etc., se desprenden los brotes que emergen alrededor de la planta madre, una vez separados se dejan cicatrizar de 10 a 15 días en un sitio seco y ventilado; después se plantan en un sustrato similar al utilizado para plántulas. La ventaja de este método, es la rápida obtención de plantas adultas y la desventaja consiste en la carencia total de recombinaciones genéticas, importante en la conservación (Reyes, 1997).

El método de propagación por injerto acelera el crecimiento de las plántulas y vástagos. Consiste en unir porciones de dos plantas distintas, una llamada patrón y la otra injerto. Se utiliza en las cactáceas y en otras plantas para ayudar a aquellas que tienen dificultad para vivir directamente en el suelo, ya que puede acelerar el desarrollo y crecimiento de plantas que han perdido el sistema radicular, por ejemplo, plantas que hayan sufrido de alguna enfermedad en la raíz causada por hongos, bacterias o ácaros, ocasionando su pudrición o también en el caso de plantas decomisadas que fueron dañadas por el saqueo ilegal (Reyes, 1997; Terrazas, 1995).

El Cultivo de Tejidos Vegetales es otra técnica de propagación, pero difiere de los métodos convencionales en que los intervalos de regeneración son mucho más eficientes y la multiplicación de plantas es mayor; una muestra de ello son los más de 500 millones de plantas cultivadas producidas al año por esta técnica (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2000).

II.6. Cultivo de Tejidos Vegetales

Los términos micropropagación, propagación *in vitro* y propagación por cultivo de tejidos, se definen como el conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales, el cual se basa en el principio de totipotencialidad celular postulado por Haberlandt (Pérez, 1998), la totipotencialidad es la capacidad de las células o tejidos para formar todo tipo de células y/o regenerar una planta completa (Pierik, 1990).

Dentro de la biotecnología, es la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y química vegetal hasta la obtención de plantas libres de patógenos, conservación y propagación masiva de especies que estén en peligro de extinción, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y selección *in vitro* y la ingeniería genética (Jiménez, 1998).

En México esta actividad se inició en 1970 con la firma de un Convenio de Colaboración Científica entre México y Japón que trajo a investigadores japoneses al Colegio de Posgraduados de Chapingo. Posteriormente un grupo de investigadores del Departamento de Bioquímica Vegetal de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM, comenzó a emplear las técnicas de cultivo de células y tejidos vegetales como una nueva metodología, de gran potencial, para apoyar la investigación bioquímica básica en las plantas (Robert y Loyola, 1985).

Actualmente existen distintas instituciones que emplean este método en investigaciones básicas y aplicadas, como el Instituto Tecnológico de Estudios superiores de Monterrey, campus Querétaro (ITESM-CQ) propagó 105 especies de cactáceas, de las cuales 62 son nativas a este estado (Martínez y Martínez, 2002).

El Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, emplea el Cultivo de Tejidos Vegetales en especies en peligro de extinción o que ameriten el uso de esta metodología, debido a que presentan problemas de supervivencia por sus escasas poblaciones, reticentes a florecer, razones por las que las semilla son difíciles de obtener, además de su lento crecimiento y mortalidad en etapas precoces (Sánchez, 1991; Hubstenberger *et al.*, 1992; Chávez y Rubluo, 1995). Se ha logrado propagar especies en peligro como *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) y *Bletia urbana* (Orchidaceae) a una escala que permitiría repoblar su hábitat natural. Paralelamente se ha abierto la posibilidad de un mercado potencial que

disminuirá la presión de la extracción por coleccionistas en el campo de estas especies (Vovides, 1995). En la **Tabla 2**, se enlistan algunas de las especies que se han trabajado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, IB-UNAM.

Tabla 2. Algunas especies cultivadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico, IB-UNAM

Familia	Especies	Categoría
Cactaceae	<i>Ariocarpus retusus</i>	Pr
	<i>A.bravoanus</i>	Pr*
	<i>A. kotschoubeyanus</i>	A*
	<i>Aporocactus flagelliformis</i>	P*
	<i>Aztekium hintonii</i>	R, Ap II.
	<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	Ap II.
	<i>Cephalocereus apicicephalium</i>	Ap II.
	<i>Echinocereus pentalophus</i>	P*
	<i>Mammillaria san-angelensis</i>	P*, Ap II.
	<i>M. bombycina</i>	Pr, Ap II.
	<i>M. luethyi</i>	A*
	<i>M. sanchez-mejoradae</i>	P*, Ap II.
	<i>Turbincarpus laui</i>	R*
<i>T. pseudopectinatus</i>	Pr	
Orchidaceae	<i>Bletia urbana</i>	A*
	<i>Vanilla planifolia</i>	Pr*
	<i>Oncidium stramineum</i>	A
	<i>Stanbopea tigrina</i>	A*
	<i>Mormodes badia</i>	Ap II.
	<i>Encyclia vitellina</i>	Pr
	<i>Euchile citrina.</i>	Pr*
	<i>Euchile mariae</i>	A*
	<i>Laelia autumnalis</i>	Ap II.
	<i>Laelia speciosa</i>	Pr
	<i>Laelia eyermaniana</i>	Ap II.
	<i>Laelia gouldiana</i>	E
	<i>Thrichocentrum carthagenense</i>	Ap II.
<i>Prostechea ionoplhebia</i>		
Agavaceae	<i>Agave victoriae-reginae</i>	P*
	<i>A. peacockii</i>	Pr*
	<i>A. "comiteco"</i>	
	<i>A. salmiana</i>	
Zamiaceae	<i>Ceratozamia mexicana</i>	A*
	<i>C. hildae</i>	A*
	<i>C.euryphyllidia</i>	P*
	<i>Zamia pumila</i>	Ap II.
	<i>Z. furfuracea</i>	A*
	<i>Z. fischeri</i>	A*
	<i>Dioon merolae</i>	P*
	<i>Dioon edule</i>	A*

Pinaceae	<i>Pseudotsuga macrolepis</i> <i>Picea chihuahuana</i>	Pr* P
Areaceae	<i>Chamaedorea sartorii</i>	Pr

NOM-ECOL-059-2001: Probablemente extinta en el medio silvestre (E), Peligro de extinción (P), Amenazadas (A), Raras (R) sujetas a Protección especial (Pr) y dentro de estas categorías, las Endémicas (*). CITES: Ap. I, Ap. II.

II.6.1. Morfogénesis *in vitro*

La regeneración *in vitro* puede expresarse por tres rutas a partir de: 1) yemas preformadas, 2) vía embriogénesis somática, permite el desarrollo de embriones somáticos semejantes estructural y fisiológicamente a los embriones cigóticos y 3) vía organogénesis, proceso que implica comúnmente el desarrollo de brotes. Éstas dos últimas pueden ocurrir vía indirecta, con la mediación de una fase de tejido indiferenciado (callo) o vía directa sin formación de callo (Sánchez-Espinosa *et al.*, 2000).

II.6.1.1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso en el cual una sola célula o un grupo de éstas inician el proceso de desarrollo que culmina en la regeneración reproducible de un embrión no-cigótico (sin la fusión de gametos) capaz de germinar y formar plantas completas. Bajo condiciones naturales este proceso generalmente no se lleva a cabo, pero en cultivo de tejidos, la embriogénesis somática ocurre frecuentemente como alternativa a la organogénesis para la formación de plantas completas (Jiménez, 1998).

Sharp *et al.* (1982) menciona que la embriogénesis somática se inicia a partir de dos tipos de células, las células pre-embriogénicas determinadas y las células embriogénicas determinadas inducidas. En las primeras el desarrollo embriogénico está predeterminado y aparentemente las células esperan a la síntesis de un inductor (o la remoción de un inhibidor). Estas células se encuentran en tejidos embriogénicos, nucela, sacos embrionarios y algunos tejidos jóvenes de plantas cultivadas *in vitro*. El segundo tipo de células requieren una redeterminación al estado embriogénico mediante la exposición a ciertos reguladores de crecimiento como el 2,4-D. Una vez que el estado embriogénico es alcanzado, ambos tipos de células proliferan de la misma forma que las células embrionarias normales. Las plantas se generan al seguir directamente el desarrollo normal de un embrión cigótico (Razdan, 2003).

II.6.1.2. Organogénesis directa

Es un evento morfogénético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno, sin una fase previa de callo (Jiménez, 1998). Mediante el proceso organogénético se pueden diferenciar *in vitro* brotes adventicios, que son susceptibles de enraizar y formar plantas completas (Villalobos, 1993).

II.6.1.3. Organogénesis indirecta

La organogénesis indirecta también es un evento morfogénético que se caracteriza por la formación de nuevos brotes con la formación previa de callo. La formación del callo comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, en las células se presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, dando origen a una masa amorfa de tejido; las yemas formadas sobre un callo en cultivo *in vitro* se consideran como yemas adventicias, la estimulación de éstas para la brotación resulta del empleo de auxinas asociadas a citocininas. La organización de este callo, ya sea dirigido hacia la organogénesis o la embriogénesis, producirá un número casi ilimitado de plantas. Sin embargo, cuando los callos se mantienen durante largos periodos *in vitro*, van perdiendo la capacidad de responder a los reguladores de crecimiento, fenómeno conocido como habituación, además la planta diferenciada puede dar origen a individuos diferentes a la planta original (Jiménez, 1998; Margara, 1988; Villalobos, 1993).

II.6.2. Variación somaclonal

La variación somaclonal se define como la variabilidad genética generada durante la práctica de cultivo de tejidos (Larkin y Scowcroft, 1981). Los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal no han sido completamente dilucidados, pero entre sus causas se mencionan alteraciones en el cariotipo, mutaciones puntuales, recombinación somática e intercambio de cromátidas hermanas, rearrreglos génicos somáticos, elementos genéticos transponibles, amplificación y/o metilación del ADN y cambios en el ADN de las organelos. Por ello, aunque los caracteres morfológicos (como por ejemplo el hábito de crecimiento, la morfología floral, etc.) son fáciles de evaluar, muchos aspectos de la variación suceden sin manifestarse en cambios morfológicos evidentes. Una diferencia estructural en un producto génico puede no alterar su actividad biológica lo suficiente como para producir un fenotipo modificado. Por ello, la variación debe analizarse a varios niveles. Esta variación depende del

genotipo, de la fuente de explante, del tiempo en que el material ha estado sometido al cultivo *in vitro*, de las condiciones y composición del medio de cultivo y de la vía de regeneración, es decir, las plantas regeneradas a partir de de las yemas axilares tienen una mayor estabilidad genética, en comparación con los brotes regenerados a partir de callo o células aisladas (**Fig. 1**). Lo cual, tiene severas implicaciones en especies amenazadas o en peligro de extinción en las que el cultivo *in vitro* forma parte de una estrategia de conservación (Echenique *et al.*, 2004).

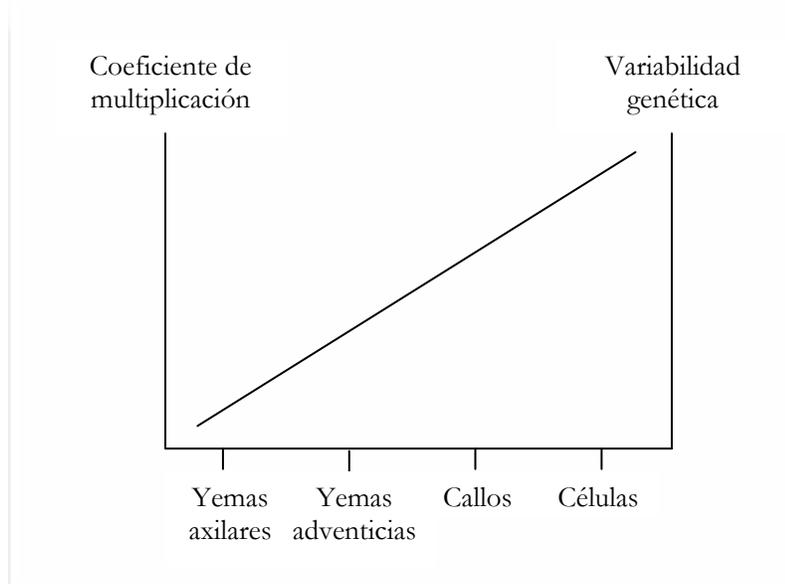


Figura 1. Relación entre el coeficiente de multiplicación y la estabilidad genética (Pérez, 1998)

González-Caballero (2008) sugiere que el conocimiento de la variabilidad genética es importante cuando la estrategia de conservación está enfocada en la conservación *ex situ* del material. Además señala que no hay métodos de regeneración y almacenamiento *in vitro* que se apliquen a todas las especies vegetales, por lo que es necesario desarrollar continuamente nuevos protocolos para cada especie.

II.6.3. Factores involucrados en la Organogénesis

La proliferación de los explantes en el cultivo *in vitro*, pueden lograrse por los componentes del medio de cultivo previamente establecido, por el uso de sustancias reguladoras de crecimiento y un adecuado manejo en el proceso *in vitro* (Orellana, 1998).

II.6.4. Explantes

El explante es una porción de tejido u órgano escindida de la planta, empleada para iniciar un cultivo *in vitro* (Pierik, 1990). El uso de semillas para iniciar cultivos es muy eficaz, ya que pueden ser sometidas a una profunda desinfección superficial para que puedan germinar en condiciones asépticas *in vitro* y se obtienen plántulas libres de contaminación, la importancia de éstas radica en la variabilidad genética de las plantas (Jiménez, 1998). En el caso de especies propagadas vegetativamente, la edad fisiológica determina el tipo y la velocidad de la morfogénesis, ya que se obtienen mejores resultados entre más joven sea el explante porque presenta mayor capacidad de diferenciación que los viejos, los explantes más usados son brotes jóvenes y los ápices meristemáticos (Barba, *et al.*, 2001; Villalobos, 1993).

II.6.5. Componentes del medio de cultivo

Los tejidos y órganos vegetales crecen de forma *in vitro* en un medio artificial, el cual provee los nutrientes necesarios para su crecimiento. Para que las plantas crezcan saludables y vigorosas éstas requieren absorber los siguientes nutrientes: macronutrientes y micronutrientes, los primeros son requeridos en cantidades relativamente altas en forma de iones de Nitrógeno (N), Potasio (K), Calcio (C), Fósforo (P), Magnesio (Mg) y Azufre (S). Los segundos se requieren en pequeñas cantidades y suelen ser generalmente metales como el Hierro (Fe), Níquel (Ni), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Boro (B) y Cloro (Cl). Los elementos anteriores más el Carbono (C), Oxígeno (O) y Nitrógeno (N), son los 17 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas (George *et al.*, 2008).

El medio más comúnmente usado es el de la formulación de Murashige y Skoog (George *et al.*, 2008).

II.6.6. Medio de cultivo Murashige y Skoog

El medio de Murashige y Skoog está caracterizado, principalmente, por una alta concentración de nitrógeno (60meq/l, aproximadamente) el cual 1/3 está aportando en forma reducida (NH^{+4}) y una concentración igualmente elevada de potasio; parece ser que su contenido en algunos iones supera el óptimo, por lo que, diversos autores emplean la solución diluida a la mitad de su concentración original. El medio de Murashige y Skoog se ha empleado de manera general para todos los tipos de cultivo *in vitro*. Además de ser combinado con

reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas), lo que ha permitido el éxito de los trabajos sobre organogénesis en cultivo *in vitro* (**Tabla 3**) (Margara, 1988).

II.6.7. Reguladores de crecimiento

En el cultivo *in vitro* de plantas, los reguladores, especialmente las auxinas y citocininas, desempeñan un papel muy importante, ya que permiten llegar a dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células (Chávez, 1993).

II.6.7.1 Auxinas

Entre las auxinas más comúnmente empleadas en cultivo de tejidos tenemos al ácido naftalen-1-acético (ANA), el ácido indol-3-acético (AIA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), su efecto *in vitro* produce: elongación celular, expansión de los tejidos, división celular, frecuentemente son empleadas para la inducción de la embriogénesis somática, en altas concentraciones produce la formación de callo, mientras que en concentraciones bajas predomina la formación de raíces adventicias (Pierik, 1990).

II.6.7.2 Citocininas

La 6-Benciladenina (BA), la N-6 dimetil alil aminopurina (2iP), la Kinetina (KIN) entre otras, se utilizan frecuentemente en cultivo de tejidos para estimular la división celular, el crecimiento y el desarrollo. En concentraciones elevadas pueden inducir la formación de brotes adventicios, sobre todo si se combina con una auxina, la formación de yemas sobre callos, generalmente inhiben la formación de raíces. Las citocininas promueven la formación de brotes axilares, porque disminuyen la dominancia apical, además de retardar el envejecimiento, debido a que promueven la movilización de nutrientes y la maduración de los cloroplastos (Margara, 1988; Pierik, 1990).

II.6.8. Enraizamiento *in vitro*

Durante el proceso organogénico se generan brotes unipolares, por lo que es necesario una vez individualizados inducir la formación de raíces para su establecimiento *ex situ*. La formación de los meristemos de la raíz resulta de una desdiferenciación celular provocada, que conduce a la producción de células meristemáticas primarias. El manejo de la concentración de las sales minerales es recomendado ampliamente para estimular el enraizamiento, lográndose la

formación abundante de raíces al disminuir las sales a la mitad de su concentración original, sin embargo, pueden participar diversos factores en el enraizamiento de los brotes generados *in vitro* (Orellana, 1998).

Las raíces laterales, casi siempre son de origen profundo y generalmente provienen a partir del periciclo, endodermo y raramente de la corteza. Las raíces adventicias pueden tener su origen en la base de una yema después de la neoformación de un callo cicatricial o de tejidos superficiales (epidermis o subepidermis) o también pueden generarse a partir del tejido profundo (cambium). La activación de la base del brote resulta del aislamiento y trasplante, reanudando la actividad mitótica para la formación de un tejido cicatricial (en caso de haber sido herido), y la desdiferenciación que lleva a la producción de células meristemáticas primarias y a la formación de meristemos (Margara, 1988).

II.6.8.1. Factores que inducen el enraizamiento de los brotes regenerados en cultivo *in vitro*

II.6.8.2. Carbón activado

El carbón activado es cualquier forma de carbón caracterizada por su alta capacidad de adsorción de gases, vapores y sólidos coloidales. El carbón activado es producido por la destilación destructiva de madera, musgo, lignita, nueces, huesos, vegetales u otras fuentes carbonosas. La estructura del carbón activado comercial tiene una naturaleza amorfa y una estructura microcristalina, tiene un área de $1000\text{m}^2/\text{g}$, una porosidad de 75.7% y un volumen de poros de $1.4\text{ cm}^3/\text{g}$ (Pan y Staden, 1998).

El carbón activado utilizado en el medio nutritivo tiene una preferencia de adsorción por compuestos moderadamente polares, por ejemplo compuestos aromáticos, fenólicos con sus oxidantes y reguladores de crecimiento como auxinas (AIA, ANA) y citocininas (BA) (Pan y Staden, 1998). El tener estructuras en forma de anillo heterocíclicas e insaturadas vuelve a los compuestos más afines para su adsorción; la capacidad de adsorción depende de factores como la densidad, pureza y pH. Los efectos del carbón en los tejidos cultivados *in vitro* no dependen sólo del tipo de carbón o de su grado de activación sino también de la especie cultivada, además puede tener un efecto benéfico o adverso en el crecimiento y desarrollo de los brotes. El aporte de carbón al medio favorece el crecimiento de los tejidos, acelera el crecimiento del ápice, promueve el enraizamiento debido al oscurecimiento del medio (ya que la reducción de luz en la base de un brote puede proveer un ambiente que conduzca a la acumulación de auxinas fotosensibles o sus cofactores) y adsorbe los reguladores de crecimiento, sustancias

inhibidoras o indeseadas contenidas en el medio. Otros efectos pueden ser la liberación de sustancias al medio o la acidificación de este (Margara, 1988; Pierik, 1990).

II.6.8.3. Las auxinas en el enraizamiento

Las auxinas favorecen la iniciación y crecimiento de raíces para muchas especies de plantas, la auxina más importante para la inducción de raíces es el ANA, sin embargo, para plantas leñosas es el ácido indol-3-butírico (IBA) y para herbáceas es el AIA, su empleo se recomienda en la mayor parte de los medios de enraizamiento, excepto en aquellas especies que no las requieren, limitándose en estos casos, a medios simples sin ningún regulador de crecimiento, debido a que los brotes jóvenes en desarrollo son una rica fuente en la producción de auxinas, la adición de éstas a los medios durante esta fase, se ha encontrado que es innecesaria para muchas especies. Otro procedimiento, no muy utilizado, es la sumersión durante varios minutos de los brotes en una solución con altas concentraciones de auxinas y transferirlos a un medio libre de éstas (Orellana, 1998; Pierik, 1990).

II.6.8.4. Potencial Osmótico

El potencial osmótico es uno de los componentes del potencial de agua y su determinación se basa principalmente en el cambio de las propiedades físicas y químicas de ésta, debido a la presencia de solutos. La concentración total de las sales de un medio de cultivo determina el potencial osmótico del medio (Pierik, 1990). El uso de sustancias osmóticas como manitol, polietilenglicol (PEG) se han empleado para elevar el potencial osmótico del medio para la inducción del enraizamiento de cultivos *in vitro*.

El manitol es una fuente de carbono que presenta una acción metabólica y osmótica, sin embargo, no es un osmorregulador (Rodríguez, 2006), pero altera el balance osmótico debido a que es un azúcar, el cual interactúa con las cabezas polares de los fosfolípidos para hacer más impermeable a la membrana celular, de ésta manera baja el potencial hídrico del medio para que el agua contenida en el medio no pueda ser absorbida por la planta y está se vea forzada a generar raíces (Rodríguez, 2006). Un ejemplo, en cultivos de tomate *in vitro* Abu Shama (2001) reportó que el medio adicionado con manitol en concentración 0.1M presentó un incremento en el porcentaje de enraizamiento y número de raíces por explante. Asimismo Lankes y Zimmerman (1990) al estudiar el efecto del potencial osmótico en el cultivo *in vitro* de brotes de *Malus pumila* (manzano), modificado con manitol, encontraron que el genotipo fue el

factor más importante para enraizamiento, además del medio básico con la osmolaridad más alta por la adición de nutrimentos y fuente de energía.

II.6.8.5. Suncaps

Un suncaps es una membrana de polipropileno de 0.02 μm de grosor con un filtro para intercambio gaseoso y autoadhesivo resistente al calor (Ghoraishi, 2006). El empleo de los suncaps favorece el enraizamiento de los brotes, debido a que éstos le permiten al CO_2 ambiental penetrar al recipiente, de ésta manera la fotosíntesis es más eficiente y se reduce de manera significativa el shock que sufren las plantas al ser transferidas a condiciones *ex vitro* (Miclăuş *et al.*, 2003). Por ejemplo, Ghoraishi (2006) reportó que el uso de los suncaps redujo la humedad de un 99% a un 90% e incrementó el enraizamiento de *Pistacia mutica* de manera significativa.

II.6.9. Hiperhidratación

El término hiperhidratación se refiere a los desarreglos morfológicos, metabólicos y fisiológicos que ocurren durante la proliferación de brotes en cultivos *in vitro* debido a una alta acumulación de agua en el tejido. Los brotes hiperhidratados generalmente crecen poco, se vuelven necróticos y mueren. Algunas medidas preventivas para reducir la hiperhidratación incluyen aumentar la concentración de agente gelificante, sobreponer el medio con parafina, usar algún desecante por ejemplo CuSO_4 , enfriar el frasco para mejorar la ventilación disminuir la concentración de citocininas o reemplazarla por otra, manipular las concentraciones de sales y de NH_4 del medio (Razdan, 2003).

II.6.10. Propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales de la Familia Cactaceae

Los sistemas de regeneración *in vitro* han resultado importantes para la propagación a gran escala comercial internacional de especies agrícolas, hortícolas y forestales, como lo demuestra el hecho de que más de 500 millones de plantas se producen *in vitro* cada año (Vasil y Thorpe, 1994). Así mismo, como ya se ha mencionado anteriormente esta tecnología ha resultado exitosa para diversos grupos como las orquídeas y las aráceas entre otras, sin embargo, la importancia comercial de las cactáceas han recibido poca atención, no obstante que los resultados obtenidos hasta ahora, permiten vislumbrar aplicaciones de impacto para su propagación masiva (**Tabla 3**), cabe resaltar que las técnicas de cultivo de tejidos aplicadas a la

reproducción de cactáceas son relativamente recientes, en 1976, Kolar y Bartek reportaron la primera regeneración de brotes de una cactácea, originados a partir de callo de *Mammillaria woodsii*.

Tabla 3. Algunas cactáceas regeneradas *in vitro*.

Especie	Categoría	Medio de cultivo	Explante	Reguladores de crecimiento (mg/l)	Respuesta <i>in vitro</i>	Referencia
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	NOM: Pr CITES: Ap. I	MS 50%	Plántulas de semillas germinadas <i>in vitro</i>	2.4 BA /1.1 ANA 1.6-4 BA /0.1-1.1 ANA 5 KIN sola y con 0.1 2,4-D	Brotes Embriones somáticos Callo compacto	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003
<i>Ariocarpus bravoanus</i>	NOM: P CITES: Ap. I	MS 50%	Plántulas de semillas germinadas <i>in vitro</i>	0-0.5 BA/0-5 ANA 0-0.5 KIN/0-5 2,4-D 2 IBA/0.05 ANA	Brotes Callo Raíces	Gómez, 2008
<i>Ariocarpus retusus</i>	Pr	MS y SH 20% (v/v) agua de coco	Plántulas de semillas germinadas <i>in vitro</i>	-	Callo morfogénico Embriones somáticos	Stuppy y Nagl, 1992
<i>Ariocarpus retusus</i>	Pr	MS	(tubérculos centrales, laterales, y raíces) de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	0-3 BA /0-1 ANA 0-10 2iP /0-1 AIA 0-1 KIN /0-1AIA	Callo: brotes y raíces Embriones somáticos	Olguín, 1994
<i>Aztekium ritteri</i>	A	MS	Brotes de plantas germinadas <i>in vitro</i>	0.1 BA sola y 0.1 BA /0.01ANA 2 KIN /2 2,4-D 1, 2ANA; 1, 2IBA	Brotes Embriones somáticos Callo Enraizamiento	Rodríguez-Garay y Rubluo A. 1992
<i>Cephalocereus apicephalium</i> <i>Echinocereus pentalophus</i>	CITES: Ap. II	MS 50%	Plántulas de semillas germinadas <i>in vitro</i>	3 BA solo y con 0.1 ANA 0.5 ANA / 3 BA	Brotes	Saucedo, 2006
<i>Coryphanta minima</i>		MS	Semillas Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	0.5 BA/ 0.1 ANA	Brotes Callo	Malda <i>et al.</i> , 1999
<i>Hylocereus undatus</i> , <i>Stenocereus griseus</i> , <i>S. queretaroensis</i> y <i>S. gummosus</i>		MS	Plántulas de semillas germinadas <i>in vitro</i>	2 BA/ 1 KIN	Plántulas	Cuéllar <i>et al.</i> , 2006
<i>Leuchtenbergia principis</i>	A	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	10 BA/ 0.1 ANA	Brotes	Starling R., 1985
<i>Obregonia denegrii</i>	A	MS	Plántulas de semillas germinadas	0.5 BA/ 0.1 ANA	Callo Embriones somáticos	Malda <i>et al.</i> , 1999

			<i>in vitro</i>		Brotos	
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	Pr	MS 50%	Plántulas de semillas germinadas <i>in vitro</i>	0.15 BA o 0.1 KIN	Brotos Callo	Santos <i>et al.</i> , 2003
<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	A	MS Puentes papel	Semillas Plántulas <i>in vitro</i>	0,1,2,3 BA 0,0.5,1,2 ANA	Brotos y callo	Flores, 2004
<i>Turbincarpus laui</i>	Pr CITES: Ap I	MS 50%* 1% carb act	Semillas Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	0.05, 0.1 BA	Brotos Callo	Santos-Días <i>et al.</i> , 2003
<i>Turbincarpus laui</i>	Pr CITES: Ap I	MS	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	0-0.5 ANA/2-3 BA	Brotos	Mata-Rosas <i>et al.</i> , 2001
<i>Turbincarpus pseudopectinatus</i>	Pr UICN: V CITES: Ap I	MS	Plántulas de semillas germinadas <i>in vitro</i>	0-0.5 ANA/2 BA 2,4-D/KIN	Brotos y callo	González-Caballero 2008
8 especies de <i>Turbincarpus</i>	A CITES: Ap I	MS Modificado Sucrosa 3%	Semillas Apical, lateral y transversal	0.05–0.15 BA 3.2–4.8 6 2iP	Brotos y callo	Dávila-Figueroa <i>et a.</i> , 2005

II.6.11. Propagación por cultivo de tejidos en el género *Mammillaria*

Existen pocos trabajos sobre el cultivo *in vitro* de este género contrastando con el número que hay en los listados de la NOM-059-ECOL-2001, CITES y UICN. No obstante, el género *Mammillaria* ha sido exitosamente explorado en la regeneración *in vitro* (Tabla 4). Cada especie de *Mammillaria* requiere de concentraciones específicas de auxinas y citocininas para obtener respuestas concretas (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989).

Márquez (2001) trabajó con *Mammillaria carmenae* y *M. herrerae*, partió de meristemas de plantas adultas y semillas, cultivados en medio MS modificado y con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento de ANA/BA y AIA/BA y obtuvo callo en ambos tratamientos. Sin embargo, no hubo germinación de las semillas en condiciones *in vitro*. Otro reporte es de Anicua (2000), quien empleó meristemas de plantas adultas de *Mammillaria bocasana* y *M. carmenae* sembrados en MS con diferentes concentraciones de KIN/BA, obtuvo callo y brotes.

Con respecto a *Mammillaria theresae* sólo hay un trabajo de Fay and Gratton (1992), quienes emplearon yemas laterales, pero no mencionaron las condiciones del cultivo *in vitro* ni los resultados obtenidos.

Tabla 4. Algunas especies de *Mammillaria* regeneradas *in vitro*.

Especie	Categoría	Medio de cultivo	Explante	Reguladores de crecimiento (mg/l)	Respuesta <i>in vitro</i>	Referencia
<i>Mammillaria albicoma</i>	Pr	MS	Yemas florales	0.1ANA/5 BA	Brotos y callo	Wyka <i>et al.</i> , 2006
<i>M. bocasana</i> <i>M. carmenae</i>	Pr P UICN: P	MS	Meristemos de plantas adultas	5.0 KIN, 5.0, 10 BA 1.0,10 KIN/5.0,10 BA	Brotos y callos	Anicua, 2000
<i>M. bocasana</i> <i>M. densispina</i> <i>M. habniana</i> <i>M. butchisoniana</i> <i>M. orcutii</i> <i>M. pectinifera</i> <i>M. perbella</i> <i>M. picta</i> <i>M. rhodantha</i> <i>M. zephyranthoides</i> <i>M. carmenae</i>	Pr	MS	Secciones de tallo de 2-4 años	0,1,3,6,10 KIN /0, 1,2,4 AIA	Brotos y callos	Ramírez <i>et al.</i> , 2007
<i>M. carmenae</i> <i>M. herrerae</i>	P P	MS Modificado sacarosa al 15% y tiamina-HCl 0.4mg/l	Secciones de tallo de 2-3 años Meristemos de plantas adultas y semillas	1 ANA/2 BA 0.5 ANA /2.5 BA 5.0 AIA /5.0 BA	Brotos múltiples Callo Callo	Vyskot y Jára,1984 Márquez, 2001
<i>M. elongata</i>	Ap II	MS modificado	Tubérculos de plantas <i>ex vitro</i>	2-10 2,4-D/ 1-2 KIN o 2iP 20 KIN, 10-60 2iP o BA 10 2iP /10 BA 60 ANA o 60 IBA/1-2 KIN o 2iP	Callo friable Brotos Brotos Enraizamiento	Johnson y Emينو, 1979
<i>M. elongata</i>		Nitsch	Anteras	1-2 2,4-D 1-2 KIN	Callo	Cheema y Mehra, 1981
<i>M. gummifera</i>		MS	Secciones de tallo	Auxinas y citoquinas no especificadas	Callo	Ault y Blackmon, 1985
<i>M. haageana</i> <i>M. huitzilopochtli</i> <i>M. san-angelensis</i>	Pr P	MS	Secciones de tallo de plántulas <i>in vitro</i>	1.0 BA	Brotos múltiples Callo	Rubluo <i>et al.</i> , 1993
<i>M. haageana</i> <i>M. san-angelensis</i>	P	MS	Secciones de tallo de plántulas <i>in vitro</i>	1,2 BA 0-0.1 ANA / 0.01, 0.1, 1, 10BA	Brotos individuales y múltiples	Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989
<i>M. san-angelensis</i>	P	MS	Caloso	0.1-0.5KIN/0 2,4-D	Brotos	Calderón, 2007
<i>M. san-angelensis</i>	P	MS (subcultivo)	Callo, brotes provenientes de callo y plántulas		Callo y brotes	Duval K. 1995
<i>M. spaerica</i> <i>M. gracilis</i> <i>M. eichlamii</i>		MS	Tubérculos con espinas	10 2iP /2 IBA	Poco Callo Poco Callo Sin respuesta	Jonson y Emينو, 1979

<i>M. spp.</i>					Sin respuesta	
<i>M. pectinifera</i>		MS	Semillas, Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	0.01 ANA/0.1,4 BA	Callo Brotos	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>M. prolifera</i>		MS	Semillas, yemas vegetativas y órganos florales	1-2 KIN/10-20 2,4-D AIA /2KIN	Callo	Minocha y Mehra, 1974
<i>M. prolifera</i>		MS	Secciones de tallo de 2-3 años	0.5-1 ANA/0.5-1 BA	Brotos múltiples	Vyskot y Jára,1984
<i>M. sanchez- mejoradae</i>	P	MS y B5 modif.	Tejido calloso	0.1K, 2.0 de 2,4-D	Callo y brotes	Calderón, 2007
<i>M. woodsii</i>		MS	Secciones de tallo (areolas) sin haces vasculares secundarios	2AIA /2KIN	Brotos Callo	Kolar <i>et al.</i> , 1976
21.spp. Diferentes de <i>Mammillaria</i>		MS	Semillas	2,4-D + BA	Callo Brotos	Damiano <i>et al.</i> , 1986
<i>M. voburnensis</i>		MS	Semillas Secciones de tallo de plántulas <i>in vitro</i>	0.01-1 ANA/0.1-6 BA	Brotos	Ordóñez, 2003
<i>M. gracilis</i> <i>M. spp.</i> <i>M. albinata</i> <i>M. lasiacantha</i> <i>M. mammillaris</i> <i>M. nana</i> <i>M. parkinsonii</i> <i>M. solisoides</i> <i>M. viperina</i> <i>M. theresae</i>		MS	Yemas laterales Yemas laterales Yemas laterales Yemas laterales Semillas Yemas laterales Semillas Semillas Yemas laterales Yemas laterales	2 BA 2 BA No especifican No especifican No especifican No especifican No especifican No especifican No especifican No especifican	Brotos Brotos y callo	Fay y Gratton, 1992
	Pr					
	Pr					
	A					
	A					

Esta última especie *Mammillaria theresae* tiene un severo problema de perturbación en su hábitat además del saqueo de sus poblaciones silvestres, por lo que, se ha realizado esta investigación para evitar su extinción, mediante el cultivo de tejidos vegetales para favorecer de ésta manera su conservación *ex situ*.

II.7. *Mammillaria theresae* (Cutak, 1967)

II.7.1. Clasificación taxonómica de *Mammillaria theresae* (Cutak, 1967)

REINO	Plantae
PHYLLUM	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Caryophyllales
FAMILIA	Cactaceae
SUBFAMILIA	Cactoideae
TRIBU	Cacteae
SUBTRIBU	Cactinae
GÉNERO	<i>Mammillaria</i>
ESPECIE	<i>Mammillaria theresae</i>
NOMBRE COMÚN	Peyote, peyotillo, biznaga de Coneto



Figura 2. Planta en floración de *Mammillaria theresae*. Barra 1cm.

II.7.2. Descripción botánica de *Mammillaria theresae* (Cutak, 1967)

Planta: tallo simple o escasamente cespitoso, de 2 a 4 cm de longitud, 1 a 2.5cm de diámetro, sin embargo, Schneck (1998) describe una altura de hasta 5 a 7.5cm; la porción superior subglobosa, con tubérculos salientes, la porción inferior cilíndrica, con algunas raíces fusiformes. Tubérculos dispuestos en 5 y 8 series espiraladas, de color verde olivo, algunas veces con tonos purpúreos, erectos o ascendentes, delgadamente cilíndricos, 4-6mm de altura y de 2-3mm de espesor en la base. Axilas con puntos microscópicos de lana blanca. Aréolas de circulares a elípticas, con lana cuando jóvenes. Espinas radiales, 20-30, extendidas, cortas, blancas, translúcidas, plumosas, de 2mm de longitud y sin espinas centrales (**Fig. 2**) (Glass, 1998; Gómez, 2001).

Flores: infundibuliformes, 3.5-4.5cm de longitud, 3cm o poco más de diámetro cuando están en anthesis; tubo bien definido, de unos 20mm de longitud, angosto, hasta de 3mm de diámetro; segmentos exteriores del perianto, los más externos, como escamas, 4-6mm de longitud, castaño verdoso; los siguientes, petaloides, 10-15mm de longitud, rosados en la parte baja del margen; segmentos interiores del perianto oblanceolados, de unos 15mm de longitud, purpúreos o violeta hacia la punta y más claros hacia la base; filamentos erectos y blancos; anteras amarillo intenso; estilo blanco, delgado, que sobrepasa ligeramente a los estambres; lóbulos del estigma, de color amarillo pálido, cerrados (Glass, 1998; Gómez, 2001).

Periodo de floración: presenta dos periodos de floración al año, uno a mediados de mayo y otro a principios de julio, de la misma manera sucede en plantas cultivadas en vivero, éstas florecen de manera intermitente desde las primeras semanas de mayo hasta mediados de julio. En un período de floración se desarrollan una a tres, raramente cuatro, flores por individuo. La flor dura de dos a tres días, abriendo por la mañana y cerrando por la tarde (López-Enríquez *et al.*, 2003).

Fruto: profundamente embebido en el cuerpo de la planta; seco, claviforme de 1cm de longitud, 4mm de espesor, cubierto de una película blanca o tomento (Glass, 1998; Gómez, 2001).

Semillas negras, foveoladas, muy pequeñas, 0.5mm de espesor. Éstas permanecen retenidas en la planta por varios meses, protegidas entre los lóbulos del tallo y particularmente en la base de éste, por lo que es difícil su extracción (Gómez, 2001).

Dispersión: la dispersión se lleva a cabo principalmente por arrastre, ya que el fruto y las semillas son movidos por el agua o el viento. Las semillas se establecen en las fisuras de las

rocas o sobre el suelo somero. Adicionalmente, las plantas muertas o desenterradas por efecto de la erosión, son arrastradas por el agua o el viento y dispersan las semillas que aún permanecían adheridas entre los lóbulos del tallo y en el engrosamiento en la base de éste, dando origen a nuevas colonias. Las plántulas aparecen en el mes de agosto, tanto aisladas como alrededor de la planta madre (López-Enríquez *et al.*, 2003).

La **reproducción convencional** es un proceso difícil, debido a que las semillas son escasas y las plántulas presentan crecimiento lento, además las raíces son muy sensibles al exceso de agua, por lo que se pudren fácilmente; por ello, se suele cultivar injertada, de esta manera tiende a producir hijuelos con facilidad, sin embargo, la planta se deforma (Gómez, 2001).

II.7.3. Importancia ecológica

Mammillaria theresae es una planta endémica de la Sierra de Coneto, se encuentra asociada principalmente a *Sedum pringlei*, *Selaginella schaffneri*, *S. rupincola* y *S. pilifera*, así como a gramíneas, otras herbáceas y musgos (López-Enríquez *et al.*, 2003).

II.7.4. Distribución geográfica

Es endémica de una pequeña área de la Sierra de Coneto, la cual, se localiza en los municipios de Nuevo Ideal y Coneto de Comonfort, en el centro del estado de Durango. Es una serranía aislada, ubicada al oriente de la Sierra Madre Occidental y en el límite occidental del Desierto Chihuahuense, entre los 24° 54' y 24° 59' N y los 104° 45' y 104° 49' W; su altitud varía entre los 2100 y los 2700m (**Fig. 3**) (López-Enríquez *et al.*, 2003).

Se localiza únicamente en la zona conocida como Puerto de Coneto y sus alrededores, entre los 2180 y los 2320 m, en una superficie de 1.7 ha distribuidas sobre un área de 2.5 km². Se distribuye en siete manchones (poblaciones) de tamaño y densidad muy diversos, en pendientes de 0° a 45° desde la parte media de las laderas hasta el pie de monte, donde es más abundante. Crece solitaria o en colonias; la densidad promedio de los individuos en la zona en donde mejor se desarrolla es de 1.2/m², aunque llega a alcanzar (incluyendo plántulas y juveniles) hasta 78 plantas/m² en el sitio de mayor densidad.

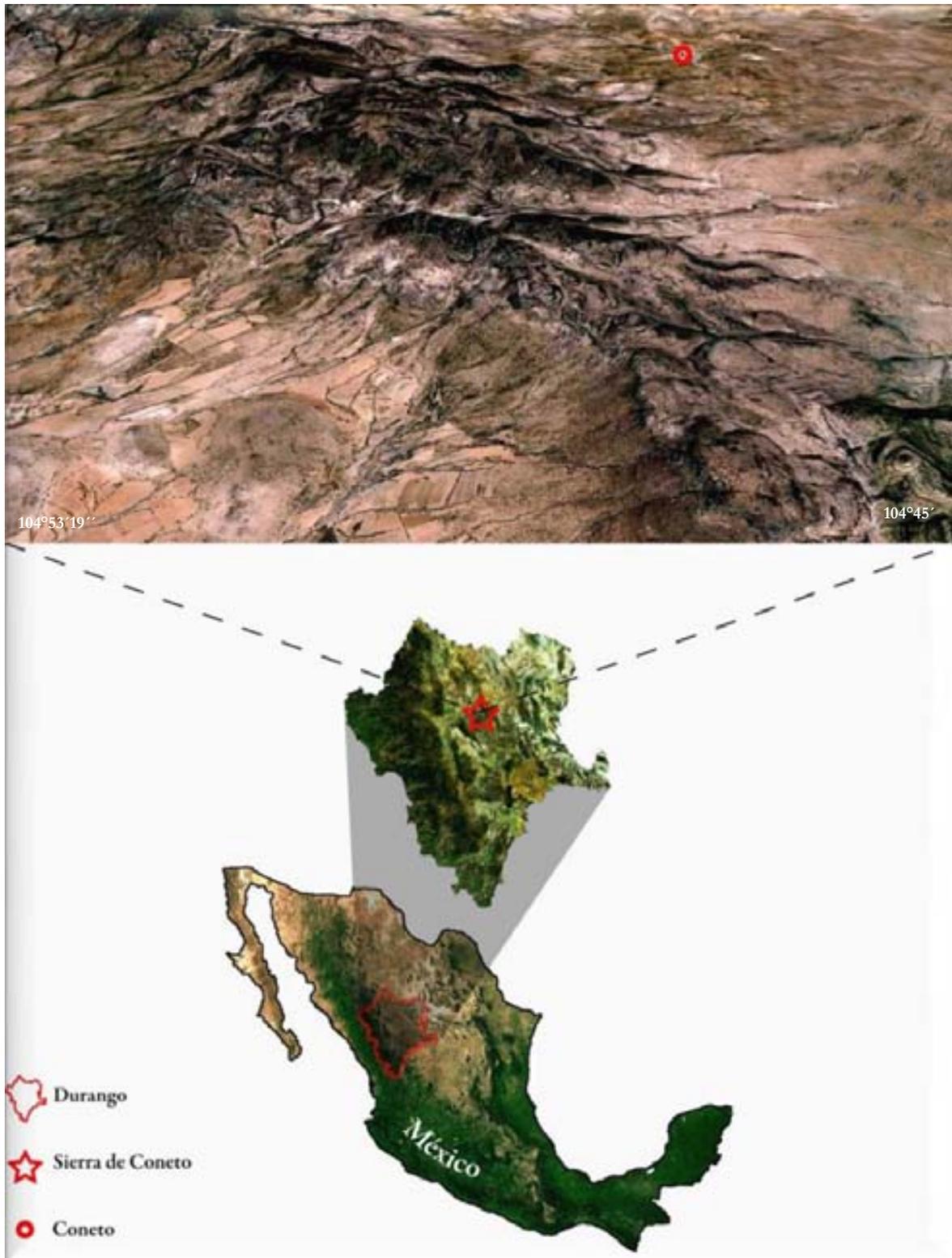


Figura 3. Mapa de distribución de *Mammillaria theresae*, Sierra de Coneto (vista satelital, basada en la carta topográfica 1:250 000 de INEGI).

II.7.5. Descripción del hábitat

El clima de la Sierra de Coneto es templado semiseco (BS1kw), de acuerdo al sistema de Koeppen, modificado por E. García (1973). La vegetación dominante es un matorral esclerófilo de *Quercus depressipes* y *Arctostaphylos pungens* con *Pinus cembroides*, *Quercus* y *Yucca*. En el estrato herbáceo destacan *Selaginella schaffneri*, *S. rupicola*, *S. pilifera*, *Sedum pringlei* y diversas gramíneas y compuestas (**Fig. 4a**). Este tipo de ecosistemas contribuyen a la génesis, al mantenimiento de endemismos y por lo tanto a la riqueza de la flora (Rzedowski 1978; López-Enríquez *et al.*, 2003). *M. theresae* manifiesta preferencia por sitios con fuerte afloramiento rocoso y suelo muy somero o ausente, así como sobre grava. Al desarrollarse en fisuras de la roca madre, esta especie afronta condiciones de escasa o nula humedad la mayor parte del año, quedando completamente expuesta al sol y al viento. Como resultado de la erosión que está sufriendo el suelo, las plantas en ocasiones son arrastradas por las lluvias y su raíz queda al descubierto (**Fig. 4b, c y d**) (López-Enríquez *et al.*, 2003).



Figura 4. a) Hábitat de *Mammillaria theresae*, Sierra de Coneto, b) Colonias de *M. theresae* en la Sierra de Coneto, d) *M. theresae* en su hábitat rodeada de hielo.

III. JUSTIFICACIÓN

Mammillaria theresae Cutak (Cactaceae), es una especie endémica de la Sierra de Coneto (Durango), presenta una distribución restringida a una área de 2.5 km², sus poblaciones están disminuyendo debido a la ampliación de un camino entre Coneto y Nuevo Ideal, en un tramo de la carretera entre Torreón, Coahuila y Culiacán, Sinaloa; así como por las actividades de extracción ilegal de individuos que afectan en forma severa las poblaciones de *M. theresae*.

Esta especie forma parte de la serie *Longiflorae* (Hunt 1981, 1987), particularmente buscada por la belleza de sus flores, y es altamente apreciada por coleccionistas, especialmente europeos, por su originalidad y rareza. Hasta hace 15 años, era tanta su demanda que la población rural del área la conoce con los nombres de “peyotillo” y “peyote” al considerar erróneamente que su demanda se debía a que la planta posee propiedades alucinógenas (López-Enríquez *et al.*, 2003). En consecuencia, la NOM-059-ECOL-2001 la coloca en la categoría de amenazada (A), y citada entre las especies en peligro por Vovides (1981), en el libro rojo de datos de la IUCN (www.redlist.org).

Además no se tienen reportes de que *M. theresae* se encuentre en jardines botánicos de México, a excepción probablemente del Jardín Botánico del Grupo Cante, en Guanajuato. La especie se ha reproducido con éxito en Europa en diversos jardines botánicos y en viveros sólo para venta (López-Enríquez *et al.*, 2003).

Por lo tanto, es urgente el establecimiento de un programa para la protección de esta especie y de su hábitat para evitar su desaparición. El Cultivo de Tejidos es una alternativa para el estudio, propagación, conservación y aprovechamiento sustentable de *M. theresae*. Lograr un procedimiento para su micropropagación haría posible una propagación masiva comercial, lo que reduciría la presión en las poblaciones silvestres. Asimismo el protocolo serviría de guía a otras especies de cactáceas que se encuentren amenazadas o en peligro de extinción.

VI. OBJETIVOS

VI.1. Objetivo general

- ♦ Establecer condiciones *in vitro* para la regeneración y conservación de *Mammillaria theresae*.

VI.2. Objetivos particulares

- ♦ Establecer condiciones de desinfección del material vegetal (planta madre y semillas).
- ♦ Determinar si el tipo de explante (apical y basal) influye en la regeneración *in vitro* de *M. theresae*.
- ♦ Determinar los requerimientos de reguladores de crecimiento (ANA, BA y en combinación) para el desarrollo de brotes.
- ♦ Establecer condiciones para el enraizamiento de las plantas regeneradas.
- ♦ Establecer las condiciones para la aclimatización *ex vitro* de las plantas regeneradas.
- ♦ Realizar un análisis estructural (histológico e histoquímico) de cultivos *in vitro* para conocer y documentar el desarrollo ontogénico y la identidad de los regenerantes.
- ♦ Realizar la donación de plantas regeneradas *in vitro* de *Mammillaria theresae* a diferentes jardines botánicos de la Ciudad de México.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Material biológico:

V.1.1. Semillas (explante)

Se empleó un lote de 65 semillas de *Mammillaria theresae* donadas por el biólogo Gabriel Olalde Parra del Área de Cactología del Jardín Botánico, IB-UNAM (Fig. 4a).

V.1.2. Plantas (explante)

Se usaron tres ejemplares de *Mammillaria theresae*, donados por el biólogo Gabriel Olalde del Área de Colecciones del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM y el Ing. Benjamín Aburto Director de Ecocactus de México, organización no gubernamental dedicada a propagar cactáceas por métodos convencionales (Fig. 4b, c y d).



Figura 4. (a) Semilla *Mammillaria theresae*. Barra 1mm, (b) planta injertada ejemplar 1, (c) planta ejemplar 2, (d) planta ejemplar 3. Barra 1cm.

V.2. Desinfección y siembra de semillas.

A las semillas se les efectuó una imbibición en agua por 48 horas, posteriormente se lavaron con agua y detergente comercial en agitación constante durante 15 minutos en una parrilla de agitación magnética, se enjuagaron con agua destilada, se desinfectaron superficialmente con alcohol etílico al 70% v/v durante 1 minuto en agitación constante, en una solución de hipoclorito de sodio comercial (5.25% de cloro activo) al 30% v/v durante 30 minutos y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada (**Diagrama 1**). Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, las semillas se colocaron en una caja Petri y con la ayuda de las pinzas de disección se sembraron en frascos de vidrio de 125 ml de capacidad (Gerber®) con 25 ml de medio MS 50% (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30 g/l. El pH del medio se ajustó a 5.7 con soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y/o ácido clorhídrico (HCl) 1N, previo a la adición de Phytigel® 5 g/l. Los frascos con medio de cultivo se esterilizaron en una autoclave a 120°C a presión de 1.5 kg/cm² durante 17 minutos. Los cultivos fueron incubados a una temperatura 26 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 h luz y con una intensidad luminosa de 50µMol/m²/s proporcionada por 2 lámparas fluorescentes de 75W.

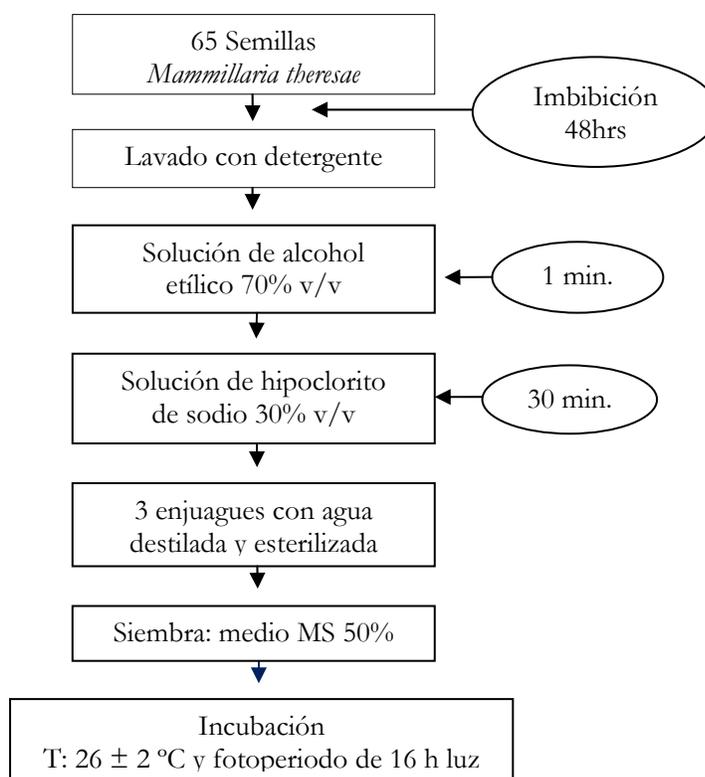


Diagrama 1. Desinfección de las semillas

V.3. Desinfección y siembra de explantes de ejemplares adultos.

Para el establecimiento aséptico de los podarios y el cuerpo del tallo, se realizó un primer ensayo con una sola planta. El tejido se sometió a un tratamiento de desinfección, el cual consistió en limpiar la planta, se quitaron las espinas y lana, a continuación se lavó con detergente (en agitación constante), se enjuagó con abundante agua destilada, se sumergió en alcohol etílico al 70% durante un minuto, se pasó a una solución 1g/l de benomilo® durante 60 minutos y posteriormente se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% v/v (5.25% de cloro activo) manteniendo agitación constante durante 30 minutos, finalmente en la campana de flujo se realizaron 3 enjuagues con agua destilada esterilizada; el ejemplar se colocó en una caja Petri y con la ayuda de las pinzas de disección y bisturí se extrajo 1cm³ del cuerpo del tallo y se disectaron los podarios desde su base, los cuales se sembraron con el área de corte en contacto con el medio MS 50% (**Diagrama 2**). Se inocularon dos explantes por frasco. Los diferentes explantes fueron incubados una temperatura 26 ± 2 °C y permanecieron en oscuridad durante 20 días para evitar la oxidación.

Se repitió el protocolo de desinfección para las otras dos plantas, pero con explantes de mayor tamaño para asegurar su sobrevivencia, por lo que se disectaron los podarios en pares.

V.4. Inducción morfogénica de los podarios

Después de 20 días desde la siembra los explantes fueron subcultivados en medio MS con ácido adicionado con ácido ascórbico 1 g/l, sacarosa 30 g/l, 12 tratamientos resultantes de la combinación de ANA/BA (tabla 5) fueron ensayados. Se inocularon dos explantes por frasco de cultivo para un total de cinco repeticiones por tratamiento. La respuesta se evaluó posterior a los 62 días.

Tabla 5. Reguladores de crecimiento empleados para la inducción morfogénica de podarios de *M. theresae*, cultivadas en medio MS, durante 62 días.

BA (mg/l) \ ANA (mg/l)	0	1	2	3
0	1	2	3	4
0.1	5	6	7	8
0.5	9	10	11	12

Todos los cultivos se mantuvieron en el cuarto de incubación bajo condiciones ambientales controladas, con una temperatura 26 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 h luz con una intensidad de 29.29 μEs-1m-2 (PAR 50μMol/m2/s), por 8 h de obscuridad.

V.5. Cultivo *in vitro* de bases y ápices

Cuatro meses después de la inducción de los podarios, fueron seleccionados brotes regenerados de 1 cm de longitud de los tratamientos 8, 11 y 12, para la exploración del potencial morfogénico de dos tipos de explantes del tallo: 1) secciones apicales de aproximadamente 0.4cm y 2) secciones basales de aproximadamente 0.6x0.4cm. Los explantes fueron sembrados en MS 100% y 6 tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BA. Se inocularon dos explantes por frasco con cuatro repeticiones por cada tratamiento para los explantes basales y para los explantes laterales se inocularon cuatro explantes por frasco con cuatro repeticiones por cada tratamiento. (Tabla 6). Basados en la efectividad presentada en otras especies de cactáceas (González-Caballero, 2008).

Tabla 6. Concentraciones hormonales para la inducción de explantes basales y apicales de tallo, cultivados en medio MS, durante 57 días.

	BA (mg/l)	2	3	3.5
ANA (mg/l)				
0.1		1	2	3
0.5		4	5	6

V.6. Inducción de secciones del cuerpo de tallo

El cuerpo del tallo de 1cm³ se sembró en frascos Gerber® con 25 ml de medio MS 50% permaneció durante tres meses en el cuarto de incubación, posteriormente se subcultivó a medio MS 100% y 4 tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BA para inducir la formación de brotes.

Se inocularon fragmentos de 2cm³ por frasco de cultivo para un total de 12 repeticiones por tratamiento (Tabla 7). La respuesta se evaluó cada mes. Después de 8 meses de cultivo se cuantificó el peso seco del callo para cada tratamiento.

Tabla 7. Concentraciones hormonales para inducción de brotes a partir de callo.

	BA (mg/l)	0	2	3	4
ANA (mg/l)					
0		1			
0.1			2	3	4

V.7. Peso seco del callo

El callo de aspecto necrosado de cada tratamiento, generado de cada subcultivo, se secó en una estufa a 60°C y pesado después de 8 meses de cultivo *in vitro*.

V.8. Individualización y enraizamiento de los brotes regenerados

A partir de los explantes cultivados en los diferentes tratamientos se seleccionaron 250 brotes regenerados de aspecto normal (semejante a la planta original) de 1 a 5cm de longitud, para su individualización y enraizamiento en medio MS 50% adicionado con carbón activado o manitol (1g/l). Los frascos fueron sellados con tapas plásticas, posteriormente a los 30 días las tapas de 50 frascos Gerber® fueron sustituidas por *suncaps*. El porcentaje de enraizamiento fue evaluado a los 3 meses.

V.9. Aclimatización

Se seleccionaron 200 brotes individualizados de aspecto normal con raíces mayores a 1cm de longitud, de ambos tratamientos (manitol y carbón activado), se sacaron los brotes de los frascos, se lavaron las raíces con agua tibia destilada para eliminar los restos de agar, se dejaron secar por 24 h y se plantaron (una planta por maceta). El sustrato empleado para las plantas consistió de tierra negra/tepojal 3:1 se humedeció y se esterilizó en el horno de microondas por 40 minutos. Con este sustrato se rellenaron macetas cuadradas de 6x5cm, las cuales se colocaron dentro de charolas traslúcidas (16 macetas x cada charola). Las charolas se mantuvieron dentro de un vivero cubiertas con malla sombra, el riego se realizó cada 3 ó 4 días. Éstas se abrieron gradualmente y la malla se retiró en los días posteriores. El porcentaje de sobrevivencia se evaluó después de 6 meses.

V.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos para el número de brotes, fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), las diferencias de medias estadísticamente significativas se discriminaron mediante la prueba de rango múltiple de mínima diferencia significativa (LSD).

Posteriormente, se realizó un análisis de correlación entre las variables de número de brotes generados y cantidad de peso seco por explante, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico *SPSS* ver. 15.0.

Para la comparación entre los 3 distintos tipos de explantes se seleccionó el mejor tratamiento de cada tipo de explante: Los datos obtenidos para el número de brotes, fueron evaluados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), las diferencias de medias estadísticamente significativas se discriminaron mediante la prueba de rango múltiple de mínima diferencia significativa (LSD). El análisis se realizó con el paquete estadístico *SPSS* ver. 17.0.

Diagrama 2. Método general para la regeneración *in vitro* de *M. theresae*

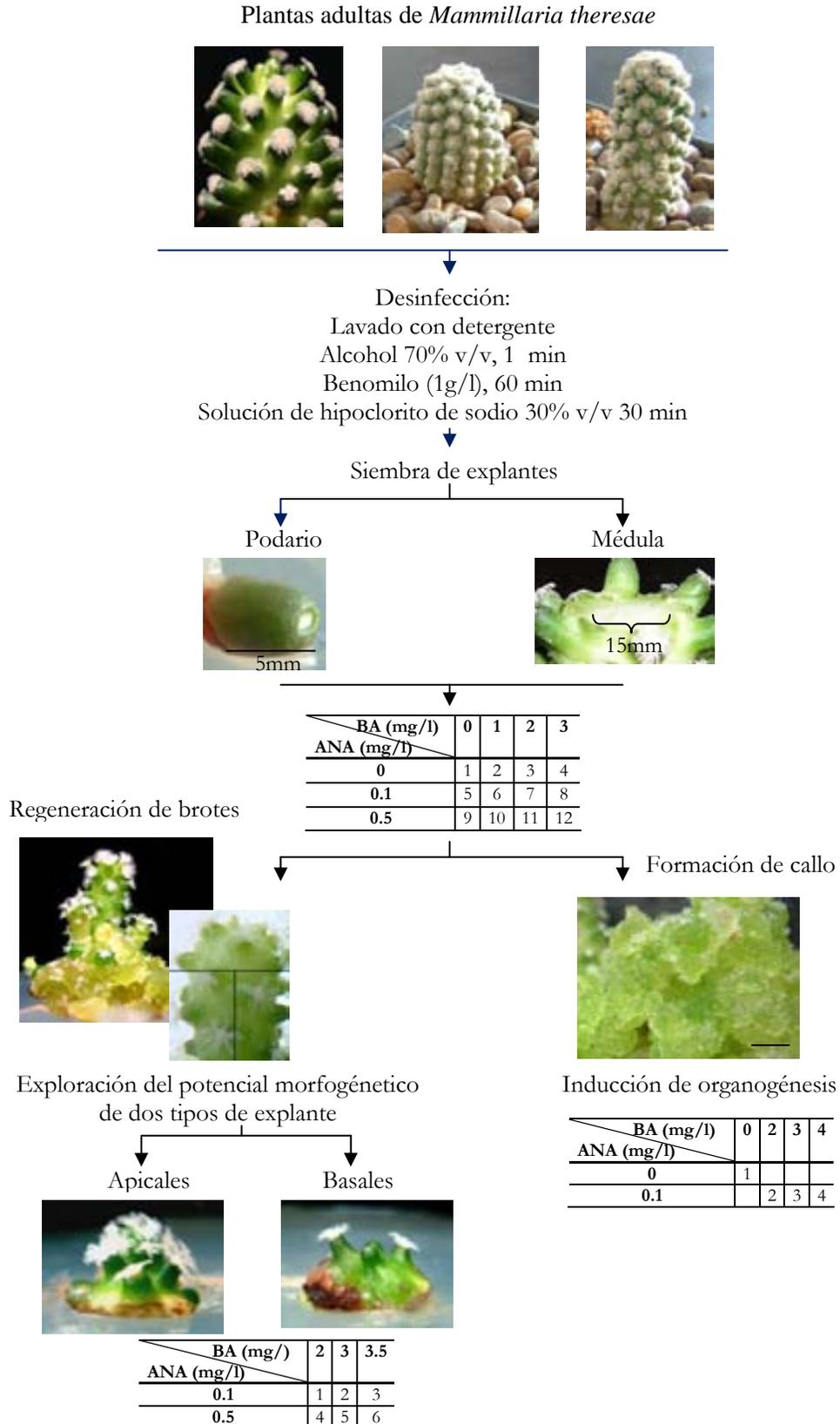
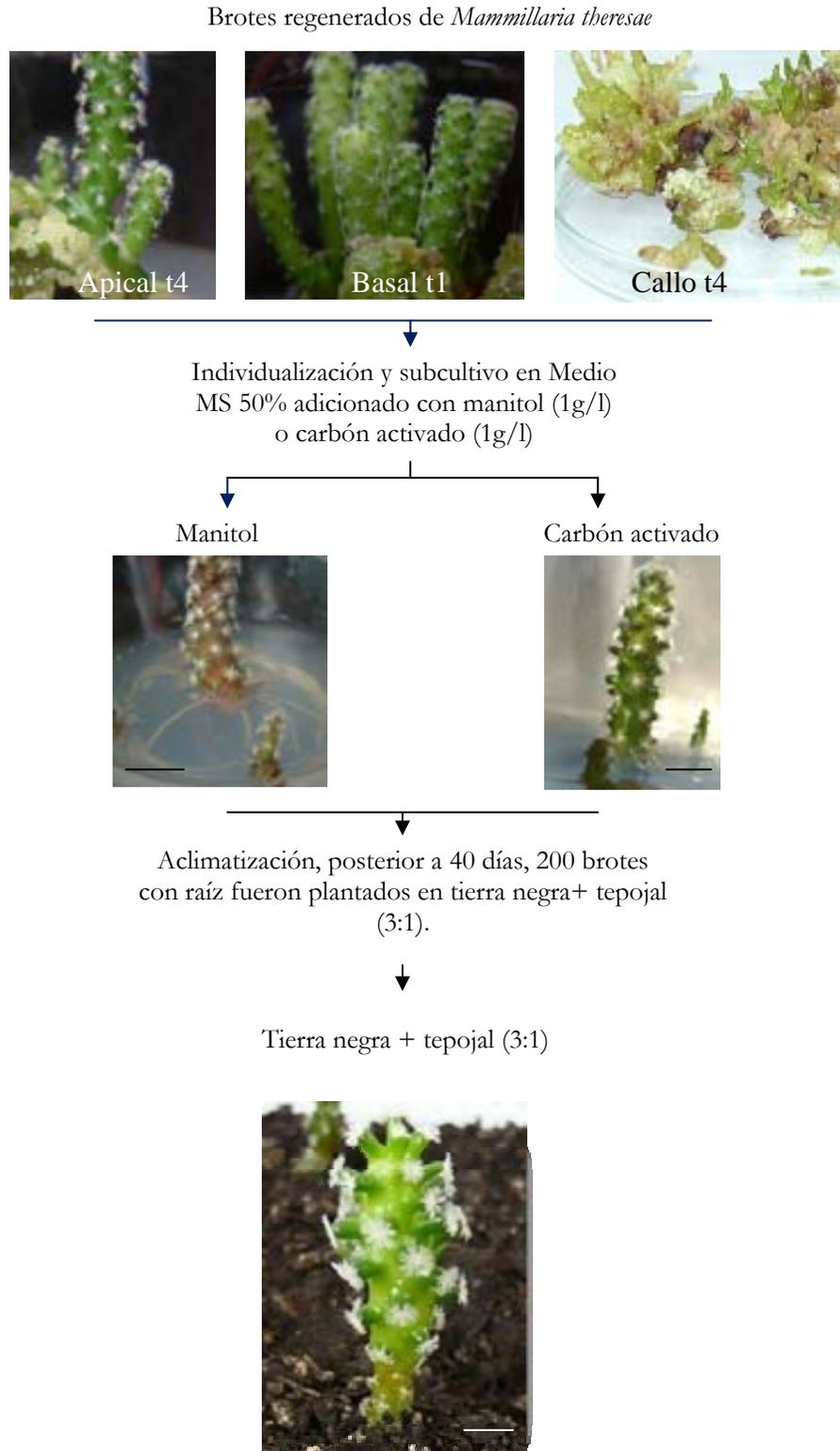


Diagrama 2. Continuación



V.11. Análisis estructural

El propósito de este análisis fue caracterizar el desarrollo de brotes a partir de callo e identificar histológicamente las estructuras desarrolladas. El callo empleado se obtuvo del explante basal de tallo del tratamiento 1 (0.1/2 ANA/BA mg/l), a los 8 meses de cultivo (**Diagrama 3**).

Primero se seleccionaron estructuras representativas de las etapas en desarrollo de brotes regenerados *in vitro*. Se usó el fijador de Navashin mezcla 1:1 de la solución A:B (**APÉNDICE C**). Las muestras se lavaron en agua corriente durante 1h. Para la deshidratación se usó el método directo de alcohol butílico terciario (ABT) (**APÉNDICE D**). Después del tercer cambio de ABT puro, el tejido se infiltró en parafina gradualmente, los frascos que contenían las muestras se incubaron en una estufa a temperatura de 58-60°C marcando el volumen inicial que ocupaba el ABT, ya que consecutivamente se le adicionaron algunas escamas de parafina cada media hora hasta que ésta cubrió por completo las muestras. Posteriormente la parafina se substituyó por parafina pura. Se elaboraron bloques de parafina en moldes de papel de 1cm³.

Los cortes se realizaron en un micrótopo de rotación American Optical® 820, se obtuvieron secciones de 8-10 µm de grosor, en forma de listones, los cuales se colocaron en un baño de flotación (agua 23-25 °C más una delgada capa de grenetina disuelta) se montaron en un portaobjetos y se dejaron secar por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente. Para la desparafinación, se colocaron los portaobjetos en una canastilla y se introdujeron a la estufa (60 °C) durante 30 minutos. Para rehidratar las muestras se colocaron en una canastilla y se sumergieron en una serie de alcoholes graduales: xileno puro, xileno-alcohol 1:1, etanol absoluto, 96%, 70%, 50%, 30% durante 20 minutos en cada uno y finalmente en safranina durante 24 h.

Las laminillas se tiñeron con la técnica dicrómica safranina-verde rápido. Se infiltraron con safranina durante 24 horas y posteriormente se lavaron con agua destilada. Consecutivamente pasaron por una serie alcoholes graduales 30%, 50%, 70% y 96% para su deshidratación, durante dos minutos en cada uno. Se les agregó verde rápido durante 15 minutos, para retirar el exceso con alcohol absoluto. Inmediatamente se les aplicó aceite de clavo por un periodo de cinco minutos para finalmente ser lavadas con Citri-solv®. Las preparaciones se montaron utilizando resina sintética y se dejaron secar en el horno (60 °C) durante un periodo de 15 a 20 días. Las laminillas se limpiaron y etiquetaron con: nombre de la especie, familia, fecha de obtención de la muestra, estructura, tipo de tinción, nombre del procesador y fecha de

elaboración. Por último se observaron y tomaron fotomicrografías de las muestras con un microscopio Carl-Zeiss-Axioskop®.

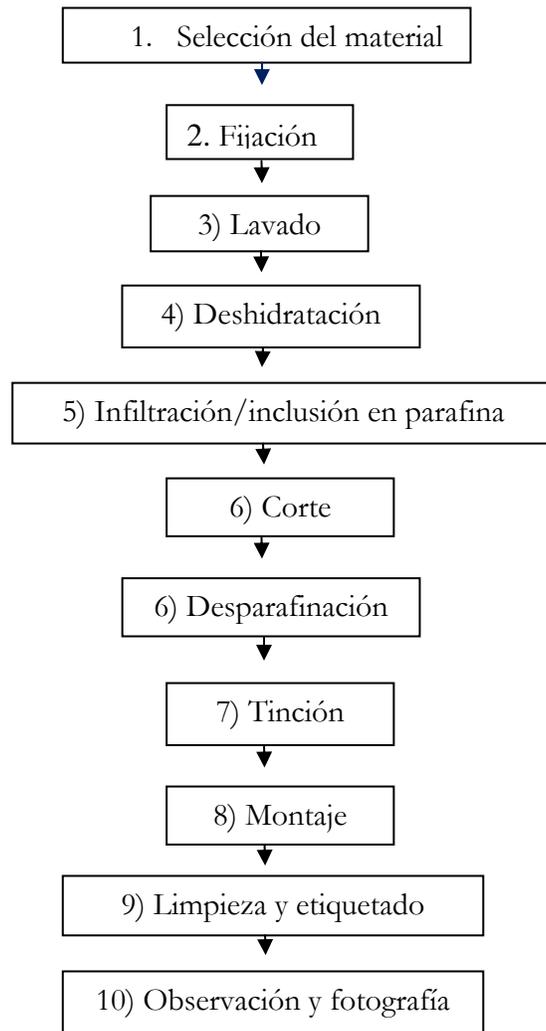


Diagrama 3. Procesamiento histológico

V.12. Pruebas histoquímicas

Para la identificación de los abundantes contenidos celulares de tipo granular en el citoplasma y adheridos a las paredes celulares del callo. Se realizaron pruebas histoquímicas para la caracterización de proteínas, almidón y lípidos. Se emplearon colorantes específicos (lugol, rojo de aceite “O”, sudán IV, eosina acuosa y azul negro de naftol) que reaccionaron y produjeron coloraciones, las cuales fueron identificadas microscópicamente.

V.12.1. Almidón

Se empleó callo fresco, el cual se colocó sobre un portaobjetos, se les aplicó lugol durante 5 minutos, se enjuagó con agua destilada, con el cubreobjetos se le realizó un squash y se observó al microscopio. La mayoría de los almidones en presencia del lugol presentan una tinción azul oscuro.

V.12.2. Aceites y grasas

V.12.2.a. Rojo de aceite “O”

Se empleó callo fresco, el cual se colocó sobre un portaobjetos, se le aplicó rojo de aceite “O” durante 25 minutos, se enjuagó con agua destilada, se le realizó un squash, se montó en gelatina glicerinada y se observó al microscopio.

V.12.2.b. Sudán IV

Se empleó callo fresco, el cual se colocó sobre un portaobjetos, se le aplicó rojo Sudán III durante 25 minutos, se le realizó un squash, se montó y se observó. Las cutículas, grasas, aceites esenciales y triglicéridos muestran una tinción rojiza.

V.12.3. Proteínas

V.12.3.a. Eosina acuosa

Se empleó callo fresco, el cual se colocó sobre un portaobjetos, se le colocó eosina acuosa durante 25 minutos, se enjuagó con agua destilada, se le realizó un squash y posteriormente se montó. Las proteínas se tiñen de rojo.

V.12.3.b. Azul negro de naftol

Se empleó callo fresco, el cual se colocó sobre un portaobjetos, se deshidrató con alcoholes graduales 30, 50%, durante tres minutos en cada uno, se le agregó azul negro de naftol 1:1, durante 20 minutos, se enjuagó en alcoholes 70, 96% y 100%, se pasó a xilol durante tres minutos, se le realizó un squash y posteriormente se montó en resina sintética. Las proteínas se tiñen azul.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Desinfección y germinación de semillas

El método de desinfección empleado para las semillas (65) fue efectivo, ya que no generó contaminación microbiana en los cultivos. Sin embargo, transcurridos 2 meses desde la siembra *in vitro*, sólo germinó 1 semilla (**Fig. 5a**). Después de dos años, la plántula alcanzó una altura de 1.3 cm y permanece *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del JB-IB UNAM (**Fig. 5b**).

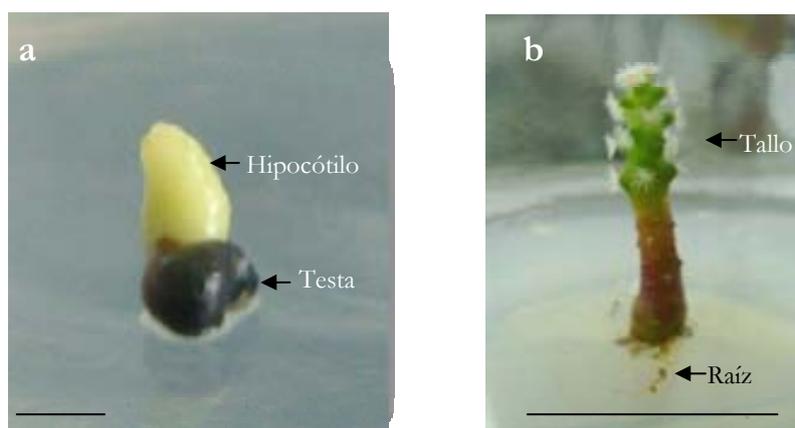


Figura 5. (a) Única semilla germinada, 60 días después de su cultivo, barra=1mm, (b) plántula de dos años de edad *in vitro*, barra= 1cm.

La baja germinación, probablemente se debió a 1) la desinfección resultó ser muy severa y/o 2) las condiciones *in vitro* no fueron las óptimas para la germinación de esta especie, así como lo ocurrido para *M. carmenae*, en la cual, Márquez (2001) señaló que el cultivo *in vitro* no favoreció la germinación de esta especie; Las semillas de *M. theresae* provenían del vivero de Ecocactus, con 1 año de edad, las cuales tal vez presentan algún tipo de dormancia para asegurar su sobrevivencia, similar a lo mencionado por Flores (2004) en *Pelecypora strobiliformis* y/o 3) no eran viables estas semillas.

Algunos de los trabajos realizados con cactáceas presentan un método de desinfección similar, sin embargo, el grado de germinación de las semillas varía entre especies, lo cual se atribuye a ciertos factores como especie, escarificación, medio de cultivo *in vitro* empleado, etc. Por ejemplo, Márquez (2001) sugirió que para *M. carmenae* las condiciones *in vitro* no favorecieron la germinación o que éstas requieren escarificación, por otro lado, Mata *et al.* (2001) reportaron que para *Turbincarpus laui* la germinación de éste se vio favorecida por el medio de cultivo *in vitro* empleado, de la misma manera, Flores (2004) empleó medio MS líquido con puente de papel

filtro Whatman No.1 para la germinación de 80 semillas de *Pelecyphora strobiliformis* con 89.23% de germinación. Este último trabajo presentó el mayor porcentaje de germinación, debido a que el medio líquido favoreció la disponibilidad de agua, llevando a cabo la imbibición de las semillas. Sin embargo, los porcentajes de germinación que presentaron los trabajos ya mencionados, evidencian la baja germinación de ciertas especies de la Familia Cactaceae. Además, cada especie necesita requerimientos específicos y no se puede llegar a una conclusión general acerca de los efectos para su germinación como lo indica Rojas (2008).

Otros factores clave para la germinación de las semillas son la viabilidad y madurez del embrión como lo mencionan Beristain (1997) y Flores (2004). Sin embargo, debido al escaso material no se pudieron realizar las pruebas respectivas de viabilidad a las semillas de nuestra investigación.

No obstante, algunas características intrínsecas de las semillas también pueden influir en su respuesta germinativa; por ejemplo, el tamaño afecta la germinación y sobrevivencia de plántulas; el tamaño de las semillas en una especie puede variar entre poblaciones o entre individuos, ya sea por diferencias genéticas o por diferencias en la historia de vida de cada planta (South *et al.*, 1985; Venable y Pake, 1999; Barbour *et al.*, 1999).

VI.2. Desinfección y siembra de los ejemplares adultos

El tratamiento de desinfección empleado resultó exitoso debido a que la contaminación fue casi nula, ya que de 84 explantes sólo se contaminaron 2.3%. Esto pudo deberse al estado de sanidad de los 3 ejemplares de *M. theresae* debido a que provinieron de un vivero, también a que es una cactácea con poca ornamentación, no presenta lana, tricomas y las espinas se eliminaron fácilmente antes de la desinfección. Además la concentración de los agentes desinfectantes y los tiempos empleados fueron efectivos.

Para la siembra, 40 podarios se cortaron longitudinalmente (**Fig. 6a**), no obstante, 50% de los explantes murieron, por oxidación, debido a que los explantes eran muy pequeños; por lo que se procedió a sembrar dos podarios con areolas (**Fig. 6b**), para disminuir el área de estrés (oxidación y necrosis) lo cual, favoreció la regeneración del explante.

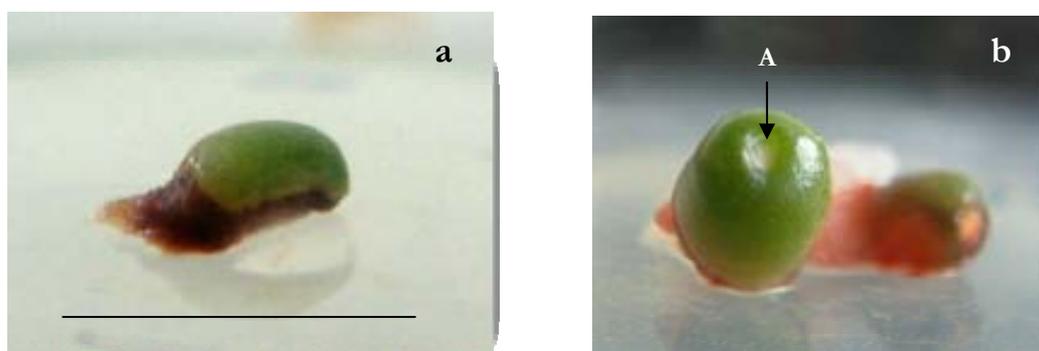


Figura 6. (a) Corte longitudinal de podario en MS50% después de 20 días de cultivo, (b) Dos podarios con areola cada uno. Aspecto después de cinco días de cultivo. A=Aréola Barra 1cm.

El tamaño de un explante puede determinar la respuesta *in vitro*; los explantes grandes son más difíciles de desinfectar; sin embargo, poseen un potencial regenerativo mayor a diferencia de los explantes pequeños, los cuales son dañados fácilmente y tienden a presentar baja viabilidad y capacidad regenerativa (Litz y Jarret, 1993). Esto ha sido reportado para diez especies de *Mammillaria*: *M. bocasana*, *M. densispina*, *M. habniana*, *M. hutchisoniana*, *M. orcutii*, *M. pectinifera*, *M. picta*, *M. perbella*, *M. rhodantha*, y *M. zephyranthoides*. El 80% de sus explantes perecieron por la extensiva oxidación, contaminación y necrosis, debido al corte excesivo del tejido (Ramírez *et al.* 2007). Garrido (1998) reportó para *Epiphyllum crenatum*, que los brotes regenerados a partir de explantes pequeños presentaron brotes con tallo cilíndrico estrecho y etiolado, a diferencia los brotes regenerados a partir de explantes de mayor talla presentaron un aspecto similar al de las plantas maduras *in vivo*.

VI.3. Inducción de los brotes a partir de podarios

A los 15 días de la inducción se observaron las primeras respuestas solo en los cultivos con reguladores de crecimiento. Éstos explantes mostraron un cambio en su tamaño y morfología, comenzaron a aumentar su volumen, formaron callo friable de crecimiento rápido en el área de corte (tratamientos del 4 al 12), el cual presentó en ciertas regiones tonalidades carmesí que posteriormente en el transcurso de los subcultivos disminuyó su intensidad. A los 30 días este crecimiento acelerado se detuvo, pero en el primer subcultivo a medio MS50% sin reguladores de crecimiento aumentó su desarrollo.

Después de 40 días de la inducción los podarios sólo regeneraron brotes vía organogénesis directa, éstos se formaron a partir de las areolas, debido a la existencia de yemas preformadas, sobre todo en tres tratamientos (1/3.0, 0.5/2.0 y 0.5/3.0 mg/l ANA/BA) (**Fig.7**).

Estos nuevos brotes en medio de inducción continuaron su crecimiento y presentaron una epidermis de color verde intenso y espinas blancas plumosas.

En la **Tabla 8** y **Gráfica 1** se muestra el promedio de brotes y peso seco de callo por tratamiento. La formación de brotes ocurrió en 10 de los tratamientos, no obstante, en el tratamiento sin reguladores de crecimiento (control) y en el tratamiento adicionado únicamente con 1mg/l de BA no ocurrió la formación de éstos, sólo la formación de una raíz por explante.

El análisis estadístico indicó que los tratamientos 8 (0.1/3.0 mg/l ANA/BA), 11 (0.5/2.0 mg/l ANA/BA) y 12 (0.5/3.0 mg/l ANA/BA) mostraron diferencias significativas en la formación de brotes, los cuales presentaron el mayor número de regenerantes. Con respecto al resto de los tratamientos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10) no hubo diferencias significativas en cuanto al número promedio de brotes obtenidos.

Después de 90 días de iniciar la inducción los brotes llegaron a presentar talla de 2.5 cm de longitud y una morfología similar a la planta madre (**Fig. 7e**). A los 120 días los brotes comenzaron a etiolarse, llegaron a medir 4 cm de altura y 0.5cm de diámetro (**Fig. 7f**).

En este estudio, se observó que los brotes regenerados fueron vía organogénesis directa, es decir, a partir de las areolas, de la misma manera Olguín (1994) reportó que los podarios de *Ariocarpus retusus* sólo regeneraron brotes vía organogénesis directa.

Con respecto al callo de éste estudio, sólo fue generado de manera abundante en 3 tratamientos (8, 11 y 12), sin embargo, para los restantes tratamientos se generó de manera limitada, lo cual se asemeja a lo reportado por Jonson y Emino (1979) para los podarios de *M. gracilis*.

Los brotes generados a partir de los mejores tratamientos 8 (0.1/3.0 mg/l ANA/BA), 11 (0.5/2.0 mg/l ANA/BA) y 12 (0.5/3.0 mg/l ANA/BA) fueron seleccionados para explorar el potencial morfogénico de las secciones apicales y basales de sus tallos.

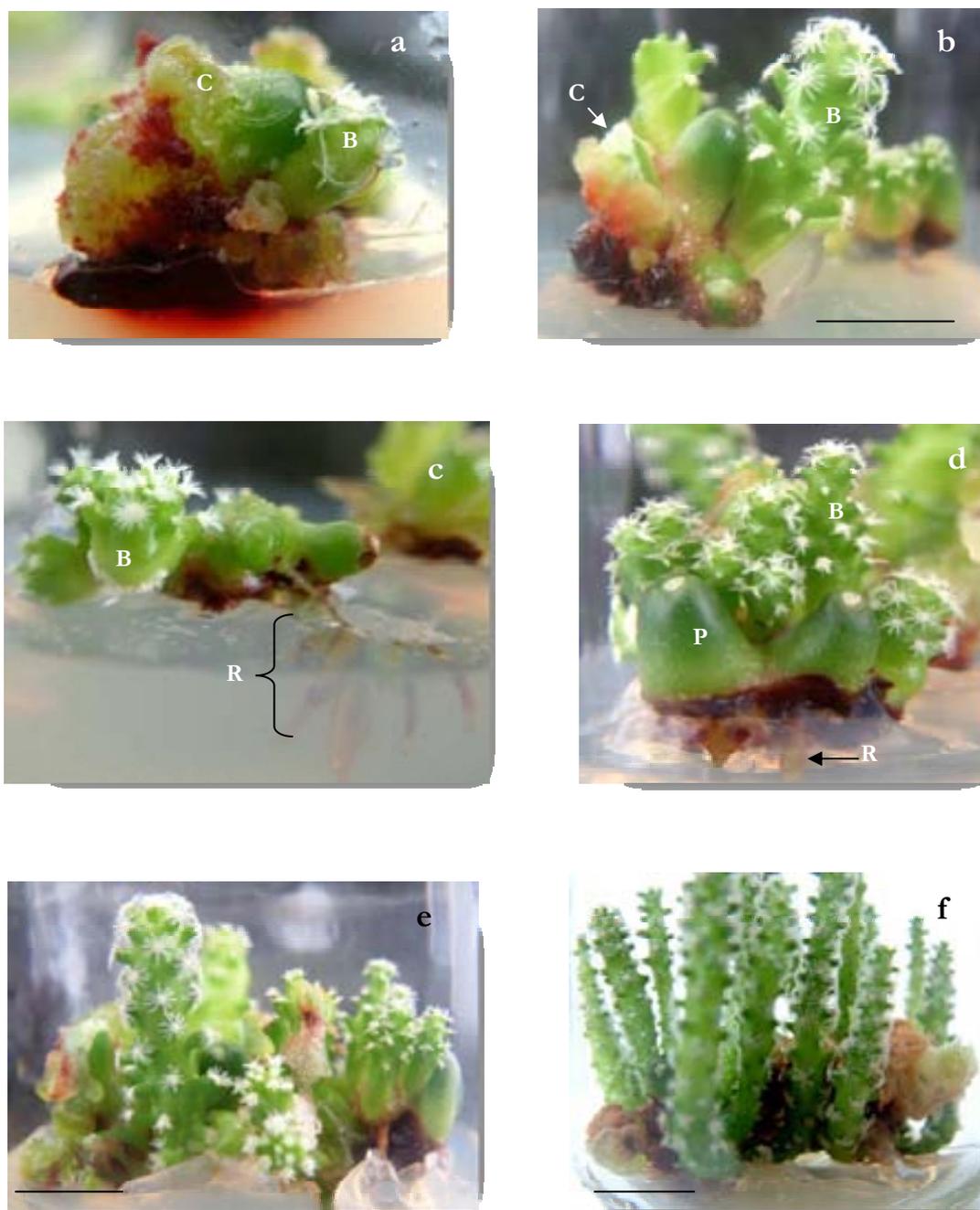


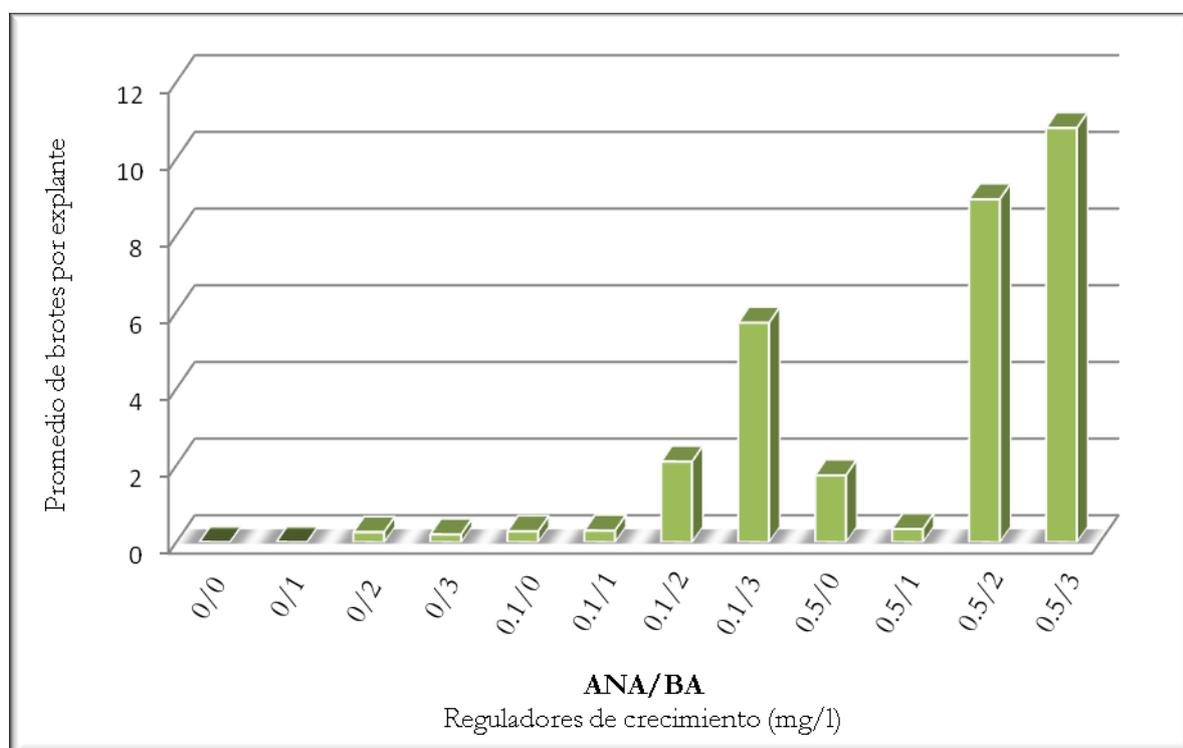
Figura 7. (a) Podario que formó callo en la base y generó un brote vía directa 8(1/3.0 ANA/BA mg/l), (b) Brote generado a partir de areola del podario 11(0.5/2.0 ANA/BA mg/l), (c) Brotes y raíces generados vía directa 6(0.1/2.0 ANA/BA mg/l), (d) Múltiples brotes y raíces generados vía directa 12(0.5/3.0 ANA/BA mg/l), cultivos después de 40 días. (e) Brotes generados vía directa 11(0.5/2.0 ANA/BA mg/l), cultivo después de 90 días (f) Múltiples brotes y raíces generados a partir de podarios en tratamiento 12(0.5/3.0 ANA/BA mg/l), cultivo después de 120 días. C=Callo, B=Brote, R=Raíz, P=Podario. Barra: 1cm.

Tabla 8. Promedio de formación de brotes y peso seco del callo a partir de podarios inicialmente cultivados en medio MS con reguladores de crecimiento durante 2 meses.

No	Tratamiento (mg/l)		No de explantes	Promedio de Brotes por explante	Promedio del peso seco callo (g)
	ANA	BA			
1	0	0	10	0 ^{abcdefgij}	0
2	0	1	10	0 ^{abcdefgij}	0
3	0	2	10	0.26 ^{abcdefgij}	0
4	0	3	10	0.2 ^{abcdefgij}	0.034
5	0.1	0	10	0.28 ^{abcdefgij}	0.023
6	0.1	1	10	0.3 ^{abcdefgij}	0.020
7	0.1	2	10	2.1 ^{adbcdefghi}	0.209
8	0.1	3	10	5.72 ^{gh}	1.482
9	0.5	0	10	1.74 ^{abcdefgij}	0.695
10	0.5	1	10	0.34 ^{abcdefgij}	0.056
11	0.5	2	10	8.94 ^{kl}	1.250
12	0.5	3	10	10.8 ^{kl}	2.213

Las medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no difieren significativamente a $p=0.05$

Gráfica 1. Promedio de brotes generados a partir de podarios cultivados en medio MS adicionado con reguladores de crecimiento ANA/BA. Resultados después de 2 meses de cultivo.



VI.4. Tipos de brotes obtenidos

Los brotes obtenidos vía organogénesis indirecta, de acuerdo a su apariencia se clasificaron de la siguiente manera:

- Normal: Los brotes normales presentaron apariencia similar a la planta original, es decir, órganos consolidados funcionales de color verde olivo y espinas plumosas abiertas (**Fig.8a**).
- Compactos: Los compactos son brotes con tejido muy compacto de color verde oscuro y en ocasiones sin espinas (**Fig.8b**).
- Hiperhidratado: Los hiperhidratados son brotes suculentos de apariencia vítrea, hialina a ligera coloración verde y a veces con espinas delgadas (**Fig.8c y d**).

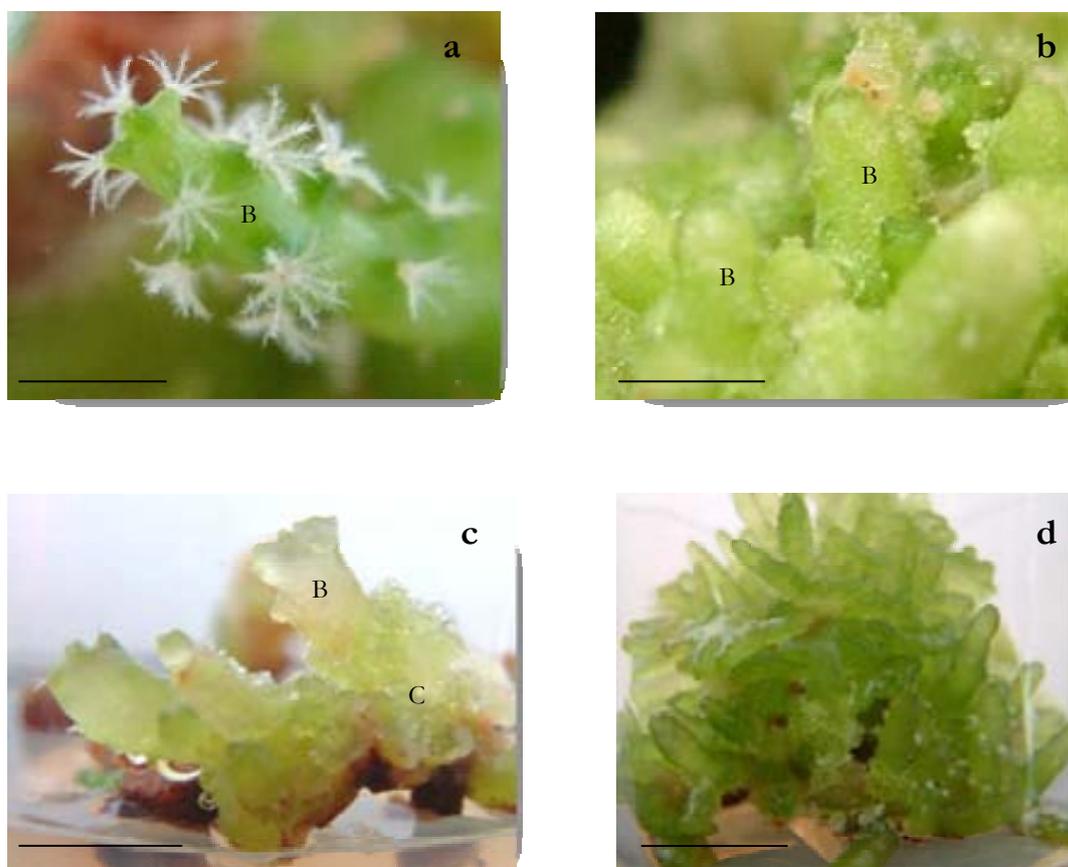


Figura 8. (a) Brote normal, (b) Brotes compactos, (c y d) Brotes hiperhidratados. B=brote, C=callo. Barra 1cm.

De manera similar Moebius-Goldammer (1999) en *Ariocarpus kotschoubeyanus*, clasificó los brotes obtenidos a partir de organogénesis indirecta en cuatro tipos: compactos (de consistencia sólida), semicompactos (apariencia suave), hiperhidratados (apariencia vítrea) y reventandos (revirtiéndose a callo).

VI.5. Cultivo *in vitro* de ápices de tallos

A los brotes regenerados *in vitro* vía organogénesis directa de *M. theresae* de 1 cm se les exploró el potencial morfogénico de los fragmentos apicales, en 6 tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BA. La morfogénesis emergente de los explantes apicales fue resultado del estímulo inducido; después de un mes de cultivo se observaron cambios en su tamaño (su volumen se incrementó) y morfología. El explante apical creció hasta alcanzar una longitud promedio de 1.5cm (el cual era la elongación del ápice inoculado, al cual se le determinó como dominante) y en la base se formó callo aproximadamente 1 a 2cm³ de aspecto friable, esponjoso y coloración verde olivo con pequeñas zonas carmesí principalmente donde el tejido había tenido contacto con el medio de cultivo. También hubo formación de algunas raíces provenientes del callo y brotes (**Fig.9a y b**).

Después de 2 meses de iniciada la inducción los explantes fueron subcultivados a medio MS50% sin reguladores de crecimiento, pero, éstos no conservaron su identidad. A los 40 días de este subcultivo, los explantes mostraron un aumento en la formación de callo, tuvo un volumen promedio de 37cm³ y su aspecto siguió siendo friable, esponjoso y de coloración verde olivo, con pequeñas zonas rosadas en la superficie de éste. Los brotes dominantes llegaron a alcanzar una altura de entre 2.5 a 3 cm, en las areolas de su base emergieron brotes (organogénesis directa) y a partir del callo generado (organogénesis indirecta).

Únicamente en el tratamientos 2 (0.1/3.0 ANA/BA mg/l) se observó callo de aspecto más compacto y de color verde intenso con tonos carmesí en su superficie, las areolas cercanas al área de corte del brote dominante se engrosaron y formaron callo esponjoso y otras formaron callo muy compacto como tejido de cicatrización, en proporción 85:15 respectivamente. Tres brotes generados vía organogénesis directa a partir de su ápice originaron brotes múltiples.

A los 8 meses de cultivo, la mayor respuesta en formación de brotes ocurrió en el tratamiento 2 (0.1/3.0 ANA/BA mg/l) con un total de 367 brotes por tratamiento. Seguido por los tratamientos 5 (0.5/3.0 ANA/BA mg/l) con 180 brotes, 3 (0.1/3.5 ANA/BA mg/l) con 176 brotes, 6 (0.5/3.5 ANA/BA mg/l) con 137 brotes, 1 (0.1/2.0 ANA/BA mg/l) con 118 brotes y por último 4 (0.5/2.0 ANA/BA mg/l) con 58 brotes (**Gráfica 2 y Tabla 9**).

Los explantes apicales generaron brotes vía organogénesis directa e indirecta, la primera ocurrió a partir de las areolas y la segunda se formó a partir del callo. El tratamiento 2 (0.1/3.0 ANA/BA mg/l) produjo la mayor cantidad de brotes con 367, de éstos el 70.5% presentó hiperhidratación, los cuales requirieron de 4 meses por lo menos para adoptar una apariencia

normal o no llegaron a tenerla y posteriormente se revirtieron a callo o simplemente murieron. Esto indica que el tratamiento 6 (0.5/3.5 ANA/BA mg/l) sería el más conveniente para la proliferación de brotes normales y evitar los efectos adversos de la hiperhidratación (Tabla 9 y Fig. 9c y d).

Con respecto al callo, este fue de aspecto esponjoso, de color verde intenso y desmenuzable. El mayor promedio de peso seco de callo por tratamiento fue generado en el tratamiento 2 (0.1/3.0 ANA/BA mg/l) con 2.272g (Tabla 9). Para *Turbinicarpus pseudopectinatus* los explantes apicales y basales inducidos con ANA/BA no presentaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de callo, aunque de manera total los explantes apicales generaron en promedio menos cantidad de callo (1.78 g por tratamiento) que los basales (2.33 g por tratamiento) (González-Caballero, 2008). Por otro lado, Márquez (2001) empleó ápices de *M. herrerae* para la multiplicación e inducción a organogénesis de tejido calloso obteniendo resultados favorables.

Gráfica 2. Brotes producidos de explantes apicales de tallos cultivados en medio MS con reguladores de crecimiento, después de 8 meses de iniciados los cultivos.

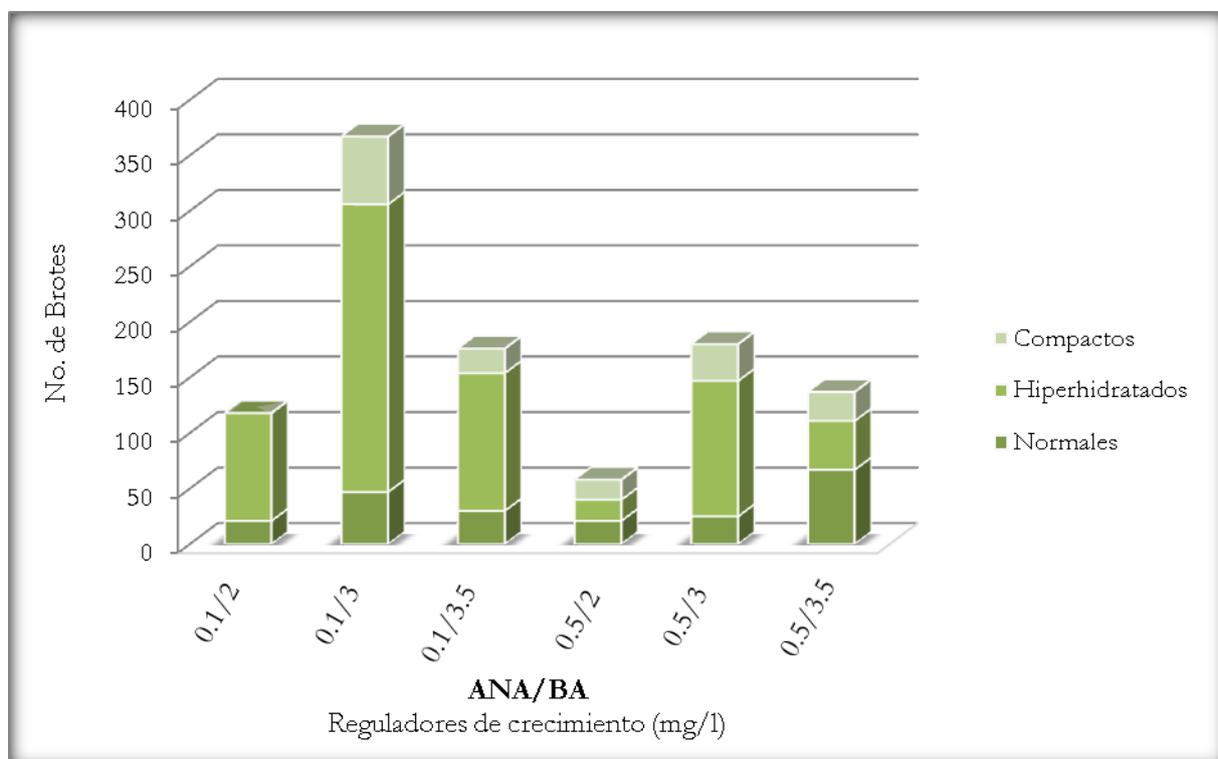


Tabla 9. Brotes producidos de explantes apicales de tallos cultivados en medio MS con reguladores de crecimiento, después de 8 meses de iniciados los cultivos.

No. Tratamiento	Reguladores (mg/l)		No. de explantes	Total brotes	% de los tipos de brotes			Promedio brotes	Promedio del peso seco de callo (g)
	ANA	BA			Normal	Hiperhidratados	Compactos		
1	0.1	2	8	118	17.8	82.2	0	16.5 ^{adef}	1.439
2	0.1	3	8	367	12.8	70.5	16.6	40.12 ^{abc}	2.272
3	0.1	3.5	8	176	17.0	70.4	12.5	25.12 ^{bcf}	1.560
4	0.5	2	8	58	36.2	32.7	31.1	8.37 ^{adef}	1.161
5	0.5	3	8	180	13.9	67.8	18.3	24.12 ^{acdef}	1.254
6	0.5	3.5	8	137	48.9	32.1	18.9	15.12 ^{acdef}	1.130
Total			48	1036					1.469

Las medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no difieren significativamente a $p=0.05$

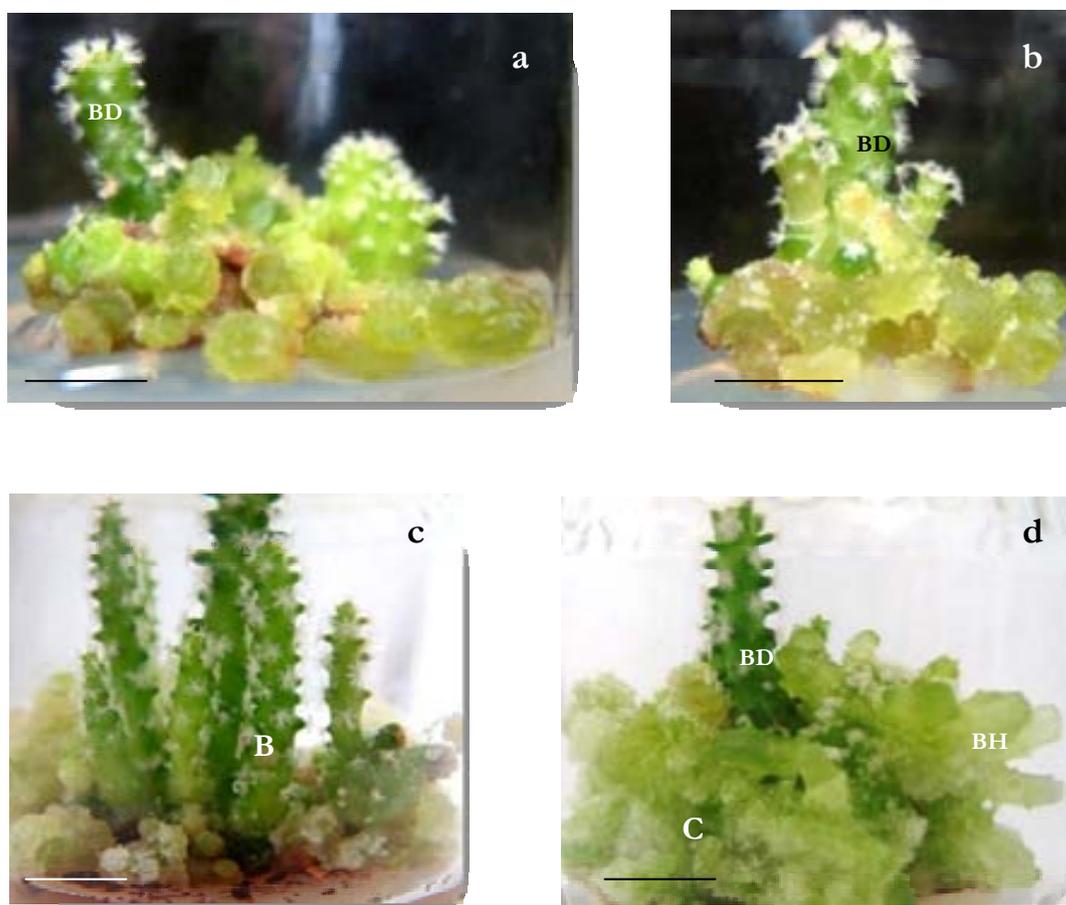


Figura 9. (a) Brote dominante y brotes regenerados vía organogénesis directa e indirecta a partir de explantes apicales 2(0.1/3 ANA/BA mg/l) después de 1 mes de cultivo, (b) Brotes generados a partir de explantes apicales 3(0.1/3.5 ANA/BA mg/l) después de 1 mes de cultivo. (c) Múltiples brotes generados a partir de explantes apicales 6 (0.5/3.5 ANA/BA mg/l), después de 8 meses de cultivo, (d) Brote dominante rodeado de callo y brotes hiperhidratados 2(0.1/3.0 ANA/BA mg/l) después de 8 meses de cultivo. B=brote, BD=brote dominante, BH=brote hiperhidratado, C=callo. Barra: 1cm.

VI.6. Cultivo *in vitro* de bases de tallos

A los brotes regenerados *in vitro* de *M. theresae* de 1 cm se les exploró el potencial morfogénico de los fragmentos basales, en 6 tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BA. A estos tallos sin ápice se les realizó un corte longitudinal y el área de corte fue sembrada en contacto con el medio. Después de un mes de cultivo el tejido presentó cambios en su tamaño y morfología, el volumen de éstos se incrementó y la zona de corte comenzó a generar callo esponjoso de crecimiento acelerado, ligeramente oxidado. Con respecto a los brotes, su regeneración fue vía organogénesis directa, es decir emergieron de las areolas, las cuales se hincharon y mostraron tejido de cicatrización en algunos explantes (**Fig.10a y b**).

Después de 2 meses de iniciada la inducción los explantes fueron subcultivados a medio MS50% sin reguladores de crecimiento. A los 40 días de este subcultivo, los explantes mostraron un aumento en la formación de callo, en promedio midió 50 cm³ y mantuvo su aspecto friable, esponjoso y de coloración verde olivo, con pequeñas zonas rosadas en la superficie de éste. Los brotes se originaron a partir de las areolas axilares y apicales de los nodarios, su aspecto era normal. A partir del área de corte se generó callo, el cual presentó una gran capacidad de regeneración (**Tabla 10**). El tratamiento uno 0.1/2.0 ANA/BA mg/l presentó la mayor formación de éste con 4.950g.

Los fragmentos basales de tallo presentaron una mayor capacidad morfogénica que se expresó en la formación de brotes vía organogénesis directa pero sobre todo indirecta, no obstante aproximadamente el 84% de ellos presentaron el fenómeno de hiperhidratación. A los 8 meses de cultivo, el tratamiento uno con 0.1/2.0 ANA/BA mg/l presentó el mayor número de regenerantes con un total de 757 brotes por tratamiento, sin embargo, 89.6% de éstos fueron hiperhidratados, (**Gráfica 3, Tabla 10 y Fig. 10c y d**). Para evitar los efectos adversos de la hiperhidratación, como ya se mencionó, se recomienda aumentar la concentración del agar o simplemente dejar envejecer (deshidratar) el medio de cultivo.

González-Caballero (2008) reportó que las secciones basales de *Turbiniarpus pseudopectinatus*, produjeron mayor cantidad de callo y brotes en comparación con las secciones apicales, esto lo atribuyó, a que la superficie de corte es mayor (alto índice de superficie) en comparación con los explantes apicales. Igualmente para *Escobaria minima*, *M. pectinifera* y *Pelecypora aselliformis*, Giusti *et al.* (2002) reportaron que el mejor explante fue el basal, aunque no haya presentado diferencias significativas con los otros dos explantes (apical y lateral). También Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa (2002) reportaron en *P. aselliformis*, que la proliferación más alta fue de 12.4 brotes por explante con BA (1.5 mg/l) y sacarosa (50 g/l), en segmentos basales. En contraste, Saucedo (2006) reportó que el resultado obtenido de explantes basales de *Echinocereus*

pentalophus, fue nulo, ya que la mayoría se necrosaron, no tuvieron respuesta a los tratamientos o sólo se dio la formación de callo sin respuestas morfogénicas.

Gráfica 3. Brotes producidos a partir de explantes basales de tallos cultivados en medio MS después de 8 meses de iniciados los cultivos.

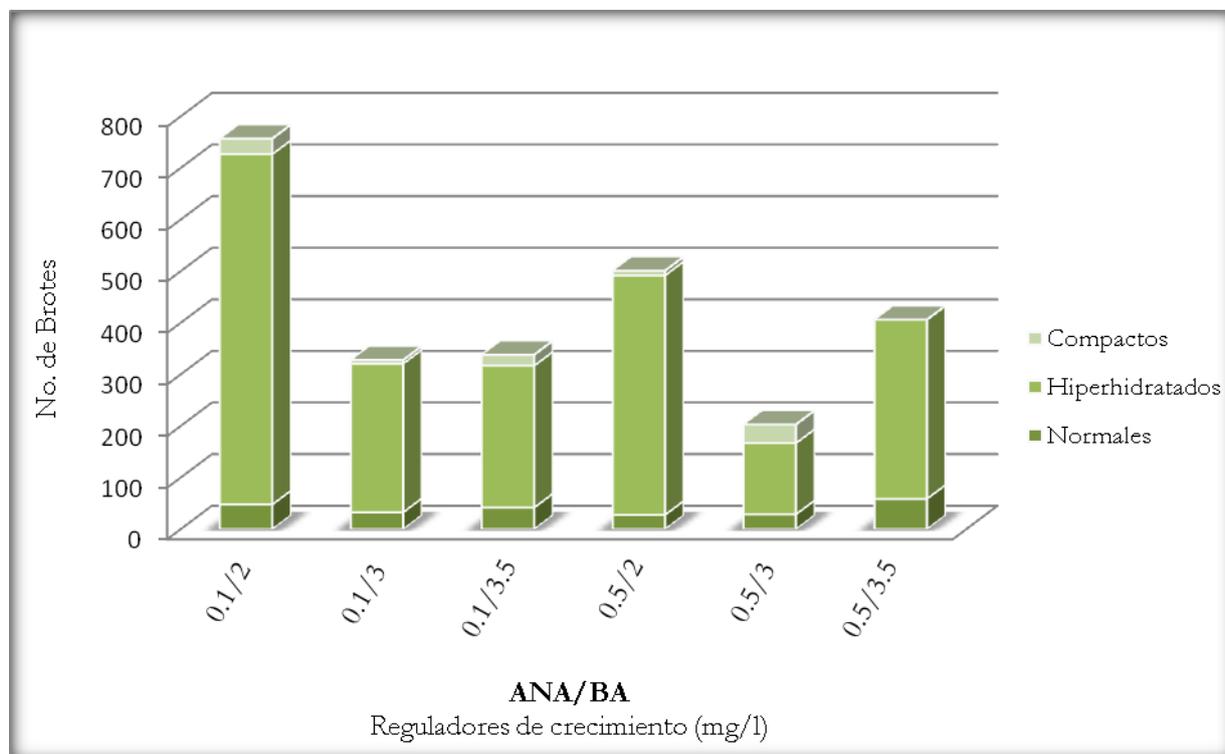


Tabla 10. Brotes producidos a partir de explantes basales de tallos cultivados en medio MS después de 8 meses de iniciados los cultivos.

No. Tratamiento	Reguladores (mg/l)		No. de explantes	Total brotes	% de los tipos de brotes			Promedio brotes	Promedio del peso seco de callo (g)
	ANA	BA			Normal	Hiperhidratados	Compactos		
1	0.1	2	16	757	6.5	89.6	3.9	47.31 ^{adf}	4.950
2	0.1	3	16	328	10	87.8	2.2	20.5 ^{bcdef}	3.451
3	0.1	3.5	16	338	12.4	81.3	6.3	21.13 ^{bcdef}	2.529
4	0.5	2	16	501	5.6	92.6	1.8	31.31 ^{bcdf}	3.415
5	0.5	3	16	203	14.2	68	17.8	12.69 ^{bc}	1.897
6	0.5	3.5	16	406	14.6	85.4	0	25.38 ^{abcd}	4.334
Total			96	2533					3.429

Las medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no difieren significativamente a $p=0.05$

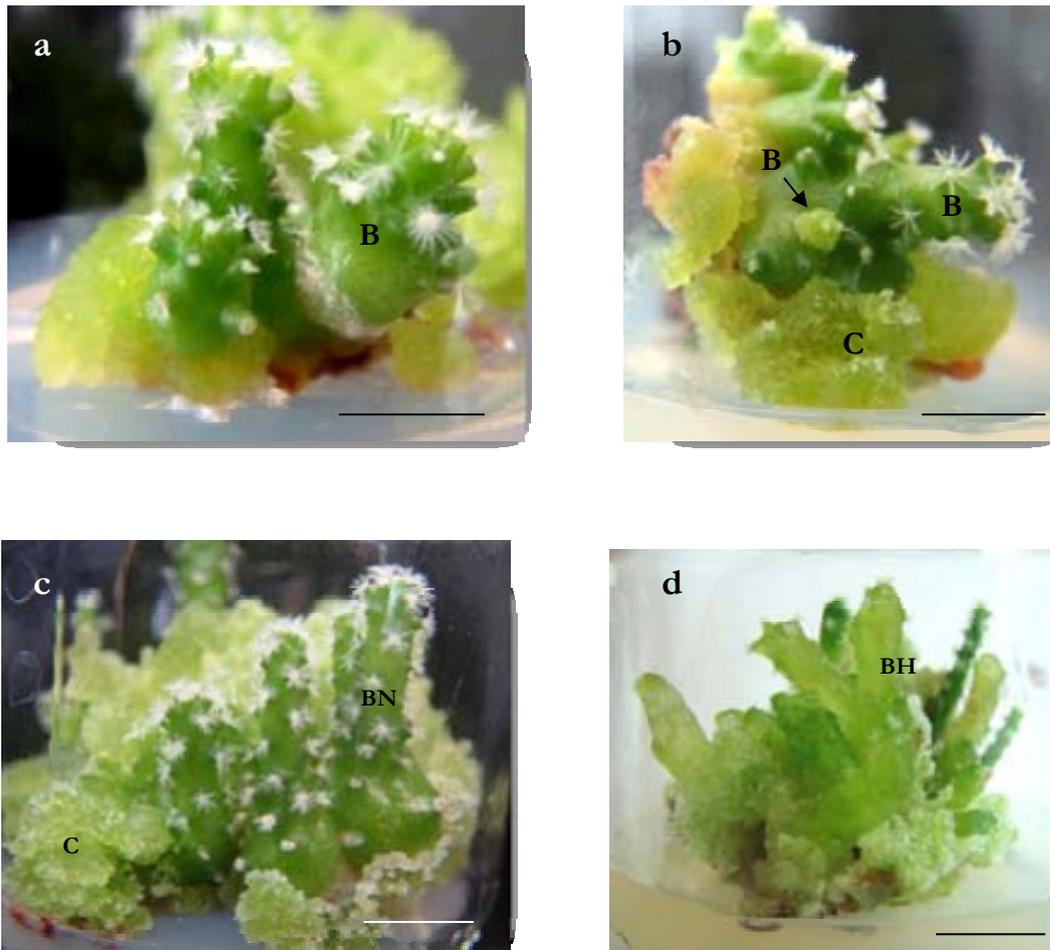


Figura 10. (a) Brotes generados vía organogénesis directa de explantes basales de tallo en 1(0.1/2 ANA/BA mg/l) después de 1 mes de cultivo, (b) Brotes y callo generados a partir de explantes basales en tratamiento 4(0.5/2 ANA/BA mg/l) después de 1 mes de cultivo, (c) Brotes normales regenerados vía organogénesis directa y callo generado a partir de explante basal 5(0.5/3.5 ANA/BA mg/l) después de 8 meses de cultivo, (d) Brotes hiperhidratados regenerados vía indirecta 1(0.1/2.0 ANA/BA mg/l). BN=Brote normal, BH=Brote hiperhidratado, C=Callo. Barra: 1cm.

Las bases de tallos de *M. theresae* comparadas con los ápices de tallos, presentaron un mayor potencial morfogénico, en cuanto a la regeneración de brotes y callo.

VI.7. Cultivo *in vitro* de secciones del cuerpo de tallo

Durante los tres meses que estuvo el cuerpo del tallo en medio MS 50% sin reguladores de crecimiento, el callo generado presentó un crecimiento rápido de apariencia esponjosa, vítrea, con coloración verde claro a blanquecino y pequeños fragmentos rosados, sin embargo, no presentó indicios de organogénesis como zonas más oscuras (meristemos) o brotes (**Fig. 11a**), por lo que posterior a los tres meses se procedió a su inducción en tres tratamientos con reguladores de crecimiento ANA/BA y un control (**Tabla 11**).

A los 15 días el callo obtenido a partir de los 3 tratamientos (2-4) en MS con reguladores de crecimiento proliferó en gran cantidad de biomasa en forma de callo friable de color verde intenso con pequeñas zonas rosadas, sin presentar casi oxidación, pero con evidente respuesta morfogénica, es decir, con pequeños nódulos de color verde más intenso que el callo.

A los 30 días el callo presentó pequeños fragmentos rosados e indicios de organogénesis: zonas más oscuras y pequeños brotes (**Fig.11b**).

La formación de callo y organogénesis ocurrió en todos los tratamientos, además del control (**Tabla 11**). Este último mostró ser estadísticamente diferente con respecto a los otros 3 tratamientos, ya que éste generó el menor número de brotes 30.33 en promedio, lo cual probablemente se debió a la falta del impulso que proporcionan los reguladores de crecimiento. Moebius-Goldammer (1999), reportó que en *Ariocarpus kotschoubeyanus* el crecimiento y formación de callo fue mínimo en medio sin reguladores de crecimiento, sin embargo, se incrementó al adicionar citocinina únicamente o en combinación de auxinas. También González-Caballero (2008) mencionó que los controles (cultivos sin reguladores de crecimiento) generaron la menor cantidad de callo en *Turbinicarpus pseudopectinatus*.

A medida que se aumentó la concentración de citocinina el número de brotes fue en aumento; En los tratamientos 2 y 3 el promedio de brotes generados fue similar, ya que el tratamiento 2 formó 67.91 y 78.75 en el tercero, en estos dos tratamientos no se observaron diferencias significativas, es decir estadísticamente son similares. El tratamiento 4 parece ser estadísticamente el mejor con respecto a la formación de brotes con 90.33 en promedio.

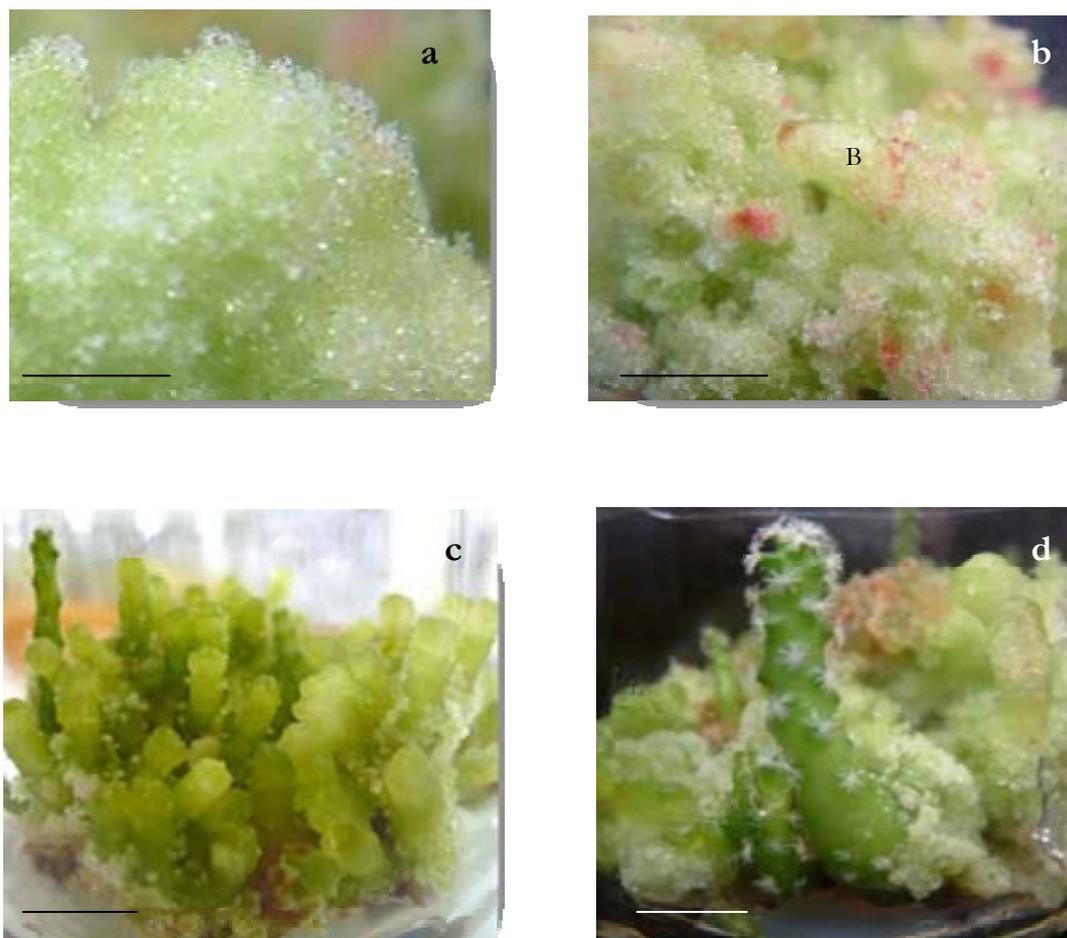


Figura 11. (a) Callo esponjoso con apariencia vítrea generado a partir del cuerpo del tallo en MS sin reguladores de crecimiento después de 1 mes de cultivo, (b) Brotes hiperhidratado en formación 2(0.1/2.0 ANA/BA mg/l) después de 1 meses de cultivo, (c) Brotes hiperhidratados en 4(0.1/4.0 ANA/BA mg/l) después de 8 meses de cultivo, (d) Brotes normales generados a partir de callo en 3(0.1/3.0 ANA/BA mg/l) después de 8 meses de cultivo. B=Brote, C=Callo. Barra: 1cm.

Tabla 11. Promedio de formación de brotes a partir de callo cultivado en medio MS adicionado con reguladores de crecimiento (ANA/BA), después de 8 meses de iniciados los cultivos.

No	Tratamiento (mg/l)		Callo		
	ANA	BA	Volumen (cm ³)	Peso seco (g)	Promedio de brotes por explante
1	0	0	71.27	0.97	30.33 ^a
2	0.1	2	65.03	2.40	67.91 ^{bcd}
3	0.1	3	75.23	2.39	78.75 ^{bcd}
4	0.1	4	95.33	4.75	90.33 ^{cd}

Las medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no difieren significativamente a $p=0.05$

En los cuatro tratamientos se obtuvieron los tres tipos de brotes, los más frecuentes fueron los brotes hiperhidratados, seguidos por los compactos y los normales. Sin embargo, conforme trascurría el tiempo y el medio se deshidrataba, los brotes hiperhidratados adquirirían una consolidación más normal (**Fig.11c y d**). Parece ser que el explante influyó en el tipo de brotes regenerados ya que para otras especies de cactáceas donde se ha inducido organogénesis a partir de callo, éste ha generado brotes hiperhidratados, por ejemplo, para la inducción de organogénesis a partir de callo de *Echinocereus pentalophus*, Saucedo (2006) empleó 9 tratamientos (0, 0.1 y 0.5/ 0, 1 y 3 ANA/BA mg/l), sin embargo, en cinco de ellos se presentó un alto porcentaje de hiperhidratación. También Giusti *et al.* (2002) obtuvieron altos porcentajes de hiperhidratación en *M. pectinifera*; de 32.2 brotes regenerados el 62.4% fueron hiperhidratados y en *Pelecyphora aselliformis* de 85.5 de brotes regenerados el 63.7% presentaron hiperhidratación.

En esta investigación se observó, que los brotes hiperhidratados provenían de la organogénesis indirecta. Giusti *et al.* (2002) reportaron éste mismo evento en *Pelecyphora aselliformis* y *Mammillaria pectinifera*, y Saucedo (2006) en *E. pentalophus*. Ésta alteración fisiológica (hiperhidratación y compactación) se puede deber a distintos factores como la concentración de los reguladores de crecimiento, sobre todo de citocinina, la fuente nitrogenada y la presión osmótica del medio durante el cultivo *in vitro*. Ésta última, tiene efecto directo en los explantes; dependiendo de la concentración del agar éste actúa reteniendo agua, por lo que la hiperhidratación se reduce en altas concentraciones de agar, es decir, conforme sea más negativo el potencial osmótico, menor será la absorción de agua y, por consecuencia, se dificultará la disponibilidad de los nutrientes del medio, sin embargo, afecta de manera negativa la multiplicación de brotes axilares (Ortiz y Alcántara, 1997; Cárdenas y Villegas, 2002; Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa, 2002; Christiane *et al.*, 2004).

Para este estudio la hiperhidratación de los brotes de *M. theresae* fue reducida por dos factores 1) el aumento del gelificante al medio de cultivo (se incrementó la concentración del agar de 8 a 10 g/l) y 2) la deshidratación del medio, para generar un potencial osmótico más negativo, lo que reflejó la consolidación de los brotes, sin embargo, éste último tuvo un efecto negativo sobre el callo, ya que éste murió por la deshidratación del medio. De la misma manera, Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa (2002), emplearon altas concentraciones de agar y bajas concentraciones de reguladores de crecimiento y obtuvieron un nivel bajo de hiperhidratación (5%) en el total de los brotes de *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis*. En el caso de *Chamaecereus*

silvestrii, Garrido (1998), realizó combinaciones con diferentes concentraciones de ANA/KIN (mg/l) y obtuvo diferentes morfologías dependiendo de la concentración de estos reguladores, por ejemplo con 0.1/10 ANA/KIN mg/l los brotes presentaron morfología similar a la planta madre; con 0 KIN mg/l los brotes fueron muy delgados; con 0 y 0.1 ANA mg/l fueron similares a la planta madre y con 0.5 y 1.0 ANA (mg/l) los brotes estaban hiperhidratados.

Las altas concentraciones de BA fueron más eficaces para el incremento de la biomasa (callo), así como para promover la formación de brotes en éste, por lo que, pueden señalarse como “potencialmente” útiles para la inducción de organogénesis del callo de *M. theresae*. Al igual que se ha señalado para *M. herrerae* (Márquez, 2001) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer, 1999).

Aunque las altas concentraciones de BA sean muy eficientes en la inducción de callo *M. theresae*, esto contrasta con la calidad de los brotes, por el alto porcentaje de hiperhidratación.

VI.7. Comparación entre los tres tipos de explantes

Se comparó el potencial morfogenético de los tres tipos de explantes (apical, basal y el cuerpo del tallo) mediante un análisis de varianza de una vía. Se compararon de cada tipo de explante los tratamientos que obtuvieron un mayor número de brotes generados (Tabla 12).

Tabla 12. Promedio de brotes por explante en secciones apicales, basales y cuerpo de tallo de *M. theresae* cultivados en medio MS adicionado con reguladores de crecimiento. Resultados después de 8 meses de iniciados los cultivos.

Tipo de explante	Tratamiento	Promedio de brotes /explante
Apical	2	45.87 ^{bc}
Basal	1	47.31 ^{bc}
El cuerpo del tallo	4	90.33 ^a

Las medias seguidas de la misma letra dentro de una columna no difieren significativamente a $p=0.05$

De lo anterior se puede concluir que existen diferencias significativas en la cantidad de brotes generados a partir del cuerpo del tallo en comparación entre los explantes laterales y apicales, siendo el cuerpo del tallo, el que generó una mayor cantidad de brotes. Sin embargo, como ya se explicó la calidad de los brotes es menor, además de que requieren más tiempo para adoptar una morfología normal.

Las investigaciones realizadas con otras especies de cactáceas mostraron que existen diferencias en la regeneración, debido al tipo de explante empleado. Los siguientes autores reportan que las partes basales de tallo fueron el mejor explante en la regeneración: González-Caballero (2008) para *Turbinicarpus pseudopectinatus*; Giusti *et al.* (2002) para *E. minima*, *M. pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis*; Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa (2002) para *P. estrobiliformes* y Olguín (1994) para *Ariocarpus retusus*.

Para *M. theresae*, en nuestra opinión el mejor explante para la regeneración de brotes normales fueron las secciones apicales y basales; y para la formación de callo fue el explante del cuerpo del tallo.

El cuerpo del tallo de *M. theresae*, fue el mejor explante para la regeneración de callo, de manera semejante Kolar *et al.* (1976) lograron regenerar brotes a partir de callo de origen medular de *M. woodsii*, emplearon MS adicionado con AIA/KIN 2.0/2.0 mg/l; a las 5 semanas de inducción obtuvieron callo y 10 semanas después éste generó brotes. Por otro lado, Márquez (2001) empleó ápices de *M. herrerae* para la inducción y multiplicación de callo, obtuvo favorables resultados. No obstante, la vía de la regeneración puede causar variación somaclonal en los brotes regenerados, por lo que, los brotes regenerados a partir del callo pueden presentar una mayor variabilidad, factor crucial para conservación de las especies (Pérez, 1998).

VI.8. Correlación entre el número de brotes y el peso seco de callo

Se efectuó un análisis estadístico entre las variables de cantidad de brotes generados y el peso seco del callo de cada explante para observar si existía una correlación entre ambas. Los resultados mostraron que en todos los explantes existió una relación directamente proporcional entre el peso seco del callo generado y el número de brotes obtenidos por explante (**Tabla 13**).

Tabla 13. Correlación entre el número de brotes y el peso seco de callo en los tres tipos de explante. Resultados después de 8 meses de iniciados los cultivos.

Tipo de explante	Coefficiente correlación pearson
Basal	0.843*
Apical	0.878*
El cuerpo del tallo	0.909*

*La correlación es significativa en $p=0.05$ (dos extremos)

Entre más callo regeneraron los explantes de *M. theresae*, existió una mayor área del tejido para inducir organogénesis, de esta manera se regeneró una mayor cantidad de brotes. De la misma manera, Litz y Jarret (1993) mencionaron que el tamaño de un explante puede determinar la respuesta *in vitro*, es decir los explantes grandes poseen un potencial regenerativo mayor a diferencia de los explantes pequeños, esto se debe directamente a la cantidad de células que posiblemente puedan ser competentes en el explante. Sin embargo, en este estudio se observó que en algunos casos, la biomasa regenerada a partir de los explantes en forma de callo no estuvo relacionada directamente con la cantidad de brotes obtenidos.

VI.9. Regeneración a partir de raíces

Se obtuvieron brotes espontáneos a partir de raíces generadas *in vitro* en los diferentes tratamientos cultivados. El primer caso surgió en el explante basal de tallo del tratamiento 7(0.1ANA/2BA mg/l), el cual comenzó a generar raíces espontáneas a los 10 días de su inducción, las raíces eran siete de color verde claro y dos rojizas; en particular una de ellas creció 1.5cm y generó dos brotes de 0.3cm a los 50 días de su inducción (**Fig. 12a**). Estos brotes, presentaron areolas gruesas, coloración verde clara además de ser regenerativos.

Algunos nodarios de tallo no respondieron a la inducción, por lo que este tejido se siguió conservando en condiciones *in vitro* con subcultivos periódicos cada 60 días, en 25 ml de medio fresco MS para que continuara el proceso de proliferación. (**Fig.12b**). Después de un año, se observó la formación de raíces en tres explantes cultivados en diferentes frascos y a los dos años a partir de estas raíces se generaron brotes. Las raíces eran fibrosas de color verde claro y los brotes estaban bien desarrollados con apariencia normal (**Fig. 12b, c y d**).

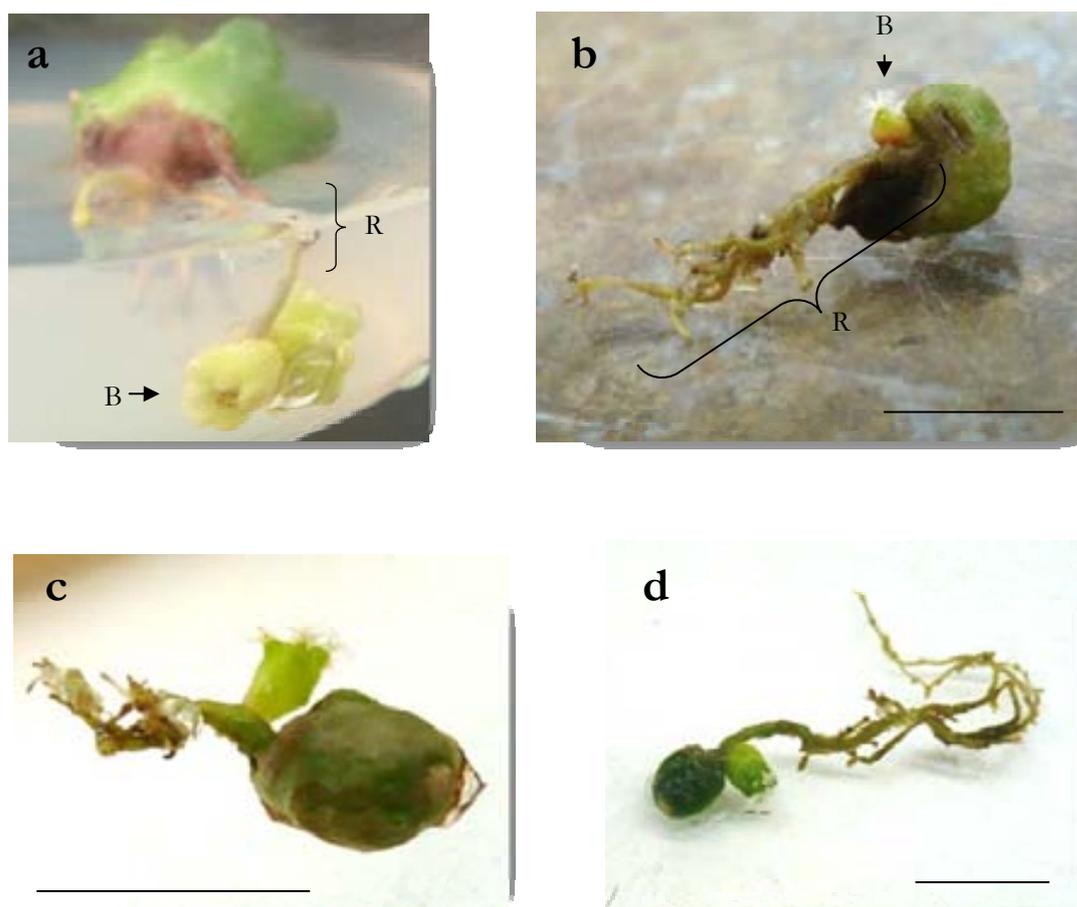


Figura 12. (a) Brotes generados a partir de la raíz en tratamiento después de 50 días de cultivo, (b, c y d) Brote generado a partir de la raíz después de 2 años de cultivo. B=Brote, R=Raíz. Barra: 1cm.

La exploración del potencial morfogénico de la raíz como explante, ha sido empleado escasamente en individuos de la Familia Cactaceae. Como ejemplo, Singh (1999) regeneró callo y brotes a partir de raíces de *Coryphantha elephantidens* cultivadas en MS adicionado con reguladores de crecimiento (2,4-D/ KIN) y Olguín (1994) en *Ariocarpus retusus*, obtuvo callo y brotes a partir de raíces con corona de plántulas en MS adicionado con reguladores de crecimiento (ANA/BA, 2iP/AIA, KIN/AIA).

Parece ser la primera vez que ocurre este tipo de brotación espontánea a partir de la raíz bajo condiciones *in vitro* en esta Familia, sin embargo, éste tipo de multiplicación vegetativa se observó en la especie *Myrtillocactus geometrizans* en su hábitat natural (Querétaro) por el Biólogo Gabriel Olalde (Com. pers. 2009) durante una investigación de campo.

Este tipo de regeneración espontánea pudo tener su origen, debido a que los órganos y tejidos de una planta pueden responder de diferente manera a idénticas condiciones de cultivo. Bajo condiciones *in vitro* existen interacciones entre un gran número de variables que pueden afectar de diferente manera la respuesta del explante, como el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, el tipo de explante empleado, etc. (Litz y Jarret, 1993). Por lo que, el tejido meristemático de la raíz regenerada de *M. theresae* fue estimulado por las condiciones *in vitro*, dando origen así a estos brotes.

VI.10. Individualización y enraizamiento de los brotes regenerados

La inducción de raíces fue necesaria, debido a la baja formación de éstas. Por lo que, se seleccionaron brotes con aspecto normal de talla mayor a 1cm, éstos fueron individualizados y subcultivados a medio MS50% adicionado con manitol (1g/l) o carbón activado (1g/l).

La formación de raíces en *M. theresae* ocurrió en pocos brotes a la semana de su inducción. La capacidad de respuesta fue evaluada a los 3 meses posteriores. Los brotes presentaron diferentes porcentajes de respuesta en ambos tratamientos (**Fig. 13** y **Tabla 14**).

Las raíces inducidas presentaron el tipo fusiforme, es decir una raíz principal gruesa, característico de esta especie (**Fig. 13c**). Sin embargo, algunas de estas raíces cultivadas en MS 50% adicionado con manitol presentaron abultamientos y una coloración verdosa (**Fig. 13d**), probablemente este tipo de raíz surgió por la radiación de luz hacia éste tejido, ya que los cultivos con carbón activado no presentaron éste tipo de crecimiento, el oscurecimiento del medio

reduce la luz en la base del brote y provee un ambiente que favorece la acumulación de auxinas fotosensibles para el enraizamiento (Margará, 1988; Pan y Staden, 1998; Pierik, 1990).

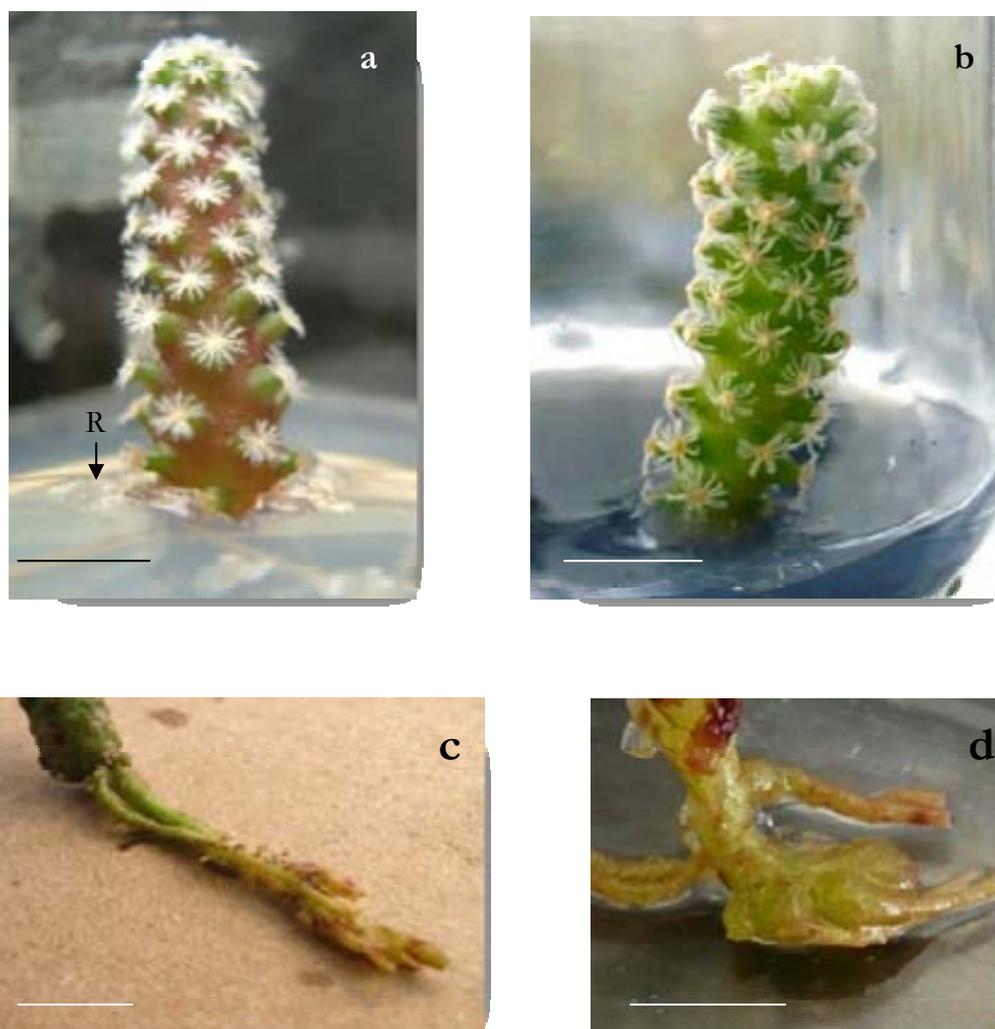


Figura 13. (a) Brote individualizado en medio MS50% con manitol, (b) Brote individualizado en medio MS50% con carbón activado y suncaps, (c) Raíz fusiforme generada en MS adicionado con manitol, (d) Raíz abultada generada en MS adicionado con manitol. Resultados después de 3 meses de cultivo. Barra 1cm.

Dentro de las respuestas no deseadas durante la individualización de los brotes estuvieron: 1) la formación de callo, alrededor del 20% de los brotes comenzaron a aumentar el volumen de su base hasta reventar la epidermis, para generar callo organogénico y 2) el alto porcentaje de mortandad de los brotes (**Tabla 14**), lo cual se debió al incremento del potencial osmótico del medio, lo cual fue confirmado por Pérez (1993), quien señaló que un alto contenido de sacarosa en los cultivos *in vitro* provoca un bajo porcentaje de supervivencia *in vitro* debido al potencial osmótico.

Con respecto a los brotes cultivados en frascos Gerber® sellados con suncaps, el medio presentó una mayor deshidratación. Los brotes generaron raíces a los 15 días de la sustitución de tapas. Sin embargo, este ensayo presentó la mayor mortandad de los brotes, debido a que hubo una mayor pérdida de humedad dentro del frasco y a su vez del medio de cultivo, en comparación con los frascos sellados con tapas plásticas (**Fig. 13 y Tabla 14**). Este resultado contrasta con lo reportado por Moebius-Goldammer *et al.* (2003) que emplearon MS 100 y 50% adicionado con carbón activado (1 g/l), además de suncaps para promover el enraizamiento de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y obtuvieron 55% de enraizamiento, sin embargo, no mencionaron el total de brotes generados.

Tabla 14. Porcentaje de enraizamiento y otras respuestas de los brotes individualizados y subcultivados en medio MS 50% con manitol o carbón activado. Resultados después de 3 meses de cultivo.

Tratamiento	Porcentaje de respuesta				Total de brotes
	Raíz	Sin raíz	Callo	Muertos	
Carbón Activado	33.8%	42.2%	21.4%	2.4%	100
Manitol	48.4%	19.4%	20.8%	11.13%	100
Suncaps/C. A.	21%	12%	12%	48%	25
Suncaps/Manitol	36%	16%	4%	44%	25

C.A.= Carbón activado

El uso de osmorreguladores como el polietilenglicol (PEG) se ha empleado para elevar el potencial osmótico del medio para la inducción del enraizamiento de cultivos *in vitro*. Por ejemplo, para inducir el enraizamiento de *Pelecyphora aselliformis*, Santos-Días *et al.* (2003) emplearon MS y MS50% adicionado con 1% de polietilenglicol y 1% de carbón activado, a los 6 meses no hubo formación de raíces, posteriormente realizaron un subcultivo a MS adicionado sólo con polietilenglicol, lo que generó la formación de raíces vigorosas en los 10 a 12 meses posteriores.

Algunos reportes y autores describen que ciertas especies de cactáceas no requieren de osmorreguladores o reguladores de crecimiento para la inducción de raíces, Orellana (1998) recomienda sólo reducir las sales minerales a la mitad de su concentración para estimular el enraizamiento y lograr la formación abundante de raíces, ya que los brotes jóvenes en desarrollo son una fuente rica en la producción de auxinas, lo que estaría estimulando su enraizamiento. Ramírez *et al.* (2007), realizaron el enraizamiento de 10 especies de *Mammillaria*, emplearon brotes de 1 a 2cm de longitud, algunos de ellos enraizaron directamente en su medio y otros tuvieron que ser subcultivados a medio MS50%. De la misma manera, Saucedo (2006) reportó que los

brotos individualizados (≥ 5 mm) de 8 semanas de edad de *Echinocereus pentalophus* formaron raíces de manera espontánea después de una semana del subcultivo en medio MS 50%, gelificado con Phytigel® 5 g/l.

También se reporta el uso de reguladores de crecimiento para inducir el enraizamiento de estas especies. Por ejemplo, en *M. elongata*, Johnson y Emino (1979) emplearon ANA o IBA (60 mg/l), pero no mencionaron cuántos brotes enraizaron; en *Aztekium ritteri*, Rodríguez-Garay y Rubluo (1992) emplearon MS adicionado con IBA (2mg/l), sin embargo, la respuesta no fue la esperada, ya que de 60 brotes sólo enraizaron dos.

Durante los diferentes cultivos realizados en esta investigación se observó la formación de raíces, sin embargo, para *M. theresae* el uso de osmorreguladores aceleró y homogeneizó la regeneración de raíces.

VI.11. Aclimatización

Para la aclimatización, se seleccionaron 200 brotes de *M. theresae* de aspecto normal de talla mayor a 1cm y con raíces.

Durante la aclimatización, se observó una adaptación gradual a las condiciones *ex vitro* (**Fig. 14**), es decir, el tallo presentó algunos cambios, hubo contracción de los podarios, la epidermis engrosó y presentó un tono verde más oscuro con tintes rosados, las espinas presentaron una forma más plumosa y cerrada, para mayor protección de la planta y la raíz fibrosa comenzó a expandirse por toda la maceta (**Fig. 14b y c**). Se obtuvo una supervivencia de 172 ejemplares (86%) después de 6 meses del cambio a condiciones *ex vitro*.



Figura 14. Plantas aclimatizadas (a) Planta aclimatizada, con podarios engrosados y de coloración intensa después de 6 meses, (b) Planta aclimatizada con espinas bien desarrolladas después de 6 meses, (c) Planta aclimatizada con raíz funcional después de 6 meses, (d, e y f) Plantas en floración después de 1 año. Barra: 1cm.

Las condiciones del cultivo *in vitro* provocan cambios en la morfología y fisiología de las plantas, como son: tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo, por lo que es necesario realizar una aclimatización de las plantas regeneradas, para lograr una adaptación gradual de su anatomía y fisiología (Agramonte *et al.*, 1998).

Muchos trabajos realizados *in vitro* no llegan hasta la etapa de aclimatización, debido a las dificultades que ésta implica o por tiempo, como ejemplo están *Pelecyphora strobiliformis* (Flores, 2004), *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994), *Pelecyphora aselliformis* (Santos-Días *et al.*, 2003), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius, 1999), entre otras.

Los porcentajes de supervivencia reportados en la literatura, para las especies de la Familia Cactaceae propagadas *in vitro* son muy variables. González-Caballero (2008) reportó para *Turbincarpus pseudopectinatus* un porcentaje de supervivencia de alrededor del 60% después de un año. Mata *et al.* (2001) reportaron una supervivencia de 94-100% para *T. laui*. Pérez-Molphe y Dávila-Figueroa (2002) obtuvieron 88% de sobrevivencia para *Pelecyphora aselliformis* y *P. strobiliformis* después de cuatro meses. Pérez-Molphe *et al.* (1998) reportaron para 21 especies de cactáceas que del 70-95% de los brotes enraizados *in vitro* sobrevivieron al proceso de aclimatización y para los brotes que no enraizaron *in vitro* emplearon soluciones comerciales para enraizamiento obtuvieron una supervivencia del 50-95% en la aclimatización.

Ramírez *et al.* (2007), realizaron la aclimatización de 10 especies de *Mammillaria*, emplearon brotes de 1 a 2cm de longitud y *peat moss* como sustrato, sin embargo, hubo putrefacción de éstos, por lo que, los demás brotes fueron desecados por 3 días y asperjados con fungicida, la parte basal de los brotes fue sumergida durante 20 min en una disolución de 10 mg/l de IBA, consecutivamente se plantaron en macetas con *peat moss* y permanecieron dentro de un invernadero. Después de 4 semanas la sobrevivencia para cada especie fue: *M. bocasana*, 93.9%; *M. densispina*, 87.5%; *M. habniana*, 96.5%; *M. hutchisoniana*, 92.0%; *M. orcutii*, 84.5%; *M. pectinifera*, 90.0%; *M. picta*, 86.0%; *M. perbella*, 92.2%; *M. rhodantha*, 92.5% y *M. zephyranthoides*, 88.2%. Sin embargo, estos resultados no parecen ser representativos, ya que las plantas sólo estuvieron un mes en aclimatización y esta etapa requiere un lapso de tiempo mayor, para asegurar la supervivencia de estas especies.

También existen trabajos en los que no se lograron obtener resultados satisfactorios en la aclimatización de las plantas propagadas *in vitro*. Por ejemplo, Gómez (2008), presentó un problema fitosanitario durante la aclimatización de 4 plantas de *Ariocarpus bravoanus*, las plantas murieron a las 11 semanas de estar en condiciones *ex vitro*. Sin embargo, este trabajo tampoco es representativo para esta etapa, ya que el número de ejemplares y tiempo fueron muy limitados.

Las plántulas de *M. theresae* presentaron dificultades en su reproducción convencional como crecimiento lento y raíces muy sensibles al exceso de agua, por lo que se pudren fácilmente (Gómez, 2001). En la presente investigación, el porcentaje de supervivencia que se obtuvo después de 6 meses fue un logro significativo. Cabe destacar que cinco de estas plantas florecieron dentro de su periodo de floración de las especies en condiciones naturales, sin embargo, no pudieron ser polinizadas debido a que no coincidieron todas las plantas en cuanto a la apertura de la flor.

VI.12. Secuencia cronológica del desarrollo de *Mammillaria theresae*

El presente estudio demostró ser viable, permitiendo la regeneración *in vitro* y aclimatización de *M. theresae* en un periodo aproximado de 17 meses, partiendo de diferentes tipos de explantes y la regeneración de los brotes ocurrió vía organogénesis directa e indirecta.

De manera general, toda la investigación requirió de dos años y medio, a la cual se le realizó la regeneración *in vitro*, análisis histológico e histoquímico, aclimatización y conservación *ex situ* de *M. theresae*, ya que en esta última parte requería que la aclimatización de las plantas fuera de 6 meses por lo menos, para donarlas a los diferentes jardines botánicos.

Un protocolo de regeneración *in vitro* junto con la fase de aclimatización, requiere de un tiempo considerable, debido a que son plantas con tasas de crecimiento muy lento (Hernández y Godínez, 1994). El tiempo que se reporta en la literatura de trabajos realizados con éxito en la regeneración de plantas de especies de esta Familia, generalmente es mayor a un año y medio. Por ejemplo, para *T. pseudopectinatus* el protocolo de regeneración *in vitro* y aclimatización requirió de 1.8 años (González-Caballero, 2008). En el caso de *Pelecyphora aselliformis* fue posible regenerar 10 brotes por semilla y obtener plantas de 3-4cm en 2 años (Santos-Días *et al.*, 2003).

VI.13. Análisis estructural

El propósito del análisis estructural fue caracterizar el desarrollo de brotes a partir de callo e identificar las estructuras desarrolladas. El tejido empleado se obtuvo del explante basal de tallo del tratamiento 1 (0.1/2 ANA/BA mg/l), a los 8 meses de cultivo. Al callo de *Mammillaria theresae* se le identificaron 4 etapas de desarrollo (callo, nódulos, brotes en formación y plántula), las cuales fueron procesadas por las técnicas histológicas cotidianas, teñidas, observadas en el microscopio, analizadas y fotografiadas.

Cabe señalar que los estudios anatómicos en especies del género *Mammillaria* son muy escasos, en el caso de *M. theresae* no hay estudios anatómicos previos, por lo tanto, es el primer análisis estructural e histoquímico que se le realiza a ésta especie.

VI.13.1. Callo

En esta investigación, en los cortes histológicos realizados al callo (**Fig. 15a**), se observaron células parenquimatosas grandes e irregulares de paredes delgadas, núcleos poco frecuentes, en general inconspicuos, haces vasculares abundantes, abundantes contenidos celulares de tipo granular en el citoplasma y adheridos a la pared (**Fig. 15b**). Lo cual concuerda con lo reportado por Margara (1988), donde describe al callo como un tejido neoplástico relativamente homogéneo inicialmente, constituido por células que se dividen más o menos activamente; sin embargo, hay callos en los que su centro es relativamente homogéneo y secundariamente puede aparecer heterogeneidad en el tejido (**Fig. 15c**). Algunas células se diferencian, por ejemplo, en traqueidas (**Fig. 15d, e y f**). El callo presentó el mismo patrón morfogenético en la mayoría de la cactáceas, ya que en los resultados obtenidos de *Mammillaria theresae* comparados con *Mammillaria san-angelensis* y *Aztekium hintonii*, mostraron células parenquimatosas de gran tamaño, de formas irregulares, núcleos no aparentes, paredes celulares delgadas y espacios intercelulares no aparentes, además de la formación de tejido vascular de *novo* (Duval, 1995; Calderón, 2007).

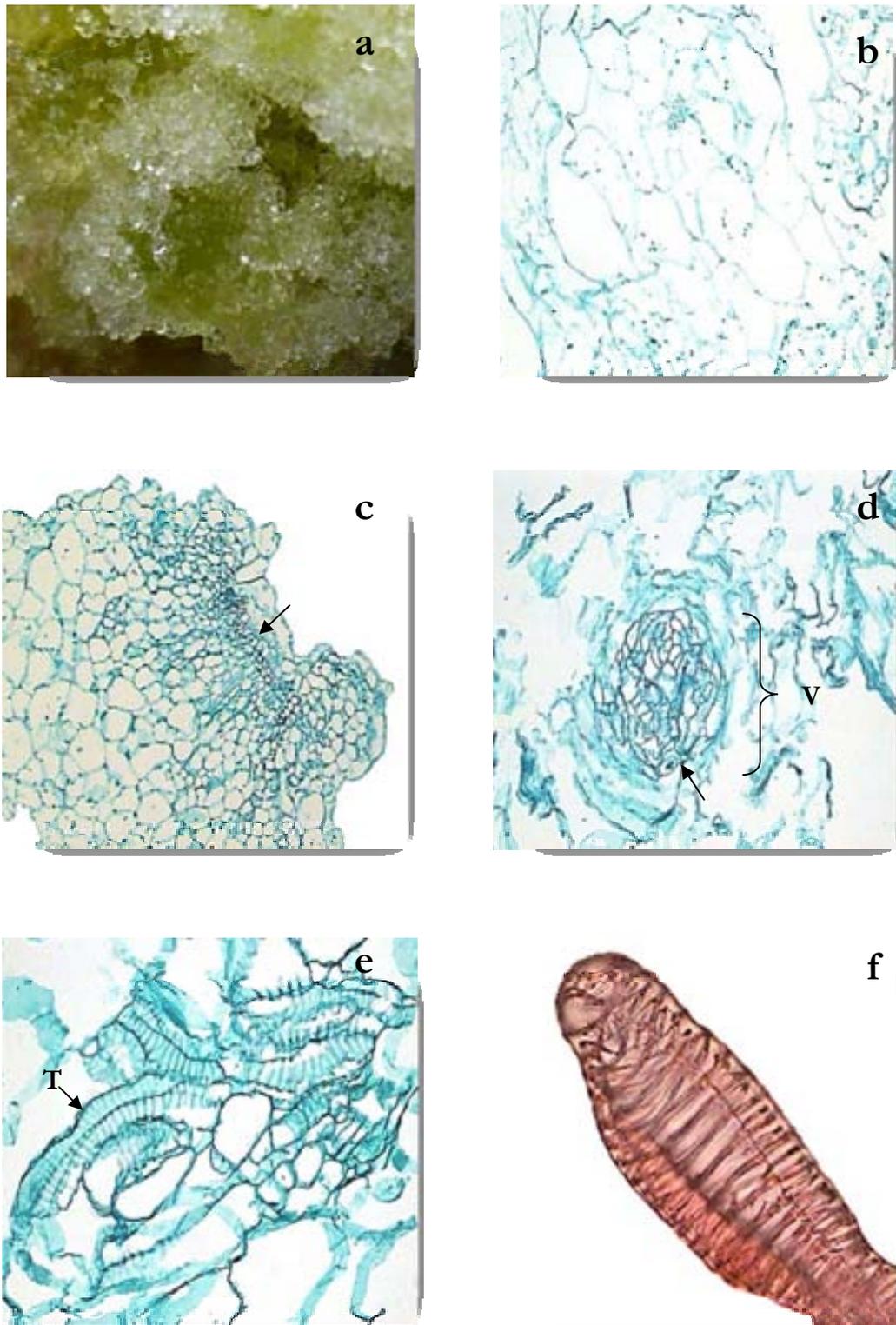


Figura 15. a) Callo verde de apariencia vítrea. Secciones longitudinales de callo de *Mammillaria thesae* cultivo en medio MS 50%: b) Corte de callo, células parenquimatosas irregulares de gran tamaño, núcleos inconspicuos y abundantes gránulos en pared celular y citoplasma, 200X, c) Callo heterogéneo; arreglo de células pequeñas 100X, d) Callo con tejido de conducción, 200X. e) Acercamiento al tejido de conducción; conjunto de traqueidas, 400X, f) Traqueida, 1000X. T= Traqueida, V= Tejido vascular.

Dentro del callo se observó la presencia de un gran número de células especializadas, como las traqueidas con engrosamientos helicoidales y anulares. Schleiden (1845) descubrió las traqueidas de banda ancha en el género *Mammillaria*, las cuales, son un tipo especializado de traqueidas en las que las paredes secundarias anulares o helicoidales se proyectan hacia el lumen celular. Son cortas, anchas y con forma de ejes, sus paredes secundarias son como bandas que cubren una pequeña porción de la pared primaria, dejando la mayoría libre para la difusión del agua (**Fig. 15f**). Las traqueidas de banda ancha aparentemente almacenan y conducen agua mientras previenen la difusión de embolismos (Hunt y Taylor 1990, Barthlott y Hunt 1993).

VI.13.2. Nódulos

Los meristemos generados a partir del callo formaron estructuras nodulares de coloración verde intenso (**Fig. 16a**). En esta etapa se observaron células en un estrato celular bien definido con una polaridad ya establecida. El meristemo apical presenta células pequeñas e isodiamétricas con citoplasma denso, vacuolas y núcleos grandes. Mientras la región basal presentó células parenquimatosas de mayor tamaño con pared definida y contenidos celulares de tipo granular (**Fig. 16b**). La organización es de vital importancia y queda establecida cuando se forman los tejidos, esto ocurre en el meristemo apical constituido por un grupo de células en constante división celular, las cuales se organizan para formar nudos, entrenudos, brotes, etc. Cuando las células se han organizado apropiadamente, se expanden hacia su forma madura final, principalmente por la absorción de agua (Mauseth, 1983)

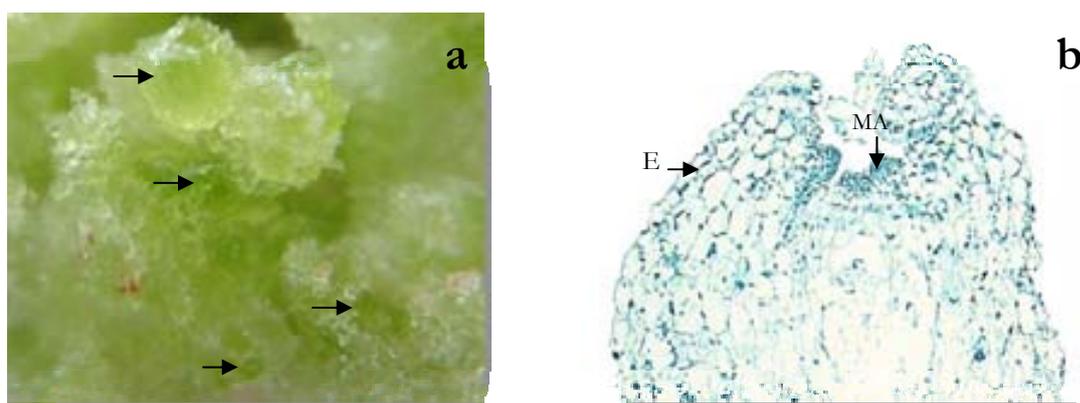


Figura 16. a) Callo verde con pequeños nódulos. Sección longitudinal de nódulo de *Mammillaria theresae*, cultivo en medio MS 50%; b) Corte de ápice, epidermis bien definida, células pequeñas y abundantes gránulos en pared celular y citoplasma, 100X. →: nódulo, MA: meristemo apical, E: epidermis.

VI.13.3. Brotes en formación

En secciones longitudinales de brote en formación de *M. theresae* se observó el meristemo apical con una epidermis definida, células parenquimáticas con núcleos grandes y abundantes contenidos celulares de aspecto granular y tejido vascular bien definido formado principalmente por traqueidas (**Fig. 17**). Este mismo patrón morfogenético fue reportado para los brotes de *Mammillaria sanchez-mejoradae* (Calderón, 2007).

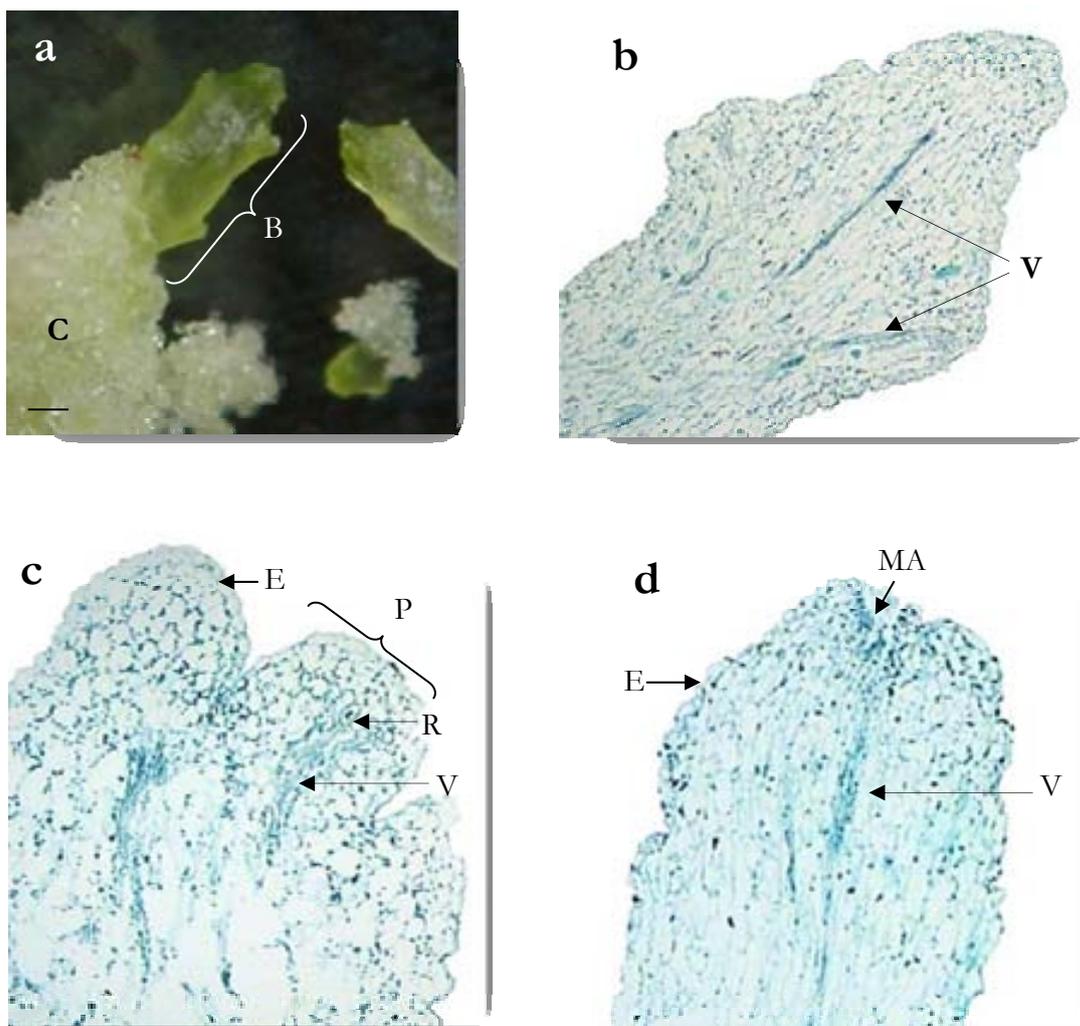


Figura 17. a) Brote de apariencia vítrea. Secciones longitudinales de brote de *Mammillaria theresae* cultivo en medio MS 50%; b) brote en formación, epidermis definida y tejido de conducción, 50X, c) Acercamiento del ápice: epidermis definida, tejido de conducción y abundantes gránulos de almidón, 100X. d) Vista panorámica del brote: ápice y dos podarios con su epidermis y tejido de conducción, 50X. P: Podario, MA: Meristemo apical, E: Epidermis, R: Rafidios, V: Tejido vascular. Barra: 1mm.

El meristemo apical comienza a producir primordios de brote o tubérculos (podario), los cuales son pequeños abultamientos de meristemos cubiertos por protodermos (**Fig. 17c**). Conforme las células son empujadas hacia arriba en el meristemo, éstas pasan de la zona meristemática a la zona de elongación y maduración (Mauseth, 1977).

Se observaron rafidios asociados al tejido de conducción. Generalmente están agrupados en haces; cada haz consiste de numerosos cristales aciculares individuales usualmente embebidos en mucilago (Sandoval *et al.*, 2005).

VI.13.4. Plántula

En secciones longitudinales de la plántula se observaron espinas, epidermis definida, meristemo apical con células de núcleos grandes, tejido parenquimático con células isodiamétricas con contenidos celulares de tipo granular en el citoplasma y pared, así como haces vasculares bien desarrollados a lo largo de las estructuras constituidas (traqueidas) (**Fig. 18**). Este mismo arreglo estructural lo presentaron brotes de 2 meses de edad de *M. sanchez-mejoradae* y *Aztekium bintonii* (Calderón, 2007).

En la **Figura 18b** se observan las estructuras bien definidas de la plántula, como los meristemos apicales, que son zonas protegidas por una depresión en la parte central en la punta del brote, la cual posee un gran número de espinas en las cactáceas. Estos meristemos tienen tamaños que van de 200 a 400 micrómetros. Las células del meristemo se dividen a la mitad, produciendo dos células hijas como reemplazo de la célula madre original, éstas a su vez se dividen en dos, creando una división exponencial. De estas células obtenidas de la división, sólo una de ellas permanece como célula meristemática, la otra se convierte en célula somática. Estas células somáticas atraviesan un límite inferior en el meristemo para organizarse y formar los órganos del cuerpo (Mauseth 1983). Estas células son las encargadas de la elongación del eje del brote, lo que produce el cuerpo de la planta

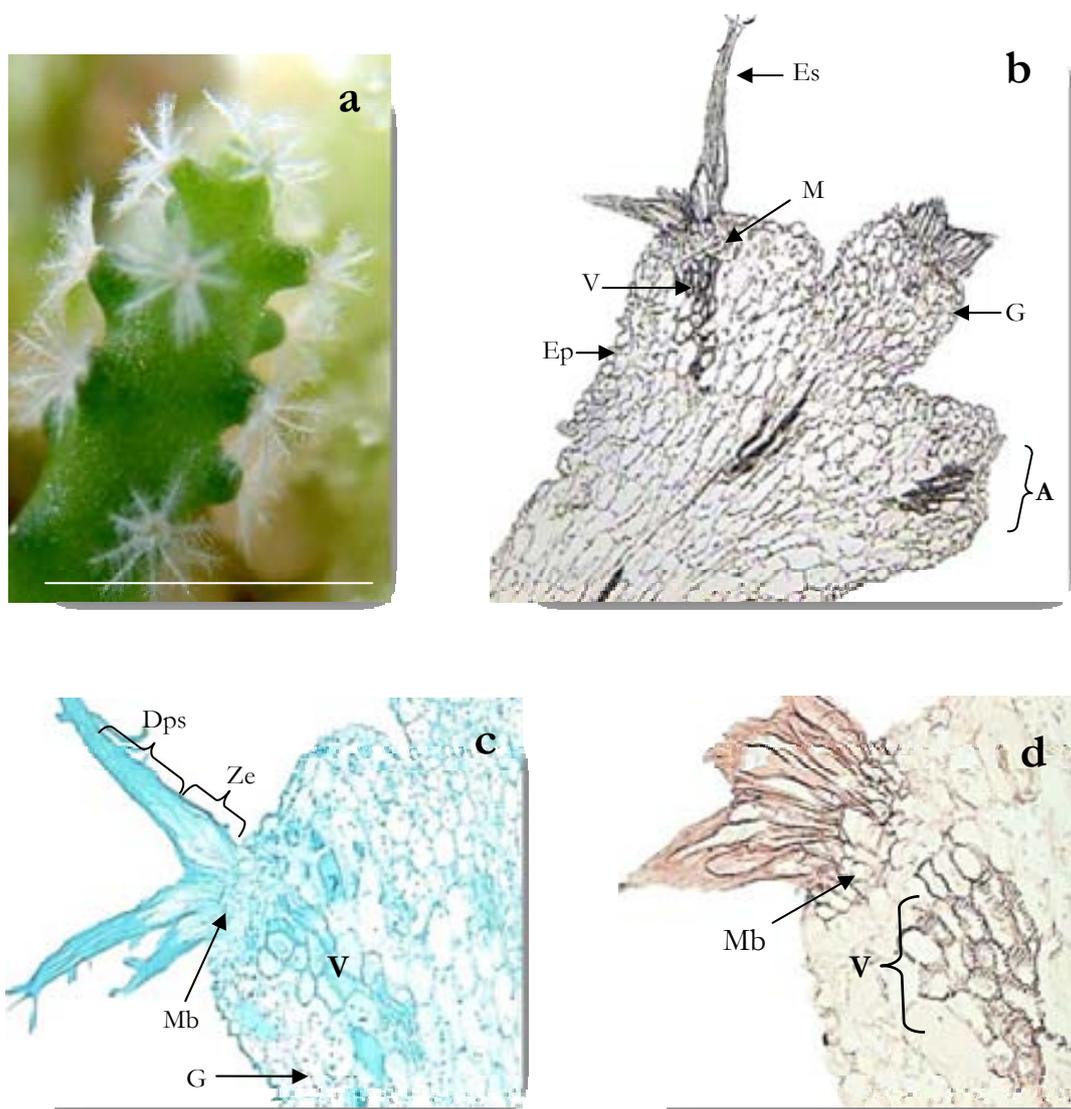


Figura 18. a) Plántula, barra: 1cm. Secciones longitudinales de planta de *Mammillaria theresae*. cultivo en medio MS 50% b) Espinas, epidermis definida, tejido de conducción y abundantes gránulos de almidón, 50X, c) Acercamiento al tejido de conducción y espina, 100X, d) Acercamiento al tejido de conducción: traqueidas. 100X, Ep=Epidermis, Es=Espina, G=Gránulo de almidón, Dps=Depósito de pared secundaria, M=Meristemo, Mb=Meristemo basal, V=Tejido vascular, Ze=Zona de elongación.

De acuerdo con Mauseth (1977, 2003) las espinas son escamas modificadas de las yemas axilares; pueden ser consideradas hojas modificadas de un brote pequeño. En el momento que el meristemo apical de la yema se vuelve reconocible, éste desarrolla las zonas típicas del meristemo, una túnica uniseriada sobre un corpus compuesto de células centrales, zona periférica y meristemo de médula. La mayoría de la división celular produce en mayor medida células hijas alineadas de forma paralela al eje largo de la espina, pero ocasionalmente existen divisiones celulares en otro plano que ensanchan el meristemo basal gradualmente, lo que provoca que las

espinas de las cactáceas sean estrechas en las puntas y anchas en la base. Los meristemos de la yema crecen, las células en su punta forman vacuolas y se elongan, lo cual regionaliza a la espina joven en 3 partes: un meristemo basal, una zona de elongación y diferenciación y una zona apical de fibras maduras, lignificadas y muertas. De la misma manera se observa en la **Fig. 17c** el desarrollo de las espinas de *M. theresae* como el mesofilo está constituido por fibras comprimidas, posteriormente ocurre el depósito de lignina en las paredes y por último las células mueren y se secan, endureciendo aún más la espina.

Una vez que las células maduran, éstas mueren; aunque se desconoce si esta muerte es programada o se debe a que son empujadas por la elongación de células jóvenes que también se están esclerificando a una zona muy lejana a la fuente de nutrientes en el meristemo basal (Sotomayor y Arredondo, 2004).

Las espinas son un mecanismo de protección contra la herbivoría. Sin embargo, cuando éstas son abundantes, proveen de sombra a la corteza fotosintética, como en algunas especies de los géneros *Mammillaria* y *Turbinicarpus*, las células de la epidermis se pueden elongar y formar tricomas como es el caso de *Mammillaria theresae*, la cual, presenta espinas radiales, suaves y plumosas, que le proveen protección contra el ambiente extremo presente en su hábitat (Sierra de Coneto) (Gómez, 2001; López-Enríquez *et al.*, 2003; Schill and Barthlott, 1973; Porembski, 1994; Sotomayor y Arredondo, 2004).

El xilema primario consiste de elementos traqueales estrechos y matriz celular asociada a éstos. El protoxilema tiene una matriz de parénquima, el metaxilema una matriz de parénquima (en las plantas con tallos globosos) o fibras (en las plantas con tallos largos y delgados). En casi todas las especies, el xilema primario contiene una mezcla de elementos de vasos y traqueidas de banda ancha. Éstas traqueidas son cortas, anchas con pared secundaria con patrón anular o una o dos hélices (Müller-Stoll and Süß, 1970; Mauseth *et al.*, 1995; Mauseth, 2004c). Banda ancha indica que el depósito de la pared secundaria continúa hasta que el patrón anular o helicoidal se proyecte profundamente en el lumen de la traqueida, en la mayoría de los casos, obstruyéndolo. Estas traqueidas nunca tienen paredes escaleriformes, reticuladas o perforadas, carecen de perforaciones. Las paredes anulares o helicoidales están asociadas con el protoxilema, el cual se diferencia cuando un órgano está todavía en proceso de elongación y por lo tanto estos elementos traqueales son flexibles. Este tipo de traqueidas nunca son el único elemento traqueal en el xilema del cactus, siempre están acompañados de vasos, esto es una característica inusual en angiospermas. La flexibilidad de este tipo de traqueidas permite que mientras un cactus pierde agua en tiempo de sequía, las traqueidas puedan encogerse, reduciendo su volumen, para evitar que el tejido se deshidrate (**Fig. 18d**).

VI.9. Pruebas histoquímicas

Las sustancias que se encuentran con más frecuencia como resultado del metabolismo celular, incluidas las células de las cactáceas son: almidón, mucílagos, gomas, ácidos orgánicos, cristales de sílice, alcaloides, etc. (Bravo-Hollis, 1937).

Mediante el empleo de pruebas histoquímicas, fue posible identificar los abundantes contenidos celulares de tipo granular presentes en el citoplasma y adheridos a la pared del callo de *M. theresae*; se encontró la presencia de almidón, proteínas y lípidos.

VI.14.1. Almidón

La prueba de lugol que se realizó para la identificación de almidones en el callo de *M. theresae*, fue positiva, ya que mostró una coloración azul en los gránulos contenidos en la muestra, lo que indica que el tejido contiene almidón con una proporción mayor de amilopectina que de amilosa (**Fig. 19**). La presencia de granos de almidón se ha reportado para otras cactáceas como *Aztekium hintonii* (Calderón, 2007), *Mammillaria gracillis* (Poljuha *et al.*, 2003) y *Mammillaria san-angelensis* (Duval, 1995).

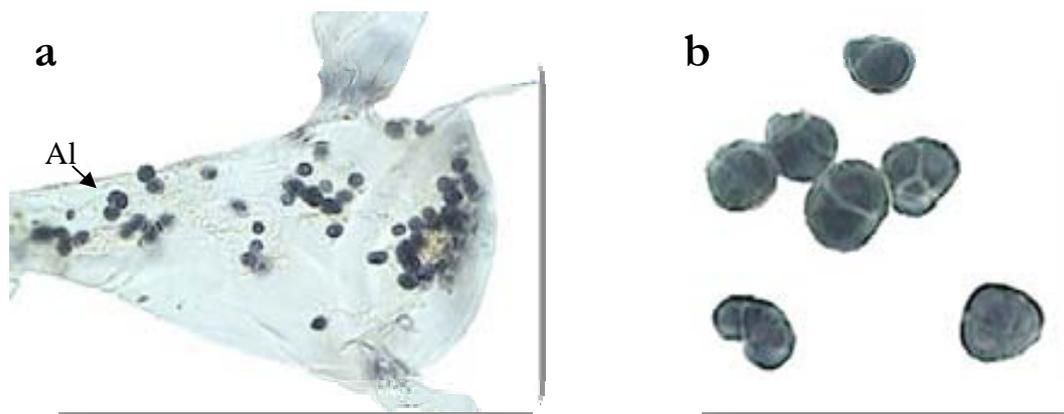


Figura 19. Presencia de almidón teñido con lugol en células de callo, en medio MS 50%. a) Vista panorámica de gránulos de almidón en célula de callo, 400X, b) Acercamiento de los gránulos de almidón de células de callo, 1000X. Al =Almidón.

El almidón es un producto del metabolismo celular y es el polímero de reserva más común, el cual se sintetiza en los amiloplastos y puede tener una duración más o menos larga. Está constituido por maltosa, amilosa y amilopectinas, el conjunto forma una construcción paracristalina compleja con orientación radial a partir de un punto conocido como “hilo”, al ser observado con microscopía de polarización da lugar al fenómeno de la cruz negra o cruz de malta. Abunda en órganos de almacenamiento, localizándose libre en las células o en amiloplastos (Sandoval *et al.*, 2005).

El reactivo de yodo-yoduro (Iugol), tiñe específicamente el almidón en un tono azul violeta. El color del producto puede variar según la constitución precisa del almidón y en particular, de la porción de amilosa y amilopectina. El almidón es una hélice y el yodo se queda inmovilizado en su interior, cuando la proporción de amilopectina es mayor, tiñe azul, pero si es mayor la proporción de amilosa la tinción es más roja y menos intensa (Sandoval *et al.*, 2005). Bravo-Hollis (1937) señaló que el almidón se identifica como pequeños granos irregulares, abundantes en médula y radios medulares, y en menor cantidad en las células corticales.

Los gránulos encontrados en el callo de *M. theresae* presentan una morfología aglomerada. Las diferentes características del almidón, no sólo la morfología (circular, elíptica, ovalada, lenticular o poligonal), el tamaño y la composición que posee el gránulo, están muy relacionadas con la procedencia de la fuente biológica de donde provienen, además de que puede haber variación entre la misma especie (Jane *et al.*, 1994; Reis y Cunha, 2005).

La presencia de almidón, se debe a dos razones; 1) a que son **sustancias de reserva para el proceso organogénético**, es decir, existe un pico de acumulación de almidón justo antes de la formación de meristemas, brotes etc. y 2) al **suministro de azúcares libres** desde el medio hacia el tejido, es decir, la acumulación de este metabolito es consecuencia del incremento de la síntesis en el tejido durante el cultivo y subcultivo a medio rico en azúcar (Thorpe y Murashige, 1970; Thorpe y Meier, 1974, 1975).

VI.14.2. Lípidos

Mediante las pruebas histoquímicas realizadas con Sudán IV y Rojo de aceite “O”, se observaron lípidos (teñidos en rojo) en citoplasma y pared celular del callo en *M. theresae* (**Fig. 20**). La presencia de estos lípidos en las células de callo probablemente se deba a que son una de las reservas energética previa al proceso organogénético.

Los lípidos son sustancias ergásticas productos del metabolismo, es decir, productos de reserva o de desecho resultantes de la actividad celular. Las sustancias ergásticas se encuentran en las vacuolas y en la membrana celular y pueden estar asociadas con los componentes protoplásmicos de la célula. Pueden aparecer o desaparecer en diferentes estadios de la vida de una célula (Sandoval *et al.*, 2005). Las grasas y aceites constituyen comúnmente materiales de reserva en semillas, esporas y embriones, en células meristemáticas y ocasionalmente, en tejidos diferenciados del cuerpo vegetativo. Se presentan como corpúsculos sólidos o más frecuentemente, como gotitas líquidas de diversos tamaños dispersas por el citoplasma o agrupadas en masas de mayor tamaño. Las sustancias grasas pueden ser elaboradas directamente por el citoplasma o también por los elaioplastos (Esau, 1976).

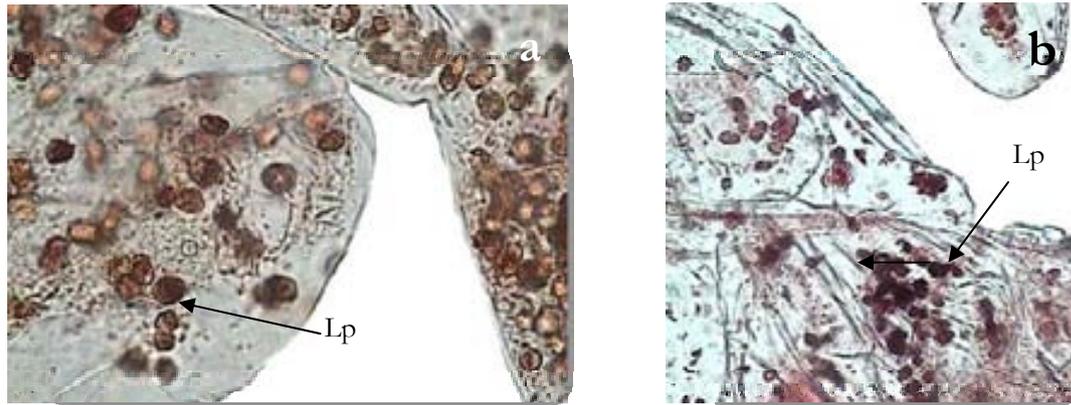


Figura 20. Presencia de lípidos teñidos con Sudán IV y Rojo de aceite “O”, en células de callo, en medio MS 50%. a) Presencia de lípidos en células de callo teñido con Sudán IV, 1000X. c) Presencia de lípidos en células de callo teñido con Rojo de aceite “O”, 400X. Lp =Lípidos.

VI.14.3. Proteínas

Para este estudio las pruebas histoquímicas de eosina acuosa y azul negro de naftol para proteínas resultaron positivas (**Fig. 21**), al igual que en otras dos especies de Cactáceas *Epiphyllum* y *Pereskia*, donde se hallaron cristaloides proteicos (Sandoval *et al.*, 2005). Las proteínas son los componentes principales de los corpúsculos protoplasmáticos vivos, pero también se encuentran como sustancias ergásticas transitorias inactivas, funciona como material de almacenamiento y se encuentra depositada en forma amorfa, cristalina o globular.

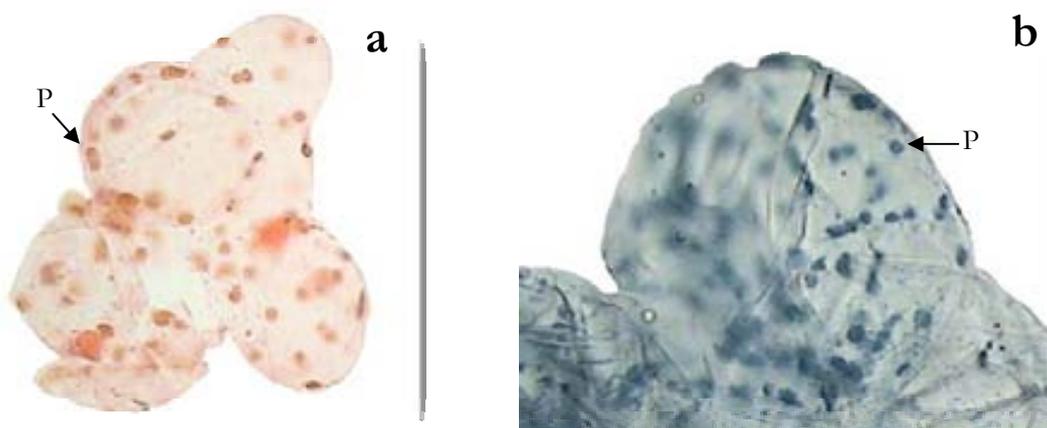


Figura 21. Presencia de proteínas teñidas con eosina acuosa y azul negro de naftol, en células de callo, en medio MS 50%. a) Acercamiento de proteínas en células de callo, teñidas con eosina acuosa, 400X. c) Acercamiento de proteínas en células de callo, teñidas con azul negro de naftol, 400X. P =proteínas.

En general, la gran abundancia de contenidos celulares de tipo granular en el citoplasma es una probable evidencia, que apoya al proceso previo de diferenciación, los compuestos de reserva como lípidos, grasas o proteínas, serán utilizados como fuente de energía para el proceso de división celular y diferenciación de los elementos de conducción, proceso que requiere de un gran aporte energético (Flona, 1991).

VII. Conservación *ex situ*

Las plantas de *Mammillaria theresae* regeneradas *in vitro* de aproximadamente 3 cm de longitud y 6 meses de aclimatización fueron donadas en lotes de 25 ejemplares (**Fig. 22 a y b**), a tres jardines botánicos de la Ciudad de México (Jardín Botánico de Cactáceas Efraín Hernández Xolocotzi, Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec y Jardín Botánico, IB-UNAM), se anexó un poster informativo sobre la distribución, estatus y la forma en que *M. theresae* fue propagada mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, contribuyendo así a la conservación *ex situ* de esta especie amenazada.

La conservación ecológica y la biodiversidad aseguran el uso sostenible de los recursos renovables para la humanidad y sus generaciones futuras (Vovides *et al.*, 1997). La conservación *ex situ* es una alternativa viable para la protección y perpetuación de plantas amenazadas (Boyle y Anderson, 2002). Los jardines botánicos en México tienen una importante responsabilidad de protección y conservación de la flora mexicana, caracterizada por su gran diversidad y riqueza de especies. Muchas de éstas están seriamente amenazadas o en peligro de extinción, por la acelerada destrucción de los ecosistemas, la sobreexplotación, el saqueo, el comercio ilegal y especialmente aquellas especies endémicas o de distribución muy restringida, tal es el caso de *M. theresae* (Martín-Lunas, 1990; Hernández *et al.*, 1990; Sánchez-Mejorada, 1987 y López-Enríquez *et al.*, 2003).

VII.1. Parque Ecológico Huayamilpas

El día 4 de septiembre del 2008, se realizó la donación de las plantas regeneradas *in vitro* de *Mammillaria theresae* al Jardín Botánico de Cactáceas “Efraín Hernández Xolocotzi” localizado dentro del Parque Ecológico Huayamilpas de la Delegación Coyoacán (**APÉNDICE E**). El Jardín Botánico de Cactáceas “Efraín Hernández Xolocotzi” alberga aproximadamente mil cactáceas de 10 especies diferentes, producto de decomisos y donaciones (**Fig. 22c y d**).

VII.2. Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec

El día 25 de septiembre del 2008 se realizó la donación de las plantas regeneradas *in vitro* de *M. theresae* al Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec, ubicado en Avenida Paseo de la Reforma s/n, Col. Chapultepec Polanco de la Delegación Miguel Hidalgo (**Fig. 22e y f**), las cuales fueron recibidas por el Biólogo Martín Aguilar Cervantes, Jefe de la Unidad de Servicios Especiales y Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec (**APÉNDICE F y G**).

Actualmente el Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec alberga 37 especies de cactáceas, incluyendo a *M. therease* (Com. pers. Aguilar, 2008).

VII.3. Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM

La donación de las plantas regeneradas *in vitro* de *M. theresae* se realizó el día 5 de diciembre del 2008, al Área de Colecciones del Jardín Botánico, IB-UNAM, las cuales fueron recibidas por el Dr. Salvador Arias Montes responsable de dicha área (**APÉNDICE H**).

El papel desempeñado por el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM (**Fig. 22 g y h**) en la conservación de especies mexicanas de la Familia Cactaceae es de suma importancia, debido a que protege y preserva aproximadamente **1200** especies de esta Familia agrupadas en 450 géneros, de las cuales **355** presentan alguna categoría en la NOM-059-ECOL-2001 (Caballero y Cabrera, 2007); además el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del JB-IB UNAM posee una colección *in vitro* de 16 especies de la Familia Cactaceae, entre las que se encuentran *Ariocarpus retusus*, *A. bravoanus*, *A. kotschoubeyanus*, *Aporocactus flagelliformis*, *Aztekium hintonii*, *Pelecyphora strobiliformis*, *P. aselliformis*, *Cephalocereus apicicephalium*, *Echinocereus pentalophus*, *Mammillaria san-angelensis*, *M. bombycina*, *M. luethyi*, *M. sanchez-mejoradae*, *M. theresae*, *Turbincarpus laui* y *T. pseudopectinatus*.

Existen pocos reportes de cactáceas que se hayan regenerado *in vitro* y además se conserven de manera *in situ* y *ex situ*; Martínez-Vázquez y Rubluo (1989) realizaron un importante avance en la micropropagación y reintroducción a su medio natural de *M. san-angelensis*, de esta manera contribuyeron a la conservación *in situ* de esta especie en peligro de extinción. De igual manera, Quiala *et al.* (2007) realizaron la reintroducción de plantas regeneradas *in vitro* de *Pilosocereus spp.* a su hábitat natural (Cantera de Pelo Malo, Cuba), después de dos años de su reintroducción presentó un porcentaje de supervivencia superior al 80%. Y Giusti *et al.* (2002) realizaron la conservación *ex situ* de 12 a 28 plantas de 3 especies de cactáceas *Escobaria minima*, *M. pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis* en el Jardín Botánico de la Universidad de Tuscia, después 3 años de la introducción florecieron las tres especies, lo cual demuestra la viabilidad e importancia de estas investigaciones.

El estudio en *T. pseudopectinatus* reveló que la existencia de variación somaclonal no es significativa, ya que esta se atribuyó al origen del explante (González-Caballero, 2008). La realización de un estudio de esta naturaleza en *M. theresae* contribuiría a resaltar la existencia de cambios heredables a nivel fenotípicos o genotípicos (cambios en la secuencia del DNA), lo cual serviría para evaluar las posibilidades de reintroducción a su hábitad natural o mantener la conservación de la especie a nivel *in situ*.

La colaboración entre el Instituto de Biología de la UNAM y estos jardines botánicos es una contribución valiosa en la conservación y preservación de *M. theresae*, por lo que este trabajo es el primer esfuerzo conjunto de un propósito común para esta especie.

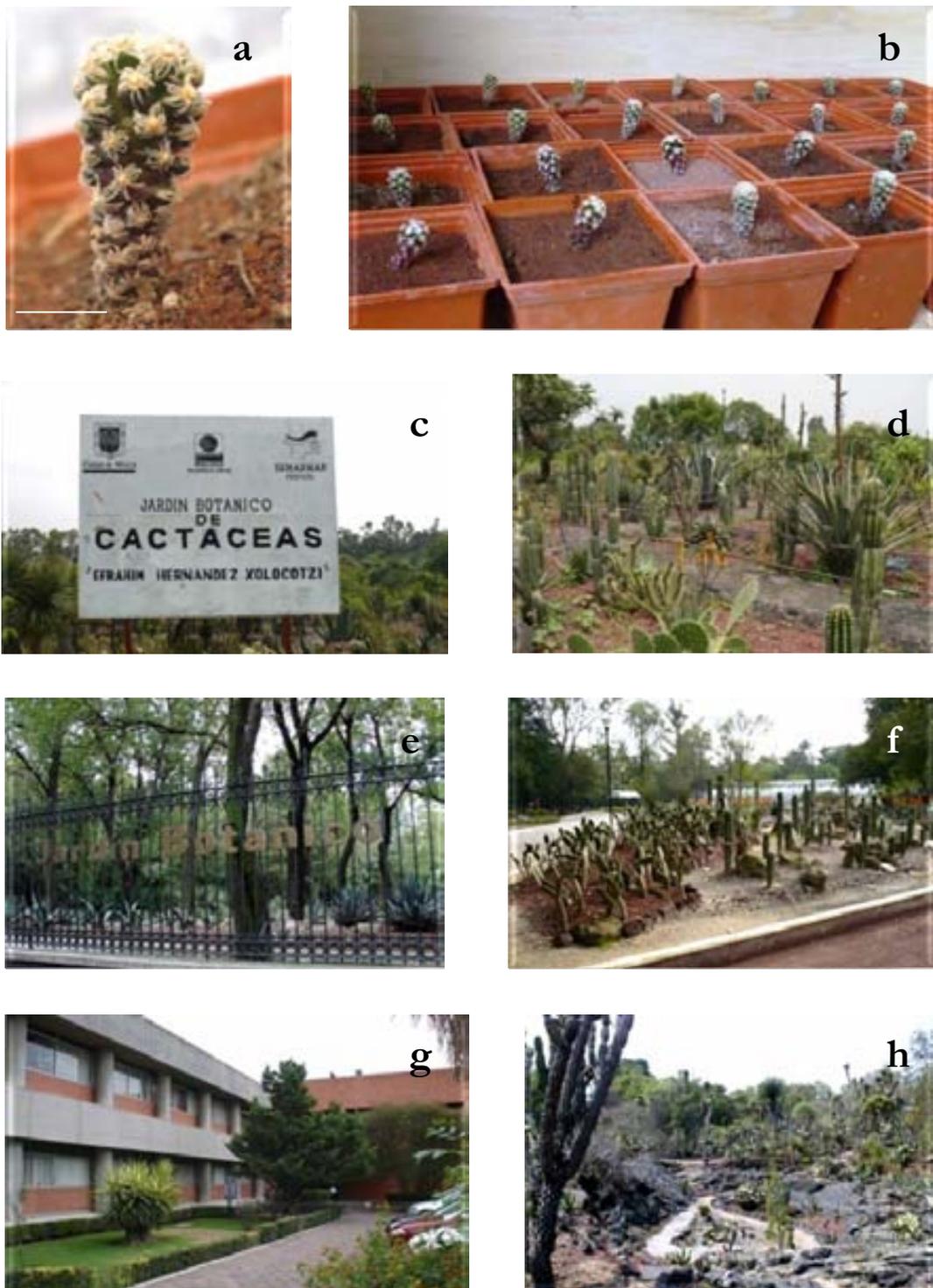


Figura 22. (a) Plantas aclimatizadas de 3cm de longitud y 6 meses de edad, (b) Lote de 25 plantas donadas, (c y d) Jardín Botánico de Cactáceas “Efraín Hernández Xolocotzi”, Jardín (e) Entrada del Jardín Botánico de Chapultepec, (f) Zona árida del Jardín Botánico de Chapultepec, (g) Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, (h) Vista panorámica del Área de Colecciones del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

VII. CONCLUSIONES

- ♦ Por medio de la técnica de cultivo de tejidos se lograron establecer condiciones para la regeneración *in vitro* y aclimatización, además del análisis histológico e histoquímico y conservación *ex situ* de *Mammillaria theresae*.
- ♦ Se establecieron condiciones de desinfección para las semillas de *M. theresae* con detergente, alcohol al 70% v/v por 1min y solución de hipoclorito de sodio comercial (5.25% de cloro activo) al 30% v/v por 30 min. La plántula obtenida de la única semilla germinada, permanece en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en preservación *in vitro*, para que en un futuro pueda ser empleada para su micropropagación con la metodología ya establecida en esta investigación.
- ♦ Se establecieron condiciones de desinfección para los diferentes explantes probados (podarios) con alcohol al 70% v/v por 1min, benomilo® (1g/l) por 1 h y solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial) 30% v/v por 30 min, la contaminación microbiana fue de 2.3%.
- ♦ Las respuestas de los podarios después de 40 días de cultivo fue: la formación de organogénesis vía directa e indirecta.
- ♦ El tratamiento que regeneró la mayor cantidad de brotes a partir de podarios fue el tratamiento 12 (0.5/3.0 mg/l ANA/BA) con 10.8 brotes promedio por explante después de 2 meses.
- ♦ Se logró la regeneración de plantas completas a partir de secciones apicales y basales de plántulas regeneradas *in vitro* de *M. theresae* en medio MS adicionado de reguladores de crecimiento ANA/BA.
- ♦ El tratamiento que regeneró la mayor cantidad de brotes a partir de los ápices fue el tratamiento 2 (0.1/3.0 ANA/BA mg/l) con un total de 367 brotes por tratamiento después de 8 meses de cultivo.

- ♦ El tratamiento que regeneró la mayor cantidad de brotes a partir de las bases de tallo, fue el tratamiento 1 (0.1/2.0 ANA/BA mg/l) con un total de 757 brotes por tratamiento, después de 8 meses de cultivo.
- ♦ El tratamiento que regeneró la mayor cantidad de brotes a partir del cuerpo del tallo, fue el tratamiento 4 (0.1/4.0 ANA/BA mg/l) con un total de 90.33 promedio de brotes por tratamiento, después de 8 meses de cultivo.
- ♦ Todos los explantes empleados fueron regenerativos, bajo las condiciones ensayadas. Mostraron una capacidad morfogénica diferencial de acuerdo al tipo de explante, el de mayor potencial fue el cuerpo del tallo, seguido de las secciones basales y apicales de los tallos, aunque entre éstos dos explantes no hubo diferencias significativas, éste último regeneró el mayor número de brotes normales.
- ♦ En un sólo control fue posible regenerar callo y brotes a partir de los explantes, sin embargo, fue el tratamiento que indujo el menor número de brotes por explante, después de 8 meses de cultivo.
- ♦ Se demostró el gran potencial de regeneración de explantes de *M. theresae* en cultivo, con la regeneración de 3,361 brotes vía directa e indirecta a partir de los 3 tipos de explantes, después de 8 meses de cultivo.
- ♦ Las altas concentraciones de BA combinadas con ANA fueron más eficaces para la multiplicación de callo, así como para promover la brotación en éste, por lo que, pueden señalarse como potencialmente útiles para la inducción de organogénesis del tejido calloso de *M. theresae*.
- ♦ Se obtuvieron brotes a partir de raíces generadas *in vitro* en los diferentes tratamientos y tiempos de cultivo, lo cual demuestra el gran potencial regenerativo que tiene *M. theresae*.

- ◆ Después de 2 meses, el manitol (1g/l) fue más exitoso para la formación de raíces en los brotes con 45%.
- ◆ En condiciones de invernadero el sustrato empleado (tierra negra/tepojal) para la aclimatización de los brotes, permitió obtener un porcentaje de supervivencia del 86% después de 6 meses.
- ◆ Por medio del análisis estructural se logró la identificación de cuatro etapas: callo, nódulos, brotes en formación y plántula, las cuales fueron descritas y registradas en fotomicrografías.
- ◆ Las pruebas histoquímicas empleadas en el callo generado permitieron la identificación de contenidos celulares tales como: proteínas, almidón y lípidos. Los cuales, servirán como fuente de energía para el proceso organogenético.
- ◆ Se llevó a cabo la conservación *ex situ* en 3 jardines botánicos de la Ciudad de México en lotes de 25 ejemplares de *M. theresae* con plantas regeneradas *in vitro* de aproximadamente 3 cm de longitud y 6 meses de aclimatización.
- ◆ El presente estudio contribuyó a la investigación, regeneración *in vitro* y conservación *ex situ* y divulgación de *Mammillaria theresae*.
- ◆ Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran una alternativa viable y de gran utilidad para la propagación masiva de *M. theresae* que permitiría satisfacer la demanda comercial y de esta manera disminuir la presión de colecta sobre las poblaciones silvestres. Además, este procedimiento puede ser aplicado para la micropropagación de otras especies de cactáceas que se encuentren amenazadas y en algún riesgo de extinción.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- * Abu, Shama. 2001. *Response of Tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) to in vitro induced water deficit*. Plant Physiology - Growth and development, Israel.
- * Agramonte, D., F. Jiménez, M. Dita. 1998. *Aclimatización*. 193-205p. En: Pérez J.N. (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, Vol.1. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390p.
- * Aíra, L., R. Salvador, L. Gallo, E. Tiago y M. Soares. 2005. *In vitro propagation of Notocactus magnificus*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. Brasil. 84: 165–169p.
- * Anderson, E. F. 2001. *The cactus family*. Timber Press, EUA. 776p.
- * Anicua, J. 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), Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala UNAM. México 68p.
- * Álvarez, J., H. Benítez y A. Oliveras. 2003. *Cites un convenio para proteger plantas y animales amenazados por el comercio ilegal*. Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 49: 2-6p.
- * Álvarez, J., M. Bellot, H. Benítez y A. Olveras. 2003. *La ciencia en el combate al comercio ilegal de especies*. Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 49: 7-11p.
- * Arias, S. 1997. *Distribución, grupos taxonómicos y formas de vida*. 17-25p. En: *Suculentas Mexicanas, cactáceas*. CVS Publicaciones-CONABIO-UNAM-Semarnap, México. 143p.

- * Arias, S., S. Gama y L. Guzmán. 1997. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Instituto de Biología, UNAM. México D.F. Fascículo 14. CACTACEAE A.L. Juss. 125p.
- * Arreola, N.H.J. 1997. *Formas de vida y características morfológicas*. pp. 27-31. En: *Suculentas Mexicanas, cactáceas*. CVS Publicaciones-CONABIO-UNAM-Semarnap, México. 143p.
- * Ault, J. y W. Blackmon. 1985. *In vitro propagation of selected native cacti species*. En *Micropropagation of Mammillaria Species (Cactaceae)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Alemania. 40:193-205p.
- * Avitia, E. y A. Castillo. 2007. *Desarrollo floral en frutales*. Universidad Autónoma Chapingo. México. 142p.
- * Baena, M., S Jaramillo y J.E. Montoya. 2003. *Material de apoyo para la capacitación en conservación in situ de la diversidad vegetal en áreas Protegidas y en Fincas*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia. 130p.
- * Barba, A., B. Luna y J. Romero. 2001. *Micropropagación de plantas*, Trillas. México. 107p.
- * Barbour, M.G., J.H. Burk, W.D. Pitts., F.S. Gillian y M.W. Schwartz. 1999. *Allocation and life history patterns*. En: Enríquez E., H. Suzán, G. Malda. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Taxodium mucronatum* (Ten.) en el estado de Querétaro, México. México. Agrociencia. 38: 375-38p.
- * Barthlott, W. y D. Hunt. 1993. *Cactaceae*. 161-197p. In: Kubitzki, K., J. Rohwer y V. Bittrich, editors (ed.) *The families and genera of vascular plants*, Vol. II. Springer. Alemania. 653p.
- * Benítez, H. y P. Dávila. 2002. *Las Cactáceas mexicanas en el contexto de CITES*. Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 40:8-11p.

- * Beristain, S. 1997. *Germinación de *Astrophytum myriostigma* Lemaire en relación con la disponibilidad de luz. Lugar de procedencia y reguladores de crecimiento*. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 75p.
- * Bidwell, R.G.S. 1979. *Fisiología vegetal*. AGT Editor, S.A. Canadá. 784p.
- * Blanco, A. 1985. *El problema del germoplasma en el Mundo*. 27-34p. En: Robert M. y Loyola V.M., (comp). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 167p.
- * Boyle, T. y E. Anderson. 2002. *Biodiversity and conservation*. En: *Cacti biology and uses*. University of California. USA. 8:125-141p.
- * Bravo-Hollis, H. 1937. *Las cactáceas de México*. Imprenta universitaria. México. 3-67p.
- * Bravo-Hollis, H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Volumen I, Segunda Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 743p.
- * Bravo-Hollis, H. 1991. *Las Cactáceas de México*. Volumen III, Segunda Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 643p.
- * Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 1995. *El interesante mundo de las cactáceas*. CONACYT. Fondo de Cultura Económica, México. 233p.
- * Caballero, J. y T. Cabrera. 2007. *Que están haciendo los jardines botánicos en relación a la estrategia global para la conservación de la diversidad vegetal*. Reunión XX de la Asociación Mexicana de los Jardines Botánicos. México.
- * Calderón, E. 2007. *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 Maestría (Biología experimental). UNAM. México 67p.

- * Cárdenas, A. y A. Villegas. 2002. *Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación in vitro*. Fitotecnia Mexicana, A.C. Chapingo, México. 25:213-217p.
- * Ceballos, G. 2001. *Especies raras, el conocimiento de la diversidad biológica y la conservación*. CONABIO Biodiversitas. México. 6 38:9-13p.
- * Chávez, V. M. 1993. *Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de Ceratozamia mexicana var. robusta (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción*. Tesis Doctorado (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 148p.
- * Chávez V. y A. Rubluo. 1995. *El cultivo de tejidos vegetales en la conservación*. 123-131p. En: Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM. México. 175p.
- * Cheema, G. y P. Mehra. 1981. *Anther culture of a cactus*. En Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Alemania. 40:193-205p.
- * Christiane, S., Á. Villegas, P. Sánchez, G. Alcántar, M. Rodríguez y L. Ruiz P. 2004. *Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca^{2+} y K^+ , producción de biomasa y necrosis apical de vid "r110"*. Interciencia. 29: 384-388p.
- * Cuéllar, L., E. Morale, J. Treviño. 2006. *La germinación in vitro una alternativa para obtener explantes en cactáceas*. Zonas Áridas. México. 10:129-133p.
- * Cutak. 1967. *Cactus and Succulent Journal*. USA. 39 (6):239p.
- * Damiano, C., P. Curir, T. Cosmi y B. Ruffoni. 1986. *Tissue culture of Mammillaria spp.* En Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Alemania. 40:193-205p.

- * Dávila-Figueroa C., M. de la Rosa-Carrillo y E. Pérez-Molphe. 2005. *In vitro propagation of eight species or subspecies of turbinicarpus (Cactaceae)*. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 41(4): 540-545p.
- * Dehgan, B. y F. Almira. 1990. *Horticultural practices and conservation of cycads '90*. The second International Conference on the Biology of Cycads. Australia. 384p.
- * Diario Oficial de la Federación. Marzo. 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 o cambio-Lista de especies en riesgo*. México DF.
- * Duval, K. 1995. *Organogénesis de novo en Mammillaria san-angelensis Sánchez-Mejorada, especie cultivada in vitro*. Tesis Licenciatura (Biología). Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM. México. 58p.
- * Echenique, V., C. Rubinstein y L. Mroginski. 2004. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal III.-Capítulo 1*. Ediciones INTA. Argentina. 424p.
- * Esau, K. 1976. *Anatomía vegetal*. Omega. España. 108-135p.
- * Evans, D.E. 2003. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers. USA. 194p.
- * Franco, I. 1997. *Legislación y conservación*. En: *Suculentas Mexicanas, Cactáceas*. CVS Publicaciones-CONABIO-UNAM-SEMARNAP. México. 101-111p.
- * Fay, M.F.y J. Gratton. 1992. *Tissue culture of cacti and others succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew*. En: *Micropropagation of Mammillaria Species (Cactaceae)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Alemania. 40:193-205p.

- * Flona, A. 1991. *Histology and stereological analysis of shoot formation in leaf callus of Saintpaulia ionantha Wendl, (African violet)*. Plant Science. 73: 243- 251p.
- * Flores, J. 2004. *Regeneración in vitro de Pelecyphora strobiliformis (Wendemann) Fric et Schelle (Cactaceae)*. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 58p.
- * García, E. 1973. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen*. 2ª. ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 146p.
- * Garrido, M. 1998. *Evaluación del metabolismo ácido de crasuláceas en tres especies de cactáceas cultivadas in vitro y durante su aclimatación a suelo*. Tesis Licenciatura (Biología). Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala UNAM. México. 124p.
- * George, E., M. Hall and G. Klerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture 3rd edition*. Sprigner. Dordrecht. 501p.
- * Gibson, A. y P. Nobel. 1986. *The cactus primer*. Harvard University Press. USA. 286p.
- * Giusti, P., Vitti D., F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. *In vitro propagation of three endangered cactus species*. Scientia Horticulturae 95: 319-332p.
- * Glass, C. 1998. *Guía para la identificación de Cactáceas amenazadas de México. Vol. I* CONABIO, Ediciones Cante. México. 212p.
- * Godínez-Álvarez, H., T. Valverde y P. Ortega-Baes. 2003. *Demographic trends in the Cactaceae*. The Botanical Review. 69:173-203p.
- * Gómez, A. 2001. *Enciclopedia ilustrada de los cactus y otras suculentas*. Mundiprensa. España. 124 p.

- * Gómez, R. 1998. *Cultivo de células y tejidos*. 25-44p. En: Pérez J.N. (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Vol.1. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390p.
- * Gómez, R. 2008. *Regeneración in vitro de Ariocarpus bravoanus, Hernández y Anderson (CACTACEAE), especie endémica mexicana en peligro de extinción*. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 67p.
- * González-Caballero, O. 2008. *Regeneración in vitro de Turbinicarpus pseudopectinatus (Backeb.) Glass & R. A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs*. Tesis Maestría (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 106p.
- * Ghorraishi, S. R. 2006. *Micropropagation of P. mutica*. *Acta Horticulturae*, 726:183-192p.
- * Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila. 2003. *Catálogo de cactáceas mexicanas*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. UNAM. México. 161p.
- * Hernández, C. y T. Terrazas E. Linares. 1990. *Las colecciones del Jardín Botánico del Instituto de Biología*. UNAM. México. 32p.
- * Hernández, H.M., C. Gómez-Hinostrosa y B. Goettsch. 2004. *Checklist of Chihuahuan desert cactaceae*. *Harvard Papers in Botany*. USA. 9:1. 51-68p.
- * Hernández, H.M. y R.T. Bárcenas. 1995. *Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns*. *Conservation Biology*. 9(5):1176-1188p.
- * Hernández, H. M., and R. T. Bárcenas. 1996. *Endangered cacti in the Chihuahuan Desert. II. Biogeography and Conservation*. *Conservation Biology* 10(4):1200-9p.
- * Hernández, H. 2006. *La vida en los desiertos mexicanos*. Fondo de Cultura Económica. México. 188p.

- * Hernández, H. y H. Godínez. 1994. *La conservación de la familia Cactaceae A.L. de Jussieu en las colecciones de los jardines botánicos de México*. Boletín Amaranto. México. 2:37-53p.
- * Hernández, M. y E. Sánchez. 2000. *Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas*. Acta Botánica Mexicana. México. 26:33-52p.
- * Hernández-Oria, J., R. Chávez y E. Sánchez. 2007. *Diversidad y estrategias para la conservación de Cactáceas en el semidesierto Queretano*. Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. México. 70:6-9p.
- * Hernández, T. 1991. *Las cactáceas en la dieta de tres especies de mamíferos en un matorral crasicauale de Tula, Tamaulipas*. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. México. 26:63-69p.
- * Hubstenberger, J., P. Clayton y G. Phillips. 1992. *Micropropagation of Cacti (Cactaceae)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Alemania. 20:49-67p.
- * Hunt, D. R. 1981. *Revised classified list of the genus Mammillaria*. Cactus and Succulent Journal. 43:41-48p.
- * Hunt, D. R. 1987. *A new review of Mammillaria names S-Z*. Bradleya 5:17-48p.
- * Hunt, D. 1999. *CITES Cactaceae Checklist*. Royal Botanical Gardens & International Organization for Succulent Plant Study, Kew. 315p.
- * Hunt, D. y N. Taylor (Eds). 1990. *The genera of the Cactaceae: progress towards a new consensus*. Bradleya 8: 85-107p.
- * Jane, J. L., T. Kasemsuwan., S. Leas., H. Zobel. y J. F. Robyt. 1994. *Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy*. En: Acosta A., H. Villada, G. Torres y J. Ramírez. 2006. Morfología Superficial de Almidones Termoplásticos Agrio de Yuca y

- Nativo de Papa por Microscopía Óptica y de Fuerza Atómica. Información tecnológica. Colombia. 17:63-70p.
- * Jiménez, E. 1998. *Generalidades del cultivo in vitro*. pp. 13-24. En: Pérez J.N. (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, Vol.1. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390p.
 - * Johnson, J. y E. Emino. 1979. *In vitro propagation of the cactus Mammillaria elongata*. HortScience. USA. 14 5:605-606p.
 - * Kolar, Z., Bartek, J. y Vyskot, B. 1976. *Vegetative propagation of the cactus Mammillaria woodsii Craig through tissue cultures*. Experientia 32:668-669p.
 - * Lankes, C. y R. Zimmerman. 1990. *Impact of osmotic potential on in vitro cultures of apple*. En: Cárdenas y Villegas. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. Fitotecnia Mexicana, A.C. Chapingo, México. 25:213-217p.
 - * Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. *Somaclonal variation- A novel source of variability from cell cultures for plant improvement*. Theoretical and Applied Genetics. 60:197-214p.
 - * Litz R.E. y R.L. Jarret. 1993. *Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis*. 144-157p. En: Roca W. M. y Mogrinsky L. A (Ed.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cuba. 970p.
 - * López-Enríquez I., S. González, M. González y J. Tena. 2003. *Aspectos ecológicos y estado de conservación de Mammillaria theresae (cactaceae)*. Botanical Research Institute of Texas, Sida Botanical Miscellany. 20 4: 1665-1975p.

- * López, M. L., J. Márquez y G. Murguía. 1998. *Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas*. Las prensas de ciencias, México. 116p.
- * Malda, G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. *In vitro cultura as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism*. Scientia Horticulturae. USA. 81: 71-87p.
- * Margara, J. 1988. *Multiplificación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la Organogénesis*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 230p.
- * Marín, T. 1998. *Inducción de respuestas morfogénéticas in vitro en Mammillaria san-angelensis Sánchez - Mejorada especie en peligro de extinción*, Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias Biológicas). Facultad de Ciencias, UNAM. México 74p.
- * Márquez, V. 2001. <http://132.248.9.25:4500/ALEPH/SPA/TDF/TDF/TDF/SCAN-F/0108886> *Inducción y multiplicación in vitro de tejido calloso de Mammillaria carmenae y Mammillaria herrerae (Cactacea)*. Tesis Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM. México 130p.
- * Martín-Lunas, R. 1990. *Estado actual de seis especies de cactáceas mexicanas sobrecolectadas y algunos planteamientos alternativos para su conservación*. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México 182p.
- * Martínez, E. y M. Martínez. 2002. *Propagation of Mexican cacti threatened with extinction*. Cactus and Succulent Journal 74(1):17–21p.
- * Martínez-Vázquez O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro mass propagation of the near-extinct Mammillaria san-angelensis Sánchez-Mejorada*. Journal of Horticultural Science. México. 64 1: 99-105p.
- * Mata, M., M. Monroy, K. Moebius y V. Chávez. 2001. *Organogenesis and somatic embryogenesis in Ariocarpus kotschoubeyanus (Lem.) K. Schum. (Cactaceae). an endemic and*

- endangered Mexican species*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 39:388-393p.
- * Mata-Rosas, M., M. Monroy, K. Moebius y V. Chávez. 2001. *Micropropagation of turbinicarpus laui glass et foster, an endemic and endangered species*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 37:400-404p.
 - * Mauseth, J. 1977. *Cytokinin- and gibberellic acid-induced effects on the determination and morphogenesis of leaf primordia in Opuntia polyacantha (Cactaceae)*. *American Journal of Botany* 64:337–346p.
 - * Mauseth, J. 1983. *Introduction to cactus anatomy. Part 2. Apical meristems*. *Cactus and Succulent Journal. USA*. 55:18-21p.
 - * Mauseth, J. 1988. *Plant anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing. USA. 79-128p.
 - * Mauseth, J. 2003. *Botany: An Introduction to Plant Biology*. Jones & Bartlett Publishers. USA. 848p.
 - * Mauseth, J. 2004c. *Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae*. *Journal of Plant Research*. 117:69–76p.
 - * Mauseth, J., Y. Uozumi, B.J. Plemons y J.V. Landrum. 1995. *Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti*. *Journal of Plant Research*. 108: 517–526p.
 - * Miclăuș, M., V. Cristea y C. Deliu. 2003. *Micropropagation on Dianthus petraeus W. et K. ssp. simonkaianus (Peterfii) Tutin*. *Contributions to Botany*. 38(1):77-84p.
 - * Minocha, S. y P. Mehra. 1992. *Nutritional and morphogenetic investigations of callus cultures of Neomammillaria prolifera Miller (Cactaceae)*. En: *Micropropagation of Mammillaria Species (Cactaceae)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Alemania. 40:193-205p.

- * Moebius-Goldammer, K. 1999. *Regeneración in vitro de Ariocarpus kotschoubeyanus, (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), especie amenazada endémica de México.* Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 76p.
- * Moebius-Goldammer, K., M. Mata y V. Chávez. 2003. *Micropropagation of Turbinicarpus lani Glass et Foster, an endemic and endangered species.* In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 37: 400-404p.
- * Müller-Stoll, WR y H. Süß. 1970. *Über tüpfelfreie Tracheiden mit Spiral- und Ringverdickungen bei Trichocereus schickendantzii Britt. Et Rose (Cactaceae).* Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 83: 237-244p.
- * Murashige, T. y F. Skoog. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.* Physiol. Plant. 15: 473-497p.
- * Olguín, L. 1994. *Cultivo in vitro de Ariocarpus retusus Scheidw (Cactaceae), especie en peligro de extinción.* Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias UNAM. México. 85p.
- * Ordóñez, M. 2003. *Propagación in vitro de Mammillaria voburnensis Scheer. (Cactaceae).* Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 70p.
- * Orellana, P. 1998. *Propagación vía organogénesis.* pp. 151-178. En: Pérez J.N. (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología.* Vol.1. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390p.
- * Ortiz, J. y Alcántara R. 1997. *Propagación in vitro de Peyote (Lophophora williamsii (Lemaire) Coulter).* Cactáceas y Suculentas Mexicanas. México. 42:3-6p.
- * Pan, M. J. y V. Staden. 1998. *The use of charcoal in vitro culture - a review.* Plant Growth Regulation. 26:155-163p.

- * Pérez, J. 1993. *Variación somaclonal*. 104-121p. En: Roca W. M. y Mogrinsky L. A (Ed.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cuba. 970p.
- * Pérez, J. 1993. *Cultivo de tejidos en la caña de azúcar*. 543-575p. En: Roca W. M. y Mogrinsky L. A (Ed.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cuba. 970p.
- * Pérez-Molphe, E., M. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones, H. Lizalde. 1998. *Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation*. In Vitro Cell Developmental Biology Plant. 34:131-135p.
- * Pérez-Molphe, E. y C. Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro propagation of Pelecyphora aselliformis Ehrenberg and P. strobiliformis Werdermann (cactaceae)*. In Vitro Cell Developmental Biology Plant. 38:73-78p.
- * Pierik, R.L.M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Mundi-prensa. España. 326p.
- * Pimienta, E., 1997. *El nopal en México y el mundo*. En: Suculentas Mexicanas, Cactáceas. CVS Publicaciones-CONABIO-UNAM-SEMARNAP. México. 87-95p.
- * Poljuha, D., B. Balen, A. Bauer, N. Ljubescic y M. Krsnik-Rasol. 2003. *Morphology and ultrastructure of Mammillaria gracillis (Cactaceae) in vitro culture*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 75:117-123p.
- * Porembski, S. 1994. *Opuntia invicta, eine nebelabsorbierende Cactaceae aus Baja California (Mexico)*. Beirträge zur Biologie der Pflanzen 68: 73–79p.
- * Primack, R.B. 1993. *Essentials of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc. Inglaterra. 564p.

- * Quiala, E., G. Montalvo, J. Matos y R. Mederos. 2007. *La biotecnología vegetal: su aplicación para el manejo integrado de cactáceas cubanas amenazadas*. Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas. 4:11-14p.
- * Ramírez, R., I. Aguilar, A. Borodanenko, L. Perez, J. Barrera, H. Nuñez y N. Ochoa. 2007. *In vitro propagation of ten threatened species of Mammillaria (Cactaceae)*. In Vitro Cellular and Development Biology Plant. 43:660-665p.
- * Razdan, M.K.. 2003. *Introduction to Plant Tissue Culture*. 2da edition. Science publishers Inc. USA. 375p.
- * Reis, R. L., y A. M., Cunha, 2005. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. En: Peñaranda O., J. Perilla y N. Algecira. Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos. Colombia. Ingeniería e investigación. 28: 47-52p.
- * Rzedowski, J. 1983. *Vegetación de México*. Editorial Limusa. México. 505p.
- * Reyes, S.J. 1997. *Cultivo y Propagación como plantas de ornato*. En: Suculentas Mexicanas, Cactáceas. CVS Publicaciones-CONABIO-UNAM-SEMARNAP. México. 68-77p.
- * Rivas, M. 2001. *Conservación in situ de los recursos fitogenéticos*. PROCISUR. Uruguay. 12p.
- * Rincón S. y R. González. 1991. *Importancia de los sistemas de documentación en el manejo de los recursos fitogenéticos*. Agronomía Mesoamericana. El Salvador. 2:89-92p.
- * Rojas, M. 2008. *Efecto del ácido giberélico en la germinación de cuatro especies del género Mammillaria del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México*. Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas. México 5(1): 21-23p.
- * Robbins, C. 2003. *Comercio espinoso: comercio y conservación de cactus en el desierto chihuahuense*. Traffic. USA. 122p.

- * Robert, M. y V.M. Loyola. 1985. *El cultivo de tejidos vegetales en México*. pp. 21-27. En: Robert M. y Loyola V.M., (comp). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 167p.
- * Robles, R. 1999. *Establecimiento del cultivo in vitro de Mammillaria huitzilopochtli para la obtención de metabolitos secundarios*. Tesis Maestría (Biotecnología). Colegio de Ciencias y Humanidades, Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado, UNAM. México. 84p.
- * Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo. 1992. *In vitro morphogenetic responses of the endangered cactus Aztekium ritteri (Boedeker)*. Cactus And Succulent Journal. USA. 64:116-119p.
- * Rodríguez, L. 2006. *Implicaciones fisiológicas de la osmoregulación en plantas*. Agronomía Colombiana. Colombia. 24:28-37p.
- * Rubluo, A. 1985. *Estrategias para la preservación del germoplasma vegetal in vitro*. pp. 35-53. En: Robert M. y Loyola V.M., (comp). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 167p.
- * Rubluo, A. 1997. *Micropropagation of Mammillaria Species (Cactaceae)*, Biotechnology in Agriculture and Forestry. 40 2:89-92p.
- * Rubluo, A. V. Chávez, A.P. Matínez y O. Matínez-Vázquez. 1993. *Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in- vitro culture*. Biological Conservation. 63: 163-169p.
- * Sánchez, E. 1991. *Avances en la propagación in vitro de cactáceas*. Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey-Campus Querétaro. México. 39p.

- * Sánchez, E., G. Galindo y J. Hernández. 1995. *El cultivo de tejidos vegetales en la conservación*. En: Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM. México. 175p

- * Sánchez-Espinosa, C., A. Jiménez, K. Moebius, A. Álvarez, V. Cervantes, I. Vargas, S. Luna, P. Ortega, A. Martínez, A.L. López, P. Olgún, M. Mata, M. Monroy, V. Chávez y R. Bye. 2000. *Regeneración in vitro de especies mexicanas en peligro de extinción*. Boletín Amaranto. Asociación Mexicana de Jardines Botánicos A.C. México. 1:12-19p.

- * Sánchez-Mejorada, H. 1982. *Algunos usos prehispánicos de las Cactáceas entre los indígenas de México*. Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Dirección de Recursos Naturales. México. 48p.

- * Sánchez-Mejorada, H. 1987. *Observaciones sobre el estado de conservación de doce especies de cactáceas amenazadas del noreste de México*. En: Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM. México. 175p.

- * Sandoval, E., A. Rojas, C. Guzmán, L. Carmona, M. Ponce, C. León, C. Loyola, M. Vallejo y A. Medina. 2005. *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Cuadernos del Instituto de Biología 38. UNAM. México. 278p.

- * Santos-Días, M.S., R. Méndez, A. Arredondo y M.L. Santos. 2003. *Clonal propagation of Turbinicarpus laui Glass & Foster, a cactus threatened with extinction*. Bradleya. 21:7-12p.

- * Santos-Días, M.S., R. Méndez, A. Arredondo y M.L. Santos. 2003. *In vitro organogenesis of Pelecyphora aselliformis Erbenberg (Cactaceae)*. In Vitro Cellular and Development Biology Plant. 39:480-484p.

- * Saucedo, S. 2006. *Regeneración in vitro de Cephalocereus apicicephalium y Echinocereus pentalophus, cactáceas nativas de México*. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias UNAM. México. 154p.

- * Scheinvar, L. 2004. *Flora cactológica del estado de Querétaro diversidad y riqueza*. Fondo de Cultura Económica. México. 389p.
- * Schleiden, M. 1845. *Beiträge zur anatomie der cacteen*. Mémoires de l'Academie Imperiale des Sciences. St Petersburg. 4:335-380p.
- * Schill, R y W. Barthlott. 1973. *Kakteendornen als wasserabsorbierende Organe*. Die Naturwissenschaften. 60:202–203p.
- * Schneck, M. 1998. *Cactus, guía ilustrada de las 150 principales especies*. Sauseta. España. 112p.
- * Singh, B. 1999. *Regeneration of Coryphantha elephantidens (Lem) Cactaceae from root explants*. Scientia Horticulturae. 81:337-344p.
- * Sotomayor, M y A. Arredondo. 2004. *Turbincarpus; spines and seedling development*. Cactus & Co. 8:102–114p.
- * South, D. B., J. N. Boyer and L. Bosh. 1985. *Survival and growth of loblolly pine as influenced by seedling grade: 13 year results*. Southern Journal Applied Forestry. 9:76-81. En: Enríquez E., H. Suzán, G. Malda. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Taxodium mucronatum* (Ten.) en el estado de Querétaro, México. México. Agrociencia 38:375-381p.
- * Starling, R. 1985. *In vitro propagation of Leuchtenbergia principis*. Cactus and Succulent Journal. USA. 37:114-115p.
- * Stuppy, W y W. Nagl. 1992. *Regeneration and propagation of Ariocarpus retusus Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis*. Bradleya. 10:85-88p.

- * Terrazas, T. 1995. *Las plantas decomisadas y su rescate en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México*. En: Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM. México. 133-138p.
- * Thorpe, T.A. y D.D. Meier. 1974. *Starch metabolism in shoot-forming tobacco callus*. Journal of Experimental Botany. 25:288–294p.
- * Thorpe, T. A. y D. D. Meier. 1975. *Effect of gibberellic acid on starch metabolism in tobacco callus cultured under shoot-forming conditions*. Phytomorphology. 25:238–245p.
- * Thorpe, T. A. y T. Murashige. 1970. *Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures*. Canadian Journal of Botany. 48: 277–285p.
- * Vasil, I. K. y A. T. Thorpe. 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos, 576p.
- * Vázquez, C. y C. Rodríguez. 1995. *Banco de semillas: relación entre hábitat de origen y longevidad potencial de almacenamiento*. 117-121p. En: conservación de plantas en peligro de extinción (diferentes enfoques) UNAM. México. 175p.
- * Venable, D.L. y C. E. Pake, 1999. *Population ecology of desert plants*. En: Enríquez E., H. Suzán, G. Malda. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Taxodium mucronatum* (Ten.) en el estado de Querétaro, México. México. Agrociencia. 38:375-381p.
- * Viguera, A.L. y L. Portillo. 2002. *Elaboración de alimentos y conservas con cactáceas y otras plantas suculentas*. Universidad de Guadalajara, México. 98p.
- * Villalobos, A y T.A. Thorpe. 1993. *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados*. 127-171p. En: Roca W. M. y Mogrinsky L. A (Ed.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones, Centro internacional de Agricultura Tropical. Cuba. 970p.

- * Vyskot, B. y Z. Jára. 1984. *Clonal propagation of cacti through axillary buds in vitro*. Journal of Horticultural Science. 59 3: 449-452p.
- * Vovides, A. 1981. *Lista preliminar de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción*. Biótica 6:219–228p.
- * Vovides, A. 1988. *Relación de plantas mexicanas raras o en peligro de extinción*. En: Flores-Villela O. y Geréz. Conservación en México: Síntesis sobre vertebrados terrestres, vegetación y uso del suelo. INIREB, Apéndice F: 289-302p.
- * Vovides, A. 1995. *Experiencias y avances en el conocimiento de las plantas mexicanas en peligro de extinción*. 139-144p. En: Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. UNAM. México. 175p.
- * Vovides, A. P., V. Luna y G. Medina. 1997. *Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación*. Acta Botánica Mexicana. 39:1-42p.
- * Wyka, T., M. Hamerska y M. Wróblewska. 2006. *Organogenesis of vegetative shoots from in vitro cultured flower buds of Mammillaria albicoma (Cactaceae)*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 87:27-32p.
- * www.cactusart.biz/schede/MAMMILLARIA/Mammillaria_theresae/Mammillaria_theresae/Mammillaria_theresae.htm
- * www.cact.cz/noviny/2005/09/Mammillaria_theresae_Dur_1.jpg
- * www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichas/doctos/plantas.html
- * www.dgbiblio.unam.mx/tesiseunam.html
- * www.ine.gob.mx/ueajei/plantas11_13.html

* yann.cochard.free.fr/images/6/690.jpg

VI. APÉNDICES

APÉNDICE A. Composición del medio Murashige y Skoog (1962).

Componente	MS 100%(g/l)	MS 50%(g/l)		
Macronutrientes	(NH ₄)NO ₃	1.65	0.825	
	KNO ₃	1.9	0.950	
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.37	0.185	
	KH ₂ PO ₄	0.17	0.085	
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.44	0.220	
Micronutrientes	MnSO ₄ * H ₂ O	0.01689	0.0084445	
	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0.0086	0.0043	
	H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031	
	KI	0.00083	0.000415	
	NaMoO ₄ * 2 H ₂ O	0.00025	0.000125	
	CuSO ₄ *5 H ₂ O	0.000025	0.0000125	
	CoCl ₂ *6 H ₂ O	0.000025	0.0000125	
	FeEDTA	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.0278	0.0139
		Na ₂ EDTA	0.0373	0.01865
	Vitaminas	Tiamina HCL	0.0001	0.00005
Ac. Nicotínico		0.0005	0.00025	
Piridoxina * HCl		0.0005	0.00025	
Inositol		0.10	0.5	
Glicina		0.002	0.001	
Sacarosa		30	30	
Agente gelificante	Agar bacteriológico	9	9	
pH		5.7		

APÉNDICE B. Preparación de stocks de reguladores de crecimiento

La auxina ANA y la citocinina BA empleadas fueron de la marca Sigma® y para su preparación se pesaron 10 mg del regulador de crecimiento y se disolvieron en 2 ml de disolución de NaOH 1 N, finalmente se aforaron a 10 ml con agua destilada.

APÉNDICE C. Composición para el fijador de Navashin mezcla 1:1 de la solución A:B. La solución A compuesta por trióxido de cromo 1g, ácido acético glacial 7ml y agua destilada 92ml, y la solución B compuesta por formaldehído (37-40%) 30ml y agua destilada 70ml. Se mezclaron 1 minuto antes de su uso (Sandoval, 2005).

APÉNDICE D. Composición en proporciones para la preparación de la disolución de alcohol butílico terciario (ABT) (Sandoval, 2005).

Tiempo (hrs)	ABT 100% (ml)	EtOH 100% (ml)	EtOH 95% (ml)	H2O (ml)	Concentración final (%)
24	5	0	30	65	35
24	10	0	40	50	50
24	15	0	45	40	60
24	20	0	50	30	70
24	35	0	50	15	85
24	55	0	45	0	95
24	75	25	0	0	100
24	100	0	0	0	100
24	100	0	0	0	100
24	100	0	0	0	100

APÉNDICE E. Carta de donación de *M. theresae* y *M. san-angelensis* al parque ecológico Huayamilpas.



Instituto
de Biología



Jardín Botánico

Universidad Nacional
Autónoma de México

Ing. José Luis Delgado Conde
Subdirector de Parques, Jardines y Ecología
Parque Ecológico Huayamilpas
Tel. 5617-9189
Presente

Por este conducto nos dirigimos atentamente a Usted para hacer la donación de dos especies de cactáceas, 25 individuos de cada una, *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada y *Mammillaria theresae* Cutak, así como 1 poster informativo de esta última.

Mammillaria san-angelensis, endémica del Pedregal de San Ángel, en peligro de extinción.
Mammillaria theresae, cactácea endémica de Durango, de alto valor ecológico, ornamental y que solamente se propaga con fines comerciales en el estado de México; sin embargo se encuentra amenazada debido a que sus poblaciones silvestres son saqueadas y a que la demanda de esta planta es mucho mayor que el ritmo de su propagación; su hábitat está siendo alterado y su crítica situación se agudiza debido al lento y largo ciclo de vida de esta especie.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología, de la UNAM, se lleva a cabo una investigación para lograr el estudio, conservación y aprovechamiento sostenible de especies mexicanas en peligro de extinción o de especies con problemas en su propagación, es por ello que las citadas especies han sido regeneradas y propagadas *in vitro* por cultivo de tejidos.

La investigación de *M. theresae* ha requerido de 2 años de intenso estudio bajo la dirección del M. en C. Octavio González Caballero y realizado por la Pasante de Bióloga Neri Ronquillo Vázquez, quien la presentará como tesis para obtener el título de Bióloga.

Los ejemplares resultantes de nuestras investigaciones están siendo distribuidos en distintos Jardines Botánicos o en áreas de protección cercanas a la UNAM para así facilitar por algunos años el seguimiento del desarrollo de las plantas. De esta manera se llevará a cabo una primera etapa en la conservación *ex situ* de estas valiosas especies.

Agradecemos de antemano todos sus esfuerzos en la conservación de *M. san-angelensis* y *M. theresae*, sin otro particular aprovechamos la oportunidad de enviarle un cordial saludo con la intención de estrechar la colaboración entre nuestras instituciones.

Atentamente
Ciudad Universitaria, México, D. F. 4 de septiembre de 2008.



Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales
Jardín Botánico del Instituto de Biología
UNAM
Tel. 5622-9048 FAX 5622-9046 victorm@ibiologia.unam.mx

Recibi
Sub de PJE
4/sep/08
Yendi
11:20

C.e.p. Dr. Javier Caballero Nieto, Jefe del Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM

3er. Circuito Exterior, Cd. Universitaria. Apdo. Postal 70-614 C.P. 04510 México, D.F. Tels.: (+55) 5616-1297, 5622-9057 Fax: (+55) 5622-9046
jib@ibiologia.unam.mx

www.ibiologia.unam.mx

APÉNDICE F. Carta de donación de 25 plantas y poster informativo de *M. theresae* para el Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec



Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México



Jardín Botánico

Ing. Rosa María Gómez Sosa
Directora General del Bosque de Chapultepec
Tel. 5286-0505 ext. 1010

Biólogo Martín Aguilar Cervantes
Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec
Av. Paseo de la Reforma sin número
Tel. 5553-8114
Presente

Por este conducto nos dirigimos atentamente a Usted para hacer la donación de 25 individuos de *Mammillaria theresae* Cutak, así como 1 poster informativo. Cactácea endémica de Durango, de alto valor ecológico, ornamental y que solamente se propaga con fines comerciales en el estado de México; sin embargo se encuentra amenazada debido a que sus poblaciones silvestres son saqueadas y a que la demanda de esta planta es mucho mayor que el ritmo de su propagación; su hábitat está siendo alterado y su crítica situación se agudiza debido al lento y largo ciclo de vida de esta especie.

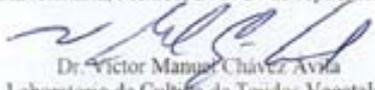
En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología, de la UNAM, se lleva a cabo una investigación para lograr el estudio, conservación y aprovechamiento sostenible de especies mexicanas en peligro de extinción o de especies con problemas en su propagación, es por ello que la citada especie ha sido regenerada y propagada *in vitro* por cultivo de tejidos.

La investigación de *M. theresae* ha requerido de 2 años de intenso estudio bajo la dirección del M. en C. Octavio González Caballero y realizado por la Pasante de Bióloga Neri Ronquillo Vázquez, quien la presentará como tesis para obtener el título de Bióloga.

Los ejemplares resultantes de nuestras investigaciones están siendo distribuidos en distintos Jardines Botánicos o en áreas de protección cercanas a la UNAM para así facilitar por algunos años el seguimiento del desarrollo de las plantas. De esta manera se llevará a cabo una primera etapa en la conservación *ex situ* de esta valiosa especie.

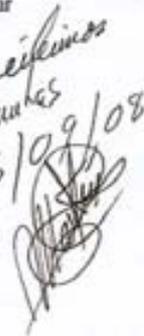
Agradecemos de antemano todos sus esfuerzos en la conservación de *M. theresae*, sin otro particular aprovechamos la oportunidad de enviarle un cordial saludo con la intención de estrechar la colaboración entre nuestras instituciones.

Atentamente
Ciudad Universitaria, México, D. F. 24 de septiembre de 2008.



Dr. Victor Manuel Chávez Avila
Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales
Jardín Botánico del Instituto de Biología
UNAM
Tel. 5622-9048 FAX 5622-9046 victorm@ibiologia.unam.mx

*Recibimos
Plantas
25/09/08*



C.e.p. Dr. Javier Caballero Nieto, Jefe del Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM

Ser. Circuito Exterior, Cd. Universitaria. Pqdo. Postal 70-614 C.P. 04510 México, D.F. Tels.: (+55) 5616-1297, 5622-9057 Fax: (+55) 5622-9046
jjb@ibiologia.unam.mx

www.ibiologia.unam.mx

APÉNDICE G. Carta de agradecimiento de la Directora Rosa María Gómez Sosa del Bosque de Chapultepec por la donación de 25 plantas y poster informativo de *M. theresae*



Secretaría del Medio Ambiente
Dirección General de Bosques Urbanos y Educación Ambiental
Dirección del Bosque de Chapultepec

SMA/DGBUEA/DBCH/ 002067

México D.F., a 26 de Septiembre de 2008

ASUNTO: Donación de cactus al Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec.

DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES
JARDÍN BOTÁNICO DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA
UNAM
3ER CIRCUITO EXTERIOR, CD. UNIVERSITARIA
APDO. POSTAL 70-614, CP. 04510
COYOACÁN, MÉXICO, D.F.
TEL: 56-22-90-48
FAX: 56-22-90-46
EMAIL: VICTORM@IBIOLOGIA.UNAM.MX

Por este conducto, me permito expresarle mi agradecimiento y el de mis colaboradores, por haber considerado al Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec como una alternativa para la donación de 25 individuos de la cactácea endémica del Estado de Durango, de la especie *Mammillaria Thereae* Cutak, mismos que son recibidos con el compromiso de proporcionarles las condiciones necesarias que estén a nuestro alcance para su supervivencia.

Sabemos de la importancia y la responsabilidad que conlleva la recepción de estos individuos cuya supervivencia en el ambiente natural está amenazada, por lo que cumpliendo con los objetivos para los cuales fue creado el Jardín Botánico del Bosque de Chapultepec y considerando el esfuerzo y dedicación de la investigación mediante la cual fueron obtenidos, tenemos a bien asignar un sitio para su desarrollo en nuestras áreas de cuarentena y en las jardineras demostrativas.

Esperando que este sea el inicio de un intercambio fructífero de experiencias, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
LA DIRECTORA



ROSA MARÍA GÓMEZ SOSA

C.c.p. Ing. Ara, Francisco Domínguez Aranda, Director General de Bosques Urbanos y Educación Ambiental, Presente,
Lic. Ulla Hagua, Directora del Fideicomiso Pro Bosque de Chapultepec, Presente,
Miembros del Consejo Rector Ciudadano, Presentes.

Folio 4, Sin referencia.
MPS/JMA



Ira. Sección del Bosque de Chapultepec, Colonia San Miguel Chapultepec,
Delegación Miguel Hidalgo
C.P. 11850, México, D.F.
Commutador 52.86.05.05 y 52.86.05.10



APÉNDICE H. Carta de donación de 25 plantas y poster informativo de *M. theresae* para el Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.



Dr. Ángel Salvador Arias Montes
Responsable del área de colecciones
Jardín Botánico
Instituto de Biología UNAM
Presente

Por este conducto nos dirigimos atentamente a Usted para hacer la donación de 25 individuos de *Mammillaria theresae* Cutak, así como 1 poster informativo. Cactácea endémica de Durango, de alto valor ecológico, ornamental y que solamente se propaga con fines comerciales en el estado de México; sin embargo se encuentra amenazada debido a que sus poblaciones silvestres son saqueadas y a que la demanda de esta planta es mucho mayor que el ritmo de su propagación; su hábitat está siendo alterado y su crítica situación se agudiza debido al lento y largo ciclo de vida de esta especie.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología, de la UNAM, se lleva a cabo una investigación para lograr el estudio, conservación y aprovechamiento sostenible de especies mexicanas en peligro de extinción o de especies con problemas en su propagación, es por ello que la citada especie ha sido regenerada y propagada *in vitro* por cultivo de tejidos.

La investigación de *M. theresae* ha requerido de 2 años de intenso estudio bajo la dirección del M. en C. Octavio González Caballero y realizado por la Pasante de Bióloga Neri Ronquillo Vázquez, quien la presentará como tesis para obtener el título de Bióloga.

Los ejemplares resultantes de nuestra investigación están siendo distribuidos en distintos Jardines Botánicos o en áreas de protección cercanas a la UNAM para así facilitar por algunos años el seguimiento del desarrollo de las plantas. De esta manera se llevará a cabo una primera etapa en la conservación *ex situ* de esta valiosa especie.

Agradecemos de antemano todos sus esfuerzos en la conservación de *M. theresae*, sin otro particular aprovechamos la oportunidad de enviarle un saludo.

Atentamente
Ciudad Universitaria, México, D. F. 5 de diciembre de 2008.


Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales
Jardín Botánico del Instituto de Biología
UNAM

Tel. 5622-9048 FAX 5622-9046 victorm@ibiologia.unam.mx

Rubi
S. P. V.
5/02/08