



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

ESTUDIO DE LA MORFOGÉNESIS
DURANTE EL DESARROLLO DE
BROTOS DE *Cephalocereus senilis*
(HAW.) PFEIFF. (CACTACEAE)
CULTIVADOS *IN VITRO*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

DULCE MARÍA TAPIA CRUZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ
GUZMÁN.

MIEMBROS DEL
COMITÉ TUTOR: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/024/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de noviembre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **TAPIA CRUZ DULCE MARIA** con número de cuenta **507019734** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA MORFOGENESIS DURANTE EL DESARROLLO DE BROTES DE *Cephalocereus senilis* (HAW.) PFEIFF. (CACTACEAE) CULTIVADOS IN VITRO."**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN**:

Presidente: DR. ANGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Vocal: DRA. SONIA VAZQUEZ SANTANA
Secretario: DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMAN
Suplente: DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA
Suplente: DRA. ANA LAURA LOPEZ ESCAMILLA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de enero de 2010.

Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/ipp

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por darme la oportunidad de cursar un posgrado de excelencia en esta ¡maravillosa Universidad!.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría. Número de becario: 207147

A mi Comité Tutorial, por su dedicación y orientación para que realizara esta tesis.

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Dra. Sonia Vázquez Santana

Dra. Ana Laura López Escamilla

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia Espinoza Matías del laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias-UNAM, por la toma de micrografías de las plántulas de *Cephalocereus senilis* en el microscopio electrónico de barrido.

Al Maestro Alejandro Martínez Mena y a la Maestra Anabel Bieler, por la toma de fotomicrografías de los cortes histológicos de *Cephalocereus senilis*.

A la Biol. Yolanda Hornelas Orozco del Instituto de Ciencias de Mar y Limnología-UNAM, por la toma de micrografías de las muestras de *Cephalocereus senilis* a los 28 y 42 días en el medio de inducción, con el microscopio electrónico de barrido

A mis sinodales, por sus valiosas sugerencias durante la revisión de mi trabajo escrito: Dr. Ángel Salvador Arias Montes, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. G. Judith Márquez Guzmán, Dra. Margarita Collazo Ortega y Dra. Ana Laura López Escamilla.

A la Dra. Ana Laura López Escamilla, por toda su ayuda, apoyo y motivación constante, por invitarme a conocer la UNAM! MUCHAS GRACIAS

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por darme la oportunidad de ser su alumna, por tenerme paciencia, por ofrecerme ayuda en todo momento, por invitarme a ser parte de la gran familia que es su laboratorio.

A la Maestra Clara Esquivel, por enseñarme a hacer cortes histológicos, por su enorme paciencia y consejos, por su ayuda en todo momento.

A la Biol. Patricia Olgún por siempre estar dispuesta a ayudar, por todo su apoyo y motivación.

A la Dra. Sonia Vázquez por todo su apoyo durante la parte experimental de este trabajo.

A todos mis compañeros de Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias-UNAM, por la convivencia día con día, por sus sugerencias, por su ayuda. A Mónica Pérez, por estar siempre dispuesta a ayudar y por sus consejos en la realización de los cortes histológicos, a Ricardo Wong, por el apoyo en el uso del material, por sus comentarios y sugerencias durante la parte experimental de este trabajo, a Ame, Rebe, Erick, Dulce Y. Alma, Kari, Magali, Aldebarán, Rocio, Diana, Raúl, Juan y Gabriel.

A mis queridos amigos, a pesar del tiempo y la distancia siempre los recuerdo: Noemy, Claudia, Raquel, Erika, Adriana, por supuesto Maris y Lupis, Emmanuel, León y Leonel. Gracias por toda su ayuda, motivación, por las risas sobretodo. A Angie, gracias por tus consejos, fui muy afortunada al coincidir contigo.

Y por supuesto a Jaime, por tu cariño y por ser tan paciente conmigo.

DEDICATORIA

Con mucho cariño: Para mi familia

¡Gracias!

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	4
1.- FAMILIA CACTACEAE.....	4
2.- CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	5
3.- MICROPROPAGACIÓN.....	6
4.- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LAS ESTRUCTURAS REGENERADAS <i>IN VITRO</i> EN CACTÁCEAS.....	13
5.- MERISTEMOS.....	16
6.- MODIFICACIONES ANATÓMICAS DE CACTACEAE.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	21
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL Y MÉTODO.....	22
OBTENCIÓN DE LAS SEMILLAS.....	22
CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cephalocereus senilis</i>	22
PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
PLÁNTULA.....	26
7 DIAS.....	29
14 DIAS.....	30
21 DÍAS.....	32
28 DÍAS.....	36
35 DÍAS.....	43
42 DÍAS.....	44
CONCLUSIONES.....	48
LITERATURA CITADA.....	49
ANEXOS.....	56

RESUMEN

En esta investigación se estudió la formación y el desarrollo de brotes generados *in vitro* a partir del meristemo de las aréolas en explantes longitudinales de *Cephalocereus senilis* (Cactaceae). Las muestras se procesaron para su inclusión en LR-White mediante técnicas convencionales para su posterior observación al microscopio de luz. Para las observaciones micromorfológicas, se utilizó un microscopio electrónico de barrido.

Para inducir la formación de brotes, los explantes longitudinales se colocaron en medio de cultivo MS adicionado con 2 mg L^{-1} de N⁶-benciladenina (BA) (medio de inducción) durante seis semanas en condiciones controladas de luz y temperatura.

La respuesta de los explantes fue la formación de brotes por organogénesis directa. Estos brotes y sus tubérculos surgen a partir del meristemo de la aréola que se localiza en el ápice de todos los tubérculos. Los brotes inician cuando el meristemo de la aréola forma primordios foliares que se ensanchan de su base hasta formar un tubérculo y este desarrolla un meristemo en su axila que forma primordios de espina. Por lo tanto el meristemo de la aréola del explante ya no forma espinas sino tubérculos.

La citocinina (BA) adicionada al medio de cultivo, tuvo el efecto de cambiar el destino del meristemo de las aréolas hacia la formación de tubérculos.

ABSTRACT

This research studied the formation and growth of shoots produced *in vitro* from areole meristem of longitudinally explants in *Cephalocereus senilis* (Cactaceae). The samples were processed for inclusion in LR-White by conventional techniques for subsequent light microscopic observation. For micromorphological observations, we used a scanning electron microscope.

To induce shoot formation, explants were placed into culture jars (baby food jars) containing 30 mL MS medium added with 2 mg L⁻¹ N⁶-benzyladenine (BA) (induction medium) for six weeks under controlled light and temperature.

The response of explants was the formation of shoots by direct organogenesis. These shoots and their tubercles arise from the areole meristem, which is located at the apex of all tubercles. The shoots began when the areole meristem forms leaf primordia which expand from its base to form a tubercle and it develops an axillary meristem to form spine primordia.

Therefore the areole meristem of the explant is no longer spines but tubercles.

Cytokinin (BA) added to the culture medium, had the effect of changing the fate of the meristem of the areole towards the formation of tubercles.

INTRODUCCIÓN

Existen múltiples reportes sobre la evaluación del efecto de diferentes reguladores del crecimiento durante la micropropagación de cactáceas, sin embargo son sumamente escasos los trabajos que estudian la ontogenia de las estructuras obtenidas.

La escasa investigación al respecto, se debe principalmente a problemas técnicos, puesto que el tejido interno de estas plantas, presenta un alto contenido de agua, que se incrementa por las condiciones *in vitro* dificultando enormemente el procesamiento histológico del material.

Cephalocereus senilis es una cactácea columnar, con espinas setosas blancas, que cubren totalmente el tallo de los individuos juveniles, lo que le ha valido el nombre común de “viejito”. Su belleza ha contribuido a que sean plantas sobrecolectadas colocandola como una especie amenazada de extinción, en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002). En un estudio previo, se establecieron las condiciones óptimas para la propagación *in vitro* de esta especie y se observó, que los brotes surgen a partir de las aréolas. Sin embargo estas observaciones no fueron suficientes para determinar el proceso mediante el cual se genera un nuevo brote, que es el inicio de las plantas regeneradas *in vitro* (Tapia, 2006).

El conocer el origen preciso de los brotes obtenidos durante la micropropagación, es importante, porque permite comprender el efecto de los reguladores del crecimiento durante la inducción hormonal, y proporciona las bases para poder diseñar protocolos más eficientes de micropropagación de cactáceas.

ANTECEDENTES

1.- FAMILIA CACTACEAE

Las cactáceas son nativas del continente americano. Se han diversificado en un considerable número de especies y formas de vida y se han establecido en varios ecosistemas, sin embargo en las regiones áridas y semiáridas es donde han alcanzado su máxima diversificación morfológica, fisiológica y reproductiva (Arias, 1997; Rzedowski, 1998; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1999).

México es uno de los centros de alta diversidad de cactáceas, en su territorio se encuentra la mayor variedad florística, con $54 \pm$ géneros y $850 \pm$ especies (Arias, 1997) y al igual que Chile, Brasil, Perú, Argentina, Bolivia, Estados Unidos y Costa Rica, presenta un elevado porcentaje de especies endémicas (Hernández y Godínez, 1994).

Arias (1997) considera que existen cinco centros de diversidad para cactáceas, tres se ubican en América del Sur, uno en Mesoamérica y uno más en América del Norte.

Las Cactáceas son de las plantas más amenazadas, las poblaciones naturales de muchas especies han sido afectadas por actividades humanas; en México, las zonas áridas y semiáridas han sido alteradas por la agricultura de riego (Challenger, 1998), por el sobrepastoreo de ganado introducido y por la severa extracción de plantas para su venta como ejemplares de ornato tanto en mercados nacionales como en internacionales. En consecuencia, la familia está incluida en los apéndices de la Convención Internacional sobre el Tráfico de Especies Silvestres de Flora y Fauna Amenazadas (CITES) (Hernández y Godínez, 1994) y 144 especies se ubican en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), 54 de ellas se distribuyen en México (IUCN, 2009). Además la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 enlista a 285 especies de cactáceas en alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2002).

***Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff.**

Es una cactácea columnar que llega a medir hasta 15 m de altura, su tallo es columnar simple aunque en raras ocasiones llega a ramificarse (usualmente cuando ha sufrido una lesión). En los organismos juveniles el tallo se encuentra completamente cubierto de cerdas de color blanco que llegan a medir desde 12 hasta 30 cm de largo, debido a esta característica, la especie es conocida como “viejito”. En estado adulto presenta un cefalio lateral, donde en algunas costillas se reducen los espacios interareolares, por lo que hay abundantes cerdas blancas y tricomas de color beige (Bravo-Hollis, 1978). Esta especie se distribuye en los estados de Hidalgo y Veracruz (Bravo-Hollis, 1978; Hernández y Godínez, 1994; Vovides *et al.*, 1997; Dávila-Aranda *et al.*, 2002; Guzmán *et al.*, 2003). En Hidalgo se distribuye en la Barranca de Tolantongo (Challenger, 1998) y al Centro-Este del estado, en los cerros que se encuentran al Este del Río Venados y que forman la Barranca de Metztlán, y en la base de los cerros “El León” y “Partido” en los márgenes del Río Grande Tulancingo en el Municipio de Huasca. En esta área se localiza el tipo de vegetación al que se le ha llamado matorral crassicaule de *Cephalocereus senilis* puesto que dicha especie es la dominante (CONANP, 2003).

En cuanto a su estatus de conservación desde 1994 ha estado en la categoría de Amenazada de extinción de acuerdo a la NOM-059-ECOL-1994 y a la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 1994; 2002). No se encuentra en la lista roja de la UICN, y respecto a su situación dentro del comercio internacional se ubica en el Apéndice II de la CITES (Arias *et al.*, 2005).

2.- CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV)

Los primeros ensayos que se realizaron para cultivar *in vitro* células vegetales fueron realizados por Gottlieb Haberlandt en 1902 con monocotiledóneas, quien logró que las células sobrevivieran en condiciones artificiales, pero no consiguió que se dividieran. Por sus trabajos, se reconoce que definió el principio de

“totipotencialidad celular”, que es la base teórica del cultivo *in vitro*. Sesenta años después, en 1962, Murashige y Skoog desarrollaron la formulación del medio de cultivo MS para tejidos de hojas de tabaco; este hecho tuvo gran impacto ya que actualmente se usa con éxito para cultivar *in vitro* casi todas las especies. Posteriormente, con el descubrimiento de las hormonas vegetales, se iniciaron los trabajos sobre combinación hormonal, para controlar la formación de brotes y de raíces de tejido indiferenciado (Jiménez-González, 1998).

El 1963, White organizó el primer Congreso Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales en la Universidad de Pensilvania en Estados Unidos. Después de este evento las investigaciones se multiplicaron y cada vez se encontraron más aplicaciones del CTV (Collin y Edwards, 1998).

El CTV, es el conjunto de técnicas que permiten mantener en condiciones asépticas órganos, tejidos, células y protoplastos, empleando medios nutritivos y químicamente definidos (Evans, 1990). El CTV ha probado ser una herramienta poderosa para manipular la morfogénesis bajo condiciones controladas y para entender el papel de los factores intrínsecos y extrínsecos que intervienen durante este proceso. El uso de estas técnicas ha hecho contribuciones importantes en tres aspectos de la morfogénesis: la citodiferenciación, la diferenciación organogénica y la embriogénesis somática (Soh y Bhojwani, 1999).

Algunas de las aplicaciones prácticas del CTV que se han detectado son: la producción de metabolitos secundarios, la producción de plantas libres de patógenos, la conservación de germoplasma y la micropropagación (Debergh y Read, 1991).

3.- MICROPROPAGACIÓN

Esta técnica se define como la formación de brotes a partir de ápices, yemas o meristemos y la subsecuente regeneración de plantas (Debergh y Read, 1991). De todas las aplicaciones del CTV, esta es la que más se ha trabajado en cactáceas,

dado que se han diseñado protocolos exitosos que inducen la proliferación de brotes, su enraizamiento y posterior establecimiento *ex vitro*. Esta técnica ha tenido gran impacto y relevancia como estrategia de conservación, puesto que las plantas micropropagadas pueden sustituir a las plantas silvestres en los mercados nacionales e internacionales y de esta manera se evita la alteración de las poblaciones naturales.

Los trabajos de micropropagación se han realizado principalmente con especies de distribución restringida, con potencial uso ornamental y que han sido sobre explotadas.

El primer trabajo que se publicó sobre la propagación *in vitro* de una cactácea fue realizado por Kolář *et al.* (1976) utilizando *Mammillaria woodsii*, en el que lograron la regeneración de brotes a partir de tejido parenquimático medular cultivado en medio MS con 2 mg L⁻¹ de K. Tres años después, Mauseth (1979) reportó la propagación de 10 especies de cactáceas a partir de aréolas en presencia de BA con 1 a 10 mg L⁻¹.

De las cuatro subfamilias de Cactaceae, Cactoideae es la que ha recibido mayor interés para realizar trabajos de este tipo, en Opuntioideae únicamente se encontraron 3 reportes (Escobar *et al.*, 1986; García-Saucedo *et al.*, 2005 y Khalafalla *et al.*, 2007) y ninguno para las subfamilias Pereskioideae y Maihuenioideae. De la subfamilia Cactoideae, el género *Mammillaria* es el más estudiado, posiblemente debido a que es uno de los géneros más utilizados como ornamentales; entre las especies estudiadas se encuentran *M. carmenae*, *M. prolifera* (Vyskot y Jára, 1984), *M. san-angelensis* (Martínez-Vazquez y Rubluo, 1989), *M. candida*, *M. craigii*, *M. formosa*, *M. obscura*, *M. sphacelata*, *M. uncinata*, (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998), *M. bocasana*, *M. oteroi* (Castro-Gallo *et al.*, 2002) y *M. pectinifera* (Giusti *et al.*, 2002) entre otras especies.

También se han realizado estudios con especies de los géneros *Astrophytum* (Vyskot y Jára, 1984; Villavicencio-Gutierrez *et al.*, 1999; Castro-Gallo *et al.*, 2002), *Coryphantha* (Smith *et al.*, 1991; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Malda *et*

al., 1999; Wakhlu y Bhau, 2000), *Echinocereus* (Lizalde-Viramontes, 2004; Retes-Pruneda *et al.*, 2007) y *Turbincarpus* (Mata-Rosas *et al.*, 2001; Dávila-Figueroa *et al.*, 2005) por mencionar algunos. En general, la mayoría son especies de talla pequeña, las especies columnares y las candelabriformes son las menos estudiadas. Se tiene un reporte de *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002) y cuatro reportes de *Cephalocereus senilis* (Nava-Esparza y Yáñez, 1984; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000 y Tapia, 2006) (Anexo 1).

El proceso de micropropagación consta de cinco etapas (Hartman *et al.*, 1997: Orellana-Pérez, 1998).

Etapas 0.- Selección del material vegetal.

Esta etapa consiste en seleccionar el material biológico que se va a utilizar como fuente de explantes, debe estar sano y completamente libre de patógenos, ya que el origen del material vegetal es crítico para el posterior crecimiento y respuesta organogénica de la planta (Kalilian-Fakhrai y Fakhrai, 1990). Es importante seleccionar un tipo de explante adecuado, dependiendo de su disponibilidad y del objetivo de la investigación (Fay y Gratton, 1992).

Para la propagación de cactáceas, Rubluo *et al.* (2002) recomendaron utilizar plántulas generadas *in vitro* como fuente de explantes, porque evitan problemas de contaminación, principalmente bacteriana; de otra forma resulta difícil desinfectar el tallo de organismos provenientes del campo, puesto que las espinas no dejan que las soluciones estén completamente en contacto con la superficie de la planta evitando una desinfección profunda.

En cactáceas los explantes provenientes de plántulas pueden ser de cuatro tipos: 1) apicales, si se utiliza únicamente el ápice de la planta, 2) laterales, si se realiza un corte longitudinal de la plántula, previa eliminación del ápice, 3) longitudinales, mediante un corte longitudinal de la plántula completa ó 4) transversales, segmentos transversales del tallo (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002).

Etapa I.- Desinfección y establecimiento *in vitro*

En esta etapa se establece un tren de desinfección que consiste en someter el material biológico a un lavado con detergente y posteriormente con alcohol e hipoclorito de sodio (cloro comercial) en concentraciones que varían del 20 al 70% y de 0.1 al 3% respectivamente. También se reporta el uso de Cloruro de mercurio (HgCl₂) aunque por ser altamente tóxico no se recomienda. Los tiempos y concentraciones dependen del tipo de explante utilizado y son determinados por ensayo y error. También se emplean soluciones surfactantes como Tween 20 o Tween 80 para romper la tensión superficial del agua y permitir que los desinfectantes estén en contacto directo con la superficie del explante (Gratton y Fay, 1990; Villavicencio-Gutierrez *et al.*, 1999; Wakhlu y Bhau, 2000; Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; Pelah *et al.*, 2002; Giusti *et al.*, 2002).

Etapa II.- Inducción y proliferación de brotes

Durante esta etapa se induce la formación y proliferación de brotes mediante la adición de hormonas vegetales al medio de cultivo. Las hormonas que se utilizan pertenecen a dos tipos, citocininas y auxinas. Las citocininas se utilizan para activar a las yemas laterales, las más utilizadas son N⁶-Benciladenina (BA), kinetina (K) y N⁶-2-isopentil-adenina (2iP). Las auxinas se utilizan para inducir la formación de callo y para generar la formación de raíces de los brotes formados. Para la inducción de callo la auxina más utilizada es el 2,4-D y en algunos casos puede además inducir embriogénesis somática. La mayoría de los aspectos de crecimiento y diferenciación celular así como la organogénesis en cultivo de tejidos, son controlados por la interacción de estas hormonas, tanto de las endógenas como de las exógenas que se agregan al medio de cultivo (Kalilian-Fakhrai y Fakhrai, 1990; Gaspar *et al.*, 1996) siendo necesario un balance adecuado para cada especie que se desee micropropagar (Rubluo, 1997; Malda *et al.*, 1999; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002).

El medio de cultivo que se utiliza de manera general en cactáceas es el MS (Murashige y Skoog, 1962) ya que se reporta que es capaz de soportar todas las fases de la organogénesis.

Etapa III.- Enraizamiento de brotes

Durante esta etapa los brotes formados se separan del explante y se someten al efecto de las auxinas. Las más utilizadas para inducir el enraizamiento de los brotes son el ácido indolacético y el ácido-naftalenacético (Gaspar *et al.*, 1996).

También se ha observado que la presencia de carbón activado en el medio de cultivo promueve la formación de raíces. En *Acharagma aguirreana*, *Pachycereus schottii* y *Stenocereus stellatus* se utilizaron 3 gr L⁻¹ y obtuvieron el 100% de brotes enraizados (Castro-Gallo *et al.*, 2002), aunque también existen trabajos en donde se reporta la formación de raíces en medio basal, sin la adición de alguna hormona; como en *Cephalocereus senilis*, *Coryphantha elephantidens*, *Epithelantha micromeris*, *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis* (Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000; Wakhlu y Bhau, 2000; Velázquez-Enciso y Soltero-Quintana, 2001; Giusti *et al.*, 2002).

Etapa IV.- Aclimatización

Durante esta etapa las plantas se transfieren del ambiente aséptico a las condiciones *ex vitro*. Es la etapa con mayor riesgo en un sistema de micropropagación exitoso puesto que de su resultado depende la eficacia total del sistema de micropropagación (Preece y Sutter, 1991).

La micropropagación ha demostrado presentar ventajas y desventajas. Las ventajas son que el rango de multiplicación es rápido para especies de difícil regeneración; las estaciones del año no restringen la producción de las plantas, pues se encuentran en ambientes controlados; es posible la producción de plantas que de forma convencional serían difíciles de propagar; mediante el cultivo de meristemas es posible la producción de plantas libres de virus y existe el potencial

para automatizar la propagación a través del cultivo de brotes adventicios o de embriones en medio líquido.

Entre las desventajas es que se requiere de personal capacitado para dar un seguimiento a las plantas propagadas, el equipo, material y los reactivos necesarios son costosos, se requiere de cuidados extremos para mantener las áreas totalmente asépticas, después de la propagación *in vitro* se requiere de un largo periodo para aclimatizar las plantas, así mismo, el tiempo de investigación para establecer las condiciones de cultivo para nuevas especies que son difíciles de regenerar o enraizar, puede ser muy largo y además existen fenómenos que afectan el proceso de la micropropagación, como la formación de compuestos fenólicos dentro del frasco de cultivo, la presencia de contaminantes endógenos y la hiperhidratación de las plantas (Ziv, 1991; Collin y Edwards, 1998; Pospišilova *et al.*, 1999).

3.1.- FORMAS DE REGENERACIÓN VEGETAL

Existen dos patrones para la formación de plantas durante el proceso de micropropagación, que se describen por la forma en que se originan a partir del explante inicial durante las etapas I y II (Hartman *et al.*, 1997). Estos patrones son: la embriogénesis somática, que se refiere a la formación de embriones somáticos, asexuales o adventicios que no son el resultado de la fusión de gametos. Estas estructuras tienen un eje apical-radical, aislados por tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno, pero son capaces de crecer y formar plantas normales. La organogénesis se refiere a la formación de un primordio unipolar a partir de una yema, hasta su desarrollo como un brote vegetativo. En este caso, siempre existe continuidad de los haces vasculares entre los nuevos brotes y el tejido materno. Dentro de la organogénesis existen dos vías: la formación de brotes axilares (a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o en primordios de hojas) y la formación de brotes adventicios (Jiménez-González, 1998); que se pueden formar directamente del explante o a partir de callo que se forma del explante (Hartman *et al.*, 1997).

El callo es un tejido producido sobre los explantes cultivados *in vitro* como respuesta a una herida o a los reguladores del crecimiento ya sean endógenos o exógenos. Casi cualquier parte o estructura de una planta puede ser disectada, desinfectada e inducida a formar callo, el cual se puede subcultivar por largos periodos de tiempo y posteriormente este callo puede seguir vías de diferenciación como la organogénesis o la embriogénesis somática. La formación de callo se atribuye principalmente al efecto de las auxinas. El callo en cultivo aparentemente es una masa homogénea de tejido, sin embargo su estructura es relativamente compleja. Su crecimiento sigue un típico patrón logarítmico: al inicio hay un periodo de inducción con división celular lenta en el que se requieren auxinas, después sigue una fase de intensa división celular donde ocurre síntesis de ADN, ARN y proteínas y el tercer periodo es una gradual disminución de la división para iniciar con la diferenciación hacia parénquima y células de tipo vascular.

En el cultivo de callo, la organogénesis comienza con la desdiferenciación de células de parénquima para producir centros de actividad meristemática llamados meristemoides (Hartman *et al.*, 1997). Estas estructuras se han descrito desde 1966 (Torrey) como predecesoras durante la formación de tallo, de raíces o de meristemas florales (Hicks, 1994). Los meristemoides consisten de masas esféricas de células pequeñas, isodiamétricas, con citoplasma denso, microvacuoladas, que tienen un alto contenido de todos los organelos y el núcleo contiene una alta cantidad de material nucleolar. Un meristemoide es inicialmente apolar, pero rápidamente muestra direccionalidad para formar un primordio unipolar (Joy-Iv y Thorpe, 1999).

La formación de meristemoides bajo cultivo *in vitro* se ha reportado en *Mammillaria gracilis* (Poljuha *et al.*, 2003), en coníferas (Joy-Iv y Thorpe, 1999; López, 2000), y en *Nicotiana tabacum* (Joy-Iv y Thorpe, 1999), entre otras especies.

Cualquier vía de micropropagación puede producir un gran número de plantas que son fenotípicamente similares a la planta original. Sin embargo la forma más apropiada para obtener plantas genotípicamente iguales es la formación de brotes por yemas axilares, puesto que es la respuesta más estable para conservar el

genotipo. Este tipo de propagación evita la variación somaclonal, muy común en la micropropagación cuando existe una fase intermedia de callo (Evans, 1990; Pérez-Ponce, 1998).

4.- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LAS ESTRUCTURAS REGENERADAS *IN VITRO* EN CACTÁCEAS

Existen pocos trabajos que estudian la anatomía y/o el desarrollo de las estructuras regeneradas *in vitro* de cactáceas y la mayoría se han realizado con especies del género *Mammillaria*.

Escobar *et al.* (1986) establecieron las mejores condiciones para micropropagar a *Opuntia amyclaea*, utilizaron como explantes segmentos transversales de cladodios jóvenes de plantas que crecían *ex vitro* y los cultivaron en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de N⁶- benciladenina (BA) y ácido indol-3-butírico (AIB). En el análisis histológico que realizaron, determinaron la existencia de contacto vascular entre los brotes y las raíces que éstos generaron.

En otro trabajo, Dabekaussen *et al.* (1991), estudiaron los factores que afectan la activación de las aréolas de *Sulcorebutia alba* Rausch *in vitro*. Para realizar el estudio, utilizaron como explantes segmentos de brotes regenerados *in vitro* a partir de secciones de plantas adultas colectadas en campo. Realizaron el análisis histológico de explantes cultivados en medio MS adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de BA, y encontraron que después de tres días de cultivo, el meristemo de la aréola se activó, aumentó de tamaño y comenzó a formar un brote, mostrando que éstos no son adventicios si no, de origen axilar. Sin embargo, en este trabajo no se muestran los resultados y no se describe el proceso de formación de los brotes.

Rubluo *et al.* (2002), realizaron un estudio sobre el papel de las auxinas durante la inducción de respuestas morfogénéticas en plántulas de *Mammillaria san-angelensis*. Los explantes que utilizaron en este trabajo provenían de plántulas que fueron regeneradas *in vitro* en medio MS adicionado con 0.1 mg L⁻¹ y

subcultivadas cada 6 meses durante 7 años en medio MS sin reguladores de crecimiento. Estos explantes fueron colocados en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de auxinas. En el estudio histológico demostraron que los nuevos brotes se regeneraron por dos vías: por formación de meristemos *de novo* a partir de callo y por la activación de los meristemos axilares.

Durante la formación de meristemos *de novo*, se observó callo, con células parenquimatosas, irregulares, grandes, con pocos espacios entre ellas y con cloroplastos en la periferia. Hacia la superficie del callo las células observaron más pequeñas, con núcleos conspicuos, sin vacuolas y mostraron apariencia meristemática. Después de 3-4 semanas, se observaron haces vasculares, células parenquimatosas, tubérculos, meristemos axilares y espiníferos; después, a partir de éstas estructuras se desarrollaron brotes que formaron raíces y que se transfirieron a suelo y sobrevivieron.

Respecto a la activación de la aréola los autores no detallan cómo ocurre éste proceso, sólo mencionan observar células pequeñas que se organizan y que muestran activa división celular que deriva en la formación del brote. Sin embargo tampoco se detalla cómo ocurre la formación de esta estructura.

En otro trabajo, Poljuha *et al.* (2003), analizaron la morfología y ultraestructura de *Mammillaria gracilis* cultivada *in vitro* y reportaron la formación de brotes, a partir de callo en medio MS sin hormonas. Realizaron un estudio histológico y lograron observar que el callo estaba formado por células vacuoladas, isodiamétricas, con paredes delgadas y además observaron meristemoides dispersos aleatoriamente, a partir de los cuales se formaron los brotes. Éstos tenían la apariencia de grupos de células más pequeñas en división.

Liconá-Sánchez *et al.* (2004), analizaron el desarrollo ontogenético de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria crucígera*. Reportan la formación de brotes a partir de las aréolas del explante entre los 20 y 28 días de cultivo en medio MS adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de BA. El análisis histológico indicó que los brotes se

formaron por organogénesis directa a partir del meristemo de la aréola, que previamente formó espinas y tricomas y que los haces vasculares son continuos entre el explante y los brotes. En este trabajo tampoco se muestra el desarrollo de las estructuras.

Wyka *et al.*, (2006), probaron la capacidad organogenética de explantes florales de *Mammillaria albicoma*. Estos explantes consistían del perianto completo con estambres adheridos a él, sin el ovario ínfero. Para inducir la formación de brotes, utilizaron medio MS adicionado con Ácido α -naftalenacético (ANA) y BA. El análisis histológico reveló la formación de callo a partir del perianto y la formación de brotes a partir de dicho callo. La formación de callo ocurrió en la parte basal del explante, muy cerca de la superficie de corte, mientras que en la parte superior se observaron divisiones periclinales. Con el tiempo, el callo se fue haciendo cada vez más compacto, con centros meristemáticos y trazas de tejido vascular. En la superficie de este callo compacto, ocurrió la organogénesis llevando a la formación de grupos de aréolas y de brotes; las aréolas presentaron espinas, tricomas y haces vasculares. También reportaron la diferenciación de brotes sin la formación intermedia de callo, directamente del tejido del perianto, donde divisiones celulares llevaron al desarrollo de meristemos individuales y superficiales, con apariencia aplanada con una capa de túnica y una de corpus.

López (2009) realizó el estudio histológico de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* y reportó que dichas estructuras se forman a partir de las aréolas vegetativas y de las aréolas florales y que además los brotes inician su formación cuando los primordios destinados a la formación de espinas, cambian su destino hacia la formación de primordios de tubérculo.

5.- MERISTEMOS

Los meristemos son regiones de continua división celular localizados en sitios específicos de una planta, que contribuyen a su crecimiento (Sussex y Kerk, 2002).

De acuerdo a su posición los meristemos se clasifican en: apicales, laterales e intercalares (Evert, 2006).

El meristemo apical del tallo es una estructura altamente organizada y dinámica, que debe mantener un balance continuo entre la producción de células del cuerpo vegetativo y la incorporación de sus derivados a primordios de órganos; cualquier exceso, ya sea de acumulación o de pérdida de células, tiene severas consecuencias morfológicas para la planta (Doemer, 2003).

En el embrión de las angiospermas se establece una estratificación del meristemo. El meristemo apical del tallo tiene una o más capas en el ápice que muestra predominantemente divisiones celulares orientadas anticlinalmente y es llamada túnica, mientras que la región subyacente de células que se dividen periclinal y anticlinalmente se llama, corpus. En las angiospermas se han observado de una a cinco capas de túnica. El número de capas de la túnica es constante en la mayoría de las especies, pero puede variar en relación con la etapa de desarrollo, el tiempo de iniciación de órganos laterales y en plantas perennes, de acuerdo a cambios estacionales. En *Arabidopsis* y en otras dicotiledóneas la túnica consiste de una capa epidérmica (L1) y una capa subepidérmica (L2). Cada capa es monoestratificada y sus divisiones celulares son anticlinales. El corpus o capa L3 se encuentra por debajo de la túnica y puede tener varios estratos. Los derivados celulares de la capa L1 dan origen a la epidermis de tallos, hojas y flores, mientras que los de la capa celular L2, originan al tejido mesodérmico y a las células madres de los granos de polen, óvulos y sacos embrionarios. Los derivados de la capa celular L3 forman a la médula, al tejido vascular del tallo y a la mayoría de las células interiores de hojas y órganos florales. Tanto la túnica como el corpus

participan en el mantenimiento del meristemo, en la formación de órganos y la especificación del destino celular. Durante el desarrollo, todas las capas celulares están coordinadas (Sussex y Kerk, 2002; Doemer, 2003).

Sussex y Kerk (2002) mediante estudios citológicos e histológicos han determinado un patrón general de zonación del meristemo apical vegetativo de angiospermas y de gimnospermas. La zonación del corpus consiste de una zona central, que se observa como un cúmulo de células altamente vacuoladas que se dividen con poca frecuencia, respecto a las demás células del meristemo. Las células de la zona central se dividen en todos los planos y es el lugar de origen del resto de las células del corpus. Rodeando a esta zona, se encuentra la zona lateral o periférica, formada por células pequeñas con citoplasma denso. Por debajo de la zona central en las capas más profundas del meristemo, se encuentra una serie de filas o columnas de células pequeñas y vacuoladas que corresponden a la zona del meristemo medular.

Las zonas central y periférica se pueden diferenciar histológicamente, sin embargo no está claro qué proporción del meristemo corresponde a cada región o si existe un límite definido entre ellas. Además tienen diferentes capacidades de proliferación, en la zona central es baja, incrementa hacia la periferia y es más alta en los primordios foliares (Doemer, 2006).

5.1 MERISTEMO APICAL EN CACTACEAS

Los meristemos apicales de cactáceas son de los más grandes que se han estudiado. El rango de diámetro registrado va de 80 hasta 2565 μm . Generalmente son de forma convexa, se encuentran en el fondo de una depresión cónica formada por las costillas más jóvenes y están densamente cubiertos por abundantes tricomas, cerdas y espinas (Boke, 1980; Mauseth, 2004).

La túnica del meristemo apical de cactáceas es monoestratificada, sólo se divide anticlinalmente y produce el sistema dérmico de la planta. En el corpus, se observa la zonación típica del meristemo apical de angiospermas: la zona central de células madre, la zona periférica y el meristemo de la médula (Mauseth, 1983a).

De los costados del meristemo apical surgen primordios foliares en sucesión acrópeta y en espiral. Tempranamente en su desarrollo, estas estructuras se diferencian en una hoja y en una base de la hoja. La hoja puede ser amplia y laminar hasta pequeña y rudimentaria. En *Mammillaria lasiacantha*, alcanza una longitud de 300 μm ; en *Echinocactus*, de 90 μm y de 100 μm en *Echinocereus*. En la mayoría de los casos, únicamente se reconoce por su posición, puesto que sólo es posible distinguir un pequeño abultamiento y no se observa tejido vascular (Boke, 1951, 1957, 1958). Sin embargo en *Coryphantha vivipara* la hoja rudimentaria alcanza 1 mm de longitud, presenta tejido vascular e incluso estomas (Boke, 1952).

6.- MODIFICACIONES ANATÓMICAS DE CACTACEAE

a) TUBÉRCULO

La base de la hoja (modificada en podario, Boke, 1952) se alarga y se convierte en el tubérculo, que es una característica permanente del tallo (Boke, 1951). Cuando las bases de las hojas se forman justo en línea vertical y se arreglan una por encima de la otra, se fusionan y forman las costillas, típicas de algunas especies (Boke, 1941).

b) ARÉOLA

La aréola es la característica distintiva de la familia Cactaceae. Boke (1951) menciona que una aréola corresponde a un meristemo con simetría bilateral, que equivale a una yema axilar (meristemo de la aréola), donde se forman primordios de espina, espinas y tricomas. Mauseth (1983b) define a esta estructura, como

una rama extremadamente reducida que posee nudos y entrenudos o braquiblasto. Gibson y Nobel (1986), definen a una aréola como una yema axilar altamente modificada, que produce espinas en lugar de hojas.

El meristemo de la aréola presenta la misma zonación de túnica-carpus que el meristemo apical (Mauseth, 1983b).

La yema axilar o meristemo de la aréola surge directamente de los costados del meristemo apical, y es visible poco después de que emerge el primordio foliar que lo sustenta. En el género *Mammillaria*, este meristemo se divide y una porción, el que corresponde al meristemo vegetativo se mantiene en el ápice del tubérculo, mientras que en su axila se mantiene un meristemo reproductivo (Boke, 1957, 1958).

Una vez que se desarrolla la aréola en la cara adaxial del primordio foliar, a esta estructura se le puede llamar primordio de tubérculo, puesto que ya está destinado a formar esta estructura (Boke, 1952).

c) ESPINAS

A partir del meristemo de la aréola se desarrollan las espinas en sucesión acrópeta, de manera muy similar a un primordio foliar (Mauseth, 1983b). La primera espina inicia su formación en la región abaxial al meristemo (también llamado meristemo espinífero o de la espina) (Boke, 1941).

En estos primordios se distingue una protodermis y un meristemo fundamental (Mauseth, 1983b). Durante un corto periodo, la espina crece desde el ápice, y posteriormente lo hace por divisiones en su base, región que se conoce como zona meristemática basal. Las células producidas por esta zona se alargan y estiran mientras maduran. Las células alargadas del ápice se endurecen y esclerifican, porque producen pared celular secundaria que está impregnada de lignina (Gibson y Nobel, 1986). Por lo tanto se pueden distinguir dos regiones en

una espina; el meristemo basal y la zona de alargamiento-maduración (Mauseth, 1983b).

Las espinas no tienen tejidos vasculares, éstos se encuentran por debajo de la base de la espina y no penetran la zona meristemática basal (Gibson y Nobel, 1986).

La unión de la espina al tejido basal queda reforzada gracias a que las células de la zona meristemática basal finalmente maduran y forman paredes gruesas, ya que cada espina se adhiere a las demás por medio de células corticales. Estas células son producidas por un felógeno que surge de la hipodermis que rodea la base de cada espina, de manera que las bases de las espinas individuales se fusionan entre ellas por la formación de células corticales (Gibson y Nobel, 1986).

El orden de formación de los primordios de espinas es característico de cada especie, por ejemplo, en *Mammillaria lasiacantha*, el primer primordio de espina se forma antes de que se separen los meristemas vegetativo y reproductivo. Los primordios de espina surgen en una secuencia de tres series más o menos elípticas, el primer primordio de cada serie, surge en un plano medio justo en frente de la hoja vestigial, los demás primordios de cada serie se desarrollan en sucesión acrópeta en los costados del meristemo espinífero hasta que lo rodean completamente. La formación de los primordios de espina de la segunda serie comienza antes de que terminen de formarse los de la primera serie y los de la tercera comienzan antes de que terminen de formarse los de la segunda. Una vez que se han completado las tres series, el meristemo espinífero produce unos pocos primordios adicionales y se consume durante este proceso. El proceso de alargamiento de las espinas se presenta hasta que se ha iniciado la formación del total de primordios en la aréola, las espinas delanteras comienzan entonces a elongarse y después lo hacen las demás en secuencia basipétala (Boke, 1958).

JUSTIFICACIÓN

Existe información considerable con respecto al establecimiento de protocolos para la micropropagación de cactáceas. En la mayoría de dichos trabajos, los autores reportan que los brotes obtenidos se forman a partir de las aréolas de los explantes, puesto que esta estructura contiene al meristemo axilar. Sin embargo, son escasos los trabajos que han abordado el tema del origen y desarrollo de las estructuras obtenidas mediante cultivo de tejidos y menos aún en cactáceas columnares. Por tal motivo este trabajo se avocó al estudio de la ontogenia de los brotes de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. inducidos *in vitro*, para aportar conocimientos para la micropropagación en cactáceas.

OBJETIVOS

General

Analizar el desarrollo de los brotes de *Cephalocereus senilis* obtenidos mediante su cultivo *in vitro*.

Particulares

- 1.- Conocer la anatomía de plántulas de *Cephalocereus senilis* utilizadas como explantes obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de semillas.
- 2.- Conocer la contribución del meristemo de las aréolas en la formación de los brotes *in vitro* de *Cephalocereus senilis*.
- 3.- Conocer la anatomía de los tubérculos de explantes longitudinales de *Cephalocereus senilis* sometidos a inducción hormonal con 2 mg L^{-1} de BA.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de las semillas

Las semillas utilizadas para realizar esta investigación fueron colectadas en la Reserva de la Biósfera Barranca de Meztitlán en el estado de Hidalgo, México, y donadas en 2006 por las autoridades de la Reserva.

Cultivo *in vitro* de *Cephalocereus senilis*

Desinfección

Para lavar y desinfectar las semillas se lavaron primero con una solución de 50 mL de agua destilada y 6 gotas de Dawn® (detergente líquido comercial) durante 20 minutos y después con 50 mL de agua destilada y 6 gotas de Microdyn® (bactericida comercial, plata coloidal 0.35%) durante 30 minutos. Posteriormente se desinfectaron 3 minutos con alcohol 70% y en seguida con 50 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl, 6% cloro activo) al 30% con 4 gotas de “Tween 80” durante 30 minutos. Por último, en condiciones asépticas se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada. Todo el proceso se realizó en constante agitación (Tapia, 2006).

Siembra

Se sembraron 100 semillas, colocando 5 en cada frasco que contenía 30 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con sacarosa 30 g⁻¹, 8 g L⁻¹ de agar Bioxón, se ajustó el pH entre 5.7-5.8 (ANEXO I). Los frascos con las semillas se incubaron en una cámara con ambiente controlado (30-35 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa, temperatura de 25 ±2 ° C y fotoperiodo 16/8h).

Inducción hormonal

Se seleccionaron 20 plántulas de 1.5 cm de longitud (tres meses de edad), se les eliminó la raíz, se disecaron para obtener dos explantes longitudinales de cada una (Figs. 1a y 1b). Cada explante longitudinal se colocó en un frasco de cultivo

con 30 mL de medio MS adicionado con 2 mgL⁻¹ de N⁶- benciladenina (BA) (medio de inducción), en donde permanecieron hasta 42 días. Se incubaron en una cámara con ambiente controlado (30-35 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa, temperatura de 25 ±2 ° C y fotoperiodo 16/8h).

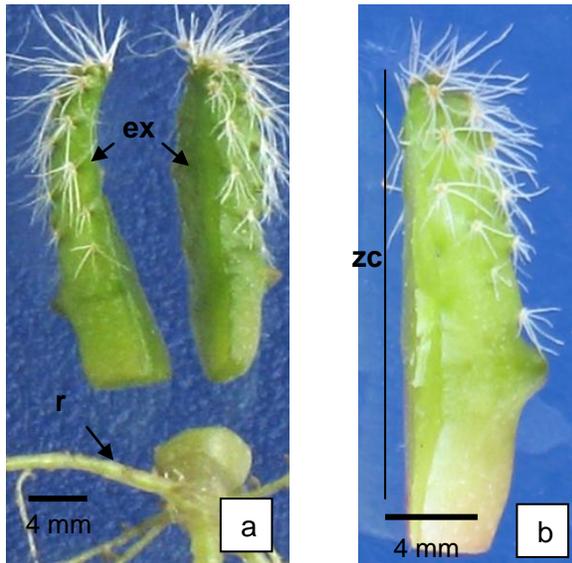


Fig. 1. **Obtención de explantes.** **a)** Diseción de una plántula de *C. senilis* para obtener dos explantes longitudinales y una raíz que se deshecha. **b)** Explante longitudinal. **(ex)** explantes, **(r)** raíz, **(zc)** zona del corte.

Procesamiento Histológico

Microtecnica

Se colectaron tres explantes a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días en el medio de inducción, así como una plántula de tres meses de edad para utilizarla como tratamiento control, los cuales se fijaron en FAA (Formaldehído 10 mL/ ácido acético glacial 5 mL/ alcohol etílico 96% 50 mL/ agua destilada 35 mL) para procesarlos y obtener cortes semifinos, así como para microscopía electrónica de barrido (MEB).

Inclusión en LR-White

Después de la fijación, los explantes se lavaron bajo el chorro de agua corriente durante 20 minutos, después se deshidrataron gradualmente en una serie

etanólica al 30%, 50%, 70%, 85%, 96% durante 15 minutos en cada uno y tres cambios en alcohol absoluto de 20 minutos cada uno. Posteriormente las muestras se infiltraron en LR-White al 25% durante 72 horas, al 50 %, 75 % y 100 % durante 24 horas a 4 °C. Para incluir las muestras, éstas se colocaron en cápsulas de gelatina orientadas de acuerdo al corte deseado, se inundaron hasta llenar las cápsulas con LR-White puro, se taparon y se colocaron en una estufa a 60°C durante 24 horas para permitir su polimerización. Se realizaron cortes de 1 a 3 µm de grosor en un ultramicrotomo marca SORVAL MT2-B, se tiñeron con azul de toluidina y se seleccionaron los mejores para realizar el registro fotográfico.

Histoquímica

Se colocó una gota de lugol sobre un corte de 3 µm de grosor y se dejó actuar durante 30 segundos, se retiró el exceso del reactivo y se dejó secar. El color oscuro indica la presencia de almidón en la muestra (López *et al.*, 2005).

Microscopía Electrónica de Barrido

Para este procedimiento se utilizaron únicamente explantes a los 28 y 42 días en el medio de inducción y secciones de una plántula del tratamiento control.

De los explantes fijados en FAA, se disectaron secciones con tubérculos, se deshidrataron de la manera descrita anteriormente, se desecaron a punto crítico con CO₂ en una desecadora CPD-030 Baltek y se colocaron en portamuestras de aluminio para ser cubiertas con una capa de oro por medio de una ionizadora Denton Vacuum Desk II. Finalmente las muestras se observaron y se determinaron las zonas para fotografiar.

El diagrama de flujo de la figura 2 resume la metodología empleada.

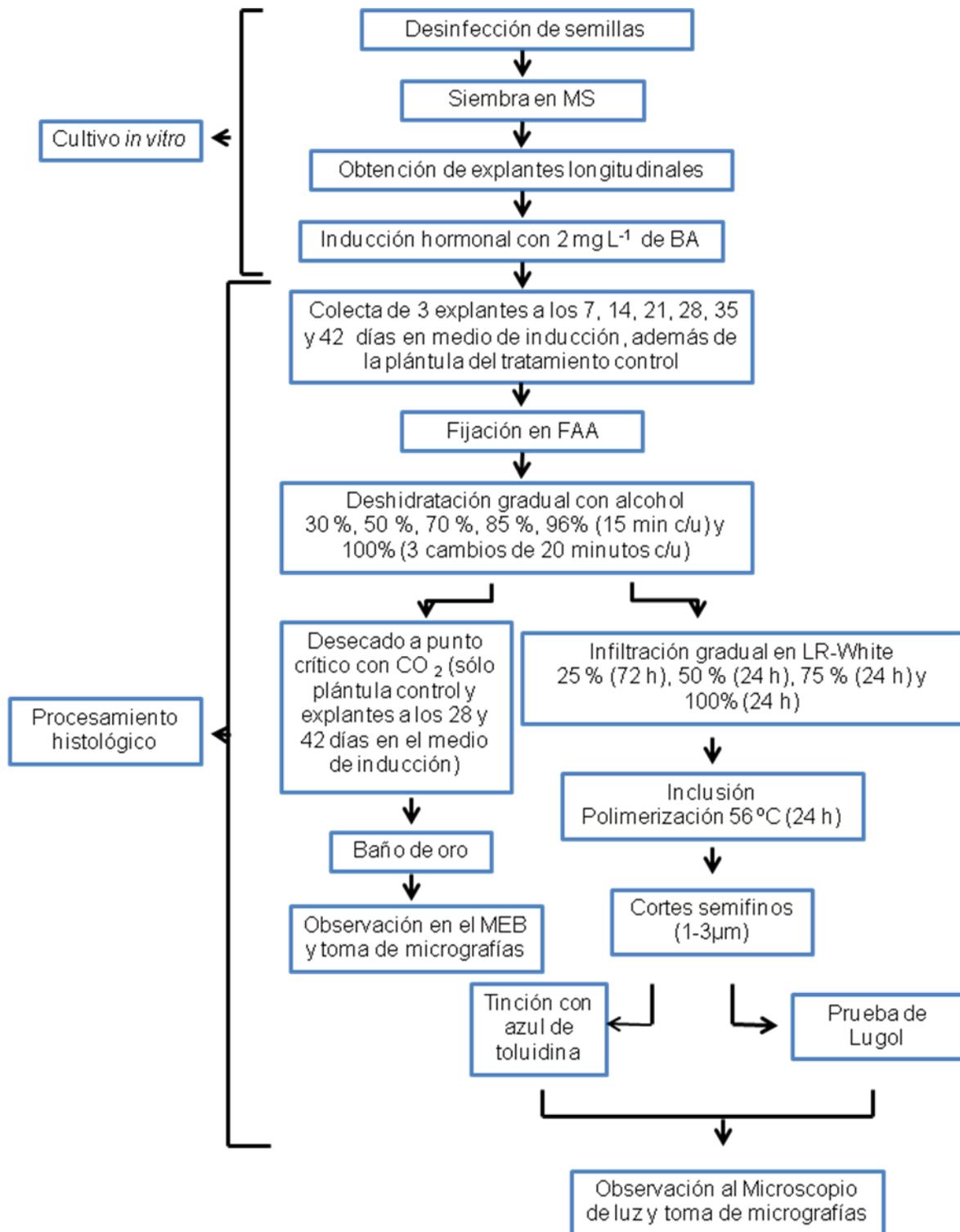


Fig. 2. Diagrama de flujo del procedimiento empleado para estudiar el desarrollo de brotes de *Cephalocereus senilis* regenerados *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción morfológica y anatómica de una plántula de tres meses de edad, germinada *in vitro*.

Morfológicamente, la plántula presenta tubérculos que conforme se alejan del ápice se hacen más grandes y más separados entre sí, incluso algunos empiezan a fusionarse verticalmente para formar las costillas típicas de la especie (Fig. 3a); tal como mencionan Gibson y Nobel (1986) que ocurre durante la formación de las costillas en cactáceas. En la parte apical de cada tubérculo se observan generalmente 9 espinas y abundantes tricomas (Fig. 3b).

Respecto a la anatomía, en un corte transversal de la plántula se encuentra, de adentro hacia afuera, la médula rodeada por los haces vasculares colaterales dispuestos en un anillo, el córtex, la epidermis y una gruesa cutícula (Fig. 4a). El tejido medular es parénquima de almacenamiento y el cortical está formado por **parénquima**. Esta observación coincide con la descripción que hacen Gibson y Nobel (1986) de la anatomía del tallo de las cactáceas.

Al colocar el explante sobre el medio de cultivo, los tejidos de la zona disecada quedan en contacto con él, principalmente de la médula y el córtex.

Se observó que el meristemo apical de *C. senilis*, al igual que el del resto de las cactáceas (Mauseth, 1983a), tiene forma convexa o de domo y se localiza en una depresión cubierta por tricomas. En él se reconoce la zonación túnica-carpus y origina primordios foliares en espiral y en sucesión acrópeta (desde la base hacia el ápice), a partir de sus costados, como ya se ha reportado para especies de Cactaceae (Boke, 1941, 1952).

Los primordios foliares que se forman a partir del meristemo apical, agrandan su base por la actividad de un meristemo periférico, también llamado meristemo primario periférico, que se encarga de producir tejido de córtex durante la formación del tubérculo (Boke, 1951; Gibson y Nobel, 1986).

En *C. senilis*, también se observaron tubérculos desarrollándose a partir del meristemo apical de la plántula (Fig. 4b).

En los tubérculos se observó la epidermis monoestratificada, en donde se localizan los estomas de tipo paracítico; éstos se encuentran al mismo nivel que el resto de las células epidérmicas, tal como lo reportaron Vazquez-Sánchez *et al.* (2005). La cutícula mide aproximadamente 3 µm de espesor. Los tubérculos presentan parénquima y células de mucílago subepidérmicas (Fig. 4c). En su ápice se encuentra la aréola con su meristemo con espinas y tricomas. El meristemo de la aréola* se localiza en una ligera depresión, tiene forma de domo aplanado y presenta la zonación túnica-corporis. La túnica es monoestratificada al igual que en el meristemo apical, y de acuerdo a Boke (1951), en el meristemo de la aréola también es posible observar la región de células centrales, la zona periférica y el meristemo de la médula, como en el resto de las dicotiledóneas, aunque en este estudio no fue posible observarlas, debido a que no se encontraban completamente diferenciadas. Por debajo de la aréola se observan haces vasculares (Fig. 4d). A partir del meristemo de la aréola se forman las espinas, blancas, largas, delgadas y flexibles; formadas por células esclerificadas con proyecciones evidentes en las células de la superficie. Adicionalmente la aréola también produce tricomas multicelulares y uniseriados (Figs. 4e y 4f).

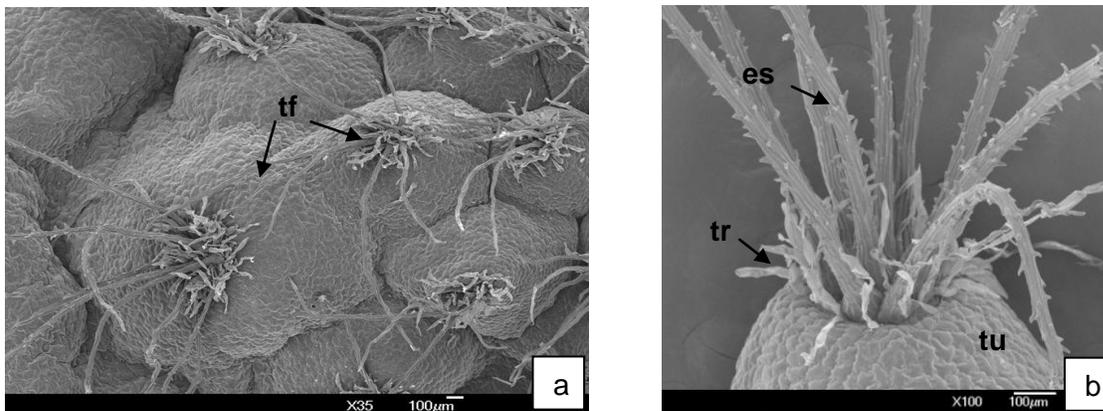


Fig. 3. **Morfología de una plántula de *Cephalocereus senilis*.** a) Fusión de dos tubérculos para empezar a formar una costilla b) Ápice de un tubérculo con espinas y tricomas (Microscopia Electrónica de Barrido) (es) espina, (tf) tubérculos fusionados, (tr) tricoma, (tu) tubérculo de la plántula,

***ACLARACIÓN:** De acuerdo a la teoría del origen de la aréola, como un braquiblasto (Mauseth, 1983b), en ella se localizan los meristemos axilares de todas las hojas reducidas. En este trabajo, se hace referencia a esos meristemos axilares como “meristemo de la aréola”.

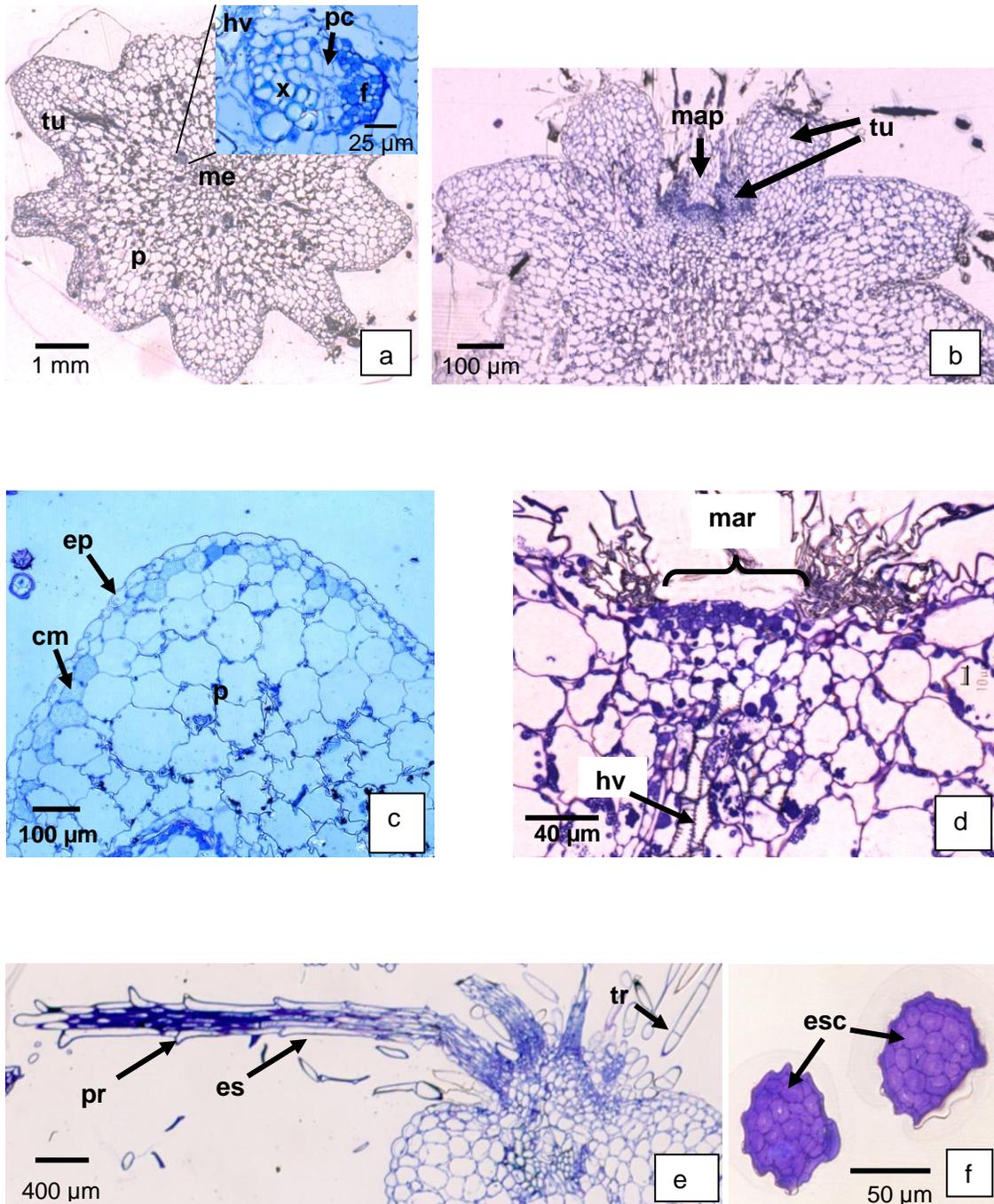


Fig. 4. **Anatomía de una plántula de *Cephalocereus senilis*.** a) Corte transversal de una plántula. El recuadro muestra un acercamiento a los haces vasculares colaterales. b) Meristemo apical de la plántula formando tubérculos. c) Tubérculo mostrando células de mucílago subepidérmicas. d) Meristemo de la aréola. e) Corte longitudinal de espinas. f) Dos espinas lignificadas vistas en corte transversal. (cm) células de mucílago, (ep) epidermis, (esc) esclereidas, (f) floema, (hv) haces vasculares, (map) meristemo apical, (mar) meristemo de la aréola, (me) médula, (p) parénquima, (pc) procambium, (pr) prolongaciones de la espina, (tr) tricomas, (x) xilema.

EXPLANTES EN MEDIO DE INDUCCIÓN

7 Días

Después de una semana en el medio de inducción, el explante longitudinal se curvó, con la parte cóncava sobre el medio de cultivo. Mostró una ligera tonalidad rojiza por la oxidación y se observó la formación de callo hialino en la superficie cóncava (Fig. 5a). No se observó ningún otro cambio en el explante. Anatómicamente se observaron divisiones anticlinales en la epidermis (Fig. 5b), y múltiples divisiones periclinales en el parénquima, cerca de la región del explante adyacente al medio de cultivo (Fig. 5c). Wyka *et al.* (2006) reportaron la formación de callo en la región cercana al corte en el explante de perianto en *Mammillaria albicoma*, y también en ésta zona observaron capas de células mostrando divisiones celulares periclinales, al igual que lo observado en *C. senilis*.

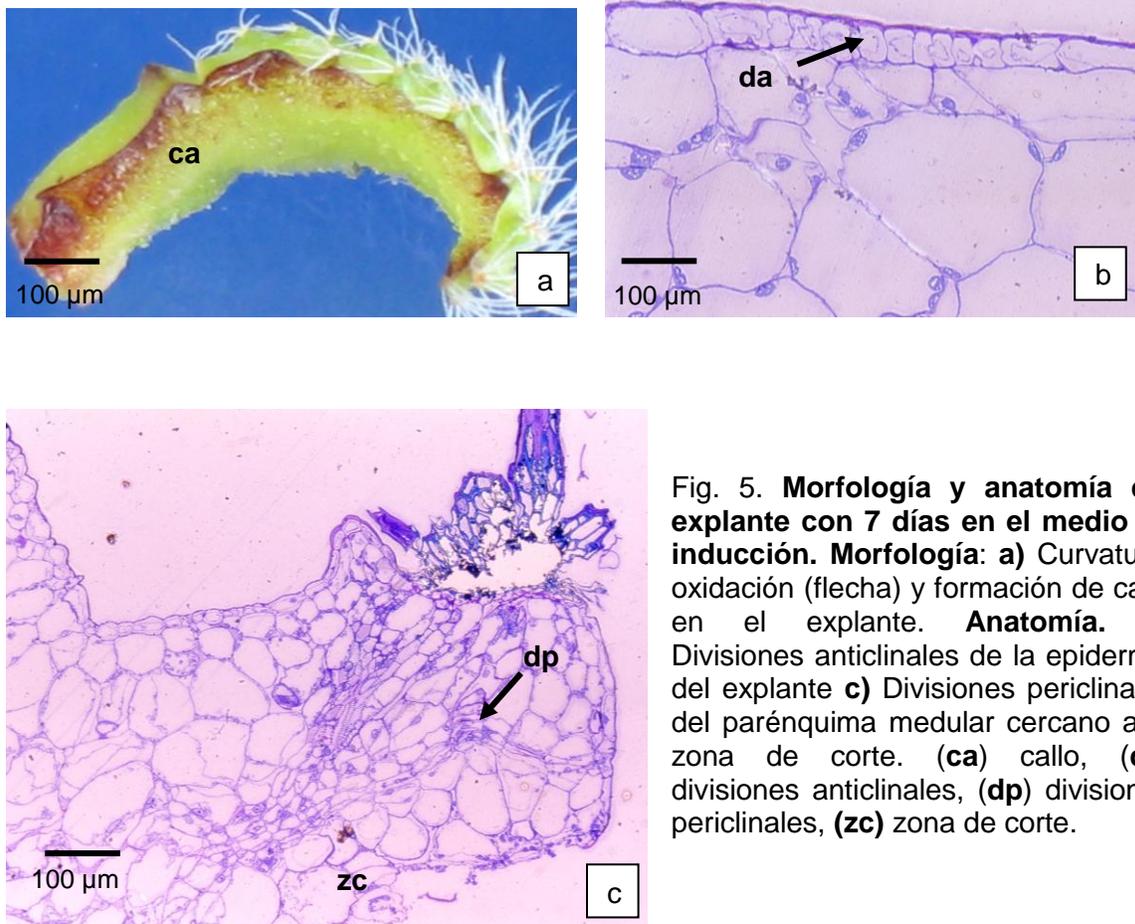


Fig. 5. **Morfología y anatomía del explante con 7 días en el medio de inducción. Morfología:** a) Curvatura, oxidación (flecha) y formación de callo en el explante. **Anatomía.** b) Divisiones anticlinales de la epidermis del explante c) Divisiones periclinales del parénquima medular cercano a la zona de corte. (ca) callo, (da) divisiones anticlinales, (dp) divisiones periclinales, (zc) zona de corte.

14 Días

Durante este tiempo de inducción morfológicamente se observó que la parte basal del explante se oxidó completamente; en el resto del explante también hubo oxidación, aunque en menor grado (Fig. 6a). La oxidación en los cultivos *in vitro* se evidencia por una coloración rojiza en los tejidos, principalmente en las regiones dañadas por el corte, este fenómeno se ha observado en los cultivos *in vitro* de otras especies de cactáceas como *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002) y *Mammillaria schiedeana* subsp. *schiedeana* (Soria, 2006), puede deberse a la liberación y oxidación de los compuestos del medio de cultivo, a las hormonas, los componentes del medio de cultivo, al tipo de explante e incluso al disecar el tejido (Gaspar *et al.*, 2002) y particularmente en *C. senilis*, por la presencia de alcaloides (con. pers Arias, 2010).

El explante continuó curvándose y se observó de mayor tamaño con respecto al explante de 7 días en medio de inducción; en algunos casos presentó un aumento en la cantidad de callo y sus tubérculos se observaron ligeramente turgentes, observaciones que también se han reportado en *Mammillaria schiedeana* subs. *schiedeana* (Soria, 2006).

Algunos explantes regeneraron la parte apical a partir del meristemo apical (Fig. 6b), lo cual ya se había reportado para *C. senilis* (Tapia, 2006) y para otras cactáceas columnares (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002).

Anatómicamente se observó que en la región del explante que se mantuvo en contacto con el medio de cultivo se observaron regiones concéntricas de divisiones múltiples llamadas “meristemoides.” Dichas estructuras están formadas de células aparentemente meristemáticas, pequeñas, isodiamétricas y con núcleos conspicuos (Figs. 6c y 6d). Los meristemoides no estuvieron presentes en la plántula del tratamiento control.

Continuaron las divisiones periclinales en el parénquima y no fueron aparentes otros cambios en ninguna otra zona del explante.

En *Mammillaria gracilis* se reportó la formación de meristemoides a partir de callo formado por células vacuoladas, isodiamétricas y con paredes delgadas, se observaron como grupos de células más pequeñas, en división y dispersos aleatoriamente en el callo, a

partir de los cuales se formaron los brotes por organogénesis indirecta en medio MS sin hormonas (Poljuha *et al.*, 2003).

En *C. senilis*, estos meristemoides no progresaron en su desarrollo y no se observaron en etapas posteriores.

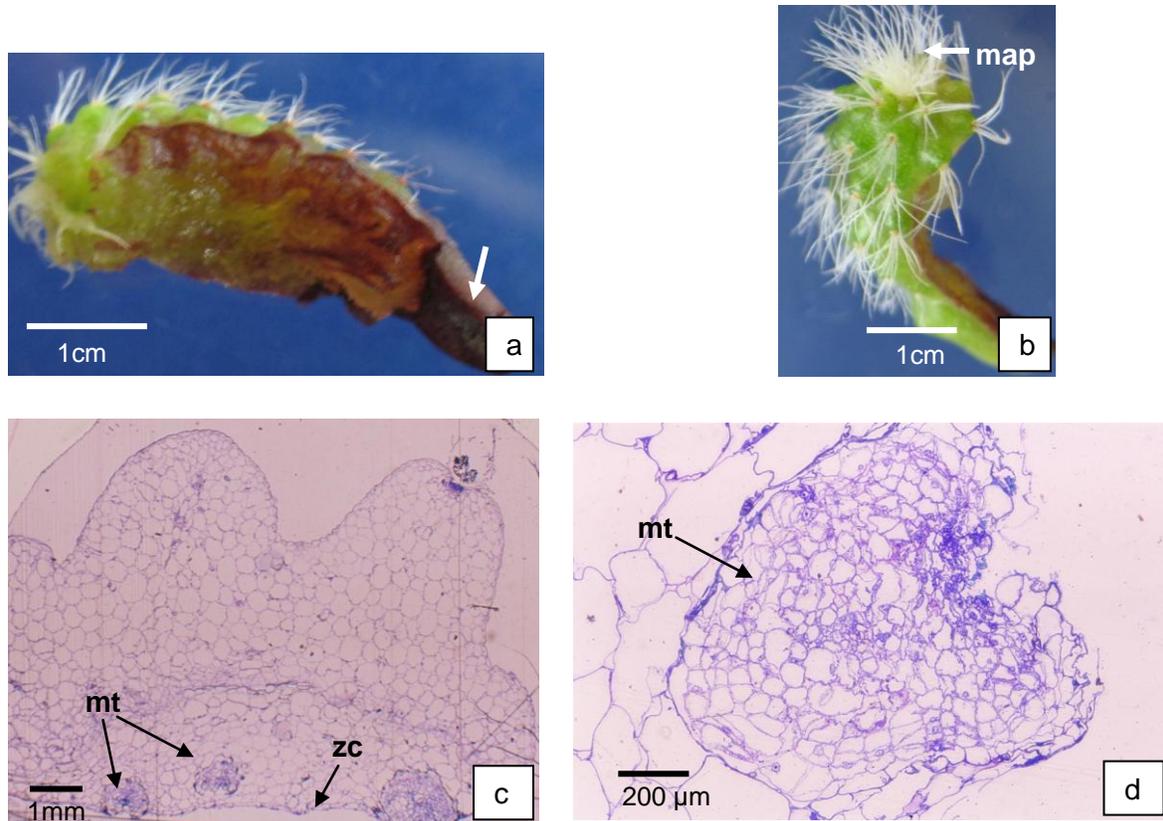


Fig. 6. **Morfología y anatomía del explante con 14 días en el medio de inducción. Morfología. a)** Oxidación del explante (flecha). **b)** Explante longitudinal con el ápice regenerado. **Anatomía: c)** Explante con meristemoides en la zona de contacto con el medio de cultivo. **d)** Meristemoide. **(map)** meristemo apical, **(mt)** meristemoide, **(zc)** zona de contacto con el medio de cultivo.

21 Días

Morfológicamente se observó el aumento de tamaño de los tubérculos del explante tanto en grosor como en longitud, con respecto a los tubérculos de la plántula del tratamiento control, principalmente los de la región apical del explante (Fig. 7a). También fue notorio el aumento en la cantidad de tricomas en el meristemo de las aréolas. En algunos explantes se desarrolló callo de manera abundante en la región del corte (Fig. 7b), y en otros la formación de callo se derivó de algunos tubérculos modificando su morfología (Fig. 7c). El proceso de oxidación se detuvo en la mayoría de los explantes, sin embargo en otros avanzó hasta los tubérculos alterando su desarrollo (Fig. 7d).

Anatómicamente se observó que después de 21 días en el medio de inducción, el meristemo de la aréola incrementó a casi tres veces su tamaño y adquirió una forma de domo bien definida, en comparación con dicho meristemo en un tubérculo de la plántula del tratamiento control. Mauseth (1977) reportó que el meristemo de la aréola de *Opuntia polyacantha* forma primordios foliares cuando se cultiva con citocininas y es mucho más grande, contiene más células, y es mucho más activo mitóticamente que cuando se le induce a la formación de primordios de espina con giberelinas. Con base en ese trabajo, el incremento de tamaño del meristemo de la aréola en *C. senilis* puede ser la primer respuesta a la inducción hormonal para la formación de primordios foliares.

Se observó la zonación túnica-carpus similar a la del meristemo apical. La túnica es monoestratificada con divisiones anticlinales y el carpus está formado por varios estratos celulares con divisiones tanto anticlinales como periclinales (Fig. 8a). El crecimiento del meristemo de la aréola ocasionó la formación de una constricción muy conspicua en la parte superior de los tubérculos (Fig. 8b).

Esta constricción también fue observada por Téllez-Román *et al.* (2008) en *Mammillaria plumosa* y mencionan, además, que en el desarrollo posterior de los brotes en dicha especie, la constricción dio origen a una zona de abscisión que permitió que los brotes se separaran del explante por si solos, sin embargo no muestran la evidencia histológica de estas descripciones.

Otros cambios observados en los tubérculos fueron la formación de tejido provascular (Fig. 8c) y la síntesis de gran cantidad de amiloplastos en las células parenquimáticas

(Fig. 8d), los cuales no eran tan abundantes en el tejido de la plántula del tratamiento control ni en el de los explantes de las etapas anteriores. Al respecto López (2009) reportó la presencia de almidón durante la formación de brotes de *Mammillaria coahuilensis in vitro*; igualmente, Flinn *et al.* (1989) analizaron las sustancias de reserva durante la formación de primordios en *Pinus strobus*, y encontraron que la síntesis de almidón se incrementa al inicio del cultivo de los explantes y disminuye conforme avanza el desarrollo de los primordios, lo cual coincide con lo observado en *C. senilis*, puesto que la cantidad de almidón va disminuyendo en las etapas posteriores.

Es probable que el almidón sea la fuente de energía durante el desarrollo de las estructuras regeneradas *in vitro*.

Las células parenquimáticas de la médula que se mantuvieron en contacto con el medio de cultivo aumentaron de volumen y presentaron grandes vacuolas, núcleos excéntricos y grandes espacios intercelulares (Figs. 8e y 8f). Esta descripción coincide con la del parénquima del callo que se forma en cultivos de *Mammillaria gracilis* (Poljuha *et al.*, 2003), el cual está formado de células con paredes delgadas, vacuoladas y con los plástidos ubicados hacia las paredes celulares.

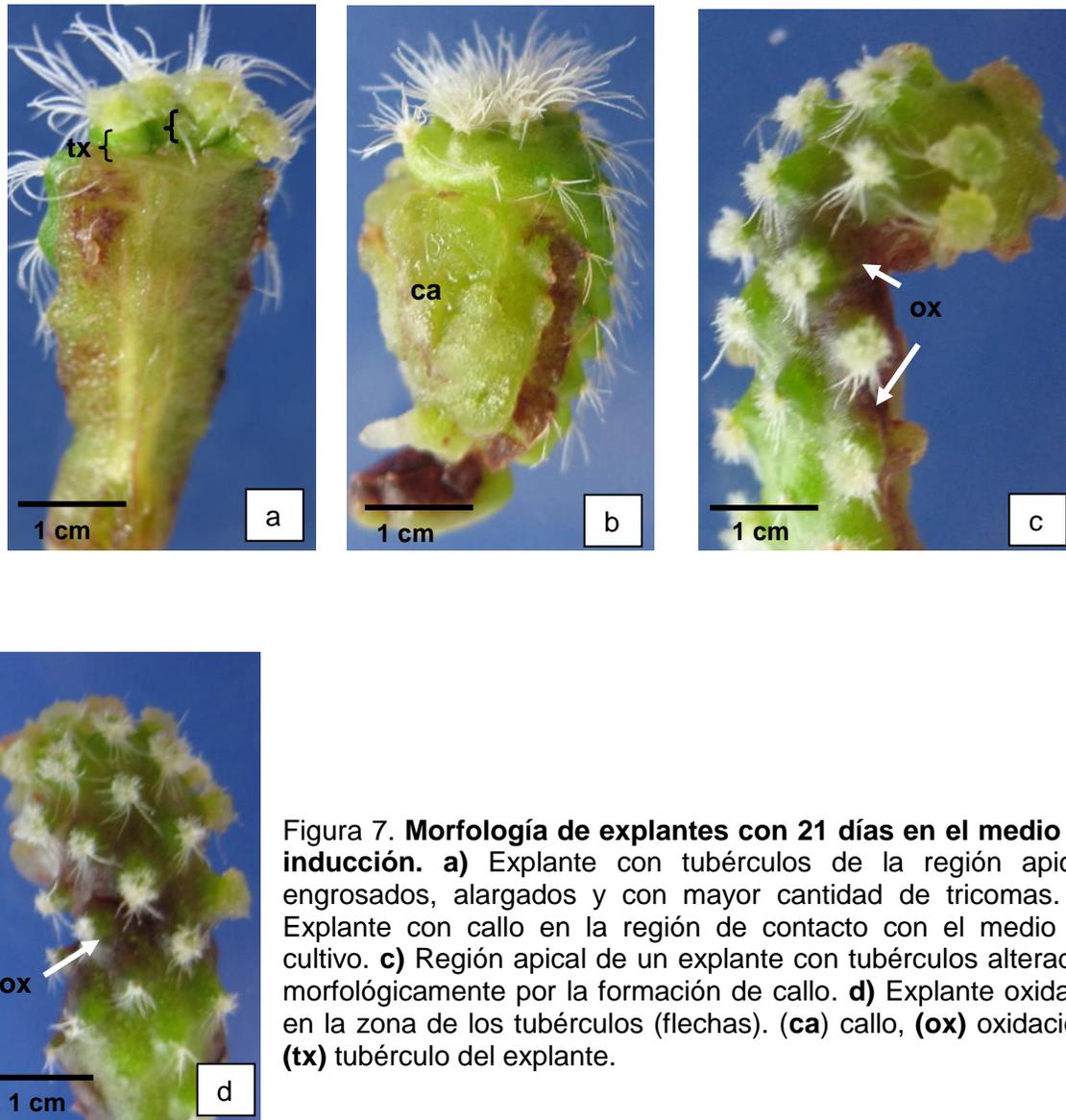


Figura 7. **Morfología de explantes con 21 días en el medio de inducción.** **a)** Explante con tubérculos de la región apical, engrosados, alargados y con mayor cantidad de tricomas. **b)** Explante con callo en la región de contacto con el medio de cultivo. **c)** Región apical de un explante con tubérculos alterados morfológicamente por la formación de callo. **d)** Explante oxidado en la zona de los tubérculos (flechas). (**ca**) callo, (**ox**) oxidación, (**tx**) tubérculo del explante.

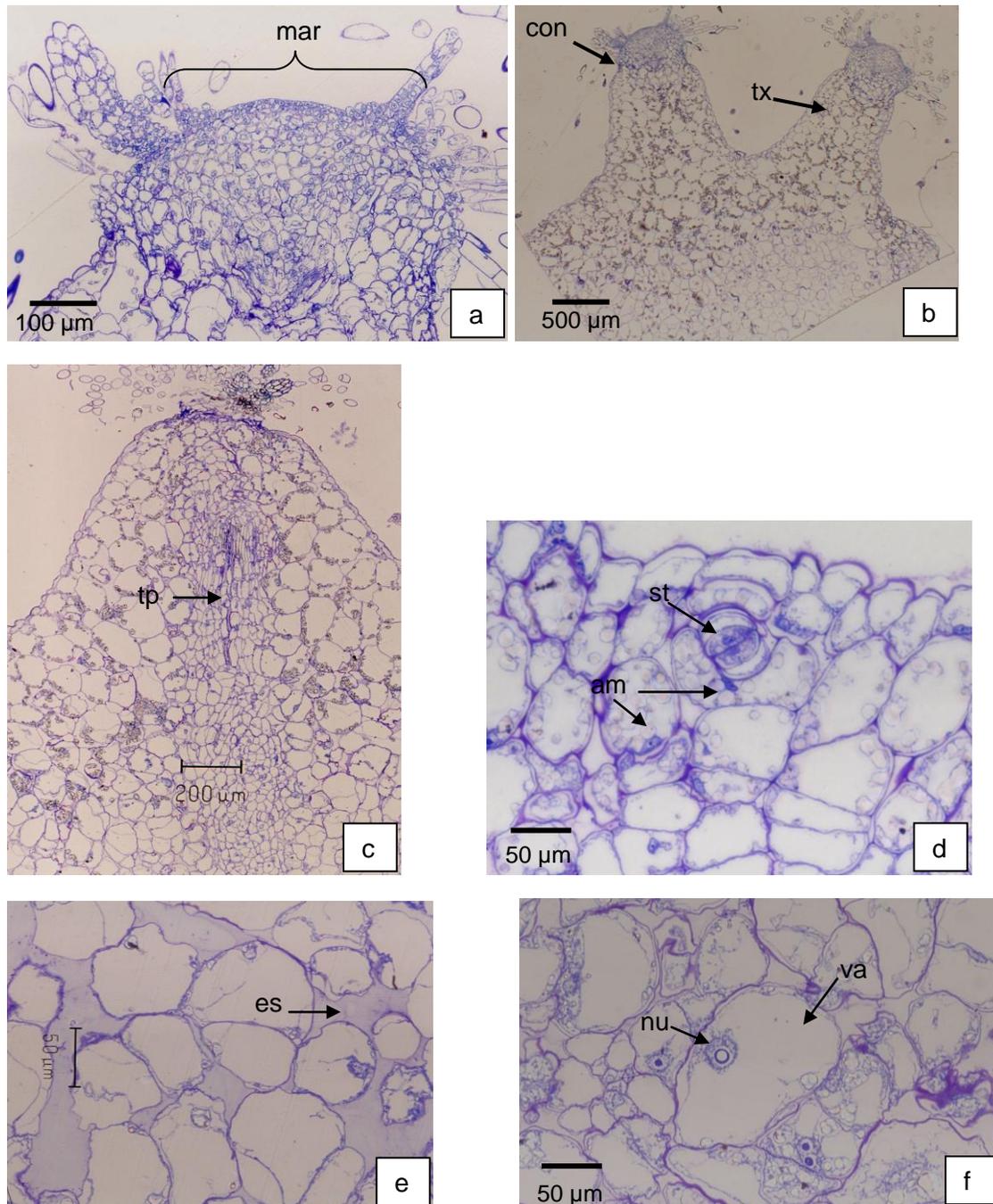


Figura 8. **Anatomía de explantes con 21 días en el medio de inducción.** **a)** Meristemo de la aréola del tubérculo mostrando el patrón típico de túnica-corpora. **b)** Constricción de la parte superior de los tubérculos. **c)** Tejido provascular en el tubérculo. **d)** Amiloplastos en el córtex. **e)** Amplios espacios intercelulares en el parénquima de la zona de contacto con el medio de cultivo. **f)** Células de callo con grandes vacuolas y núcleos excéntricos. **(am)** amiloplastos, **(con)** constricción, **(es)** espacio intercelular, **(mar)** meristemo de la aréola del tubérculo, **(nu)** núcleo, **(st)** estoma, **(tp)** tejido provascular, **(tx)** tubérculo del explante, **(va)** vacuola.

28 Días

Después de 28 días en el medio de inducción hormonal fue posible observar las respuestas morfogénicas más evidentes en los explantes. Morfológicamente se observó que estos respondieron de diversas maneras al tratamiento: formaron abundantes tricomas en el ápice de algunos de los tubérculos (Fig. 9a); formaron además callo en la zona de contacto con el medio de cultivo (Fig. 9b); únicamente regeneraron la región apical formando gran cantidad de espinas y tricomas (Fig. 9c); otros además de regenerar su ápice, formaron abundantes espinas y tricomas en las aréolas cercanas a dicha zona apical (Fig. 9d) y, por último hubo explantes que no mostraron cambios (Fig. 9e).

Anatomía y micromorfología

Los morfogénicos más importantes en la organogénesis de los explantes de *C. senilis* se produjeron a los 28 días en el medio de inducción. Durante éste tiempo, se observó el proceso por el cual se forman los brotes, y que se describe a continuación.

El meristemo de la aréola que se localiza en el ápice de cada tubérculo del explante comenzó a formar primordios foliares, pero a diferencia de lo que ocurrió en el meristemo de la aréola de la plántula del tratamiento control, estos primordios foliares no se diferenciaron en espinas, sino que se ensancharon en su base y formaron tubérculos (Fig. 10a). Además, en etapas tempranas del desarrollo de dichos tubérculos, se observó una región meristemática en posición axilar, que corresponde al meristemo de la aréola, que a su vez dio origen a primordios de espina (Fig. 10b).

Al respecto, Boke (1944) estudió el desarrollo de la hoja de *Opuntia cylindrica* y encontró que el meristemo apical forma exclusivamente primordios foliares, cuya base se ensancha para formar tubérculos y el meristemo de la aréola forma únicamente primordios de espina. Este estudio fue realizado utilizando plantas silvestres. De hecho, ésto es lo que se conoce que ocurre en las cactáceas en condiciones naturales (Boke, 1980; Mauseth, 1983a y b). Sin embargo, Mauseth (1977) encontró que en *Opuntia polyacantha* el meristemo de la aréola cultivado *in vitro* con BA es capaz de desarrollar primordios foliares y no primordios de espina como sucede sin hormonas exógenas, y que además éstos primordios foliares forman también un meristemo de la aréola que, a su vez, forma

primordios de espina. Observaciones semejantes fueron hechas en *Mammillaria coahuilensis* cultivada *in vitro* en medio MS adicionado con BA (López, 2009). Los resultados de dichos trabajos coinciden con lo observado en el presente trabajo con *C. senilis*.

Mauseth (1977) analizó la actividad mitótica de meristemos de aréola que fueron inducidos a formar primordios foliares (con BA) y de aquellos que fueron inducidos a formar primordios de espina (con giberelinas) y encontró que dicha actividad es mayor, en los que forman primordios foliares. Esto significa que la citocinina BA estimula la actividad mitótica de los primordios que se están desarrollando en tubérculos, lo cual no ocurre en los primordios que se desarrollarán en una espina. Posiblemente esto se deba a que la estructura de una espina no requiere de una intensa actividad celular ya que consiste en su mayoría de células muertas lignificadas, a diferencia del desarrollo de un tubérculo cuya base deberá ensancharse a tal grado que su meristemo axilar quede en su ápice, como se ha reportado (Boke, 1951) y como se observó en *C. senilis*.

En la axila de los primordios de tubérculo recién formados de *C. senilis* se distinguió una zona meristemática que corresponde al meristemo de la aréola, éste forma primordios de espina (Fig. 10c). Con frecuencia los primordios de espina se alinean en dos filas, una a cada lado del meristemo (Mauseth 1983b). Las espinas se consideran equivalentes morfológicos de hojas debido a que se forman a partir de una yema axilar (Boke, 1980), lo cual queda corroborado para *C. senilis* con este trabajo.

De acuerdo a Boke (1944) los primordios de espina de cactáceas creciendo en condiciones naturales son más pequeños que los primordios foliares del meristemo apical, estos resultados coinciden con lo que Mauseth (1977) observó al inducir la formación de primordios foliares y de espina con hormonas exógenas en *Opuntia polyacantha*. Y también coinciden con lo observado en este estudio con *C. senilis*.

De acuerdo con los resultados de estudios anteriores, y con base en las observaciones de este trabajo, es probable que el efecto de la citocinina BA en las cactáceas estudiadas, al estimular la actividad mitótica del meristemo de la aréola, promueve la formación de primordios foliares en vez de primordios de espinas. Por lo tanto el meristemo de la aréola de un tubérculo se convierte en el meristemo apical del brote.

En *C. senilis* el papel de las hormonas exógenas es determinante en el desarrollo de brotes en condiciones *in vitro*, puesto que se sabe que ésta especie no forma hijuelos en condiciones naturales, a menos que el ápice sea lesionado (Bravo-Hollis, 1978), lo cual es evidencia de la fuerte dominancia que ejerce el meristemo apical sobre el meristemo de las aréolas.

Conforme avanza el desarrollo de los brotes de *C. senilis*, nuevos primordios de tubérculo se forman, y los que se formaron primero, van quedando en la periferia y los más jóvenes hacia el centro. En el interior de cada tubérculo también se observa tejido vascular.

La parte apical del tubérculo del explante es la única zona involucrada en la formación del brote, y está delimitada del resto del tubérculo del explante por una constricción que comenzó a ser evidente a los 21 días en el medio de inducción y que se destaca conforme avanza el desarrollo (Fig. 10d).

Las micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido, muestran que el meristemo de la aréola del tubérculo y posterior meristemo apical del brote se localiza en un extremo del ápice de los tubérculos (Fig. 11a). Se observa también que los primordios foliares de *C. senilis* que se forman a partir de este meristemo están ensanchados en su base, e inicia la formación de los tubérculos (Fig. 11b), y que a diferencia de la base, el ápice del primordio foliar no se desarrolla, por lo que con frecuencia a esta región se le llama “hoja rudimentaria”, así lo ha reportado, Boke (1944, 1951, 1953) en otras especies de cactáceas. En *Coryphantha vivípara* la hoja rudimentaria puede medir hasta 1mm de longitud, tener tejido vascular e incluso estomas (Boke, 1951). Mientras que en *Echinocereus reichenbachii* carece de estomas y no se le han observado rastros de tejido vascular (Boke, 1953), al igual que lo observado en *C. senilis*. Se observó también que en la axila de los tubérculos jóvenes del brote se localiza el meristemo de la aréola, el cual inicialmente forma tricomas a partir de sus costados laterales, al igual que en *Mammillaria heyderi*, los tricomas son la primer estructura que forma el meristemo de la aréola y

después forma el primer primordio de espina en posición adaxial al ápice de la hoja rudimentaria (Fig. 11c) (Boke, 1953).

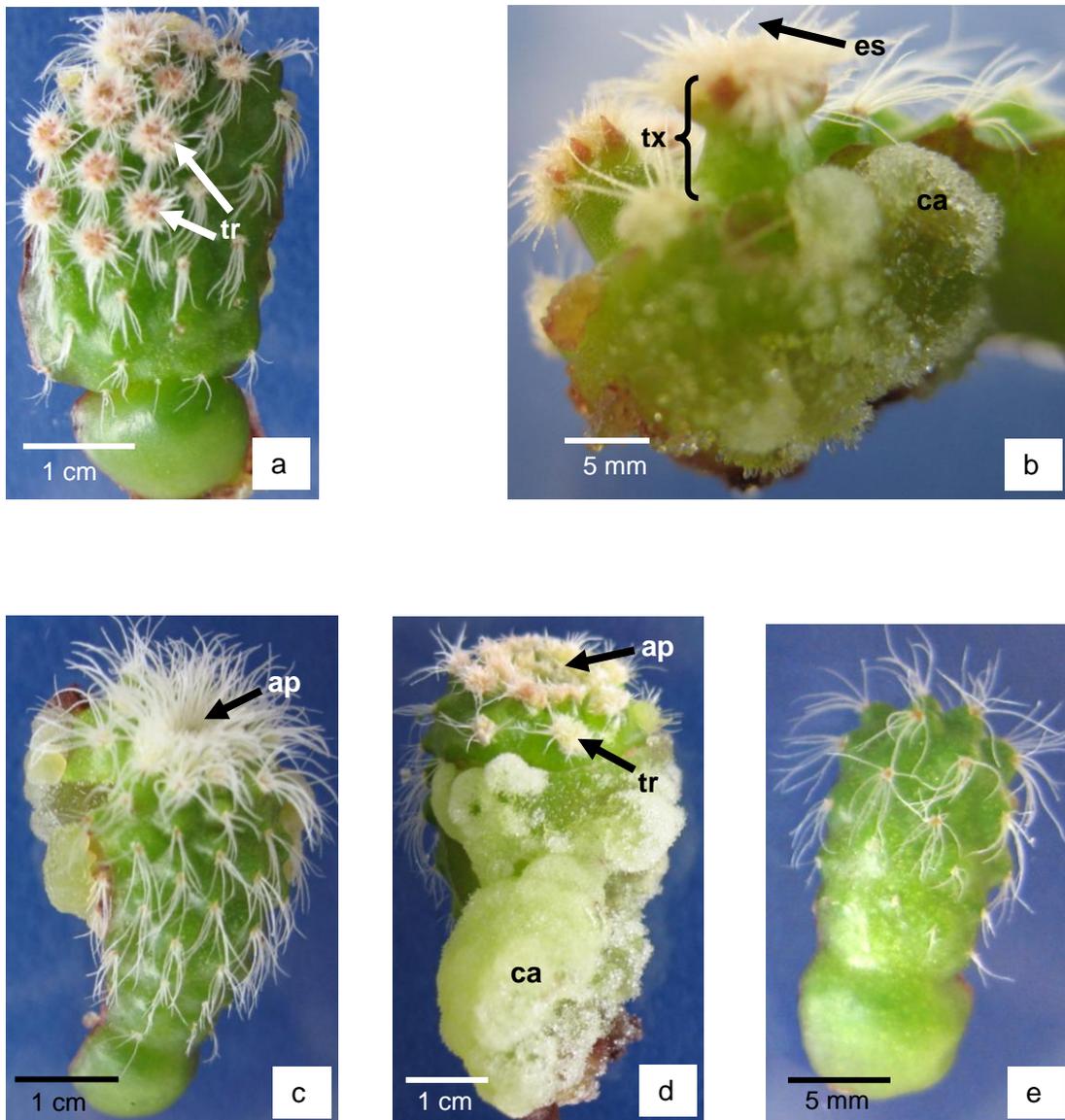


Figura 9. **Morfología de explantes con 28 días en el medio de inducción.** **a)** Explante con abundantes tricomas en el ápice de tubérculos. **b)** Explante con abundantes tricomas y espinas en el ápice de los tubérculos y además con callo en la zona que está en contacto con el medio de cultivo. **c)** Explante con regeneración completa del ápice. **d)** Explante con el ápice regenerado, y con tubérculos formando tricomas y espinas **e)** Explante sin respuesta morfogenética. (**ap**) ápice del explante, (**ar**) aréola, (**ca**) callo, (**es**) espina, (**tr**) tricoma, (**tx**) tubérculo del explante.

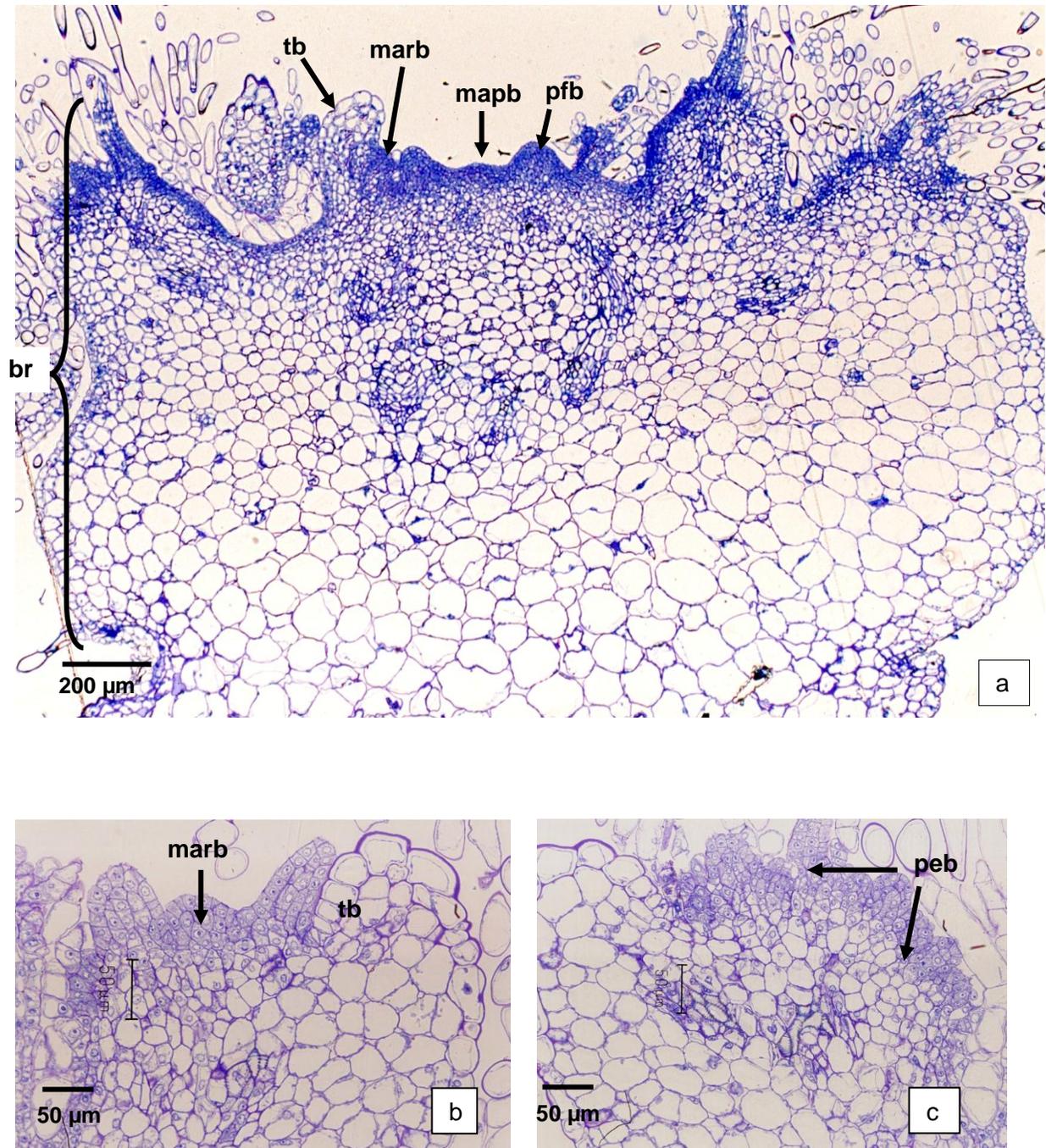


Figura 10. Anatomía del desarrollo del brote en un explante con 28 días en el medio de inducción. Desarrollo de un brote de *C. senilis*. **a)** Meristemo apical de un brote formando primordios foliares que se desarrollan en tubérculos con el meristemo de la aréola en su axila. **b)** Tubérculo del brote con su meristemo de la aréola formando dos primordios de espina. **c)** Meristemo de la aréola con primordios de espina. **(br)** brote, **(mapb)** meristemo apical del brote, **(marb)** meristemo de la aréola del brote, **(peb)** primordio de espina del brote, **(pfb)** primordio foliar del brote. **(tb)** tubérculo de brote.

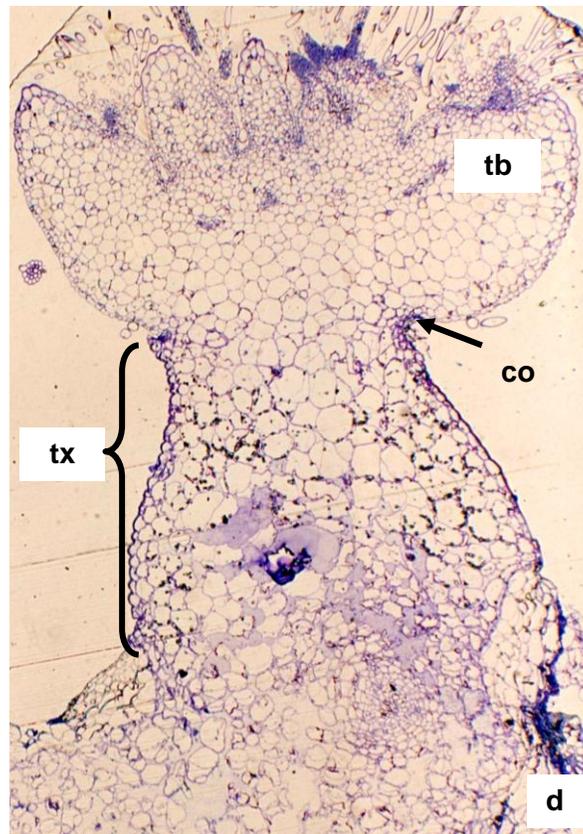


Figura 10. Anatomía del desarrollo del brote en un explante con 28 días en el medio de inducción. Desarrollo de un brote de *C. senilis*. **d)** Constricción del tubérculo del explante. **(co)** constricción, **(tb)** tubérculo de brote, **(tx)** tubérculo del explante.

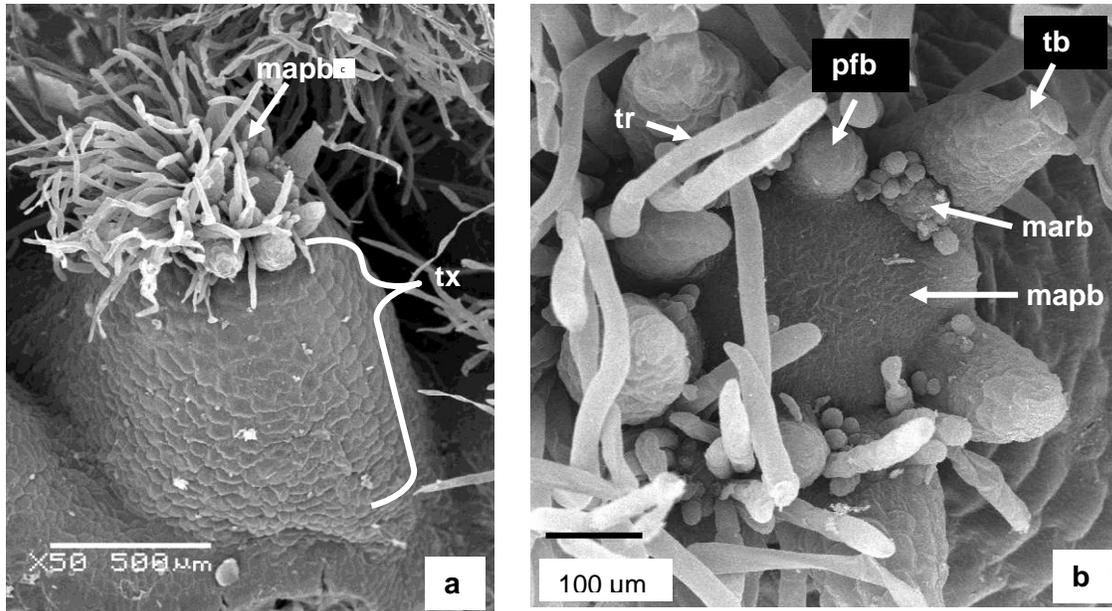


Figura 11. **Micromorfología del desarrollo del brote en un explante con 28 días en el medio de inducción. (MEB) a)** Tubérculo de un explante con el meristemo apical del brote en un extremo de su ápice. **b)** Meristemo apical del brote formando primordios foliares que se desarrollarán en tubérculos. **c)** Acercamiento de la figura b, mostrando el tubérculo con su

meristemo de la aréola formando tricomas. **(mapb)** meristemo apical del brote, **(marb)** meristemo de la aréola de un tubérculo del brote, **(pfb)** primordio foliar del brote, **(tb)** tubérculo del brote, **(tr)** tricoma, **(tx)** tubérculo del explante.

35 Días

Morfológicamente los brotes se observaron completamente desarrollados (Fig. 12a) y en la mayoría de los explantes se formaron cerca del ápice del explante (Fig. 12b). Anatómicamente se observó el inicio de la diferenciación vascular en el brote (Fig. 12c) y espinas completamente desarrolladas formadas a partir de la aréola en el ápice de los tubérculos (Fig. 12d).

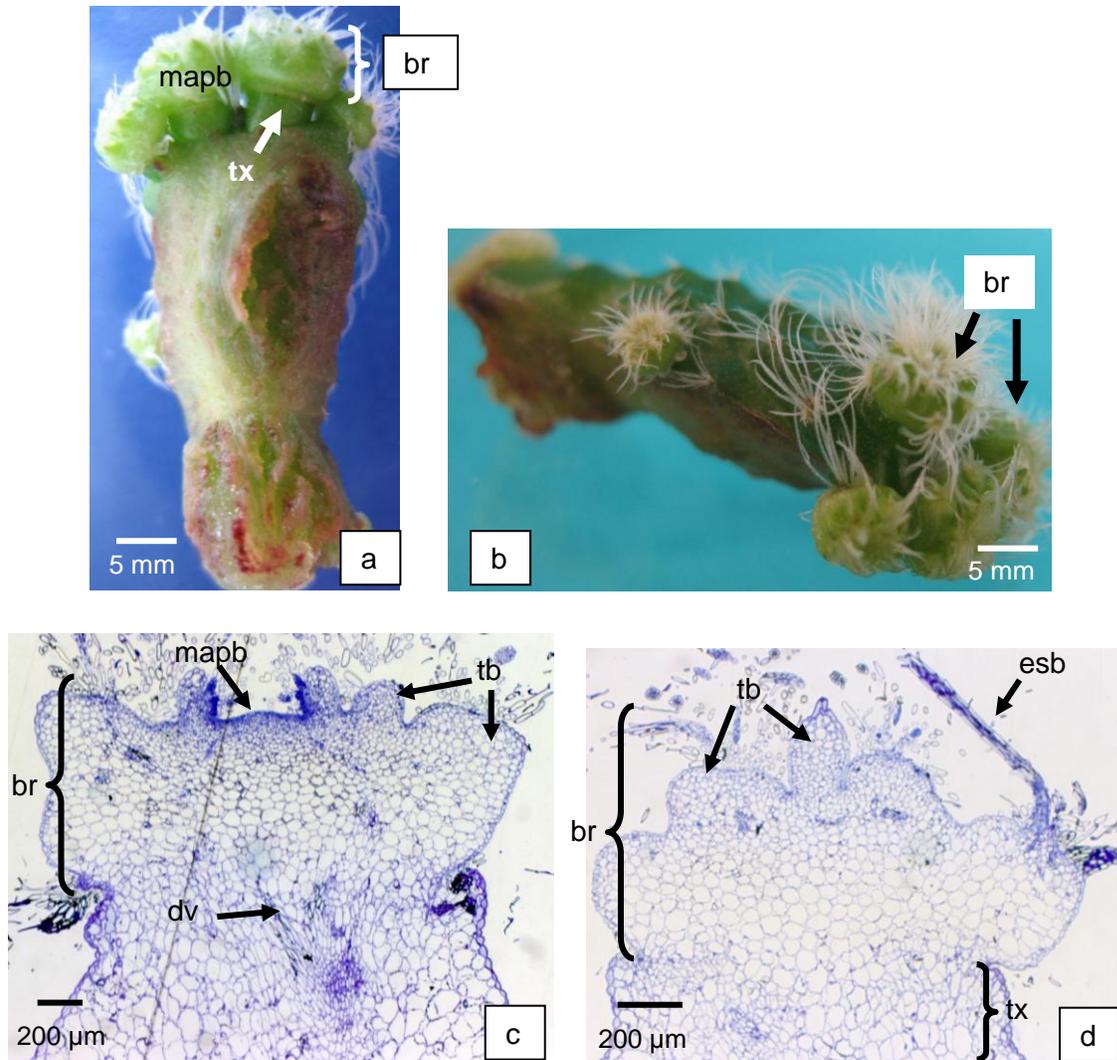


Figura 12. **Morfología del explante y anatomía de brotes después de 35 días en el medio de inducción.** a) Brotes completamente desarrollados. b) Región apical del explante con brotes. c) Diferenciación vascular del brote. d) Espinas en un tubérculo del brote (**br**) brote, (**esb**) espina del brote, (**dv**) diferenciación vascular, (**mapb**) meristemo apical del brote, (**tb**) tubérculo del brote, (**tx**) tubérculo del explante.

42 Días

En los explantes de esta edad, se observó el desarrollo de raíces. En la parte basal de dos tubérculos, a partir de los cuales se formaron dos brotes, se observó una raíz. Esta estructura se originó cuando los brotes aún se encontraban adheridos al tubérculo del explante (Fig. 13a). En el análisis micromorfológico de una de estas estructuras se observó que presenta pelos radiculares cubriendo su superficie y una cofia que recubre el ápice de la raíz (Fig. 13b). En el análisis estructural, se encontró que existe diferenciación tisular y que presenta haces vasculares, sin embargo no se logró determinar el origen de tales estructuras (Figs. 13c y d).

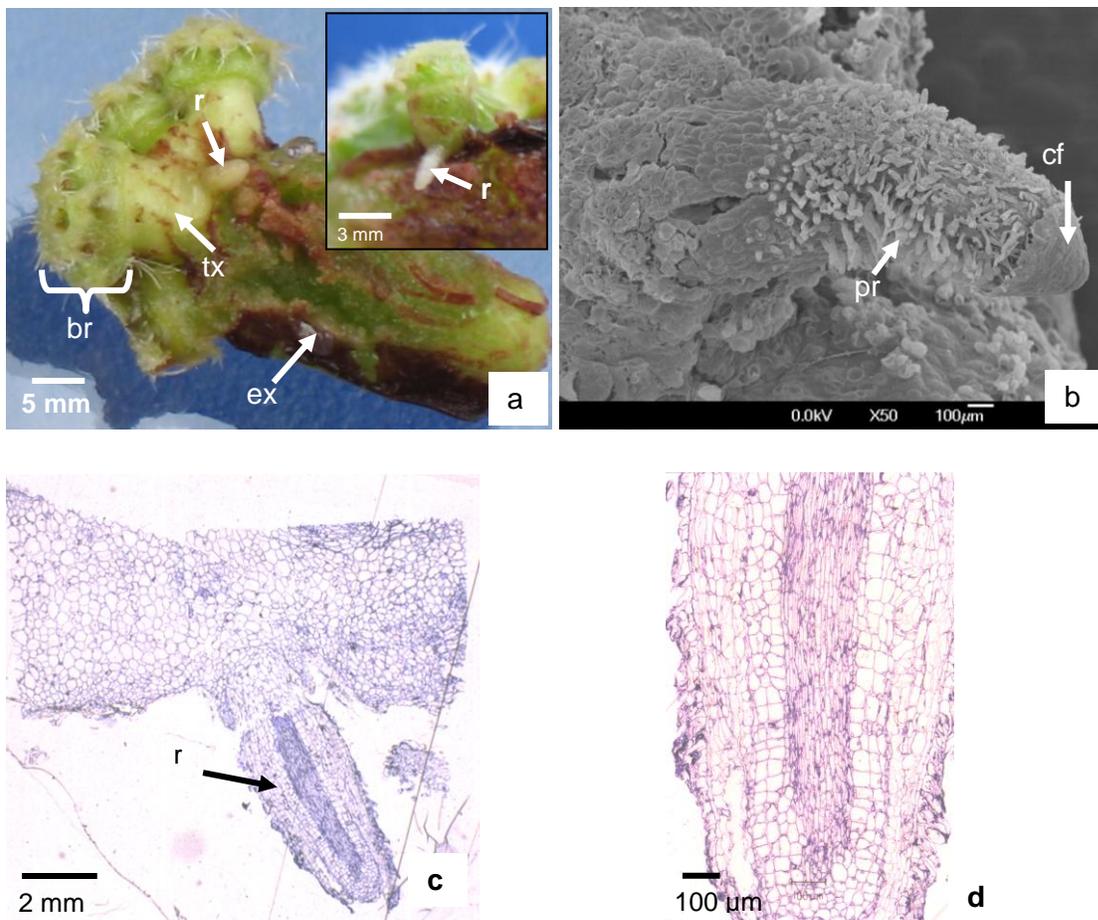


Figura 13. **Descripción de raíces en brotes regenerados *in vitro*.** a) Morfología de raíces desarrolladas *in vitro*. b) Micromorfología de la raíz, se observan pelos radiculares cubriendo la cofia. c) Estructura de la raíz. d) Detalle de la estructura de la raíz en corte longitudinal. (br) brote, (cf) cofia, (ex) explante, (r) raíz, (pr) pelos radiculares (tx) tubérculo del explante.

Ya se ha reportado la formación de raíces en cactáceas cultivadas *in vitro* sin inducción hormonal, incluso en *C. senilis* (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Flores-León y Ortíz-Montiel, 2000; Wakhlu y Bhau, 2000; Giusti *et al.*, 2002 y Tapia, 2006), sin embargo este es el primer trabajo en donde se describe la estructura de una raíz que se ha formado *in vitro* en cactáceas, para corroborar que su estructura es similar a la de una raíz formada *ex vitro*.

Por otra parte, después de 42 días en el medio de inducción, el meristemo apical de los brotes continuó formando primordios foliares cuya base se ensancha y forma a los tubérculos (Fig. 14a). En la axila de dichos primordios foliares se desarrolla el meristemo de la aréola, de donde se forman primordios de espina (Fig. 14b). También se observó la continua diferenciación de tejido vascular en el brote que se conecta con el sistema vascular del tubérculo del explante (Fig. 14c), al igual que lo reportado por López (2009) para *Mammillaria coahuilensis*. Así mismo, se observaron estomas en la epidermis de algunos tubérculos de los brotes (Fig. 14d), igualmente de tipo paracítico y estructuralmente iguales a los que se observaron en la plántula del tratamiento control.

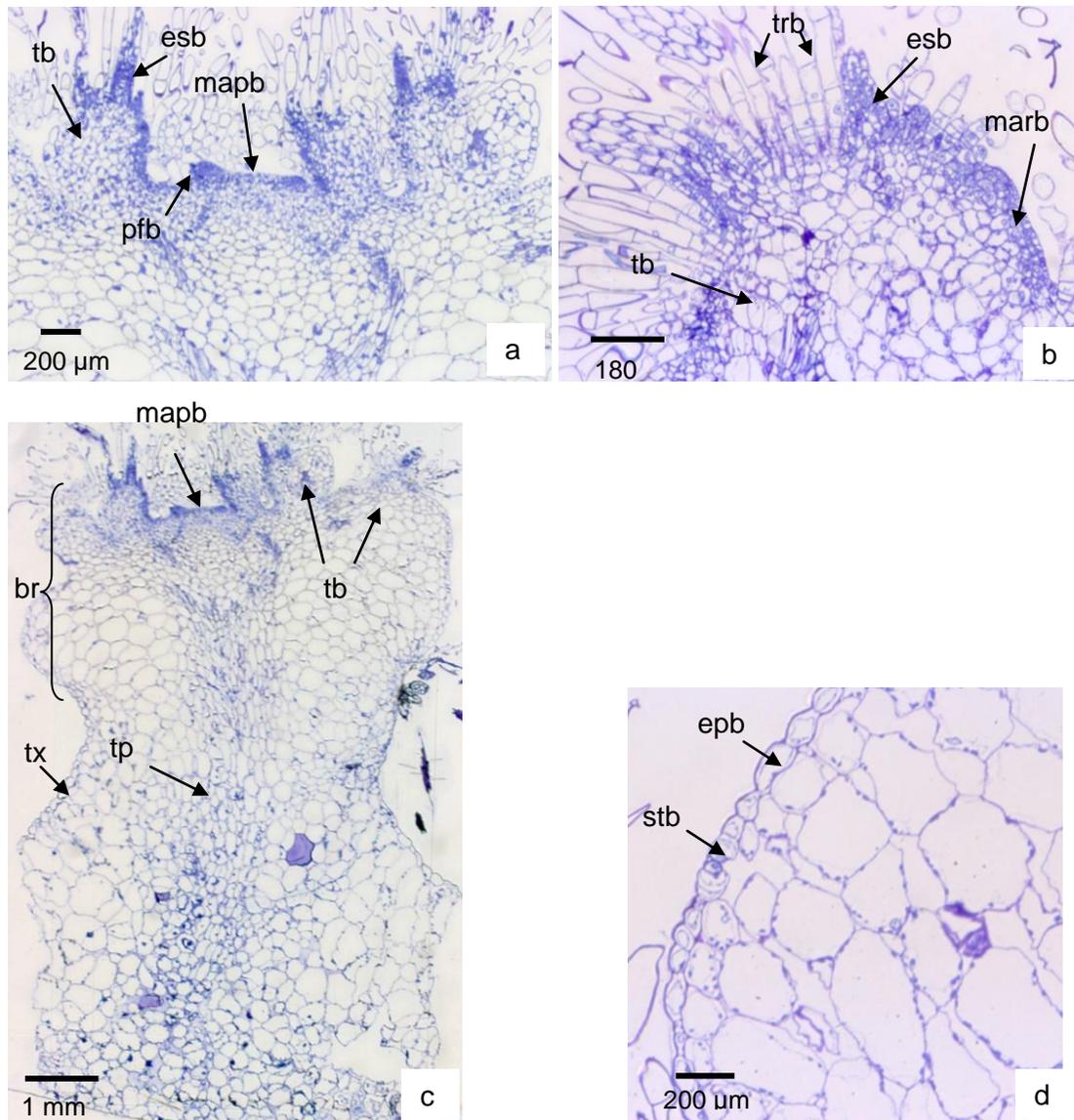


Figura 14. **Anatomía de brotes de explantes con 42 días en el medio de inducción.** **a)** Parte apical de un brote. **b)** Porción de un tubérculo de brote con su meristemo de la aréola. **c)** Formación de tejido provascular de un brote y del tubérculo del explante donde se localiza. **d)** Estoma en la epidermis de un tubérculo de brote. **(br)** brote, **(esb)** espina del brote, **(epb)** epidermis del brote, **(mapb)** meristemo apical del brote, **(marb)** meristemo de la aréola del brote, **(pfb)** primordio foliar del brote, **(stb)** estoma del brote, **(tb)** tubérculo del brote, **(tp)** tejido provascular, **(trb)** tricoma del brote, **(tx)** tubérculo del explante.

A lo largo de las observaciones de este trabajo, se encontró que en todo el explante la única zona involucrada en la formación de brotes de *C. senilis* es el meristemo de la aréola. Sin embargo es importante considerar que durante los primeros 14 días de inducción hormonal se detectó la formación de meristemoides, los cuales posiblemente podrían originar brotes mediante organogénesis indirecta con un adecuado tratamiento hormonal. Existen varios trabajos sobre la formación de brotes mediante organogénesis indirecta en cactáceas (Kolář *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1995 y de Medeiros *et al.*, 2006), que si bien, en ninguno se realizaron estudios histológicos, es probable que dichos brotes se originen a partir de meristemoides, como lo reportaron Poljuha *et al.* (2003) en *Mammillaria gracilis*.

Un brote se forma porque el meristemo de la aréola da origen a primordios foliares con un meristemo axilar. Los primordios foliares se diferencian en tubérculos y el meristemo axilar forma primordios de espina. Probablemente a esto se refieren los autores que reportan la formación de brotes en cactáceas por “activación areolar” (Dabekaussen *et al.*, 1991; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002; Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

Esta nueva actividad del meristemo, no sólo se evidencia estructuralmente, sino también fisiológicamente, puesto que después de 42 días en cultivo con BA, se observaron raíces. Al respecto se sabe que las auxinas inducen la formación de raíces adventicias, y que estas hormonas se secretan en el ápice de la planta manteniendo la dominancia apical, además de que también promueven la diferenciación del tejido vascular (Raven *et al.*, 1992), entonces es probable que una vez que se desarrolló el ápice del brote, las auxinas endógenas sintetizadas en esta zona inducen la formación de las raíces al igual que promueven la diferenciación de tejido vascular del brote.

CONCLUSIONES

- La organogénesis directa es la respuesta morfogenética por la cual se producen los brotes de *Cephalocereus senilis* a partir de explantes longitudinales cultivados *in vitro* con la hormona BA.
- Los brotes de *Cephalocereus senilis* se forman a partir del meristemo de la aréola, que se localiza en el ápice de los tubérculos
- La inducción con BA, tiene el efecto de cambiar el destino de los meristemas que forman los primordios foliares en la aréola. Sin la hormona éstos se diferencian en espinas y en presencia de la hormona éstos se diferencian en tubérculos.
- La organogénesis indirecta puede ser una vía alterna para la propagación de *Cephalocereus senilis*, puesto que durante el cultivo *in vitro* de dicha especie se forman meristemoides.

LITERATURA CITADA

- Arias, M. S.** 1997. Distribución general. En: CONABIO-SEMARNAP-PROFEPA-UNAM-Centro Universitario de Comunicación de la Ciencia (eds.). *Suculentas Mexicanas. Cactáceas*. CVS Publicaciones S. A. de C. V. México D. F. 17-25p
- Arias, S., U. Guzmán, M. Mandujano, M. Soto-Galván y J. Golubov.** 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 50(4):100-125.
- Ault, J. R. y W. J. Blackmon.** 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HortScience* 22(1): 126-127.
- Boke, N. H.** 1941. Zonation in the shoot apices of *Trichocereus spachianus* and *Opuntia cylindrica*. *American Journal of Botany* 28: 656-664.
- Boke, N. H.** 1944. Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. *American Journal of Botany* 31(6):299-316.
- Boke, N. H.** 1951. Histogenesis of the vegetative shoot in *Echinocereus*. *American Journal of Botany* 38:23-38.
- Boke, N. H.** 1952. Leaf and areole development in *Coryphantha*. *American Journal of Botany* 39:134-145.
- Boke, N. H.** 1953. Tubercle development in *Mammillaria heyderi*. *American Journal of Botany* 40: 239-247.
- Boke, N. H.** 1957. Comparative histogenesis of the areoles in *Homalocephala* and *Echinocactus*. *American Journal of Botany* 44: 368-380.
- Boke, N. H.** 1958. Areole histogenesis in *Mammillaria lasiacantha*. *American Journal of Botany* 45: 473-479.
- Boke, N. H.** 1980. Developmental Morphology and Anatomy in Cactaceae. *BioScience* 30 (9): 605-610.
- Bravo-Hollis, H.** 1978. Las cactáceas de México. UNAM. México. 743p.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar.** 1999. El interesante mundo de las cactáceas. UNAM. Mexico. 548 p.
- Castro-Gallo, I. A., E. Meza-Rangel, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch.** 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae* 4 (2):5-23.
- Challenger, A.** 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. CONABIO. México. 847p.
- Collin, H. A. y G. S. Edwards.** 1998. *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers. Inglaterra. 157p.
- CONANP-Dirección General de Manejo para la Conservación.** 2003. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán. CONANP. México. 202p.
- Dabekaussen, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. van der Laken y J. Hoek-Spaans.** 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. *Scientia Horticulturae* 46: 283-294.
- Dávila-Aranda, P., S. Arias-Montes, R. Lira-Saade, J. L. Villaseñor y A. Valiente-Banuet.** 2002. Phytogeography of the Columnar Cacti (Tribe Pachycereeae) in Mexico: A Cladistic Approach. En: Fleming, T. H. y A. Valiente-Banuet.(eds.)

Columnar Cacti and Their Mutualists. Evolution, Ecology and Conservation. The University of Arizona Press. 25-41pp.

- Dávila-Figueroa, C. A., M. De la Rosa-Carrillo y E. Pérez-Molphe-Balch.** 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology* 41: 540-545.
- Debergh, P. C. y P. E. Read.** 1991. Micropropagation. En: Debergh P. C. y R. H. Zimmerman. (eds.) Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Nueva Zelanda. 1-13 pp.
- De Medeiros, L. A., R. C. S. de Ribeiro, L. A. Gallo, E. T. Oliveira y M. E. S. P. Demattê.** 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus Magnificus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84:165-169.
- Doemer, P.** 2003. Plant Meristems: A Merry-Go-Round of Signals. *Current Biology* 13:R368-R374.
- Doemer, P.** 2006. Plant Meristems: What you see is what you get?. *Current Biology* 16(2):R56-R58.
- Escobar, A. H. A., V. M. Villalobos y A. Villegas.** 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 7: 269-277.
- Evans, N. E.** 1990. Micropropagation. En: Pollard, J. W. y J. M. Walker (eds.) Methods in Molecular Biology, Vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey. 93-102 pp.
- Evert, R. F.** 2006. Esau's Plant Anatomy. Wiley-Interscience. Estados Unidos. 601 p.
- Fay, M. F. y J. Gratton.** 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.
- Flinn, B. S., D. T. Webb y W. Newcomb.** 1989. Morphometric analysis of reserve substances and ultrastructural changes during caulogenic determination and loss of competence of Eastern White pine (*Pinus strobus*) cotyledons *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*. 66: 1556-1565.
- Flores-León, R. y G. Ortiz-Montiel.** 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer through areole activation of etiolated plants. *Haseltonia* 7:92-96.
- García-Saucedo, P. A., M. Valdez-Morales, M. Valverde, A. Cruz-Hernández y O. Paredes-López.** 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 80: 215-219.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. A. Thorpe.** 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Development Biology* 32:272-289.
- Gaspar, T., T. Franck, B. Bisbis, C. Kevers, L. Jouve, J.F. Hausman y J. Dommes.** 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37:263-285.
- Gibson, A. C. y P. S. Nobel.** 1986. The Cactus Primer. Harvard University Press. Londres, Inglaterra. 286p.
- Giusti, P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci.** 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 1790: 1-14.
- Gratton, J. y M. F. Fay.** 1990. Vegetative propagation of cacti and other succulents *in vitro*. En: Pollard J. W. y J. M. Walker. (eds.) Methods in Molecular Biology, Vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey, E.U 219-225pp.

- Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila.** 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM-CONABIO. México. 315p.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies y R. L. Geneve.** 1997. Plant Propagation: principles and practices. Prentice Hall. New Jersey, E.U. 770 pp.
- Hernández, H. M. y H. Godínez.** 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- Infante, R.** 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 31:155-159.
- IUCN-International Union for Conservation of Nature.** 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2009.2. www.iucnredlist.org. 05-Noviembre-2009.
- Jiménez-González, E.** 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez-Ponce J. (ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 13-24pp.
- Johnson, J. L. y E. R. Emino.** 1979. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience* 14(5):605-606.
- Joy-IV, R. W. y T. A. Thorpe.** 1999. Shoot Morphogenesis: Structure, physiology, biochemistry and molecular biology. En: Soh, W. y S. S. Bhojwani. (eds.). Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. Nueva Zelanda. 171-214 pp.
- Kalilian-Fakhrai, H. y F. Fakhrai.** 1990. Hormonal control of growth and development. En: Pollard J. W. y J. M. Walker. (eds.) Methods in Molecular Biology, Vol 6, Plant Cell and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey. 49-56 pp.
- Khalafalla, M. M., E. Abdellatef, M. M. Mohameed-Ahmed y M. G. Osman.** 2007. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semiarid regions. *International Journal of Sustainable Crop Production* 2(4):1-8.
- Kolář, Z. J. Bártek y B. Vyskot.** 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue cultures. *Experientia* 15(5):668-669.
- Hicks, G. S.** 1994. Shoot induction and organogenesis *in vitro* a developmental perspective. *In vitro cell development Biology* 30:10-15.
- Lazarte, J. E., M. S. Gaiser y O. R. Brown.** 1982. *In vitro* propagation of *Epiphyllum chrysocardium*. *HortScience* 17(1):84.
- Licona-Sánchez, O., L. P. Olguín-Santos y J. Márquez-Guzmán.** 2004. Ontogenia de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria crucigera* Martius (Cactaceae). Memorias del XVI Congreso Mexicano de Botánica. Oaxaca, México.
- López, E. A. L.** 2000. Organogénesis *in vitro* y adquisición de la competencia morfogénica a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana*, Martínez (Gymnospermae) especie en peligro de extinción. Doctor en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias-UNAM. México.
- López, H. A.** 2009. Origen y desarrollo de los brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed) Moran (Cactaceae) especie Amenazada del estado de Coahuila. Tesis Licenciatura, Biólogo. Facultad de Ciencias-UNAM. México. 65p.
- López, M., J. Márquez y G. Murguía.** 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Facultad de Ciencias-UNAM. 178p.

- Machado, M. F. P. S. y A. J. Prioli.** 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) by areole activation. *In vitro Cell Development Biology* 32:199-203.
- Malda, G., H. Suzán y R. Backhaus.** 1999. *In vitro* culture as a potencial method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81:71-87.
- Martínez-Vázquez, O. y A. Rubluo.** 1989. *In-vitro* mass propagation of the near-extint *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Science* 64(1):99-105.
- Mata-Rosas, M., M. A. Monroy-de la Rosa, K. Moebius.Goldammer y V. M. Chávez-Ávila.** 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cell Development Biology* 37: 400-404.
- Mauseth, J. D.** 1977. Cytokinin-and Gibberellic acid-induced effects on the determination and morphogenesis of leaf primordial in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 64 (3): 337-346.
- Mauseth, J. D.** 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus and Succulent Journal* 51: 186-187.
- Mauseth, J. D.** 1983a. Introduction to cactus anatomy. Part 2. Ápical Meristems. *Cactus and Succulent Journal* 55: 18-42.
- Mauseth, J. D.** 1983b. Introduction to cactus anatomy. Part 6. Areoles and spines. *Cactus and Succulent Journal* 55: 272-276.
- Mauseth, J. D.** 2004. Giant shoot apical meristem in cacti have ordinary leaf primordia but altered phyllotaxy and shoot diameter. *Annals of Botany* 94:145-153.
- Moebius-Goldammer, K. G., M. Mata-Rosas y V. M. Chávez-Ávila.** 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cell Development Biology* 39:388-393.
- Mohamed-Yasseen, Y.** 1994. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus*) Britt. et Rose). *HortScience* 29(5): 238.
- Mohamed-Yasseen, Y.** 2002. Micropropagation of Pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). *In Vitro Cell Development Biology* 38:427-429.
- Murashige, T. y F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-479.
- Nava-Esparza, V. C. y L. Yáñez.** 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 29:3-7.
- Oliveira, S. A., M. F. P. S. Machado, A. J. Prioli y C. A. Mangolin.** 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Society for In Vitro Biology* 31:47-50.
- Orellana-Pérez, P. A.** 1998. Introducción a la propagación masiva En: Pérez-Ponce J. (ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 125-133 pp.
- Pelah, D., R. A. Kaushik, Y. Mizrahi y Y. Sitrit.** 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71:81-84.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, E. Villalobos-Amador, E. Meza-Rangel, L. Morones-Ruíz y H. J. Lizalde-Viramontes.** 1998. Micropropagation of 21

- species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell Development Biology* 34:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch, E. y C. A. Dávila-Figueroa.** 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology* 38:73-78.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. E. Pérez-Reyes, C. A. Dávila-Figueroa y E. Villalobos-Amador.** 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *HortScience* 37(4):693-696.
- Pérez-Ponce, J. N.** 1998. Mutagénesis *in vitro*. En: Pérez-Ponce J. N. (ed.) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 297-324pp.
- Poljuha, D., B. Balen, A. Bauer, N. Ljubešić y M. Krsnik-Rasol.** 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 75:117-123.
- Pospíšilová, J., I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel y Š. Plzánková.** 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4):481-497pp.
- Preece, J. E. y E. G. Sutter.** 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C. y R. H. Zimmerman (eds.) Micropropagation. Technology and Application. Kluwer Academic Publisher. Netherlands 71-93pp.
- Ramirez-Malagón, R., I. Aguilar-Ramirez, A. Borodanenko, L. Perez-Moreno, J. L. Barrera-Guerra, H. G. Nuñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo.** 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology* 43:660-665.
- Raven, P. H., R. F. Evert y S. E. Eichhorn.** 1992. Biología de las Plantas. Reverté. Barcelona, España. 773pp.
- Retes-Pruneda, J. L., M. Valadez-Aguilar, M. E. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch.** 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81:9-16.
- Rubluo, A.** 1997. Micropropagation of *Mammillaria* species (Cactaceae). En Y. P. S. Bajaj (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag. Berlin. 40:193-205.
- Rubluo, A., T. Marín-Hernández, K. Duval, A. Vargas y J. Márquez-Guzmán.** 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 95:341-349.
- Rzedowski, J.** 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En: Ramamoorthy T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) Diversidad biológica de México: Orígenes y Distribución. Instituto de Biología, UNAM. 129-145pp.
- Santos-Díaz, M., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. Santos-Díaz.** 2003. *In vitro* organogénesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cell Development Biology* 39:480-484.
- SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.** 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, Protección Ambiental-Especies nativas de

México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de Especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. México D. F.

- SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.** 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de Especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*. 6 marzo. México D. F.: 1-85pp.
- Smith, R. H., P. J. Burdick, J. Anthony y A. A. Reilley.** 1991. *In vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. *HortScience* 26(3): 315.
- Soria, C. D.** 2006. Establecimiento y propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana* Ehrenberg subsp. *Schiedeana* (Cactaceae), especie amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Tesis Licenciatura, Biólogo. Universidad Veracruzana. 74pp.
- Soh, W. y S. S. Bhojwani.** 1999. Morphogenesis in plant tissue cultures. Kluwer Academic Publishers. Nueva Zelanda. 520 pp.
- Sriskandarajah, S. y M. Serek.** 2004. Regeneration from phylloclade explants and callus cultures of *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 78:75-81.
- Starling, R.** 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cactus and Succulent Journal* 57: 114-115.
- Sussex, I. M. y N. M. Kerk.** 2002. The organization and function of plant meristems. En: McManus M. T. y B. E. Veit (eds.) *Meristematic Tissues in Plant Growth and Development*. Sheffield Academic Press. Inglaterra. 1-15pp.
- Tapia, D. M.** 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis Licenciatura, Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 81p.
- Téllez-Román, J., H. A. Zavaleta-Mancera, M. G. C. López-Peralta y M. Livera-Muñoz.** 2008. Histología de brotes de *Mammillaria plumosa* Weber desarrollados *in vitro*. Congreso Nacional de Histología, México, D. F.
- Vázquez-Sánchez, M., T. Terrazas y S. Arias.** 2005. Morfología y anatomía del cefalio de *Cephalocereus senilis* (Cactaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 62(2): 153-161.
- Velázquez-Enciso, L. E. y R. Soltero-Quintana.** 2001. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Eng.) Weber ex Britton et Rose. var. *micromeris*, Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46(3):56-62.
- Villavicencio-Gutiérrez, E. E., A. Villegas-Monter, G. Arellano-Ostoa y J. Vargas-Hernández.** 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 44(2):56-62.
- 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* 39:1-42.
- Vyskot, B. y Z. Jára.** 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 59(3): 449-452.

- Wakhlou A. K. y B. S. Bhau.** 2000. Callus formation and plant regeneration from tubercles of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *In Vitro Cell Development Biology* 36:211-214.
- Wyka, T. P., 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* 87:27-32.
- Ziv, M.** 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: Debergh, P. C. y R. H. Zimmerman (eds.) *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. 45-69pp.

ANEXO1. Trabajos sobre micropropagación de Cactáceas

ORGANOGENESIS DIRECTA

Especie	Hormona (mg L ⁻¹)	Tipo de explante	Referencia
SUBFAMILIA OPUNTIOIDEAE			
<i>Opuntia amyclaea</i>	BA (n. m)	Segmentos de plantas desarrolladas ex vitro	Escobar <i>et al.</i> , 1986
<i>Opuntia spp</i>	BA (0.1)	Segmentos de plantas desarrolladas ex vitro	Garcia-Saucedo <i>et al.</i> , 2005
<i>Opuntia ficus-indica</i>	BA (5)	Segmentos de plantas desarrolladas ex vitro	Khalafalla <i>et al.</i> , 2007
SUBFAMILIA CACTOIDEAE			
<i>Epiphyllum chrysocardium</i>	ANA (0.1) +BA (1)	Segmentos de plantas desarrolladas ex vitro	Lazarte <i>et al.</i> , 1981
<i>Mammillaria carmenae</i> <i>Mammillaria prolifera</i> <i>Astrophytum myriostigma</i> <i>Trichocereus spachianus</i>	BA (2) + ANA (1) BA (0.5-1) +ANA (0.5- 1) AIA (5) +K (0.5) AIA (5) +K (0.5)	Segmentos de plantas desarrolladas ex vitro	Vyskot y Jára, 1984
<i>Leuchtenbergia principis</i>	BA (10) +ANA (0.1)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Starling, 1985
<i>Ferocactus acanthodes</i>	K (10) +ANA (1)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Ault y Blackmon, 1987
<i>Mammillaria san-angelensis</i>	BA (0.1) y/o +ANA (0.01) BA (1) y/o +ANA (0.01)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Martínez-Vazquez y Rubluo, 1989
<i>Sulcorebutia alba</i>	BA (0.25)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Dabekaussen <i>et al.</i> , 1991
<i>Hylocereus undatus</i>	TDZ/ ANA (en varias combinaciones)	Segmentos de brotes regenerados <i>in vitro</i>	Mohamed-Yasseen, 1994
<i>Cereus peruvianus</i>	BA (1) ANA (1)	Segmentos de brotes regenerados <i>in vitro</i>	Machado y Prioli, 1996
<i>Astrophytum myriostigma</i> <i>Cephalocereus senilis</i> <i>Coryphantha clavata</i> <i>Coryphantha durangensis</i> <i>Coryphantha radians</i>	BA (1)+ ANA (0.01) BA (1)+ ANA (0.01) BA (1) BA (1)+ ANA (0.01) BA (1)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i> o del tallo de plantas desarrolladas ex vitro	Pérez-Mophe-Balch <i>et al.</i> , 1998

<i>Echinocactus platyacanthus</i>	BA (1)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i> o del tallo de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Pérez-Mophe-Balch <i>et al.</i> , 1998
<i>Echinocereus dubius</i>	BA (1)+ ANA (0.01)		
<i>Echinocereus pectinatus</i>	BA (1)+ANA (0.01)		
<i>Echinofossulocactus sp.</i>	BA (1)		
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	BA (1)+ ANA (0.1)		
<i>Ferocactus histrix</i>	BA (1)+ ANA (0.01)		
<i>Ferocactus latispinus</i>	BA (1)+ ANA (0.01)		
<i>Ferocactus pilosus</i>	BA (1)+ ANA (0.1)		
<i>Mammillaria candida</i>	BA (1)+ ANA (0.1)		
<i>Mammillaria craigii</i>	BA (1)		
<i>Mammillaria formosa</i>	BA (1)		
<i>Mammillaria obscura</i>	BA (1)+ ANA (0.1)		
<i>Mammillaria sphacelata</i>	BA (1)+ ANA (0.1)		
<i>Mammillaria uncinata</i>	BA (1)+ ANA (0.01)		
<i>Nyctocereus serpentinus</i>	BA (1)		
<i>Stenocactus coptonogonus</i>	BA (2)		
<i>Cephalocereus senilis</i>	BA (10)	Segmentos de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000
<i>Pelecyphora aselliformis</i> y <i>P. strobiliformis</i>	BA (2)	Secciones de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002
<i>Acharagma aguirreana</i>	BA (1)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Castro-Gallo <i>et al.</i> , 2002
<i>Astrophytum ornatum</i>	BA (2)		
<i>Coryphantha elephantidens</i>	BA (3)+ANA (0.1)		
<i>Ferocactus flavovirens</i>	2iP (4)		
<i>Mammillaria bocasana</i>	BA (2)+ ATIB (2)		
<i>Mammillaria oteroi</i>	BA (2)		
<i>Pachycereus schotii</i>	BA (3)		
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	BA (2)		
<i>Stenocereus stellatus</i>	BA (1)		
<i>Thelocactus hexaedophorus</i>	2iP (6)		
<i>Escobaria minima</i>	BA (5)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Giusti <i>et al.</i> , 2002
<i>Mammillaria pectinifera</i>	BA (5)		
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	K (5)		
<i>Carnegiea gigantea</i>	BA (2)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 2002
<i>Pachycereus pringlei</i>	BA (1)		
<i>Stenocereus thurberi</i>	BA (1)		

<i>Mammillaria san-angelensis</i> *	AIA (6)	Segmentos de brotes regenerados <i>in vitro</i>	Rubluo <i>et al.</i> , 2002
<i>Hylocereus undatus</i>	ANA (0.1)+TDZ (0.1)	Segmentos de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Mohamed-Yasseen, 2002
<i>Pelecyphora aselliformis</i>	BA (1.81)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Santos-Díaz <i>et al.</i> , 2003
<i>Mammillaria crucigera</i>	BA (0.5)	Segmentos de brotes regenerados <i>in vitro</i>	Licona-Sánchez, 2004
<i>Schlumbergera</i> *y <i>Rhipsalidopsis</i> *	BA, TDZ y Z (6)	Segmentos de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Sriskandarajah y Serek, 2004
<i>Turbincarpus laui</i> <i>Turbincarpus</i> <i>lophophorooides</i> <i>Turbincarpus</i> <i>pseudopectinatus</i> <i>Turbincarpus</i> <i>schmiedickeanus</i> subsp. <i>flaviflorus</i> <i>Turbincarpus</i> <i>schmiedickeanus</i> subsp <i>klinkerianus</i> <i>Turbincarpus</i> <i>schmiedickeanus</i> subsp. <i>schmiedickeanus</i> <i>Turbincarpus subterraneus</i> <i>Turbincarpus valdezianus</i>	BA (1) BA (2) BA (0.75) 2iP (3) 2iP (5) BA (2) BA (1) BA (0.5) o 2iP (3)	Segmentos de brotes regenerados <i>in vitro</i>	Dávila-Figueroa <i>et al.</i> , 2005

<i>Mammillaria bocasana</i> *	K (10)	Segmentos de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2007
<i>Mammillaria densispina</i> *	AIA (2)+ K (6)		
<i>Mammillaria hahniana</i>	AIA (4)+ K (10)		
<i>Mammillaria hutchisoniana</i>	K (10)		
<i>Mammillaria orcutii</i>	K (10)		
<i>Mammillaria pectinifera</i> *	AIA (4)+ K(6)		
<i>Mammillaria perbella</i> *	AIA (1)+ K (10)		
<i>Mammillaria picta</i> *	AIA (2)+ K (10)		
<i>Mammillaria rhodantha</i>	K (6)		
<i>Mammillaria zephyranthoides</i> *	AIA (2)+K(10)		
<i>Echinocereus knippelianus</i>	BA (2)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Retes-Pruneda <i>et al.</i> , 2007
<i>Echinocereus schmollii</i>	BA (2)		
<i>Mammillaria carmenae</i>	BA (2)		
<i>Mammillaria carmenae forubrispina</i>	BA (1)		
<i>Mammillaria herrerae</i>	BA (0.5)		
<i>Mammillaria herrerae</i>	2iP (5)		
<i>Mammillaria theresae</i>	2iP (5)		
<i>Melocactus curvispinus</i>	BA (2)		
<i>Escontria chiotilla</i>	BA (1)		
<i>Polaskia chichipe</i>			

ORGANOGENESIS INDIRECTA

Especie	Hormona (mg L ⁻¹)	Explante	Referencia
<i>Mammillaria woodsii</i>	AIA (2)+K (2)	Segmentos de tallos de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Kolář <i>et al.</i> , 1976
<i>Coryphantha macromeris</i>	BA (10)+2,4-D (0.1)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Smith <i>et al.</i> , 1991
<i>Cereus peruvianus</i>	2,4-D (3.5)+ K (4 o 6)	Explantos provenientes de plántulas	Oliveira <i>et al.</i> , 1995
<i>Coryphantha elephantidens</i>	K (1.5)+ 2,4-D (0.5)	Segmentos de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Wakhlu y Bhau, 2000
<i>Mammillaria san-angelensis</i> *	AIA (6)	Segmentos de brotes regenerados <i>in vitro</i>	Rubluo <i>et al.</i> , 2002

<i>Notocactus magnificus</i>	BA (5)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i> y de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	De Medeiros <i>et al.</i> , 2006
------------------------------	--------	--	----------------------------------

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Especie	Hormona (mg L ⁻¹)	Tipo de explante	Referencia
<i>Mediocactus coccineus</i>	BA (1) y ANA (0.5)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Infante, 1992
<i>Obregonia denegrii</i>	BA (0.5)+ ANA (0.1)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Malda <i>et al.</i> , 1999
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	BA (3) + ANA (1)	Segmentos de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003

FORMACIÓN DE CALLO

Especie	Hormona (mg L ⁻¹)	Explante	Referencia
<i>Mammillaria elongata</i> *	2iP (10)+ AIA (1)	Segmentos de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Johnson y Emino, 1979
<i>Mammillaria bocasana</i> *	K (10)	Segmentos de plantas desarrolladas <i>ex vitro</i>	Ramírez-Malagón <i>et al.</i> , 2007
<i>Mammillaria densispina</i> *	AIA (2)+ K (6)		
<i>Mammillaria pectinifera</i> *	AIA (4)+ K (6)		
<i>Mammillaria perbella</i> *	AIA (1)+ K (10)		
<i>Mammillaria picta</i> *	AIA (2)+ K (10)		
<i>Mammillaria zephyranthoides</i> *	AIA (2)+ K (10)		

AIA: Ácido Indolacético, **ANA:** Ácido α -naftalenacético; **ATIB:** Ácido 2,3,5- triyodobenzóico, **BA** N⁶-benciladenina, **K:** Kinetina, **TDZ:** Tidiazurón, **Z:** Zeatina, **2,4-D:** Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, **2iP:** N⁶-2-isopentil-adenina.

ANEXO 2. FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MS (Murashige y Skoog, 1962)

MACROELEMENTOS	mg L⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MICROELEMENTOS	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.89
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
SOLUCIÓN DE Fe-EDTA	
Na ₂ .EDTA	37.30
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80
COMPUESTOS ORGÁNICOS	
VITAMINAS	
Ácido nicotínico (B ₃)	0.50
Piridoxina-HCl (B ₆)	0.50
Tiamina-HCl (B ₁)	0.10
INOSITOL	
myo - Inositol	100.00
GLICINA	
Glicina	2.00
Sacarosa	30 g L ⁻¹
pH	5.7 - 5.8
Agar	8 g L ⁻¹