



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Regeneración *in vitro* de
Mammillaria bombycina Quehl
(Cactaceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

MARISELA YÁÑEZ MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

2011



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.

1. Datos del alumno.

Yáñez
Martínez
Marisela
15 17 13 25
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
09802630-4

2. Datos del tutor

Dr
Víctor Manuel
Chávez
Ávila

3. Datos del sinodal 1

Dra
Alicia Enriqueta
Brechú
Franco

4. Datos del sinodal 2

M en C
Octavio
González
Caballero

5. Datos del sinodal 3

Biol
Gabriel
Olalde
Parra

6. Datos del sinodal 4

Biol
María Concepción
Guzmán
Ramos

7. Datos del trabajo escrito

Regeneración *in vitro* de *Mammillaria bombycina* Quehl
86 páginas
2011

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Abreviaturas	
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN	6
II. ANTECEDENTES	9
II.1 Biodiversidad	9
II.2 Generalidades de la Familia Cactaceae	9
II.2.1 Características morfológicas de las cactáceas	11
II.2.2 Formas de Vida de las cactáceas	12
II.2.3 Metabolismo en cactáceas	13
II.2.4 Semillas de las cactáceas	14
II.2.5 Germinación en cactáceas	14
II.2.6 Uso e importancia de las cactáceas	17
II.2.7 Estatus	19
II.3 Género <i>Mammillaria</i>	23
II.3. Descripción botánica del género <i>Mammillaria</i>	23
II.4 <i>Mammillaria bombycina</i> Quehl	24
II.4.1 Clasificación taxonómica de <i>M. bombycina</i>	25
II.4.2 Descripción botánica de <i>M. bombycina</i>	26
II.4.3 Distribución geográfica de <i>M. bombycina</i>	27
II.4.4 Estatus <i>M. bombycina</i>	27
II.5 Conservación	28
II.6 Métodos convencionales de propagación en cactáceas	29
II.7 Cultivo de Tejidos Vegetales	30
II.7.1 Explantes	33
II.7.2 Medio de cultivo	33
II.7.3 Reguladores de crecimiento vegetal	33
II.7.4 Algunas condiciones que deben ser controladas <i>in vitro</i>	36
II.8 Cultivo de tejidos vegetales en la Familia Cactaceae	37
III. JUSTIFICACIÓN	42
IV. OBJETIVOS	43
IV.1 Objetivo General	43
IV.2 Objetivos Particulares	43
	44

V.	MATERIALES Y MÉTODOS	
V.1	Desinfección de semillas	44
V.2	Siembra <i>in vitro</i>	44
V.3	Siembra <i>ex vitro</i>	44
V.4	Explante	45
V.5	Mantenimiento	46
V.6	Análisis estadístico	46
V.7	Aclimatización	46
V.8	Método para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>M. bombycina</i> Quehl	47
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
VI. 1	Desinfección	48
VI.2	Germinación de semillas	49
VI.2.1	Otras respuestas <i>in vitro</i> de las semillas	55
VI.3	Fuente de explantes	56
VI.4	Oxidación de explantes	57
VI.5	Rizogénesis	58
VI.6	Callo	58
VI.7	Inducción a partir de explantes plántula	60
VI.8	Inducción a partir de explantes laterales de tallo	63
VI.9	Inducción a partir de explantes raíz	66
VI.10	Individualización y enraizamiento de brotes	67
VI.11	Aclimatización	68
VII.	CONCLUSIONES	71
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	73
IX.	APÉNDICES	86

ABREVIATURAS

ANA: ácido Naftalenacético

BA: benciladenina

°C: grados Celsius

cm: centímetros

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre

CTV: Cultivo de tejidos vegetales

g: gramos

l: litros

mg: miligramos

min: minutos

MS: medio nutritivo Murashige & Skoog (1962)

MS 50%: medio nutritivo Murashige & Skoog (1962), al 50% de sus sales inorgánicas

pH: potencial de hidrógeno

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

NOM-059-ECOL-2001: Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 con el título: "Protección ambiental a especies nativas de México de flora y fauna silvestre en categorías de riesgo"

SEMARNAT: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales

RCV: reguladores de crecimiento vegetal

RESUMEN

Mammillaria bombycina Quehl, es una especie endémica de México (Aguascalientes y Jalisco), se encuentra bajo severas presiones por la destrucción de su hábitat; la escasa producción de semillas; su largo y lento ciclo de vida y su colecta ilegal como planta de ornato, por lo que se encuentra sujeta a protección especial por la NOM-059-ECOL-2001 y catalogada en el Apéndice II de CITES.

El objetivo de esta investigación fue aportar conocimientos sobre la capacidad de germinación y la micropropagación de *M. bombycina*.

Dos lotes de semillas fueron sembradas en condiciones *in vitro* (356) y *ex vitro* (100), al término de 75 días se registró un 92.13% y 38% de germinación respectivamente.

A partir de plántulas germinadas *in vitro* se disectaron para obtener 3 tipos de explantes: plántula, laterales de tallo y raíces, para explorar su potencial morfogénico en medio MS 50%, 30g/l de sacarosa, con diferentes concentraciones y combinaciones de BA y ANA, durante 60 días.

A los 6 meses de iniciados los cultivos, se obtuvo la formación de callo en todos los tratamientos; 941 brotes regenerados por organogénesis indirecta y 60 brotes por organogénesis directa. Los explantes de raíz produjeron 7 brotes vía organogénesis indirecta, esto tiene una gran relevancia ya que es el tercer reporte en cactáceas en el que se ha manifestado este tipo de respuesta.

El explante plántula tuvo mayor capacidad regenerativa, 620 brotes regenerados vía indirecta y 22 vía directa. 260 brotes con raíz y más de 2 cm de longitud, desde la base del tallo hasta el ápice, fueron aclimatizados con una sobrevivencia del 75% al cabo de 6 meses.

I. INTRODUCCIÓN

México es un país con gran diversidad vegetal, con alrededor de 30,000 especies de plantas (Rzedowski, 1983), se estima que alberga aproximadamente el 10% de la flora del mundo, y es el cuarto lugar a nivel mundial en diversidad de especies vegetales (Magaña y Villaseñor, 2002). Es un país donde la diversidad de formas de vida es de excepcional magnitud, debido a que, además de ser una zona de transición o convergencia entre flora y fauna neártica y neotropical, tiene una larga y compleja historia de aislamiento en algunas regiones, lo que ha favorecido la evolución de un gran número de especies endémicas (Soberón y Llorente, 1993; Toledo, 1988).

Enmarcada en la diversidad florística de México, la Familia Cactaceae destaca por su amplia representatividad a nivel genérico y específico (Hernández y Godínez-Álvarez, 1994; Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2005). Es el centro de cactáceas más importante, con un elevado número de endemismos. Desafortunadamente, los ecosistemas naturales de los países megadiversos, dentro de los cuales se encuentra México, están experimentando alteraciones significativas que amenazan sus ecosistemas y con ello a sus recursos naturales (Sarukhán y Dirzo, 2001).

La Familia Cactaceae es una de las más fascinantes por su diversidad de formas de vida, las hay arbustivas o herbáceas, con tallos carnosos ya sean globosos, columnares, articulados, candelabrifformes, o en forma de rosetas, etc., y por sus espinas (León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994). Su mayor significancia se alcanza en las regiones áridas y semiáridas, ampliamente representadas en México (Hernández y Godínez-Alvarez, 1994; Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2005). Entre las más conocidas se encuentran: los nopales (*Opuntia*), biznagas (*Echinocactus* y *Ferocactus*), biznaga de chilitos (*Mammillaria*), órganos (*Pachycereus*, *Neobuxbaumia*), viejitos (*Cephalocereus*), peyotes (*Lophophora*),

saguaros (*Carnegiea*), garambullos (*Myrtillocactus*) y jiotillas (*Escontria*), entre otras (Arias-Montes, 1997).

Dentro de esta Familia el género *Mammillaria* es el más diverso y popular debido a la enorme variedad de formas que posee, el color de sus flores, su pequeño tamaño, y su relativamente sencillo cultivo y mantenimiento, por lo que ha sido objeto de explotación por parte de coleccionistas nacionales e internacionales (Arias-Montes, 1997).

En la actualidad *Mammillaria bombycina* es una especie de gran valor ecológico, ornamental y económico, endémica de México, que se distribuye exclusivamente en Jalisco y Aguascalientes (Guzmán *et al.*, 2003). Está catalogada como especie sujeta a Protección especial por la NOM-059-ECOL-2001 y se encuentra en el Apéndice II de CITES. Para esta especie no existe ningún tipo de reporte más que el de su descripción botánica y su distribución, no se conocen datos de su comercialización y/o propagación; sin embargo, se sabe de su comercio ilegal, por lo que el objetivo de este trabajo fue lograr la regeneración *in vitro*, con fines de conservación.

Cuando las plantas son propagadas para estos fines es importante mantener la variabilidad genética y por ello el uso de semillas como fuente de explantes es importante (Fay y Gratton, 1992). Además de aportar bases para su propagación como alternativa para su preservación *ex situ* y para su comercialización.

La propagación masiva de cactáceas mexicanas en riesgo de extinción resulta ser una alternativa para su conservación, ésta se puede llevar a cabo por semillas, vástagos, esquejes, injertos y por el uso de la biotecnología, por medio de técnicas de cultivo de tejidos, según las características y la abundancia de cada especie (Reyes, 1994).

El cultivo de tejidos vegetales representa una alternativa para el estudio, conservación y propagación de aquellas especies que se encuentran en peligro de extinción (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992). Ayudan a superar algunas de las dificultades asociadas a la propagación convencional (Malda *et al.*, 1999a). Pues con este método, la calidad de las plantas obtenidas pueden satisfacer los volúmenes de comercialización, tanto en los mercados nacionales como en los internacionales (Dodds y Roberts, 1982).

Esta técnica ha significado una herramienta importante para la micropropagación y mejoramiento genético de las plantas alimenticias y ornamentales, con una tasa de propagación mucho más rápida (Stuppy y Nagl, 1992), con un alto potencial para la preservación del germoplasma libre de patógenos y una producción homogénea (clonal) (Wochok, 1981). Es una alternativa de gran utilidad para la investigación básica, ya que proporciona modelos para estudios bioquímicos, fisiológicos, anatómicos, de desarrollo, así como de genética molecular.

II. ANTECEDENTES

II.1 Biodiversidad.

El término biodiversidad se refiere a la variabilidad de la vida (CONABIO, 1998), es la variedad de organismos que existen, su distribución, sus interacciones, y el estudio de su uso y conservación (Dirzo, 1990). En el mundo existen más de 170 países, pero sólo 12 de ellos son considerados como megadiversos, ya que en conjunto albergan entre 60 y 70% de la biodiversidad total del planeta (CONABIO, 1998).

De acuerdo con la categoría de países megadiversos, México ocupa uno de los primeros cinco lugares con mayor biodiversidad en el mundo por su alto grado de riqueza, entre 10 y 12% de las especies del planeta se encuentra en nuestro país con un alto índice de endemismos (63% de la flora y 30% de los vertebrados). Además, es el centro de origen de muchas especies. A ello han contribuido lo accidentado de su fisiografía, la numerosa variedad de tipos de suelos, amplios litorales, altiplanos, cuencas fluviales, etc., además su posición geográfica en el continente ha permitido la entrada y diferenciación de especies del Norte y del Sur, en ambos sentidos (Semarnat, 2003).

Dentro de la enorme diversidad florística de México, existe una familia que destaca por su amplia representatividad a nivel genérico y específico, la Familia Cactaceae, ocupa el quinto lugar en diversidad en el ámbito nacional además de tener una importancia cultural trascendental para nuestro país (Rzedowski, 1983; Arias, 1993).

II.2 Generalidades de la Familia Cactaceae.

La región norte de Sudamérica es considerada como la posible zona de origen de la Familia Cactaceae; Axelrod (1950, 1958 citado por Bravo-Hollis y

Scheinvar, 1995) mencionó que los desiertos son considerados geológicamente recientes, así, las cactáceas que en ellos se han diferenciado son igualmente recientes, pero las de la Subfamilia Pereskioideae, son probablemente las más antiguas, tal hipótesis toma en cuenta la tectónica de placas y el lugar donde se encuentra el género más primitivo de la familia (*Pereskia*) (Arias, 1993), sin embargo no se conoce en que época se originaron las cactáceas puesto que hasta la fecha no se han encontrado fósiles (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

La Familia Cactaceae es endémica de América y se distribuye a lo largo del continente, desde el sur de Canadá (Columbia Británica y Alberta), hasta Argentina (Patagonia), cerca del extremo sur de Sudamérica, además de las Islas Galápagos y las Antillas (Arias, 1993; Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2004). Habitan desde cero hasta cuatro mil metros sobre el nivel del mar. Generalmente, se encuentran en zonas áridas y semiáridas aunque se han adaptado a selvas altas perenifolias, bajas caducifolias, y bosques mesófilos de montaña (Becerra, 2000; Olalde, 2001).

Durante su evolución se han diversificado en un gran número de especies y formas de vida. Se estima en forma conservadora, que las cactáceas incluyen cerca de 110 géneros y 2000 especies, de las cuales México posee 52 géneros, es decir, el 47% del total reconocido para la familia y 850 especies silvestres, lo que equivale a cerca del 42% de las especies (Arias, 1993; Olalde, 2001; Mandujano *et al.*, 2002). México es también el centro de diversificación de cactáceas más importante encontrándose en el país el mayor número de especies endémicas, con un alto índice a nivel genérico (73%) y específico (78%) (Hernández y Godínez-Alvarez, 1994). Algunas de las regiones de alta diversidad florística de cactáceas en México son el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, localizado en los Estados de Puebla y Oaxaca, el Altiplano Potosino y sur de Nuevo León, los valles intermontanos de Hidalgo y Querétaro y los bosques deciduos y espinosos de Tehuantepec (Arias-Montes, 1993).

La característica distintiva de la familia es la presencia de **aréolas**, que son zonas meristemáticas que dan origen a nuevos tallos, flores, espinas y tricomas. Estos últimos protegen al tejido meristemático de los rayos solares y a la vez crean una microatmósfera aislante de las temperaturas extremas y durante periodos de alta humedad relativa las gotas de agua se deslizan sobre la superficie y bajan por las costillas del tallo hasta el suelo inmediato (Hunt, 1992; León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994; Arreola, 1997).

II.2.1 Características morfológicas de las cactáceas.

Las cactáceas cuentan con tres tipos de raíces, una principal (que constituye el sistema de fijación), las secundarias (para la absorción de agua y sustancias nutritivas) y las temporales (sólo aparecen en la época de lluvia).

El tallo conforma básicamente el cuerpo de la planta, es de color verde porque en él se concentra la actividad fotosintética; los tubérculos (característicos de las cactáceas globosas como el género *Mammillaria*) se consideran la base hipertrofiada de las hojas, que se forman a partir de la yema cotiledonar apical (Bravo-Hollis, 1978).

En las cactáceas columnares, los tubérculos se unen verticalmente para formar las costillas; las hojas bien diferenciadas existen solamente en los géneros primitivos: *Pereskia*, *Peresklopsis* y *Quiabenti*, en el resto se encuentran espinas, adaptación que permite reducir la superficie de transpiración. Por ello se dice que las espinas son hojas modificadas. Estas se forman a expensas de los tejidos meristemáticos de las aréolas de la misma manera que las hojas. Su crecimiento se debe a un meristemo que existe en la base, y el endurecimiento a un proceso de lignificación de los tegumentos. Sus funciones consisten en proteger contra la depredación por animales herbívoros; producen sombra y protección al tallo reflejando los rayos solares o formando una verdadera coraza; condensan la humedad ambiental y la dirigen hacia las raíces donde es

absorbida; facilitan la propagación vegetativa cuando se adhieren a la piel de algún animal que dispersa los tallos (Bravo-Hollis, 1978).

Las flores son hermafroditas, las hay diurnas y nocturnas, y su producción se restringe a una por aréola; los frutos pueden ser carnosos, jugosos o secos, constan de una cámara en cuyo interior se encuentran las semillas unidas por una estructura llamada funículo, el cual determina su carnosidad o succulencia; externamente son lanosos, espinosos o escamosos (Bravo-Hollis, 1978; CONABIO, 1997).

II.2.2 Formas de vida de las cactáceas.

Las cactáceas poseen hábitos muy diversos, existen plantas que presentan un porte arbóreo como *Carnegiea gigantea* (saguaro), o el género *Pachycereus* (cardón), especies que puede alcanzar una altura de 18 m, también las hay candelabroformes como *Myrtillocactus* (garambullo), arbustivas (*Opuntia*), columnares (*Neobuxbaumia*, *Cephalocereus*), globosas (*Echinocactus*, *Mammillaria*) y epífitas cilíndricas (*Ripsalis*, *Disocactus*, *Aporocactus*) (León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995) o epífitas de tallos aplanados como *Selenicereus wittii* (Barthlott *et al.*, 1997). Algunas especies de cactáceas al iniciar su etapa de desarrollo son terrestres, pero al cabo de un tiempo se vuelven trepadoras debido a que sus tallos al crecer buscan un soporte al cual adherirse a través de sus raíces adventicias; otras son rastreras como *Machaerocereus* (León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994), las rupícolas viven sobre rocas calizas, basálticas o de granito; las gipsófilas prefieren suelos ricos en yeso.

Crece generalmente solas (como un único individuo con sus raíces), aunque algunas especies tienden a ramificarse en exceso, principalmente desde la base, llegando a formar colonias. Cuando una planta da lugar a nuevas ramas o brotes se forma un tallo o segmento, éste es capaz de enraizar y desprenderse del

cuerpo principal originando un nuevo individuo. No todas las especies son capaces de multiplicarse vegetativamente, algunas solo se reproducen a partir de semillas (Arreola, 1997), otras sólo tienen hábitos solitarios de crecimiento y no se ramifican a menos que sufran una herida (May, 1994).

Las cactáceas son componentes importantes de los bosques tropicales caducifolios y matorrales xerófilos de las zonas áridas y semiáridas, las que abarcan alrededor de dos tercios del territorio nacional (Casas, 2002). Por las regiones en las que se distribuyen las cactáceas necesitaron numerosas adaptaciones fisiológicas y morfológicas para sobrevivir, la más evidente es su capacidad de almacenar agua y hacer un uso eficiente de ésta en su desarrollo.

La forma globosa o redondeada que por lo general presentan les permite reducir la superficie de exposición al medio e incrementa el volumen interno, espacio que se aprovecha para almacenar agua, además de que sus tallos son fotosintéticos y presentan gruesas cutículas para evitar la pérdida de agua por transpiración; la entrada y salida de agua está regulada por los estomas (Hunt, 1992; León de la Luz y Valiente-Banuet, 1994; Arreola, 1997).

II.2.3 Metabolismo en cactáceas.

Presentan metabolismo CAM (metabolismo ácido crasuláceo). Las plantas con este tipo de metabolismo, habitan generalmente en ambientes sujetos a periodos de sequía y con sustratos pobres. Por lo que resulta ventajoso para las plantas, separar en el tiempo las etapas de asimilación de carbono, abriendo los estomas durante la noche para la captación del CO₂, almacenándolo en forma de ácido málico, y el cual procesan durante el día siguiente para la síntesis de carbohidratos. De esta manera, aseguran las reservas de carbono sin correr el riesgo de pérdida de agua por transpiración durante el día. En periodos de sequía severos, cuando los estomas permanecen cerrados tanto en el día, como en la noche, el CO₂ formado en la respiración se recaptura, restableciendo el

balance de carbono, al mismo tiempo que conservan el agua y protegen el aparato fotosintético del daño ocasionado por exceso de irradiación solar (Walter, 1995; Becerra, 2000).

La energía que las plantas gastan en la producción de grandes masas de tejido de almacenamiento se ve reflejado directamente en su crecimiento y es por esto que la mayoría de las cactáceas tienen un crecimiento lento (Bravo-Hollis, 1978; Becerra, 2000).

II.2.4 Semillas de las cactáceas.

Las semillas de las distintas especies de cactáceas varían apreciablemente, no solamente en el tamaño (0.5 mm a 10 mm), sino también en forma, color, cubierta seminal, apariencia y posición del funículo y del micrópilo, características del embrión y de los tejidos de almacén y número de semillas por fruto. En general las semillas maduras cuentan con las siguientes partes: testa, embrión, endospermo, perispermo (en los grupos más primitivos), cubierta de arilo (característica de la subfamilia Opuntioideae), funículo (*Opuntia*) e hilo (Tejero-Díez *et al.*, 1998). El número de semillas por fruto varía entre las distintas especies y puede ir desde una a cinco como en el género *Epithelantha* hasta varios cientos como en el caso de *Pilosocereus chrysacanthus* (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

II.2.5 Germinación en cactáceas.

La germinación incluye una serie de eventos que comienzan con la entrada de agua a la semilla y terminan con la elongación del eje embrionario (Bewley y Black, 1994; citados en Bewley, 1994), el signo visible de que la germinación se ha completado es la protusión de la radícula, este resultado es llamado usualmente germinación visible (Bewley, 1994).

Para que una semilla germine requiere de ciertos factores internos controlados por su propia información genética, debe ser viable, es decir, el embrión debe estar vivo, y además requiere de condiciones ambientales adecuadas, tales como la presencia de oxígeno, temperatura, luz y oscuridad (fotoblásticas positivas y negativas respectivamente), por ejemplo las semillas de *Carnegiea gigantea* y *Stenocereus thurberi*, necesitan luz para germinar, mientras que las semillas de *Pereskia aculeata* son indiferentes a la luz (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000); aunque algunas semillas se desarrollan mejor en presencia de luz (Hernández, 1998). Rojas-Aréchiga *et al.*, (1997), sugiere que los requerimientos de luz podrían estar asociados a la forma de vida de las cactáceas.

Cuadro 1. Rango óptimo de temperatura para la germinación (más del 90%) de algunas especies de cactáceas, (Tomado de Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Especie	Rango de temperatura
<i>Oreocereus trollii</i>	15–20°C
<i>Rebutia marsoneri</i>	15–20°C
<i>Rebutia minuscula</i>	15–20°C
<i>Oreocereus celsianus</i>	15–25°C
<i>Astrophytum myriostigma</i>	15–25°C
<i>Cereus peruvianus</i>	15–25°C
<i>Echinopsis pasacana</i>	15–30°C
<i>Mammillaria polythele</i>	15–30°C
<i>Ferocactus glaucescens</i>	15–30°C
<i>Cleistocactus hyalacanthus</i>	20–25°C
<i>Mammillaria zeilmanniana</i>	20–25°C
<i>Gymnocalycium saglionis</i>	20–25°C
<i>Thelocactus setispinus</i>	20–30°C
<i>Mammillaria muehlenpfordtii</i>	20–30°C
<i>Echinocactus grusonii</i>	25–30°C
<i>Opuntia lindheimeri</i>	25–30°C

Las cactáceas tienen un amplio espectro de respuestas a la temperatura sobre todo las especies de ambientes cálidos. Se ha demostrado que la temperatura

óptima para que las semillas de cactáceas germinen, oscila en el rango, entre 17 y 34°C (Cuadro 1), frecuentemente con óptimos valores a 25°C (Nobel, 1988).

La dormancia (término incluido dentro del concepto unificado y actualizado de latencia), es una etapa del desarrollo de la planta en la que su metabolismo fisiológico es muy lento, por lo que no puede mantener su crecimiento (Grajales-Muñiz, 2004), tiene un valor de supervivencia cuando las condiciones de germinación y establecimiento no son apropiadas. Las semillas de cactáceas se desarrollan en lugares donde la disponibilidad de agua es escasa por lo que se dice son quiescentes (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Tres tipos de dormancia han sido descritos; primaria (innata), forzada y secundaria (inducida) (Harper, 1957 citado por Murdoch y Ellis, 1992 Roberts, 1972).

La dormancia primaria, previene la germinación de las semillas en la planta madre y por un tiempo antes de la dispersión; la dormancia forzada es regulada por condiciones ambientales tales como la luz y/o temperatura, las semillas están listas para germinar una vez que las limitaciones ambientales son removidas; y la dormancia secundaria, es caracterizada por la persistencia de la condición de dormancia incluso cuando las semillas se encuentran en condiciones favorables para la germinación (Tran y Cavanagh, 1984). Para las semillas de cactáceas se ha encontrado la dormancia primaria y forzada (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Algunas especies de cactáceas como *Stenocerus griseus*, pasan hasta 4 meses en el suelo antes de germinar; *Opuntia rastrera*, presenta latencia primaria, germina mejor con el envejecimiento, al igual que semillas almacenadas de *Opuntia lindheimeri* que mostraron un mayor porcentaje de germinación que semillas recién colectadas (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Existen diferentes factores que pueden ayudar a romper con la dormancia como la escarificación, la estratificación, fotoperiodo, imbibición (hidratación) o una

combinación de todas estas. Por ejemplo, periodos de imbibición, en semillas de varias especies de *Opuntia*, *Stenocereus griseus*, *S. gummosus* y *Melocactus curvispinus*, mostraron buenos resultados de germinación. Varios trabajos han demostrado que las semillas provenientes de frutos ingeridos por animales, tiene una mejor respuesta de germinación que las semillas provenientes de frutos intactos. Tal es el caso de semillas de *Pereskia aculeata* y *Melocactus violaceus*. La escarificación puede hacerse con inmersiones en bajas concentraciones de soluciones ácidas, para simular el paso de las semillas a través del tubo digestivo de los animales, como en el caso de algunas especies de *Opuntia*, *Echinocactus grusonii*, *E. platyacanthus*, *Ferocactus peninsulæ* y *Pachycereus pringlei* (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

II.2.6 Uso e importancia de las cactáceas.

Las cactáceas han representado un símbolo para nuestro país, desde antes de la Conquista (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). Existen reportes del uso y aprovechamiento de las cactáceas, desde la época prehispánica (Becerra, 2000; Bravo-Hollis, 1978), y han sido plantas muy apreciadas por su belleza. Se sabe que en los jardines de Netzahualcóyotl, eran plantas importantes, siendo que algunas de ellas eran traídas desde tierras lejanas (Oldfield, 1985; Bravo-Hollis, 1978; Kobayashi, 1993); no pasaron desapercibidas para las civilizaciones como los mexicas, ya que fueron usadas ampliamente en su vida cotidiana como alimento (*Echinocactus grusonii*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Opuntia* spp), medicina, economía doméstica y prácticas religiosas y políticas.

Actualmente siguen siendo empleadas por distintos grupos étnicos en ceremonias religiosas; además de que se utilizan para la obtención de una gran cantidad de productos químicos, fibras y pulpa para la fabricación de papel y materiales aislantes; extracción de pegamentos adhesivos y como fuente de pectinas para elaborar jaleas y mermeladas (Bravo-Hollis, 1978), bebidas, y

como plantas de ornato (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995), son usadas como forraje ya que los tallos de algunas especies son consumidos por el ganado (*Opuntia* spp.), los cuales no obstante a su bajo valor nutricional, permiten a los animales sobrevivir en la época de sequía, gracias al contenido acuoso de sus parénquimas, los haces liberoleñosos del sistema vascular de algunas columnares secas, se usan como materia prima para la construcción de viviendas; como cercas vivas; para retener el suelo y como combustible cuando se encuentran secos como *Pachycereus marginatus*, (Bravo-Hollis, 1978), además se usan como armas de caza y pesca; como alimento humano, prácticamente todos los órganos de estas plantas son comestibles (raíces, tallos, flores, frutos y semillas).

Los tallos de algunas especies de biznagas de los géneros *Melocactus*, *Echinocactus* y *Mammillaria*, son empleados para preparar el dulce de acitrón, tradicional del centro del país. Los tallos jóvenes de varias especies del género *Opuntia*, conocidos como nopales, así como también sus frutos, conocidos como tunas, son muy populares, incluso fuera del país, las pitayas, tunillos, teteches, garambullos y xoconoxtles, son frutos recolectados tradicionalmente por los habitantes de las zonas áridas (Becerra, 2000, Bravo-Hollis, 1978).

Así mismo las cactáceas tienen grandes implicaciones ecológicas debido a que brindan oxígeno, son fijadoras de suelo, un excelente medio para evitar la erosión eólica y pluvial gracias a que tienen un sistema radical muy desarrollado que compacta el sustrato, además de que los pelos radicales son caducos y constituyen una fuente importante de materia orgánica que constantemente se incorpora al suelo.

Las diferentes especies de cactáceas proporcionan alimento y resguardo a múltiples organismos asociados (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991), así como también, son recursos con potencial económico para las comunidades

rurales, los que utilizan para satisfacer sus necesidades de subsistencia y las comercializan a escala local o regional (Casas, 2002).

11.2.7 Estatus.

Con la llegada de los españoles a América, quedaron fascinados con la belleza y rareza de estas plantas, y comenzaron a colectarlas y enviarlas al viejo continente, dando inicio a un comercio que con el paso de los años las ha llevado a ser uno de los grupos de plantas más amenazadas (Oldfield, 1985; Bravo-Hollis, 1978; Kobayashi, 1993).

No obstante la importancia económica, ecológica y cultural de las cactáceas, y que México sea uno de los centros de concentración más importantes, en términos absolutos, nuestro país es el lugar con más especies amenazadas, 197 o 35% del total de las especies mexicanas (Hernández y Godínez-Alvarez, 1994).

Entre las causas principales de la reducción continua de las poblaciones silvestres de cactáceas están la modificación de su hábitat que incluye la agricultura, la ganadería (ganado bovino y caprino), los asentamientos humanos, el desarrollo industrial, la construcción de caminos y carreteras, los tendidos de líneas eléctricas y telefónicas, así como la extracción de materiales para la construcción de presas (Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2005; Sotomayor y Arredondo, 2004).

Actualmente, las cactáceas, han alcanzado gran auge sobre todo entre aficionados y científicos, dando como resultado un comercio de grandes volúmenes y la creación de numerosos establecimientos comerciales dedicados a su importación, reproducción y venta en diversos países (Oldfield, 1985; Bravo-Hollis, 1978; Kobayashi, 1993). El saqueo ha sido brutal, miles de toneladas de plantas han sido arrancadas de su hábitat natural para ir a formar

parte de jardines y colecciones privadas en todo el mundo (Benítez y Dávila, 2002). Este es otro factor importante que afecta a las poblaciones silvestres para el comercio nacional e internacional (Reyes y Terrazas, 1991), pues ambos mercados se han abastecido en gran parte por medio de la extracción de ejemplares de su hábitat, variando en costos según la rareza de la especie y el éxito de su propagación (Arias, 1993).

Por lo anterior en México, la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales generó la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 con el título: “Protección ambiental a especies nativas de México de flora y fauna silvestre en categorías de riesgo”, la cual es un listado que señala las categorías de riesgo de especies tanto vegetales como animales; las categorías son: probablemente extintas en el medio silvestre, en peligro de extinción, amenazadas, sujetas a protección especial, además de señalar aquellas que son endémicas. La NOM-059-ECOL-2001, incluye 39 géneros y 285 especies de cactáceas en alguna categoría de riesgo, de las cuales 247 son endémicas, 89 se presentan como amenazadas, 166 sujetas a protección especial y 30 en peligro de extinción (SEMARNAT, 2002).

Además la familia completa se encuentra en el Apéndice II de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre), organismo internacional que intenta conservar la diversidad de flora y fauna regulando su comercio, la cual a través de un acuerdo concertado entre los gobiernos, tiene como finalidad velar porque el comercio de especímenes de animales y plantas silvestres no constituya una amenaza para su sobrevivencia. La CITES somete al comercio internacional de determinadas especies a ciertos controles. Toda importación, exportación, reexportación o introducción de especies amparadas por la Convención debe autorizarse mediante un sistema de concesión de licencias (Benítez y Dávila, 2002).

Las especies amparadas por la CITES están incluidas en tres Apéndices, según el grado de protección que les asignen los listados.

En el Apéndice I se incluyen todas las especies en peligro de extinción. En lo concerniente a la Familia Cactaceae, en el Apéndice I, se encuentran especies pertenecientes a los géneros: *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Coryphanta*, *Discocactus*, *Echinocereus*, *Escobaria*, *Mammillaria*, *Melocactus*, *Obregonia*, *Pachycereus*, *Pediocactus*, *Pelecypora*, *Sclerocactus*, *Strombocactus*, *Turbinicarpus* y *Uebelmannia*.

En el Apéndice II se incluyen especies que no se encuentran necesariamente en peligro de extinción, pero cuyo comercio debe controlarse a fin de evitar un uso incompatible con su sobrevivencia. Dentro de este Apéndice quedan comprendidas el resto de las cactáceas mexicanas junto con sus semillas.

En el Apéndice III se incluyen especies que están protegidas al menos en un país, el cual ha solicitado la asistencia de otros países para controlar su comercio. Sólo se autoriza el comercio internacional de especímenes de estas especies, con la presentación previa de los permisos o certificados apropiados. En el caso de las cactáceas, no existen especies en este Apéndice (<http://www.cites.org>).

Sin embargo, los listados afrontan problemas tales como, la evaluación precisa del estado biológico de las especies, ecológicos, como la relación de nodricismo, la dispersión y la alteración de los ecosistemas, y en general informes fidedignos sobre la especie en cuestión, como la recolección excesiva y uso de la tierra (Arias, 1993).

Como un indicador de lo antes mencionado, se ha estimado que en el periodo de 1977-1984 se exportaron a los Estados Unidos de América cerca de 289 mil ejemplares de cactáceas en forma ilegal incluyendo a las especies colocadas en

el Apéndice I de CITES (Arias, 1993). Se estima que más de 50, 000 ejemplares de cactáceas son exportadas cada año de nuestro país y menos del 1% son reportadas como propagadas, es decir, prácticamente todas son extraídas de manera ilegal de las poblaciones silvestres (Oldfield, 1997).

Un total de 285 especies de cactáceas mexicanas están incluidas en la lista oficial de especies amenazadas (Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2005) y muchas especies de cactáceas están siendo reevaluadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) para una posible inclusión en las categorías de la nueva lista Roja. La UICN, está encargada de señalar cuáles son las especies de flora y fauna extintas en estado silvestre, en peligro de extinción, vulnerables y las que se encuentran en menor riesgo. Está representada en México por el comité Mesoamericano. Desde su creación, en 1948, ofrece asesoría experta sobre aspectos científicos y políticos relacionados con el medio ambiente, con el fin de promover acuerdos regionales, legislaciones e instituciones adecuadas y estrategias para la gestión sostenible de los recursos naturales (UICN, 1994).

La mayoría de las especies de la Familia Cactaceae poseen una combinación de características biológicas y ecológicas inherentes que las hacen más vulnerables a factores de perturbación. Sus áreas de distribución son extremadamente restringidas y en ocasiones viven en condiciones edáficas muy específicas. Las bajas tasas de crecimiento de muchas de ellas, así como sus reducidos niveles de reclutamiento, determinan por lo común que las poblaciones se restablezcan demográficamente de manera extremadamente lenta después de un episodio de perturbación; además de que sus patrones particulares de distribución geográfica representa un enorme riesgo de supervivencia a cualquier forma de perturbación local (Hernández y Godínez-Alvarez, 1994). A pesar de la existencia de instituciones reguladoras del comercio de las especies y de promover su conservación, se necesita actualizar la información disponible sobre las especies y aplicar un método general para determinar las categorías de

riesgo a las que puede ser asignada cualquier especie silvestre, pues se ha afirmado que el éxito de la conservación de la biodiversidad depende en gran medida del conocimiento de las especies o sistemas que se requieren conservar (Hernández y Godínez-Álvarez, 1994; Arias-Montes *et al*, 2005).

En México, uno de los géneros de cactáceas que merece mayor atención es *Mammillaria*, dada su gran riqueza de especies que oscila entre 170 a 306 especies (Villaseñor, 2004). Esta diversidad de especies obedece a varios factores biológicos, así como ambientales, más una carencia de estudios sistemáticos.

II.3 Género *Mammillaria*.

Recientemente se han registrado 173 especies pertenecientes al género *Mammillaria* (Guzmán, *et al.*, 2003), de las cuales 113 son endémicas (DOF 2002). Además muchas especies de este género se han clasificado como raras (Hunt, 1992) y algunas podrían ser consideradas extremadamente raras. Este género está ubicado taxonómicamente dentro de la Subfamilia Cactoideae y a su vez, en la Tribu Cacteeae (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

El género *Mammillaria*, es evolutivamente muy reciente y está ampliamente representado en el país. Sólo algunas especies crecen en el Sur de Estados Unidos, las Antillas, Colombia y Venezuela (Bravo-Hollis, 1978). La distribución del género *Mammillaria* se presenta principalmente en el Desierto Sonorense, la Depresión del Balsas, el Istmo de Tehuantepec y en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Esta última región se propone como el centro de origen y de diversificación de *Mammillaria*, donde las condiciones ambientales son más cálidas y las heladas escasas (Reyes *et al.*, 2004).

II.3.1 Descripción botánica del género *Mammillaria*.

Las especies que pertenecen a este género presentan las siguientes características: plantas pequeñas, simples o cespitosas. El tallo es globoso-

aplanado, cortamente cilíndrico. Se ramifica por brotes basales o laterales, contiene jugo acuoso o lechoso. Los tubérculos están dispuestos en series espiraladas, 3 y 5, 5 y 8, 8 y 13, 13 y 21, ó 21 y 34; son más o menos numerosos, cónico-cilíndricos. Las aréolas son dimorfas, las espiníferas están situadas en el ápice de los tubérculos, provistas de lana cuando jóvenes, con o sin cerdas; las floríferas situadas en la axila de los tubérculos, con lana, cerdas o desnudas. Las espinas se diferencian en centrales y radiales, pero a veces son solo radiales o centrales, son variables en número, forma, dimensiones y color: están dispuestas en las areolas en formas diversas. Las flores generalmente se disponen en corona cerca del ápice, son pequeñas y/o grandes, de aspecto infundibuliformes o campanuladas, de color blanco, amarillo, rosado, rojo o púrpura; el pericarpelo normalmente sin escamas; el tubo receptacular es corto; en la mayoría de los casos, los estambres son escasos, el estilo es delgado, incluido y los lóbulos del estigma lineares. Los frutos son bayas pequeñas, más o menos globosas o piriformes, con testa de estructura reticulada, foveolada y de color castaño rojizo oscuro o negro; el embrión es ovoide o algo cilíndrico, muy succulento, con cotiledones reducidos (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

Desde el primer contacto europeo con la flora del Nuevo Mundo, las cactáceas despertaron el interés por sus formas particulares, el color tan variado de sus espinas y la belleza de sus flores. De ahí que una gran cantidad de ellas se utilicen como plantas de ornato (Reyes y Arias, 1995). Se teme que las poblaciones de cactáceas incluyendo las especies del género *Mammillaria* estén sujetas a eventos de disturbios que las podrían afectar a largo plazo.

II.4 *Mammillaria bombycina*.

En la actualidad *Mammillaria bombycina* es una especie de gran valor ecológico, ornamental y económico; sin embargo, para esta especie no existe ningún tipo de reporte más que el de su descripción botánica y su distribución, no se

conocen datos de su comercialización y/o propagación, no obstante se sabe de su comercio ilegal.

II.4.1 Clasificación taxonómica de *M. bombycina* Quehl. (Bravo-Hollis, y Sánchez-Mejorada, 1991).

Reino: Plantae
Phylum: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Caryophyllales
Familia: Cactaceae
Subfamilia: Cactoideae
Tribu: Cacteeae
Subtribu: Cactinae
Género: *Mammillaria*
Especie: *Mammillaria bombycina* Quehl



Figura 1. *Mammillaria bombycina*, en floración. (Barra de 1 cm).

II.4.2 Descripción botánica de *M. bombycina*.

Tallo simple o cespitoso en la base, globoso hasta claviforme, de 20 cm de altura y de 6 cm de diámetro; ápice hundido y provisto de abundante lana blanca.

Tubérculos dispuestos en 11 y 18 series espiraladas, cónicos hasta cilíndricos, con el ápice redondeado, de 15 mm de longitud y 10 mm de espesor en la base, de consistencia firme, con jugo acuoso.

Axilas con abundante lana blanca que, en el ápice de la planta, cubren los tubérculos, provistas también algunas veces, de cerdas.

Aréolas circulares cuando jóvenes, después alargadas, al principio con algo de lana blanca, después desnudas.

Espinas radiales 30 a 40, de 2 a 10 mm de longitud, las laterales más largas, todas muy delgadamente aciculares, rígidas, rectas, algo pubescentes, bulbosas en la base, blancas, brillantes, casi siempre horizontales, las superiores y las inferiores más ascendentes que las laterales.

Espinas centrales 2 a 4; la superior de 7 mm de longitud, recta; las laterales, cuando existen, de 10 mm de longitud, rectas, extendidas y algo ascendentes; la inferior de 20 mm de longitud, recta, ganchuda; todas delgadamente aciculares, lisas, blancas, volviéndose de color ámbar, con la punta de color café rojizo.

Flores infundibuliformes, situadas cerca del ápice, de 15 mm de longitud y diámetro, segmentos exteriores del perianto lanceolados, acuminados, con el margen ciliado, de color verde rojizo hacia la base y arriba de color blanco rojizo; segmentos interiores del perianto largamente elípticos, con el ápice hendido y el margen ciliado, de color violeta rojizo; filamentos blancos abajo y hacia arriba

rojo carmín; anteras amarillentas; estilo blanco abajo, y arriba muy rojo; lóbulos del estigma 4 a 6, purpúreo rojizos.

Fruto claviforme, de 15 mm de longitud por 12 mm de diámetro, blanquecino. Semillas muy pequeñas, negras (Bravo-Hollis, y Sánchez-Mejorada, 1991).

II.4.3 Distribución geográfica de *M. bombycina*.

Mammillaria bombycina Quehl, es endémica de México, se distribuye en Aguascalientes y Jalisco.

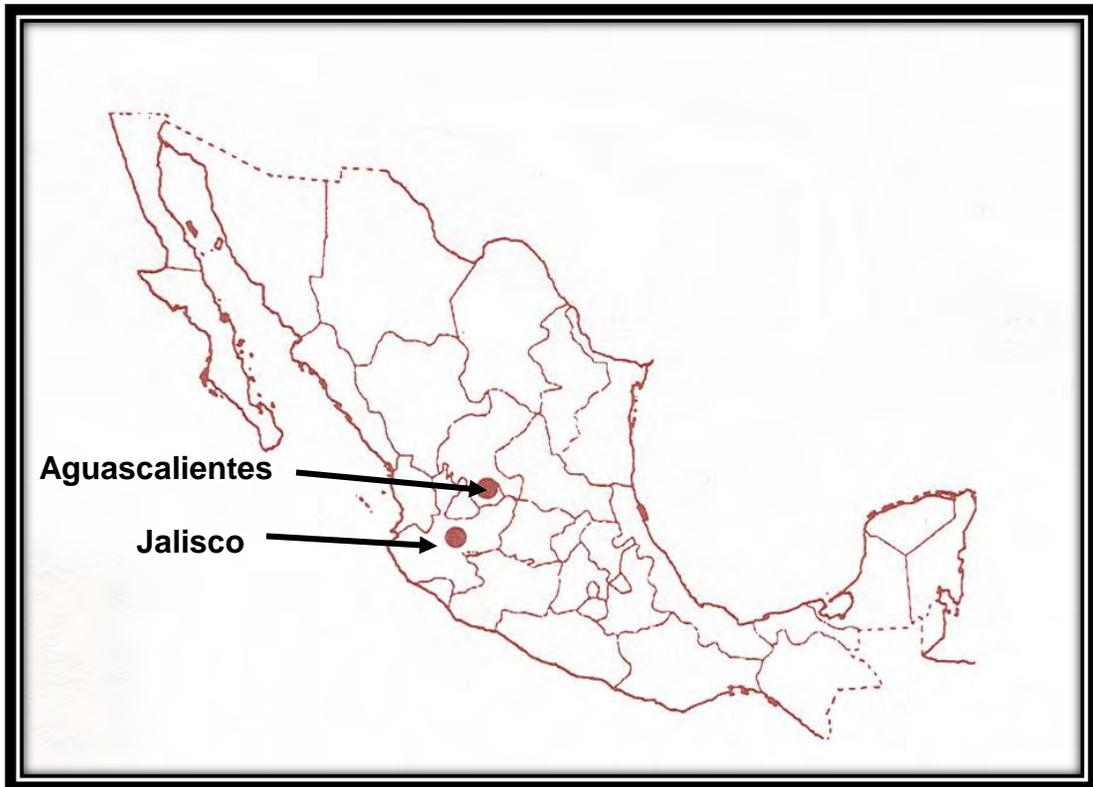


Figura 2. Distribución geográfica de *M. bombycina* Quehl (tomado de Guzmán *et al.*, 2003).

II.4.4 Estatus de *M. bombycina*.

Está catalogada como especie sujeta a Protección especial por la NOM-059-ECOL-2001 y se encuentra en el Apéndice II de CITES.

II.5 Conservación.

Las cactáceas son un grupo de plantas que en su gran mayoría se encuentran amenazadas o en peligro de extinción en sus hábitats naturales, por lo cual es urgente la aplicación de acciones que ayuden a conservar dichas especies (Olalde, 2001).

En México se está dando énfasis a distintas líneas de investigación para rescatar y conservar las cactáceas amenazadas y en vías de extinción. La propagación de cactáceas se ha desarrollado como una alternativa más para la conservación de su biodiversidad. Con esta actividad se pretende estudiar los requerimientos de cada una de las especies en la germinación, crecimiento, establecimiento y desarrollo; así como enriquecer los métodos de propagación y proponer nuevos modelos dependiendo de las especies y el área donde se esté trabajando (Reyes, 1997).

Existen dos principales estrategias de conservación, las cuales están encaminadas a la protección de las especies en su hábitat (*in situ*) o fuera de las áreas donde crecen de forma natural (*ex situ*).

Las estrategias de preservación *in situ* están diseñadas para mantener el ambiente natural representativo del lugar, es decir, la diversidad genética de las especies silvestres en especial las endémicas, amenazadas y en peligro de extinción; asegurando el aprovechamiento sustentable para la población local (CONABIO, 1997). En México, entre las estrategias de conservación *in situ* se hallan las Áreas Naturales Protegidas, las cuales son zonas destinadas esencialmente para actividades de carácter científico, educativo y de conservación (Franco, 1997).

Las estrategias de conservación *ex situ* pretenden mantener colecciones vivas que actúan como reservorio de germoplasma, en los cuales se realizan

actividades de investigación, propagación y educación, permitiendo la protección y supervivencia de una parte de la variabilidad genética. Estas constituyen las más importantes acciones que impiden o disminuyen la sobrecolección de especies silvestres. Además de que son una buena alternativa para los países (como México) que carecen de tecnologías y recursos económicos que les permitan aprovechar comercialmente (y de manera racional) sus recursos naturales, pues tienen la ventaja de ser métodos de muy bajo costo (CONABIO, 1997). Para la conservación *ex situ* de plantas existen los Jardines Botánicos, UMAS, Viveros, bancos de germoplasma, de semillas y laboratorios de Cultivo *in vitro*; instituciones que propagan, cultivan y mantienen colecciones de plantas vivas con fines de investigación científica, conservación y educación (Franco, 1997).

II.6 Métodos convencionales de propagación en cactáceas.

Los métodos utilizados para la reproducción de cactáceas son variados, e incluyen la propagación sexual a partir de semillas o de diferentes formas asexuales ya sean a partir de vástagos (hijuelos) esquejes y/o injertos.

La propagación por vástagos aprovecha los brotes que proliferan en ciertas cactáceas globosas como algunas especies de *Mammillaria*, *Epithelantha*, *Echinocereus*, entre otras; la propagación por esquejes consiste en fragmentar los tallos para después inducir su enraizamiento; sin embargo, muchas especies producen muy pocos brotes laterales, pocas semillas o presentan bajos porcentajes de germinación, por lo que la propagación por semillas o vástagos resultan poco efectivas.

Los métodos de propagación y almacenamiento *in vitro* pueden ser empleados como herramientas muy poderosas en programas de conservación *ex situ* de diferentes especies incluyendo las que se encuentran en peligro de extinción.

Durante los últimos años, el cultivo de tejidos ha emergido como una poderosa herramienta para la propagación de numerosas especies vegetales, esto en ciertos casos permite la producción masiva de individuos a partir de un pequeño fragmento de tejido, al aprovechar la totipotencialidad de las células vegetales. Por tanto el potencial de estas técnicas en la recuperación de especies amenazadas resulta trascendente (Rubluo *et al.*, 2002).

II.7 Cultivo de Tejidos Vegetales.

La biotecnología es una rama de la Biología, de la cual el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una técnica que se basa en la totipotencialidad celular, lo que hace posible dividir un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente *in vitro*: protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas en condiciones controladas (medio nutritivo, luz, temperatura, atmósfera, pH, RCV, etc.), permitiendo variar las condiciones de cultivo y de esta manera llegar a realizar investigación básica, propagación o recuperación de plantas libres de patógenos, por lo que esta técnica ha sido empleada en diferentes especies vegetales con diversos usos (Chávez, 1993).

El Cultivo de Tejidos es esencialmente otro método de clonación, pero difiere de los métodos tradicionales en que permite intervalos mucho más rápidos y numerosos de multiplicación de plantas (Murashige, 1974).

De manera general, George y Sherrington (1984) establecieron cinco etapas para llevar a cabo el proceso de la micropropagación:

- Etapa 0 (selección de la planta madre), también llamada fase preparativa (Debergh y Maene, 1981). Esta fase permite seleccionar la planta madre o donante que se encuentre en las mejores condiciones para evitar contaminación en la siguiente etapa. Con la finalidad de reducir los riesgos de contaminación de los cultivos y maximizar la diversidad

genética de las plantas producidas, se puede optar por la utilización de plantas cuyas semillas han germinado *in vitro* (George y Sherrington (1984; Fay, 1993; Hartman *et al.*, 1997; Lynch, 1999, Razdan, 2003).

- Etapa 1 (establecimiento de un cultivo aséptico del material vegetal seleccionado). El éxito de esta etapa requiere que los explantes puedan ser transferidos al medio de cultivo sin contaminarse, así como también que continúen con su desarrollo. Generalmente los explantes se toman de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas ya que mientras más joven y menos diferenciado sea el tejido, mejor será la respuesta *in vitro*.
- Etapa 2 (producción de propágulos), es la etapa en donde se da la multiplicación de órganos y estructuras que sean capaces de dar como resultado plantas nuevas.

La morfogénesis en plantas ya sea *in vivo* o *in vitro* es un complejo evento de desarrollo, es un cambio fisiológico y/o morfológico que permite la especialización de una célula, tejido, órgano o una planta completa durante su desarrollo. La morfogénesis involucra el desarrollo de células diferentes de la célula madre a partir de la división celular de acuerdo a un plan y secuencia específicos (Smigocki y Owens, 1999). Los explantes pueden tener diversas respuestas morfogenéticas, entre ellas:

Organogénesis, que involucra dos procesos, la organogénesis directa e indirecta. La organogénesis directa se define como la formación de órganos, pero comúnmente de manera particular de brotes adventicios y/o raíces directamente de los tejidos del explante inicial sin que intervenga una fase previa de formación de callo, mientras que en la organogénesis indirecta los brotes adventicios se regeneran a partir de las células de callo (desorganización de las células del explante inicial) que se formaron provenientes de los tejidos originales del explante (George y Sherrington, 1984). El callo se define como un conjunto de células vegetales que

crecen en forma desorganizada que proliferan en una masa irregular, que varia ampliamente en textura, apariencia y tasa de crecimiento, dependiendo del tipo de tejido que le dio origen y la composición del medio (Donnelly y Vivader, 1988).

Activación de yemas axilares. Se activan los meristemos axilares del explante por la acción de RCV, con lo cual surgen los brotes genéticamente iguales a la planta madre.

La embriogénesis somática. Se presenta como la formación de embriones que no provienen de la unión de gametos, sino de células somáticas del explante inicial o a través de callo. La embriogénesis tiene la ventaja de generar estructuras bipolares, de esta forma se evita la fase de enraizamiento y se disminuyen costos, además de que se producen individuos genéticamente iguales a la planta madre (Pierik, 1993).

- Etapa 3 (en el caso de brotes, preparación para la elongación y enraizamiento, para el caso de embriogénesis somática, germinación de los embriones). En esta etapa se da el desarrollo y crecimiento de los brotes a plántulas derivadas de la etapa 2, así como también incluye el enraizamiento *in vitro*. En esta etapa es cuando se separa a las plántulas para que puedan llevar a cabo la fotosíntesis y sobrevivir sin un suplemento artificial de carbohidratos.
- Etapa 4 o de transferencia al ambiente natural (aclimatización). En esta fase factores como el fotoperiodo, humedad relativa y tipo de sustrato utilizado, así como también el manejo de plantas y control fitosanitario son muy importantes para el éxito de esta etapa. Aquí se da el cambio de una planta en condiciones mixotróficas a condiciones autotróficas y el paso gradual a condiciones *ex vitro*. Las plantas provenientes de condiciones *in vitro* presentan modificaciones en su estructura o metabolismo tales como

una humedad relativa alta, tasas reducidas en la fotosíntesis, una cutícula delgada y un bajo o nulo intercambio gaseoso, lo que las hace susceptibles a la deshidratación. Por lo que después de la transferencia a condiciones *ex vitro*, las plantas tienen que corregir dichas modificaciones, y lograr su aclimatización a su nuevo ambiente (Kadlecek *et al.*, 2001)

II.7.1 Explantes.

Los pequeños órganos o partes de tejido que son empleados, para iniciar los cultivos *in vitro*, se denominan explantes. Estos pueden ser cualquier parte de la planta como la raíz, tallo, hojas, anteras, semillas, etc. Es importante la edad fisiológica del explante puesto que determina el tipo y la velocidad de morfogénesis, en relación con el tipo de medio de cultivo en que se siembre. Generalmente los tejidos jóvenes tienen mayor capacidad de diferenciación en comparación con los tejidos maduros (Robert y Loyola, 1985).

II.7.2 Medio de cultivo.

Consiste en una solución de sales que suministran los micro y macroelementos necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas, compuestos químicos indispensables para el metabolismo (vitaminas), aminoácidos y una fuente de carbono como fuente de energía (generalmente sacarosa), pueden contener agentes gelificantes, para dar soporte natural al explante (opcional). Hoy en día existen diversos medios de cultivo de acuerdo a las necesidades de los distintos grupos vegetales, así como también los objetivos de la investigación (Robert y Loyola, 1985).

II.7.3 Reguladores de crecimiento vegetal.

Las plantas producen hormonas las cuales tienen efecto en el desarrollo y crecimiento. Las hormonas son mensajeros químicos que median la

comunicación intercelular con proteínas celulares específicas llamadas receptores (Taíz y Zeiger, 2002).

Los RCV son compuestos orgánicos que actúan en pequeñas cantidades y estimulan, inhiben o modifican los procesos fisiológicos de las plantas, estos constituyen, junto con el tipo y estado de desarrollo del explante, los factores más importantes en la determinación de las respuestas morfogénicas del tejido (George y Sherrington, 1984). Actualmente los RCV se dividen en 3 grupos principales:

- 1) Promotores de crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas
- 2) Inhibidores de crecimiento: ácido abscísico y etileno
- 3) Un nuevo grupo llamado moléculas señal, incluye a las poliamidas, que poseen un efecto regulatorio en el desarrollo y crecimiento. Los jasmonatos, que promueven la senescencia, abscisión y maduración de los frutos, formación de pigmentos y como defensa ante los ataques de depredadores o patógenos. El ácido salicílico que aumenta la longevidad de las flores, inhibe la biosíntesis de etileno y la germinación, así como también revierte los efectos del ácido abscísico. Los brasinoesteroides que son de origen lipídico y provocan efectos sobre el crecimiento y desarrollo, inducen el alargamiento y división celular, promueven la biosíntesis de etileno, y aumentan la resistencia a situaciones de estrés hídrico, por exceso de salinidad y bajas temperaturas (Pérez-Ponce, 1998).

La respuesta de los tejidos a los RCV puede ser diferente en cada fase, pueden ser inducidos a seguir una ruta morfogénica determinada. Esta inducción puede ser alcanzada por estímulos externos, tales como los RCV en el medio y/o un balance entre los niveles endógenos de las hormonas (Thorpe y Kumar, 1993).

Los RCV más utilizados en el cultivo de tejidos vegetales son aquellos que promueven el crecimiento y el desarrollo, tales como las auxinas y las citocininas, ya que regulan la morfogénesis de brotes (Martínez, 2003).

Las auxinas se definen como sustancias orgánicas, se sintetizan a partir de triptófano en los órganos inmaduros, embriones y meristemos apicales principalmente y son transportados al resto de la planta, principalmente a la raíz, de manera basipétala (Bidwell, 1993; Salisbury y Ross, 1994). Tienen efecto en la relajación de la pared celular, en la síntesis de RNA y de proteínas, activan el crecimiento en espesor de los tallos y promueven la rizogénesis. Promueven el crecimiento y alargamiento de las células cuando se aplica en bajas concentraciones a segmentos de tejidos vegetales (Normanly *et al.*, 2004). Las auxinas más empleadas en el cultivo *in vitro* son el 2,4-D (ácido 2,4-dicloro fenoxiacético) AIB (ácido indol-3-butírico), AIA (ácido indol-3-acético) y el ANA (ácido naftalenacético) (Hu y Wang, 1983; Bonga y von Aderkas, 1992; Gaspar *et al.*, 1996; Evans, 2003).

Las citocininas son derivados de la adenina, desempeñan un papel importante en diversos procesos de la regulación de crecimiento y desarrollo de las plantas, como el desarrollo floral, tienen como efecto principal la diferenciación y división celular, rompen la dominancia apical y retardan la senescencia de los órganos y tejidos. Actúan en el desarrollo y diferenciación de los cloroplastos, el metabolismo autotrófico, la expansión de hojas y cotiledones y la transmisión de señales para la nutrición, las citocininas se sintetizan principalmente en regiones de crecimiento activo, sobre todo en los meristemos apicales de las raíces y en los embriones, de donde son transportadas al resto de la planta mediante el transporte acropétalo (Bidwell, 1993; Salisbury y Ross, 1994). Las más utilizadas en el cultivo *in vitro* son BA (benciladenina), K (kinetina), 2iP (N-6 dimetil alil aminopurina) y Z (zeatina) (Hu y Wang, 1983; Gaspar *et al.*, 1996; Haberer y Kieber, 2002).

En los tejidos cultivados *in vitro* generalmente una concentración alta de auxinas exógenas con respecto a las citocininas promueve la formación de callo y raíces y es promotora de la inducción de embriogénesis somática, en cambio una concentración alta de citocininas respecto a la de auxinas induce la formación de

brotos, mientras que la formación de callo puede ocurrir en un amplio rango de concentraciones de ambos reguladores de crecimiento vegetal (George y Sherrington, 1984), es decir, los procesos morfogénéticos que permiten la regeneración de nuevos individuos, ocurren bajo condiciones de cultivo más estrictas y precisas.

II.7.4 Algunas condiciones que deben ser controladas *in vitro*.

La luz, tanto su duración (fotoperiodo) como la calidad (longitud de onda), son factores importantes, por sus efectos en el fitocromo en el proceso de la fotosíntesis, influyendo en la síntesis y acumulación de almidón, así como también, en las hormonas endógenas, afectando por ello, el desarrollo del explante o inóculo.

Otro factor es el material con el que se cierra el recipiente de los cultivos, ya que éste puede influir en el intercambio gaseoso del material vegetal y por ello afectar su desarrollo morfogénético con la acumulación de gases como el oxígeno, bióxido de carbono y el etileno (Robert y Loyola, 1985).

Humedad, se conoce poco sobre la influencia de ésta en el crecimiento y desarrollo *in vitro*; sin embargo, se sabe que una alta humedad relativa en la cámara de cultivo favorece una mayor producción de contaminación.

Durante el proceso de establecimiento *in vitro* se pueden presentar distintos problemas tales como la contaminación, que se da cuando no se maneja adecuadamente la técnica de desinfección o de inoculación; los principales contaminantes son bacterias y hongos (Rubluo, 1997).

La hiperhidratación, es la apariencia turgente de los tejidos, con superficie acuosa e hipolignificada, en algunos casos se pierde la coloración y son fácilmente quebradizos (Kevers *et al*, 2004), anatómicamente, la hiperhidratación se trata de una hipertrofia de las células del parénquima y de los espacios intercelulares. Se incrementa el espacio intercelular y el volumen de aire,

contenido en los espacios, además de que los vasos y traqueidas están pobremente lignificados.

La oxidación, está relacionada con la producción de fenoles (Garrido, 1998). Se manifiesta como un ennegrecimiento del explante en la zona que está en contacto con el medio de cultivo que puede extenderse en todo el tejido e incluso en el medio afectando el crecimiento y en algunas ocasiones provoca la muerte del explante (Jiménez, 1998). Steinhart (1962) propuso que la oxidación se debe a las polifenol oxidasas que en algunos tejidos se encuentran relacionadas con la tripsina, la caseína hidrolizada y altos niveles de sacarosa, la oxidación en los tejidos es un indicador de sensibilidad al estrés físico (disección) y estrés químico (desinfección) que cada especie presenta, aunque también sugirió que este fenómeno es la respuesta al estrés causado por la presencia de alguna infección fúngica o bacteriana.

II.8 Cultivo de tejidos vegetales en la Familia Cactaceae.

Las cactáceas constituyen una familia con un alto índice de especies en peligro de extinción, principalmente causado por el saqueo de ejemplares, algunos investigadores han propuesto el uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, como una opción de gran utilidad para la propagación de esta importante familia (Mauseth, 1979a; Johnson y Emino, 1979a; Starling, 1985).

Las primeras técnicas *in vitro* se han explorado desde hace más de 30 años en especies de la familia Cactaceae, sin embargo los protocolos son específicos para cada especie, y aún hace falta explorar la familia, dichos protocolos se han desarrollado para tratar de resolver problemas en especies que producen pocos hijuelos o con problemas de germinación, entre otros, dando una alternativa para evitar el saqueo de individuos silvestres y el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas donde habitan (Fay y Gratton, 1992; Fay, 1993).

Las cactáceas al igual que las demás angiospermas, tienen yemas localizadas en el sitio donde la hoja se une al tallo. Estas yemas, denominadas aréolas son productoras de flores y a veces de raíces y nuevos tallos. Las aréolas normalmente son inactivas después de que han formado las espinas; sin embargo, pueden ser reactivadas *in vitro* para producir brotes (Mauseth, 1979; Bonnes *et al.*, 1993).

El medio más utilizado para inducir la regeneración *in vitro* en cactáceas es el desarrollado por Murashige y Skoog (1962) conocido como MS, y los RCV más frecuentemente usados son el BA y el ANA (Cuadro 2).

Cuadro 2. Algunas especies de cactáceas regeneradas *in vitro*.

ESPECIE	ESTATUS NOM-059- ECOL-2001	EXPLANTE	MEDIO DE CULTIVO Y RCV	RESPUESTA	REFERENCIA
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	No Endémica Pr	Tubérculos	MS, ANA/BA	Embriones somáticos, brotes, enraizamiento y aclimatización	Moebius- Goldammer <i>et</i> <i>al.</i> , 2003
<i>Aztekium ritteri</i>	Endémica A	Tallo	MS, ANA/BA	Embriones somáticos, Brotes	Rodríguez- Garay y Rubluo, 1992
<i>Aztekium hintonii</i> , <i>Mammillaria san- angelensis</i> y <i>M. sanchez-mejoradae</i>	Endémica s A P P	Callo	MS50%, B5, 2,4-D/K	Embriones somáticos	Calderón, 2007
<i>Carnegia gigantea</i> , <i>Pachycereus pringlei</i> y <i>Stenocereus thurberi</i>	No especifica	apical, lateral y transversal	MS, ANA/BA	Brotes	Pérez-Molphe- Balch <i>et al.</i> , 2002

Continuación del Cuadro 2. Algunas especies de cactáceas regeneradas *in vitro*.

<i>Cephalocereus senilis</i>	Endémica A	No específica	MS, K/ANA, IBA, 2,4-D y AIA	Callo	Corona y Yáñez, 1984
<i>Cephalocereus senilis</i>	Endémica A	Segmentos apicales y laterales	MS, BA	Brotes	Flores-León y Ortiz-Montiel, 2000
<i>Cephalocereus apicicephalum</i> , <i>Echinocereus pentalophus</i>	No específica	Semillas	MS50%, ANA/BA	Brotes, enraizamiento	Saucedo, 2006
<i>Coryphantha elephantidens</i>	No endémica A	Raíz	MS, 2,4-D, AIA, AIB, ANA/BA, K	Callo y brotes	Bhau, 1999
<i>Escobaria minima</i> , <i>Mammillaria pectinifera</i> y <i>Pelecyphora aselliformis</i>	Endémica A Pr	No específica	MS, ANA, BA, K y TDZ	Callo y Brotes	Guisti <i>et al.</i> , 2002
<i>Ferocactus acanthodes</i>	No específica	Ápices	MS, ANA/K	Brotes	Ault y Blackmon, 1987
8 especies de cactáceas	No específica	Yemas axilares	MS Varios RCV	Callo, raíces y brotes	Johnson y Emino, 1979
<i>Mammillaria bocasana</i> , <i>M. carmenae</i> y <i>Echinocactus grusonii</i>	Endémicas Pr P P	Aréolas	MS, BA/K	Brotes, enraizamiento	Anicua, 2000

Continuación del Cuadro 2. Algunas especies de cactáceas regeneradas *in vitro*.

<i>Mammillaria conspicua</i>	No específica	Areolas activadas <i>in vivo</i> por etiolación	MS, BA, 2iP	plántulas	Fuentes y Mondragón, 2001
<i>M. carmenae</i> , <i>M. prolifera</i> , <i>Astrophytum myriostigma</i> y <i>Trichocereus spachianus</i>	Endémica P - A -	Yemas axilares	MS, AIA, ANA, BA y K	Brotos y plántulas	Vyskot y Jara, 1984
<i>Mammillaria elongata</i>	No específica	Tubérculos	MS, BA/ANA	Callo, brotes, plántulas	Papafotiou <i>et al.</i> 2001
<i>Mammillaria theresae</i>	Endémica A	Semillas, podarios, cuerpo de tallo, ápices y bases de tallo	MS ANA/BA	Callo, brotes, enraizamiento, aclimatización	Ronquillo, 2009
<i>Mammillaria woodsii</i>	No específica	Médula	MS, AIA/K	Brotos, enraizamiento	Kölar <i>et al.</i> , 1976
<i>Opuntia ficus-indica</i>	No específica	Cotiledones, hipocótilo	MS, K, 2,4-D, picloram	Callo, cultivos en suspensión	Llamoca-Zárate <i>et al.</i> , 1999
<i>Opuntia polyacantha</i>	No específica	Areolas	MS ANA, BA, AG ₃	Aumento de tamaño y producción de hojas	Mauseth y Halperin, 1975
<i>Opuntia polyacantha</i>	No específica	Meristemos apicales de brote	BA GA ₃	Aumento de tamaño Espinas	Mauseth, 1976

Continuación del Cuadro 2. Algunas especies de cactáceas regeneradas *in vitro*.

<i>Pelecyphora aselliformis</i>	Endémica Pr	Plántulas	MS, BA	Brotos, enraizamiento	Santos-Díaz, <i>et al.</i> , 2003
<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	No endémica A	Plántulas Semillas, plántulas	MS, BA MS, ANA/BA	Brotos, enraizamiento Callo, brotes, enraizamiento	Pérez-Molphe-Balch y Dávila-Figueroa, 2002 Flores, 2004
<i>Rhipsalidopsis rosea,</i> <i>Chamaecereus silvestri</i> <i>y Epiphyllum crenatum</i>	No especifica	Areolas	MS, ANA/K	Brotos y plántulas	Garrido, 1998
<i>Sulcorebutia alba</i>	No especifica	Segmentos de tallo	MS, BA	Brotos	Dabekausen <i>et al.</i> , 1991
<i>Turbincarpus laui</i>	Endémica Pr	Plántulas	MS, ANA/BA	Brotos, enraizamiento, aclimatización	Mata <i>et al.</i> , 2001
<i>Turbincarpus pseudopectinatus</i>	Endémica Pr	Brotos	MS ANA/BA 2,4-D/K	Callo, brotes, enraizamiento, aclimatización	González-Caballero, 2008
8 especies de <i>Turbincarpus</i>	Endémicas	Plántulas	MS, BA/2iP	Brotos, enraizamiento	Dávila-Figueroa <i>et al.</i> , 2005
21 especies de los géneros: <i>Astrophytum,</i> <i>Cephalocereus,</i> <i>Coryphantha,</i> <i>Echinocactus,</i> <i>Echinocereus,</i> <i>Ferocactus,</i> <i>Mammillaria,</i> <i>Nyctiocereus</i> y <i>Stenocactus</i>	Endémicas	Semillas y segmentos de brotes juveniles	MS, BA/ANA	Callo y brotes	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> 1998

III. JUSTIFICACIÓN

La familia de las cactáceas está representada por un gran número de endemismos en nuestro país, sus especies están afectadas por el comercio ilegal, la destrucción de su hábitat, el uso de tierras para la actividad agrícola y el sobrepastoreo, por lo que es importante crear estrategias para su conservación y propagación. Aunado a esto, las raras formas, color de las flores y espinas, hacen a esta familia, más vulnerable a saqueos constantes, lo cual contribuye a reducir sus poblaciones.

Dentro de esta familia el género *Mammillaria* es uno de los más importantes, ya que es casi endémico de nuestro país; sin embargo, también es uno de los más explotados en cuanto a comercio ilegal se refiere. *Mammillaria bombycina* Quehl, es una especie de gran valor ecológico, ornamental y económico, endémica de México, se distribuye exclusivamente en Jalisco y Aguascalientes. Está catalogada como especie sujeta a Protección especial por la NOM-059-ECOL-2001 y se encuentra en el Apéndice II de CITES. Si no se toman acciones inmediatas que permitan la propagación de la especie así como su reintroducción a su hábitat natural, se puede poner en peligro de extinción o llegar a la desaparición total de la especie. No existe ningún tipo de reporte más que el de su descripción botánica y su distribución, no se conocen datos de su comercialización y/o propagación, sin embargo se sabe de su comercio ilegal, por lo que el objetivo de este trabajo fue lograr la regeneración *in vitro*, con fines de conservación.

La propagación convencional de esta especie requiere de varios años, debido al largo y lento ciclo de vida, además de la baja tasa de germinación de las semillas, y la poca sobrevivencia de las plántulas, por lo que la técnica de cultivo de tejidos vegetales, es una opción para la rápida propagación de esta y otras especies de cactáceas.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General.

Establecer condiciones experimentales que permitan la regeneración *in vitro* de plantas completas de *Mammillaria bombycina* Quehl.

IV.2 Objetivos Particulares.

- ❖ Establecer asépticamente semillas de *Mammillaria bombycina in vitro*.
- ❖ Evaluar el porcentaje de germinación *in vitro* y *ex vitro* de semillas de *M. bombycina*.
- ❖ Explorar el potencial morfogenético de explantes apicales, laterales de tallo así como de raíz de plántulas germinadas *in vitro*.
- ❖ Estudiar el efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de BA y ANA en los diferentes tipos de explantes empleados.
- ❖ Establecer las condiciones para la aclimatización *ex vitro* de las plantas regeneradas de *M. bombycina*.
- ❖ Contribuir al conocimiento de la biología de *M. bombycina*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los experimentos realizados se utilizaron 456 semillas de *M. bombycina* Quehl (Cactaceae), donadas por el Biólogo Miguel Hernández Alva, de 4 y 6 meses de formados los frutos, dichos frutos provenían de la misma planta.

V.1 Desinfección de semillas.

Las semillas se lavaron con una solución jabonosa por 15 minutos, posteriormente se sumergieron en etanol 70 % (v/v) durante 1 minuto y finalmente se desinfectaron en hipoclorito de sodio 30% (v/v) por 30 minutos, todo esto en agitación constante.

V.2 Siembra *in vitro*.

Dentro de la campana de flujo laminar, las semillas fueron enjuagadas cinco veces con agua destilada esterilizada.

Se sembraron 4 semillas por frasco en medio de cultivo sólido MS 50% de sales inorgánicas, sacarosa 30g/l y Bacto agar (Bioxón®) 9 g/l. Se establecieron dos lotes cada uno con 178 semillas, uno bajo fotoperíodo de 16h luz/8h oscuridad, y el otro solamente en oscuridad (30 días y luego transferido a fotoperíodo). Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

V.3 Siembra *ex vitro*.

Se sembraron 100 semillas con el mismo tipo de desinfección que en condiciones *in vitro*, en una mezcla de tierra negra y tepojal 1:1, desinfectada en

horno de microondas por 30 minutos, dicha mezcla fue colocada en charolas de plástico con tapa, incubadas bajo fotoperiodo de 16 h luz a 25°C.

V.4 Explantes.

A partir de las plántulas germinadas por cultivo *in vitro* se obtuvieron 3 tipos de explantes: plántula, lateral y raíz.

Plántulas que tenían entre 0.5-0.7 cm de longitud, se les realizó un corte transversal y se separó la raíz del tallo, al cual se le llamo plántula (Figura 3a).

Plántulas entre 1.0-1.5 cm longitud, se les hizo un corte transversal y se separó la raíz del tallo, este fue disectado longitudinalmente, en dos partes denominados laterales de tallo (Figura 3b).

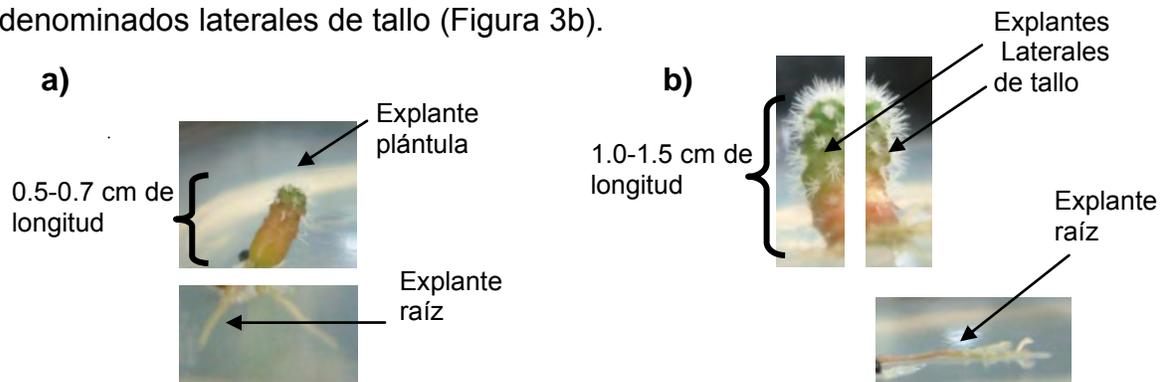


Figura 3. Cortes en las plántulas, para obtener los diferentes explantes, a) explante plántula y raíz; b) explantes laterales de tallo y raíz.

Los explantes fueron inducidos por dos meses, en medio MS 50% de sales inorgánicas, sacarosa 3%, agar Bioxon® 0.9%, adicionado con BA (0, 1.0 y 2.0 mg/l) en combinación con ANA (0, 0.1 y 0.5 mg/l). Incubados en fotoperiodo (16h luz, 8h oscuridad) en una cámara de crecimiento a $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

Para cada tratamiento se utilizaron:

- 3 explantes de plántula por frasco con 4 repeticiones
- 4 explantes laterales por frasco con 5 repeticiones
- 22 explantes de raíz

V.5 Mantenimiento.

Posteriormente fueron transferidos a medio MS 50%, sacarosa 3%, agar 0.9%, libre de RCV. Los subcultivos posteriores se efectuaron cada dos meses, con la finalidad de reducir la hiperhidratación de los explantes.

V.6 Análisis estadístico.

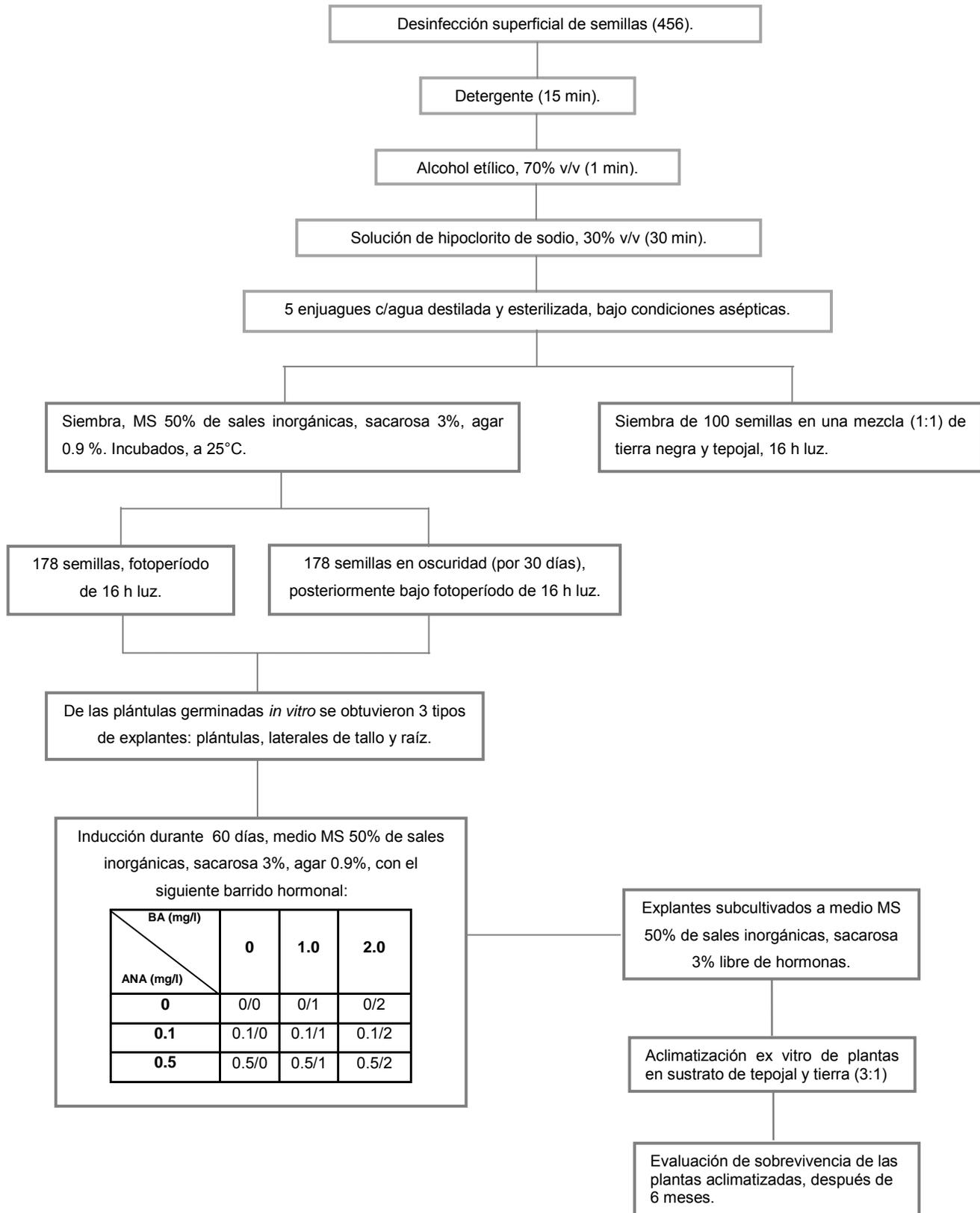
Transcurridos 6 meses de iniciada la inducción, se contabilizaron los brotes obtenidos, y se realizó un análisis estadístico, con el programa *Statistica versión 6.0*, que consistió en un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Duncan, para determinar en qué tratamientos había diferencias significativas.

Estos análisis se realizaron por separado para los brotes obtenidos vía organogénesis directa y vía organogénesis indirecta entre los tratamientos provenientes de plántula, y para los brotes obtenidos vía directa e indirecta de laterales de tallo. Finalmente se realizó el mismo análisis para todos los tratamientos sin importar el tipo de explante.

V.7 Aclimatización.

Dentro de la campana de flujo laminar, se separaron las plantas de tamaño mayor a 1.5 cm, con raíces, con espinas, sin hiperhidratar. Las raíces se lavaron con agua corriente hasta eliminar los restos de agar. Un total de 260 plantas se plantaron en charolas de plástico con tapa, en una mezcla de tepojal y tierra negra (3:1), previamente desinfectada en horno de microondas por 60 min, las charolas se mantuvieron en invernadero, con riego cada 3 días, posteriormente las plantas se transfirieron a macetas de plástico con el mismo sustrato y las mismas condiciones de invernadero, y se contabilizó la sobrevivencia de estas al termino de 6 meses.

V.8 Método para la regeneración *in vitro* de *M. bombycina* Quehl.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Desinfección.

La desinfección tuvo resultados exitosos ya que solo 12 semillas (3.3%) sembradas *in vitro*, tuvieron contaminación por hongos que pudo deberse a errores de manipulación dentro de la campana de flujo laminar, dichas semillas son de un tamaño aproximado de 1 mm de longitud (Figura 4).

Se han tenido resultados similares a los obtenidos para *M. bombycina* en otras de especies de cactáceas, en donde se utilizó el mismo procedimiento de desinfección, por ejemplo, en *Ariocarpus retusus* (Olguín, 1994); *A. kotschobeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003); *Cephalocereus apicicephalium* y *Echinocereus pentalophus* (Saucedo, 2006); *Mammillaria coahuilensis* (Flores, 2007) y *M. theresae* (Ronquillo, 2009). Flores (2004) reportó que sólo obtuvo el 6% de contaminación por hongos en la desinfección de semillas de *Pelecycphora strobiliformis*.

Mientras que Mata-Rosas *et al.*, (2001) para semillas de *Turbinicarpus laui*; y Gómez (2008) para semillas de *A. bravoanus* utilizaron una solución de NaOCl 30% 30 min, para la desinfección de semillas obteniendo resultados exitosos, al igual que Martínez (2007) con semillas de *Mammillaria pectinifera*, al utilizar una solución de NaOCl 5% 25 min.

Si bien es cierto que los ensayos para propagar plantas adultas a partir de estructuras somáticas es una necesidad, muchas veces se ven afectados y no se logran por las grandes dificultades de contaminación microbiana. De ahí que si se cuenta con semillas, el problema puede resolverse más fácilmente.

Además cuando las plantas son propagadas con propósitos de conservación es importante mantener la diversidad genética, por lo que es conveniente iniciar los

cultivos con semillas (Fay y Gratton, 1992); debido a que éstas pueden resistir una enérgica esterilización superficial y germinar bajo condiciones asépticas *in vitro* para obtener plantas libres de patógenos, mismas que pueden ser utilizadas como fuente de explantes (George y Sherrington, 1984).

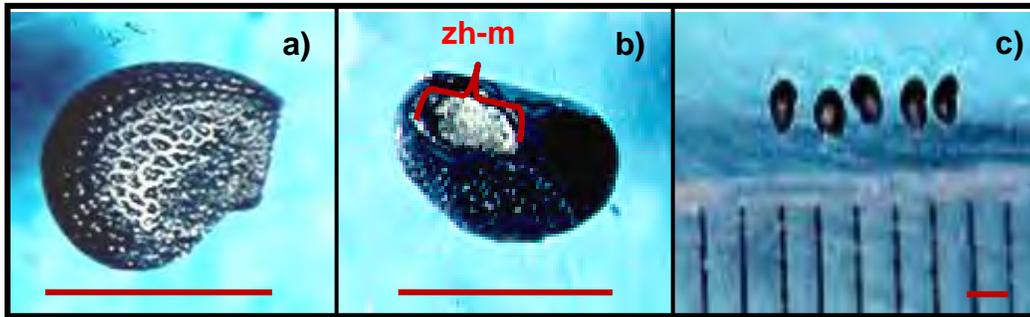


Figura 4. Semillas de *M. bombycina*, a) ornamentaciones de la testa, b) zona hilo-micropilar (zh-m) y c) tamaño de las semillas (Barra 1 mm).

VI.2 Germinación de semillas.

El criterio de germinación fue el rompimiento de la testa de la semilla y la emergencia de la radícula. En todas las semillas se dió el rompimiento de la testa, posteriormente la emergencia del ápice de la radícula, seguido del crecimiento del cuerpo del embrión, y el desarrollo de la plántula (Figura 4).

El rompimiento de la cubierta seminal ocurrió a partir del séptimo día en las semillas sembradas *in vitro* y bajo fotoperíodo, mientras que las semillas que permanecieron en oscuridad al término de 30 días no tuvieron respuesta, por lo que se colocaron en luz y al cabo de 15-20 días comenzaron a germinar. En tanto que para las semillas *ex vitro*, el comienzo de la germinación fue entre los 15-30 días. (Gráfica 1).

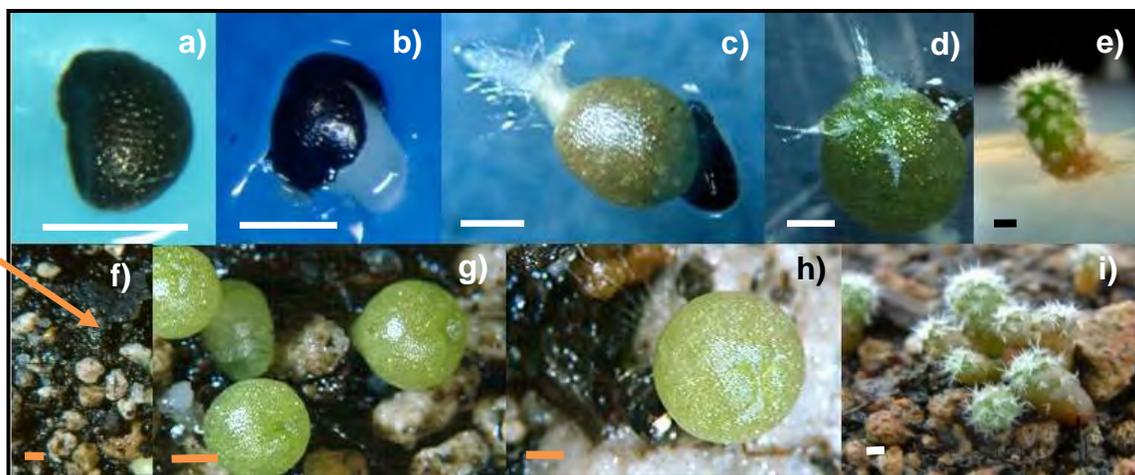
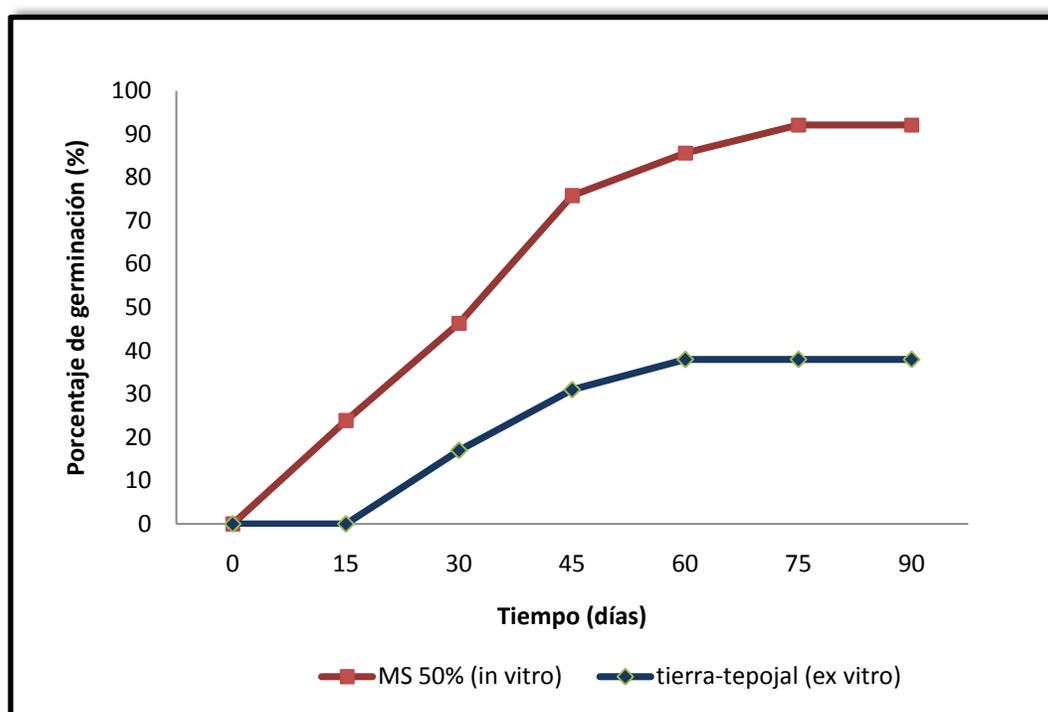


Figura 5. Etapas de la germinación *in vitro* (a-e) y *ex vitro* (f-h) de *Mammillaria bombycina*: a) Semilla; b) rompimiento de la testa y emergencia de la radícula, 7 días; c) plántula, 30 días; d) primeras espinas en el ápice, 4 meses y e) plántula de 1.5 cm de longitud, 1 año; f) semillas sobre el sustrato tierra-tepojal; g) plántulas de forma esférica, 30 días; h) acercamiento de una plántula; i) plántulas con una altura de 1 cm a 6 meses (barra de 1 mm).



Gráfica 1. Porcentaje de germinación de semillas de *M. bombycina*, sembradas *in vitro* y *ex vitro* bajo fotoperiodo (16 h luz).

Se ha encontrado que la germinación de algunas especies de cactáceas se ve estimulada por la luz, otras especies germinan en oscuridad y otras más

necesitan variaciones lumínicas. Rojas-Aréchiga *et al.*, (1997), en un estudio de 7 especies de cactus del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, de las cuales 4 especies son globosas y 3 columnares, encontraron que las respuestas a los distintos tipos de iluminación agrupaban a dichas especies de acuerdo a su forma de vida. Las especies con forma de vida globosa, tuvieron un comportamiento fotoblástico, mientras que las especies columnares presentaron un comportamiento indiferente a la luz.

En el presente estudio la germinación de *M. bombycina*, solo ocurrió en presencia de un fotoperiodo de 16h luz y 8 de oscuridad, tanto *in vitro* como *ex vitro*. Las semillas que permanecieron en oscuridad total, no germinaron al cabo de 30 días, si lo hicieron después de que fueron colocadas bajo fotoperiodo.

En un estudio de 8 especies de cactáceas (*Mammillaria aplanata*, *M. winteriae*, *Escobaria runyonii*, *Anicistrocactus scheri*, *Echinocereus pectinatus*, *Aztekium ritteri*, *Epithelantha micromeris* y *Echinocactus texensis*), ninguna de las especies germinaron en condiciones de oscuridad (Maiti *et al.*, 1994).

La germinación de semillas fotoblásticas en ecosistemas áridos se restringe a la parte superior del suelo, la cual se seca rápidamente. Por ello, los requerimientos de luz aseguran que la germinación se dará únicamente después de fuertes lluvias que humedecen el suelo por periodos prolongados (Kigel, 1995 en Rojas-Aréchiga *et al.*, 2001). La mayoría de las semillas fotoblásticas son pequeñas (Hammouda y Bakr, 1969), éstas, debido a su pequeño tamaño, se pondrían en peligro al germinar a cierta profundidad debido a sus limitados recursos alimenticios, que podrían no ser suficientes para lograr que la plántula emerja y por lo tanto podrían morir. Por ello, la germinación con requerimiento de luz, asegura que sólo las semillas que se encuentran cerca de la superficie del suelo germinarán (Benítez-Rodríguez *et al.*, 2004).

Al término de 75 días, el 92.13% (328) de las semillas habían germinado *in vitro*. Las semillas en tierra-tepojal, comenzaron a germinar entre el día 20 y 25, alcanzando el 38% (38) en 60 días. (Cuadro 3 y Gráfica 1).

Como puede observarse en la Gráfica 1, hubo un rápido aumento en la germinación *in vitro* entre los 0-45 días; entre los días 0-15 hubo un promedio de 5.6 semillas germinadas por día; en el siguiente periodo que fue de los días 15-30, 5.3 semillas germinaron por día, aunque el promedio decayó un poco en este período la germinación no se detuvo, y para el siguiente periodo que fue de los 30-45 días de iniciada la siembra se obtuvo un promedio de 7 semillas germinadas por día, es decir, que el promedio tuvo un aumento (Cuadro 3). Esto puede interpretarse como un carácter adaptativo de las especies que mantienen así un lote de semillas que no morirían en caso de cambiar las condiciones en que estaría ocurriendo la germinación de un primer grupo de semillas. En algunos casos, una sola planta puede producir diferentes grados de latencia en semillas individuales, de tal forma que la germinación exhibe una distribución discontinua en el tiempo, es decir, en un grupo de semillas puede existir un número reducido inicial de semillas en germinación, seguidas de otras con un período prolongado de latencia que pueden germinar repentinamente (Rabenda, 1990). Posteriormente se observó un decremento en cuanto a la germinación hasta que ésta cesó a los 75 días.

En cambio, para las semillas germinadas *ex vitro* se obtuvo que entre los 15-30 días el promedio de germinación fue de 1.13 por día, siendo éste el más alto, posteriormente el promedio fue decayendo hasta que al día 60 ya no germinaron más semillas dentro de las condiciones ensayadas (Cuadro 3).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Flores (2007), en semillas de *M. coahuilensis*, que obtuvo el 90% de germinación en medio MS50%, con semillas de 6 meses de almacenamiento, y que comenzaron la germinación entre el cuarto y sexto día de iniciada la siembra; el porcentaje reportado en *M.*

magnimamma (Ruedas, 1999), al utilizar agar al 2% como sustrato fue de más del 80%. Para *Thelocactus rinconensis* (Díaz, 2007), reportó el 79% de germinación en medio MS 50% con sacarosa 15 g/l, el inicio de la germinación fue al sexto día.

**Cuadro 3. Germinación de semillas de *M. bombycina* en dos condiciones:
a) Medio MS 50% de sales inorgánicas, sacarosa 3% (*in vitro*);
b) Mezcla de tierra negra y tepojal (*ex vitro*).**

a) <i>In vitro</i>				b) <i>Ex vitro</i>			
TIEMPO (días)	SEMILLAS GERMINADAS/ NÚMERO INICIAL	%	Promedio por día de germinación	TIEMPO (días)	SEMILLAS GERMINADAS/ NÚMERO INICIAL	%	Promedio por día de germinación
0	0/356	0.0	0	0	0/100	0	0
15	85/356	23.87	5.6	15	0/100	0	0
30	165/356	46.34	5.3	30	17/100	17	1.13
45	270/356	75.84	7	45	31/100	31	0.93
60	305/356	85.67	2.3	60	38/100	38	0.46
75	328/356	92.13	1.5	75	38/100	38	0.46

Olguín (1994) reportó para *A. retusus* que el inicio de la germinación *in vitro* se dio entre 5-7 días de iniciados los cultivos, logró un porcentaje de germinación de 66.3% en medio MS y 63.8% en MS 50% con 15 g/l de sacarosa, después de 50 días, algo similar ocurrió en *A. kotschoubeyanus*, con un porcentaje de

germinación del 74 y 90% en lapsos de 8-75 y 8-30 días respectivamente en MS (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003). Gómez (2008) señaló que para *A. bravoanus* el inicio de la germinación se dio a los 10 días en MS 50%, obtuvo a los 25 días el 86.6% de germinación. Mata-Rosas *et al.*, (2001) reportaron para *Turbinicarpus laui*, una germinación de 41.7% en MS y 28% en MS 50% al cabo de 5 semanas. Saucedo (2006) utilizó medio MS 50% adicionado con BAP/ANA y obtuvo 32% de germinación en 7 semanas para *Cephalocereus apicicephalium*.

La germinación gradual en cactáceas parece ser una estrategia adaptativa a condiciones cambiantes del medio. Algunos mecanismos de latencia y longevidad de las semillas son factores que posiblemente tienen mayor influencia en la tasa de germinación, esto hace evidente posibles estrategias que presentan las especies en la deposición de un banco permanente o temporal en el suelo, mostrando las posibles relaciones que guardan los frutos que permanecen en la planta y/o la ontogenia de las semillas con el rompimiento de la latencia. Los mecanismos de latencia pueden ser la explicación de que no germinara la totalidad de las semillas. Se sabe que muchas semillas no germinan por esta causa a pesar de tener las condiciones favorables para ello. Se considera que las cactáceas, que generalmente habitan ambientes áridos, presentan mecanismos naturales de latencia. Resulta notable que muchas semillas de plantas silvestres, que maduraron mientras la planta madre estuvo expuesta a condiciones naturales severas, están en latencia (Rabenda, 1990). Para *M. bombycina*, se obtuvo un porcentaje de germinación alto (92.13 %), sin embargo no se logró el 100% de germinación, esto puede deberse a que pudo presentarse uno o varios mecanismos de latencia que responden a una estrategia para la sobrevivencia de la especie en su medio natural.

Bajo condiciones *in vitro* *M. bombycina*, alcanzó un mayor porcentaje de germinación (92.13%) en comparación con las condiciones de tierra-tepojal (38%), después de 75 días. El medio MS ha sido el más empleado para

germinar semillas de cactáceas *in vitro* con el fin de obtener plántulas que se utilizan como fuente de explantes (Starling, 1985; Smith *et al.*, 1991), incluso también se ha empleado MS al 50% en la concentración sus sales (Ault y Blackmon, 1987), sin embargo, aún cuando se reportan pocos datos en relación a los porcentajes de germinación, se considera que éstos son frecuentemente más elevados en el sistema de cultivo *in vitro* que al aplicar técnicas convencionales (Fay y Gratton, 1992). Esto puede deberse, a que en condiciones *in vitro*, hay una alta concentración de humedad relativa, disponibilidad de agua, luz y temperatura controladas.

VI.2.1 Otras respuestas *in vitro* de las semillas.

Al término de 2 meses de iniciada la siembra, en 19 plántulas germinadas, sus tejidos comenzaron a hincharse, observándose muy turgentes y con apariencia hiperhidratada hasta reventar y desdiferenciarse a callo, y no presentaron morfogénesis, esto ocurrió en medio basal (MS 50%) sin RCV (Cuadro 4 y Figura 6). Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores, ya que la hiperhidratación es uno de los principales problemas que presentan las cactáceas durante el cultivo *in vitro*.

Cuadro 4. Respuestas observadas en las semillas cultivadas *in vitro* de *M. bombycina*.

# total de semillas	Germinadas						Contaminadas		Sin respuesta	
	En desarrollo		Callo		Oxidadas					
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
356	328	92.13	19	5.33	24	6.74	12	3.37	16	4.49

Todas las semillas que germinaron *in vitro*, lo hicieron a lo largo de 75 días, sin embargo, 16 semillas del total no presentaron ningún tipo de respuesta, se dejaron en el medio de cultivo inicial y posteriormente se realizaron subcultivos para renovarlo, a lo largo de 12 meses, sin embargo no se obtuvo respuesta (Cuadro 4).

En otras semillas de *M. bombycina* (24) al comienzo de la germinación tuvieron una rápida respuesta de oxidación, por lo que la emergencia de la radícula no fue total, posteriormente ésta murió (Figura 6).

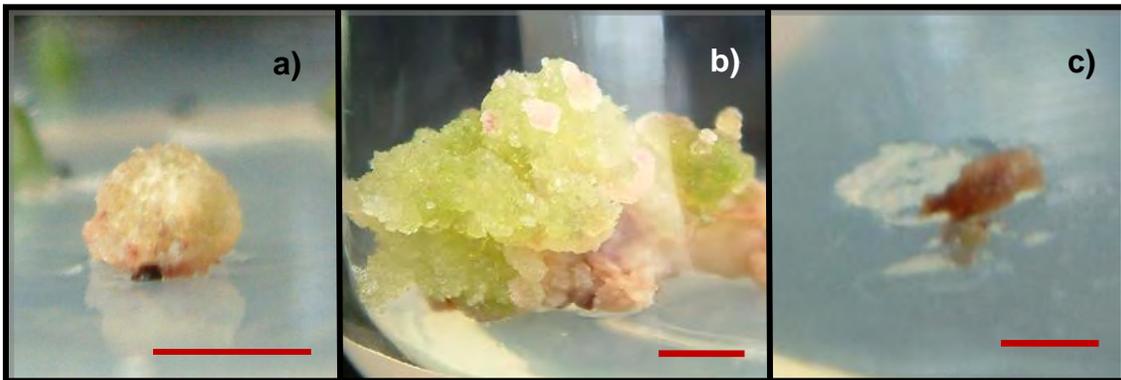


Figura 6. a) Callo producido a partir de la germinación, a los 2 meses de iniciados los cultivos; b) proliferación de callo y c) radícula germinada y oxidada. (barra 1 cm).

VI.3 Fuente de explantes.

Debido a que la germinación de las semillas fue asincrónico, es decir, que no todas las semillas germinaron al mismo tiempo, y además su desarrollo se dio de forma muy lenta, las primeras plántulas en disectarse fueron las de 9 meses de edad, que presentaron un tamaño de brote de entre 0.5 a 0.7 cm de longitud, dichas plántulas apenas tenían las primeras aréolas y espinas del ápice las cuáles debido a su pequeño tamaño sólo se les realizó un corte en la parte basal, separando la raíz del resto de la plántula.

Otro lote de plántulas con una longitud de entre 0.7 cm hasta 1.5 cm, y aréolas a lo largo del tallo, fueron disectadas en forma longitudinal, y también separando la raíz del tallo.

Estos tipos de corte dieron como resultado tres tipos de explantes (plántula, laterales de tallo y raíces) que fueron sometidos a los mismos tratamientos hormonales.

VI.4 Oxidación de los explantes.

Todos los explantes presentaron oxidación en el corte. En todos los explantes que se presentó la oxidación, esta fue letal y murieron antes de presentar algún tipo de respuesta morfogénética (Cuadro 5 y Figura 7). Los explantes pequeños son dañados fácilmente y tienden a presentar baja viabilidad y capacidad regenerativa (Litz y Jarret, 1993).

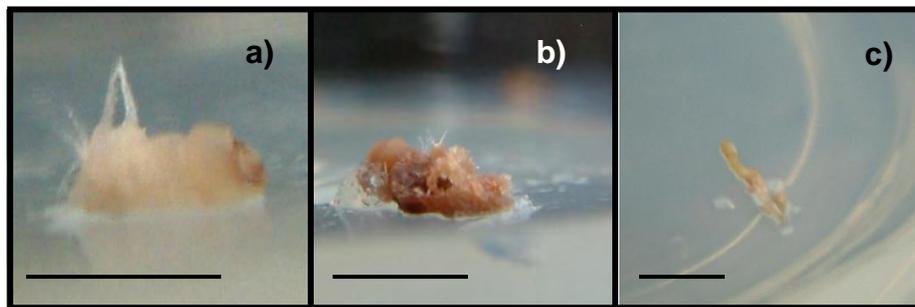


Figura 7. oxidación letal en los explantes: a) explante plántula, b) explante lateral de tallo y c) explante raíz (barra 1 cm).

Cuadro 5. Oxidación letal en los 3 tipos de explantes.

Explante	# total de explantes	# de explantes oxidados
Plántula	110	50
Lateral de tallo	176	25
Raíz	198	68

La oxidación en explantes pequeños ha sido reportado en varias especies de *Mammillaria*; tales como *M. bocasana*, *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana*, *M. orcutti*, *M. picta*, *M. perbella*, *M. pectinifera*, *M. rhodantha* y *M. zephyranthoides*, puesto que el 80% de sus explantes presentaron oxidación, y necrosis, posiblemente debido al corte excesivo del tejido (Ramírez-Malagón et al., 2007). Ronquillo (2009) también reportó para *M. theresae*, el 50% de oxidación en los explantes de podarios disectados longitudinalmente.

VI.5 Rizogénesis.

Para los explantes de **plántula**, 18% de los explantes, presentaron la regeneración de raíz, y para los explantes **laterales de tallo** fue el 14 %. Siendo el tratamiento 1 o control y el tratamiento 7 (0.5mg/l de ANA) los que más explantes presentaron regeneración de raíz (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número y porcentaje de explantes totales que regeneraron raíz.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento BA/ANA mg/l	No. de explantes que regeneraron raíz	Porcentaje (%)
1	0/0	10/32	3.2
2	1.0/0	1/32	0.3
3	2.0/0	2/32	0.6
4	0/0.1	3/30	0.9
5	1.0/0.1	1/32	0.3
6	2.0/0.1	1/32	0.3
7	0/0.5	18/32	5.7
8	1.0/0.5	5/32	1.6
9	2.0/0.5	5/32	1.6

VI.6 Callo.

El callo se define como un conjunto de células vegetales desorganizadas, amorfas y desorganizadas, formadas a partir de la división activa de células. Dicha proliferación da lugar a la formación irregular con distintas características, variando en su textura, apariencia y tasa de crecimiento, dependiendo del tejido que le dio origen, así como también la composición del medio de cultivo. Esto es causado por el estímulo de los RCV tanto endógenos, como exógenos, que cambian el metabolismo celular de quiescente a metabólicamente activo (Donelly Vivaver, 1988; George y Sherrington, 1984).

El callo en los explantes de **plántula** se presentó a partir del día 20, en todos los tratamientos, excepto el tratamiento control, este callo fue muy incipiente y sólo se observó en el área del corte (Figura 8a), hasta el día 70 comenzó a tener un crecimiento acelerado, sobre todo en el tratamiento **5** (BA1.0/ANA 0.1 mg/l). El callo fue de apariencia friable, hidratado, de color verde claro con zonas blanquecinas, algunos presentaban coloraciones rosas o rojizas (Figura 8b), debidas probablemente a la presencia de betalainas, producidas por estrés (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998). La apariencia del callo fue similar en todos los tratamientos.

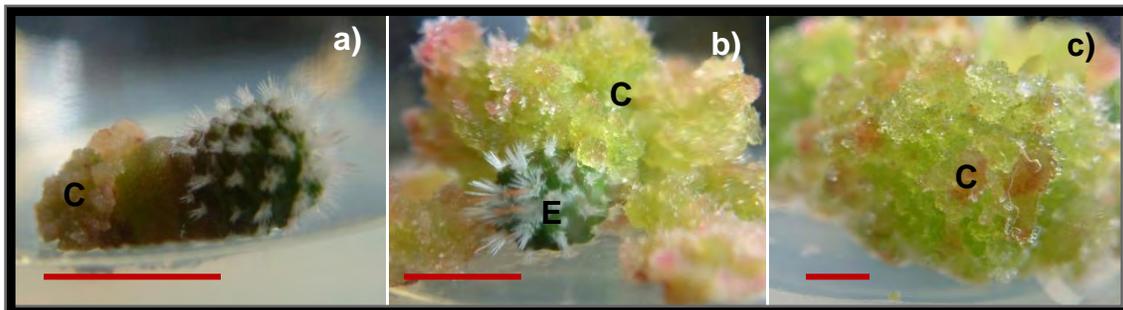


Figura 8. a) formación de callo en el área del corte de un explante de plántula; b) crecimiento de callo, cubriendo un brote, proveniente de un explante de plántula del T5 (1.0/0.1 mg/l de BA/ANA) a los 70 días de iniciados los cultivos; c) callo producido en el T5 (1.0/0.1 mg/l de BA/ANA) a los 90 días de iniciados los cultivos, (C=callo, E=explante). Barra 1 cm

La mayor abundancia de callo se observó en los tratamientos **5** (1.0/0.1 mg/l de BA/ANA) y **9** (2.0/0.5 mg/l de BA/ANA). El callo comenzó a proliferar de una manera rápida cubriendo los brotes regenerados (Figura 8c), evitando así su desarrollo e individualización, este tipo de respuesta ha sido reportada por Tapia (2006) y Zamora (2007) para *Cephalocereus senilis* y *Thelocactus bicolor*, respectivamente.

En cuanto a los explantes de **laterales de tallo** hubo formación de callo en el tratamiento **1**, además de reportarse la formación de callo en plántulas recién germinadas, lo que indica que la formación de callo para *M. bombycina*, no estuvo sujeta a la presencia de RCV, este tipo de respuesta puede atribuirse a la presencia de auxinas endógenas en el tejido.

El desarrollo de callo en ausencia de RCV ha sido reportado en varias investigaciones tales como en secciones del cuerpo de tallo en *Mammillaria theresae* (Ronquillo, 2009), en plántulas recién germinadas en *M. coahuilensis* (Flores, 2007) explantes de *Thelocactus bicolor* (Zamora, 2007) y *Cephalocereus senilis* (Flores-León y Ortíz-Montiel, 2000), entre otros.

VI.7 Inducción a partir de explantes plántula.

Transcurridos 40 a 50 días en el medio de inducción, en los explantes apicales se comenzó a observar un engrosamiento y aumento de tamaño, dando lugar a la separación de aréolas y posteriormente a la formación de nuevos brotes vía **organogénesis directa** (Figura 9 y 10), en los tratamientos **3** (2.0 mg/l BA), **4** (0.1 mg/l ANA), **6** (2.0/0.1 mg/l BA/ANA), **7** (0.5 mg/l ANA) y **9** (2.0/0.5 mg/l BA/ANA), y se regeneraron 3, 3, 1, 7 y 8 brotes respectivamente (Cuadro 7), estos brotes se formaron a partir de las aréolas. No se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos. Como puede observarse en la gráfica 2, los tratamientos donde hubo formación de brotes fue en los que la citocinina se encontraba en mayor concentración (BA 2.0 mg/l), en combinación con

concentraciones bajas de auxina o en ausencia total de ésta, sin embargo en dos tratamientos se obtuvo la regeneración de brotes sólo con la presencia de auxina, esto es poco reportado en investigaciones de regeneración *in vitro* en cactáceas, Rubluo *et al.* (2002) encontraron que para la regeneración de brotes de *Mammillaria san-angelensis*, la adición de auxina como único regulador exógeno de crecimiento promovió respuestas morfogénicas, Zamora (2007) reportó para *Thelocactus bicolor*, que sus mejores tratamientos fueron con las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/l de ANA.

La **organogénesis indirecta** en los explantes plántula fueron los más regenerativos ya que dieron un total de 620 brotes a los 6 meses de iniciados los cultivos (Gráfica 3), cabe mencionar que este tipo de explante fue el que más pérdidas tuvo, debido al pequeño tamaño, presentaron el 45% de muerte por oxidación, aun así el 30% de los explantes se desdiferenció por completo dando origen a callo de color verde claro, de apariencia friable e hidratado (Figura 11). En el tratamiento **5** (1.0/0.1 mg/l BA/ANA) se contabilizaron 410 brotes, en el **9** (2.0/0.5 mg/l BA/ANA) se obtuvieron 95 brotes, en el **3** (2.0 mg/l BA) se contabilizaron 57 brotes, en el **6** (2.0/0.1 mg/l BA/ANA) 48 brotes, en el **8** (1.0/0.5 mg/l BA/ANA) 7 brotes y en el **2** (1.0 mg/l BA) se contabilizaron 3 brotes. En cuanto a esta vía de regeneración se pudo establecer mediante el análisis estadístico, diferencias significativas del tratamiento **5** (1.0/0.1mg/l de BA/ANA), con respecto a los demás tratamientos: **1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, y 9** donde no existieron diferencias significativas entre estos últimos.

Los tratamientos que regeneraron mayor número de brotes fueron aquellos en donde la citocinina estuvo presente (BA 2 y 1 mg/l) combinada con bajas concentraciones de ANA (0.5 y 0.1 mg/l) o incluso su ausencia (Cuadro 7). Esto concuerda con varios reportes de cactáceas, Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) reportó para 21 especies de cactáceas, la formación de brotes para varios géneros entre ellos *Mammillaria*, en concentraciones de 2 y 1 mg/l de BA combinado con 0.01 mg/l de ANA o en la ausencia de ésta, Ronquillo (2009)

para *M. theresae*, encontró la mayor formación de brotes en concentraciones altas de citocininas y bajas de auxina (3/0.1 y 3.5/0.5 mg/l BA/ANA), además con las mismas concentraciones y combinaciones en las que se obtuvieron mejores resultados para *M. bombycina*, Ronquillo (2009) reportó la formación de más de 50 brotes por tratamiento. Flores (2007) para *M. coahuilensis* reportó para explantes apicales su mejor tratamiento con 1 mg/l BA, con 7.5 brotes por explante.

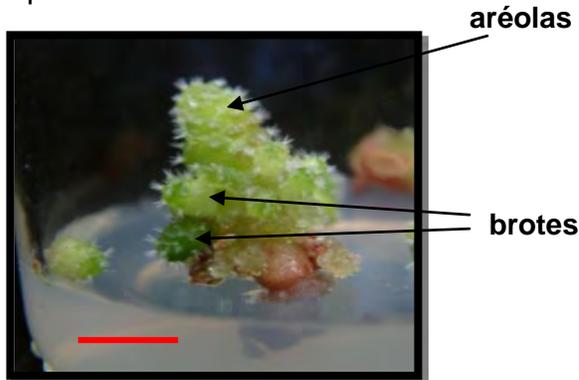


FIGURA 9. Organogénesis directa, T6 (2.0/0.1 mg/l BA/ANA), 5 meses de iniciados los cultivos. (Barra 1 cm)

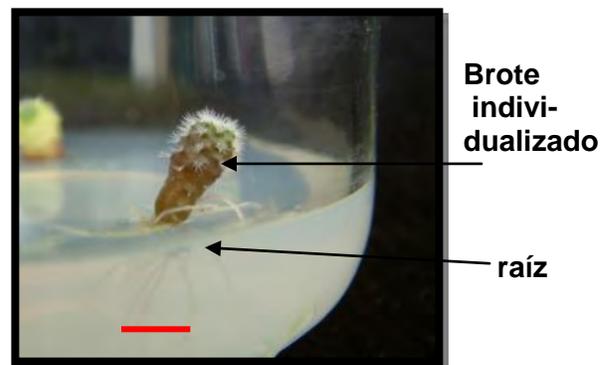


Figura 10. Brote con raíz regenerada, proveniente de organogénesis directa, 7 meses de iniciados los cultivos. (Barra 1 cm)

VI.8 Inducción a partir de explantes laterales de tallo.

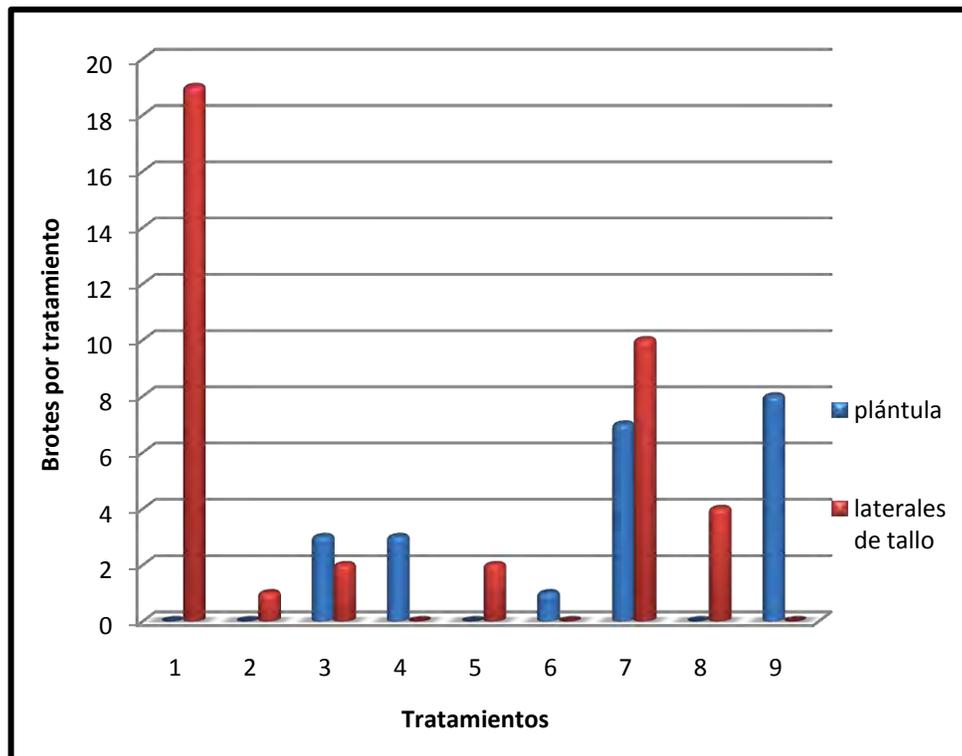
A los pocos días de iniciados los cultivos en los explantes laterales se observó engrosamiento y el aumento de tamaño, dando lugar a la separación de los tubérculos, posteriormente se observó la formación de nuevos brotes que surgieron de las aréolas en los ápices de los tubérculos, entre los 40 y 50 días de iniciados los cultivos. Esto ocurrió en todos los tratamientos incluso en el **1** o el control (0/0 mg/l BA/ANA), siendo éste el que mayor número de brotes (19) produjo, seguido del tratamiento **7** (0.5 mg/l ANA) con 10 brotes regenerados vía organogénesis directa (Gráfica 2).

Cuadro 7. Respuestas de los explantes obtenidos de plántulas de *M. bombycina* a 6 meses iniciados los cultivos

TRATAMIENTO	INDUCCIÓN (2 MESES) CON REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l)		EXPLANTE	# DE EXPLANTES QUE REGENERARON RAÍZ	# DE EXPLANTES OXIDADOS	# DE EXPLANTES CONTAMINADOS	# DE EXPLANTES QUE FORMARON CALLO	# DE BROTES REGENERADOS POR ORGANOGENESIS DIRECTA	# DE BROTES REGENERADOS POR ORGANOGENESIS INDIRECTA
	BA	ANA							
	1	0							
			Laterales	8/20	3/20	0/20	6/20	19	26
			Raíces	-	22/22	0/22	0/22	0	0
2	1.0	0	Plántulas	1/12	8/12	0/12	2/12	0	3
			Laterales	0/20	4/20	0/20	13/20	1	34
			Raíces	-	18/22	0/22	0/22	0	0
3	2.0	0	Plántulas	2/12	3/12	0/12	7/12	3	57
			Laterales	0/20	5/20	3/20	9/20	2	55
			Raíces	-	0/22	0/22	1/22	0	2
4	0	0.1	Plántulas	2/12	4/12	0/12	3/12	3	0
			Laterales	1/18	2/18	3/18	14/18	0	40
			Raíces	-	8/21	0/21	0/21	0	0
5	1.0	0.1	Plántulas	0/12	7/12	0/12	5/12	0	410
			Laterales	1/20	1/20	1/20	17/20	2	41
			Raíces	-	4/22	0/22	1/22	0	0
6	2.0	0.1	Plántulas	0/12	6/12	0/12	6/12	1	48
			Laterales	1/20	2/20	2/20	15/20	0	69
			Raíces	-	12/22	4/22	2/22	0	0
7	0	0.5	Plántulas	5/12	4/12	0/12	3/12	7	0
			Laterales	13/20	2/20	2/20	3/20	10	10
			Raíces	-	0/22	0/22	0/22	0	0
8	1.0	0.5	Plántulas	3/12	5/12	0/12	4/12	0	7
			Laterales	2/18	0/18	0/18	16/18	4	21
			Raíces	-	0/21	0/21	0/21	0	0
9	2.0	0.5	Plántulas	5/12	3/12	0/12	4/12	8	95
			Laterales	0/20	6/20	0/20	14/20	0	18
			Raíces	-	4/22	0/22	2/22	0	5

Los análisis estadísticos demostraron que estos tratamientos no fueron diferentes entre ellos estadísticamente, sin embargo con respecto a los demás tratamientos (2, 3, 4, 5, 6, 8 y 9) si existieron diferencias significativas con $p \leq 0.05$.

Obtener organogénesis directa en el tratamiento control, demostró que los tejidos tuvieron células que expresaron una amplia plasticidad morfogénica, dicha capacidad se ha reportado en la formación de brotes en los cultivos de *M. san-angelensis* (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989); *Turbincarpus pseudopectinatus* (González, 2008) y en *Ariocarpus bravoanus* (Gómez, 2008), entre otros.



Gráfica 2. Número de brotes totales por tratamiento, generados por explantes plántula y laterales de tallo vía organogénesis directa a los 6 de iniciados los cultivos.

Se considera que las plantas derivadas por vía de organogénesis directa son genéticamente estables por lo que esta vía es recomendable cuando la propagación tiene fines de conservación (Murashige, 1974; Hu y Wang, 1983).

En cuanto a la **organogénesis indirecta** en los explantes laterales de tallo, los tratamientos que más brotes produjeron fueron el **6** (2.0/0.1 mg/l de BA/ANA) con 69 brotes y el **3** (2.0 mg/l de BA) con 55 brotes (Gráfica 3 y Figura 11), no existieron diferencias significativas entre estos tratamientos ni con respecto a los demás (1, 2, 4, 5, 7, 8 y 9).

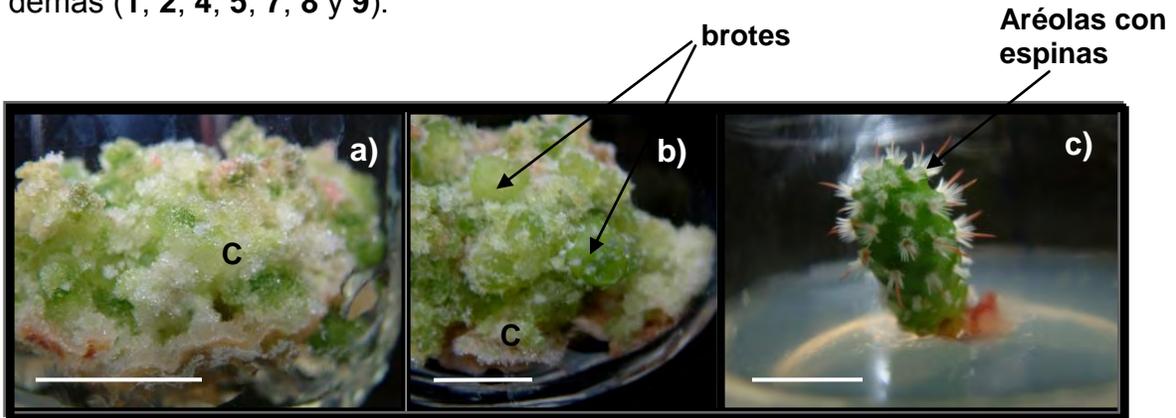
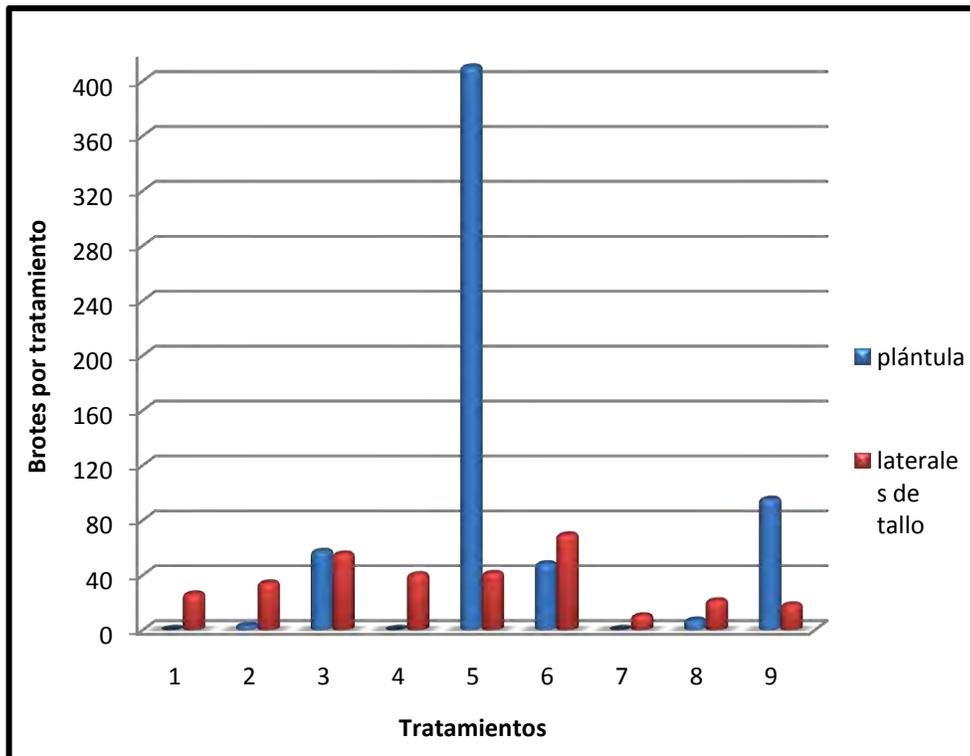


Figura 11. Organogénesis indirecta: a) callo en el T8, 2 meses iniciados los cultivos; b) formación de brotes en el T5, 4 meses iniciados los cultivos; c) brote individualizado, 6 meses de iniciados los cultivos, (C=callo). Barra 1 cm.



Gráfica 3. Número de brotes totales por tratamiento generados por organogénesis indirecta a partir de explantes plántula y laterales de tallo a los 6 meses de iniciados los cultivos.

VI.9 Inducción a partir de explantes raíz.

Se obtuvo la formación de callo en los explantes provenientes de raíz, en los tratamientos **3** (2 mg/l BA), **5** (1.0/0.1 mg/l BA/ANA), **6** (2.0/0.1 mg/l BA/ANA) y **9** (2.0/0.5 mg/l BA/ANA) (Cuadro 6 y Figura 10). Estos explantes comenzaron a engrosarse entre los 20 y 30 días de iniciados los cultivos, posteriormente se observaron estructuras nodulares a lo largo del explante, en los tratamientos mencionados, 6 explantes comenzaron a formar callo a partir de los 40 días iniciados los cultivos. Este callo en algunos explantes fue de color crema, y apariencia hidratada, en otros fue verde claro, con zonas blanquecinas, de apariencia friable e hidratado (Figura 12). Dicha apariencia y color fue similar a la del callo obtenido de explantes de plántula y laterales de tallo. Olgúin (1994), reporto para *Ariocarpus retusus* la formación de callo de apariencia friable, en explantes de raíz con corona, para los tratamientos con 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l de BA, por otra parte Bhau (1999), para *Coryphantha elephantidens* utilizó raíces de entre 5 y 20 mm de longitud, como explante y logró la formación de callo en presencia de 2,4-D y K.

De los explantes que formaron callo (6), solamente 2 explantes formaron brotes vía organogénesis indirecta. Se obtuvieron en total 7 brotes, 2 provenientes del tratamiento **3** y 5 en el tratamiento **9**, estos tratamientos fueron los que contenían mayor cantidad de citocinina (2.0/0.0 y 2.0/0.5 mg/l BA/ANA respectivamente) (Figura 10).

Aunado al tipo de explante y su tamaño, la adición al medio de RCV es otro factor fundamental en el control de la morfogénesis, se sabe que bajos niveles de auxinas o ausencia de éstas, en combinación con altos niveles de citocininas, son necesarios para la formación de brotes (Rubluo, 1990). Para *M. theresae*, Ronquillo, (2009) reportó la formación de brotes por organogénesis directa en presencia de 2.0/0.1 mg/l de BA/ANA, y la formación de brotes de manera espontánea en raíces de podarios con 2 años de cultivo. Sin embargo según

Olguín (1994), para *Ariocarpus retusus* se logró la formación de brotes a partir de raíz en los tratamientos 0.1/0.1 mg/l de BA/ANA y 0.1 mg/l de ANA; para *Coryphantha elephantidens*, Bhau (1999), logró la formación de 1.6 brotes por explante de raíz, regenerados a partir de callo, en medio MS suplementado con 9.0 µM de 2,4-D.

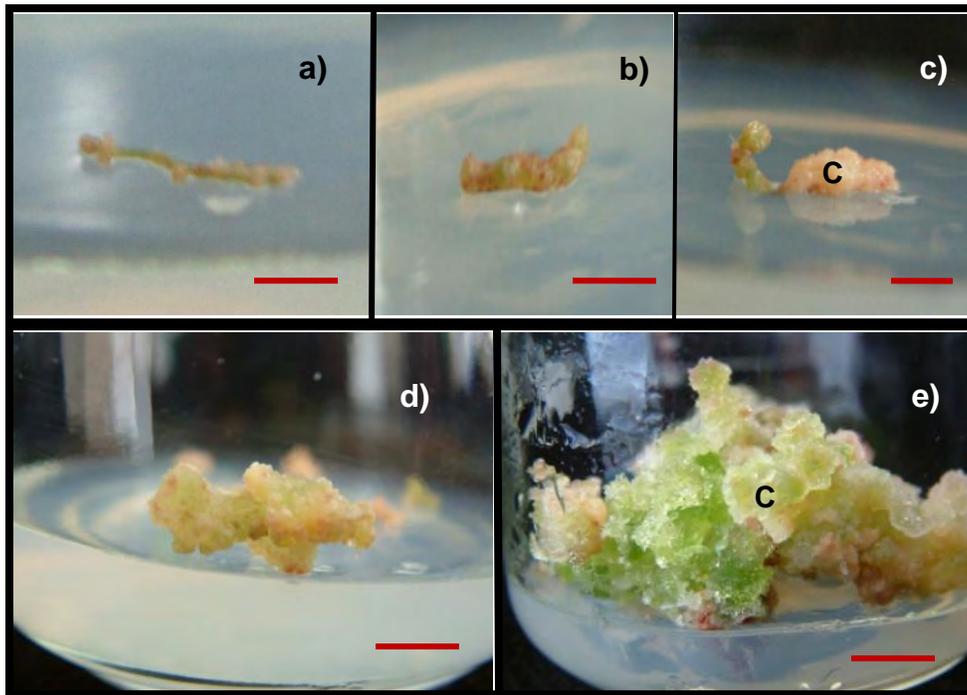


Figura 12. Regeneración de brotes a partir de raíz por organogénesis indirecta: a) explante de raíz; b) engrosamiento de la raíz a los 20 días de iniciados los cultivos en el T5; c) formación de callo en el extremo apical de raíz en el T3, a los 40 días de iniciados los cultivos; d) callo en todo el explante en el T3; e) abundante callo en el T9 a los 3 meses de iniciados los cultivos, (C=callo) barra 1 cm.

VI.10 Individualización y enraizamiento de brotes.

Para *M. bombycina*, los brotes regenerados vía directa e indirecta, fueron individualizados, en algunos casos y en otros los grupos de brotes que tenían al menos una raíz fueron subcultivados a medio MS, sin reguladores de crecimiento. Entre 2 y 3 meses después del subcultivo, hubo la formación de callo en la base de la mayoría de los brotes y en otros la formación de raíces fue de manera espontánea, (Rubluo, 1997) reportaron para 8 especies del género *Mammillaria* que 6 enraizaron de manera espontánea, sin la presencia de

auxinas; Rubluo *et al.* (1993), para *M. san-angelensis* obtuvieron el enraizamiento de los brotes en medio MS.

Aunque las raíces se generaron en medio MS sin reguladores de crecimiento, se ensayó la adición de carbón activado (1g/l) al medio, sin embargo no se observaron diferencias morfológicas entre estos y el medio sin carbón activado. Aunque en otras investigaciones se menciona que la adición de carbón activado, favorece la formación de raíces debido a que el oscurecimiento del medio reduce la luz en la base del brote y provee un ambiente que estimula la acumulación de auxinas fotosensibles para el enraizamiento (Pan y Van Staden, 1998).

VI.11 Aclimatización.

Bajo condiciones asépticas, se separaron un total de 260 plantas con un tamaño mayor a 1.5 cm, con raíces y de morfología similar a la planta madre (Figura 13). Dichos brotes provinieron de los 3 tipos de explantes, se aclimatizaron en una mezcla de tepojal y tierra negra (3:1) en charolas de plástico con tapa, debido a que durante las primeras semanas del trasplante a condiciones *ex vitro* es necesario controlar los factores ambientales, manteniendo una humedad relativa alta, hasta que las plantas se adapten a sus nuevas condiciones.

A seis meses del inicio de la aclimatización, se obtuvo un 75% de sobrevivencia de las plantas en condiciones de invernadero (Figura 14), el resto de la plantas murió, esto pudo haber ocurrido porque las plantas *in vitro* presentan modificaciones en su estructura o metabolismo tales como una humedad relativa alta, tasas reducidas en la fotosíntesis, una cutícula delgada y un bajo o nulo intercambio gaseoso, lo que las hace susceptibles a la deshidratación, a pesar de tener riego constante en el invernadero.

La sobrevivencia de plantas de *M. bombycina* fue mayor al 70%, resultados similares a los que reportó Ronquillo (2009) para *M. theresae* con el 86% de sobrevivencia, a los 6 meses de aclimatizadas las plantas; al igual que Fuentes y Mondragón (2001) que reportaron el 100% de sobrevivencia para *M. conspicua*, ambos trabajos con el mismo tipo de sustrato.

Flores (2007) reportó para *M. coahuilensis*, casi el 53% de sobrevivencia, utilizando un sustrato compuesto por tierra de hoja, tierra negra y tepojal (1:1:1). Estos estudios se suman a los pocos trabajo en los que se reporta la etapa de aclimatización. En algunos se obtuvieron buenos resultados, con más del 50% de sobrevivencia, tal es el caso de Ramírez-Malagón *et al.* (2007), quienes en un estudio de 10 especies del género *Mammillaria*, encontraron una sobrevivencia desde el 84.5% en *M. orcutii* (el más bajo) hasta el 96.5 % en *M. hahniana* (el más alto). Zamora (2007) reportó para *Thelocactus bicolor*, el 81% de 113 plantas, entre otros.

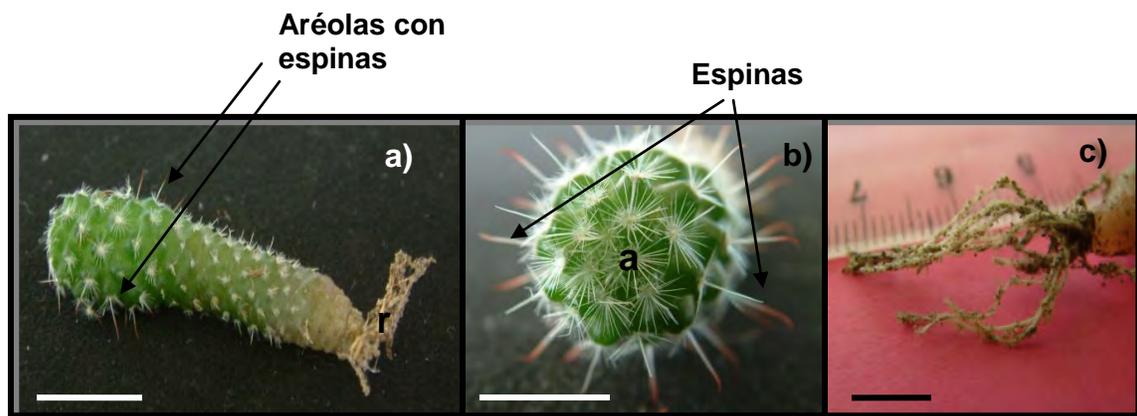


Figura 13. a) planta con raíz a 3 meses de la aclimatización, b) ápice de una planta, c) sistema radicular de una aplanata con 3 meses de aclimatización. (Barra 1 cm).

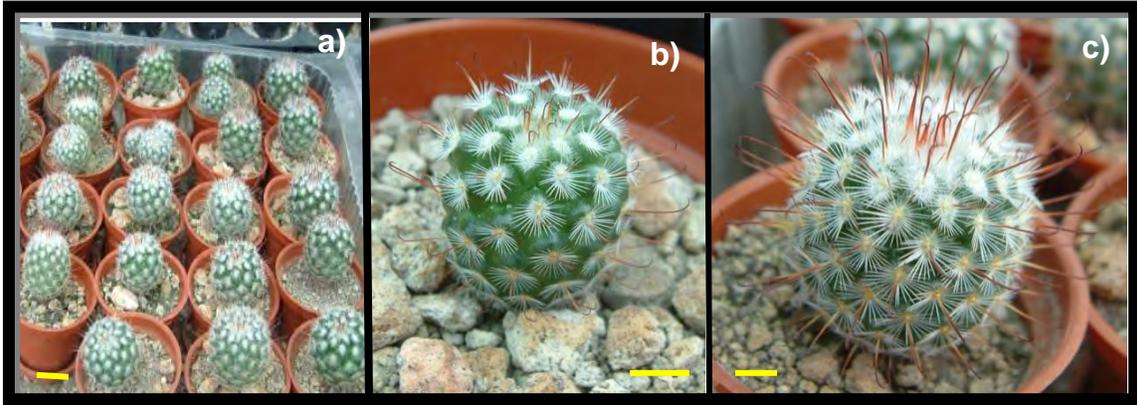


Figura 14. a) Plantas aclimatizadas de *M. bombycina*, en condiciones de invernadero (barra 5 cm); b), y c) plantas aclimatizadas, con podarios bien definidos, espinas radiales y centrales bien diferenciadas a 1 año de iniciada la aclimatización (barra 1 cm).

Este es el primer reporte de cultivo *in vitro* para *M. bombycina*, donde se logró la regeneración a partir de los tres tipos de explantes, cabe resaltar que se obtuvieron regenerantes a partir de raíz, siendo esta investigación la tercera a nivel mundial donde se obtienen estos resultados. Aunado a esto se obtuvieron plantas completas y aclimatizadas en suelo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan una alternativa para la propagación de *M. bombycina*, lo que permitiría satisfacer la demanda comercial y así reducir la presión de colecta en sus poblaciones silvestres.

VII. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones de desinfección para las semillas de *M. bombycina*, obteniendo un 97% del material biológico libre de contaminación.
- Bajo condiciones *in vitro*, se logró un 80% de germinación a los 75 días, en comparación con las condiciones *ex vitro* (mezcla de tepojal-tierra 3:1), donde se obtuvo el 38% para la germinación de *M. bombycina*.
- Se lograron establecer las condiciones para la regeneración *in vitro* de *Mammillaria bombycina*, a partir de explantes de plántulas, laterales de tallo y raíz.
- Los tres tipos de explantes: plántula, laterales de tallo y raíz, fueron regenerativos bajo las condiciones ensayadas.
- Las respuestas morfogénicas de los explantes de plántulas y laterales de tallo fueron, formación de brotes vía organogénesis directa (60) e indirecta (941); así como formación de callo.
- El tratamiento 9 (2.0/0.5 mg/l de BA/ANA), regeneró la mayor cantidad de brotes a partir de plántulas, por organogénesis directa, con 8 brotes totales después de 6 meses de iniciados los cultivos.
- La mayor cantidad de brotes a partir de plántulas por vía indirecta se presentó en el tratamiento 5 (1.0/0.1 mg/l de BA/ANA) con 410 brotes totales después de 6 meses.

- En los explantes laterales de tallo, el mejor tratamiento vía organogénesis directa fue el tratamiento sin reguladores de crecimiento, con 19 brotes, a los 6 meses de iniciados los cultivos.
- El mejor tratamiento vía indirecta para explantes de laterales de tallo fue el 6 (2.0/0.1 mg/l de BA/ANA) con 69 brotes a los 6 meses de iniciados los cultivos.
- A partir de explantes de raíz, se formaron brotes vía indirecta, 7 brotes a partir de los explantes de raíz, siendo la mayor proliferación en el tratamiento 9 (2.0/0.5 mg/l de BA/ANA) con 5 brotes, a los 6 meses de iniciados los cultivos.
- El mejor explante fue el de plántula, ya que estadísticamente se obtuvo una diferencia significativa, regenerando 2.9 brotes por tratamiento.
- El mejor tratamiento estadísticamente fue el 5 (1.0/0.1 mg/l de BA/ANA), en comparación de los demás tratamientos, no existiendo diferencias significativas entre ellos.
- El sustrato tepojal-tierra (3:1) para la aclimatización permitió obtener un porcentaje de sobrevivencia del 75% después de 6 meses.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Anicua, F. J. y B. R. V. Rivas. 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de cactáceas endémicas y amenazadas o en peligro de extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM. México. 68 p.

Arias-Montes, S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. Rev. Soc. Méx. Hist. Nat. XLIV: 109-115.

Arias-Montes S. 1997. Distribución General. Pp. 17-25. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (eds.). Suculentas Mexicanas. Cactáceas. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México.

Arias-Montes, S., U. Guzmán, M.C. Mandujano, M. Soto Galván y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. Cactaceas Suculentas Mexicanas. 50(4): 100-125.

Arreola, H. 1997. Legislación y conservación. Pp. 101-111. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (eds.). Suculentas Mexicanas. Cactáceas. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México.

Ault, R. J. y J. W. Blackmon. 1987. *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes*. Scientia Horticulturae. 22: 26-27.

Barthlott, W., S. Porembski, M. Kluge, J. Hopke y L. Schimidt. 1997. *Selenicereus wittii* (Cactaceae): an epiphyte adapted to Amazonian Igapó inundation forest. Pl. Syst. Evol. 206: 175-185.

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

Becerra, R. 2000. Las cactáceas. Biodiversitas. 32(6): 1-5.

Benítez, H. y P. Dávila. 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de CITES. Biodiversitas. México. 40: 8-11.

Benítez-Rodríguez, J. L., A. Orozco-Segovia y M. Rojas-Aréchiga. 2004. Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacan-Cuicatlán Valley, Central Mexico. The Southwestern Naturalist. 49(1): 11-17.

Benson, E. 1999. Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis Padslow. UK.

Bewley, J. 1994. Seed germination and dormancy. The Plant Cell 9: 1055-1066.

- Bidwell, R. G. 1993. Fisiología Vegetal. AGT ED. México. 784 pp.
- Bonga, J. y P. von Anderkas. 1992. In vitro cultura of tres. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 236 pp.
- Bonnes, M. S., P. W. Pare y T. J. Mabry. 1993. Novel callus and suspensión cultures of the "old man" (*Cephalocereus senilis*). Cactus & Succulent Journal. 65 (3):144-147.
- Bravo, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. UNAM, México, D.F.
- Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las Cactáceas de México, Vol. II. UNAM. México, D. F. 404 pp.
- Bravo-Hollis, H. y L. Scheinvar. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. CONACYT-FCE. México, D.F. 233 p.
- Calderón, G. E. 2007. Morfogénesis *in vitro* de *Aztekium hintonii* Glass y F. Maurice, *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada, y *Mammillaria sanchez.mejoradae* González, Cactáceas Endémicas y en Peligro de extinción. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Biología. UNAM. México.
- Casas, A. 2002. Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. Biodiversitas. 40: 18-22.
- Chávez, V. M. 1993. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 148 p.
- CITES. 1990. Convention on International trade of Endangered Species. Apendices I, II and III to the convention. US Fish and Wildlife Service, Washington, D. C.
- CONABIO. 1997. Suculentas Mexicanas. Cactáceas. Publicaciones S. A. de C. V. México, D. F. p. 10.
- CONABIO. 1998. La Diversidad Biológica de México de México: Estudio de País. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Corona, N. E. V. y L. Yáñez. 1984. Propagación de *Cephalocereus senilis* mediante cultivo de tejidos. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. XXXIX: 3-7.
- Dabekaussen, M. A. A., R. L. M. Pierik, J. D. Van der Laken y J. Hoek Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rauh. Scientia Horticulture. 46: 283-294.

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

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

Díaz, R. B. 2007. Propagación *in vitro* de *Thelocactus rinconensis* (Poselger) Britton & Rose (Cactaceae) especie endémica amenazada. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 63 p.

Dirzo, R. 1990. La biodiversidad como crisis ecológica actual, ¿qué sabemos? Ciencias. 4. UNAM. México.

Dodds, J. H. 1991. Conservation of plant genetic resources, the need for tissue culture. Pp.10. In: J. H. Dodds (ed.). *In vitro* Methods of Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman and Hall. London. 239 p.

Dodds, J. H. y L. W. Roberts. 1982. Experiments in plant tissue culture. New York (USA): Cambridge University Press. 50 p.

Diario Oficial de la Federación. 2002. SEMARNAT. NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. DOF. México. 85 p.

Donnelly, D. J. y W. E. Vivader. 1988. Glossary of Plant Tissue Culture. Vol. 3. Discorides Press. USA. 141 p.

Evans, D. E. 2003. Plant Cell Culture. BIOS Scientific Publishers. USA. 194 p.

Fay, M. F. 1993. In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation*. 3: 176-183.

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

Flores, J. 2004. Regeneración *in vitro* de *Pelecyphora strobiliformis* (Wendemann) Fric et Schelle (Cactaceae). Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 58 p.

Flores, R. D. 2007. Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* (Boed.) Moran (Cactaceae), especie endémica amenazada del estado de Coahuila. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 61 p.

Flores, O. y P. Geréz. 1995. Conservación. En: CONABIO, 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Flores-León, R. y M. Ortiz-Montiel. 2000. *In vitro* culture of *Cephalocereus senilis* Pfeiffer through areole activation of etiolated plant. *Haseltonia*. Year book of the cactus and succulents of America. 7: 92-96.

Franco, I. 1997. Legislación y conservación. Pp. 101-111. En: Suculentas Mexicanas, Cactáceas. CVS Publicaciones-CONABIO-UNAM-SEMARNAP. México.

Fuentes, M. V. y N. M. Mondragón. 2001. Micropropagación de *Mammillaria conspicua* a través de areolas activadas *in vivo* por etiolación. Tesis Licenciatura (Biología). Escuela nacional de Estudios Profesionales. Iztacala. UNAM. México. 35 p.

Garrido, M. 1998. Evaluación del metabolismo ácido crasuláceo en tres especies de cactáceas cultivadas *in vitro* y durante su aclimatación a suelo. Tesis Licenciatura (Biología). Escuela Nacional de Estudios Profesionales. Iztacala. UNAM. México. 124 p.

Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid y T. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant regulators in plant tissue culture. *In vitro* Cellular Developmental Biology Plant 32: 272-289.

George, E. F. y P. D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. UK. 690 p.

Gibson, M. y, P. S. Nobel. 1986. The cactus primer. Harvard University Press Cambridge. p. 1-16.

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

Gómez, R. 1998. Cultivo de células y tejidos. Pp. 25-44 p. En: Pérez J. N. (ed.). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Vol. I. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390 p.

Gómez, J. R. 2008. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus* Hernández y Anderson (Cactaceae), especie endémica mexicana en peligro de extinción. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 67 p.

González, C. O. 2008. Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R. A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis Maestría (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 160 p.

Grajales-Muñiz, O. 2004. Fisiología Vegetal. 1ª Edición. UNAM - Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. México. 84 p.

Guzmán V., S. Arias-Montes y P. Dávila. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM. CONABIO. México. 315 p.

Haberer, G. y J. Kieber. Cytokinins. 2002. New insights into a classic Phytohormone. *Plant Physiology*. 128: 354-362.

Hammouda, M. A. y Z. Y. Bark. 1969. Some aspects of the germination of desert seeds. *Phyton*. 13: 183-201.

Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies y R. L. Geneve. 1997. *Plant propagation: Principles and Practices*. Prentice Hall. USA. 770 p.

Hernández, J. 1998. Cactáceas del Municipio de Victoria, Tamaulipas. *Cactaceas y Suculentas Mexicanas*. 48: 17-23.

Hernández, H. M. y H. Godínez-Álvarez. 1994. Contribución al Conocimiento de las cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52.

Hernández, H. y C. Gómez-Hinostrosa. 2004. Checklist of Chihuahuan desert Cactaceae.

Hernández H. y C. Gómez-Hinostrosa. 2005. Cactus Diversity and Endemism in the Chihuahuan Desert Region. En: Cartron, J., G. Ceballos and R. Stephen (ed.). *Biodiversity, Ecosystem and Conservation in Northern Mexico*. Oxford University Press. USA.

Hu, C. V. y J. P. Wang. 1983. Meristem Shoot tip and bud cultures. En: Evans, D. A., P. V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*. McMillan Publishing, New York. Pp. 177-227.

Hunt, D. 1992. CITES Cactaceae checklist. Royal Botanical Gardens Kew. UK. 190 p.

IUCN (International Union Conservation of Nature). 1994. Rare, threatened and insufficiently known endemic cacti of Mexico. Botanic Gardens Conservation-Coordinating Body. Threatened Plants Unit. Threatened Plants Committee. July 839 p.

Jayasankar, S. 2000. Variation in tissue culture. Pp. 387-395. En: Trigiano, R. y D. Gray (ed.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. NY.

Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. Pp. 13-24. En: Pérez, J. N. (ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Vol. I. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 390 p.

Johnson, J. H. y E. R. Emino. 1979. *In vitro* Propagation of *Mammillaria elongata*. *Horticultural Science*, 14(5): 605-606.

Johnson, J. H. y E. R. Emino. 1979a. Tissue Culture Propagation in the Cactaceae and *Succulent Journal*, USA. 51: 275-277.

Kadlecek, P., I. Tichá, D. Haisel, V. Capkova y C. Schäfer. 2001. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* aclimatización and growth. *Plant Science*. 161:695-701.

Kevers, C., F. Thierry, R. Strasser, J. Dommès y T. Gaspar. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 77: 181-191.

Kobayashi, A. 1993. Cacti and succulents in Japan. *Cactaceae and Succulent Journal*. (US). 65(3): 126-127.

Kölar, Z. J. Bartek y V. Vyskot. 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig. Through tissue culture. *Experimental*. 32: 668-669.

León de la Luz J. L. y A. Valiente-Banuet. 1994. Las cactáceas: un recurso natural diverso y predominante mexicano. *Ciencia y Desarrollo*. 20(117): 58-65.

Llamoca-Zárate, R. C. Studart-Guimaraes, J. Landsmann y F. Campos. 1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 155-157.

Lynch, P. 1999. Tissue culture techniques *in vitro* plant conservation. Pp. 41-62. En: Benson E. (ed.). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor and Francis. UK.

Litz, R. E. y R. L. Jarret. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. Pp. 144-157. En: Roca W. M. y L. A. Mogrinsky (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cuba. 970 p.

Magaña, P. y J. L. Villaseñor. 2002. La flora de México ¿se podrá conocer completamente? *Ciencias* 66: 24-26.

Maiti, R. K., J. L. Hernández-Piñero y M. Valdéz-Marroquín. 1994. Seed ultrastructure and germination of some species of Cactaceae. *Phyton*. 55: 97-105.

Malda, G., R. Backhaus y C. Martín. 1999a. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 58: 1-9.

Malda, G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999b. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*. 81: 71-87.

Mandujano, M., J. Golubov y J. Reyes. 2002. Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. *Biodiversitas*. 6(40): 2-7.

Martínez, B. A. 2007. Análisis de crecimiento temprano de tres cactáceas amenazadas (*Mammillaria pectinifera*, *Obregonia denegrii* y *Coryphantha wedermanni*) bajo condiciones controladas de humedad y radiación lumínica. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 91 p.

Martínez, R. R. 2003. Aplicación de la Biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo*. 9: 17-34.

Martínez-Vázquez, O. y A. Rubluo. 1989. *In-vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *Journal of Horticultural Science* 64(1): 99-105.

Mata-Rosas, M., M. Monroy, K. Moebius y V. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 37: 400-404.

Mauseth, J. D. 1976. Cytokinin-and giberellic acid-induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristems in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 66(4): 446-451.

Mauseth, J. D. 1979. Cytokinin-Elicited formation of the pit-rib meristem and other effects growth regulators on the morphogenesis of *Echinocereus* (Cactaceae) seedling shoot apical meristems. *American Journal of Botany*. 66(4): 446-451.

Mauseth, J. D. 1979a. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactaceae and Succulent Journal*. USA. 51: 186-187.

Mauseth, J. D. y W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 62(8): 869-877.

May, R. 1994. The ecology of *Sclerocactus polyancistrus* (Cactaceae) in California and Nevada. *Desert Plants*. 11(1): 6-22.

Moebius-Goldammer, K. 1999. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.). K. Schum. (Cactaceae), especie amenazada endémica de México. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 76 p.

Moebius-Goldammer, K., M. Mata y V. Chávez. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Cactaceae), an endangered and Mexican species. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 39: 388-393.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture, *Ann. Rev. Plant. Physiology*. 25: 135-166.

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 15: 473-497.

Murdoch, A. J. y R. H. Ellis. 1992. Longevity, viability and dormancy. En: Fenner, M. (ed.), *Seeds. The Ecology of Regeneration in Plants Communities*. CAB International, Wallingford, UK. Pp. 193-229.

NG, S. Y. C. y N. Q. NG. 1991. Reduced growth storage of germoplasm. Pp. 11-40. En: J. H. Dodds. (ed.). *In vitro methods for Conservation of Plant Genetic Resources*. Chapman and Hall. UK. 239 p.

Nobel-S., P. 1988. *Environmental biology of agaves y cacti*. First edition. University of California. USA. Pp. 55-57.

Normanly, J., J. P. Slovin y J. D. Cohen. 2004. Auxin biosynthesis and metabolism. En: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Davies J. (ed.). Kluwer Acad. Ub. Dordrecht. The Netherlands, Pp. 36-62.

Olalde, G. 2001. La familia de las cactáceas. *Gaceta de Coapa*. Julio-agosto: 6.

Oldfield, S. 1985. The Western European Trade in Cacti and other Succulents. *TRAFFIC Bulletin* 7(3/4): 44-56.

Oldfield, S. 1997. In situ conservation. En: Oldfield S. (comp.). *Cactus and succulent plants-Status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Cactus and succulent specialist group. UICN. Gland. Switzerland and Cambridge, UK. 212 p.

Olguín, L. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 85 p.

Pan, M. J. y J. Van Staden. 1998. The use of charcoal *in vitro* culture a review. *Plant Growth Regulation*. 26:155–63

Papafotiou, M., G. N. Balotis, T. L. Panayioti y J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163-167.

Pérez-Molphe-Balch, E. y C. A. Dávila-Figueroa. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg y *P. strobiliformis* Wendermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*. 38: 73-78.

Pérez-Molphe-Balch, E., E. M. Pérez-Reyes, C. A. Dávila-Figueroa y E. Villalobos-Amador. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *Horticultural Science*. 37(4): 693-696.

Pérez-Molphe-Balch, E., M. Pérez-Reyes, C. Dávila-Figueroa, E. Villalobos-Amador, E. Meza, L. Morones y H. Iizal. 1998. *In vitro* culture of 21 species of mexican cacti. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34: 131-135.

Pérez-Ponce, J. N. 1998. Variación somaclonal. Pp. 105-121. En: Pérez Ponce, J. N. (ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba.

Pierik, R. 1993. Micropropagation: Technology and Opportunities. Pp. 9-22. En: Prakash, J. y R. Pierik (ed.). *Plant Biotechnology*. Commercial prospects and problems. International Science Publisher. NY.

Rabenda, I. 1990. Breaking dormancy in cactus seed. Part 1. Cactaceae and Succulent Journal. USA. 62(2): 86-94.

Ramírez-Malagón, R., I. Aguilar-Ramírez, A. Borodaneko, L. Pérez-Moreno, J. L. Barrera-Guerra, H. G. Nuñez-Palenius y N. Ochoa-Añejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 43: 660-665.

Razdan, M. K. 2003. *Introduction to Plant Tissue Culture*. Second edition. Science Publishers, Inc. Enfield. 375 p.

Reyes, J. 1994. Propagación de Cactáceas Mexicanas: una alternativa para la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción: Pp. 108-109. En: Encuentro Internacional sobre el Impacto de la Biotecnología en el Desarrollo Sustentable. PROMESUP, OEA.

Reyes, J. 1997. Cultivo y propagación como plantas de ornato. Pp. 69-77. En: Valles S. C. y I. Rodríguez (eds.). *Suculentas Mexicanas. Cactáceas*. CONABIO. México.

Reyes, S. J. y S. Arias. 1995. Cactáceas de México: Conservación y Producción. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 1(3): 85-92.

Reyes, S. J., I. C. Brachet, C. J. Gutiérrez de la R. A. 2004. Cactáceas y otras plantas nativas de la Cañada. Cicatlán, Oaxaca. Ed. Sociedad Mexicana de Cactología A. C. México. 194 p.

Reyes, J. y T. Terrazas. 1991. Cactáceas raras, amenazadas y en peligro de extinción de las colecciones del Jardín Botánico, IB-UNAM. *Amaranto* 4: 7-10.

Robert, M. y V. M. Loyola. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. Pp. 21-27. En: Robert M. y Loyola V. M., (comp). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Consuelo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 167 p.

Roberts, E. H. 1972. Dormancy: a factor affecting seed survival in the soil. Pp. 351-359. En: Roberts, E. H. (ed.). *Viability of seed*. London: Chapman & Hall. 448 p.

Rodríguez-Garay, B. y A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Broedker). *Cactaceae and Succulent Journal*. USA. 64(3): 116-119.

Rojas-Aréchiga, M., A. Orozco-Segovia y C. Vázquez-Yanes. 1997. Effect on light of germination of seven species of cacti from the Zapotitlan Valley in Puebla, México. *Journal of Arid Environments* 36: 571-578.

Rojas-Aréchiga, M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 48: 85-104.

Rojas-Aréchiga, M., A. Casas y C. Vázquez-Yanes. 2001. Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Central Mexico. *Journal of Arid Environments*. 49: 279-287.

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

Ronquillo, N. 2009. Regeneración *in vitro* y Conservación *ex situ* de *Mammillaria theresae* Cutak. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 126 p.

Rubluo, A. 1990. Aplicaciones biotecnológicas para el rescate de especies en peligro de extinción. BIOMAT. 1 (4).

Rubluo, A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* species (Cactaceae). En: Y. P. S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag. Germany. 40:193-205.

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

Rubluo, A., V. Chávez, A. P. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. Biological Conservation 63: 163-169.

Ruedas, M. M. 1999. Germinación y crecimiento temprano de *Mammillaria magnimamma*. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 79 p.

Rzedowski, J. 1983. Vegetación de México. 1ª Edición. Limusa. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.

Salisbury, F. y C. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamericana. México, D.F. 759 pp.

Santos-Díaz, M. del S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez y M. de L. Santos-Díaz. 2003. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg (Cactaceae). In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant. 39: 480-484.

Sarukhán J. y R. Dirzo. 2001. Biodiversity-Rich Countries. En Levin S. (Ed.) Enciclopedia de biodiversidad. Volumen 1. Academia Press. USA. p. 419-436.

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

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental, Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres, Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio, Lista de Especies en Riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, 6 de marzo de 2002. México, D. F.

SEMARNAT, 2003. Especies con usos no maderables en bosques tropicales y subtropicales en los estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.

<http://www.semarnat.gob.mx/>

Smigocki, A. C. y L. D. Owens. 1999. Regulation of morphogenesis by bacterial auxin and cytokinin biosynthesis transgenes. Pp. 305-326. In: W. Y. Soh and S. S. Bhowjwani (ed.). Morphogenesis in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers.

Smith, R. H., P. J. Burdick, J. Anthony y A. A. Reilley. 1991. *In vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. Horticultural Science 26: 315.

Soberón, M. J. y J. Llorente. 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). Rev. Soc. Hist. Nat. Vol. Esp. 44: 3-17.

Sotomayor, M. y A. Arredondo. 2004. *Turbinicarpus*; spines and seedling development. Cactus & Co. 8: 102-114.

Starling, R. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. Cactus & Succulent Journal. USA. 37: 114-115.

Steinhart, C. R. 1962. Tissue culture of a cactus. Science 137(3529): 545-546.

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

Taíz, L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland.

Tapia, D. M. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis Licenciatura (Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 73 p.

Tejero-Díez, J. D., M. P. Granillo-Velázquez, S. Aguilar-Rodríguez, G. N. Pozos-Banda, R. Rico-Montiel y L. Abundiz-Bonilla. 1998. Plantae. Introducción al estudio de las plantas con embrión. Pp. 133-134. 2ª Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores – Iztacala. México.

Thorpe, T. A. y K. R. Patel. 1984. Clonal Propagation: Adventitious buds. En: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vasil, I. K. (ed.). Academic Press. NY. p. 49-60.

Toledo, V. M., 1988. La diversidad biológica de México. Ciencia y Desarrollo. 81: 17-30.

Tran, V. N. y A. K. Cavanagh. 1984. Structural aspects of dormancy. In: Murray, D. E. (ed.). Seed Physiology. Vol. 2. p. 1-44. Australia: Academic Press. 295 p.

Villaseñor, J. L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. Bol. Soc. Bot. Méx. 75: 105-135.

Vyskot, B. y Z. Jára. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. Journal of Horticultural Science 59(3): 449-452.

Walter, L. 1995. Physiological Plant Ecology. Springer. Austria. 506 p.

Wochok, Z. 1981. The Role of Tissue Culture in Preserving Threatened and Endangered Plant Species. Biological Conservation. 20: 83-89.

Zamora, M. H. 2007. Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 45 p.

IX. APÉNDICES

Apéndice 1) Medio de Cultivo Murashige y Skoog (1962).

COMPONENTES	MS 100% (g/l)	MS 50% (g/l)
MACRONUTRIENTES		
(NH ₄)NO ₃	1.65	0.825
KNO ₃	1.9	0.950
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.37	0.185
KH ₂ PO ₄	0.17	0.085
CALCIO		
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.44	0.220
MICRONUTRIENTES		
MnSO ₄ *H ₂ O	0.01689	0.00844
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.0086	0.0043
H ₃ BO ₃	0.0062	0.0031
KI	0.00083	0.000415
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.00025	0.000125
CuSO ₄ **5H ₂ O	0.000025	0.0000125
CoCl ₂ *6H ₂ O	0.000025	0.0000125
FIERRO		
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.0278	0.0139
Na ₂ EDTA	0.0373	0.0186
VITAMINAS		
Tiamina*HCl	0.0001	0.00005
Ácido Nicotínico	0.0005	0.00025
Piridoxina*HCl	0.0005	0.00025
INOSITOL		
	0.10	0.05
GLICINA		
	0.002	0.001
CARBOHIDRATOS		
Sacarosa	30.0	30.0
AGAR		
Agar Bioxón	9.0	9.0

Apéndice 2) Soluciones de reguladores de crecimiento.

Auxina: Se pesaron 10 mg de **ANA**, y se disolvieron en NaOH 1N, dicha solución se aforó a 10 ml con agua destilada.

Citocinina: Se pesaron 10 mg de **BA**, y se disolvieron en NaOH 1N, dicha solución se aforó a 10 ml con agua destilada.