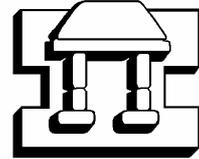




UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
I Z T A C A L A



IZTACALA

“MULTIPLICACIÓN *in vitro* de *Mammillaria pectinifera* F. A. C. Weber DEL VALLE DE TEHUACAN-CUICATLÁN”

TESIS

Que para obtener el título de Biólogo

Presenta

Villanueva Hernández Oscar Isaac.

Director de Tesis: Dr. Juan Gerardo Ortiz Montiel.

Los Reyes Iztacala, Edo de México, Junio de 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A la memoria de mi Padre,
Aquí estoy, presente, no te fallé.

A mi madre, con mucho cariño, quien siempre me ha apoyado, me dado su confianza y que en estos días ha cuidado de Ximenita de tiempo completo.
Mamá gracias por todo.

A Lulú por darme una hija Hermosa y ser quien me alienta en los momentos duros y quien ha decidido compartir su vida conmigo.

A mi Ximenita hermosa. Hija, cuando tú puedas leer esto –creo que va ser pronto- sabrás que pensé todo el tiempo en ti, que a tu corta edad me siento orgulloso de ti, porque siempre me sorprendes y logras con tus gracias y ocurrencias que me sienta el hombre más feliz de todo el universo.

A mis hermanos. Martín, Lupe, Roma, Yesenia, Pedro, Yunis, Mari y Sandra

A toda la Bandota.

Del 1103

Don Isaías, Chamuelo, Angy, Ara, Diana, Misael, Sagrash, Chío, Pedro y Pitor por ser todos mis amigos en las buenas y en las malas.

A Brenda porque eres buena amiga y porque sé que aquí estarás.

A Goyo, Yola, Ricardo y Lulú por ser parte de este esfuerzo y hacer ameno cada día de trabajo.

A Tania, Moni, Gus del Acuario por su convivencia y hacerme parte de sus logros.

A Anita y Fabián por hacerme parte sus logros, esfuerzos y motivarme para seguir adelante

A mi hijo Osvaldo y sus hermanos Clímaco y Alex.

A la memoria del profesor Antonio Meyrán Camacho, por su trabajo incansable con las suculentas y en especial de la familia *Cactaceae* y ser quien indujo en mí el interés por este valioso y hermoso grupo.

AGRADECIMIENTOS

Profe Gerardo. Con profunda gratitud por recibirme en el laboratorio y ser parte de su equipo, con admiración y respeto por enseñarme la importancia de la Biología y por hacerme disfrutar del jazz.

Al maestro Hector Barrera Escorcía del laboratorio de Microscopía por sus acertados comentarios y sugerencias durante la captura de las imágenes.

ÍNDICE

Resumen.....	5
I. Introducción.....	6
II. Generalidades.....	8
2.1 Situación Actual.....	8
2.2 Origen de las cactáceas.....	9
2.3. Distribución y hábitat.....	10
2.4. Importancia y usos de las cactáceas.....	11
III.-Descripción.....	13
3.1. Descripción de Mammillaria pectinifera.....	13
3.2 Ubicación geográfica de la especie.....	15
IV.- Propagación <i>in vitro</i>	16
4.1 Los reguladores del crecimiento <i>in vitro</i>	16
4.2 Las auxinas.....	17
4.2.1 Tipos de auxinas.....	17
4.3 Citocininas.....	18
4.3.1 Tipos de citocininas.....	18
V. Antecedentes	19
VI Justificación.....	22
VII. Objetivos.....	23
VIII. Materiales y métodos.....	24
8.1 Cultivo <i>in vitro</i>	24
8.2 Obtención de brotes.....	24
8.3 Inducción de raíz.....	25
8.4 Proceso de aclimatización.....	25
8.5 Cortes histológicos.....	26
8.6 Fijación.....	26
8.7 Deshidratación.....	27
8.8 Infiltración e inclusión en Paraplast.....	27
IX.. Resultados y discusión.....	29
9.1 Obtención de brote.....	29
9.2 Inducción de la raíz.....	38
9.3 Aclimatización.....	42
9.4 Cortes histológicos.....	44
X. Conclusiones.....	54
XI. Recomendaciones y aportaciones finales.....	55
XII. Literatura citada.....	56

RESUMEN

Mammillaria pectinifera es una especie vulnerable por su colecta ilegal al grado de ser ubicada en la categoría de Amenazada dentro de la NOM-059 ECOL 2002. Por ello se diseñó un protocolo para su propagación por cultivo *in vitro*, donde se utilizó el tallo como explante debido a la baja disponibilidad de las semillas y su bajo nivel de germinación además de que existen escasos trabajos acerca de cultivo de tejidos. Se trabajó con cuatro reguladores del crecimiento; las auxinas: Ácido indol 3 acético (AIA) y Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) mientras que las citocininas fueron Bencil aminopurina (BAP) y Cinetina (KIN) que se dispusieron en dos grupos, uno, con BAP y 2,4 D en 1.0, 3.0, 5.0 mgL⁻¹ y 0.0, 0.5 y 1.5 mgL⁻¹ respectivamente de donde se obtuvieron 9 tratamientos más el grupo control. El segundo grupo se formó de KIN en 6.0 mgL⁻¹ y AIA 4.0 mgL⁻¹ Kin y 0.0 mgL⁻¹ de AIA del que se obtuvieron 4 tratamientos más el grupo control. Se obtuvieron brotes a las 16 semanas de establecido el explante en el grupo uno de BAP/2,4 D en los tratamientos 3.0 mgL⁻¹ BAP-0.0 mgL⁻¹ 2,4 D; 3.0 mgL⁻¹ BAP-0.5 mgL⁻¹ 2,4 D; el tratamiento 5.0 mgL⁻¹ BAP-0.0 mgL⁻¹ 2,4 D generó gran cantidad de brotes con vitrificación. Este mismo fenómeno se produjo en el grupo dos con el tratamiento 6.0 mgL⁻¹ Kin - 0.0 mgL⁻¹ con gran proliferación de plántulas. En tanto que el tratamiento 6.0 mgL⁻¹ kin 4.0 mgL⁻¹ AIA generó brotes viables en menor tiempo que el grupo uno de BAP-2,4 D en 4 semanas.

Por otro lado para el proceso de aclimatización se realizaron cortes histológicos que se compararon en plantas obtenidas *in vitro*, *in vivo* y aclimatizadas en donde no se encuentran diferencias anatómicas entre los tres. Esta técnica comprendió la fijación con (F.A.A.), la deshidratación con 30, 40, 50, 70, 80, 90, 96 y 100% de etanol así como la inclusión en parafina y se realizó en todas las muestras de tejidos. Esto permitió establecer una comparación en la formación y composición del tejido y se observan en todos, la epidermis, córtex y el cilindro vascular.

Se logró reproducir *M. pectinifera in vitro* a partir explantes obtenidos del tallo produciendo así plántulas viables que sobrevivieron a un proceso de aclimatización, esto se pudo comprobar por medio de los cortes histológicos realizados en plantas *in vitro*, *in vivo* y aclimatizadas no encontrándose diferencias anatómicas entre sí.

Es importante señalar que este trabajo contribuye a dar información acerca del cultivo *in vitro* y de la anatomía de las cactáceas.

I. Introducción

La flora de México se considera como una de las más diversas del mundo; a ello ha contribuido su situación geográfica, lo accidentado de su fisiografía, sus climas variados y su notable grado de endemismo. En este último elemento es importante destacar que nuestro país es centro de origen y diversificación de géneros y especies de flora, tales como la flora xerófila que puebla extensas regiones que equivalen al 60% del territorio nacional. La flora xerófila mexicana está integrada predominantemente por la familia *Cactaceae* (Bravo, 1978).

Las cactáceas son plantas endémicas del continente americano con 2000 especies (León de L. *et al.*, 1994; Bravo, *et al.* 1995). Su distribución va desde Peace River al sur de Canadá, a una latitud de 59°N, hasta la Patagonia en Argentina a 52° latitud sur en el estrecho de Magallanes, incluyendo las islas del Caribe y las islas Galápagos; así como una altura de 5100 m s.n.m. en Perú (Bravo y Scheinvar; 1995). En nuestro país forman parte de varios tipos de vegetación como el matorral xerófilo, matorral rosetófilo y bosque tropical caducifolio, las dunas costeras y bosques tropicales perennifolio pero es en los tipos de vegetación de zonas áridas y semiáridas donde alcanzan su máxima diversidad en géneros y especies (Bravo y Scheinvar;1995).

Las regiones áridas y semiáridas se caracterizan por sus lluvias escasas pero torrenciales, humedad atmosférica y nubosidad bajas, insolación intensa, vientos fuertes y temperaturas extremas. Las regiones de alta diversidad florística de cactaceas en México son el altiplano Potosino y el sur de Nuevo León, los valles intermontanos de Querétaro e Hidalgo, los desiertos de Chihuahua y de Sonora y el valle de Tehuacán-Cuicatlán en los estados de Puebla y Oaxaca (Becerra, 2000)

En el centro sur del país se encuentra el valle de Tehuacán que forma parte de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán; según García, (1965) es de clima árido

BS, estas características determinan el grado de aridez e influyen preponderantemente en las plantas y los tipos de vegetación (Bravo, 1978). Este valle es una provincia fitogeográfica perteneciente a la región Xerófita Mexicana, la cual por estar constituida mayormente por componentes florísticos de afinidad meridional, se le ubica dentro del Reino Neotropical (Rzedowski, 1978).

El valle de Tehuacan-Cuicatlán se ubica como el centro de diversificación de cactáceas columnares más importante de América con 45 de las 70 especies distribuidas en México, es decir, el 64% (Valiente-Banuet, *et al.* 2009, Valiente-Banuet, *et al.* 1996; Valiente-Banuet, *et al.* 1991). Este Valle es presumiblemente un sitio de origen, el cual constituye uno de los reservorios naturales más importantes de recursos genéticos para México. Fue declarado reserva de la biosfera y es depositario de una biodiversidad excepcional, lo que le convierte en la zona árida y semiárida más importante de Norteamérica con una mayor riqueza biológica (Dávila *et al.* 2002, citada por Valiente-Banuet, *et al.* 2009), lo que significa que en esta zona existe alrededor del 10% de la flora total del país y el 1% de la flora del mundo (Anaya y Varela, 2000). En el valle existen un total de 180 familias, 891 géneros y alrededor de 2650 especies de plantas vasculares (Valiente-Banuet, 2009).

El Valle de Tehuacán presenta elementos fisiográficos sobresalientes como son una geografía, edafología y clima muy específicos; las cuales influyen en su riqueza florística entre las que destacan elementos que componen el matorral xerófilo crasicale; como el tetecho (*Neobuxbaumia tetetzo*), la chiotilla o jiotilla (*Escontria chiotilla*), el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) y el viejito (*Cephalocereus columna-trajani*), (Dávila *et al.*, 1993) citado por Godínez 1998, así como una gran diversidad de mamilarias, las cuales están en riesgo debido a su uso como plantas de ornato, propiciando el saqueo para satisfacer una creciente demanda de los aficionados a éstas especies tanto nacionales como extranjeros.

II. Generalidades de las Cactáceas

2.1 Situación actual

México tiene la diversidad más alta de cactáceas, desafortunadamente, cerca del 25% de las especies se ubican en listados de conservación en el estatus de en peligro, debido a la pérdida de su hábitat y la colecta ilegal. Esto se relaciona con el hecho de que varias especies de cactus son de distribución restringida, alta especificidad de hábitat, intervalos bajos de crecimiento y poblaciones reducidas (Hernández y Godínez, 1994; Hernández y Bárcenas, 1995 y Hernández y Bárcenas, 1996; Esparza-Olguín *et al.* 2002). Adicionalmente la vulnerabilidad de numerosas especies de cactus se ha incrementado como resultado de la destrucción del hábitat y del comercio ilegal (Arias, 1993; Esparza-Olguín *et al.* 2002). Por otra parte, Becerra, (2000) comenta que la demanda internacional se ha abastecido fundamentalmente con la extracción de plantas y semillas de sus hábitats naturales. La afición de muchos coleccionistas por adquirir plantas exóticas representa una presión para las poblaciones silvestres. Solo por mencionar que se llegan a pagar sumas muy importantes de dinero por obtener algunas especies.

Estos factores hacen de ésta familia como una de las más probables a la extinción de todo el reino vegetal (Hubstenberger *et al.* 1992), citado por Pérez-Molphe *et al.* 2002. Santos-Díaz *et al.* (2003) mencionan que 217 especies son consideradas como en peligro (Glass, 1997; NOM-059-ECOL-2001-2002). Solo en la NOM- 059-ECOL-1994 habían alrededor de 258 especies, siendo el género *Mammillaria* el más presente en la lista con 109 especies en diferentes estatus, de los cuales destaca *M. pectinifera* como Amenazada, y ha sido incluida en el Apéndice I del CITES (Hernández y Godínez, 1994).

Cuadro 1. Numero de especies de cactáceas que aparecen en la NOM-059-ECOL-1994, de las 257 especies inscritas, 238 son endémicas de México.

ESTATUS	NÚMERO DE ESPECIES
En Peligro de Extinción	24
Amenazadas	96
Raras	135
Protección especial	2

Siendo una especie muy apreciada por los coleccionistas que, desde su descubrimiento en 1800, ha sido colectada repetidamente. Es una especie aislada taxonómicamente cuya única especie conocida relativamente cercana es *Mammillaria solisoides*, otra especie amenazada (Anderson, Arias y Taylor 1994, citados por Zavala-Hurtado, 1997). Su floración ocurre entre diciembre y marzo y sus polinizadores son insectos. Actualmente presenta retos de conservación debido a posibles efectos en sus patrones de distribución, tamaño poblacional biología floral y presenta altos niveles de endogamia (Valverde, 2007). *M. pectinifera* se localiza en la Sierra de Zapotitlán en el valle de Tehuacán que comprende un clima semicálido-semiárido; donde el matorral xerófilo presenta 29.1% de la flora endémica (Anaya y Varela, 2000). Ponce-Bautista *et al.* (2007) mencionan que *M. pectinifera* se distribuye en tres poblaciones localizadas en El Riego (norte del valle), San Antonio Texcala (en el centro del valle) y Pedernal (sur del valle).

2.2.2 Origen de las cactáceas

La familia *cactaceae* evolucionó hace aproximadamente 80 a 60 millones de años, a partir de plantas no suculentas que presentaban hojas simples helicoidales y con un tipo de metabolismo C₃, xilema secundario, polen y semillas morfológicamente semejantes a otros grupos relacionados e incluidos en el orden Caryophyllales (Gibson y Nobel, 1986, citado por Fuentes, 2003).

Algunos autores mencionan que las formas ancestrales de las cactáceas fueron plantas foliadas extintas que vivieron en las territorios emergidos del caribe. Esta hipótesis se

deduce de la distribución actual de las especies que presentan hojas consideradas como primitivas, tales como *Pereskia*, cuyo origen filogenético se encuentra entre algunas dicotiledóneas del orden *Centrospermae* (Bravo, 1979). Dichas formas ancestrales primitivas del Caribe originaron las primeras opuntioideas y cereoideas que emigraron hacia el norte y hacia el sur del continente americano, regiones en que la mayoría se diferenció en géneros que alcanzaron un endemismo muy notable (Bravo, 1979). Estudios recientes consideran que su origen es el trópico ya que en dichos lugares se han encontrado los ejemplares de la subfamilia Pereskioide, que posee hojas laminadas, bien desarrolladas y crasas (León y Valiente-Banuet, 1994).

2.3 Distribución y hábitat

La ubicación de México entre dos regiones biogeográficas, la Neártica y Neotropical han generado una flora única, según Miranda y Hernández (1963), citado por Bravo (1978) compuesta de 34 tipos de vegetación, Gómez Pompa (1965) agrupa cuatro tipos de vegetación como zonas con clima árido y semiárido, zonas con climas cálido y subcálido, tipos de vegetación de zonas con clima templado y frío y algunas características especiales. Este primer grupo contempla los llamados desiertos como el Chihuahuense y Sonorense, los cuales se ubican en el norte de México entre los 20 y 40° lat. N. situados en el cinturón mundial de los desiertos el cual es una región subtropical de alta presión, en donde las corrientes de aire descendentes no favorecen la precipitación. Esta aridez se acentúa en los estados de Sonora y en la península de Baja California. Sin embargo, el resto de las zonas áridas responde a que el altiplano desciende hacia el sur y en paralelo a la Sierra Madre Oriental y Sierra Madre Occidental, que a manera de enormes contrafuertes, detienen los vientos húmedos que provienen del mar, los cuales precipitan en las vertientes de los litorales y pasan casi secos a las vertientes de sotavento y a las planicies interiores; a esto se le conoce como sombra orográfica (Hernández y Godínez, 1994).

Existen, además elementos en las zonas áridas como una precipitación menor a los 450 mm al año, temperaturas extremas y altas tasas de evapotranspiración (Rzedowski, 1981). También la formación del suelo que se origina de terrenos pedregosos

revestidos por un pavimento de rocas, son suelos pobres de materia orgánica y de coloraciones claras y sus propiedades fisicoquímicas dependen en gran parte de la roca madre que les dio origen; mientras el pH varía de neutro a alcalino. El contenido de calcio es alto y esas condiciones de suelo, suelen ser adversas para la mayor parte de especies vegetales, (Rzedowski, 1968) no obstante para las cactáceas a lo largo de su evolución adquirieron características particulares como; raíces extensas para retener y explorar el suelo en busca de agua. Un claro ejemplo es la región árida del valle de Tehuacán pertenece a la cuenca alta del Papaloapan. Los factores que influyen en su aridez son la situación geográfica, la topografía y el clima (Bravo, 1979).

2.4 Importancia y usos de las cactáceas

El valle de Tehuacán también es depositario de una larga historia cultural, las cuevas de El Riego, Coxcatlán y Purrón conservan evidencias de presencia humana sedentaria de hace 10,000 años (Anaya y Varela, 2000), dichos asentamientos basaban su subsistencia en la domesticación del maíz, chile, frijol y calabaza; así como un uso importante de las cactáceas y sus frutos. La población que se encuentra dentro de los límites de la reserva Tehuacán-Cuicatlán, está dividida en 31 municipios para el estado de Oaxaca y 20 municipios para el estado de Puebla.

Actualmente aunque la población es predominantemente mestiza, existen siete grupos indígenas: Nahoas, Chocho-polacas, Cuicatecos, Mazatecos, Mixtecos, Chinantecos e Ixcatecos que hacen actualmente uso de la gran mayoría de las especies de cactáceas como *Escontria chiotilla*, (jotilla) y *Myrtillocactus geometrizans*, (garambullo); solo por citar algunas de la gran diversidad que ahí se presenta haciendo uso de sus frutos y tallos; ya sean silvestres o en huertos familiares. Todos estos pueblos viven en condiciones rurales bajo una economía campesina de subsistencia (McNeish y Bayers, 1967).

El valle de Zapotitlán de las Salinas como parte de la reserva de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán está conformado por matorral crassicaule, donde domina *Cephalocereus*

columna-trajani, *Neobuxbaumia tetetzo* y *N. macrocephala*. Este tipo de vegetación se desarrolla sobre suelos derivados de lutitas en contacto con calizas. En esta población se obtiene beneficio de *Echinocactus platyacanthus* (forma *grandis*); *Stenocereus stellatus* del cual colectan los frutos que se usan en encurtidos y se muelen las semillas junto con la salsa, *Stenocereus griseus* se usa como ornato, cerco vivo y con fines alimenticios como la elaboración de tortillas con masa enriquecida con las semillas; *Hylocereus undatus* se usa como ornato, forraje y el fruto es muy apreciado en las comunidades. De *Neobuxbaumia tetetzo* se usan los frutos conocidos como “tetechas” (Arias, et al 2001) y sus semillas se aprovechan en salsa (Anaya y Varela, 2000); y sus flores se usan en encurtidos o como verdura. De *Escontria chiotilla* sus frutos se venden en los mercados regionales, se usa como cerco vivo y con la pulpa se elaboran bebidas y paletas de hielo; *Pachycereus grandis* es usada la semilla molida con el maíz para hacer tortillas, la pulpa se usa como fermento y el tallo como forraje; *Pachycereus marginatus* se ocupa como cercos vivos y se hacen juguetes (Anaya y Varela, 2000) además se utiliza en problemas de los riñones y la vejiga; así como para curar el malestar posterior a la ingestión de bebidas alcohólicas, jabones y champús combinado con sábila (Arias, et al. 2001); de *Polaskia chichipe* se usa el tallo como jabón y su fruto es comestible; *Myrtillocactus geometrizans* es usado en emplastos medicinales y el fruto es comestible (Anaya y Varela, 2000) como fruta de tiempo, en conserva o en mermelada. Se prepara una bebida alcohólica con el fruto y es altamente apreciado en la comunidad (Arias, et al. 2001)

III. Descripción de la planta en estudio

3.1 *Mammillaria pectinifera*. (Weber)

Son plántulas pequeñas con raíces fibrosas. Tallo globoso hasta cilíndrico, 5 a 8 cm de diámetro, con jugo acuoso o más o menos lechoso. Tubérculos ordenados en 8 y 13 series espiraladas cónicas pequeñas, lateralmente comprimidos cubiertos por las espinas. Axilas desnudas, areolas más o menos angostas y largas. Espinas radiales numerosas, 20 a 40, cortas de 15 a 20mm de longitud, aplanadas más o menos flexibles, pectinadas blancas, ocultando el tallo. Espinas centrales ausentes. Flores naciendo de la región lateral del tallo en las axilas de los tubérculos, anchamente campanuladas, generalmente con 3cm de diámetro bien abiertas, de color rosa pálido que a veces llega a ser blanco y en ocasiones adquiriendo tintes amarillentos, con la región interior cilíndrica integrada por el pericarpelo y la parte basal, muy corta del receptáculo; pericarpelo desnudo, principiando luego los segmentos del perianto; segmentos exteriores del perianto linear y lanceolados, de 5 a 7 mm de longitud y 2 mm de anchura, agudas con el margen entero, amarillentos de color pálido hasta blanco, crema o amarillo, con la franja medio de color oscuro (rosa); no existe anillo nectarial, los estambres nacen casi desde el fondo del receptáculo llegando hasta la garganta, todos más o menos de igual longitud; filamentos blancos a púrpura; estilo bastante más largo que los estambres, lóbulos del estigma 4 a 5, verdosos, divergentes, cortos papilosos. Fruto oblongo de 4 a 6 mm de longitud de color blanco a algo rojizo, desnudos, la parte saliente se seca y cae en una o dos semanas (Bravo, 1991), mientras que la parte basal, la cual contiene la mayor parte de las semillas, permanece escondida en una cavidad relativamente profunda entre los tubérculos. Las semillas retenidas de esta forma pueden permanecer en la planta indefinidamente (Boke 1960). Semillas en forma de cúpula oblicua de 1 a 1.5 mm de longitud, hilo basal grande y largo, testa negra mate, foveolada, perisperma rudimentario o ausente, cotiledones pequeños (Bravo, 1991).

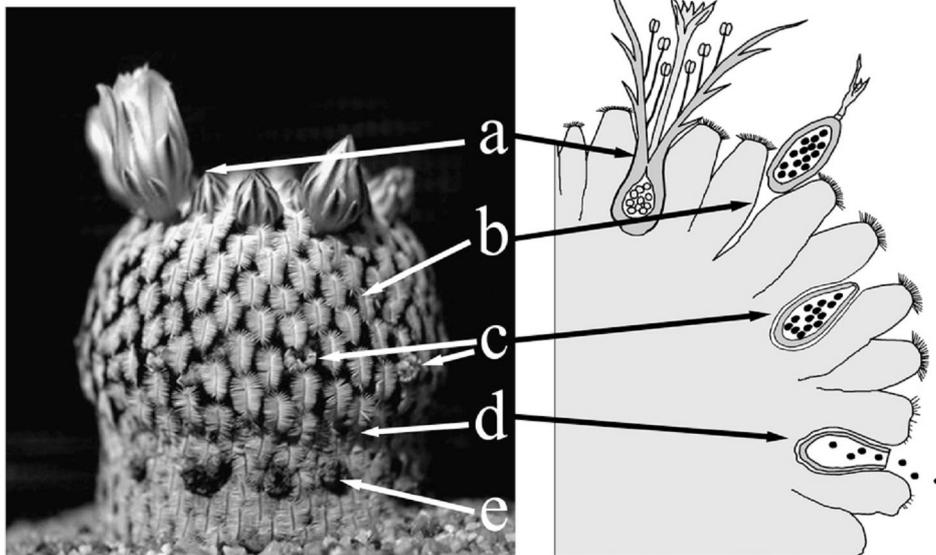


Figura. 1 *Mammillaria pectinifera* (Weber) con flores en antesis en estado silvestre. Esquema mostrando la serotinia (retención de las semillas) las letras indican el numero de años (Peters, et al. 2009)

3.2 Ubicación geográfica de la procedencia de la especie

La reserva de la biosfera de Tehuacán –Cuicatlán se localiza entre los 17° 48' y 18° 58' latitud norte y los 97° 03' y 97° 43' de longitud oeste en la parte central de nuestro territorio con un área de 10 mil km² y se distribuye en el suroeste de Puebla y noroeste de Oaxaca (Valiente-Banuet, 2009). Tiene una superficie de 496,186 Has decretada el 18 de septiembre de 1998 y pertenece a la región Mixteca Oaxaqueña. Está delimitada por el occidente por la Sierra Mixteca, al oriente por tres macizos montañosos y al norte por la Sierra de Zongolica. Presenta un régimen de lluvias de solo una estación al año (verano), siendo la temporada la que aporta principalmente el agua. (Valiente, 1991; . citado por Godínez, 1998), Zapotitlán de las Salinas se localiza en la parte sureste del Valle de Tehuacan-Cuicatlán, presenta una altitud entre 1500 y 2300 m sobre el nivel del mar. El clima es semiárido con una precipitación anual de 542.5 mm y una temperatura anual de 19.8 °C (García 1988 citado por Hernández *et al.* 2003).

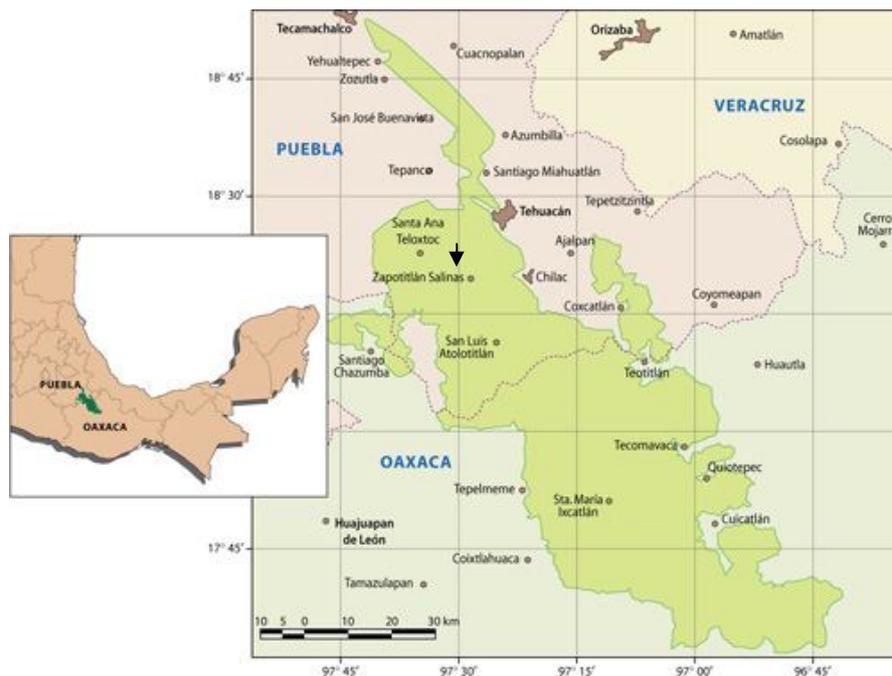


Figura 2. Mapa de la Reserva de Tehuacán-Cuicatlán, la flecha indica el lugar donde crece y se reproduce *M. pectinifera* que es la localidad de San Antonio Texcala. Escala 1:1000

IV. Propagación *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* es la capacidad de una planta para producir órganos (embriones, brotes y raíces), y tejido vegetal (células, callos y protoplastos) en condiciones de asepsia. Esto incluye la formación de plántulas, callos y embriones somáticos mediante el principio de totipotencialidad y fue descrito en 1902 por el fisiólogo vegetal Haberlandt (Hartmann, *et al* 1997).

El cultivo *in vitro* o micropropagación tiene su fundamento en la capacidad totipotencial de las células vegetales, cualquiera que esta sea su especialización, a regenerar una parte de la planta de la cual proviene o incluso generar nuevas plantas (Augé, *et al* 1984). El cultivo de tejidos *in vitro* se integra de varios procesos como la dediferenciación donde el explante o tejido incubado puede “evolucionar” en cualquier dirección (Augé, *et al* 1984); formar un acumulo celular o callo, inducir la organogénesis, que es el proceso en el cual el explante puede generar cualquier órgano vegetal como hojas, raíces y tallo con la ayuda de reguladores del crecimiento como auxinas y citocininas, o formar plantas completas nuevas por embriogénesis somática. También la inducción de una organogénesis *de novo* permite la formación de raíces y yemas así como un aumento en la velocidad de multiplicación, propagar especies de lento desarrollo, raras, en peligro de extinción ó amenazadas; tal es el caso de las cactáceas (Augé, *et al* 1984).

4.1 Los reguladores del crecimiento *in vitro*

Existen elementos presentes de manera natural en plantas los cuales tiene una actividad regulatoria en el desempeño del metabolismo y el desarrollo. Estos componentes son generalmente activos en bajas concentraciones y se les conoce como reguladores del crecimiento o fitohormonas (George, *et al.* 1993).

El desarrollo del cultivo de tejidos está estrechamente relacionado con el descubrimiento y la caracterización de las hormonas vegetales (Evans *et al.* 2003).

Skoog y Miller (1957) demostraron que la manipulación de auxinas y citocininas en el medio, estas podrían diferenciar raíces y brotes de tabaco a partir de la médula. Altas concentraciones de auxinas promueven enraizamiento y altas concentraciones de citocininas promueven brotes, mientras que concentraciones iguales se produce callo (Evans *et al.* 2003).

4.1.1 Las auxinas.

Las auxinas fueron las primeras hormonas o reguladores del crecimiento descubiertos en las plantas y cuya estructura química fue esclarecida. Se generan en las partes jóvenes de las plantas: ápices, frutos tiernos y hojas en desarrollo. También estimulan el crecimiento por alargamiento de tallo y participan en la curvación de raíces fototrópicas y gravitrópicas. Participan también en la modificación de la superficie adaxial de la hoja hacia la luz (fototropismo). Además de promover la formación de raíces adventicias y laterales. Este fenómeno está estrechamente relacionada con la propiedad de las auxinas respecto a su síntesis endógena, su transporte es basipétalo.

4.1.2 Tipos de auxinas

El ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2, 4 D) es una auxina exógena y sintética de amplio uso en el cultivo de tejidos. En concentraciones muy altas pueden ser utilizadas como herbicidas en la agricultura. Las concentraciones comparativas son de 1-5 mgL⁻¹ ; las concentraciones mayores a éstas son de efectos tóxicos para las plantas.

Las auxinas, aplicadas en concentraciones altas, provocan un aumento en la producción de etileno, y se presentan algunos fenómenos que se les atribuyen a las auxinas pero pueden ser en realidad, una respuesta de la planta al alto nivel de etileno (Jankiewicks, 2003), el tejido que posee auxinas en concentraciones altas, se convierte en un punto de atracción de nutrientes.

Además, son ampliamente usadas en trabajos de micropropagación y son incorporados al medio para promover el crecimiento de callos (George; 1993).

Por otro lado uno de los procesos determinantes en la producción de plantas esta definido por la inducción de raíz en los brotes obtenidos.

4.1.3 Citocininas

En 1892, Wiesner y Haberland, (1913), citado por Hartman 1997 propusieron que existen hormonas que estimulan la división celular. Sin embargo Miller *et al* (1955), aislaron el compuesto que estimulaba las divisiones celulares y le llamaron cinetina. Su descubrimiento estuvo relacionado con el desarrollo del cultivo de tejidos *in vitro*. Se observó que las células cultivadas *in vitro* se dividen más intensamente en agua de coco. Sin embargo una de las características más importantes de las citocininas es que estimulan las divisiones celulares y retrasan el envejecimiento. Influyen en múltiples procesos bioquímicos como la biosíntesis de los ácidos nucleicos, proteínas y enzimas como ribonucleasas y proteasas.

Participan en la estimulación de la germinación de semillas que necesitan luz y acortan el periodo de latencia en yemas. Son un factor activo en la regulación de la morfogénesis. En el cultivo de tejidos regula el número divisiones y la formación y desarrollo de brotes. Dichos cambios morfológicos del tejido u órgano cultivado *in vitro* son frecuentemente el resultado de la estimulación de la estimulación mitótica (Bouza, *et al.* 1993; citado por Jankiewics 2003).

4.1.4 Tipos de citocininas

La actividad biológica de la citocinina depende de la longitud de su cadena lateral, del grado de saturación de esta cadena y de los grupos adjuntos. Entre las citocininas que se utilizan en cultivo *in vitro* se encuentran, zeatina, 6 furfural aminopurina, 6 bencil adenina y adenina.

V. Antecedentes

El cultivo *in vitro* ha sido un método eficiente para la conservación *ex situ* de la diversidad genética (Fay (1994) citado por Guisti, *et al.*2002), seguida de una rápida multiplicación a partir de material vegetal, además con bajo impacto en la población.

El potencial del cultivo de tejidos para la conservación de especies de cactáceas amenazadas con la extinción ha tenido mucha atención de los investigadores (Fay, *et al.* 1995; Sánchez Martínez 1994; citado por Guisti *et al.* 2002).

Muchos medios, estrategias y hormonas han sido estudiadas en la propagación de cactáceas (Mauseth, 1979; Clayton 1990), y se sugiere que cada especie podría requerir de una única combinación de hormonas (Jhonson y Emino, 1979; citado por Guisti *et al.* 2002).

La activación areolar por etiolación, ha generado buenos resultados en cactáceas como lo demostró Pérez, *et al.* (1999), con *Schlumbergera truncata* (Cactus de Navidad), y, Flores y Ortiz (2000), quienes propagaron ejemplares de *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer a partir de areolas con activación por etiolación adicionando citocininas como reguladores del crecimiento. Ortiz y Alcántara (1997), propagaron *in vitro* peyote (*Lophophora williamsii*) (Lemaire) (Coulter), a partir de las areolas sobre el medio Murashige-Skoog (1962).

Una serie de trabajos en cactáceas, en esencia se han dedicado a evaluar la presencia de reguladores y la respuesta organogénica de los explantes. Brijmohan, (1999) obtuvo la regeneración de brotes de *Coryphanta elephantides* a partir de raíces como explante, aplicando reguladores del crecimiento 2,4D, IAA, IBA y NAA como auxinas y como citocininas BAP y cinetina, resultando el tratamiento más efectivo aquel que contenía $2.2 \mu\text{M}^{-1}$ de 2,4 D y $4.6 \mu\text{M}^{-1}$ de cinetina.

Se ha logrado regenerar *in vitro* a *M. elongata* a partir de las formas cristadas y normales usando un tubérculo como explante tomando como stock a una planta de dos años de edad y utilizando NAA y BA como reguladores del crecimiento (1.07 μ M NAA con 11.09 o 22.19 μ M BA (Papafotiou, *et al.* 2001).

Poljuha, *et al.* (2003) analizaron la morfología y la ultraestructura de *M. gracilis* obtenida *in vitro* encontrando que las condiciones de ambiente artificiales afectan a la fisiología de las plántulas.

La propagación de plantas *in vitro* que se encuentran en peligro es una alternativa viable para incrementar las poblaciones existentes como los demuestran Guisti *et al.* (2002) con tres especies de cactáceas *Pelecypora asselliformis*, *Escobaria minima* y *Mammillaria pectinifera*, quienes obtuvieron nuevas plantas a partir de diferentes tratamientos hormonales con 2,4 D , BA y Thidiazuron (TDZ).

Mata-Rosas, *et al.* (2001) produjeron brotes de *Turbinicarpus laui* utilizando como explantes secciones longitudinales en medio M-S adicionado con 6-benzilaminopurina (BA) y ácido naftalen acético (NAA). Mientras que Pérez-Molphe, *et al.* (2002) propagaron *Pelecypora aselliformis* y *P. strobiliformis* a partir de la activación areolar apical y transversal en medio M-S con varias citocininas como 2ip, TDZ y BA, resultando éste último como el mejor inductor de brotes por explante.

Santos-Díaz *et al.* (2003) propagaron *in vitro* *P. aselliformis* a partir de semillas utilizadas como explante utilizando medio M-S adicionado con BA y Kinetina complementado con carbón activado, encontrando la mayor respuesta cuando la concentración de ambos reguladores fueron 8.8 y 4.6 μ M respectivamente; por otro lado, en concentraciones bajas se produce hiperhidratación y formación de callo.

Fuentes, (2003), obtuvo proliferación de brotes de *Coryphanta elephantidens* obteniendo la mejor respuesta con BAP al generar un promedio de 1.6 brotes por explante.

Davila-Figueroa, *et al.* (2002), propagaron *in vitro* ocho especies de *Turbnicarpus* encontrando que BA fue más efectivo en 4 especies, mientras que 2 especies respondieron de manera significativa al tratamiento de 6 γ - γ -dimetilallylaminopurina; mientras que en las otras dos especies no se generaron resultados.

Rubluo *et al.* (2002) experimentaron con la capacidad morfogénica de auxinas como ácido indolacético (IAA) sobre *M. san-angelensis*.

Recientemente se destaca la importancia de diseñar estrategias de conservación del germoplasma de especies amenazadas y en peligro de extinción (Schemske *et al.* 1994, citado por Valverde y Zavala-Hurtado, 2006).

Es importante señalar que los objetivos de la propagación *in vitro* no son contribuir a la generación de plántulas en peligro o amenazadas para su reintroducción sino que se trata de evitar la colecta al contar con suficientes plantas.

En este trabajo desarrollamos la reproducción *in vitro* de *M. pectinifera*, como un antecedente que pueda contribuir en el cuidado de los recursos vegetales y que sea copartícipe de acciones específicas como la protección de poblaciones silvestres, sobre todo en aspectos de colecta y comercio ilegal y problemas de alteración de su hábitat natural.

VI. Justificación

Generalmente los cactus son propagados por semilla o vegetativamente a través de enraizamiento de hijuelos. Sin embargo, éstos métodos convencionales son inadecuados para especies con semillas en dormancia o latencia, bajos intervalos de germinación y lento crecimiento. Otro factor muy importante es la serotinia (figura 1) la cual, es una estrategia ecológica en la que el tallo retiene completamente el fruto hasta por más de dos años o dependiendo de las condiciones de humedad, precipitación y temperatura (Peters, *et al.* 2009). Por tales razones se han desarrollado otras metodologías de reproducción, entre las que destaca su propagación vegetativa *in vitro*, mediante el cultivo de tejidos o micropropagación, que es un método alternativo que permite la proliferación de muchos individuos a partir de un explante, que es una fracción de planta o plántula. Los sistemas de micropropagación han sido desarrollados en más de 35 especies de cactus agrupados en 20 géneros (Starling y Dodds, 1983; Hubstenberger. *et al.* 1989; Clayton *et al.*, 1990; Fay y Gratton, 1992; Pérez-Molphe-Balch, 1998; citado por Santos-Díaz *et al.* 2003).

Esta metodología se justifica en el sentido de incrementar el número de individuos para evitar la colecta lo que puede permitir mantener, restablecer o recuperar sus poblaciones, lo que es difícil por métodos convencionales, sobre todo en especies de cactus que presentan baja germinación (Pérez-Molphe, *et al.* 2002).

M. pectinifera por ser una especie muy llamativa y de “ornato” ha motivado su sobrecolecta ilegal además de otros factores antropogénicos como el cambio de uso de suelo, pastoreo, que le han afectado Zavala-Hurtado *et al.* (1997) proponen que se actualice su estatus, de especie Amenazada a especie en Peligro de Extinción. Los fundamentos se basan en predicciones sobre la reducción poblacional en el futuro cercano, su limitada extensión de presencia y estimaciones de probabilidad de extinción.

Otros han observado proporciones bajas de germinación de las semillas (22.29%) en condiciones de campo, realizadas en el vivero comercial “Cuthá” (Zavala- Hurtado, *et al.* 1997). Así como una disposición limitada, ya que las semillas quedan “guardadas” o retenidas por las plantas indefinidamente y que su extracción implica ocasionar daños mecánicos a las plantas madre que van desde severos hasta irreversibles.

VII. Objetivo General

- Propagar *in vitro* *Mammillaria pectinífera* Weber en condiciones asépticas de cultivo de tejidos.

Objetivos particulares

- Obtener un tratamiento que promueva la generación de plántulas completas de *Mammillaria pectinifera* mediante diferentes tratamientos con combinación de reguladores del crecimiento en un medio de cultivo.
- Establecer en suelo así como aclimatizar las plántulas de *M. pectinifera* obtenidas.
- Describir las características anatómicas en plántulas de *M. pectinifera* para definir diferencias o semejanzas con plantas *in vitro*, *in vivo* y aclimatadas

VIII. Materiales y métodos

8.1 Cultivo *in vitro*

El material vegetal fue obtenido en el vivero “Ecología Productiva Cuthá, S.P.R.” con número de registro SEMARNAT; SUMA, MX/VIV-CO-028-PUE; Zapotitlán de las Salinas Puebla. Se utilizaron plántulas de la misma edad (adultas) propagadas a partir de semilla.

Las plantas fueron colocadas inicialmente en total oscuridad durante 3 semanas hasta conseguir la etiolación que promueve la activación areolar para generar auxinas endógenas. Posteriormente fueron sometidas a condiciones estériles; primero se lavaron con agua corriente por 30 minutos seguido de un lavado con solución jabonosa con agitación constante por 10 minutos, posteriormente pasaron a inmersión en solución de etanol al 75% durante 1 minuto; inmediatamente después se sometieron a una solución de Hipoclorito de sodio al 30% adicionado con una gota de Tween 20 durante diez minutos; por último las plantas se enjuagaron con agua destilada estéril por cuatro veces.

8.2 Obtención de brotes. Para la obtención de brotes los explantes fueron colocados en medio de cultivo Murashige-Skoog (1962); adicionado con: 100 mgL⁻¹ de mioinositol, 1 mgL⁻¹ de tiamina, 30 gL⁻¹ de sacarosa, 8 gL⁻¹ de agar y Bencilaminopurina (BAP) con 0, 3 y 5 mgL⁻¹ combinados con 0.0, 0.5 y 1.5 mgL⁻¹ de 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4D), con al menos 10 repeticiones de cada tratamiento.

Cuadro 2. Combinación de 2,4 D y BAP para la obtención de brote.

	1 mgL ⁻¹ BAP	3 mgL ⁻¹ BAP	5 mgL ⁻¹ BAP
0.0 mgL ⁻¹ 2,4D	1/0	3/0	5/0
0.5 mgL ⁻¹ 2,4D	1/0.5	3/0.5	5/0.5
1.5 mgL ⁻¹ 2,4d	1/1.5	3/1.5	5/1.5

El esquema anterior se generó de lo recomendado por Giusti, *et al.* (2002). Por otro lado se evaluó la formación de brotes en un medio semejante (MS), con los componentes

orgánicos de los medios anteriores pero con 6mg/L de cinetina con 0 y 4 mg/L de ácido indol 3 acético (IAA). En todos los casos se ajustó el pH con 5.8. Con 10 repeticiones de cada tratamiento.

Cuadro 3. Tratamientos con cinetina y ácido indol acético

6 mgL ⁻¹ Cinetina	
6/0	0 mgL ⁻¹ IAA
6/4	4mg/L ⁻¹ IAA

8.3 Inducción de raíz

Para la inducción de raíz, se colocó un brote por cada frasco en medio MS adicionado con 100 mgL⁻¹ de mioinositol, 30 gL⁻¹ de sacarosa, 8 gL⁻¹ de agar conformando 3 tratamientos diferentes: Tratamiento 1) 2mgL⁻¹ de ácido indolbutírico, 2) 2 mgL⁻¹ de ácido 1-naftalenacético y 3) control sin reguladores. Los tres se ajustaron a un pH de 5.8. Las plántulas con un tamaño de 25 mm aproximadamente se trasladaron a frascos con medio (M-S) adicionado con 2 mg/L de ácido indolbutírico (IBA), otras plántulas se transfirieron a otro medio (M-S) adicionado con 2 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) a ambos tratamientos se les agregó 100 mg/L de mioinositol, 1 mg/L de tiamina, 100 mg/L de ácido cítrico, 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y se ajustó a un pH de 5.8.

8.4 Proceso de aclimatización

Después de la generación de raíz, se sembraron 20 brotes en cada frasco de vidrio transparente con tapa de polipropileno además de una mezcla de suelo compuesta por tezontle- finamente cernido- y tierra de hoja en proporción 1:1, previamente esterilizado en autoclave a 121 libras durante 15 minutos, todo ello, en la cámara de flujo laminar, inmediatamente se le colocó una tapa de polipropileno Magenta, Chicago, Ills, U.S.A. Las plántulas permanecieron 30 días en la cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16h luz /8h oscuridad con una intensidad luminosa de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 /\text{s}^{-1}$ durante un mes a una temperatura entre 22-28°C.. Transcurrido este tiempo se les retiró la tapa de

polipropileno Magenta, USA. Se llevaron al invernadero aún en el frasco pero con una cubierta de egapack y se mantuvieron durante un mes a una temperatura y humedad relativa constante.

Un mes después se les retiró el egapack ya que se comenzó a observar una succión en el plástico, señal de actividad de intercambio de gases. Se realizó riego periódicamente de tres veces por semana con agua destilada.

El proceso de aclimatización consistió en colocar a los brotes en un domo de polietileno transparente con la misma proporción de suelo 1:1 tierra de hoja y tezontle. Los brotes se mantuvieron en el invernadero con riego dos veces por semana.

8.5 Cortes histológicos

Para la obtención de cortes histológicos, se trabajó con tejido de *Mammillaria peenifera* obtenida *in vitro* así como *in vivo* y plantas obtenidas *in vitro* con 6 meses de establecimiento en suelo en el invernadero.

8.6 Fijación

Se colocó la parte media y apical de una planta de *M. pectinifera* por 24 horas en una solución de Formol:acético:acohol (F.A.A.) compuesta por (50 mL de etanol al 96%, 5 mL de ácido acético glacial, 10mL de formaldehído 40% y agua 35 mL) para la fijación del tejido (Sandoval, 2005).

8.7 Deshidratación

Para remover al máximo la cantidad de agua contenida dentro de los tejidos vegetales previamente fijados y endurecidos, el tallo se sometió a un tren de deshidratación gradual de etanol al 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100% (3 cambios del tejido en éstas concentraciones); durante 3 horas cada concentración (Sandoval, 2005).

Posteriormente se pasó a un tren de etanol-xilol en las siguientes proporciones: 80%-20%, 60%-40%, 50%-50%, 40%-60%, 20%-80% y xilol 100% por tres veces, esto durante 3 horas cada tratamiento (Sandoval, 2005).

8.8 Obtención del bloque y los cortes histológicos

8.8.1 Infiltración e inclusión en paraplast

De acuerdo a la técnica de Sandoval, (2005) y modificada para mamilarias, para la infiltración e inclusión se utilizó Paraplast (Kendall, Tyco-Healthcare 8889, USA). como medio para embebir tejido, punto de fusión de 56 a 62 °C; es un material semiduro compuesto por parafina y polímeros plásticos. Con el objetivo de que el Paraplast penetrara dentro de todas las células se dejó el tejido 24 horas en xilol puro y posteriormente cada 1 h se le adicionó de 5 a 7 hojuelas o “escamas” de éste medio gradualmente hasta lograr duplicar el volumen inicial (10 mL) de xilol ; de este volumen final el frasco permaneció en la estufa a 50 °C durante 48 h.

Al cabo de éste tiempo el xilol en la mezcla se evaporó sustituyéndose por el Paraplast quedando un volumen definitivo en el frasco de 10 mL, la temperatura a la cual se realizó este proceso fue de 56 °C. Es importante señalar que en el caso del tejido *in vivo* y aclimatado el tiempo de xilol-paraplast en la estufa se prolongó 2 semanas. Finalmente el tejido se trasladó aún recipiente pequeño (molde para hacer cubos de hielo) con Paraplast a punto de fusión a 56 °C. Los bloques se enfriaron gradualmente dentro de la estufa y después a temperatura ambiente.

El paraplast tiene la ventaja de que es soluble en xilol sus polímeros plásticos de peso regulado penetran con facilidad al interior de los tejidos dándoles un mejor soporte de adhesión a sus células; por lo tanto, ofrecen la posibilidad de lograr secciones de hasta 5 µm de grosor. El bloque se extrajo del molde, se cortó el exceso de parafina hasta dar forma a un cubo más pequeño que posteriormente se colocó en un microtomo de rotación American Optical Corporation modelo 820, N.Y. U.S.A a 10-15 µm.

Los cortes o secciones transversales y longitudinales obtenidos formaron entre sí un listón y posteriormente se colocaron en el portaobjetos con una aplicación previa de albumina 30mg/100mL, una vez adherido el corte al portaobjeto se calentó someramente para disolver la mayor cantidad posible de paraplast, se limpió cuidadosamente y se sumergió en una caja Coplin con xilol 100% para retirar el exceso de paraplast de los espacios intersticiales , nuevamente se colocó en una caja Coplin con etanol absoluto grado reactivo con xilol en menor proporción y posteriormente en un tren gradual de etanol al 96%, 90%, 70%, 50%, 40% y posteriormente se aplicó safranina la cual se permaneció durante 2 minutos, pasado el tiempo se “enjuaga” con 40% etanol y se continuó el tren pero en forma ascendente hasta llegar nuevamente a xilol y aquí se aplicó una o dos gotas de resina, por último se colocó el cubreobjetos. La observación se llevó a cabo en uno de los dos laboratorios de Microscopia en el laboratorio L-4 de esta facultad, se utilizó un microscopio óptico con numero de inventario 2132041 modelo Leyca Co con objetivos 4x, 10x y 40x y se analizaron las imágenes en el programa Motic Co Ltd 2005.

IX. Resultados y Discusión

9.1 Obtención de brotes

Las evidencias iniciales de brotes se obtuvieron en los tratamientos con 5.0 mgL^{-1} BAP con 0.0 mgL^{-1} de 2,4 D; 5.0 mgL^{-1} con 0.5 mgL^{-1} 2,4 D; 3.0 mgL^{-1} BAP en ausencia de 2,4 D y 3 mgL^{-1} con 0.5 mgL^{-1} de 2,4 D. se obtuvieron brotes en los tratamientos partir de la semana 16 posterior a la siembra del explante. Los brotes se mantuvieron en frascos de vidrio con aproximadamente 12 mL de medio Murashige-Skoog (M-S) hasta conseguir el tamaño deseado para la aclimatización. Ver figura 4.

El medio M-S adicionado con 5.0 mgL^{-1} BAP y 0.0 mgL^{-1} de 2,4 D generó vitrificados e hiperhidratados formó 12 a 16 brotes por frasco (ver cuadro 4 y figura 3, imágenes b, c y d; mientras que el medio adicionado con 3.0 mgL^{-1} BAP y 0.5 mgL^{-1} 2,4 D, generó brotes de apariencia óptima, de color verde oscuro, areolas y espinas definidas, tamaño uniforme y regular (fig.4). Aunque se presentó oxidación en la base del brote, esta no afectó la sobrevivencia del brote. Este tratamiento generó 26 brotes. Lo que no se observó de acuerdo a Papafotiou, *et al* (2001) con *M. elongata* quienes obtuvieron al aplicar una alta concentración de citocininas con respecto al nivel de auxinas ($1.07 \text{ } \mu\text{M}$ NAA y 11.09 o $22.019 \text{ } \mu\text{M}$ BA) brotes hiperhidratación o vitrificación en tubérculos como explantes de una forma cristada. Giusti *et al*, (2002) propagaron *M. pectinifera*, reportando que la germinación de semillas es relativamente baja 23% respecto a *Escobaria minima* 69% y *Pellecyphora aselliformis* 46%; también la adición de TDZ (tidiazuron) en altas concentraciones indujo gran incidencia en la hiperhidratación o vitrificación con un porcentaje de 64% y 71% éste último con cinetina.

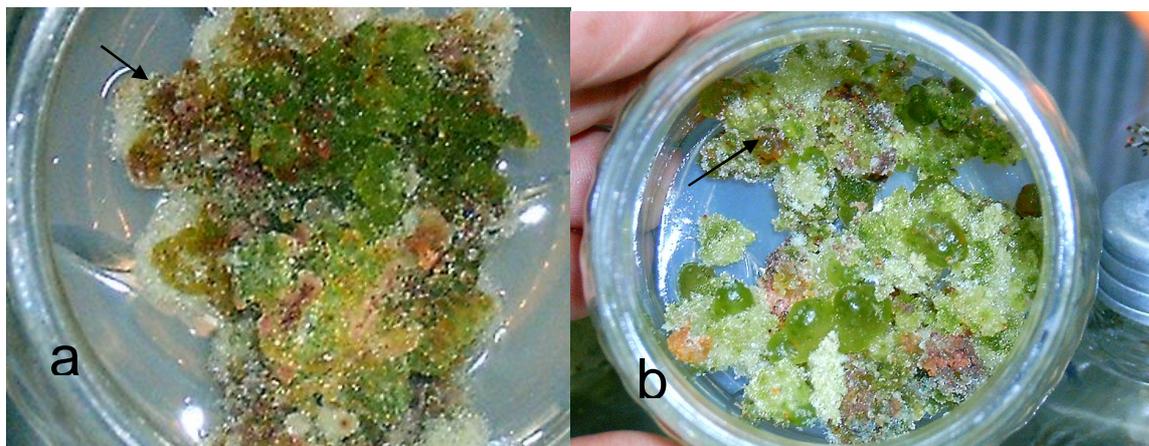
Cuadro 4 Número de brotes obtenidos por tratamiento. Se observa generación de brotes en los tratamientos 3.0 mgL^{-1} BAP sin 2,4D así como en 3.0 mgL^{-1} BAP y 0.5 mgL^{-1} de 2,4 D, sin embargo esto contrasta con el alto numero de

brotos obtenidos a partir de 5.0 mgL⁻¹ BAP y 0.0 mgL⁻¹ 2,4D en donde se observa vitrificación figura 3 en imágenes a y b.

TRATAMIENTOS BAP / 2,4D (mg/L)	Brotos por tratamiento	Brotos por frasco.
0.0/0.0	0	0
1.0/0.0	0	0
1.0/0.5	0	0
1.0/1.5	0	0
3.0/0.0	15	2
3.0/0.5	26	3
3.0/1.5	0	0
5.0/0.0	72	12
5.0/0.5	4	1
5.0/1.5	0	0

Cuadro 5. En esta conjugación de tratamientos se observa una alta cantidad de brotos para el tratamiento de 6.0 mgL⁻¹ Kinetina sin Acido indol acético con vitrificación de los brotos (figura 5), en contraste con la figura 6 donde se aprecian brotos friables y viables

KIN / IAA (mg/L)	Brotos por tratamiento	Brotos por frasco
6.0/0.0	85	14
6.0/4.0	22	3



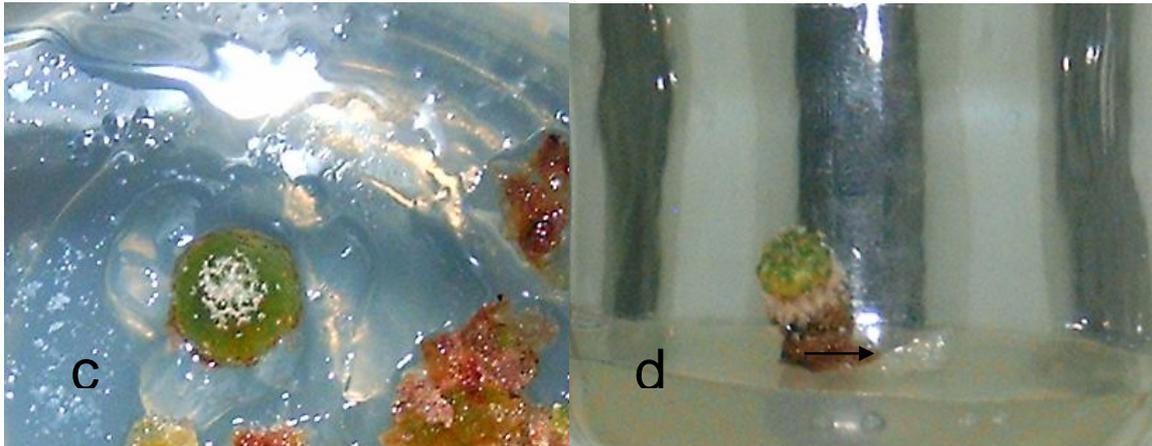
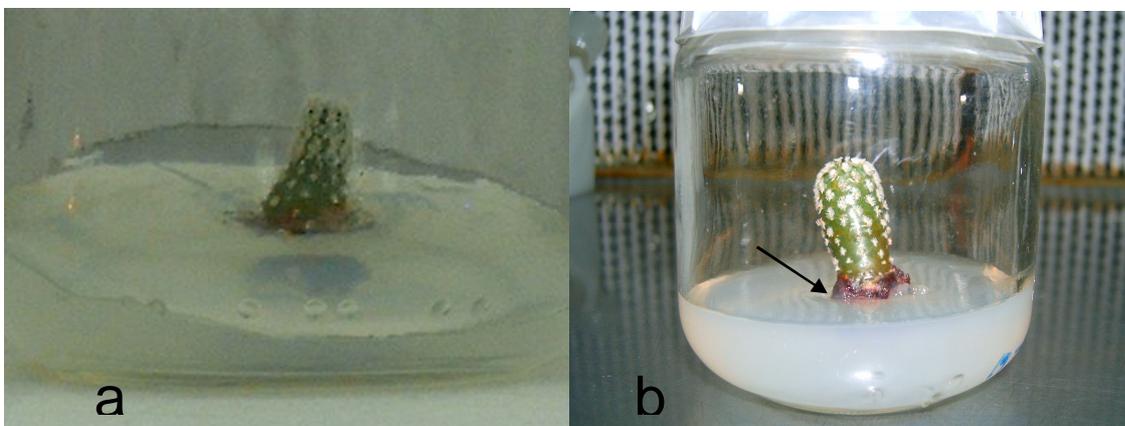


Figura 3 Brotes de *M. pectinifera* con 5mg/L de BAP y 0.0mg/L de 2,4D. a, callo disgregable; b. Múltiples brotes vitrificados con forma irregular sin diferenciación de tubérculos y areolas. c y d, Brotes vitrificados con presencia de oxidación indicado con flechas.

En este estudio la obtención de brotes fue resultado de la combinación de citocininas en diversas concentraciones, de acuerdo a como lo demuestran Guisti *et al.* (2002), quienes desarrollaron brotes en el tratamiento 22.20 μM BAP sin auxina en *Escobaria minima*, *Pellecyphora aselliformis* y *Mammillaria pectinifera* obteniendo brotes viables. Mientras que Fuentes (2003) obtuvo la generación máxima de brotes con 3.0 mgL^{-1} BAP a 48 días del cultivo y con 5.0 mgL^{-1} a las 51 días. Mientras que los resultados obtenidos en este trabajo con el mismo regulador del crecimiento a 3.0 mgL^{-1} con 0.0 y 0.5 mgL^{-1} 2,4D produjeron brotes a las 16 semanas después de cultivar el explante; por otro lado el tratamiento establecido con 5.0 mgL^{-1} y 0.0 mgL^{-1} de 2,4D (en ausencia de auxina) produjo multiplicidad de brotes con vitrificación ó hiperhidratación, figura 3.



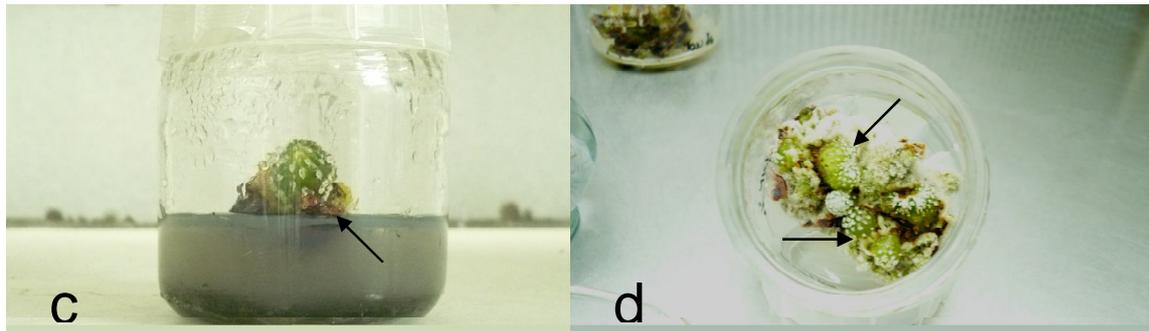


Figura 5. Brotes de *M. pectinifera* obtenidos con Kinetina/IAA 6/0mg/L a 4 semanas con hiperhidratación evidente. Imágenes a, b, c y d muestran callo con regeneración de brote con más definición morfológica como areolas y espinas, solo d presenta multiplicidad de brotes. Las flechas indican anomalías anatómicas.

Los explantes de *M. pectinifera* en un medio rico en citocininas y en ausencia de auxinas responden de manera anómala, en la figura 5; las flechas indican brotes muy “grandes” y vitrificados con callo disgregado en la imagen a); en la imagen b) se observa un brote con color claro con exceso de agua, areolas dispersas y bilobulado en el ápice lo que es un indicador de que 6.0 mgL^{-1} de BAP es una concentración muy alta que favorece la división celular; en la imagen c) se señala una oxidación en la base del brote, ésta reacción de la planta se presentó en este trabajo en todos los tratamientos que solo tenían citocininas y en la imagen d) se observa multiplicidad de brotes con hiperhidratación o vitrificación y se aprecia el aspecto característico de ésta condición como; color claro, apariencia vidriosa, areolas dispersas o muy separadas entre sí y también se observa un brote bilobulado.

Por otro lado Fuentes (2003) menciona que existen otros factores que influyen en la vitrificación del brote como las bajas concentraciones del agar, la baja irradiancia así como un exceso de etileno que se sintetiza cuando las plántulas se encuentran en estrés. (elevadas concentraciones de citocininas o iones NH_4), y que controla el sistema oxidasa-IAA.peroxidasa, encargada de regular los procesos de lignificación en las plantas. Giusti *et al*, (2002) encontraron elementos similares que originan la hiperhidratación como son; la concentración baja del agar en el medio, las diferencias y la concentración alta de citocininas. Sin embargo, es notable señalar que en este estudio la vitrificación se debió a las altas concentraciones de citocininas en ausencia de auxinas (6 mgL^{-1} Kin y 0.0 mgL^{-1} IAA; 5 mgL^{-1} BAP y 0.0 mgL^{-1} 2,4 D) y no a los

factores antes mencionados ya que todos los tratamientos incluidos éstos (3 mgL^{-1} BAP, 0.0 y 0.5 mgL^{-1} 2,4D) se mantuvieron con el mismo medio M-S; como son: con las mismas concentraciones de macronutrientes y micronutrientes, sales, factores de crecimiento, agar y sacarosa que los anteriores.; Poljuha *et al* (2003) mencionan que los reguladores del crecimiento en *M. gracilis in vitro* tienden a modificar la estructura morfológica debido a que las células del parénquima presentan crecimiento excesivo de la vacuola, así como cambios en plastidios (elongación e incremento de tamaño), acumulación de fitoferritina y cambios en la clorofila por daño ocasionado a los cloroplastos; y afirman, que existen organelos de células vegetales muy sensibles como los plastidios que reaccionan desfavorablemente afectando su desarrollo y la diferenciación.

También menciona que un deficiente cloroplasto origina un sistema tilacoidal que se observa en las células del brote, debido a que el medio de cultivo es rico en nutrientes y la actividad fotosintética se ve reducida. Existe una desdiferenciación de los cloroplastos maduros hacia proplastidios, siendo un proceso usual en células cultivadas *in vitro* durante la formación de callo.

Srivastava *et al.* 1971 citado por Poljuha, (2003) mencionan que se producen cambios en la ultraestructura del proplastidio en células de plantas después de ser tratadas con herbicidas. Tal es el caso del 2,4 D que este trabajo se utilizó como regulador del crecimiento aunque también es ampliamente usado como un herbicida, por eso, en concentraciones superiores a 1 mgL^{-1} genera daños en las células como la clorofila que es afectada por la transición de la diferenciación a la desdiferenciación o del crecimiento organizado al crecimiento desorganizado. Las auxinas estimulan el crecimiento al mismo tiempo que inhiben la formación de clorofila en el tejido.

Mientras que la concentración 3 mgL^{-1} BAP y 0.5 mgL^{-1} 2,4D produjeron brotes bien formados y con características deseables (espinas definidas y tallo de buen tamaño, color y estructura del tejido adecuado). Los resultados obtenidos confirman que las especies de cactus responden diferente a los diversos tipos de reguladores del

crecimiento y sus concentraciones (Johnson and Emino, 1979; Clayton *et al.*, 1990., citado por Giusti *et al* 2002). Papafotiou *et al* (2001) obtuvieron producción de brotes de *M. elongata* con una alta concentración de citocininas (96 μM de kinetina, 295 μM de 6 y y dimetilaminopurina y 355 μM de Benciladenina), no obstante como lo sugiere Fay y Gratton, 1992; Hubstenberger *et al* 1992; Papafotiou *et al*, 1992. Sin embargo las respuestas morfogénicas en muchas especies sugieren que necesitan de un adecuado balance entre auxinas y citocininas (George, 1993 citado por Rubluo, *et al.*,2002).

Mata-Rosas, *et al.* (2001) obtuvieron la mayor proliferación de brotes en 8.8-13.32 μM de citocininas, como explantes no utilizaron semillas debido a su baja disponibilidad, intervalos bajos de germinación y la latencia. También reportaron que las citocininas en una combinación de baja a moderada de auxinas inducen la formación de brotes de *Turbinicarpus laui* y la formación de callo presenta alta variación somaclonal inducida por la propagación *in vitro* pero manteniendo la integridad genética para asegurar especies vigorosas. Mientras que Dávila-Figueroa, *et al.* (2005) propagaron ocho especies y subespecies de *Turbinicarpus*, obteniendo que éste género responde de manera diferente a los reguladores del crecimiento, por lo tanto los sistemas de producción *in vitro* pueden ser desarrollados de manera específica para cada especie.

Los mejores resultados de la obtención de brotes fueron con los tratamientos 3.0 mgL^{-1} BAP y 0.5 mgL^{-1} 2,4D y con 6.0 mgL^{-1} de Kin con 4.0 mgL^{-1} IAA, Bhau, (1999) propagó brotes de *Coryphanta elephantidens* con un balance entre auxinas como 2,4D, IAA, IBA, NAA y citocininas como BA y Kin, para la iniciación de la organogénesis en medio M-S en combinaciones tales como 9.06 μM 2,4D e IBA con kin a 4.6 μM promovió la formación de callo sobre el explante , una alta concentración de 2,4D promueve la formación de callo friable. Mientras que la máxima brotación fue con 2.2 μM 2,4D y 4.6 μM Kin con 1.6 brotes.

Santos-Díaz, *et al.* (2003) trabajaron con citocininas como Kin a 4.6 μM y 8.8 μM BAP en *Pelecypora aselliformis*, encontrando hiperhidratación en los dos medios y siendo mayor el número de brotes en BAP

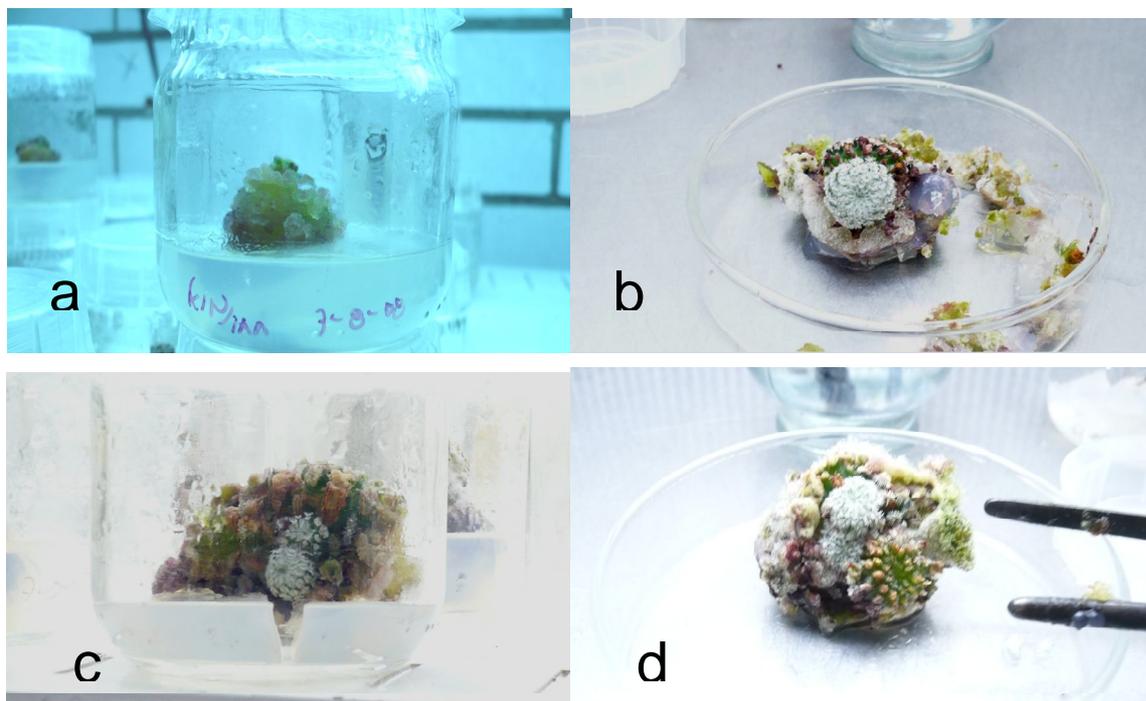


Figura 6. Brotes de *M. pectinifera* con 6mg/L Kin y 4mg/L de IAA, morfológicamente estables, sanos y con buena apariencia así como distribución regular de las espinas.

En la figura 6 la imagen a) muestra un callo generado del explante en óptimas condiciones; mientras que las imágenes b),c) y d) muestra el surgimiento de brotes bien desarrollados, esta misma respuesta se presenta en el otro bloque de tratamientos con un balance adecuado entre auxinas y citocininas; es importante señalar que en estos brotes no se presentó oxidación como en los obtenidos con los tratamientos de BAP y 2,4D.

La hiperhidratación, también conocida como vitrificación involucra múltiples factores de la fisiología y la morfología que dependiendo de la respuesta específica expresan varios grados de daño. Estos factores van desde cambios en la biosíntesis de celulosa y lignina o bien, cambios en el potencial hídrico y potencial mátrico (Gaspar, 1987; citado por Debergh, *et al* 1990). Una de las características del cultivo *in vitro* es que las plantas son mixotróficas o heterotróficas ya que su desarrollo depende del medio de cultivo; carecen de un aparato fotosintético activo lo que se traduce en una baja actividad metabólica que impide la asimilación de carbohidratos, esto es el resultado de

la presencia de altos niveles de sacarosa en el medio (30% y en algunos casos 45%); así como también se debe a que la plántula permanece en el frasco sellado impidiendo el intercambio de gases.

La vitrificación afectó únicamente a los brotes inducidos solo con citocininas en ausencia de auxinas, los siguientes tratamientos con 5.0 mgL⁻¹ de BAP / 0.0 mgL⁻¹ 2,4 D y 6.0 mgL⁻¹ Kin/ 0.0 mgL⁻¹ (ver fir.2 y 4) IAA; se observó que al realizar el primer subcultivo para reducir su efecto murieron los brotes. Pérez-Molphe, *et al.*, (2001) señalan que éste fenómeno es un desorden fisiológico que se debe a las condiciones físicas y químicas del cultivo *in vitro* por ejemplo: la alta humedad, exceso de carbohidratos y minerales al medio, baja intensidad luminosa y altas concentraciones de reguladores del crecimiento.

La causa de la muerte de los brotes vitrificados se debe principalmente como lo señala Fuentes, (2003) en donde observó la presencia de esta forma de estrés fisiológico para los tratamientos 3.0 y 5.0 mgL⁻¹ BAP sin auxina, las cuales presentaron apariencia cristalina debido a una hiperhidratación de las células y deficiencia de clorofilas asociada a altas concentraciones de citocininas, causando aumento en la permeabilidad de la membrana, permitiendo el paso del agua a través de la célula. Cuando se emplean altas concentraciones de citocininas como 3.0, 5.0 ó 10.0 mgL⁻¹ existe el riesgo de obtener plántulas vitrificadas, con bajos niveles de lignina y celulosa, con parénquima cortical atrofiado, que provoca una disminución en la calidad y en la tasa de supervivencia de brotes (Kevers *et al*, 1984, citado por Fuentes, (2003). La BAP induce vitrificación pero cuando los niveles de agar aumentan, éste impide la absorción de ésta y disminuye la vitrificación; esto se relaciona con las diferencias entre el potencial osmótico y el potencial hídrico del tejido y el medio. Sin embargo aunque se indica que con una menor concentración de citocininas en el medio puede revertirse la vitrificación, solo se ha demostrado en plántulas de árboles frutales (Leshem, *et al*, 1988; citado por Debergh, *et al*, 1990) cabe señalar que en *M. pectinifera* no se produjo tal efecto debido a que las plántulas presentaron oscurecimiento producto de la oxidación de algunos compuestos.

Es importante señalar que la vitrificación es estimulada por citocininas, siendo BAP la que más induce este fenómeno por encima de Kinetina en clavel y coníferas (Dencso, 1987, citado por Debergh, *et al* 1990). La vitrificación de cactáceas no disminuye con una menor concentración de citocininas, ya que dichos reguladores del crecimiento mejoran la división celular o cambios en el metabolismo *in vitro* el cual podría explicar el por qué varias especies responden de manera diferente a las mismas y a otras concentraciones (Leonhardt & Kandeler, 1987, citado por Debergh, *et al* 1990).

9.2 Inducción de la raíz

Las raíces comenzaron a desarrollarse a partir de la segunda semana de aplicado el tratamiento de M-S adicionado con (IBA) figura 7. Mientras que el medio con (ANA) produjo formación de callo en la base de la plántula. El medio control no indujo formación de raíces, por lo cual los brotes se transfirieron a la cuarta semana a frascos con suelo previamente estéril aún sin haber generado raíz.



Figura 7. Brotes de *M. pectinifera* con inducción de raíz (2mg/L IBA) en medio M-S a dos semanas. Crecimiento del sistema radical con ácido indol butírico



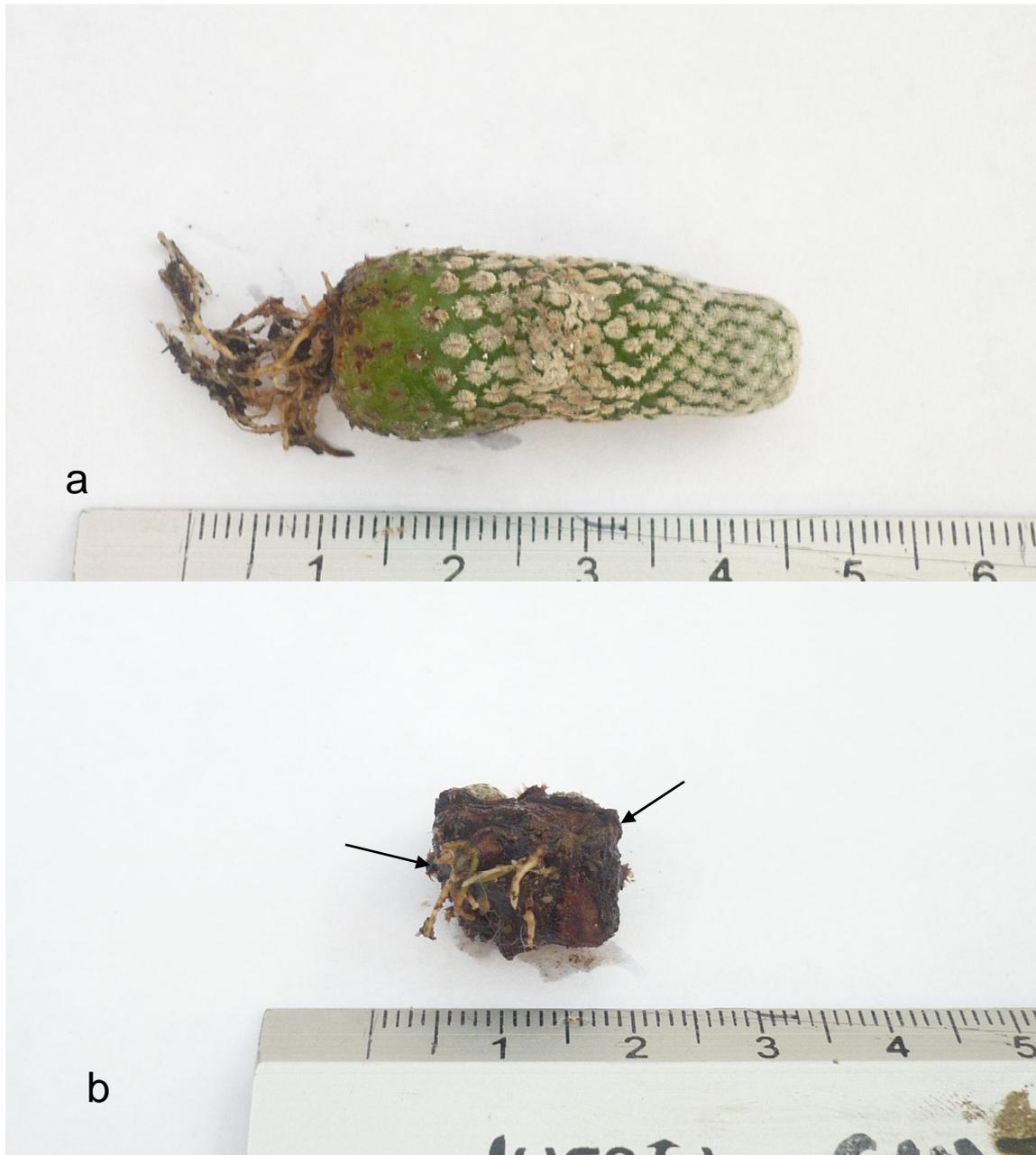
Figura 8. Plántulas con raíz de *M. pectinifera* a 19 semanas de cultivados a partir de explante en medio M-S adicionado con 3 mgL^{-1} BAP y 0.5 mgL^{-1} 2,4 D.



Figura 9. Brotes de *M. pectinifera* obtenidos en medio M-S con 3 mgL^{-1} BAP en ausencia de 2,4 D a 19 semanas

Los brotes obtenidos en medio M-S adicionado con (3 mgL^{-1} BAP y 0.5 mgL^{-1} 2,4D); (3 mgL^{-1} sin 2,4 D) y (6 mgL^{-1} Kin con 4 mgL^{-1} AIA) no arrojaron diferencias visiblemente anatómicas entre sí, ya que podemos observar en las figuras 8, 9 y 10 que las plántulas presentan la misma coloración, una forma similar, espinas y areaolas bien definidas y diferenciadas y con un sistema radical bien desarrollado en la figura 10, la flecha que indica el desarrollo de raíces a partir del explante que dio origen al brote. Es importante señalar que las plántulas obtenidas con kinetina y AIA no generaron raíces con el ácido 3-indol butírico (IBA) ante esta respuesta se transfirieron directamente del frasco en la cámara de cultivo a una mezcla de suelo (figuras 11,12 y 13) para inducir raíces. Las anomalías fisiológicas y anatómicas de las plantas producto de la vitrificación o hiperhidratación impide el adecuado establecimiento de las plántulas que no pueden sobrevivir a las condiciones *ex vitro* debido al estrés. Esto concuerda con Santos-Díaz *et al* (2003) quienes mencionan que los bajos porcentajes de

enraizamiento y la escasa sobrevivencia durante la aclimatización fue debido a las condiciones del brote sobre el medio de cultivo, esto como resultado de utilizar una concentración de 20 μM BA generando con un alto índice de vitrificación para todos los explantes.



Figura

10 Plántulas de *M. pectinifera* a cuatro semanas de establecidas en suelo obtenidas con 6mg/L Kin y 4mg/LIAA.

9.3 Aclimatización

La aclimatización se produjo en dos fases, una, al establecer las plántulas en suelo estéril pero aún en condiciones de laboratorio controladas y la segunda fase contempló el establecimiento también en un suelo estéril en el invernadero. Después de seis meses de haber establecido las plántulas en suelo, se realizaron cortes histológicos a una planta elegida al azar y se compararon con los cortes de plántulas *in vitro*, *in vivo* y aclimatizada. Se hizo énfasis en la epidermis y cutícula en los cortes y el estado de los haces vasculares en los tres cortes (figuras. 11, 12 y 13).

La condición para el establecimiento de las plántulas al suelo consistió en que el lote control (8 organismos) no generó raíces después de dos semanas tal como ocurrió con el tratamiento con 2 mgL^{-1} IBA (8 organismos); los cuales se transfirieron a suelo previamente estéril compuesto de tierra de hoja y tezontle 1:1.



Figura 11. Plántulas de *M. pectinifera* obtenidos con 3 mgL^{-1} BAP y 0.0 mgL^{-1} de 2,4 D a 19 semanas a partir de cultivado el explante.



Figura 12. Plántulas de *M. pectinifera* establecidas en suelo obtenidas con 3 mgL^{-1} BAP con 0.5 mgL^{-1} 2,4D.



Figura 13. Plántulas establecidas en suelo obtenidas 6 mgL^{-1} BAP y 4 mgL^{-1} IAA.

9.4 Cortes histológicos

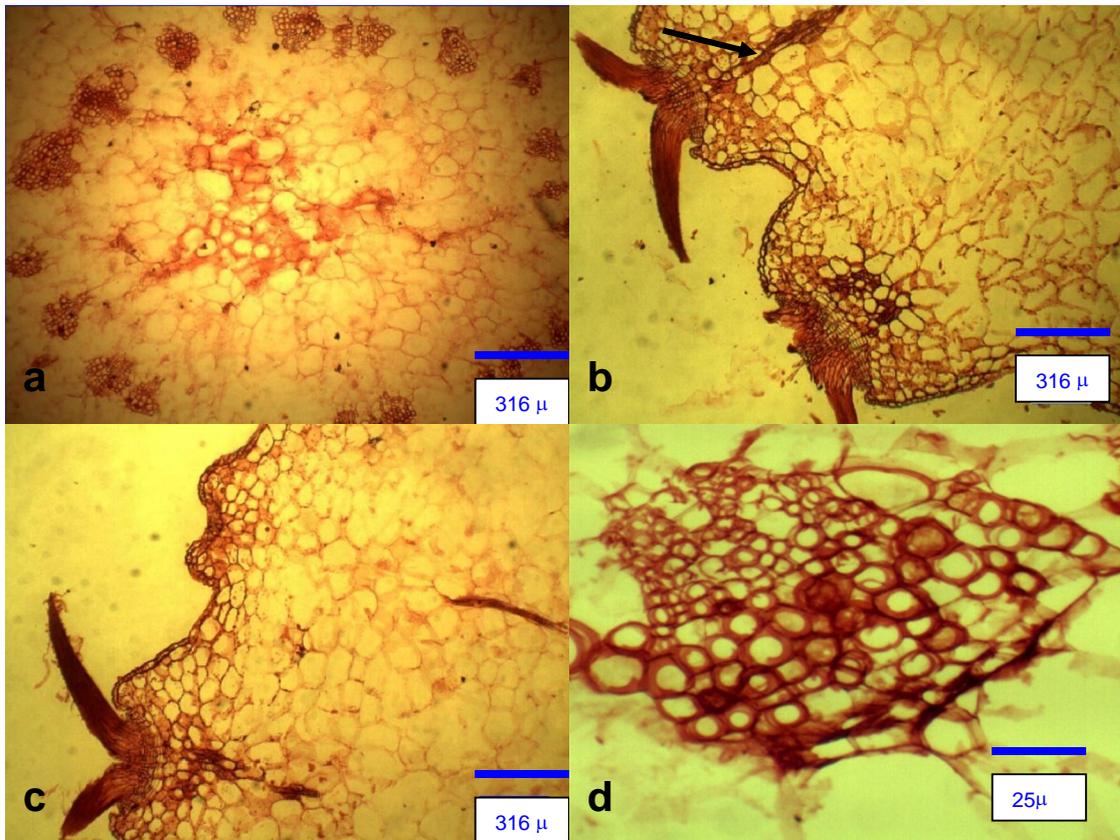


Figura 14 Cortes transversales de *M. pectinifera* *in vitro* de tinción con safranina. a) Cilindro vascular y al centro la médula de parénquima imagen b, c, espinas con tejido vascular emergiendo de la areola y yemas en formación. d, haz vascular mostrando elementos del xilema y células del floema. Las imágenes a, b y c están observadas con la lupa 40 aumentos y la imagen d a 400 aumentos.

Al no percibirse diferencias morfológicas aparentes de las plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* con respecto a plantas *in vivo* se realizaron y se analizaron los cortes histológicos de *M. pectinifera*. Para dar seguimiento al desarrollo de dichas plántulas, primero se realizó la microtecnia en dos organismos *in vitro* que se tomaron directamente del frasco con medio M-S a 20 semanas de haberse generado. En la imagen a) podemos observar el cilindro vascular conformado por los haces vasculares y la médula de parénquima al centro, en la imagen d está una amplificación de un haz vascular a 400 aumentos con las traqueidas vasculares de xilema y el floema hacia la médula.

Para los cortes histológicos es importante destacar que los cactus que nunca producen tallos leñosos presentan solo traqueidas vasculares o WBT (Wide Band Tracheids) que

hacen no solo la función de almacén y conducción de agua sino que dan estructura y soporte a causa de la turgencia por presión; el buen desarrollo de los haces vasculares genera una estabilidad hídrica en la planta (Melo de Pinna, 2009). Esto provee de importantes ventajas selectivas en plantas suculentas de cuerpos cilíndricos pequeños o de formas esféricas en ambientes xéricos; (Mauseth, et al 1995). Las taqueidas vasculares o (WBT) están presentes en todas las plantas de parénquima no lignificado formando “bandas anchas” para dar soporte a las plantas no columnares. De acuerdo con Melo de Pinna (2009) estas estructuras reciben diferente nombre; Gibson (1973) las clasificó como madera no fibrosa, Mauseth, (1995) las determinó como traqueidas vasculares o traqueidas de banda ancha; mientras de Melo de Pinna (2009) las clasificó como parénquima no leñosos. Sin embargo es importante señalar que existen aún pocos trabajos acerca de la anatomía de cactáceas la gran mayoría de ellos se enfocan a especies columnares, no obstante, los elementos dentro de la anatomía de *M. pectinifera* que son comunes a todas las cactáceas como: cutícula, epidermis, córtex, haces vasculares y médula sin embargo se presentan muy claras diferencias como lo reportan Terrazas *et al*, (2005) quienes analizaron la anatomía caulinar de 22 especies del género *Stenocereus* encontrando cristales de sílice en la epidermis e hipodermis – no presentes en *M. pectinifera* -, células de mucílago (atributo que comparten las especies de éste género, destaca el desarrollo de felodermis y la presencia de placa multiseriada en los elementos del vaso. La diferencia de estas adaptaciones anatómicas hace al género *Stenocereus* distintivo ante otros taxones.

Se observó la epidermis simple o uniestratificada en los tres tejidos analizados, solo en los cortes obtenidos *in vivo* y en los aclimatizados se observa cutícula ligeramente colapsada posiblemente debida a un exceso de temperatura durante la inclusión del tejido en Paraplast, también se observan las cámaras subestomáticas y las células oclusivas de los estomas. Tanto la epidermis como la cutícula son estructuras importantes en la sobrevivencia de las plantas obtenidas *in vitro*, ya que el cambio de las condiciones mixotróficas al establecimiento en suelo genera un porcentaje muy alto de daño debido a que las condiciones fisiológicas del medio cultivo como, alta humedad, fuentes de carbono disponibles y un limitado flujo de CO₂ origina poco

desarrollo de la epidermis y que los estomas no cierren adecuadamente (Malda, 1999). Se observa generalmente cambios fisiológicos y anatómicos pero en el caso de los cortes las plantas no existen diferencias entre las plantas *in vitro*, *in vivo* y aclimatadas.

En este estado, *in vitro*, las espinas ya están bien definidas con tejido adyacente de conducción como el xilema en las imágenes b y c en donde podemos ver una areola joven y se aprecia la epidermis muy uniforme uniestratificada que se ve a detalle también en la imagen f de la figura 15. En esta figura referida muestra el ápice de *M. pectinifera* en un corte longitudinal en las imágenes a y e.

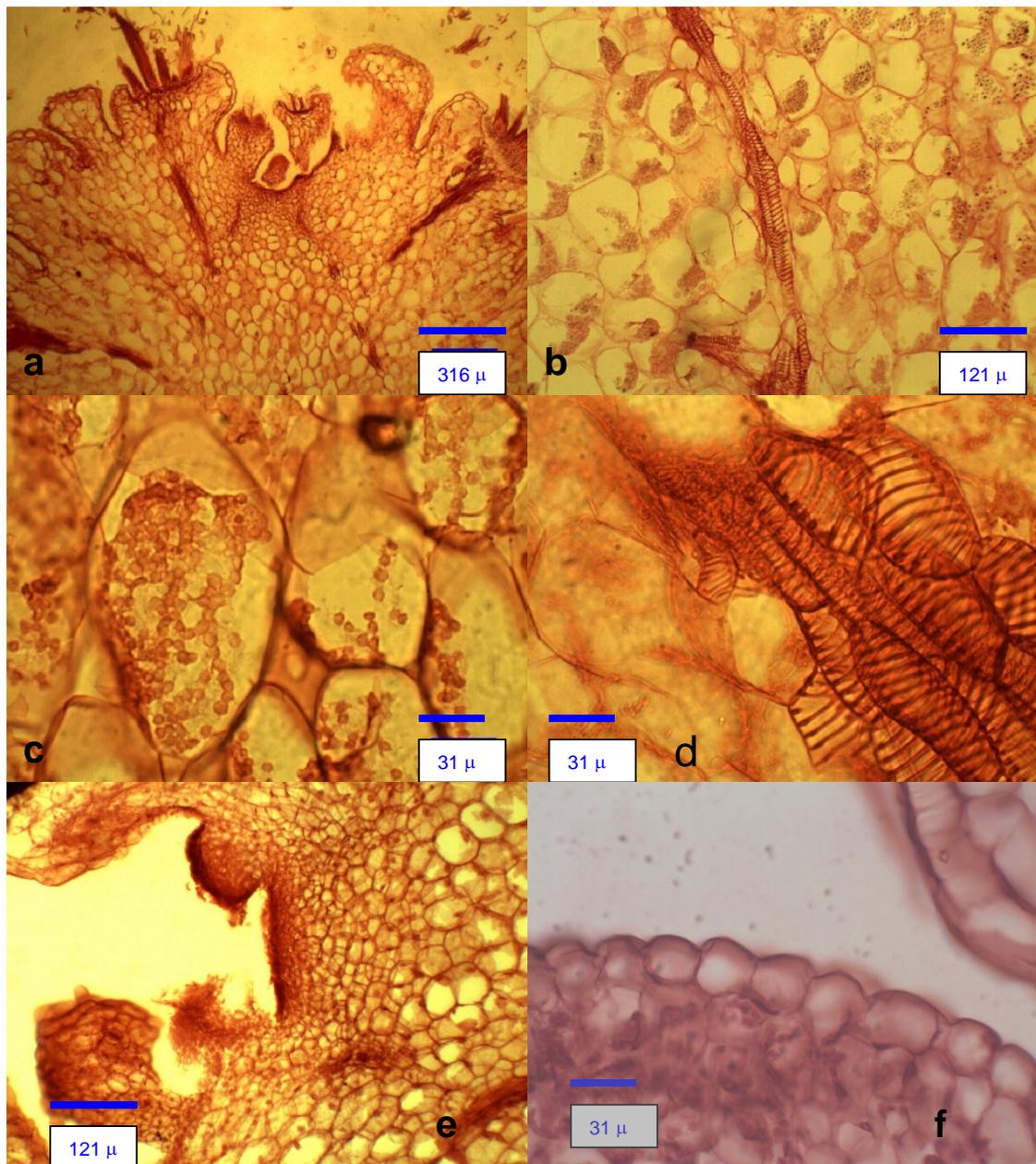


Figura 15. Cortes longitudinales de *M. pectinifera in vitro* con tinción de safranina. a) Meristemo apical, areolas con espinas, yemas en formación y córtex a 40 aumentos. b) Parénquima con células del vaso 100 aumentos. c) células con cloroplastos 400 aumentos. d) traqueidas vasculares 400 aumentos (Wide Band Tracheids), e) meristemo apical a 10 aumentos, f) epidermis uniestratificada con células del clorénquima subyacentes a 400 aumentos.

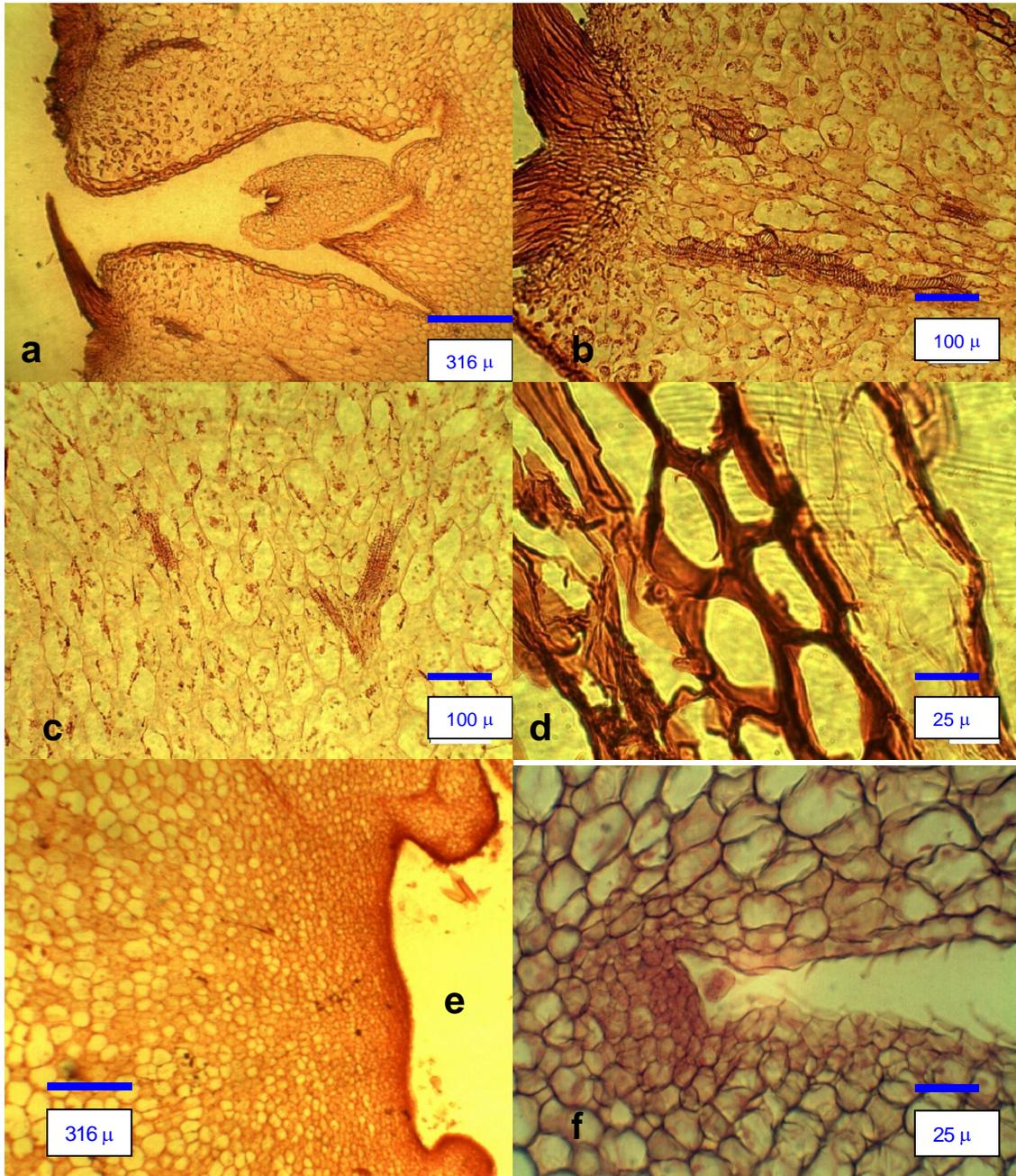


Figura 16. Cortes longitudinales de *M. pectinifera in vivo* con tinción de safranina. a) Meristemo apical y yemas con espinas a 40 aumentos, b) tubérculo con sistema vascular y diferenciación de las espinas 100 aumentos, c) cortex, médula y haces vasculares a 100 aumentos; d) cutícula y epidermis 400 aumentos, e) Meristemo apical 40 aumentos, f) meristemo lateral de la región axilar 400 aumentos.

Figura en cortes longitudinales de dos plantas *in vivo* en donde se muestra la continuidad en el desarrollo de *M. pectinifera* con respecto a *in vitro*; se puede ver el ápice en las imágenes a y e; por otro lado, se observan células parenquimáticas en

todo el volumen del tejido de la imagen b, en los extremos se localizan con mayor frecuencia cloroplastos, esta disposición nos indica que la planta ya realiza fotosíntesis. Es importante señalar que la epidermis y la cutícula son estructuras imprescindibles en el desarrollo y establecimiento de las plantas obtenidas *in vitro*, en especial, de las cactáceas, ya que éstas estructuras tienen la función de proteger a la planta del ambiente y permite el intercambio de gases; la imagen d) permite apreciar la cutícula y una epidermis biestratificada con algunas células subyacentes ligeramente colapsadas, esto se debió principalmente a la exposición prolongada del tejido al calor durante el proceso de inclusión en Paraplast.

En la figura 17 se muestran cortes transversales del mismo tejido, *in vivo*, en donde se aprecia la cutícula y la epidermis en una mamila. También la formación de nuevos órganos indica el buen establecimiento de la planta a las condiciones del ambiente, como es el caso de la imagen c; la imágenes d y e pertenecen a la misma estructura, el cilindro vascular, a 100 y 40 aumentos respectivamente las flechas señalan las traqueidas vasculares o las wide band tracheids (WBT)

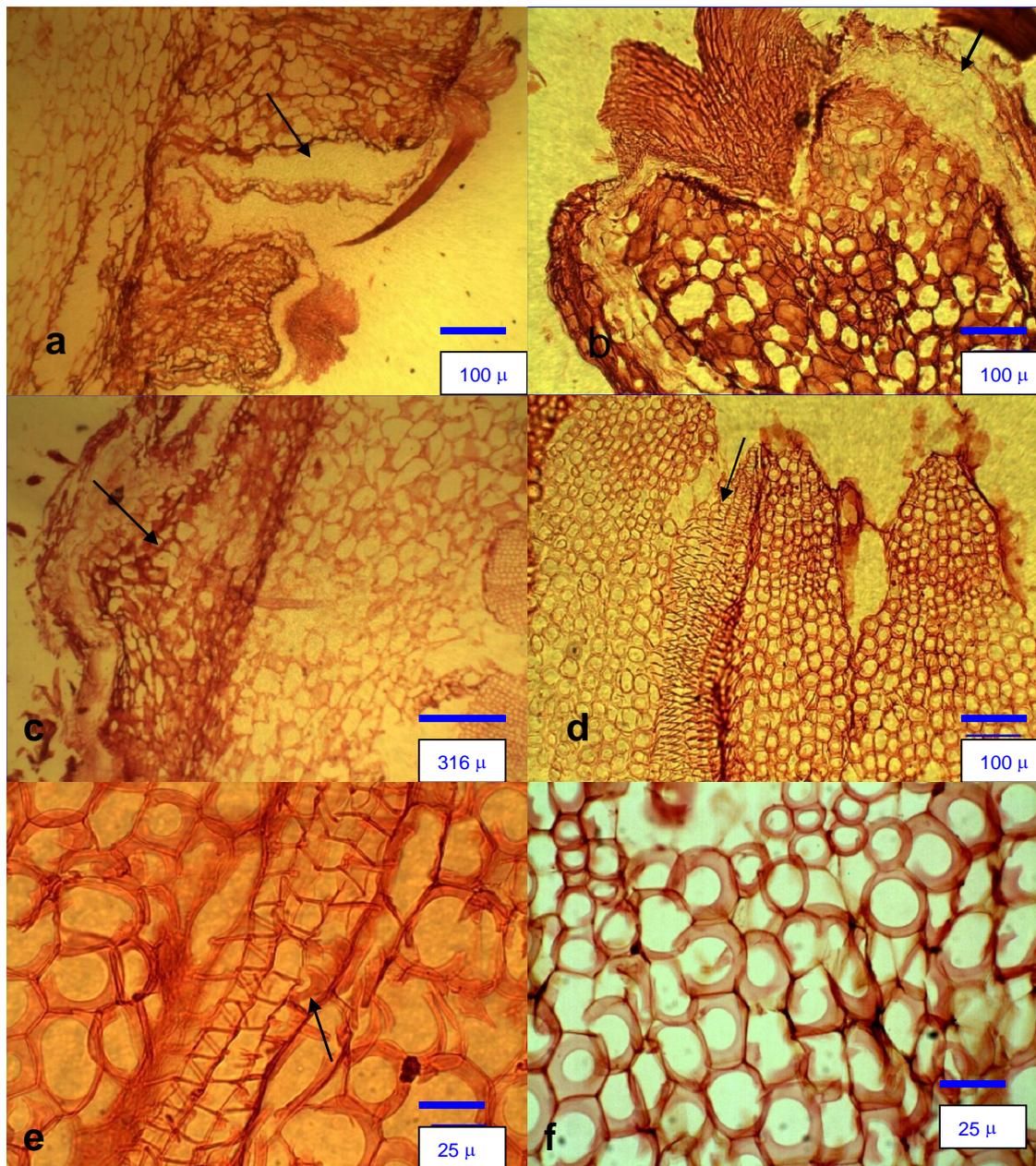


Figura 17 Cortes transversales de *M. pectinifera in vivo* 100 aumentos en tinción con safranina. a y b Tubérculos definidos con areola y se observa la cutícula, la epidermis, parénquima y las espinas. Imagen c muestra formación de una nueva yema, se aprecia el cortex 40 aumentos. En d y e se aprecian fibras y elementos del vaso a 100 y 400 aumentos respectivamente. Imagen f traqueidas vasculares o wide band tracheids (WBT) a 400 aumentos.

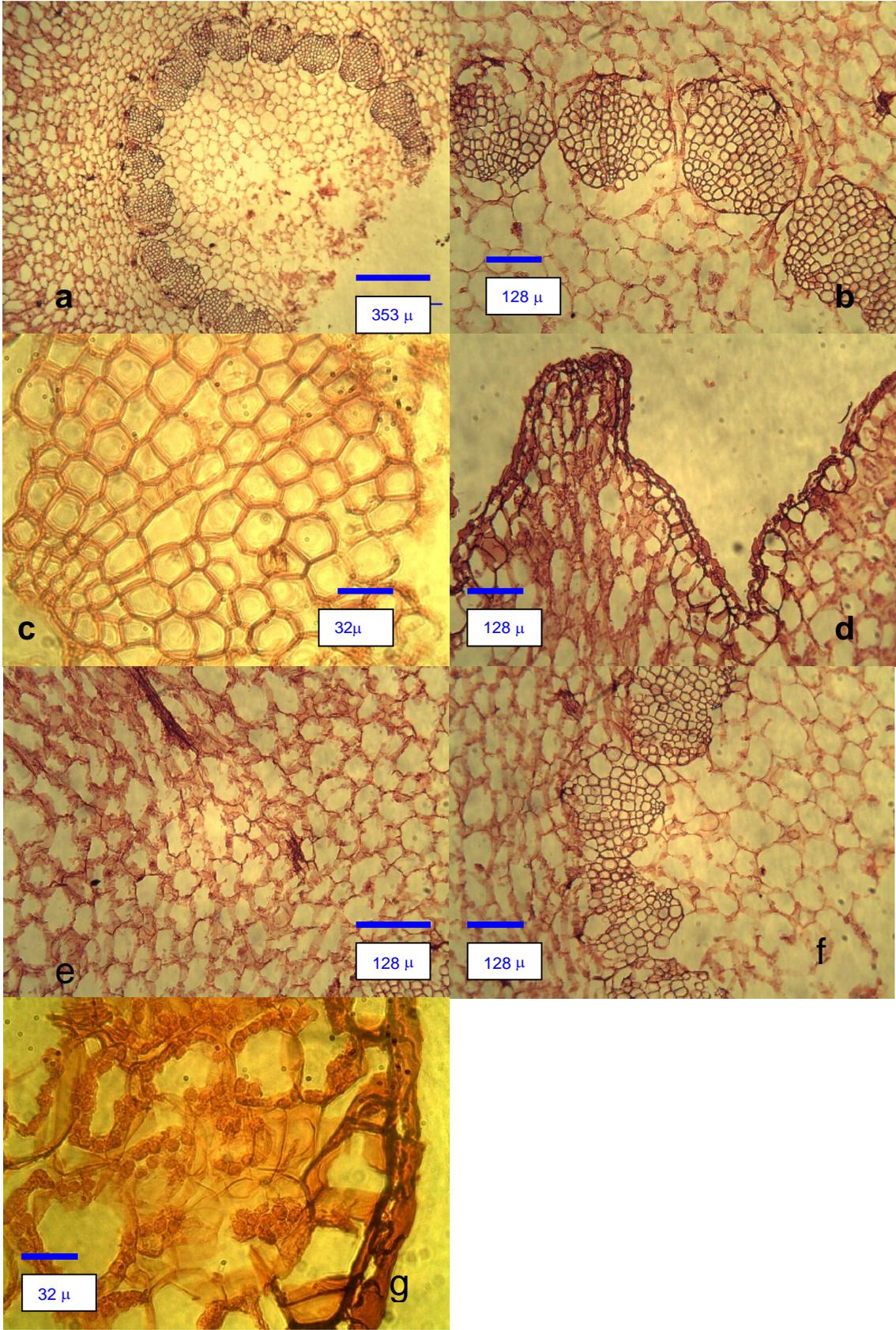


Figura 19. Cortes transversales aclimatados de *M. pectinifera* obtenidos *in vitro* con tinción en safranina a y b haces vasculares a 40 y 100 aumentos respectivamente, c floema, xilema y células acompañantes a 100 aumentos. Imagen d cutícula, epidermis y parénquima en una areola en formación, e y f se aprecian células de parénquima del córtex y de la médula ligeramente colapsadas. g muestra vista parcial de la cutícula, la epidermis y células del parénquima con cloroplastos.

El córtex presenta células parenquimáticas isodiamétricas siendo importante la presencia de cloroplastos en la posición más externa de la planta en los cortes *in vivo* y aclimatizados. Estas características son propias de plantas con crecimiento secundario con formación de tallos leñosos los cuales no se presentan en *M. pectinifera*, Mauseth, (2003) menciona que las traqueidas vasculares o Wide Band Tracheids helicoidales que tienen una función de transporte o conducción pero no es de soporte, plantas globosas como *M. pectinifera* se sustentan con la presión de turgencia. Éstas estructuras están presentes en los tres tipos de corte (*in vitro*, *in vivo* y aclimatadas) y la forma helicoidal provee flexibilidad a la planta se puede contraer en tiempo de sequía y expandir en tiempo de mayor humedad ambiental o lluvias, cabe señalar que el desarrollo de ésta característica anatómica es un factor fundamental para la absorción de agua a través de los haces vasculares de las raíces y el resto de la planta.

Los haces vasculares son notablemente similares en los tres tratamientos; en los tejidos aclimatados se observa el cilindro vascular formado por una sucesión de esteles donde se observan elementos, células floemáticas y las células acompañantes. Es importante señalar que existen ligeras variaciones en la anatomía de cactáceas como lo reportan Terrazas *et al* (2005) para plantas columnares como el género *Stenocereus*, no obstante es importante señalar que no existen diferencias anatómicas entre los tres tratamientos ya que presentan todos un médula, cilindro de haces vasculares córtex y epidermis.

En los tres cortes se observa la presencia de epidermis; mientras que la cutícula sólo se observa en los cortes aclimatados y cortes *in vivo*. Una de las razones por las cuales la cutícula no está formada en las plántulas *in vitro* es por las condiciones del medio de cultivo; como lo explica Coca, (2002) las condiciones mixotróficas del tejido al crecer en

un medio rico en carbono pero con nulo intercambio gaseoso del exterior inhibe la formación de las ceras y de la cutícula.

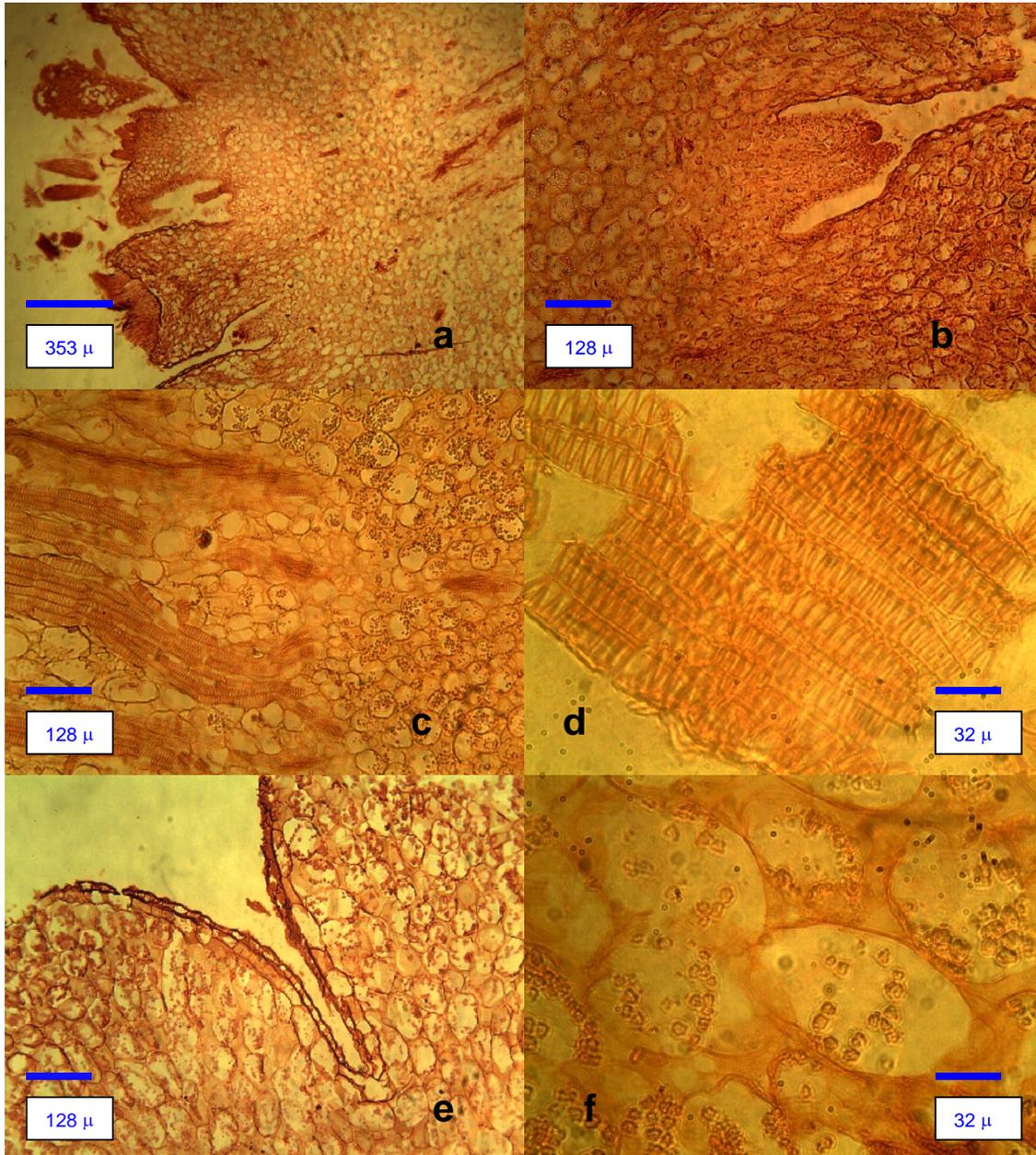


Figura 19 Cortes longitudinales de *M. pectinifera* aclimatados obtenidos *in vitro* en tinción con safranina en las imágenes a y b se observa el meristemo apical y la formación de areolas y espinas, c Cilindro vascular y más exterior clorénquima con cloroplastos, d vista parcial de los vasos del xilema, e Vista de dos areolas y axila donde se aprecia una epidermis y subepidermis definidas y f células del parénquima en empalizada con cloroplastos.

Las observaciones histológicas para plántulas *in vitro*, *in vivo* y aclimatizadas no muestran diferencias en las células que conforman cada uno de los tejidos como lo son la epidermis, el cortex, y el cilindro vascular; los cuales se observan sin alteraciones, bien definidos y sin distorsión de células. Esto nos indica que las plántulas obtenidas *in vitro* se generaron en óptimas condiciones de micropropagación ya que histológicamente son similares a las plántulas *in vivo* así como el proceso de aclimatización resultó ser un factor importante en el desarrollo de la anatomía al encontrarse similitudes en los dos grupos anteriores. Es importante señalar que la técnica histológica propuesta por Curtis, (1986) se modificó en el tiempo de deshidratación e inclusión hasta 4 horas. Solamente los tejidos de desarrollo *in situ* requirieron de más tiempo en todos los procesos fijación con F.A.A, deshidratación e inclusión en parafina; esto debido a la firmeza del tejido.

X. Conclusiones

La obtención de brotes se generó con las concentraciones; 3 mg/L⁻¹ de BAP y 0.5 mgL⁻¹ de 2,4 y 6 mgL⁻¹ Kin con 4 mgL⁻¹ IAA, siendo éste ultimo tratamiento el que produjo mejores resultados en menor tiempo, y con buen viabilidad para la sobrevivencia en un sustrato.

Se logró reproducir *M. pectinifera in vitro* a partir de plántulas jóvenes de la misma edad y producidas a partir de semilla en el vivero.

Los cortes histológicos no arrojaron diferencias anatómicas entre las plantas obtenidas *in vitro*, *in vivo* y aclimatadas lo cual nos indica que las plantas obtenidas *in vitro* con aclimatización pueden sobrevivir ya que cuentan con todos los tejidos anatómicos para poder establecerse y tener un desarrollo similar a las plantas *in situ*

Se establecieron varias modificaciones a la técnica histológica de Curtis (1986) debido a que no contempla en plantas suculentas y todos las etapas como la fijación, la deshidratación y la inclusión en Paraplast a las cuales se les prolongo el tiempo y el número de repeticiones. De esta manera se estandarizó la técnica para cactáceas tanto obtenidas *in vitro*, *in vivo* y posteriormente aclimatadas que permitió llevar a cabo el estudio anatómico y comparativo.

XI. Recomendaciones y aportaciones finales

Se obtuvieron las concentraciones adecuadas para producir plántulas de *M. pectinifera* a gran escala, en un tiempo corto, con respecto a propagar individuos por semilla y con la utilización de muy poco material vegetal, siendo un buen referente para futuras investigaciones con otros géneros y especies de cactaceas.

Una de las ventajas de el cultivo de tejidos *in vitro* es la propagación y obtención de nuevos organismos a partir de poco material ya sea un fragmento de tallo o la semilla como explante, en las cactáceas; así como tener una gran cantidad de organismos con los cuales se podría satisfacer la demanda comercial con plantas totalmente viables

Es muy importante comentar que la técnica del cultivo de tejidos solo se ha aplicado a algunas especies vulnerables de la familia *Cactaceae* que se ubican en la Lista Roja de CITES y en la NOM-059-ECOL como especie Amenazada así como, es importante señalar la escasez de trabajos sobre estructuras anatómicas en este grupo taxonómico; además del fomento de investigaciones que enriquezcan el conocimiento sobre su biología y programas de propagación en viveros como el Cuthá, todo esto dentro de planes de manejo para la Reserva de la Biosfera de Tehuacan-Cuicatlán

XII. Literatura citada

Anaya, C. D.; Varela V. G. 2000. Estudio integral del valle de Tehuacan, Puebla y Cuicatlán Oaxaca. Tesis de Ingeniero Agrónomo. División de Ciencias Forestales Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco Estado de México. p. 137.

Anderson, F. E. Arias, S; Taylor, N.P. 1994. Threatened cacto of México, Royal Botanic Gardens Kew, London U.K.

Arias, M. S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. In:R. Gío-Argáez and López-Ochoterena, Editores, diversidad Biológica en México, Sociedad mexicana de Historia Natural, México, D.F. pp. 109-116.

Arias, T. A.; Valverde, V. M; Reyes, S. Jerónimo. 2001. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ayala, C. G; Terrazas, T; López-Mata, L; Trejo, C. 2006. Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. Journal of Experimental Botany. 5(12):3165-3174.

Becerra, R. 2000 Las Cactaceas, plantas amenazadas por su belleza. Biodiversitas. CONABIO. 6:32. 1-5.

Bhau, B.S. 1999. Regeneration of *Coryphanta elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants. Scientia Horticulture 81:337-344.

Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Vol.I.p.p.755

Bravo-Hollis, H; Scheinvar, L. 1995. El interesante mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México.pp 233.

CITES, 2005. Appendix I. <http://www.cites.org/eng/app/apendices.shtml>

Clayton, P. W.; Hubstenberger, J. F.; Phillips, G. C.; Butler-Nance, S. 1990. Micropropagation members of the cactaceae subtribe Cactinae. Journal American Society Horticulture Scientific. 115:337-343.

Curtis, P. J. Microtecnia Vegetal. Editorial Trillas. México D.F. 1986 pp.107.

Dávila-Aranda, P.D. 1983. Flora genérica del Valle de Tehuacan. Ed. Nuestra Ciudad, Tehuacan Puebla, México.

Dávila-Aranda, P; Villaseñor, J. L.; Medina, R; Ramírez, A; Salinas, A; Sánchez-Ken; Tenorio, P. 1993. Listados florísticos de México. Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.

Dávila, A. P y Herrera-MacBryde.1997. In WWF and IUCN. Centres of plant diversity. A guide and strategy for their conservation. 3 volumes. IUCN Publications Unit. Cambridge, U.K.

Dávila-Figueroa, C.; De la Rosa,C. M.; Pérez-Molphe, B. E. 2005. In vitro propagation of eight species or subspecies *Turbinicarpus* (Cactaceae). In vitro Cell Development Biology Plant 41:540-545.

Debergh, P. C.; Zimmerman,R. H. 1990. Micropropagation. Tecnology an application. Ziv, M.Capítulo: Vitrification: Morphological and physiological disorders of in vitro plants. Kluwer Academic Publisher USA.

Esparza-Olguín, L; Valverde, T; Vilchis-Ayala, E. 2002. Demographic analysis of a rare columnar cactus (*Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, México. *Biological Conservation*. 103:349-359.

Fay, M. F. 1994. In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity conservation*. 3:173-186.

Fay, M. F; Gratton, J., Atkinson, P.J. 1995. Tissue culture of succulent plants-an annotated bibliography. *Bradleya*. 13: 38-42.

Flores-León, R. Y Ortiz-Montiel, G. 2000. In vitro culture of *Cephalocereus senilis* (Haworth) Pfeiffer through areole activation of etiolated plants. *Haseltonia*. 7:91-96.

Fuentes, M. V. 2003. Reintroducción de *Coryphanta elephantidens* (Lem) Lem a partir de plántulas propagadas in vitro. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM.

García, E; 1973. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México.

García, V. O. Dispersión biótica de semillas de la cactacea *Stenocereus pruinosus* (otto) F. Buxb. En el valle de Tehuacán Puebla. México.

George, E. F. 1993. Plant propagation by Tissue culture. Part 1: The Technology. Exegetics Limited, Edigton, pp. 574.

Giusti, P; Vitti, D; Fiocchetti, F; Colla, G; Saccardo, F; Tucci, M. 2002. In vitro propagación of the three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*. 95: 319-332.

Godínez, A.H. 1998. Los desiertos mexicanos. Sus características e importancia. *Ciencia y Desarrollo*. 143. 16-22.

Godínez-Alvarez, H.; Valverde, T.; Ortega-Baez, P. 2003. Demographic trends in the Cactaceae. *Botanicals Review*. 69:173-203.

Hartmann, T. K.; Davies, F.T. y Geneve, R.L. 1997. *Plant Propagation: Principles and practices*. Sixth edition. Prentice-Hall. New Jersey. U.S.A.

Hernández, H. M.; Bárcenas, R. T. 1995 Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution Patterns. *Conservation Biology*. 9:1176-1188.

Hernández, H. M.; Bárcenas, R. T. 1996. Endangered cacti in the Chihuahuan Desert II. Biogeography and conservation. *Conservation Biology*. 10:1200-1209

Hernández, T.; Canales, M.; Ávila, J.G.; Durán, A.; Caballero, J.; Romo de Vivar, A.; y Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlan de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 181-188.

Hernández, H. M.; Godínez, H. Contribución al conocimiento de cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52.

Hunt, D. 1992. CITES, Cactaceae Checklist 1st edition. Royal Botanical Gardens Kew, London, U.K.

Jankiewicz, L. S. 2003. *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción*. ed. Mundi-Prensa. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Jhonson, J. L., Emino, E. R. 1979. In vitro propagation of *Mammillaria elongata* *Horticulture Science*. 14:605-606.

Lamhamedi, M.S., Chamberland, H., Tremblay, F. M. 2003. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. *Physiologia Plantarum*. Denmark. 118:554-561.

León, L J. y Valiente-Banuet , A. 1994. Las cactáceas: un recurso natural diverso y predominantemente mexicano. *Ciencia y desarrollo*. 65: 63-70.

Malda, G. Backhaus, R. y Chris, M. 1999. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant cell and organ culture*. 58:1-9.

Mata-Rosas, M; Monroy de la R, M; Moebius-Goldammer, K. y Chavez-Ávila V.M. 2001. Micropopagation of *Turbinicarpus laui* (Glass et Foster); an endemic and endangered species. *In vitro Cell Development Biology Plant*. 37:400-404.

Mauseth, J. D. 1979. A new method of the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Journal Cactus and Succulents*. U. S.A. 51:186-187.

Mauseth, J. D.; Plemons-Rodríguez, B. J. 1997. Presence of paratracheal water storage tissue does not alter vessel characters in cactus wood. *American Journal of Botany*. 84(6): 815-822.

Mauseth, J. D. 2004. Wide-band tracheids are present in almost all species of Cactaceae. *Journal Plant Res* 117:69-76

Mauseth, J. D.; Uozumi Yoriko; Plemons, B. J.; Landrum, J. V. 1995. Structural and systematic study of an unusual tracheid type in cacti. *Journal Plant Res*. 108: 517-526

Mélo de Pinna, G. 2009. No lignified parenchyma in Cactaceae and Portulacaceae. Botanical Journal of the Linnean Society. 159:322-329.

Meyrán, G. J. 1973. Guía Botánica de Cactáceas y otras Suculentas del Valle de Tehuacán. Sociedad Mexicana de Cactología, México D.F. p.p.4

McNeish, R S; Byers, D. S. 1967. The prehistory of the Tehuacán Valley. Vol. I Environment and subsistence. University of Texas Press. Austin, Texas. Chapter 15:290-331.

Moebius-Goldammer, K. G.; Mata-Rosas, M y Chávez-Ávila, V. M. 2003. Organogénesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem) K. Schum. (Cactaceae) an endemic and endangered mexican species.

Murashige, T., Skoog, F., 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiology Plant. 15 :473-479.

Norma Oficial Mexicana. 1994. NOM-059-ECOL-1994. Que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres, terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial de la Federación. Primera Sección (16 de mayo de 1994). México D. F. p.p. 58.

Norma Oficial Mexicana. 2002. NOM-059-ECOL-2001-2002. Protección ambiental- Especies nativas de México de flora y fauna silvestres- Categorías en riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Segunda Sección (6 de marzo 2002). México D. F. pp. 81

Ortiz, M. G. y Alcántara, G. R.: 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coultet). Cactáceas y Suculentas Mexicanas. Tomo XLII No. 1 Enero-Marzo p. 3-6.

Papafotiou, M., Balotis, G. N. ; Louka, P. T. y Chronopoulos John. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and ciliate forms. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65:163-167.

Paranjothy, K., Saxena, S., Banerjee, M., Jaiswal, V. S. y Bhoojwani, S. S. 1990. Clonal multiplication of woody perennials , in Plant tissue Culture, Applications and Limitations, Development in Crop Science. Ed. Elsevier Publisher, Amsterdam p.p. 33.

Pérez, C. J. 2002. Criopreservación de *Strombocactus disciformis* (De Candolle). Britton y Rosse, como alternativa de conservación de cactáceas amenazadas. Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios superiores Iztacala. UNAM. p.p. 7.

Pérez, C. J; Flores, R. y Ortiz, M. G. 1999. Reproducción *in vitro* del cactus de Navidad *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. Tomo XLIV Año 44 No. 3 Julio-septiembre p.79-83.

Pérez-Molphe, B. E. y Dávila-Figueroa, C. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. Strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In vitro Cell Development Biology Plant.* 38:73-78.

Peters, E. M.; Martorell, C.; Ezcurra, Exequiel. 2009. The adaptative value of cued seed dispersal in deserts plants: seed retention and release in *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae), a small globose cactus. *American Journal of Botany* 96(2): 537-541.

Pierson, E.A.; Turner, R.M. 1998. An 85 years study of saguaro (*Canegiea gigantea*) demography. *Ecology*. 79:2676-2693.

Polhua, D., Balen, B., Bauer, A., Ljubescic, n., Krsnik-Rasol, M. 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) in *in vitro* culture. *Plant Cell, tissue and organ Culture*. 75:117-123.

Ponce-Bautista, A.; Jiménez-Sierra, C.; Valverde, P. L.; Vázquez, D. E.; Rendón, A. B.; Zavala-Hurtado, J. A.; López-Ortega, G.; Pérez-Hernández, M. A.; Rivas, A. S.; Cornejo, R. A. 2007. Aspectos de la morfometría floral y biología reproductiva de *Mammillaria pectinifera*. (Stein) F.A.C. Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.

Rubluo, A.; Marín – Hernández, T., Duval, K.; Vargas, A. y Márquez-Guzmán. 2002. Auxin induced morphogenetic responsis in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticultura* 95: 341-349.

Sánchez-Martínez, E. 1994. Avances en la micropropagación *in vitro* de cactáceas. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro. México. pp. 39.

Sandoval, Z. E. 2005. Técnicas Aplicadas al Estudio de la Anatomía Vegetal. Cuadernos 38. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 278.

Santos-Díaz, M. S.; Méndez, O. A.; Arredondo, G. A.; Santos, D. M. 2003. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 39:480-484.

Schemske, D. W. ; Husband, B.C.; Ruckelshaus, M. H; Goodwillie, C; Parker, I. M.; Bishop, J. G. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*. 75:584-506.

Steenbergh, W. F. y Lowe. C. H. 1969. Critical factor during the first years of life of the saguaro (*Cereus giganteus*) at the Saguaro National Monument, Arizona. *Ecology*. 50:825-834.

Steenbergh, W. F; Lowe, C. H. 1977. Ecology of the Saguaro II: reproduction, germination, establishment, growth and survival of the young plants. National Park Services Scientific Monograph series No. 8, Washington, D.C.

Steenbergh, W. F; Lowe, C. H. 1983. Ecology of the Saguaro III: growth and demography. National Park Services Scientific Monograph Series No. 17, Washington, D. C.

Terrazas, T; Loza, C. S.; Arreola N. H. 2005 Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus* (Cactaceae). *Acta Botánica Venezuéllica*. 2:321-336.

Valiente-Banuet, A; Solís, L; Dávila, P; Del Coro, A. M.; Silva, P. C.; Ortega-Ramírez, J; Treviño, C. J.; Rangel-Landa, S. y Casas, A. 2009 Guía de la vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlan.. México DF. pp. 206.

Valverde P. L.; Zavala-Hurtado, J. A.; 2006. Assessing the ecological status of *Mammillaria pectinifera* Weber (Cactáceae), a rare and threatened species endemic of the Tehuacán-Cuicatlán región in central Mexico. *Journal Arid Environments* 68:193-208.

Valverde, P.L.; Zavala-Hurtado, J. A.; Rendón, B; López, G.; Jiménez, C.; Pérez-Hernández, M.A.; Cornejo, A; Rivas, S. R. y Armella. M.H. 2007 Boletín de la

Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactaceas y Suculentas. 4(3) septiembre-diciembre.

Zavala-Hurtado, J. A.; Valverde, P.P.L.; Díaz, S. A.; Macias, M. A.; Hernández, C. G.; Rojas-Aréchiga, M.; Herrera, F. M.C.; Rivera; H. J y De la Rosa, R.O. 1997. Estatus ecológico de *M. pectinifera* Weber y *Mitrocereus fulviceps* Weber en el Valle de Zapotitlán, Puebla. CONABIO-UAMI.p.p.57

Zavala, H.J.A. 1982. Estudios ecológicos en el Valle semiárido de Zapotitlán, Puebla. Clasificación numérica de la vegetación basada en atributos binarios de presencia o ausencia de las especies. *Biótica* 7:99-1202

