



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

*Regeneración in vitro de *Backebergia militaris**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA ALEJANDRA FERNÁNDEZ TÉLLEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Fernández  
Téllez  
María Alejandra  
26 08 44 41  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303143228

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Víctor Manuel  
Chávez  
Avila

### 3. Datos del Sinodal 1

Dra.  
Estela  
Sandoval  
Zapotitla

### 4. Datos del Sinodal 2

Dr.  
Isaac  
Reyes  
Vera

### 5. Datos del Sinodal 3

M. en C.  
Octavio  
González  
Caballero

### 6. Datos del Sinodal 4

Biól.  
José Ángel  
Jiménez  
Rodríguez

### 7. Título del trabajo escrito

“Regeneración *in vitro* de *Backebergia militaris*”  
103 p  
2014

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la U.N.A.M., bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Avila y con el apoyo económico de PAPIIT con el proyecto IT 200412, titulado “Regeneración *in vitro* y conservación de cactáceas mexicanas en peligro de extinción”

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios:***

*Por estar siempre conmigo, dándome fuerza para seguir adelante, por hacer las cosas a su tiempo y como deben de pasar.*

### ***A mis papás:***

*Jorge Fernández y Crisófora Téllez, por brindarme todo su apoyo siempre, por su amor incondicional y su infinita paciencia, ustedes son un ejemplo a seguir, muchas gracias, los amo y admiro mucho. Gracias por su cariño, por enseñarnos a no rendirnos, por mantener siempre unida a la familia y por los invaluables momentos que hemos compartido juntos.*

### ***A mis hermanos:***

*Karina, Alfredo y Alberto, quienes siempre han confiado en mí y siempre me han apoyado, son una parte importante en mi vida, los quiero y admiro a cada uno de ustedes.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme los conocimientos y las experiencias necesarias para llegar a ser una mejor persona, para crecer tanto académica como personalmente.

A los integrantes del jurado por tomarse el tiempo de revisar este trabajo, por los comentarios, observaciones y sugerencias que ayudaron a mejorarlo:

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Dra. Estela Sandoval Zapotitla

Dr. Isaac Reyes Vera

M. en C. Octavio González Caballero

Biól. José Ángel Jiménez Rodríguez

A la Facultad de Ciencias por brindarme dentro de sus instalaciones los conocimientos, las prácticas y las experiencias para llegar a ser una profesionista.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del IB-UNAM, donde me aceptaron para emprender un gran reto que por fin llega a su término.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila quien siempre me ha llenado de consejos, apoyo y retos, le agradezco su infinita paciencia, su amistad y su tiempo, gracias por el ánimo y por hacer que creyera en mi misma.

Al M. en C. Octavio González, por su apoyo incondicional, sus consejos y su amistad, lo admiro mucho porque además de ser un gran maestro eres una excelente persona.

Al Biól. Ángel Jiménez por los comentarios acerca de mi trabajo, por el apoyo, los consejos y el ánimo para por fin terminar.

A la Dra. Estela Sandoval por sus comentarios tan positivos acerca de este trabajo y por su apoyo en el análisis histológico.

Al Dr. Isaac Reyes por su disposición y aportaciones a este escrito.

A la Biól. Concepción Guzmán por su apoyo en el procesamiento y análisis histológico.

Al Dr. Santiago Arizaga Pérez y al Dr. Salvador Arias Montes por el material vegetal donado.

A Claudia, gracias por tantos años de amistad (y los que faltan), por tu apoyo incondicional, consejos y compañía eres una parte muy importante en mi vida, te quiero mucho. Has estado conmigo en todo momento y por eso siempre voy a estar agradecida.

A Mariana, gracias por tu amistad, compañía y apoyo dentro y fuera del laboratorio, te admiro mucho.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Paulina, Oscar, Fernando, Héctor, Mary, Pablo, Alfonso, Silvia, Ester, Fátima, Dani, Marlene, Wendy, Octavio, Isabel, Daniel, Ale Villafuerte, Marisela, Ale Pérez, Alejandro Villada, Bertha, Aduino, Sergio, Germán, Gerardo, Laura Miranda y Laura Velázquez. Cada uno de ustedes de diferente manera, dejó una huella en mí, les agradezco su amistad, consejos, compañía y apoyo. Gracias a ustedes soy una mejor persona, con más confianza y aunque me falta camino por recorrer, sin su apoyo no lo hubiera logrado.

A Barbarita, gracias por tu apoyo y cariño, te aprecio mucho, eres una excelente persona, me brindaste además de conocimientos, una gran amistad.

A mis compañeros y amigos de la facultad de Ciencias, Ivonne, Leonardo, Raquel, Mavi, gracias por brindarme su amistad y compañía, los aprecio mucho. Con ustedes la espera entre clases en la Facultad no era tan larga, además de pasar muy buenos momentos juntos.

A mis sobrinos Nicole, Amy, Emily, Yael, Jimena y Alexei, quienes me han llenado de alegría y diversión. Espero ser un ejemplo de perseverancia, para que la meta que se propongan la logren sin importar las adversidades que ustedes mismos o que el destino les imponga, luchen por lo que quieran.

A mi cuñada Alma, por ser parte de esta gran familia, por tu apoyo y consejos.

A mis primos Omar, Ale, Esmeralda, Jonathan, Marina, Marisol, Manolo y mi sobrina Karen con ustedes pasé y espero seguir pasando momentos tan agradables, los quiero mucho a todos y les agradezco su compañía y apoyo, son una parte importante en mi vida. Hay que continuar reuniéndonos.

A toda la familia Téllez, tíos, padrinos, primos, sobrinos, a ti abue por desearme siempre lo mejor y preocuparte por mí. Los quiero a todos, espero seguir reuniéndonos para poder compartir buenos momentos en familia.

A toda la familia Fernández, aunque no nos veamos muy seguido sé que de alguna manera me apoyan.

## ÍNDICE

Contenido	Página
<b>FIGURAS</b> .....	1
<b>TABLAS</b> .....	2
<b>GRÁFICAS</b> .....	3
<b>ABREVIATURAS</b> .....	4
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>1.1 ANTECEDENTES</b> .....	9
Biodiversidad.....	9
Pérdida de la biodiversidad.....	11
Conservación de la biodiversidad.....	12
Generalidades de la familia Cactaceae.....	12
Cactáceas columnares.....	17
<i>Backebergia militaris</i> .....	18
Ubicación taxonómica.....	18
Distribución geográfica.....	19
Descripción botánica.....	20
Importancia ecológica.....	23
Reproducción.....	23
Estatus de conservación.....	24
Usos.....	25
Estrategias de conservación.....	25
Conservación <i>in situ</i> .....	25
Conservación <i>ex situ</i> .....	26
Cultivo de tejidos vegetales.....	27

Hormonas vegetales y Reguladores de crecimiento.....	30
Auxinas.....	30
Citocininas.....	32
Giberelinas.....	33
Problemas que se presentan durante el establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> .....	35
Oxidación.....	35
Contaminación.....	38
Etapas de la micropropagación.....	38
Cultivo de tejidos en Cactáceas.....	41
<b>1.2 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>1.3 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
Material biológico.....	46
Siembra de semillas en sustrato.....	47
Desinfección de semillas.....	47
Condiciones de incubación.....	48
Evaluación del material biológico.....	49
Desinfección de plántulas.....	49
Condiciones de incubación.....	51
Evaluación del material vegetal.....	52
Formación de brotes por activación de areolas en medio líquido.....	53
Formación de nuevos brotes en medio líquido.....	54

Proliferación de brotes en medio sólido.....	54
Individualización, enraizamiento de brotes y aclimatización de plántulas regeneradas <i>in vitro</i> de <i>B. militaris</i> .....	54
Análisis anatómico.....	55
Procesamiento histológico.....	56
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
Desinfección de semillas.....	58
Germinación <i>in vitro</i> .....	60
Desinfección de plántulas.....	63
Contaminación.....	63
Oxidación.....	66
Respuesta morfogénica en medio sólido.....	68
Formación de brotes por activación de areolas en medio líquido.....	70
Formación de nuevos brotes en medio líquido.....	72
Proliferación de brotes en medio sólido.....	73
Formación de brotes anormales.....	75
Individualización, enraizamiento de brotes y aclimatización de plántulas regeneradas <i>in vitro</i> de <i>B. militaris</i> .....	77
Análisis anatómico.....	79
Plántula proveniente de invernadero.....	80
Brotes regenerados <i>in vitro</i> .....	83
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>86</b>
Diagrama general para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Backebergia militaris</i> .....	87
<b>5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>88</b>
<b>6. ANEXOS.....</b>	<b>101</b>

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Países de megadiversidad.....	9
<b>Figura 2</b>	Distribución geográfica de <i>Backebergia militaris</i> en México.....	19
<b>Figura 3</b>	Plantas, cefalio, flor, fruto y semillas de <i>Backebergia militaris</i> .....	22
<b>Figura 4</b>	Esqueleto <i>ent</i> -giberelano.....	34
<b>Figura 5</b>	Semillas y plántulas utilizadas para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Backebergia militaris</i> .....	46
<b>Figura 6</b>	Explantos obtenidos de plántulas de <i>B. militaris</i> .....	51
<b>Figura 7</b>	Grado de oxidación para la evaluación de los diferentes explantes de <i>B. militaris</i> .....	53
<b>Figura 8</b>	Plántula de <i>B. militaris</i> utilizada para el análisis anatómico.....	56
<b>Figura 9</b>	Germinación <i>in vitro</i> de embriones aislados de semillas de <i>B. militaris</i> , sembrados en medio sólido MS 50% adicionado con giberelinas A <sub>4</sub> + A <sub>7</sub> 3.0 mg/L.....	60
<b>Figura 10</b>	Embriones de <i>B. militaris</i> establecidos asépticamente sembrados en medio líquido con TDZ 3.0 mg/L.....	63
<b>Figura 11</b>	Explantos de <i>B. militaris</i> contaminados.....	64
<b>Figura 12</b>	Explantos de tallo no oxidados secretando una sustancia al medio.....	68
<b>Figura 13</b>	Organogénesis directa en explantes establecidos asépticamente.....	69
<b>Figura 14</b>	Brotos obtenidos a partir de areolas de explantes laterales de tallo.....	70
<b>Figura 15</b>	Enraizamiento de los brotes separados del explante original tras 10 días en inducción.....	72
<b>Figura 16</b>	Formación de brotes en medio líquido (KIN 3.0 mg/L).....	73
<b>Figura 17</b>	Formación de brotes <i>in vitro</i> de <i>B. militaris</i> a partir de areolas (KIN 3.0 mg/L) en medio sólido.....	74
<b>Figura 18</b>	Formación de distintos tipos de brotes en explantes de <i>B. militaris</i> .....	76
<b>Figura 19</b>	Formación de brotes anormales en un explante basal de brote.....	77
<b>Figura 20</b>	Aclimatización de un brote de <i>Backebergia militaris</i> .....	79
<b>Figura 21</b>	Sección longitudinal de la parte apical de tallo de <i>Backebergia militaris</i> .....	81
<b>Figura 22</b>	Secciones basales de tallo de <i>Backebergia militaris</i> , cortes longitudinales (L) y transversales (T).....	82
<b>Figura 23</b>	Brotos de <i>B. militaris</i> regenerados <i>in vitro</i> (Medio MS 50% sólido con KIN 3.0 mg/L) utilizados para el ensayo de anatomía.....	84
<b>Figura 24</b>	Secciones longitudinales de los brotes regenerados.....	84
<b>Figura 25</b>	Diagrama general para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Backebergia militaris</i> .....	87

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Las quince familias con mayor número de especies nativas en la flora de México.....	11
<b>Tabla 2</b> Algunos ejemplos de especies propagadas por la técnica de cultivo de tejidos vegetales.....	28
<b>Tabla 3</b> Ejemplos de auxinas naturales y sintéticas.....	31
<b>Tabla 4</b> Ejemplos de citocininas naturales y sintéticas.....	33
<b>Tabla 5</b> Resumen de las principales estrategias utilizadas en el cultivo <i>in vitro</i> para evitar o disminuir los problemas oxidativos que ocurren en los explantes vegetales.....	36
<b>Tabla 6</b> Cultivos <i>in vitro</i> de especies columnares de la familia Cactaceae.....	42
<b>Tabla 7</b> Diferentes métodos ensayados para la desinfección de semillas de <i>Backebergia militaris</i> .....	48
<b>Tabla 8</b> Diferentes métodos empleados para la desinfección de plántulas de <i>Backebergia militaris</i> .....	50
<b>Tabla 9</b> Combinaciones iniciales de los reguladores de crecimiento para siembra de explantes en medio sólido.....	51
<b>Tabla 10</b> Número de explantes sembrados en cada tratamiento de desinfección.....	52
<b>Tabla 11</b> Combinaciones de RCV empleados para explantes de ápice y laterales, sembrados en medio líquido con puentes de papel.....	53
<b>Tabla 12</b> Número de brotes obtenidos con las tres citocininas utilizadas.....	73

<b>Gráfica</b>		<b>Página</b>
<b>Gráfica 1</b>	Porcentaje de explantes de <i>Backebergia militaris</i> establecidos asépticamente empleando distintos tratamientos de desinfección.....	59
<b>Gráfica 2</b>	Porcentaje de contaminación de explantes de tallo de <i>B. militaris</i> . Resultados al término de 1 mes de iniciados los cultivos.....	64
<b>Gráfica 3</b>	Porcentaje de oxidación de los explantes de tallo de <i>B. militaris</i> utilizando diferentes métodos de desinfección. Resultados al término de 1 mes de iniciados los cultivos.....	67
<b>Gráfica 4</b>	Explantes de tallo de <i>B. militaris</i> que presentaron respuesta morfogénica. Resultados al primer mes de iniciados los cultivos.....	69

## ABREVIATURAS

<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>AIA</b>	Ácido indol-3-acético
<b>AIB</b>	Ácido indol-3-butírico
<b>ANA</b>	Ácido $\alpha$ -naftalenacético
<b>BAP</b>	6-Bencilaminopurina o Benciladenina
<b>KIN</b>	Kinetina
<b>mT</b>	Metatopolina 6-(3-Hydroxibencilamino) purina
<b>RCV</b>	Reguladores de crecimiento vegetal
<b>TDZ</b>	Tidiazurón 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea
<b>C.A.</b>	Carbón activado
<b>Br</b>	Brote
<b>h</b>	Horas
<b>MS</b>	Medio nutritivo Murashige y Skoog (1962)
<b>MS 50%</b>	Medio nutritivo Murashige y Skoog (1962) reducido al 50% de sus sales inorgánicas
<b>UICN</b>	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
<b>CITES</b>	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
<b>CONABIO</b>	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
<b>PROFEPA</b>	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente

**NOM-059-SEMARNAT-2010:** Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 con el título: "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".

## RESUMEN

*Backebergia militaris* (Audot) Bravo ex Sánchez-Mejorada es una cactácea columnar cuya principal característica es la presencia de un cefalio en la punta de las ramas maduras. Se considera como amenazada (CITES Apéndice I) y bajo Protección Especial de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010, por su limitada distribución (Michoacán, Jalisco y Guerrero), destrucción del hábitat, escasa producción de semillas, largo y lento ciclo de vida. La propagación por Cultivo de Tejidos ha resultado efectiva para múltiples especies amenazadas incluyendo las cactáceas, sin embargo hay escasos estudios con especies columnares. Por lo anterior, la presente investigación se enfoca en el establecimiento *in vitro* de esta especie, así como la exploración de la capacidad regenerativa de diferentes explantes. A partir de semillas maduras fueron sembrados 60 embriones en medio MS 50% con una solución de giberelinas GA<sub>4</sub>+GA<sub>7</sub> (3.0 mg/L), bajo fotoperiodo de 16h. El porcentaje de germinación *in vitro* después de 2 meses fue de 75%. Cuatro tipos de explantes: ápice, parte media de tallo, cotiledón e hipocótilo provenientes de plántulas de 4-6 cm se cultivaron asépticamente en medio MS 50% sólido y medio líquido con puentes de papel en diferentes concentraciones de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) [0.0, 0.1, 0.5 y 1.0] mg/L y Benciladenina (BA) o Kinetina (KIN) [0.0, 1.0, 2.0 y 3.0] mg/L; en oscuridad a 26 $\pm$ 2°C. Se presentó una respuesta vía organogénesis directa así como la formación de brotes a partir de areolas, con KIN o BA 3.0 mg/L en ausencia de auxinas (ANA). Los explantes de cotiledón e hipocótilo eventualmente murieron por la severa oxidación. Ápices y bases de brotes regenerados *in vitro* fueron sembrados en medio sólido adicionado con KIN o BA 3.0 mg/L, además de otra citocinina, metatopolina (mT) en concentración de 0.5 mg/L. Se evaluó el número de brotes obtenidos en cada tratamiento al término de dos meses de inducción. Después de dos años de investigación se obtuvieron 21 plantas y 15 brotes los cuales fueron sometidos nuevamente al estímulo de los Reguladores de Crecimiento Vegetal. El análisis anatómico mostró que la vía de regeneración fue directa ya que se observaron las conexiones vasculares entre el explante original y los brotes regenerados.

Se llevó a cabo la aclimatización de una plántula de aproximadamente 3 cm de altura, con raíces bien desarrolladas presentándose la sobrevivencia de ésta al término de un año en condiciones de invernadero. A pesar de las serias dificultades para el establecimiento aséptico de *B. militaris*, los resultados abren la posibilidad de conservación de ésta y otras especies seriamente amenazadas.

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es originaria de América, cuyas especies se pueden encontrar desde Canadá hasta el sur de Argentina, además de las islas Galápagos y las Antillas, a excepción de algunas especies de *Rhipsalis* y *Opuntia* (Arias, 1993).

Las cactáceas columnares incluyen alrededor de 170 especies, de las cuales 80 se encuentran en México. Estas plantas son componentes principales de los bosques tropicales caducifolios y matorrales xerófilos de las zonas áridas y semiáridas, que cubren cerca de dos tercios del territorio nacional (Casas, 2002). Proveen de recursos alimenticios a grandes poblaciones de murciélagos, aves e insectos que hacen uso del néctar, polen y frutos como alimento. También sirven de refugio a muchos animales que utilizan su sombra y sus ramas (Bustamante y Búrquez, 2005).

Las cactáceas presentan características ecológicas como distribución geográfica restringida; ciclos de vida largos, por ejemplo la edad reproductiva de algunas especies de cactáceas columnares puede variar, en *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britton & Rose es de 33 años y para *Neobuxbaumia macrocephala* (Web.) Daws es de más de 90 años; poseen tasas de crecimiento reducidas, que las hacen especialmente sensibles a las perturbaciones ambientales. Tradicionalmente son propagadas a partir de semillas o esquejes, en estos casos, las plántulas tienden a ser de lento crecimiento y susceptibles a pudriciones (Hernández y Godínez-Álvarez, 1994; Godínez-Álvarez *et al.*, 2003; Ojeda-Zacarías *et al.*, 2010).

*Backebergia militaris* es una cactácea columnar de la región centro-oeste de México que se encuentra en peligro de extinción muy probablemente por la expansión de la agricultura y ganadería, y por la explotación en el pasado de los cefalios (estructura terminal reproductiva) (Martínez-Palacios, 2007).

Las técnicas de cultivo *in vitro* han demostrado ser útiles en la propagación de un gran número de plantas amenazadas, debido a las altas tasas de multiplicación que se obtienen y al reducido material de partida requerido, con lo que se contribuye a enfrentar los crecientes problemas de la pérdida de biodiversidad (Quiala *et al.*, 2004; Sarasan *et al.*, 2006).

Todas las plantas tienen diferente potencial de regeneración; por lo que es necesario realizar investigaciones experimentales para establecer condiciones de propagación que permitan incrementar la disponibilidad del material vegetal, ajustando protocolos de regeneración para cada especie en particular (Ojeda-Zacarías *et al.*, 2010). En el caso de las cactáceas el material vegetal inicial utilizado con mayor frecuencia son las semillas (Quiala *et al.*, 2004), sin embargo no siempre es posible iniciar el establecimiento *in vitro* a partir de éstas, debido a que algunas especies producen pocas semillas o como se mencionó tardan un largo tiempo para producirse. Además el porcentaje de germinación en algunos casos es bajo, la viabilidad de las semillas decrece con el tiempo, a veces debido a las condiciones de almacenamiento. Algunas semillas son depredadas por animales y otras tienen casos de dormancia secundaria (Rojas-Aréchiga y Vazquez-Yanez, 2000). Por tal motivo en ocasiones es necesario partir del material vegetal disponible, aunque eso represente superar problemas como contaminación y oxidación de explantes provenientes de una planta adulta.

En la presente investigación fue necesario ensayar distintos métodos de desinfección para superar la contaminación microbiana de semillas y plántulas de *B. militaris* provenientes de invernadero, además de llevar a cabo distintas estrategias para evitar la oxidación de los explantes, antes de iniciar la exploración de respuestas morfogénicas y regeneración de plántulas de esta especie seriamente amenazada.

## 1.1 ANTECEDENTES

### Biodiversidad

El concepto de biodiversidad o diversidad biológica se refiere en general a la variabilidad de la vida; se emplea con mayor frecuencia a las especies vegetales, animales o de microorganismos que hay en nuestro planeta, sin embargo hay otros dos niveles que también expresan el grado de variabilidad biológica presente en una región: la variabilidad genética y la variabilidad en los ecosistemas (CONABIO, 2006).

Cerca de dos terceras partes de la biodiversidad mundial se localizan en poco más de una docena de países conocidos como países megadiversos (Fig. 1). México destaca entre ellos ya que es la cuarta nación en cuanto a riqueza de especies, además de combinar esa elevada diversidad biológica con una gran riqueza cultural (Sarukhán *et al.*, 2009).



Figura 1. Países de megadiversidad (Neyra y Durand, 1998)

En poco más de 1% de la superficie terrestre, México posee al menos 10% de la diversidad biológica del mundo, parte de esa biodiversidad es exclusiva de nuestra nación (Sarukhán *et al.*, 2012), y es el resultado de la compleja topografía, de los diversos climas y microclimas que se encuentran en todo el territorio, así como a una compleja historia tanto geológica y biológica como cultural. Asimismo, la ubicación geográfica de México hace que se distinga por ser el territorio de unión de dos regiones biogeográficas, la Neártica y la Neotropical, lo que quiere decir que en el país han evolucionado especies de distinta afinidad ecológica y geográfica (CONABIO, 1998; Neyra y Durand, 1998). Tal ubicación geográfica da como resultado que el país esté representado por un mosaico de climas y suelos que, con excepción de la tundra, alberga todos los tipos de vegetación del planeta (Soberón y Llorente, 1993).

México se distingue por albergar un gran número de especies vegetales y animales, ocupa el tercer lugar en mamíferos con 535 especies, el segundo lugar en reptiles con 804 especies y se han descrito 361 especies de anfibios. En cuanto a insectos, se calcula que se han descrito hasta el presente 47 853 especies, lo que lo sitúa entre los primeros nueve países del mundo, además se encuentra entre los cinco países con el mayor número de plantas vasculares. Se han descrito hasta ahora poco más de 25 000, de las cuales una alta proporción (entre 50 y 60% de las especies conocidas de México hasta ahora) son endémicas al país (Sarukhán *et al.*, 2009). Si una de estas especies se extingue en México, desaparece del planeta. A nivel genérico el número de endemismos es más acentuado en las zonas áridas y semiáridas, donde alcanza el 43 y 28% respectivamente. Para algunas familias de plantas como las cactáceas esta cifra es aún mayor, con 83% de sus especies y variedades que se encuentran sólo en nuestro territorio. Junto con Cactaceae y Asteraceae otras cuatro familias de plantas alcanzan en México niveles excepcionales de diversidad: Fabaceae, Poaceae, Orchidaceae y Rubiaceae (Tabla 1) (Álvarez, 1993; Challenger, 1998; CONABIO, 2006).

Tabla 1. Las quince familias con mayor número de especies nativas en la flora de México (Villaseñor, 2003).

Familia	Géneros	Especies	Var. o ssp.
Asteraceae	361	3021 (65.9)	613
Fabaceae	93	1274 (59.5)	242
Poaceae	168	1187 (41.0)	106
Orchidaceae	155	1145 (63.1)	31
<b>Cactaceae</b>	<b>74</b>	<b>946(82.6)</b>	<b>239</b>
Euphorbiaceae	44	782(58.6)	83
Rubiaceae	93	593(48.7)	40
Lamiaceae	30	530(67.5)	64
Mimosaceae	35	463(54.4)	75
Scrophulariaceae	56	437(56.5)	44
Solanaceae	33	430(46.7)	60
Cyperaceae	22	426(27.2)	34
Acanthaceae	47	384(58.8)	23
Malvaceae	50	356(50.6)	18
Bromeliaceae	20	333(67.6)	43

Entre paréntesis se indica el porcentaje de endemismo

### Pérdida de la biodiversidad

Cuando nos referimos a la pérdida de la biodiversidad, en realidad estamos hablando de la pérdida de ecosistemas, lo que conlleva a la pérdida de las poblaciones y especies que habitan en ellos (CONABIO, 1998).

Las principales amenazas para la biodiversidad pueden dividirse en dos categorías: las naturales y las que resultan del impacto sobre los ecosistemas inducidas por las actividades humanas. Las amenazas naturales radican principalmente en alteraciones climáticas, catástrofes naturales como lluvias torrenciales y erupciones volcánicas. Entre las amenazas de impacto por las actividades antropogénicas, se encuentran la deforestación, degradación de los suelos, el tráfico ilegal de vida silvestre, la introducción de especies exóticas y más recientemente el cambio climático (PROFEPA, 2010; Martínez-Meyer *et al.*, 2014).

En México, la pérdida de áreas naturales es un problema central en la conservación de la biodiversidad, alrededor del 50% del territorio ya ha perdido su cobertura vegetal original y cerca del 27% del territorio ya ha sido profundamente transformado a zonas agrícolas, de pastizales para el ganado o zonas urbanas. La extracción por coleccionistas de ciertos grupos de plantas, como cactáceas, orquídeas y cícadas, ha destruido poblaciones de varias especies; mientras que la explotación excesiva las ha colocado en alguna categoría de riesgo. Últimamente, el cambio climático se ha identificado como uno de los factores causales de la extinción de poblaciones y especies, con posibles impactos profundos en las próximas décadas. Las proyecciones hacia el futuro sugieren que una proporción importante de la biodiversidad mexicana podría verse seriamente afectada por los cambios en el clima (Martínez-Meyer *et al.*, 2014).

### **Conservación de la biodiversidad**

La conservación de la biodiversidad es un tema fundamental que presenta múltiples aristas y requiere de diferentes miradas para lograr sus objetivos (Núñez *et al.*, 2003). Es vital demostrar que la conservación y el uso racional de los recursos naturales es la verdadera base del desarrollo económico sostenible y que la conservación y el desarrollo deben ir de la mano y que el desarrollo económico a largo plazo es imposible sin una eficaz conservación de la biodiversidad (Mittermeier y Goettsch, 1992).

### **Generalidades de la familia Cactaceae**

Aunque la familia Cactaceae comparte algunas características con otras familias de plantas suculentas como es la presencia de tallos carnosos de diferentes formas y tamaños carentes de hojas, sobre los cuales nacen grupos de espinas; las cactáceas tienen como característica diagnóstica la presencia de areolas en sus tallos. La areola es una estructura homóloga a las yemas axilares de otras dicotiledóneas, tiene un aspecto algodonoso y se encuentra sobre las costillas o tubérculos, de donde surgen fibras lanosas, cerdas, espinas, flores y frutos (Bravo-Hollis, 1978; Arreola, 1997; Anderson, 2001).

La familia Cactaceae comprende 124 géneros y 1427 especies, las cuales se han diversificado en un número considerable de especies y formas de vida, se han establecido en varios ecosistemas, aunque se postula que tal hecho se vio favorecido por la aparición de zonas áridas y semiáridas, adquiriendo varias adaptaciones fisiológicas y reproductivas, en donde los procesos de hidratación y poliploidia también han desarrollado un papel importante en la evolución de la familia. Las clasificaciones más recientes de la familia reconocen cuatro subfamilias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae (Arias, 1997; Ortega-Baes *et al.*, 2010).

Las cactáceas son uno de los grupos vegetales más exitosos en México, debido a su gran diversidad y alto número de endemismos a nivel genérico y específico (Bravo-Hollis, 1978). Nuestro país es el más importante centro de concentración de cactáceas con un total de 48 géneros y 563 especies reconocidas (Hernández y Godínez-Álvarez, 1994).

Los datos obtenidos por Ortega-Baes y Godínez-Álvarez (2006), indican que México posee alrededor de 660 especies distribuidas a lo largo de todo su territorio, 78% de las cuales (517) son endémicas (Retes-Pruneda *et al.*, 2007). Tres cuartas partes de las especies restringidas al territorio mexicano se centran en tres tribus: Echinocereae, Cacteeae y Pachycereae, a la cual pertenece *Backebergia militaris* (Arias, 1993).

Las especies de esta familia son unas de las más amenazadas del reino vegetal. Las poblaciones naturales de muchas especies han sido afectadas por las presiones del desarrollo humano, debido principalmente al cambio de uso de suelo y la extracción de plantas de su hábitat, para su venta en mercados nacionales e internacionales. La mayoría de las especies que se encuentran amenazadas pertenecen a poblaciones pequeñas, de distribución restringida, o son especies recientemente descubiertas por la ciencia, por lo que se conoce muy poco de su biología. A esto se agrega el hecho de que la mayoría presenta un lento crecimiento y tiene ciclos de vida muy largos (Hernández y Godínez-Álvarez, 1994; Becerra, 2000).

En México las especies con algún problema para su conservación se encuentran listadas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-SEMARNAT-2010) e internacionalmente organismos como la UICN y la CITES emiten sus propias categorías y listas (Arias *et al.*, 2005).

Las plantas de ésta familia han sido utilizadas desde tiempos remotos hasta el presente por una gran parte de la población para la alimentación humana, como forraje, como plantas ornamentales y con uso medicinal (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998). Desde épocas prehispánicas han sido ampliamente utilizadas en medicina tradicional y por grupos indígenas, han sido empleadas como analgésicos, antibióticos, diuréticos y para afecciones cardiacas y nerviosas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). También son utilizadas como fuente de colorantes (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose); en fabricación de velas, utensilios para comer y recipientes; como cercas vivas (*Escontria chiotilla* (Rose) F.A.C. Weber y *Myrtillocactus geometrizans* (Mart.) Console); como fibras y rellenos; como leña (*Pachycereus weberi* (Coult.) Backeb.); como muebles y material de construcción (*Pachycereus pecten-aboriginum* (Engelm. ex Watson) Britton & Rose); como gomas y mucílagos y las flores de varias especies de *Opuntia* han sido utilizadas como perfume (Anderson, 2001; Casas, 2002; Figueroa *et al.*, 2011).

Las cactáceas habitan por lo general en ecosistemas desérticos (Becerra, 2000). Sin embargo los miembros de las subfamilias Cactoideae y Opuntioideae ocupan casi todos los hábitats terrestres: desiertos, praderas, desiertos fríos, bosques sombríos, bosques tropicales y zonas alpinas frías, húmedas o cubiertas de nieve (Mauseth, 2006).

Las plantas de la familia Cactaceae son dicotiledóneas y perennes, con tejidos de almacenamiento (parénquima) muy desarrollados, lo que les permite conservar agua y nutrientes en sus tallos y raíces para sobrevivir durante prolongados periodos de sequía. Otras estrategias adaptativas a la aridez es la reducción de la superficie transpiratoria al adquirir formas globosas y la atrofia de las hojas o su transformación en espinas, las cuales cumplen varias funciones: protegen contra la depredación de animales, 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. Los tallos son verdes, porque en ellos se concentra la actividad fotosintética y varían en forma, tamaño y ramificación. Su flor es hermafrodita, vistosa con colores variados y combinados, su producción se restringe a una por areola, son solitarias y rara vez crece más de una (Bravo-Hollis, 1978; Arreola, 1997; Anderson, 2001).

Las raíces de las cactáceas crecen por lo general extendiéndose alrededor de la planta, muy cerca de la superficie del suelo, y a poca profundidad (Vázquez-Yanez, 1997). Algunas especies como *Ariocarpus*, *Peniocereus* y *Pterocactus* tienen grandes raíces principales para el almacenamiento de agua, con pequeñas raíces secundarias derivadas de la principal. Algunas especies desarrollan raíces subterráneas que parecen tubérculos y algunas especies epífitas y trepadoras como *Hylocereus* y *Selenicereus* producen sólo raíces adventicias en donde el tallo está en contacto con un sustrato (Anderson, 2001).

Las modificaciones anatómicas más notorias de las cactáceas son la presencia de ceras epicuticulares, cutícula gruesa, epidermis múltiple con tricomas hundidos en algunas especies, hipodermis colenquimatosa y desarrollo de grandes proporciones de tejido medular y cortical con células de mucílago, así como la presencia de las traqueidas de banda ancha en el xilema secundario. La existencia de una cutícula impermeable que cubre toda la planta evita la pérdida de agua por transpiración; la entrada y salida del agua está regulada por los estomas (Becerra, 2000; Loza-Cornejo y Terrazas, 2011).

Los cactus son especies de lento crecimiento. La edad de la primera reproducción varía mucho con relación a la longevidad de las plantas. En general, la capacidad reproductiva de los cactus aumenta conforme aumenta su tamaño (Godínez-Álvarez *et al.*, 2003). Muchos cactus, particularmente aquellos de la subfamilia Opuntioideae, se reproducen asexualmente por el desprendimiento del tallo, el cual produce raíces adventicias y forman nuevos individuos. Algunos segmentos de tallo de algunas especies de *Cylindropuntia* se enganchan a la piel o pelaje de algunos animales y son llevados a otro lugar donde son depositados y generan un nuevo individuo por reproducción vegetativa (Anderson, 2001).

La reproducción sexual de las cactáceas se lleva a cabo generalmente en primavera. Entre los insectos las avispas y las abejas son los más eficientes polinizadores. Una vez llevada a cabo la fertilización, el ovario se transforma en fruto y los óvulos en semillas (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). El número de semillas producidas en un solo fruto puede ser a veces hasta más de 1000 (*Pilosocereus chrysacanthus* (F.A.C. Weber) Byles & Rowley) o de solo unas pocas (de 1 a 5 semillas por fruto en *Epithelantha* y *Pereskia aculeata* Mill.). Incluso dentro de una misma especie el número de semillas por fruto puede variar en gran medida (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

A nivel de familia la respuesta germinativa es muy variable. La disminución del porcentaje de germinación cuando se incrementa la edad de la semilla ha sido reportada para algunas especies como *Cephalocereus senilis*. Las semillas de otras especies incrementan su porcentaje de germinación con la edad, como *Opuntia* spp. y especies del género *Stenocereus* y *Turbinicarpus*. En el género *Mammillaria*, las semillas de ciertas especies no presentan diferencias en su porcentaje de germinación al incrementar la edad (Flores-Martínez *et al.*, 2008).

Las cactáceas poseen hábitos muy diversos, la gran mayoría son terrestres. Existen aquellas de gran porte arbóreo como *Carnegiea gigantea* (saguaro), o *Pachycereus weberi* (cardón); arbustivas como *Opuntia* (nopales) y cactus terrestres pequeños que apenas se distinguen en el estrato de vegetación herbácea. Otras especies son descritas como globosas o globulares, siendo totalmente esféricas (*Mammillaria barbata* Engelm.) o esféricas con la parte superior aplanada (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto). Algunas son epífitas, viven sobre árboles sin llegar a ser parásitas. Las rupícolas viven sobre rocas calizas, basálticas o de granito; y las gipsófilas prefieren los suelos ricos en yeso. Por lo general crecen solitarias, aunque algunas tienden a ramificarse en exceso, principalmente desde la base llegando a formar colonias (Arreola, 1997; Anderson, 2001).

## **Cactáceas columnares**

Las cactáceas columnares no sólo constituyen especies clave en las comunidades bióticas de las zonas áridas y semiáridas, sino que además son recursos de un considerable potencial económico. En la actualidad, cientos de comunidades rurales las utilizan para satisfacer sus necesidades de subsistencia y comercializan sus productos a escala local o regional. La madera de varias especies de cactáceas columnares gigantes se utiliza de manera común en la construcción de techos y cercas de las casas campesinas tradicionales (algunas especies del género *Neobuxbaumia*). También se utilizan como cercas vivas y como bordos de contención en terrazas (especies del género *Stenocereus*). Algunas especies podrían tener importancia en mercados internacionales y su comercialización contribuiría a beneficiar la economía. Ante tal perspectiva, el estudio y conservación de los recursos genéticos de estas plantas es una prioridad para el país (Casas, 2002).

En el desierto Sonorense, la Depresión del Balsas, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán principalmente y en el Istmo de Tehuantepec, donde las condiciones ambientales son más cálidas y las heladas escasas, son notables las cactáceas arborescentes de la tribu Pachycereeae (Arias, 1997). Esta tribu está constituida por 70 especies distribuidas principalmente en México con algunas especies presentes en Venezuela y se caracteriza porque la mayoría de las especies son plantas arborescentes o arbustivas, rastreras, candelabroformes o columnares, con costillas; con una zona florífera indiferenciada o con la presencia de un cefalio apical, anular o lateral (Guzmán, 1997).

La tribu Pachycereeae está conformada por dos subtribus: Pachycereinae y Stenocereinae. La subtribu Pachycereinae se integra a su vez por nueve géneros: *Pterocereus*, *Anisocereus*, *Cephalocereus*, *Neobuxbaumia*, *Carnegiea*, *Pachycereus*, *Backebergia*, *Mitrocereus* y *Lophocereus*. El Valle de Tehuacán-Cuicatlán es la zona considerada como el principal centro de diversificación de la tribu con 45 de las 70 especies (Valiente-Banuet, 2002; Camarena, 2005).

## ***Backebergia militaris***

*Backebergia militaris* (Audot) Bravo ex Sánchez Mejorada es una cactácea arborescente candelabroiforme, con tronco bien definido que se caracteriza por la presencia de un cefalio, con cerdas de amarillo a café oscuro, que se encuentra en el ápice de las ramas maduras (Fig. 3A) (Núñez *et al.*, 2001; Vázquez-Sánchez, 2002). Alcanza de manera frecuente alturas de 6 m y se ha registrado una planta superior a los 9 m de altura. Los troncos de forma rutinaria alcanzan 38 cm de diámetro, y varias plantas tienen troncos de más de 46 cm de diámetro. La fuerza de los troncos es necesaria para soportar el peso de sus ramas, debido a que hay gran ramificación (Mauseth *et al.*, 2005).

### **Ubicación taxonómica (Arias *et al.*, 2003; CONABIO, 2010)**

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Caryophyllales
<b>Familia:</b>	Cactaceae
<b>Subfamilia:</b>	Cactoideae
<b>Tribu:</b>	Pachycereeae
<b>Subtribu:</b>	Pachycereinae
<b>Género:</b>	<i>Backebergia</i>
<b>Especie:</b>	<i>Backebergia militaris</i> (Audot) Bravo ex Sánchez Mejorada
<b>Sinónimos:</b>	<i>Pachycereus militaris</i> , <i>Cereus militaris</i> , <i>Pachycereus chrysomallus</i>
<b>Nombre común:</b>	Órgano de gorro tiponche

Mediante un análisis filogenético utilizando secuencias de ADN, *Backebergia militaris* mostró separación de otras especies del género *Pachycereus*. Ya previamente había sido clasificada como un género monotípico (*Backebergia*) por Bravo-Hollis (1953) debido a su cefalio terminal. Buxbaum señaló las fuertes similitudes en su hábito, flores y grandes semillas con *Pachycereus*. Sin embargo,

el patrón de ramificación de *B. militaris* es más denso y desordenado en comparación con las otras especies del género *Pachycereus* y exhibe ramas reproductivas altamente diferenciadas que son reconocidas como verdaderos cefalios (Arias *et al.*, 2003).

### Distribución geográfica

*Backebergia militaris* es endémica de México, se distribuye en los estados de Michoacán, Guerrero y Jalisco (Fig. 2). Desde el punto de vista florístico crece en el área conocida como “provincia depresión del Balsas”, la cual está en asociación con el bosque tropical caducifolio caracterizado por especies arbóreas y arbustivas, cuyas hojas caen durante el periodo seco de invierno, que dura por lo menos seis meses (Núñez *et al.*, 2001; Cattabriga, 2004; Guzmán *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Distribución geográfica de *Backebergia militaris* en México (Tomado de Cattabriga, 2004).

La depresión o cuenca del río Balsas posee temperaturas muy altas. En las zonas cercanas a la presa “Infiernillo” las temperaturas máximas diarias nunca están por debajo de 26 °C, mientras que la temperatura máxima puede ser de 46 °C. La frecuencia de distribución de *B. militaris* es discontinua y quebrada en poblaciones con una extensión relativamente limitada. Su distribución oscila entre los 100 y 600 msnm (Cattabriga, 2004).

## Descripción botánica

**Ramas** de color verde grisáceo oscuro, como de 12 cm de diámetro, que presentan algunas estrangulaciones. Las ramas vegetativas crecen de manera lenta alcanzando una longitud entre 1.5 y 3 metros antes de convertirse en ramas maduras. **Costillas** en las ramas jóvenes 5 a 7, con el tiempo aumentan a 9 u 11, de 3.5 cm de altura, con el dorso más bien agudo. **Areolas** próximas, distantes entre sí 5 a 10 mm, pequeñas, circulares, de 3 a 4 mm de diámetro, desnudas o con fieltro grisáceo escaso (Bravo-Hollis, 1978; Mauseth *et al.*, 2005).

**Espinas** radiales 7 a 13, como de 1 cm de largo, delgadas, aciculares, con la base ligeramente engrosada, grises con la punta café. Espinas centrales de 1 a 4 semejantes a las radiales (Bravo-Hollis, 1978).

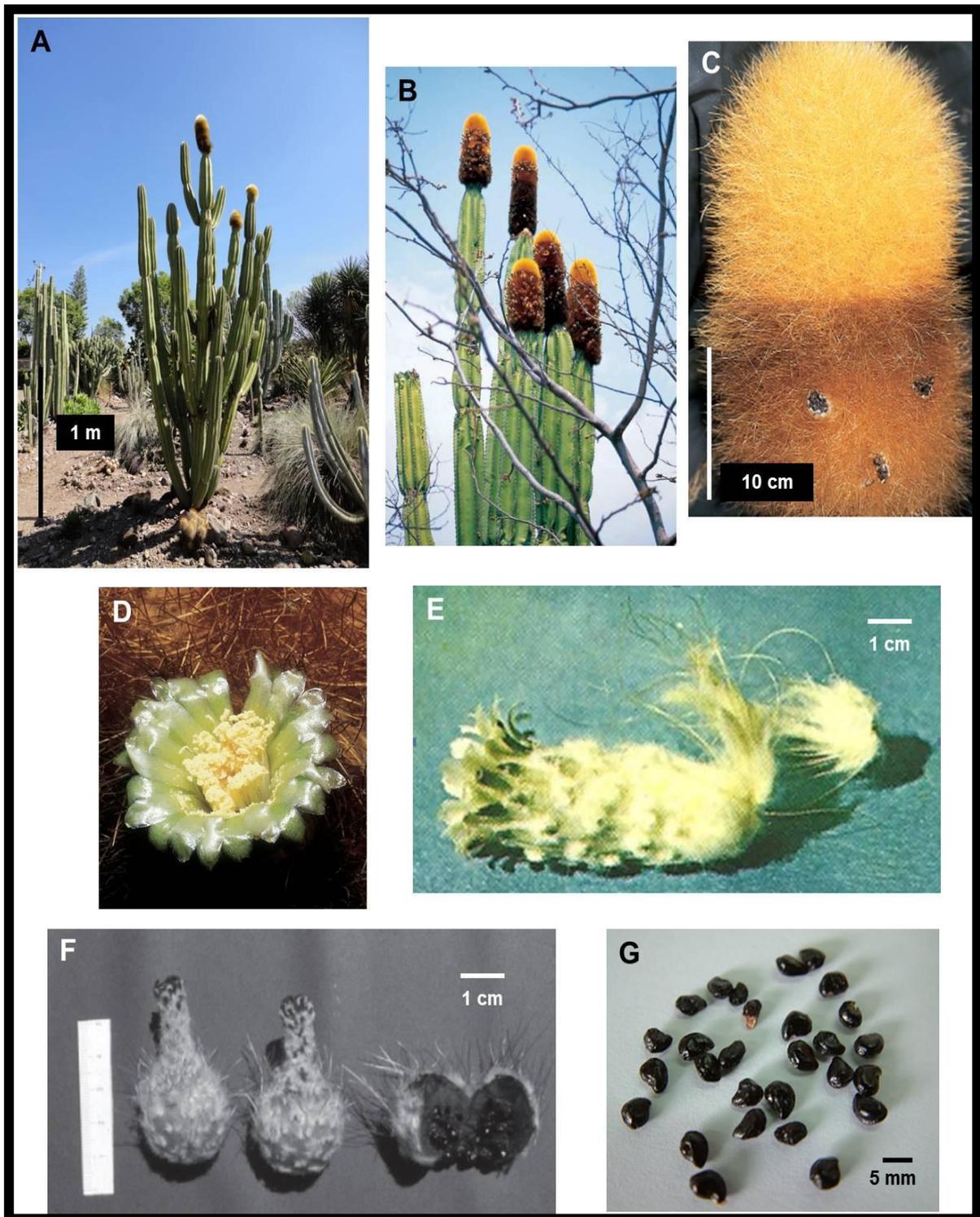
**Areolas de la zona floral** dispuestas en espiral formando un cefalio que tiene el aspecto de un antiguo gorro militar de 25 a 30 cm de largo y 18 a 20 cm de diámetro, estas areolas llevan abundante lana color beige, cerdas y espinas setosas muy numerosas 50 o 60, de 5.5 cm de largo, rectas y pungentes, las de la parte superior del cefalio son color amarillo ámbar, tornándose después, las de más abajo, progresivamente de color amarillo dorado hasta café rojizo y negro las inferiores (Fig. 3C). El cefalio puede alcanzar diámetros incluso superiores a 1 m cuando registra varios años de edad. Nunca registra fases vegetativas, por lo que no puede fotosintetizar, después de unos años con fases continuas de reproducción, muere y se desprende del tallo vegetativo (Bravo-Hollis, 1978; Martínez- Palacios, 2007).

**Cefalio:** El cefalio es una inflorescencia que en cactáceas ha sufrido gran reducción como adaptación a las condiciones de aridez. En algunas especies de las tribus Cereeae, Pachycereeae y Trichocereae, se presenta cuando la planta inicia su reproducción al llegar a la fase adulta (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2005). *Backebergia militaris* posee un cefalio terminal pero no en todas las ramas, ya que cada rama debe ser lo suficientemente vieja para pasar por un tipo de “pubertad”. Hasta este punto, la rama es muy joven para florecer (Mauseth *et al.*, 2005).

**Flores** en las areolas del cefalio, subapicales o laterales, emergiendo entre las espinas del cefalio, nocturnas, delicadamente perfumadas, solitarias en las areolas, tubular infundibuliformes, de 6 a 7 cm de largo y 3.5 a 4 cm de diámetro en la región del perianto (Fig. 3D y E) (Bravo-Hollis, 1978). Son polinizadas por murciélagos (Arias y Terrazas, 2008). La floración ocurre en Marzo y Abril y las flores no se producen todas al mismo tiempo sino poco a poco, de manera que en el día hay un cierto número de flores abiertas, durante un periodo quizá de uno o dos meses (Cattabriga, 2004).

**Fruto:** Tamaño de 2.1-3 cm × 1.4-2.1 cm, espinas y tricomas sin cubrir la pared del fruto, de forma oblonga, y dehiscencia longitudinal (Fig. 3F) (Arias y Terrazas, 2008). Los pequeños frutos maduran en menos de un mes y su maduración escalar permite la dispersión de semillas a través de un gran intervalo de tiempo, durante el primer período de la temporada de lluvias que comienza en abril. Tiene pocas semillas (10-20) (Cattabriga, 2004).

**Semillas:** Tamaño de 3.8-5.1mm× 2.5-3.8mm (Fig. 3G). Relieve de la testa con diferentes grados de estriación, probablemente de origen cuticular (Arias y Terrazas, 2008).



**Figura 3.** Plantas, cefalio, flor, fruto y semillas de *Backebergia militaris*. **A)** Individuo adulto en Vivero Cactus, Ajijic, Jalisco, México (Foto por P. Gracidias). **B)** Ramas apicales con presencia de cefalio (Tomado de Mauseth *et al.*, 2005). **C)** Detalle de cefalio (Tomado de Cattabriga, 2004). **D)** Flor en cefalio (Tomado de Cattabriga, 2004). **E)** Detalle de la flor (Tomado de Bravo-Hollis, 1978). **F)** Frutos con semillas (Tomado de Arias y Terrazas, 2008). **G)** Detalle de las semillas (Foto por A. Fernández).

## **Importancia ecológica**

El tiponche atrae una fauna diminuta que vive en medio de sus cerdas, bien protegida de los peligros del cambio climático y posibles depredadores. La fauna se compone de un cierto número de artrópodos como ácaros, hormigas y pseudoescorpiones. Se han encontrado capullos con restos recientes de crisálidas justo al lado de los restos de los frutos, protegidas por las espinas erizadas. La intención era alimentarse de las semillas inmaduras y sus funículos carnosos (Cattabriga, 2004).

## **Reproducción**

Gran parte de la reproducción de *B. militaris* es vegetativa. Cuando una rama se rompe y cae al suelo, varias de sus areolas se activan y forman brotes que comienzan a crecer hacia arriba. La rama también desarrolla raíces, por lo que el nuevo brote temporal depende de la rama para obtener agua, minerales e incluso la energía del almidón que podrían haber sido almacenados en la rama. En poco tiempo, los brotes producen sus propias raíces y cuando finalmente la rama muere, los brotes serán nuevas plantas. Sin embargo estas plantas son clones de los padres, genéticamente idénticas. Una vez convertida en una rama bastante vieja pasará a través de este ciclo: iniciará un cefalio, crecerá como cefalio durante varios años, y luego soltará el cefalio y un brote surgirá como una nueva rama. De vez en cuando una o dos semillas salen, pero generalmente sólo quedan restos de flores secas que quedan incrustadas en el cefalio durante años. Las puntas de las ramas vegetativas parecen sufrir quemaduras solares y la mayoría forman una capa de corteza sobre la punta del tallo, mientras está inactivo durante la estación seca. Cuando el tallo se activa y se reanuda su crecimiento, la corteza es aparentemente tan dura que los tejidos nuevos no se pueden expandir completamente, causando una constricción marcada por un anillo de corteza (Mauseth *et al.*, 2005).

## **Estatus de conservación**

A inicios de los años noventa, y en repetidas ocasiones, la población de *B. militaris* cercana a la presa “Infiernillo”, en Michoacán, ha sido sujeta a frecuentes recolectas de la porción terminal de las ramas, además el cambio de uso de suelo casi la ha erradicado de la región, por tal motivo ha sido listada en el Apéndice I de CITES, donde el comercio de las especies se autoriza solamente bajo circunstancias excepcionales. El control de la importación, junto con la dificultad de recolección, empaque y envío, así como la corta vida de la inflorescencia, ha desalentado a los recolectores ilegales de realizar tal actividad (Cattabriga, 2004; Martínez-Palacios, 2007).

En épocas anteriores, cuando no había preocupación por las especies en extinción, había camiones enteros de cefalios y cada uno era vendido por sólo 5 dólares. Pocos de estos cefalios sobrevivían más de un mes o dos, y las plantas eran severamente dañadas cuando los cefalios eran cortados con una motosierra (Mauseth *et al.*, 2005). Se sabe de casos que el cefalio joven con una parte del tallo se recolectaba para su comercio como planta de ornato, además se observó que el cefalio era recolectado y transportado en camiones para un posible uso industrial y con destino desconocido. Un estudio realizado por Martínez-Palacios (2007) sugiere que las fibras del cefalio fueron utilizadas para el acojinamiento de asientos y respaldo de algunos automóviles de las compañías Volkswagen de México, Ford y General Motors, ya que se encontraron fibras y semillas en un vehículo Volkswagen Sedan 1976. Este recurso debió de dejarse de utilizar al escasear de forma silvestre, parte por la sobre colecta y parte por el cambio en el uso de suelo o la introducción de la agricultura, ganadería y fruticultura.

Aun cuando ya existen acciones para la conservación *ex situ* de esta especie como el Ecojardín-UNAM, donde se propagó de manera convencional por esquejes y semillas (Martínez-Cruz com. per); hoy en día *Backebergia militaris* está considerada especie sujeta a protección especial según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y de acuerdo a la UICN, esta especie se considera “Vulnerable”, debido a que el tamaño total de la población se estima en

menos de 9000 individuos, además las subpoblaciones son naturalmente raras y aisladas, cada subpoblación tiene menos de 15 individuos maduros. Las amenazas constantes a su hábitat se han traducido en una disminución de la población (Terrazas *et al.*, 2013).

## **Usos**

Existen pocos registros de su uso, se incluye, como en otras cactáceas columnares, fruto comestible y forraje en época de estiaje. La información de las entrevistas a los ancianos de las comunidades ubicadas en el estado de Michoacán sobre el uso de ramas de *B. militaris*, reveló que se han utilizado para el tratamiento de contusiones, contracturas musculares y cólicos entre otras cosas. Se ha demostrado además que las porciones solubles de las ramas, es decir los extractos de cactus crudos de *B. militaris* tienen una importante actividad farmacológica sobre la actividad muscular (Cortés *et al.*, 1998; Casas, 2002).

## **Estrategias de conservación**

La conservación tanto de la flora como de la fauna se desarrolla en dos formas básicas: dentro del hábitat natural o conservación *in situ* y fuera del mismo, es decir, conservación *ex situ* (Lascuráin *et al.*, 2009).

### **Conservación *in situ***

La conservación *in situ* de la diversidad biológica se realiza en las áreas en que ésta ocurre naturalmente, procurando mantener la diversidad de los organismos vivos, sus hábitats y las interrelaciones entre los organismos y su ambiente. El concepto de conservación *in situ* es equivalente al de conservación dinámica, dado que la evolución de las especies vegetales continúa en el ambiente en que se han desarrollado. También es parte integral de este concepto de conservación dinámica, la continuidad de los procesos de coevolución (Rivas, 2001).

Una de las estrategias de conservación *in situ* es la creación de Áreas Naturales Protegidas, sitios legalmente protegidos, en donde el medio natural no ha sufrido perturbaciones significativas a causa del hombre (Franco-Martínez, 1997). Desde el punto de vista de la riqueza de especies, existen en México dos grandes

regiones importantes de diversidad de cactáceas columnares: estas son el triángulo Tehuacán-Depresión del Balsas-Tehuantepec, al sur del país, y la Sierra de Álamos junto con el valle del río Mayo en el Estado de Sonora, al norte. Los esfuerzos orientados a la protección y conservación de cactáceas columnares deberían considerar estas dos áreas como prioritarias para el establecimiento de áreas protegidas (Ezcurra Real de Azúa, 1998).

### **Conservación *ex situ***

La conservación *ex situ*, en cautiverio o en colecciones, es la aplicación de una amplia variedad de recursos, técnicas e infraestructuras especializadas que contribuyen a la recuperación y sobrevivencia de individuos o poblaciones fuera de sus hábitats. Este tipo de conservación surge como una medida complementaria a los mecanismos de conservación *in situ*, orientados principalmente a resguardar el material genético de las especies de importancia para el mejoramiento genético, la industria alimenticia, farmacéutica, maderera, etc., permitiendo la conservación de especies vulnerables a procesos de erosión genética (Benítez, 2001; Lascuraín *et al.*, 2009). Aun cuando este tipo de conservación provee ciertas ventajas, aleja la especie de sus contextos ecológicos naturales, por lo cual no se pueden recrear las interacciones entre los organismos y su ambiente.

Los esfuerzos para la conservación *ex situ* de la flora incluyen la creación de jardines botánicos, los recursos genéticos forestales (semilleros, plantaciones y bancos de semillas) y recientemente la propagación de las plantas amenazadas en los laboratorios de cultivo de tejidos (Lascuraín *et al.*, 2009).

Las técnicas de cultivo *in vitro* se han convertido en un método exitoso y rápido de propagación asexual de un número de especies de plantas, incluyendo algunos cactus (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998). Se sabe que las condiciones del cultivo *in vitro* en medios artificiales aceleran significativamente el crecimiento de estas plantas, confiriendo una ventaja adicional a esta técnica (Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

## Cultivo de Tejidos Vegetales

La base teórica para el desarrollo del cultivo de tejidos vegetales fue propuesta por Gottlieb Haberlandt en 1902, quien estableció el concepto de totipotencia, el cual postula que todas las células vegetales tienen el potencial para regenerar una planta completa. Sus intentos de cultivar células aisladas de plantas no fueron exitosos ya que aun cuando las células presentaron crecimiento, no se dividieron. Sin embargo con el paso de los años hubo más investigaciones que permitieron el desarrollo de esta técnica (Pierik, 1990; Thorpe, 2007).

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta de la Biotecnología la cual se basa en la totipotencialidad de las células vegetales, que hace posible propagar una gran cantidad de plantas a partir de pequeñas fracciones de tejido (hojas, raíces, tallo, pétalos, polen, entre otros) llamadas explante, en medios nutritivos bajo condiciones controladas de luz, temperatura, pH, reguladores de crecimiento, entre otras y obtener así plantas clonadas en corto tiempo y libres de patógenos (George y Sherrington, 1984; Chávez, 1993).

La elección del explante a cultivar depende de varios factores como: el objetivo perseguido, la especie vegetal utilizada, la disponibilidad del material vegetal, la facilidad de manipulación, la baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro*; es probable que en estos casos se opte por elegir explantes de plantas jóvenes provenientes de invernaderos (Roca y Mroginski, 1991).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han mostrado ser un importante procedimiento en la multiplicación, el mejoramiento y la conservación de las plantas útiles al hombre (Villalobos-Arámbula, 1985), así como la obtención de diversas especies vegetales de interés agrícola, ornamental medicinal, forestal, entre otras (Tabla 2). Éstas han sido utilizadas de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos en la agricultura. De igual manera han sido adaptadas para su utilización en un amplio número de especies silvestres con problemas de propagación por métodos convencionales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Quiala *et al.*, 2004).

Tabla 2. Algunos ejemplos de especies propagadas por la técnica de cultivo de tejidos vegetales

Nombre común	Especie	Explante inicial	Medio RCV (mg/L)	Respuesta <i>in vitro</i>	Referencia
Eucalipto	<i>Eucalyptus urophylla</i>	Estacas de 10 a 15 cm con ápices y yemas axilares	Medio Gamborg B5 + BAP y ANA (0.0, 1.0 y 3.0)	Br y Ca	Martínez-Ruiz <i>et al.</i> , 2005
	<i>Eucalyptus grandis</i>	Ápice de semillas germinadas <i>in vitro</i>			
Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i>	Ápice de semillas germinadas <i>in vitro</i>	Medio MS+ BAP (1.0)	Br	Sánchez <i>et al.</i> , 2009
Piñón azul (Pino)	<i>Pinus maximartinezii</i>	Cotiledones y embriones cigóticos maduros	Medio DCR y GD+ BAP (0.3 y 0.5)+ ANA (0.01)	Br	Ojeda-Zacarías <i>et al.</i> , 2006
Helecho espada	<i>Nephrolepis exaltata</i>	Prótalo gametofito de esporas germinadas <i>in vitro</i>	Medio MS+ AG <sub>3</sub> (0.01, 0.1 y 1.0)	Desarrollo de plántulas (talos esporofitos)	González-Rosas <i>et al.</i> , 2006
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Ápices de raíces de plántulas germinadas <i>in vitro</i>	Sales inorgánicas de medio N6 Chu y vitaminas de medio MS + 2,4-D (0.5 y 1.0) + KIN (0.5 y 1.0)	Ce. y Pl.	Quintana-Sierra <i>et al.</i> , 2005
Cícada	<i>Dioon merolae</i>	Embriones cigóticos y megagametofitos	Medio Litz+ 2,4-D (0.1, 0.5, 1.0 y 2.0) y KIN (0.5, 1.0, 2.0 y 3.0)	Ce. y Br	Cabrera <i>et al.</i> , 2008
Sábila	<i>Aloe vera</i>	Hojas más internas de hijuelos	Medio MS+ BAP (1.0)	Br	Albany <i>et al.</i> , 2006
Orquídea Flor de mayo, Lirios	<i>Laelia speciosa</i>	Cápsulas dehiscentes	Medio MS+ BAP (0.0, 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5)	Germinación y desarrollo de plántulas	Ávila-Díaz <i>et al.</i> , 2009
Boldo	<i>Peumus boldus</i>	Segmentos nodales	Medio MS+ BAP (0.0, 0.5 y 1.0) + AIB (0.0, 0.05 y 0.1)	Desarrollo de hojas y brotes	Ríos <i>et al.</i> , 2010

Abreviaturas: Br: Brotes; Ca: Callo; Ce: Callo embriogénico; Pl: Plántulas

Así como una planta que crece *in vivo* requiere de varios elementos ya sea del suelo o fertilizantes, el tejido de la planta que crece *in vitro* requiere una combinación de macro y micronutrientes para promover el óptimo crecimiento del tejido. Estos requerimientos pueden variar de acuerdo al tipo de célula, tejidos u órganos, además de la especie de planta que sea cultivada.

El medio de cultivo de tejidos consiste 95% de agua, macro y micronutrientes, reguladores de crecimiento vegetal (RCV), vitaminas, azúcares y algunas veces otros componentes orgánicos (Chawla, 2003; Razdan, 2003; Beyl, 2011).

Los macronutrientes son elementos requeridos en relativamente grandes cantidades (milimolar). El nitrógeno, es añadido en mayor cantidad, está presente ya sea como un nitrato o un ion amonio, o una combinación de los dos. Además del nitrógeno, el potasio, magnesio, calcio, fósforo y el azufre son incorporados al medio como diferentes componentes llamados macrosales. Los micronutrientes por lo general incluyen boro, cobalto, fierro, manganeso, molibdeno, cobre y zinc. Estos elementos son requeridos en una concentración (micromolar) mucho menor que los macronutrientes (Dodds y Roberts, 1985; Beyl, 2011).

La fuente de carbono estándar sin excepción es la sacarosa sin embargo el tejido vegetal puede utilizar una variedad de carbohidratos tales como la glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa y almidón. En el cultivo de células o tejidos la fotosíntesis es inhibida, además en ocasiones se cultivan *in vitro* órganos que no realizan fotosíntesis por lo tanto los carbohidratos en el medio son indispensables para el crecimiento del tejido (Chawla, 2003).

Las plantas normales sintetizan las vitaminas requeridas para su crecimiento y desarrollo, pero las células vegetales en cultivo tienen un requerimiento absoluto para la vitamina B<sub>1</sub> (tiamina), vitamina B (ácido nicotínico) y vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina). Las concentraciones están en el orden de 1 mg/L (Chawla, 2003). La tiamina es la vitamina básica requerida por todas las células y tejidos. El ácido nicotínico y la piridoxina se adicionan al medio pero pueden ser no esenciales para el crecimiento celular en algunas especies (Razdan, 2003).

Ciertas sustancias complejas también son adicionadas al medio las cuales sustituyen al nitrógeno orgánico, al carbón o las vitaminas (Chawla, 2003). Son utilizados por ejemplo: endospermo de coco, hidrolizados de proteína (caseína), extracto de levadura, extracto de malta, plátano, jugo de naranja o jitomate. Estos suplementos tienen componentes de una naturaleza indefinida, por tanto, su uso es evitado ya que puede afectar la reproducibilidad de los experimentos, dado que

la calidad y la cantidad de sus componentes varían con la edad del tejido del cual se ha obtenido el extracto (Razdan, 2003).

### **Hormonas vegetales y Reguladores de Crecimiento**

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos que se sintetizan en las plantas superiores, se encuentran de manera natural en los tejidos de la plantas (es decir, de forma endógena) y tienen efecto regulador en lugar de un papel nutricional en el crecimiento y desarrollo y por lo general están presentes sólo en cantidades muy pequeñas. Además de los compuestos naturales, se han desarrollado compuestos sintéticos con actividades fisiológicas similares a los naturales. Cuando estos compuestos han sido añadidos a los medios de cultivo (es decir de manera exógena) se denominan reguladores de crecimiento y tienen la capacidad de modificar el crecimiento de la planta (Segura, 2000; Chawla, 2003; George *et al.*, 2008).

Hasta hace poco se creía que el desarrollo vegetal estaba regulado únicamente por cinco hormonas: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico. Sin embargo existen otras hormonas como los brasinoesteroides, los cuales tienen un amplio rango de efectos morfológicos sobre el desarrollo vegetal, también se han identificado una gran variedad de moléculas de señalización que participan en la resistencia frente a patógenos y en la defensa contra herbívoros. Entre estas moléculas se encuentran el ácido jasmónico, el ácido salicílico y el polipéptido sistemina (Taiz y Zeiger, 2006). Las clases más importantes de RCV usados en el cultivo de tejidos son las auxinas y las citocininas (Beyl, 2011).

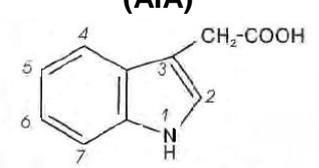
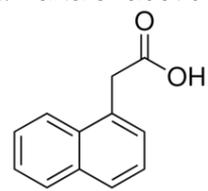
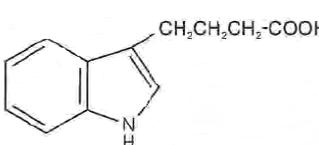
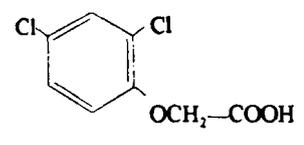
### **Auxinas**

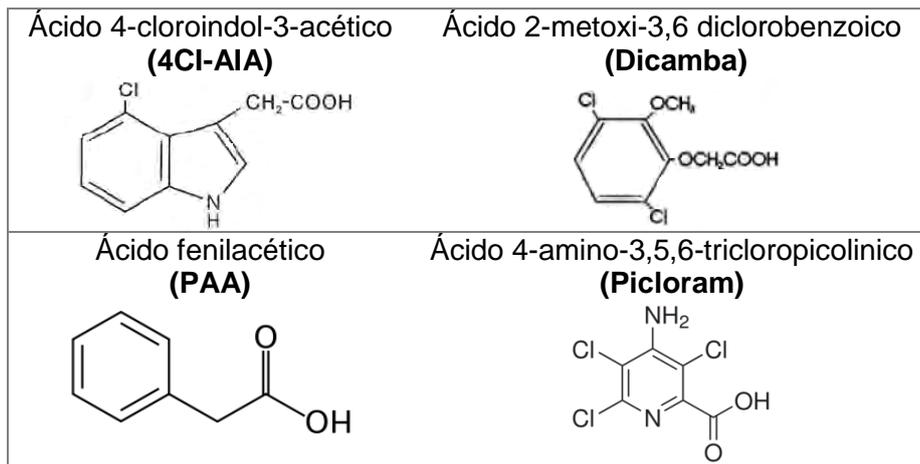
Las auxinas influyen de manera directa en procesos como la división celular del cambium, la diferenciación vascular, la formación de raíces adventicias, la dominancia apical y el desarrollo de frutos. El compuesto natural que se acepta como auxina es el AIA, considerándose como precursor de este compuesto el aminoácido triptófano (Acosta-Echeverría *et al.*, 2000). Se encuentran en hojas jóvenes, flores y frutos y es probable que se encuentre en abundancia también en los embriones inmaduros. Dentro de la planta, la auxina se transporta activamente

desde los ápices de los brotes hacia la base de la planta, en sentido basípeto. Normalmente se mueve atravesando conjuntos de tejidos o mediante un transporte polar (Raven *et al.*, 1992). A nivel celular, las auxinas controlan los procesos básicos tales como la división y elongación celular. Están involucradas en la formación de meristemas dando lugar a tejido desorganizado u órganos definidos (George *et al.*, 2008). Por lo general cuando la concentración de auxina *in vitro* es baja se favorecen la formación de raíces, y cuando la concentración es alta, ocurre la formación de callo (Beyl, 2011).

Las auxinas que en mayor frecuencia se emplean en el cultivo *in vitro* son el AIA,  $\alpha$ -ANA, y 2,4-D (Tabla 3). El AIB es en particular más efectivo para el enraizamiento. El AIA es una auxina que se produce de manera natural, es degradada muy fácil por la luz y la oxidación enzimática. Las concentraciones que se adicionan dependen del tipo de respuesta que se quiere inducir. Debido a que la AIA oxidasa puede estar presente en los tejidos cultivados, el AIA se ha adicionado al medio en concentraciones relativamente altas (1-30 mg/L). Puesto que el  $\alpha$ -ANA es un compuesto sintético, no está sujeto a la misma oxidación enzimática, éste puede ser adicionado en concentraciones más bajas (0.1-2.0 mg/L). La auxina más efectiva para la proliferación de callo para la mayoría de los cultivos es el 2,4-D a menudo en ausencia de citocininas exógenas (Dodds y Roberts, 1985).

**Tabla 3. Ejemplos de auxinas naturales y sintéticas (Taiz y Zeiger, 2006).**

Auxinas naturales	Auxinas sintéticas
<p>Ácido indol-3-acético <b>(AIA)</b></p> 	<p>Ácido <math>\alpha</math>-naftalenacético (<b>ANA</b>)</p> 
<p>Ácido indol-3-butírico <b>(AIB)</b></p> 	<p>Ácido 2,4-dicloro fenoxiacético <b>(2,4-D)</b></p> 

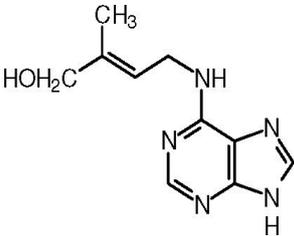
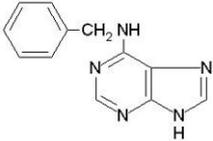
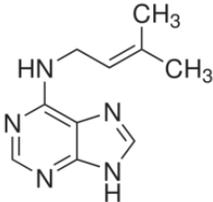
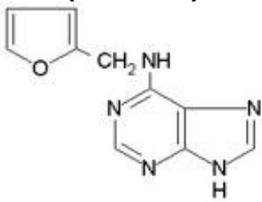
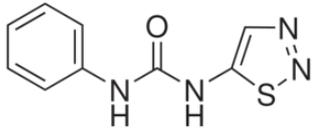


## Citocininas

Las citocininas promueven la división celular en los tejidos vegetales y son principalmente derivadas de aminopurinas (Dodds y Roberts, 1985). Estimulan la síntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular. Es quizá por esta razón que pueden promover la maduración de los cloroplastos y retrasar la senescencia de las hojas sueltas. Estos compuestos añadidos al medio de cultivo, rompen la dominancia apical y liberan las yemas laterales de la dormancia (George *et al.*, 2008). En altas concentraciones inducen la formación de brotes adventicios, pero inhiben la formación de raíces (Beyl, 2011). Su principal sitio de síntesis es el ápice de las raíces, sin embargo también se encuentran en los meristemas apicales, las semillas inmaduras y el cámbium, los cuales también las sintetizan (Kakimoto, 2003).

Las citocininas utilizadas en mayor medida son la kinetina, benciladenina y zeatina. Las dos primeras son compuestos sintéticos, mientras que la zeatina se produce de manera natural (Tabla 4). La kinetina es por lo general añadida al medio en una concentración de 0.1 mg/L para la inducción de callo (Dodds y Roberts, 1985).

Tabla 4. Ejemplos de citocininas naturales y sintéticas (Taiz y Zeiger, 2006)

Citocininas naturales	Citocininas sintéticas
<p>4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina <b>(trans-zeatina)</b></p> 	<p>6-benciladenina <b>(6-BAP, BA, N<sup>6</sup>-benciladenina)</b></p>  <p>6-3-hidroxi-benciladenina <b>(Meta-topolina)</b></p> 
<p>N<sup>6</sup>-2-isopentiladenina <b>(2 iP)</b></p> 	<p>6-furfurilaminopurina <b>(Kinetina)</b></p> 
	<p>N-fenil-N'-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea Tidiazuron <b>(TDZ)</b></p> 

## Giberelinas

Las giberelinas influyen en una gran variedad de procesos del desarrollo como la elongación del tallo, controlan varios aspectos de la germinación de las semillas, como la dormancia y la movilización de las reservas del endospermo. También pueden afectar la transición desde el estado juvenil al estado maduro, así como en la iniciación floral. Aunque existe una gran diversidad de giberelinas, todas están basadas en el esqueleto *ent*-giberelano (Fig. 4). A medida que se fueron caracterizando giberelinas de hongos y plantas, se fueron numerando como giberelina A<sub>x</sub> (o GA<sub>x</sub>), donde X es un número siguiendo el orden de descubrimiento.

Las giberelinas constituyen una gran familia de ácidos diprtenos y son sintetizados como una ramificación de la ruta terpenoide (Taiz y Zeiger, 2006; Beyl, 2011).

Los sitios de síntesis son hojas sin abrir muy jóvenes, brotes activos, punta de raíces y embriones. En general, las giberelinas inducen la elongación de entrenudos y el crecimiento de meristemas o yemas *in vitro*. En su ausencia, el cultivo tiene una apariencia globular debido a la acumulación de nudos. Es frecuente que inhiba las formación de raíces adventicias, así como la formación de brotes (Chawla, 2003). Muy pocas giberelinas están disponibles comercialmente y GA<sub>3</sub> o una mezcla de GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> han sido utilizadas con mayor frecuencia en el cultivo *in vitro* (George *et al.*, 2008).

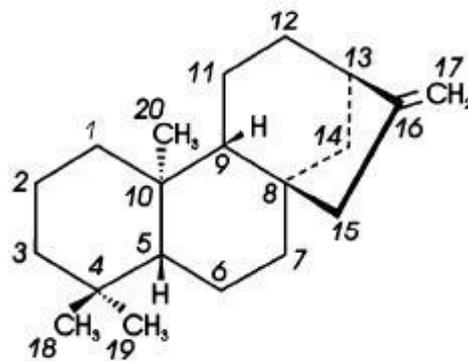


Figura 4. Esqueleto *ent*-giberelano.

Entre las ventajas que proporciona el cultivo de tejidos vegetales se encuentran:

- a) Los cultivos pueden iniciarse con sólo una pequeña fracción de la planta (explante),
- b) Se requiere poco espacio para el almacenamiento de los cultivos e incluso para aumentar en gran medida su número,
- c) Se pueden micropropagar una gran cantidad de plantas en un corto periodo de tiempo,
- d) Se pueden producir clones de un determinado tipo de planta que resultan difíciles de propagar vegetativamente,
- e) La producción es independiente de los factores ambientales, entre otros (George *et al.*, 2008).

Algunas de las desventajas que presenta el cultivo *in vitro* son:

- a) Se requieren métodos muy específicos para obtener resultados óptimos en cada especie y variedad,
- b) En la mayoría de los casos es muy común la contaminación en la fase de iniciación de los cultivos,
- c) Inversión inicial elevada,
- d) Los procedimientos son

caros y dan lugar a numerosos problemas técnicos, ya que se requiere personal altamente especializado para operar un laboratorio de CTV (Bowes, 1999; George *et al.*, 2008).

## **Problemas que se presentan durante el establecimiento de cultivos *in vitro***

### **Oxidación**

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. El oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son compuestos químicos muy reactivos y propensos a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Azofeifa, 2009).

Cuando un tejido es seccionado, los bordes o sitios de corte se tornan café-negro y se pueden oxidar en pocos minutos u horas. Tal es el caso de algunas cactáceas columnares como *Escontria chiotilla* y *Lemaireocereus hollianus* (F.A.C. Weber ex J. M. Coulter) Britton & Rose (Velázquez, 2011). Esto es ocasionado por la presencia de fenoles y quinonas, varios de estos compuestos son fitotóxicos y ocasionan la muerte del tejido celular, sin embargo, esta reacción en condiciones naturales evita que puedan penetrar patógenos por la herida y que sean un factor que provoque la muerte de la planta. La presencia de estos compuestos, está condicionada a una serie de factores como pueden ser: la edad fisiológica del explante (tejidos jóvenes contienen menores cantidades de compuestos fenólicos), el tamaño del área dañada por el corte y por el contenido natural de ellas (Lara, 2010).

Las estrategias para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explante cultivado *in vitro* son numerosas. En la Tabla 5 se enlistan algunas de las estrategias de acuerdo con Azofeifa (2009).

Tabla 5. Resumen de las principales estrategias utilizadas en el cultivo *in vitro* para evitar o disminuir los problemas oxidativos que ocurren en los explantes vegetales.

Nombre de la estrategia
Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo
Crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad
Crecimiento del explante en una temperatura baja
Subcultivos frecuentes
Cultivo en medio líquido
Uso de adsorbentes, en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo
Uso de soluciones antioxidantes
Elección del medio de cultivo
Elección de los reguladores de crecimiento
Cambio del potencial osmótico del medio de cultivo
pH bajo en el medio de cultivo
Inactivación de enzimas

- Uso de adsorbentes

#### *Polivinil pirrolidona (PVP)*

El PVP es una poliamida que, en el caso de los fenoles, es utilizada para su adsorción, a través de uniones hidrógeno, previniendo su oxidación y polimerización. Tanto el PVP como el PVPP (polivinil polipirrolidona) han sido utilizados en la prevención de oscurecimiento de tejidos, ya sea, aplicado como enjuague al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo. Las dosis aplicadas tanto en enjuague como en el medio de cultivo van de los 0.05 g/L hasta los 10.0 g/L (Azofeifa, 2009). Se han utilizado en diferentes grupos vegetales como en caña (300 mg/L) (Gómez, 2007), fresa (5 y 10%) (Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004) y el ñame (100 mg/L) (Borges *et al.*, 1999). En cactáceas se ha reportado para controlar parcialmente la oxidación en *Cephalocereus apicicephalium* E.Y. Dawson (Saucedo-Gutiérrez, 2006), en *Melocactus curvispinus subsp. dawsonii* Pfeiff. (2.0 g/L) (Azcona-Guerrero, 2009), así como para 21 especies de cactáceas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1998).

#### *Carbón activado*

El carbón activado es cualquier forma de carbón que se caracteriza por una alta capacidad de adsorción de gases, vapores y sólidos coloidales. Se produce por la

destilación destructiva de madera, musgo, lignita, cáscaras de frutos secos, huesos, vegetales u otros materiales carbonosos (Pan y Van Staden, 1998).

Algunos de los beneficios del carbón activado son: a) Adsorción de pigmentos tóxicos, marrones y negros (compuestos de tipo fenólico y melanina), b) Oscurecimiento del medio, lo cual favorece la formación de raíces y el crecimiento, c) El carbón activado estabiliza el pH y d) Puede promover la embriogénesis somática (Pierik, 1990). Para reducir los problemas de oxidación causados principalmente por los exudados de algunas plantas las concentraciones empleadas que se observan en la literatura varían entre 0.5 y 10.0 g/L, siendo más frecuentes las dosis de 2.0 y 3.0 g/L (Azofeifa, 2009). El carbón activado como estrategia para reducir la oxidación de los explantes ha sido empleado para distintas especies como *Dioscorea alata* L. (0.5 y 1.0 g/L) (Borges-García *et al.*, 2011), *Phoenix dactylifera* L. (3.0 g/L) (Tisserat, 1979) y *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don y *D. intricatus* Dyer (0.25%) (Linnington, 1991). En cactáceas ha sido empleado en especies como *Notocactus magnificus* (Ritter) y *Lophophora williamsii* (Lem. ex Salm-Dyck) Coult. (Esparza-Izunsu, 2004; De Medeiros *et al.*, 2006).

- Uso de antioxidantes

En términos generales, un agente antioxidante es un compuesto que inhibe o demora la oxidación de un sustrato propenso a este proceso. Los antioxidantes incluyen agentes reductores, los cuales pueden remover oxígeno de moléculas e incluso de compuestos (Azofeifa, 2009). Cuando los tejidos son propensos al oscurecimiento, por lo general son sumergidos en una solución de antioxidantes de manera inmediata después del corte. Los compuestos utilizados para este propósito incluyen ácido cítrico, ácido ascórbico, pirogalol y floroglucinol (Smith, 2000). Se ha utilizado con mayor frecuencia el empleo de una solución de ácido cítrico/ácido ascórbico como enjuague después de la desinfección del material vegetal (Choreño-Tapia *et al.*, 2002; Vega-Krstulovic *et al.*, 2007; Lara, 2010), como enjuague después de realizar un corte (Galván-Torres, 2005), sumergidos en la solución durante los cortes antes de la siembra en el medio o bien adicionados al medio de cultivo (Martínez-Ruiz *et al.*, 2005; Velázquez, 2011).

- Crecimiento de explantes en oscuridad o en baja intensidad luminosa

La oxidación de explantes, en varias especies vegetales, disminuye o se evita si éstos, luego de su establecimiento *in vitro*, son puestos a crecer en una condición de oscuridad por algunas semanas, como se realizó con caña de azúcar, *Hevea brasiliensis* y *Anacardium occidentale*. Posteriormente, los explantes se transfieren a un ambiente con luz normal, o en ciertas ocasiones, a una condición de baja luminosidad para ayudar a prevenir la oxidación (Azofeifa, 2009). No obstante, la oscuridad o los bajos niveles de luz no siempre pueden reducir la oxidación, como fue en el caso de algunos explantes de fresa (Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004).

### **Contaminación**

Los hongos y bacterias son los contaminantes más comunes observados en los cultivos *in vitro*. Estos microorganismos están presentes en el ambiente y al entrar en contacto con el medio de cultivo encuentran las condiciones propicias y crecen mucho más rápido que el tejido cultivado. Por consiguiente, el tejido muere debido a la contaminación (Razdan, 2003).

Para evitar y/o minimizar la contaminación en los cultivos con microorganismos es necesario: 1) Conocer el material vegetal con que se trabaja y los posibles contaminantes específicos; 2) Realizar una adecuada preparación de la planta donadora de explantes, cultivándola preferentemente en invernaderos tratadas con productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endófitos; 3) Proceder a la desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño posible al explante (Mroginski *et al.*, 2004).

### **Etapas de la micropropagación**

Murashige (1974) originalmente describió tres etapas básicas (I-III) para la micropropagación. Sin embargo reconociendo los problemas de contaminación con frecuencia asociados a la siembra de los explantes primarios, Debergh y

Maene (1981) propusieron incluir una Etapa 0, la cual describe el mantenimiento en condiciones controladas (libres de enfermedades) de las plantas madre, disminuyendo así la frecuencia de contaminación durante el establecimiento inicial de los explantes primarios. Recientemente se acepta que existen 5 etapas para la micropropagación (Kane, 2011).

**Etapa 0.** Selección y preparación de la planta madre o donadora.

Antes del establecimiento de los cultivos, las plantas madre deben ser mantenidas en condiciones controladas que permitan el crecimiento activo reduciendo la probabilidad de enfermedad. Por ejemplo manteniéndolas en condiciones de relativa baja humedad, riego por goteo, rociado con fungicida o bactericidas.

**Etapa I.** Establecimiento de cultivos asépticos.

Los explantes primarios obtenidos de las plantas madre son desinfectados superficialmente, eliminando los patógenos de meristemos apicales, puntas de brotes o brotes laterales. Los cultivos obtenidos deben primero probarse para descartar la presencia de contaminantes microbianos internos antes de utilizarse como fuente de explantes para la multiplicación (Etapa II).

**Etapa II.** Multiplicación.

Se caracteriza por un aumento repetido en la formación de brotes axilares, a partir de ápices o yemas laterales cultivadas en un medio complementado con un nivel relativamente alto de citocininas para romper la dominancia apical. La propagación se puede llevar a cabo de diferentes formas: a) a partir de yemas preformadas o nudos, b) formación *de novo* a partir de la organogénesis y c) a través de la formación de embriones somáticos (George *et al.*, 2008; Kane, 2011).

La organogénesis es la formación de órganos *de novo* a partir de tejido vegetal diferenciado. Los órganos producidos incluyen raíces, brotes, incluso flores. Se lleva a cabo a través de una fase de desdiferenciación y otra de diferenciación en las cuales las células vegetales se vuelven competentes para responder a las señales inductivas las cuales determinan el destino de los órganos (Geneve, 2011).

La embriogénesis somática se refiere al proceso por el cual las células somáticas, bajo condiciones de inducción, generan células embriogénicas, las cuales experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resulta en la formación de embriones somáticos los cuales no provienen de la unión de gametos y pueden desarrollarse en una planta completa (Pierik, 1990; Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

Tanto la organogénesis como la embriogénesis somática pueden llevarse a cabo de manera directa e indirecta. Si es de manera directa no se presenta una etapa intermedia de callo, por el contrario, cuando se produce callo de manera abundante antes de la formación de los órganos o embriones se dice que es de manera indirecta (Loyola-Vargas *et al.*, 2008). El callo es una masa de células no organizadas diferenciadas e indiferenciadas en división activa que a menudo se desarrolla ya sea por lesión (herida) o en un tejido cultivado en la presencia de reguladores de crecimiento (Chawla, 2003). Este tipo de crecimiento se induce fundamentalmente por el uso de altas concentraciones de auxina y/o citocinina en el medio nutritivo (Pierik, 1990).

### **Etapa III.** Individualización (elongación y enraizamiento)

Incluye la preparación de los brotes y plantas, que se obtienen en la fase II, para ser transferidos al suelo. Esto significa frenado de la formación de brotes axilares, e iniciación de la elongación del brote. A continuación se debe incluir la formación de raíces, ya sea *in vitro* o posteriormente *ex vitro* (Pierik, 1990).

### **Etapa IV.** Transferencia al ambiente natural (aclimatización)

Pese a las múltiples ventajas que ofrece el cultivo *in vitro* se debe tomar en cuenta que las plantas regeneradas a partir de esta técnica presentan algunos problemas tales como: Ineficiencia fotosintética debido a los bajos contenidos de pigmento del aparato fotosintético y el desarrollo de cloroplastos con granas desorganizadas; capacidad reducida de formar cutículas cerosas; estomas poco funcionales debido a la alteración en la forma de las células oclusivas; ineficiencia de los tejidos de sustento debido a la reducida presencia de colénquima y

esclerénquima; absorción y transporte de agua ineficiente debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote; las raíces de las plantas *in vitro* son vulnerables y no funcionan de forma adecuada *in vivo*, ya que carecen de tricomas en las raíces o tienen pocos, por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas. Para lo cual es indispensable el proceso de aclimatización, la última etapa en el proceso de micropropagación (Martínez-Ruiz *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2009).

La aclimatización involucra transferir y restablecer las plantas de un ambiente *in vitro* a uno *ex vitro*. Las plántulas se transfieren a condiciones de humedad relativamente más bajas y con una mayor intensidad de luz (Kane, 2011).

### **Cultivo de Tejidos en Cactáceas**

La propagación de cactáceas por semillas es insuficiente para cubrir su demanda debido a su limitada producción, disponibilidad y viabilidad; tampoco es suficiente la propagación vegetativa convencional, por lo que las técnicas de cultivo *in vitro* son herramientas indispensables para satisfacer dicha demanda; además muchas de esas especies están amenazadas o en peligro de extinción (Trejo-Orozco, 2005).

La propagación *in vitro* de cactáceas se ha logrado usando tres vías de regeneración diferentes. Existen reportes de **embriogénesis somática** en *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) y *Turbincarpus pseudomacrochele* (Backeb.) Buxb. Y Backeb. (Torres-Muñoz y Rodríguez Garay, 1996), así como de regeneración por **organogénesis** en *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. Ex Vaupel) Ralf Bauer (Pelah *et al.*, 2002), *Notocactus magnificus* (De Medeiros *et al.*, 2006) y *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Lem. (Smith *et al.*, 1991). Estos sistemas de regeneración pueden ser muy eficientes en cuanto al número de plantas que se producen en un corto tiempo. La tercera vía de regeneración *in vitro* empleada en cactáceas es la **activación de areolas**. Ésta consiste en estimular la brotación de las yemas axilares contenidas en esas estructuras, para luego enraizar y obtener plantas completas a partir de los brotes generados (De la Rosa-Carrillo *et al.*, 2012).

Algunas de las especies regeneradas a partir de esta vía son: *Echinocereus schmollii* (Weing.) N.P. Taylor, *Escontria chiotilla*, *Mammillaria theresae*, *Melocactus curvispinus*, *Pilosocereus robinii* y *Polaskia chichipe* (Retes-Pruneda et al., 2007; Quiala et al., 2009).

El cultivo *in vitro* de cactáceas globosas ha sido reportado con mayor frecuencia que en especies columnares, tan solo el género *Mammillaria* tiene hasta el momento 33 especies reportadas (Ramírez-Malagón et al., 2007). A continuación se presentan algunos trabajos de cultivo *in vitro* de cactáceas columnares (Tabla 6).

Tabla 6. Cultivos *in vitro* de especies columnares de la familia Cactaceae

Especie	Explante	Medio RCV (mg/L)	Respuesta	Referencia
<b><i>Browningia candelaris</i></b> Britton & Rose	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> Explantes transversales	Medio MS + BA (0.5, 1.0 y 1.5) o metatopolina (0.5, 1.0 y 1.5)	Br	Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch, 2007
<b><i>Carnegiea gigantea</i></b>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> Explantes apicales, laterales y transversales	Medio MS + BA (2.0) o 2iP (1.0, 2.0 y 3.0) + ANA (0.5)	Br	Pérez-Molphe-Balch et al., 2002
<b><i>Cephalocereus senilis</i></b> Haworth Pfeiffer	Segmentos de tallo de plantas de 2-3 años provenientes de invernadero	Medio MS + BA (1.0)+ ANA (0.01)	Br y Ca	Pérez-Molphe-Balch et al., 1998
	Plantas provenientes de vivero (Areolas)	Medio MS + ANA (0, 0.3, 1.0 y 3.0) + BA o KIN (0, 0.3, 1.0 y 3.0)	Br y Ca	Choreño-Tapia et al., 2002
<b><i>Cereus peruvianus</i></b> Mill.	Explantes apicales y laterales de tallo	Medio MS + AIA, ANA, BA y KIN (0, 0.01, 0.1 y 1.0 ) en combinaciones factoriales	Br y Ca	Machado y Prioli, 1996
	Plantas provenientes de invernadero Explantes apicales y laterales de tallo	Medio MS + ANA o 2,4-D y KIN o BAP (1.0, 2.0, 3.0, 4.0)	Br y Ca	Karimi et al., 2010

<b><i>Escontria chiotilla</i></b>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> Tallo, explantes transversales	Medio MS +BA (0.5, 1.0 y 2.0) o 2iP (1.0, 3.0 y 5.0)	Br	Retes-Pruneda <i>et al.</i> , 2007
<b><i>Escontria chiotilla</i></b> <b><i>Lemaireocereus hollianus</i></b>	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> Explante apical, medio y basal	Medio MS+ BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0)+ ANA (0.0, 0.1, 0.5 y 1.0)	Br y posterior enraizamiento	Velázquez, 2011
<b><i>Myrtillocactus geometrizans</i></b>	Explantes basales	Medio MS + BA (2.0)	Br	Gómez-Juárez <i>et al.</i> , 2006
<b><i>Pachycereus pringlei</i></b> (S. Watson) Britton & Rose	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> Explantes apicales, laterales y transversales	Medio MS +BA (1.0, 2.0 y 3.0) o 2iP (1.0, 2.0 y 3.0) + ANA (0.5)	Br	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 2002
<b><i>Pilosocereus robinii</i></b> (Lem.) Byles <i>et</i> Rowley	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> Explantes apicales y basales	Medio MS + BA (1.0, 1.5 y 3.0)	Br	Quiala <i>et al.</i> , 2009
<b><i>Polaskia chichipe</i></b> (Rol.-Goss.) Backeb.	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> Tallo, explantes transversales	Medio MS + BA (1.0)	Br	Retes-Pruneda <i>et al.</i> , 2007
<b><i>Stenocereus thurberi</i></b> (Engelm.) Buxb.	Plántulas germinadas <i>in vitro</i> Explantes apicales, laterales y transversales	Medio MS +BA (1.0) o 2iP (1.0, 2.0 y 3.0) + ANA (0.5)	Br	Pérez-Molphe-Balch <i>et al.</i> , 2002

Abreviaturas: Br: Brotes, Ca: Callo

A pesar de que existen varios trabajos para la propagación *in vitro* de especies de cactáceas columnares, no se tiene registro de la propagación de *B. militaris* por cultivo de tejidos, no obstante que se encuentra en tres listados de especies en riesgo de extinción: Norma Oficial Mexicana (NOM-SEMARNAT-2010) (Sujeta a Protección Especial), La lista Roja (UICN) (considerada como Vulnerable), y la CITES (Apéndice I); es necesario complementar las acciones de su conservación con técnicas biotecnológicas que además de permitir el establecimiento de material aséptico conservando así su germoplasma, permiten generar información y desarrollar un protocolo para la micropropagación ayudando a la futura recuperación de las poblaciones seriamente amenazadas.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

*Backebergia militaris* se encuentra dentro de la reserva de la biosfera Zicuirán-Infiernillo en Michoacán, sin embargo sus hábitats se han visto reducidos por cambios en el uso de suelo, en particular por las actividades pecuarias y la expansión de la frontera agrícola, considerándose en serio riesgo. Algunas poblaciones naturales podrían estar también declinando debido a problemas de plagas (Núñez *et al.*, 2001). La construcción de la Presa Francisco J. Múgica (2011) en Michoacán, afectó una de las poblaciones de esta especie ya que la zona donde habitaba quedó inundada, siendo esta especie la única cactácea endémica de la región (<http://gobiernodemichoacan.blogspot.mx/2009/11/la-presa-j-mugica-mayor-generador-de.html>). Además de esto, se ha observado que las poblaciones no están en toda ni en todas las laderas donde se distribuye, sino sólo en una pequeña franja (Martínez-Cruz com. per).

Por tanto, la propagación mediante el Cultivo de Tejidos a partir de semillas o plántulas provenientes de semillas, representa una alternativa viable para su estudio, propagación y conservación *ex situ*.

## 1.3 OBJETIVOS

### Objetivo general

Generar las condiciones para el establecimiento aséptico y la regeneración *in vitro* de *Backebergia militaris*.

### Objetivos particulares

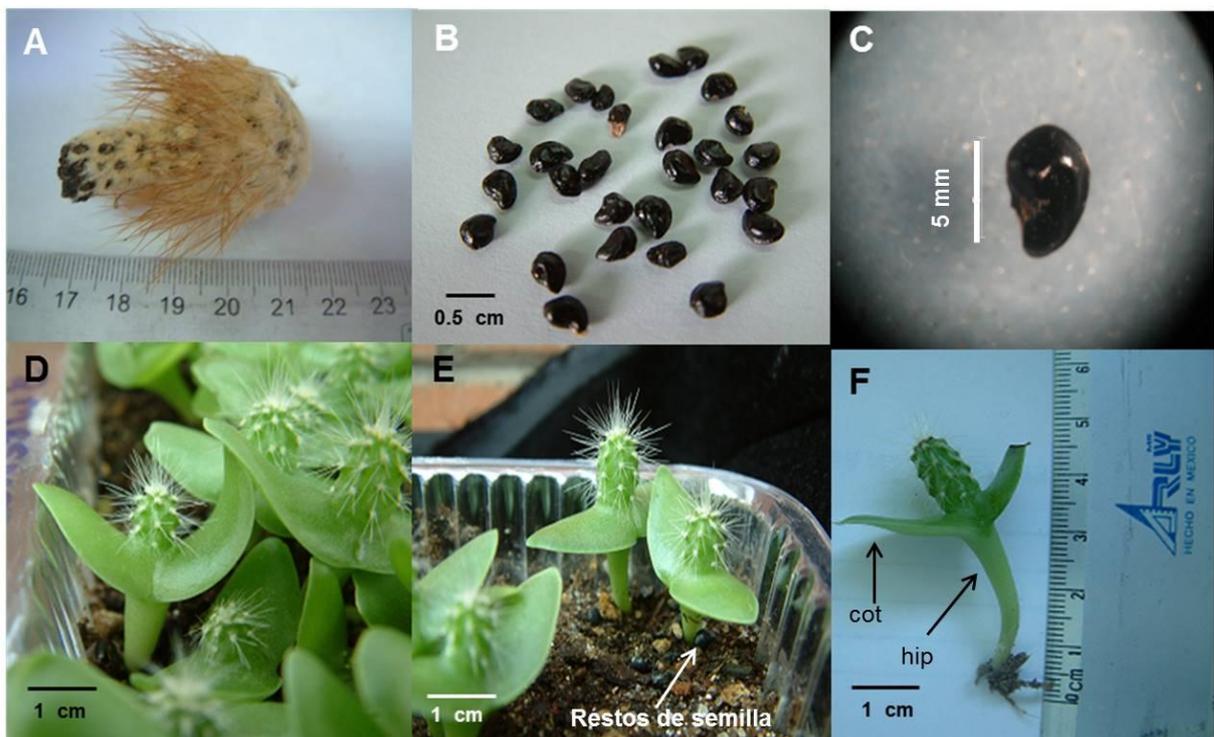
- Establecer un procedimiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* de secciones de tallo de plántulas germinadas, cultivadas en invernadero.
- Controlar la oxidación de los explantes de tallo y otras secciones de plántulas establecidas *in vitro*.
- Explorar las respuestas morfogénicas de explantes apicales y basales de tallo en presencia de diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas/citocininas.
- Realizar un análisis anatómico de tallo de las plántulas provenientes de invernadero que evidencien su estructura y posible relación con la capacidad regenerativa de los explantes apical y basal.
- Llevar a cabo un análisis anatómico de brotes regenerados *in vitro* para determinar y documentar la vía de regeneración que siguieron los mismos.
- Aclimatizar en invernadero plántulas regeneradas *in vitro*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se utilizaron 90 plántulas y 60 semillas de *Backebergia militaris* (Fig. 5). Las semillas procedían de tres frutos maduros, dos fueron donados por el Dr. Salvador Arias Montes, Jardín Botánico, IB-UNAM y uno donado por el Dr. Santiago Arizaga Pérez de la Escuela Nacional de Estudios Superiores de la UNAM Unidad Morelia. Los dos primeros frutos fueron colectados en Michoacán, uno el 30-Agosto-1998 procedente del municipio La Huacana, número de colecta 1336, y el segundo provenía de Buenavista, Tomatlán, colectado el 12-Marzo-2001. Del tercer fruto solo se tuvo el año de colecta (2009).

Las plántulas fueron donadas por el Dr. Santiago Arizaga Pérez. Éstas medían entre 3 y 5 cm desde la base del tallo (unión con la raíz) al ápice y tenían aproximadamente 3 meses de edad.



**Figura 5.** Semillas y plántulas utilizadas para el establecimiento *in vitro* de *Backebergia militaris*. Arriba: **A)** Fruto maduro utilizado para la obtención de semillas. **B)** Semillas para ensayos de germinación. **C)** Detalle de la semilla. Abajo: **D)** Plántulas donadas sembradas en sustrato. **E)** Restos de la semilla después de la germinación de las plantas. **F)** Plántula separada para el establecimiento aséptico. cot= cotiledón, hip= hipocótilo.

### **Siembra de semillas en sustrato**

Se sembraron 20 semillas en sustrato debido a que ya tenían un largo tiempo de haber sido recolectadas, provenientes de los frutos donados por el Dr. Arias. Al término de 2 meses no se observó ninguna respuesta de germinación por lo que se procedió a sembrarlas *in vitro*.

### **Desinfección de semillas**

Se realizó la imbibición de semillas en agua destilada durante 24h a una temperatura de 3° C antes de comenzar el procedimiento de desinfección. Debido a los altos porcentajes de contaminación obtenidos en previas siembras, fue necesario ensayar 5 diferentes métodos de desinfección. En la Tabla 7 se muestran los distintos tratamientos utilizados para la desinfección de las semillas de *B. militaris*.

**Tabla 7. Diferentes métodos ensayados para la desinfección de semillas de *B. militaris***

1	2	3	4	5
AD 5 min. *	AD 5 min. *	AC 5 min. *	AC 5 min. *	AD 5 min. *
SJ 10 min. *	SJ 10 min. *	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 min	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 min	SJ 10 min. *
Et 96% 1 min. *	Et 96% 1 min. *	Et 96% 1 min. *	Et 96% 1 min. *	Et 96% 1 min. *
Bn 1g/L 30 min. *	Cp 2g /L 60 min. *	Cl 30% 20 min. *	Cl 30% 20 min. *	Cl 30% 20 min. *
Cl 30% 30 min. *	Cl 30% 30 min. *	ADE 3 enjuagues	Retiro de testa	Retiro de testa
ADE 3 enjuagues	ADE 3 enjuagues		Cl 10% 15 min. *	Cl 10% 15 min. *
			ADE 3 enjuagues	Cipf 500mg/500ml 30 min. *
				Bn 1.5 g/L autoclaveado 60 min. *
				ADE 3 enjuagues

**Abreviaturas:**

AC: agua corriente, AD: agua destilada, ADE: agua destilada esterilizada, Bn: Benomil, Cl: solución de hipoclorito de sodio (v/v), Cp: Captán, Cipf: ciprofloxacino (antibiótico), Et: alcohol etílico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico, SJ: solución jabonosa, \* agitación constante. Los desinfectantes autoclaveados fueron esterilizados en autoclave a 120 °C a presión de 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos.

**Condiciones de incubación**

En los tratamientos de desinfección 4 y 5, se aislaron los embriones cigóticos retirando manualmente la testa de las semillas y fueron sembrados en medio MS al 50% (Apéndice I), adicionado con una concentración de 3.0 mg/L de las giberelinas A<sub>4</sub> + A<sub>7</sub>. Los embriones aislados fueron divididos en dos lotes de 14 cada uno, fueron incubados en fotoperiodo y oscuridad total. Estos embriones provenían de los frutos recolectados en el año 2001 y 2009.

## **Evaluación del material biológico**

La contaminación de las semillas se evaluó cada semana después del tratamiento de desinfección.

## **Desinfección de plántulas**

Para el establecimiento aséptico de los explantes a partir de plántulas, se retiró la raíz de éstas y se ensayaron diferentes métodos de desinfección de acuerdo a los resultados generados. En la Tabla 8 se muestran de manera resumida los diferentes ensayos.

Para reducir la superficie de desinfección y permitir que los agentes desinfectantes penetraran de forma más efectiva se puso en práctica 1) recortar las espinas de las areolas y 2) retirar totalmente (arrancar las espinas), estas estrategias están orientadas a dejar lo más expuesta posible la areola y reducir los contaminantes que pudieran estar presentes en esa estructura de la planta.

**Tabla 8. Diferentes métodos empleados para la desinfección de plántulas de *Backebergia militaris*.**

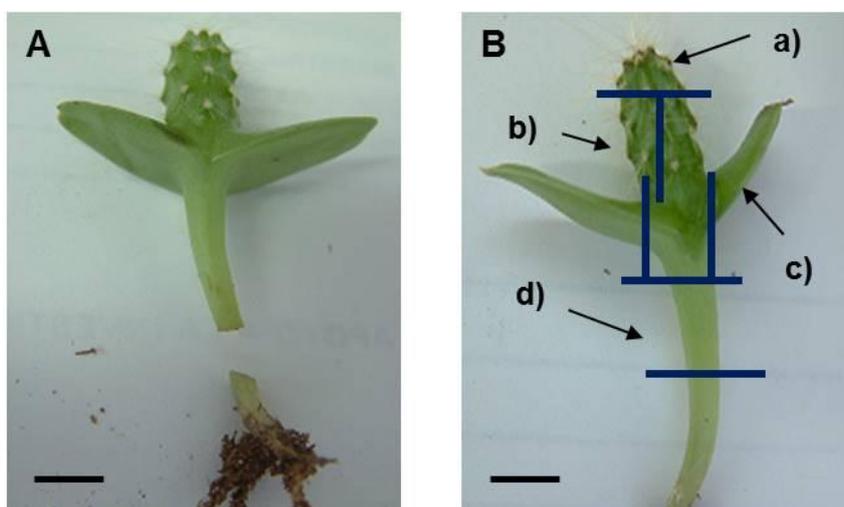
1	2	3	4	5	6	7	8	9
AD 5 min. *	AD 5 min. *	AD 5 min. *	AD 5 min. *	Cortar espinas y retirar espinas	Cortar Espinas	Cortar Espinas	Cortar Espinas	Cortar Espinas
SJ 10 min. *	SJ 10 min. *	SJ 10 min. *	SJ 10 min. *	AD 5 min. *	AD 5 min. *	AD 5 min. *	AC 1 min. *	AC 1 min. *
Et 70% 1 min. *	Et 96% 30 seg. *	Et 96% 30 seg. *	Et 96% 1 min. *	SJ 10 min. *	SJ 10 min. *	SJ 10 min. *	SJ 10 min. *	SJ (tibia) 10 min. *
Bn 1g/L 60 min. *	Bn 1g/L 60 min. *	Bn 1g/L 60 min. *	Cl 15% 30 min. *	Et 96% 1.5 min. *	Et 96% 1 min. *	Et 96% 1 min. *	Et 96% 1 min. *	Et 96% 1 min. *
Cl 30% 30 min. *	Cl 30% 20 min.	Cl 15% 10 min.	Cipf 500mg/500ml 30 min. *	S Cp/Bn autoclaveada 1.5g/L c/u 60 min. *	Cl 30% 60 min. *	Cup 1g/L 40 min *	Agr 2g/L 40 min *	S Cp/Bn* 2 g /L c/u 60 min.
ADE 3 enjuagues	ADE 3 enjuagues	Ant 3 enjuagues	Bn autoclaveado 1.5 g/L 60 min. *	Cipf 250 mg/500ml 30 min. *	AD 5 min. *	Cl 30% + 5 gotas Tween 60 min.*	Cl 30% + 2 gotas Tween 60 min.*	Cl 30% + 2 gotas Tween 60 min.*
			Ant 3 enjuagues	Cl 30% 30 min *	S Bn/Agr autoclaveada 4 g/L c/u 40 min. *	Ant 3 enjuagues	Ant2 3 enjuagues	Ant2 2 enjuagues (5 min c/u)
				Ant 3 enjuagues	Ant 3 enjuagues	Cipf 250mg/500ml 60 min. o Cef 500mg/L 30 min. *	Cef 1g/L 60 min. *	Cipf 500mg/500ml 60 min. *
						S Cp/Bn* autoclaveada 2 g /L c/u 40 min. *	S Cp/Bn* autoclaveada 2 g/L c/u 60 min. *	Ant2 1 enjuague
						Ant 3 enjuagues	Ant2 3 enjuagues	

**Abreviaturas:**

AC: agua corriente, AD: agua destilada, ADE: agua destilada esterilizada, Agr: Agrimicín, Ant: Solución de antioxidantes: Ácido cítrico y Ácido ascórbico 150 mg/L c/u, Ant2: Solución de antioxidantes: Ácido cítrico y Ácido ascórbico 300 mg/L c/u, Bn: Benomil, Cp: Captán, Cef: Cefotaxima, Cipf: Ciprofloxacino, Cup: Cuprimicín, Cl: solución de hipoclorito de sodio (v/v), S: Solución, SJ: solución jabonosa (agua destilada + jabón líquido antibacterial), \* agitación constante. Los desinfectantes autoclaveados fueron esterilizados en autoclave a 120 °C a presión de 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos.

## Condiciones de incubación

Una vez desinfectadas las plántulas completas, se realizaron cortes para obtener los siguientes explantes: a) ápices, b) secciones laterales de tallo, c) cotiledones y d) hipocótilos (Fig. 6).



**Figura 6.** Explantes obtenidos de plántulas de *B. militaris*. **A)** Separación de la raíz. **B)** Obtención de los distintos explantes: a) ápice, b) laterales, c) cotiledones y d) hipocótilo. Barra inferior=1 cm.

Cada explante se sembró con el área de corte en contacto con medio MS 50% adicionado con carbón activado (1.0 g/L) o PVP (1.0, 1.5, 2.5, 3.0 y 4.0 g/L) al medio de cultivo, se emplearon los reguladores de crecimiento BAP/ANA en concentraciones 0-2 mg/L y 0-1 mg/L respectivamente (Tabla 9).

El tamaño de los explantes era de 1 cm en el caso de los laterales, el ápice y el hipocótilo, mientras que los cotiledones medían 1.5 cm aproximadamente, sin embargo la medida de los explantes varió de acuerdo al tamaño de la plántula a desinfectar.

**Tabla 9.** Combinaciones iniciales de los reguladores de crecimiento para siembra de explantes en medio sólido.

BA mg/L \ ANA mg/L	0	0.5	1	2
0	1	2	3	4
0.1	5	6	7	8
0.5	9	10	11	12
1	13	14	15	16

Se sembró un explante por frasco y fueron incubados a temperatura de  $26 \pm 2$  °C en total oscuridad para evitar la oxidación. El número de explantes sembrados en cada tratamiento fue variable y de acuerdo a la disposición de los mismos como se muestra en la Tabla 10.

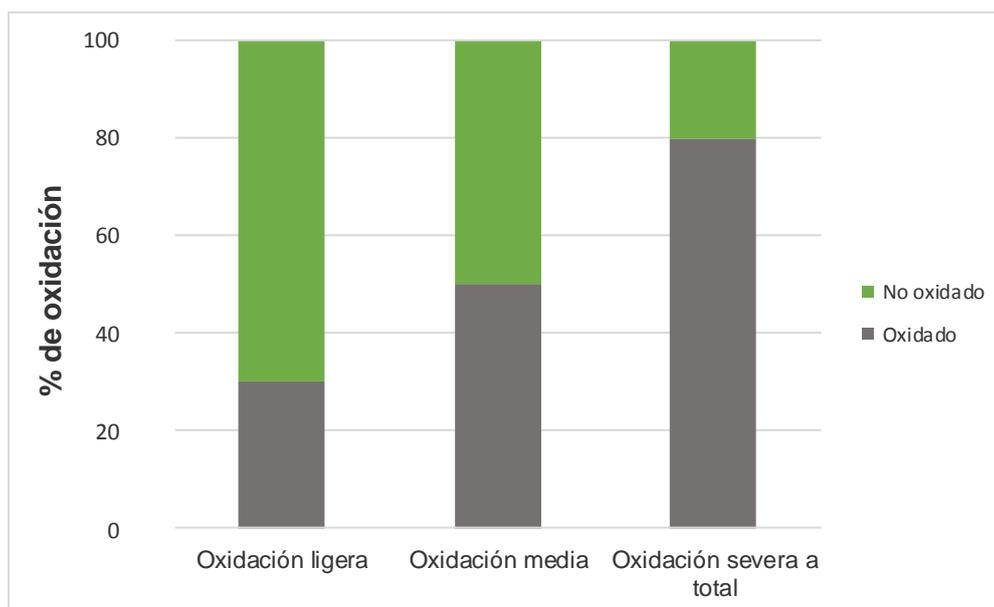
Se utilizó medio sólido, gelificado con Gellangum™ 3.5 g/L en los tratamientos de desinfección 1, 2 y 3. A partir del tratamiento de desinfección 4 se utilizó medio líquido con puentes de papel filtro.

**Tabla 10. Número de explantes sembrados en cada tratamiento de desinfección (Ver Tabla 8).**

Método de desinfección utilizado	Tratamiento para reducir la oxidación	Número de ápices sembrados	Número de laterales sembrados	Número de cotiledones sembrados	Número de hipocótilos sembrados	Tipo de medio (MS 50%)
1	C.A 1g/L (T <sub>1</sub> ) o PVP 1g/L (T <sub>2</sub> )	19	24	27	13	sólido
2	PVP 1.5g/L (T <sub>3</sub> )	9	37	19	11	sólido
3	PVP 1.5g/L	7	20	12	8	sólido
4	PVP 2.5g/L (T <sub>4</sub> )	16	19	5	2	líquido
5	PVP 2.5 g/L	10	50	11	-	líquido
6	PVP 2.5 g/L	1	16	-	-	líquido
7	PVP 2.5 g/L	2	32	-	-	líquido
8	PVP 3 g/L (T <sub>5</sub> )	2	28	-	-	líquido
9	PVP 4 g/L (T <sub>6</sub> )	3	40	-	-	líquido
<b>Total</b>		<b>69</b>	<b>266</b>	<b>74</b>	<b>34</b>	

### Evaluación del material vegetal

La contaminación y oxidación de los explantes se evaluó mediante la observación directa. Para distinguir el grado de oxidación de los explantes se tomó en cuenta el siguiente criterio: a) Oxidación ligera: cuando el explante presentaba una oxidación menor al 50% de la superficie; b) Oxidación media: cuando el explante presentaba una oxidación del 50% y c) Oxidación severa: cuando el explante se encontraba oxidado en más del 50% de su superficie (Fig. 7). De acuerdo al tratamiento de desinfección utilizado, se probaron diferentes tratamientos para reducir la oxidación de los explantes.



**Figura 7.** Grado de oxidación para la evaluación de los diferentes explantes de *B. militaris*.

### Formación de brotes por activación de areolas en medio líquido

Una vez controlada la oxidación en explantes de ápice y laterales se llevó a cabo una nueva exploración utilizando diferentes concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento (citocininas/auxinas) (Tabla 11). Las plántulas utilizadas para dichos tratamientos ya tenían más de un año de edad con una altura entre 8 y 9 cm creciendo en una mezcla de suelo y presentaban cotiledones e hipocótilo oxidados y en algunos casos muy maltratados debido a la siembra individual en maceta, por lo que para los siguientes ensayos sólo se utilizaron ápices y laterales de tallo como explante. Los segmentos utilizados medían alrededor de 1 cm. Los explantes se mantuvieron en inducción 4 meses sin subcultivos, después de ese tiempo se sembraron en medio sin RCV.

**Tabla 11.** Combinaciones de RCV empleados para explantes de ápice y laterales, sembrados en medio líquido con puentes de papel.

BA o KIN mg/L \ ANA mg/L	0	1	2	3
0	1	2	3	4
0.1	5	6	7	8
0.5	9	10	11	12
1	13	14	15	16

### **Formación de nuevos brotes en medio líquido**

Los brotes obtenidos a partir de explantes laterales de tallo con un tamaño aproximado de entre 0.5 cm y 1.5 cm, fueron separados y aquellos de mayor tamaño fueron nuevamente disectados en ápice y base. Se sembraron en medio MS 50% de sales inorgánicas con adición de PVP 4.0 g/L, sacarosa 30g/L con KIN 3.0 mg/L en puentes de papel con fotoperiodo 16h luz. Al término de 3 meses en inducción, los brotes se subcultivaron a medio libre de reguladores de crecimiento.

### **Proliferación de brotes en medio sólido**

Los ápices de brote (con o sin formación de raíz) se dejaron crecer (elongar) al menos 1 cm antes de ser divididos de nuevo en ápice y base. Para la inducción de brotes se tomaron como explantes las bases y ápices de los brotes disectados, éstos se colocaron en medio sólido complementado con PVP 4.0 g/L y 3.0 mg/L de BAP o KIN, se utilizó este regulador ya que promovió el mayor número de brotes a partir de los laterales de tallo. Se decidió además utilizar otra citocinina, la metatopolina, este fitoregulador ha sido reportado en escasas ocasiones por ejemplo para *Browningia candelaris* (Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch, 2007). El tiempo de inducción en todos los explantes fue de dos meses.

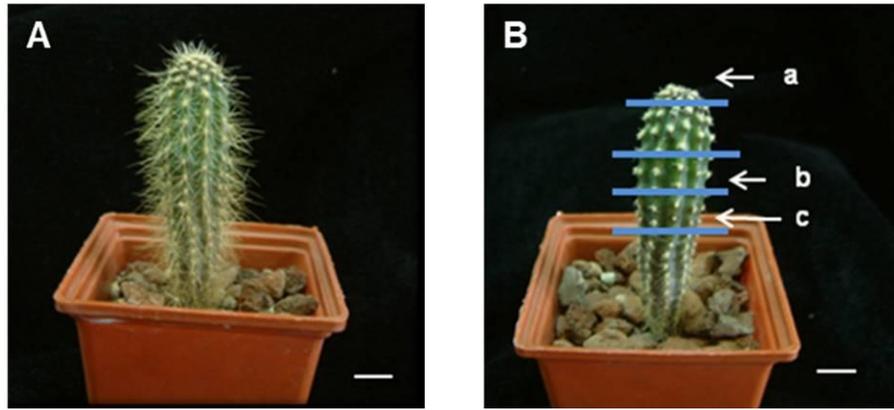
### **Individualización, enraizamiento de brotes y aclimatización de plántulas regeneradas *in vitro* de *B. militaris*.**

Para la individualización de los brotes solo se seleccionaron aquellos que fueran mayores a 0.5 cm de longitud, los cuales se separaron del explante original mediante un corte. Para su posterior enraizamiento se sembraron en un medio MS 50%, bajo dos condiciones: a) Medio adicionado con carbón activado (0.5 g/L) y agar bacteriológico Bioxon como gelificante (9.0 g/L) y b) Medio líquido con puentes de papel filtro, ambos sin RCV. Se evaluó el porcentaje de enraizamiento a los 30 días después de individualizados los brotes.

Para el establecimiento *ex vitro* de *B. militaris*, se seleccionó solo un brote de aspecto normal y vigoroso de 3 cm de longitud y 1 cm de ancho en la base, con raíces bien desarrolladas mayores a 1 cm de longitud, del tratamiento con carbón activado. Se sacó del frasco y se lavaron las raíces con agua destilada para eliminar los restos de agar, se dejó por 24h sobre una pieza de papel y posteriormente se plantó en una maceta. La mezcla de sustrato consistió de tepojal /tierra negra/ tezontle/ sphagnum/ agrolita, en proporción 4:2:2:1:1 (Gracidas com. per), el cual se humedeció y esterilizó en autoclave a 120 °C a presión de 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> durante 20 minutos. Para mantener las condiciones de humedad relativa alta, la maceta se cubrió con un domo de plástico durante un mes, con riego 2 veces por semana. Después de un mes se retiró el domo y el riego se realizó una vez por semana. La sobrevivencia se evaluó a un año de aclimatizado el brote.

### **Análisis anatómico**

El objetivo de este estudio fue tratar de explicar, con apoyo de un análisis anatómico la diferencia en la respuesta de cada zona del tallo (parte apical y basal) sometida a distintos y diferentes concentraciones de RCV, para lo cual se seleccionó una de las plántulas donadas de 7 cm de altura, crecida en condiciones de invernadero durante 2 años 5 meses aproximadamente a la cual se le recortaron las espinas para que el fijador penetrara con mayor facilidad al tallo (Fig. 8). La parte apical seccionada fue de 1 cm al igual que las dos secciones de la parte basal. Se realizaron cortes longitudinales en el ápice y en la base cortes longitudinales y transversales.



**Figura 8.** Plántula de *Backebergia militaris* utilizada para el análisis anatómico. **A)** Plántula con espinas. **B)** Plántula con espinas recortadas, a) sección apical; b) y c) Secciones basales para cortes longitudinales y transversales. Barra inferior=1 cm.

### Procesamiento histológico

Dado que las cactáceas poseen mucílago en mayor proporción a la de otras especies lo cual dificultaría la penetración del fijador, los explantes utilizados se sumergieron en agua y se dejaron hervir por 2 horas de acuerdo a lo sugerido por Sandoval (com. per). De inmediato se colocaron en fijador Navashin mezcla 1:1 de la solución A:B (Apéndice III) durante 48 h. Concluido el tiempo, se enjuagaron con abundante agua y se procedió a la deshidratación del material vegetal, para lo cual se utilizó el método de alcohol butílico terciario (ABT) (Sandoval *et al.*, 2005). Al finalizar el tercer cambio de ABT puro, el material vegetal se colocó en una estufa a una temperatura histológica (58-60 °C). Se marcó el volumen inicial del ABT y se le agregó paulatinamente parafina, ésta debía aumentar el volumen de ABT al doble. En este caso tardó dos días en aumentar el volumen sin embargo, no se logró llegar al doble al añadir parafina cada media hora. Al concluir la infiltración gradual se sustituyó la mezcla de parafina-ABT por parafina pura fundida previamente. Se mantuvieron en parafina pura durante 24h y se elaboraron bloques de 1 cm<sup>3</sup>.

Los cortes se realizaron en micrótopo de rotación, donde se obtuvieron secciones de 12 µm de grosor; éstos se colocaron en baño de flotación a 25-30 °C, posteriormente se montaron sobre un portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24h.

Para la desparafinación y rehidratación de los tejidos, las secciones se colocaron en una canastilla y se introdujeron a la estufa a 60°C durante 1 hora. En seguida, se colocó la canastilla en una serie de alcoholes graduales: xileno puro, xileno-alcohol 1:1, etanol absoluto, alcohol 96%, 70%, 50% y 30% durante 20 min cada uno. Para la tinción se sumergieron en safranina durante 24h. Transcurridas estas horas, se lavó la safranina con agua corriente dando de 2 a 3 enjuagues, dejándose secar por completo.

Secas las muestras, se sometieron a un tren de deshidratación con alcoholes graduales 30%, 50%, 70% y 96%, por un tiempo de 3 min cada uno. Se colocaron en verde rápido por 15 minutos, y se retiró el exceso con alcohol absoluto. En seguida se colocaron en aceite de clavo por 10 minutos y al final se situaron en citrosol v por 10 minutos.

Las preparaciones se montaron utilizando resina sintética y se dejaron secar en horno (60 °C) por un periodo de 15 a 20 días.

Una vez seca la resina, las laminillas se limpiaron con ayuda de una navaja y alcohol 30%, sobre un algodón. Concluyendo la limpieza, las laminillas se etiquetaron con los siguientes datos: nombre de la especie, familia, estructura, tipo de corte, tipo de tinción, nombre del procesador y fecha de elaboración. Las laminillas se observaron y fotografiaron en un fotomicroscopio Carl-Zeiss-Axioskop.

Además del análisis anatómico de una plántula proveniente de invernadero, se realizaron cortes longitudinales y observaciones de brotes regenerados *in vitro* para conocer su naturaleza y vía de formación. Los brotes de 5 meses de cultivo y con un tamaño aproximado de 4mm (Fig. 23A) se sometieron al procesamiento histológico descrito anteriormente.

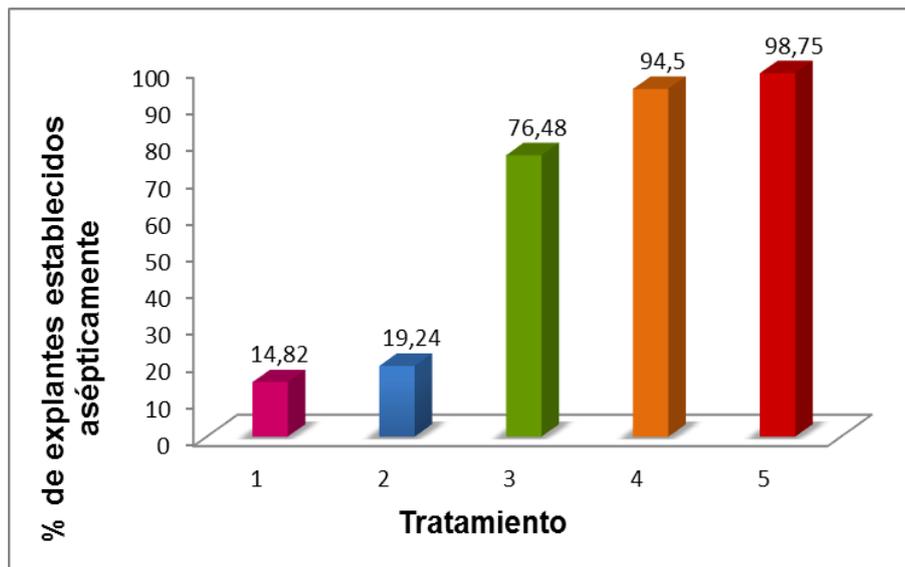
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Desinfección de semillas

Las semillas de *B. militaris* que inicialmente fueron sembradas en suelo y no germinaron, posteriormente fueron desinfectadas para su establecimiento *in vitro*, estas semillas presentaron alto porcentaje de contaminación (85.18) por microorganismos patógenos después de 7 días de iniciado el cultivo. Esto se pudo deber a que las semillas habían sido almacenadas por varios años sin los cuidados necesarios para prevenir la infección por patógenos, sumado a ello el periodo de dos meses que permanecieron en suelo pudo favorecer o incrementar la infección por los microorganismos.

Debido a lo anterior fue necesario retirar la testa y aplicar diferentes métodos de desinfección directa al embrión expuesto siendo el tratamiento 5 (Tabla 8) el que registró 98.75% de explantes establecidos asépticamente (Gráfica 1) al emplear el antibiótico ciprofloxacina 500 mg/500 ml por 30 minutos y el fungicida benomilo (carbamasa de metil-N-butilcarbamil-benzimidazol) 1.5 g/L durante 1h.

Retirar la testa para reducir la superficie de desinfección y evitar los patógenos que puedan estar presentes en esta no es una práctica muy común en cactáceas, una razón por la cual no se lleva a cabo con frecuencia este procedimiento es el tamaño pequeño de las semillas de algunas especies por ejemplo *Mammillaria theresae* Cutak y *M. bombycina* Quehl con tamaño de 0.5 mm y 1 mm respectivamente (Ronquillo-Vázquez; Yáñez-Martínez, 2011). Sin embargo existen investigaciones como en *Lemaireocereus hollianus* (Velázquez, 2011) donde el embrión fue aislado de la semilla, no obstante se observó que la contaminación continuaba presente en este.



Gráfica 1. Porcentaje de explantes de *Backebergia militaris* establecidos asepticamente empleando distintos tratamientos de desinfección.

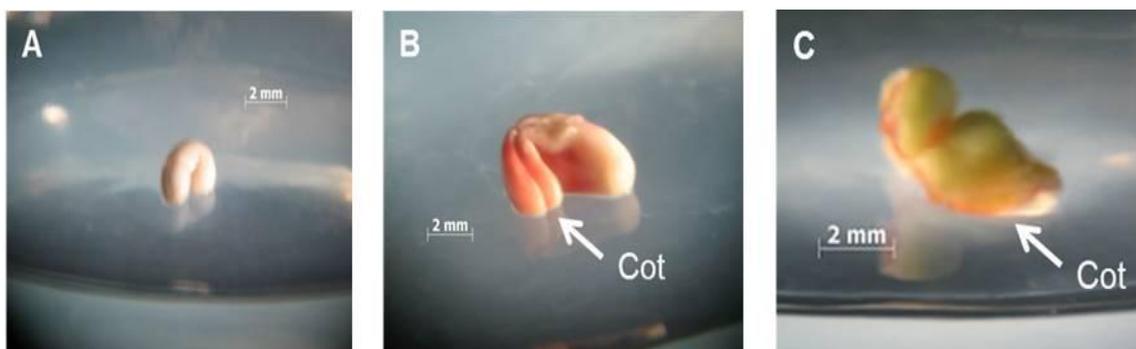
El cultivo de embriones implica el aislamiento de un embrión y su germinación *in vitro*, con el fin de obtener una planta viable. Esta técnica se lleva a cabo principalmente para inducir la germinación de semillas maduras en letargo, superando las restricciones ocasionadas por la cubierta de la semilla o del endospermo (Sánchez-Olate *et al.*, 2004). En este caso el aislamiento de los embriones se llevó a cabo principalmente para reducir la contaminación presente en la superficie de las semillas. Aunque la desinfección resultó exitosa para reducir la contaminación y no resultó ser letal como en el caso de *Abies religiosa* (Álvarez-Moctezuma *et al.*, 2008) donde la siembra de embriones aislados ocasionó el necrosamiento de los explantes; se presentaron desventajas en el desarrollo de los embriones ya que no hubo crecimiento del tallo, solo el desenvolvimiento de los cotiledones.

Para otras especies columnares como *Myrtillocactus geometrizans* (Gómez-Juárez *et al.*, 2006), *Pilosocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009), *Carnegiea gigantea* (Mier-Romero *et al.*, 2010) y *Browningia candelaris* (Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch, 2007) no fue necesario el retiro de la testa para el establecimiento aséptico de las semillas empleando diferentes agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio, etanol y captán, por mencionar algunos. En *Pilosocereus robinii* se obtuvo un 100% de semillas libres de contaminantes, mientras que en *Carnegiea gigantea*, *Browningia candelaris* no se menciona el porcentaje de

contaminación obtenido al emplear como agentes desinfectantes etanol al 70% e hipoclorito de sodio. Tampoco se mencionan las condiciones de almacenamiento de las semillas lo que puede ser un factor importante para reducir o evitar la contaminación.

### Germinación *in vitro*

Los embriones aislados inicialmente presentaron una coloración blanca (Fig. 9A), y con el paso de los días se tornaban de color rojizo (Fig. 9B). El criterio de germinación en este caso fue el estado donde los embriones se tornaron a una coloración verde y con desarrollo (desenvolvimiento) de los cotiledones (Fig. 9C). Ésta inició a los 7 días registrándose 66% de embriones germinados y a los 15 días se alcanzó un 75% de embriones germinados (9 de 12 embriones sembrados).



**Figura 9.** Germinación *in vitro* de embriones aislados de semillas de *B. militaris*, sembrados en medio sólido MS 50% adicionado con giberelinas A<sub>4</sub> + A<sub>7</sub> 3.0 mg/L. **A)** Embrión aislado, resultados a los 6 días de iniciados los cultivos. **B)** Alargamiento del embrión con coloración rojiza, resultados a los 8 días después de la siembra y **C)** Embrión germinado con coloración verde y cotiledones desarrollados, resultados a los 10 días de iniciados los cultivos. Cot= cotiledones.

Condiciones similares de germinación fueron ensayadas en *Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* (Eng.) *Shumann* (Medel-Narváez *et al.*, 2001) donde a partir del segundo día se presentó la germinación y alcanzó un 94% para el día 21 al eliminar por completo la testa, propiciando un proceso de escarificación a la semilla.

Aun cuando las condiciones de siembra fueron diferentes para otras especies de cactáceas como en *Myrtillocactus geometrizans* (Gómez-Juárez *et al.*, 2006) donde no se retiró la testa de la semilla, se observó la germinación a los 7 días de

incubación; de la misma manera fue reportado para *Carnegiea gigantea* (Mier-Romero *et al.*, 2010) cuya germinación comenzó a los 7 días con 4% de las semillas germinadas.

Para *B. militaris* no se observaron diferencias respecto a las condiciones de siembra en fotoperiodo y oscuridad. De la Barrera y Nobel (2003) señalan que no es requerida la luz para promover la germinación en algunas cactáceas columnares (*Oreocereus trolii*). Sin embargo, es evidente la falta de estudios con este grupo de cactáceas pues en varios géneros se reportaron respuestas fotoblásticas positivas y aún la insensibilidad a la luz dentro del mismo género (*Stenocereus*). Al igual que lo reportado por Rojas-Aréchiga *et al.* (1997), para la germinación de tres especies columnares donde presentaron una respuesta indiferente a la luz, mientras que 4 especies globosas fueron fotoblásticas positivas, es decir que requirieron la presencia de luz para germinar y en ausencia de ésta no germinaron.

En la presente investigación, debido al poco material disponible se sembraron los embriones en medio adicionado con giberelinas para garantizar la germinación, ya que estas sustancias regulan la germinación y la movilización de reservas. La adición de giberelinas al medio promovió la germinación de 75% de los embriones al término de 2 meses. Tomando en cuenta que las semillas provenían de frutos maduros con más de 10 años de almacenamiento.

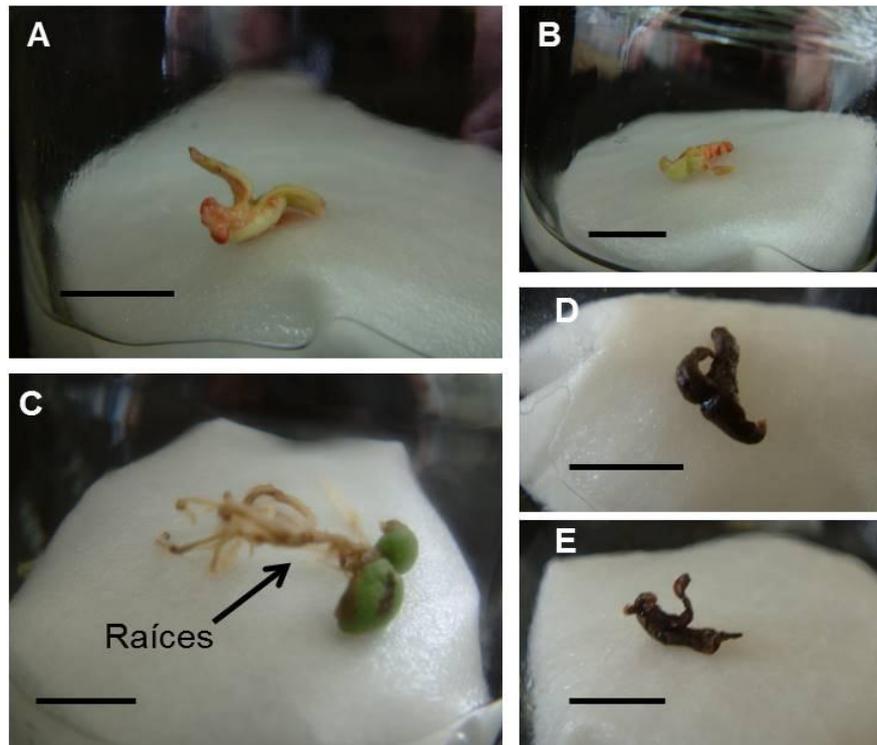
Este porcentaje es parecido al de otras especies columnares donde la adición de giberelinas al medio en *Myrtillocactus geometrizans* (Gómez-Juárez *et al.*, 2006) también favoreció la germinación, fue mayor con una alta concentración de ácido giberélico (7.5mg/L) con una germinación del 87%. Retes-Pruneda *et al.* (2007) reportaron una germinación del 98% de *Polaskia chichipe* sin adición de ninguna giberelina. De igual forma fue lo reportado para *Browningia candelaris* (Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch, 2007) donde la germinación fue de 84% en medio MS sin giberelinas. Sin embargo no se menciona la edad de las semillas o el tiempo de almacenamiento antes de ser inoculadas.

La germinación en fotoperiodo 16h, de otra especie columnar, *Escontria chiotilla*, fue de 93.7% de 600 semillas recién colectadas, inició a los 13 días y la última semilla en germinar lo hizo a las 6 semanas; de semillas con 4 años de almacenamiento, sólo germinó el 35% (3-6 semanas) (Velázquez, 2011).

Al término de 6 meses de la germinación de los embriones y a pesar de que algunos desarrollaron raíces (Fig. 10C), no se observó desarrollo ni crecimiento del tallo. El desarrollo anormal de los embriones pudo deberse al enérgico tratamiento de desinfección después de retirar la testa, en otros trabajos también se atribuye la baja germinación al empleo enérgico de agentes desinfectantes o a la dormancia de los embriones (Santos-Díaz *et al.*, 2003; Ronquillo-Vázquez, 2009). Algo similar fue reportado para *Cephalocereus apicicephalium* (Saucedo-Gutiérrez, 2006) en donde 700 semillas fueron sembradas y solo germinaron 36, en el cual emergió el ápice de la radícula, sin embargo, solo 5 se desarrollaron en una plántula bien diferenciada, el resto presentó una inhibición en su desarrollo y las plántulas no se diferenciaron en sus diferentes estructuras, sino que resultaron en la formación de callo.

Debido a que los embriones que germinaron no presentaron mayor desarrollo estos se subcultivaron a medio líquido adicionado con TDZ (Tidiazurón) 3.0 mg/L. La aplicación de TDZ induce una gran cantidad de respuestas desde la inducción de callo hasta la formación de embriones somáticos, tiene la propiedad única de imitar efectos tanto de auxinas como de citocininas sobre el crecimiento y la diferenciación de explantes cultivados *in vitro* (Murthy *et al.*, 1998).

Tras un mes de incubación en medio con TDZ todos los embriones presentaron oxidación severa que resultó letal (Fig. 10 D y E), lo cual llevó a la pérdida de todo el material de semillas. A diferencia de *Selenicereus megalanthus* (Pelah *et al.*, 2002) en donde la adición de TDZ (44.0 mg/L) al medio, utilizando la parte distal y proximal de los cotiledones promovió el desarrollo de brotes. Mientras que en explantes de epicótilos de *Escobaria minima* (Baird) D. Hunt, *Mammillaria pectinifera* (Ruempler) F.A.C. Weber y *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg la adición de TDZ en concentraciones de 0.05 y 0.5 mg/L promovió la formación de brotes axilares, sin embargo estos presentaron hiperhidratación (Giusti *et al.*, 2002).



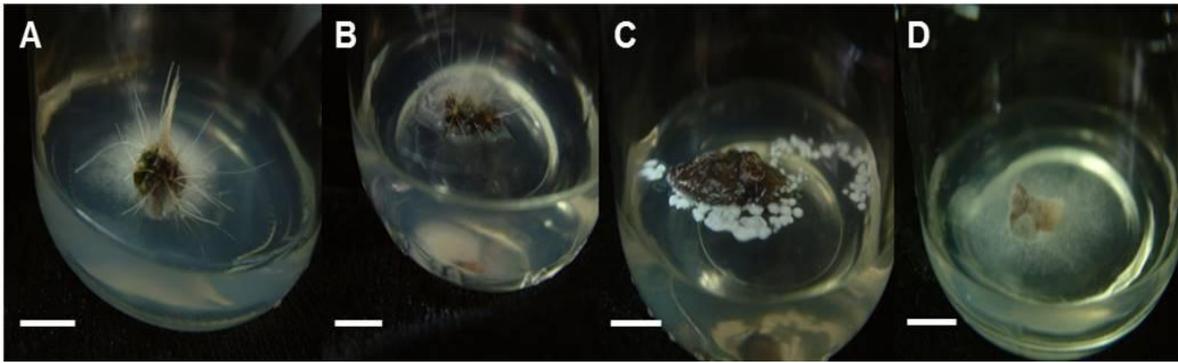
**Figura 10.** Embriones de *B. militaris* establecidos asépticamente sembrados en medio líquido con TDZ 3.0 mg/L. **A) y B)** Embriones germinados con coloración verde de cotiledones. **C)** Embrión con desarrollo de raíces. **D) y E)** Embriones con oxidación letal al término de 1 mes en inducción con TDZ. Barra=5 mm.

Es posible que la oxidación se presentara debido al cambio en las condiciones del medio, es decir se utilizó medio líquido con puentes de papel, con adición de citocininas (TDZ), lo que pudo provocar un estrés en el tejido que se manifestó con la oxidación de los embriones. A diferencia de los trabajos mencionados anteriormente donde el medio utilizado fue medio MS sólido.

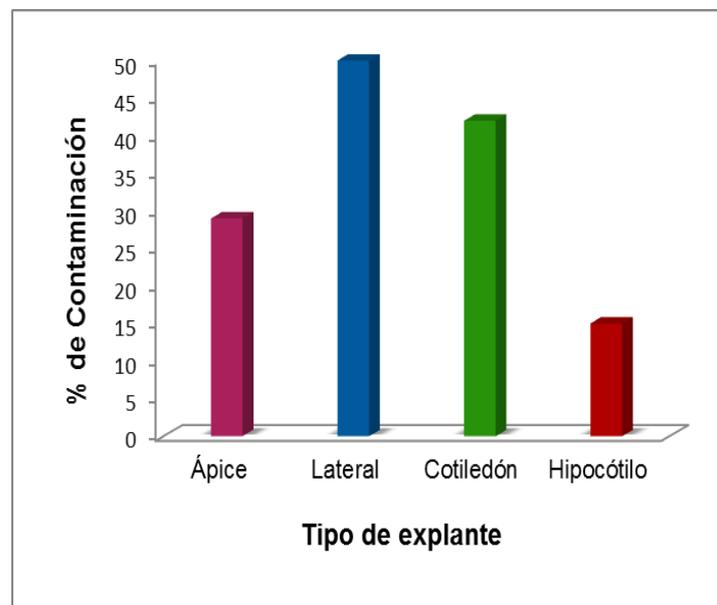
### **Desinfección de plántulas**

#### **Contaminación**

Después de una semana de establecidos los explantes, estos presentaron baja contaminación excepto los ápices; sin embargo después de la tercer semana se presentó contaminación fúngica que envolvía con un micelio de color blanco al explante (Fig. 11). Después de un mes, todos los explantes presentaron contaminación (Gráfica 2) y oxidación por lo que se perdieron en su totalidad; en hipocótilo y ápice este proceso fue más lento, sin embargo de igual forma perecieron.



**Figura 11.** Explantes de *B. militaris* contaminados. **A) y B)** Explantes apical y lateral respectivamente con presencia de micelio blanco. **C)** Explante de cotiledón y **D)** Hipocótilo con abundante micelio. Barra=1 cm.



**Gráfica 2.** Porcentaje de contaminación de explantes de tallo de *B. militaris*. Resultados al término de 1 mes de iniciados los cultivos.

La contaminación se redujo debido al empleo en conjunto de 2 agentes: el fungicida y el antibiótico. Es probable que los fungicidas sistémicos como el Benomil, puedan matar a los hongos que se han presentado de manera persistente y a distintos tiempos de los cultivos. Se debe hacer la observación respecto a que si bien puede resultar efectivo como fungicida, llega a ser fitotóxico, ocasionando un retraso en el crecimiento y daños a las plántulas, además de que disminuye la fotosíntesis (García *et al.*, 2003; rap-al.org). En la presente investigación, el enjuague de las plántulas y embriones después de utilizar el fungicida fue necesario ya que al no realizarlo, los tejidos comenzaron a necrosarse llegando a ser letal.

Debido a la contaminación excesiva en algunos explantes, se han incorporado fungicidas y bactericidas al medio de cultivo. Por lo general estas incorporaciones no han sido muy útiles debido a que llegan a ser muy tóxicas para el explante y los contaminantes pueden reaparecer tan pronto como los fungicidas o bactericidas sean removidos. Varios antibióticos han demostrado no ser tóxicos para el explante, y al mismo tiempo, controlan o eliminan la contaminación causada por bacterias, los utilizados con mayor frecuencia son timentina, carbenicilina (500 mg/L), cefotaxima (300 µg/L) y augmentin (250 mg/L) (Smith, 2000). En el caso de *B. militaris* se intentó incorporar antibiótico al medio (ciprofloxacino o cefotaxima), sin embargo provocaron una oxidación que resultó letal para los explantes.

Debido a la contaminación tan alta fue necesario emplear otros métodos de desinfección (Tabla 9) para ello se emplearon mayores concentraciones y otros desinfectantes (fungicidas Captán y benomil (2g/L) y antibiótico ciprofloxacina 500 mg/500 ml) por lo cual de la misma manera fue necesario incrementar la concentración del adsorbente (PVP 4.0 g/L) en el medio y antioxidantes (solución de ácido cítrico y ácido ascórbico 300 mg/L c/u) en los enjuagues posteriores a la solución de hipoclorito de sodio.

El tratamiento de desinfección con menor porcentaje de contaminación fue el 9 con sólo 1%, mientras que en los demás tratamientos, la contaminación fue mayor al 30%, y aunque se trataron de desinfectar de nuevo, los explantes se contaminaban otra vez y además se oxidaban debido a los agentes desinfectantes utilizados. El tratamiento número 9 consistió en cortar las espinas, sin retirarlas totalmente ya que en ocasiones anteriores se observó que al retirar de manera completa las espinas el tallo se oxidaba con mayor velocidad y al término de la desinfección estaba oscurecido en gran medida en la zona sin espinas.

Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) mencionan que los explantes de plantas provenientes de invernadero presentaron altos porcentajes de contaminación de 30 al 60% de los cultivos por lo que mencionó que es mejor utilizar plantas germinadas *in vitro*, sin embargo esto no es siempre posible ya que algunas especies no producen semillas en grandes cantidades o son difíciles de obtener.

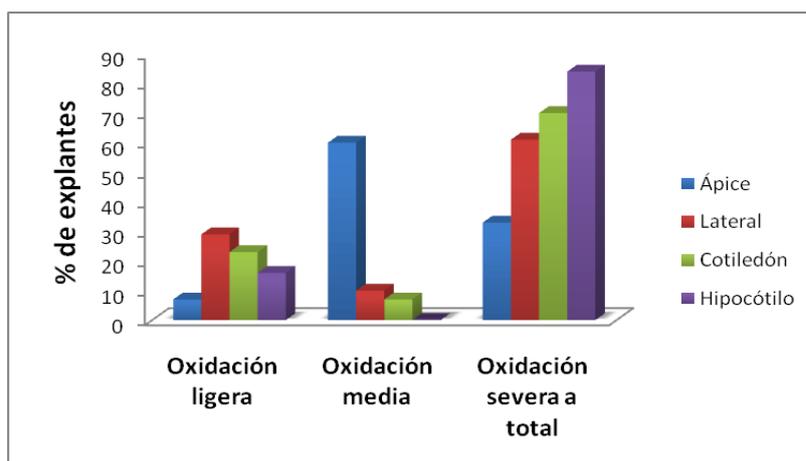
Para *Lemaireocereus hollianus* (Velázquez, 2011) sólo el 2% del material vegetal logró superar el problema de contaminación y oxidación. A pesar de la combinación de tratamientos de desinfección con fungicidas e hipoclorito de sodio, Ramírez- Malagón *et al.* (2007), reportaron que el 80% de los explantes fallaron en el establecimiento *in vitro* debido a la oxidación, contaminación y/o necrosis y en promedio sólo el 20% de los explantes de las diez especies del género *Mammillaria* fueron establecidos con éxito *in vitro*.

Lara en 2010, utilizó como material vegetal inicial tallos jóvenes de *Aporocactus flagelliformis*, presentando contaminación del 13% y 11% de oxidación al término de 60 días. Ronquillo-Vázquez (2009), reportó contaminación de solo 2.3% tras la desinfección de un ejemplar de *Mammillaria theresae* proveniente de invernadero atribuyendo la baja contaminación a que la especie presenta poca ornamentación, no presenta lana, tricomas y las espinas se eliminaron antes de la desinfección.

### **Oxidación**

Se registró un bajo porcentaje de oxidación de los explantes durante la primera semana de incubación, sin embargo a medida que transcurrió el tiempo, el porcentaje de oxidación incrementó en mayor medida en hipocótilos hasta que todos los explantes de ese tipo presentaron oxidación severa, por el contrario el explante que menor oxidación presentó durante el primer mes de cultivo fue el ápice, seguido del lateral y por último el cotiledón (Gráfica 3). Los explantes sembrados se mantuvieron siempre en oscuridad, ya que las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja (Sánchez-Cuevas y Salaverría, 2004).

El bajo porcentaje de oxidación y contaminación en los explantes apicales puede estar asociado a la presencia de estructuras que cubren la parte apical del ápice, evitando así el daño provocado por los agentes desinfectantes. Las espinas son más abundantes en esta zona (Fig. 12A).

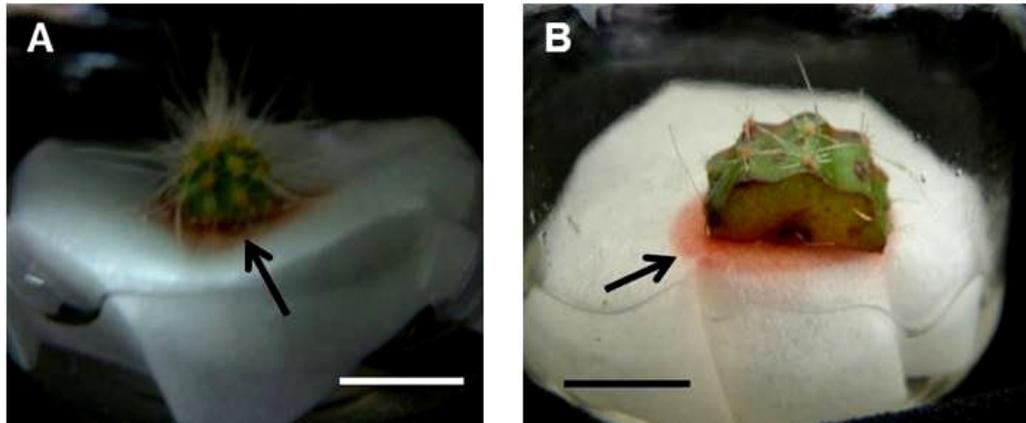


**Gráfica 3. Porcentaje de oxidación de los explantes de tallo de *B. militaris* utilizando diferentes métodos de desinfección. Resultados al término de 1 mes de iniciados los cultivos.**

Después de observar oxidación severa (mayor al 50%) en la mayoría de los explantes dentro del primer mes de cultivo en medio sólido, se decidió desinfectar y sembrar nuevos explantes en medio líquido adicionado con PVP en diferentes concentraciones con puentes de papel filtro, la adición de PVP controla parcialmente la oxidación de acuerdo a lo reportado por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998). Saucedo-Gutiérrez (2006) reportó que el uso de 1g/L de PVP controló de manera significativa la oxidación de *Cephalocereus apicicephalium* y cuando esta estuvo presente no fue letal al explante. Adicionalmente Ortiz y Alcántara (1997), mencionan que la presencia del agar en los medios de cultivo de cactáceas tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de las areolas, debido posiblemente a que la presencia de este soporte dificulta el intercambio de agua y nutrientes. La utilización de los puentes de papel sobre medio líquido redujo la oxidación de los explantes principalmente de ápices y laterales al difundir las sustancias emitidas por los explantes al medio líquido, evitando acumulación de estas sustancias lo que habría ocurrido en un medio sólido.

La fuerte oxidación en explantes de *B. militaris* se puede deber a que presenta 7 tipos de alcaloides: backebergina, dehidroheliamina, 3,4-dimetoxi PEA, lemaireocereina, N, N-dimetil-3,4-dimetoxi PEA, heliamina y N-metil-3,4-dimetoxi PEA. Observaciones han demostrado que los tallos frescos de 5 especies de *Pachycereus* y *Backebergia* se tornan de color rojo y se oscurecen rápidamente cuando son cortados (Gibson *et al.*, 1986). Este fenómeno se pudo observar al colocar los explantes en medio líquido con puentes de papel filtro, donde los

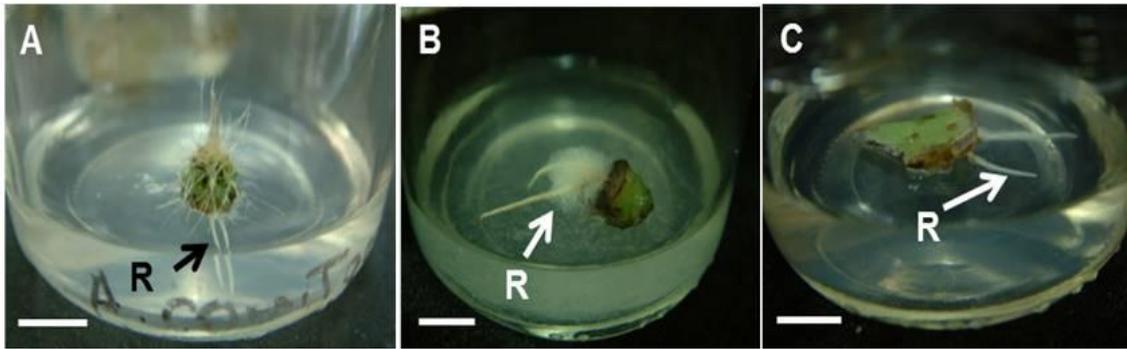
explantes producían una sustancia que teñía el papel de color rojizo (Fig. 12). Solo los explantes apicales y laterales presentaban este tipo de respuesta, tanto cotiledones e hipocótilos no emitían sustancias al medio que tiñeran el papel filtro.



**Figura 12.** Explantes de tallo no oxidados secretando una sustancia al medio (flecha). **A)** Explante de ápice. **B)** Explante lateral. Barra=1 cm.

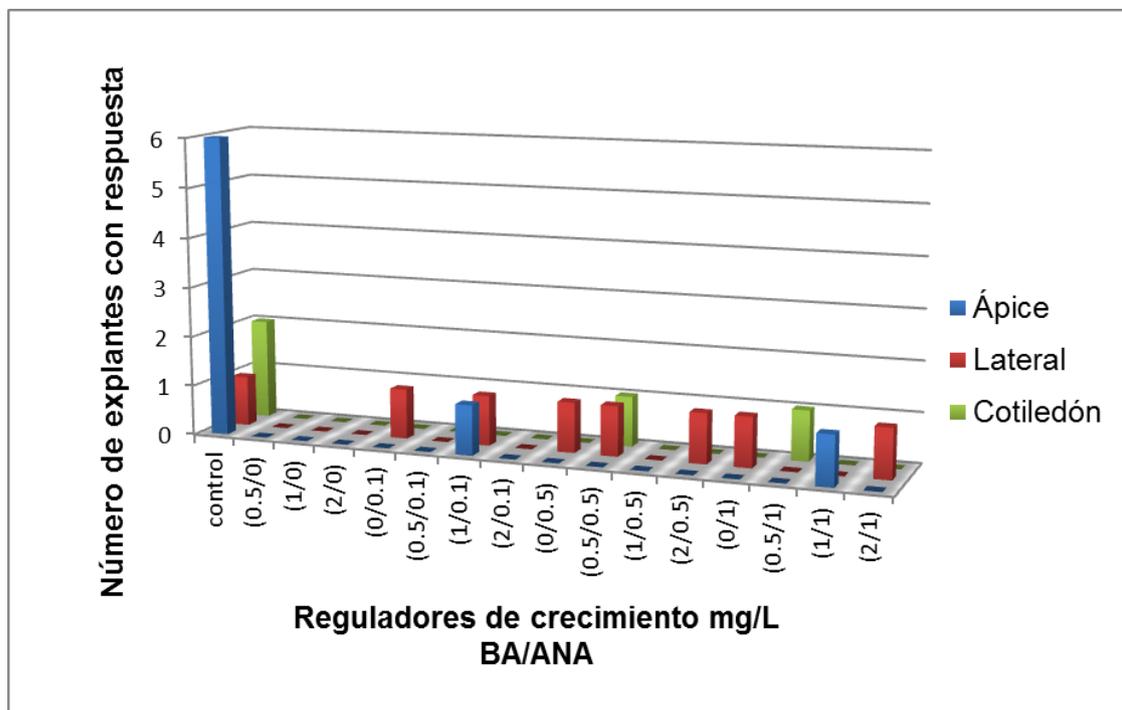
### Respuesta morfogénica en medio sólido

Después de 7 días de iniciado el cultivo se observó organogénesis directa en un explante lateral con formación de raíces, esta misma respuesta se presentó en todos los explantes exceptuando el hipocótilo el cual no diferenció ninguna estructura (Fig. 13). Lo contrario de lo reportado por Aparecida de Oliveira *et al.* (1995) donde fragmentos de hipocótilos de plántulas germinadas *in vitro* de 8 semanas de edad de *Cereus peruvianus* generaron callo en diferentes concentraciones de 2,4-D y kinetina. De la misma manera Shishkova *et al.* (2006) reportaron para *Stenocereus gummosus* (Engelm.) Gibson & Horak y *Ferocactus peninsulæ* (F.A.C.Weber) Britton & Rose, la formación de callo a partir de explantes de hipocótilos provenientes de plántulas de 14 días en diferentes combinaciones de ANA/BA mg/L (1.0 y 5.0/ 0.2, 1.0 y 5.0). En el presente trabajo los explantes de hipocótilo tenían más de 3 meses de edad lo que pudo ser un factor importante para la nula respuesta, además en este caso la poca respuesta de este tipo de explante pudo ser debida a la alta oxidación que presentaron después de ser desinfectados.



**Figura 13.** Organogénesis directa en explantes establecidos asépticamente. **A)** Ápice con formación de dos raíces. **B)** Lateral con formación de 2 raíces con tricomas y **C)** Cotiledón con formación de raíces en la zona de corte. R. Raíz. Barra=1 cm.

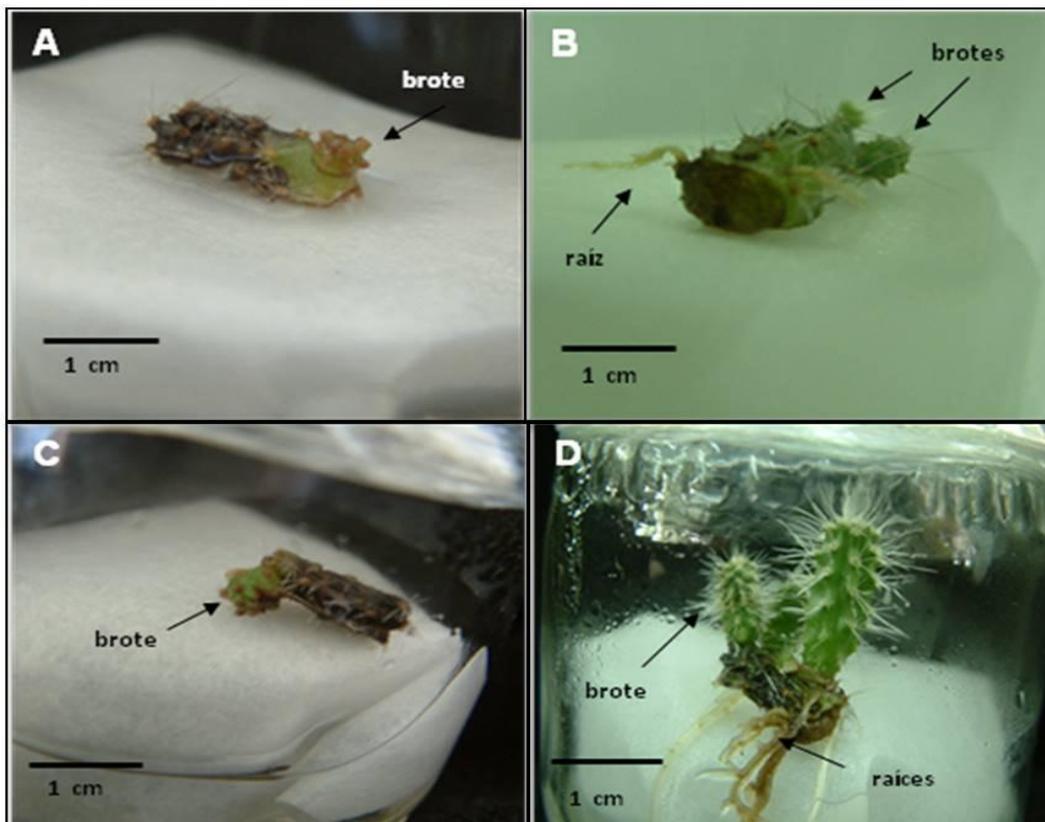
Los ápices fueron los explantes que desarrollaron raíces en mayor cantidad y frecuencia hacia la zona de corte. Ninguno de los explantes presentó cambios evidentes en su morfología, como aumento de volumen o cambio de coloración. Se pudo observar además que el tratamiento con mayor número de explantes que formaron raíces fue el control (Gráfica 4), lo que nos puede indicar el fuerte compromiso de esta especie al regenerar la estructura faltante, es decir la raíz, para permitirle continuar como individuo y restablecer sus funciones (González-Caballero, 2008) sin la necesidad de adicionar algún RCV. No todos los tratamientos con RCV presentaron respuesta debido a la oxidación.



**Gráfica 4.** Explantes de tallo de *B. militaris* que presentaron respuesta morfogénica. Resultados al primer mes de iniciados los cultivos.

### Formación de brotes por activación de areolas en medio líquido

De los explantes cultivados (ápices y laterales de tallo), provenientes del método de desinfección 4 (Tabla 8), la formación de brotes sólo ocurrió en los laterales. La respuesta morfogénica se inició a partir de la activación de areolas, las cuales presentaron un hinchamiento al igual que lo reportado para *Lophophora williamsii* (Ortiz y Alcántara, 1997), *Cephalocereus senilis* (Choreño-Tapia *et al.*, 2002) y *Neobuxbaumia tetetzo* (Galván-Torres, 2005). Esta respuesta se presentó en el tratamiento 4 (3.0 mg/L BAP) después de 38 días de iniciados los cultivos (Fig. 14A), a los 41 días se observó la formación de un brote más a partir de la areola de otro explante lateral de tallo en medio de inducción con 3.0 mg/L KIN (Fig. 14B) en donde el medio utilizado fue MS 50% líquido adicionado con PVP 2.5 g/L. Al término de un año el explante lateral cuya inducción fue con BA (3.0 mg/L) no desarrolló más brotes debido a que el explante estaba oxidado casi en su totalidad, mientras que el explante lateral con inducción de 3.0 mg/L de KIN desarrolló en total 4 brotes.



**Figura 14.** Brotes obtenidos a partir de areolas de explantes laterales de tallo. **A)** Activación de una areola no oxidada (BAP 3.0 mg/L). **B)** Se puede observar que además de la formación de brotes, se presentó la formación de una raíz (KIN 3.0 mg/L). Resultados al término de 38-41 días de establecidos los cultivos. **C)** y **D)** Crecimiento y formación de nuevos brotes al término de un año de cultivo.

Es probable que los explantes apicales no formaran brotes debido a que se encontraban bajo la influencia de las auxinas. En el caso de daño al ápice del brote causado por el viento o por algún animal, el control de la dominancia apical parece funcionar como un mecanismo de sobrevivencia para la planta. La dominancia apical es el control ejercido por las porciones apicales del brote sobre las yemas laterales (Cline, 1991).

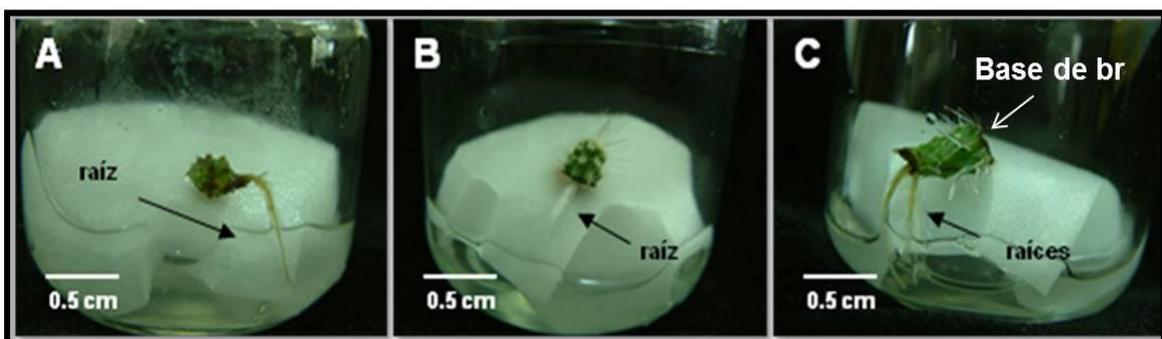
Resultados similares han sido reportados por Machado y Prioli (1996) donde se sembraron ápices y explantes laterales de tallo de *Cereus peruvianus*, siendo los laterales los únicos que regeneraron brotes a partir de la activación de areolas. Para *Escontria chiotilla* se utilizaron tres tipos de explantes basal, medio y apical, siendo las secciones medias las más regenerativas, donde los brotes se formaron a partir de la activación de areolas (Velázquez, 2011). Choreño-Tapia *et al.* (2002) reportaron que al fraccionar una plántula de *Cephalocereus senilis* la mayor proliferación de brotes se presentó en la parte media con 38 brotes en total, 52.7 % más que la parte basal, con 18 brotes y en la parte apical no se obtuvieron brotes, sólo se indujo crecimiento de callo. Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2002) utilizaron tres tipos de explantes: apicales, laterales (corte longitudinal de la plántula sin separación del ápice) y segmentos transversales (plántulas cortadas transversalmente sin el ápice), a partir de plántulas germinadas *in vitro* de 3 especies columnares *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* (Berger) Britt & Rose y *Stenocereus thurberi* (Engelm.) Buxb, obteniendo mayor número de brotes en los explantes transversales. Aun la diferencia de explantes, todos los brotes se formaron a partir de la activación de areolas.

Las plantas regeneradas *in vitro* a partir de yemas axilares son consideradas con frecuencia genéticamente estables. Esto es lo más deseable cuando se pretende conservar y propagar germoplasma de especies silvestres sin alterarlas genéticamente. Por el contrario se considera a las plántulas regeneradas a partir de cultivo de callo, genéticamente inestables ya que pueden presentar variación somaclonal (Machado y Prioli, 1996; De la Rosa-Carrillo *et al.*, 2012).

En la presente investigación, aunque se redujo la oxidación con el aumento de PVP (3.0 o 4.0 g/L) en el medio, no se logró la obtención de nuevos brotes al sembrar explantes apicales y laterales de tallo de otras plántulas provenientes de invernadero, posiblemente debido a que la poliamida PVP en concentraciones adecuadas logra tejidos libres de oxidación; pero incrementando dicha concentración, produce bajo número de regenerantes en los explantes (Gómez, 2007). De manera conjunta, es posible que la falta de respuesta en posteriores siembras se debiera al uso de otros desinfectantes (solución de benomil/captán), agrimicín o cuprimicín así como el aumento en la concentración de hipoclorito de sodio (de 15% a 30%), es importante mencionar que aunque la contaminación se redujo (a 1%) en el caso del tratamiento de desinfección 9, no hubo respuesta de formación de brotes, por lo que es necesario aplicar un criterio entre la obtención de mayor número de explantes libres de contaminantes contra la formación de brotes.

### Formación de nuevos brotes en medio líquido

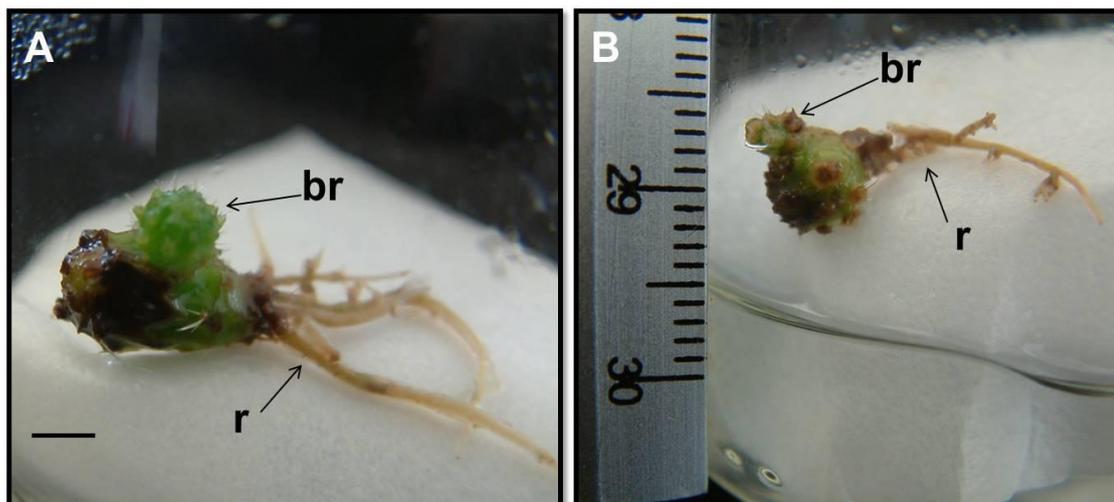
Tras la siembra de ápices y bases de brotes regenerados *in vitro*, las respuestas morfogénicas se presentaron a los diez días de inducción, en los ápices se observó desarrollo de múltiples raíces en la zona de corte; esta respuesta continuó durante un mes en todos los explantes (Fig. 15).



**Figura 15.** Enraizamiento de los brotes separados del explante original tras 10 días en inducción. **A)** Brote separado del explante lateral con BAP 3.0 mg/L sin corte. **B)** Ápice enraizado del brote más grande (1.5 cm) proveniente de un explante lateral (KIN 3.0 mg/L). **C)** Base del brote disectado.

Al término de dos meses de inducción, varios explantes ya habían formado nuevos brotes y se subcultivaron a medio sólido sin RCV, observándose el crecimiento y aún formación de nuevos brotes en algunos explantes (Fig. 16).

Bajo ningún tratamiento se observó la formación de callo, lo que podría indicar que las células mantuvieron su especialización aun con la adición de RCV.



**Figura 16.** Formación de brotes en medio líquido (KIN 3.0 mg/L). **A)** Brote formado a partir de una areola de un explante basal de brote. Barra inferior= 5 mm y **B)** Activación de una areola para la formación de un nuevo brote a partir de un brote separado proveniente del tratamiento con BA (3.0 mg/L).

### Proliferación de brotes en medio sólido

Se decidió sembrar ápices y bases de brote en medio sólido debido a que la respuesta de formación de brotes en medio líquido no se presentó antes de las ocho semanas de inducción, mientras que en medio sólido la respuesta a partir de la activación de areolas se presentó a las dos semanas de iniciados los cultivos.

Las tres citocininas ensayadas KIN, BA (3.0 mg/L) y metatopolina (mT) (0.5 mg/L) dieron resultados positivos en la regeneración de brotes (Tabla 12). Sin embargo para poder indicar cuál de ellas presenta mejores resultados es necesario realizar un mayor número de repeticiones.

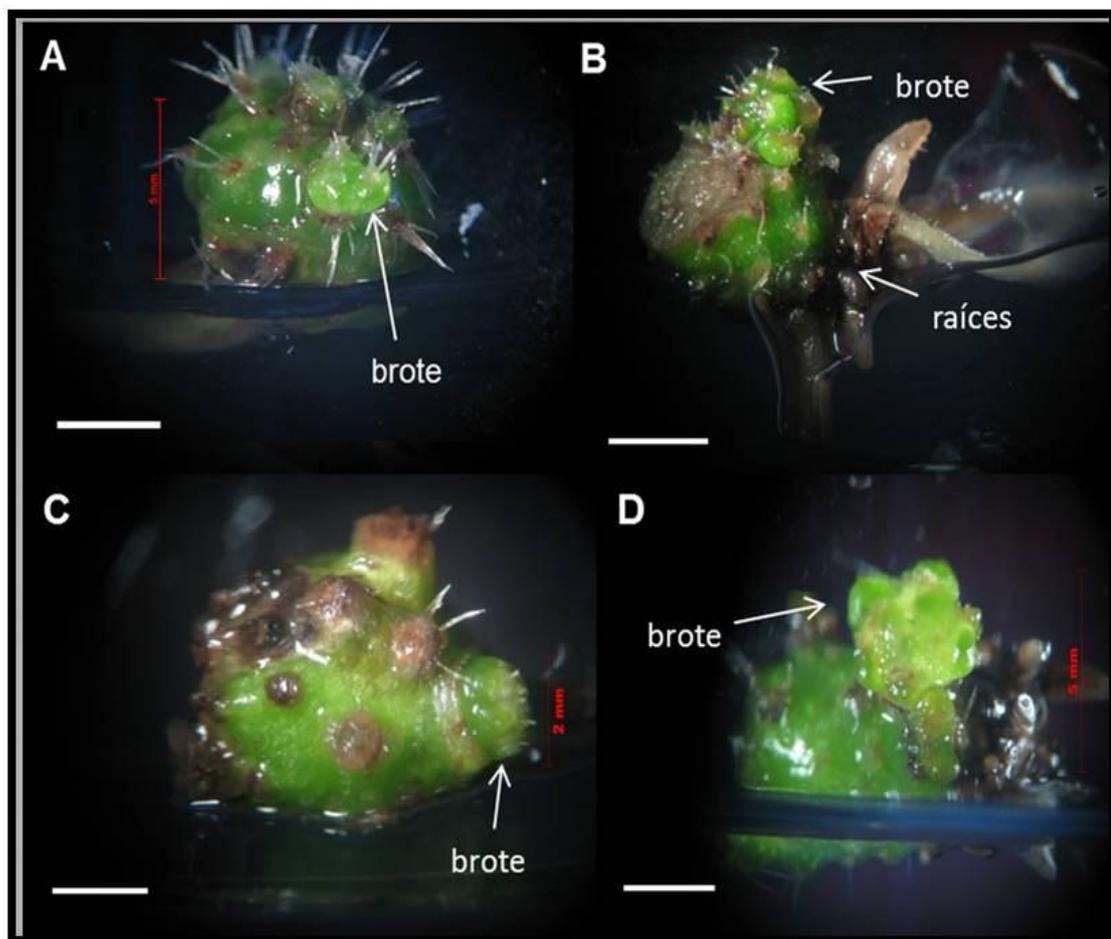
**Tabla 12.** Número de brotes obtenidos con las tres citocininas utilizadas.

Tratamiento (mg/L)	Número de explantes	Número de brotes	Brotes/explante $X \pm DS$
KIN (3)	5	22	4.4 $\pm$ 2.96
BA (3)	1	3	3
mT (0.5)	1	7	7

A partir de la activación de areolas tanto los explantes basales y apicales de brote (Fig. 17) generaron nuevos brotes, a diferencia de los explantes provenientes de

plántulas donde solo se generaron brotes en la parte lateral del tallo, lo que hace suponer que el nivel de auxinas endógena era bajo ya que no se observó dominancia apical.

Otro factor que pudiera explicar la diferencia en la respuesta es la edad del explante, ya que el ápice que regeneró brotes tenía solo 7 meses de iniciados los cultivos, mientras que los explantes apicales provenientes de plántulas de invernadero tenían más de 1 año de edad. Se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis, ya que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos y Thorpe, 1991).



**Figura 17.** Formación de brotes *in vitro* de *B. militaris* a partir de areolas (KIN 3.0 mg/L) en medio sólido. **A)** Formación de brotes a partir del explante de ápice, resultados al término de 7 meses de iniciados los cultivos. **B)** Brote formado a partir de una areola de la base, resultados al término de 7 meses de iniciados los cultivos. **C)** Resultados al término de 2 meses de iniciados los cultivos. **D)** Resultados al término de 3 meses de iniciados los cultivos. Los brotes se regeneraron a partir de las areolas, se observa también formación de raíces. Barra=2 mm.

Para *Coryphantha retusa* Britton & Rose (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010) la mayor proliferación de brotes a partir de explantes laterales se obtuvo con las concentraciones de 2.0 a 3.0 mg/L de 6-BAP y sin ANA generando de 6 a 10 brotes por explante. En *Echinocactus grusonii* Hildm. (Soto-Cortés, 2013) se obtuvo la formación de brotes en medio líquido y sólido a los 30 y 33 días respectivamente en medio de inducción MS+3.0 mg/L de 2iP obteniendo en promedio 3 y 1.8 brotes por explante, de manera similar en *Neobuxbaumia tetetzo* el regulador de crecimiento que generó más brotes fue 2iP (15 mg/L) obteniendo  $15 \pm 1.75$  brotes (Galván-Torres, 2005).

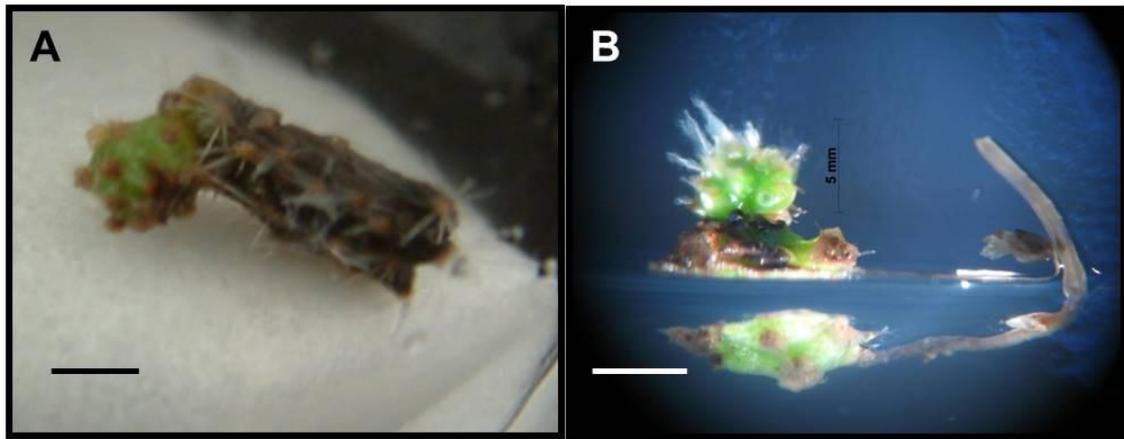
Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch (2007) reportaron que para la obtención de brotes de *Browningia candelaris* la mejor respuesta se obtuvo con BA (0.5 mg/L), donde se generó un promedio de 8.4 brotes por explante, sin embargo se obtuvieron resultados superiores con metatopolina (0.5 mg/L), donde se generó un promedio de 20.4 brotes por explante, un valor alto cuando se le compara con otros reportados para cactus. Un promedio similar de brotes generados por explante (22.4) se observó en *Mammillaria schiedeana* (Ehrenb.) con una combinación de BA/ANA (1.0/0.1 mg/L) después de 11 semanas de incubación (Soria-Campos *et al.*, 2013).

La generación de brotes de *Pilosocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2009) se inició a partir de las 4 semanas de iniciados los cultivos y se efectuó a partir de la activación de areolas. La concentración que dio el mayor número de brotes fue de 3.0 mg/L de 6-BAP (8.9 brotes por explante a las 21 semanas de cultivo), sin embargo recomiendan utilizar una concentración menor (1.5 mg/L) para evitar efectos adversos como hiperhidratación y variación somaclonal.

### **Formación de brotes anormales**

Durante la formación de brotes en medio líquido a partir de la activación de areolas en explantes laterales de tallo, se observó la formación de un brote anormal en el medio de inducción con 3.0 mg/L de BA (Fig. 18A), éste presentaba areolas de color marrón con pocas espinas o sin ellas, otra característica de este tipo de brote es que al término de un año de cultivo y a pesar de la separación del explante original y siembra en medio fresco, no presentó crecimiento, alcanzando

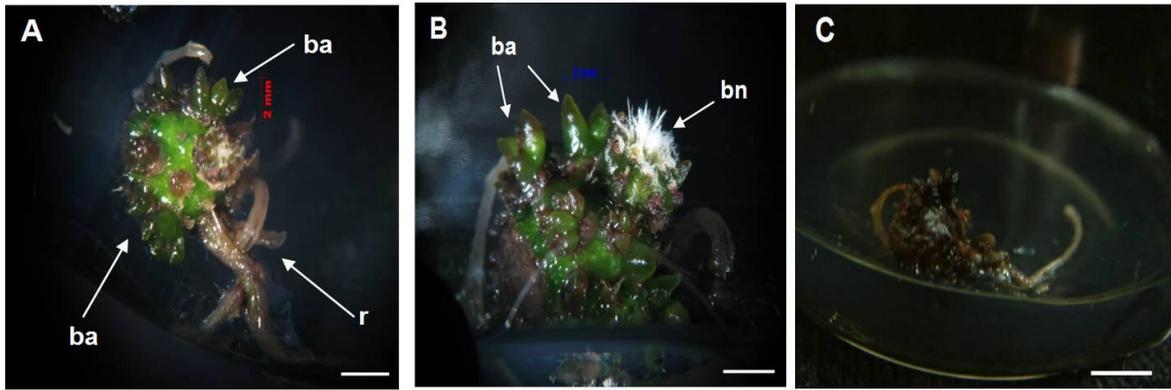
un tamaño máximo de 6mm. No obstante, este brote desarrolló nuevos brotes normales, que a diferencia de los primeros tenía abundantes espinas en las areolas, además de lana (Fig. 18B).



**Figura 18.** Formación de distintos tipos de brotes en explantes de *B. militaris*. **A)** Formación de un brote anormal a partir de una areola en un explante lateral de tallo en inducción con 3.0 mg/L BA. **B)** Brote con abundantes espinas y areolas color amarillo formado a partir de una areola de un brote. Barra=5mm.

El desarrollo de brotes anormales también se observó en la base de un brote el cual estuvo en medio de inducción con 3.0 mg/L de KIN durante dos meses y después fue subcultivado a medio sin RCV (Fig. 19A). Los brotes obtenidos tenían una textura lisa, es decir no presentaron espinas ni tricomas, tenían coloración verde oscuro con algunas zonas rojizas sobre todo en el ápice del brote, los tubérculos estaban separados y alargados. En ese mismo explante también se desarrolló un brote normal con presencia de espinas en la parte apical (Fig. 19B), el cual fue separado del explante al alcanzar una altura de 5mm. Tras casi dos meses de incubación y no obstante que se subcultivó a medio con PVP 4.0 g/L o carbón activado 0.5 g/L, el explante junto con los brotes anormales se oxidaron en su totalidad (Fig. 19C).

La presencia de este tipo de brotes diferentes se ha observado en otras especies regeneradas *in vitro* como *Pelecyphora aselliformis*, *Mammillaria pectinifera* (Giusti *et al.*, 2002), *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.) Britton & Rose (Zamora, 2007) y *Echinocactus grusonii* (Rodríguez, 2006; Soto-Cortés, 2013).



**Figura 19.** Formación de brotes anormales en un explante basal de brote. **A)** Brotes de aspecto distinto (anormal) (3.0 mg/L KIN). Barra=2 mm. **B)** Presencia de un brote con aspecto normal, se observan espinas abundantes en la parte apical. **C)** Brotes y explante basal con oxidación severa en medio con C.A. Barra=5 mm. Abreviaturas: ba= brote anormal, bn= brote normal, r= raíces.

Como lo mencionan Pospíšilová *et al.* (1999), durante el cultivo *in vitro*, las plántulas crecen bajo condiciones muy específicas como alta humedad, menor intensidad luminosa, con poco intercambio gaseoso debido a los recipientes utilizados con el fin de prevenir la contaminación, además de la adición de reguladores de crecimiento, lo que da por resultado la formación de plantas de morfología, anatomía y fisiología anormal.

### **Individualización, enraizamiento de brotes y aclimatización de *B. militaris***

Los brotes separados del explante original mediante un corte, presentaron poca oxidación al ser sembrados en medio líquido o sólido, esto debido posiblemente como algunos autores mencionan a que la exudación de sustancias fenólicas es mayormente problemático en tejidos maduros que en juveniles (Cabrera *et al.*, 2008). Por tal motivo ya no fue necesario complementar el medio con adsorbentes como el PVP.

El enraizamiento de los brotes ocurrió en las dos condiciones ensayadas. En medio líquido con puentes de papel tras un mes en incubación, el 50% (4 brotes individualizados de 8 sembrados) desarrolló raíces, mientras que en medio con carbón activado el 71.42% de los brotes (5/7) generaron raíces. Cabe mencionar que en el medio con carbón activado se desarrollaron mayor cantidad de raíces secundarias además de una raíz principal.

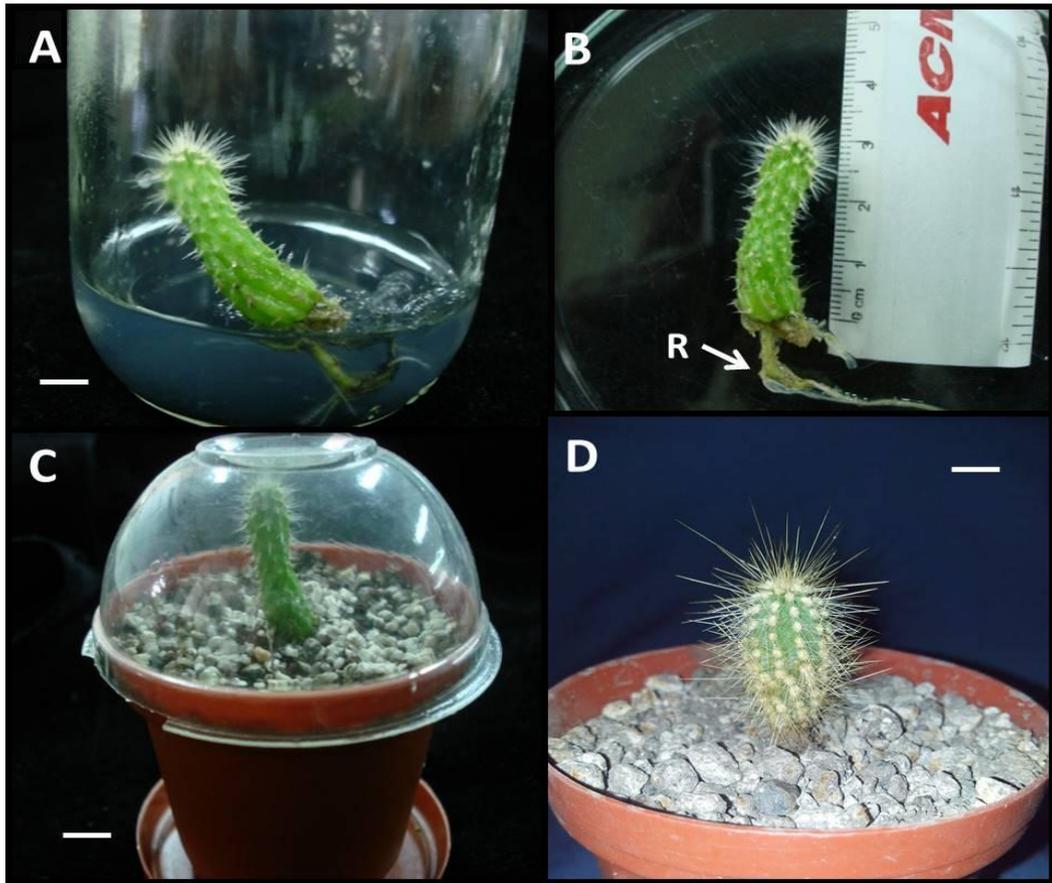
El enraizamiento de brotes individualizados utilizando carbón activado en cactáceas ha sido reportado en especies como *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003); *Thelocactus bicolor* con un 45% de enraizamiento (Zamora, 2007); Ronquillo-Vázquez (2009) reportó un 33.8% de enraizamiento de brotes de *Mammillaria theresae* después de 3 meses en cultivo en medio con carbón activado 1.0 g/L. En *Echinocereus schimollii* y *Escontria chiotilla* se obtuvo una eficacia de enraizamiento de 72.2 y 100% respectivamente con 2.0 mg/L de C.A. (Retes-Pruneda *et al.*, 2007), este representa un alto porcentaje de enraizamiento a comparación de *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* cactus columnares que presentaron un porcentaje de enraizamiento de 48%, 56% y 64% respectivamente al utilizar también 2.0 g/L de C.A. sin la adición de RCV (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002).

La adición de reguladores de crecimiento como AIA o AIB de acuerdo a lo reportado por De la Rosa-Carrillo *et al.* (2012), provocaron la aparición de tejido calloso en la parte basal de muchos de los brotes de varias especies del género *Turbinicarpus*, inhibiendo así la aparición de raíces. Mientras que en otras especies como *Mammillaria herrerae*, *Mammillaria theresae*, *Polaskia chichipe* y *Melocactus curvispinus* la adición de AIB (0.5 mg/L) promovió el enraizamiento en más del 50% de los brotes y 100% en *Polaskia chichipe*.

Después de pasar a condiciones *ex vitro*, las plantas necesitan algunas semanas de aclimatización con una disminución gradual de la humedad, tomando en cuenta que la intensidad lumínica es mayor en condiciones *ex vitro*, por lo que esta etapa es crucial para la sobrevivencia de las plantas regeneradas *in vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999).

La aclimatización de una plántula de *B. militaris* en una mezcla de sustrato (tepojal /tierra negra/ tezontle/ sphagnum/ agrolita, en proporción 4:2:2:1:1) resultó efectiva con la sobrevivencia de esta tras un año en condiciones *ex vitro* (Fig. 20). Como es la naturaleza misma de este tipo de plantas su crecimiento fue muy poco, alcanzando los 3.3 cm de altura y 1.1 cm de ancho en la parte más apical. Se observó un engrosamiento en el tallo, con espinas más abundantes y de mayor tamaño (Fig. 20D).

De acuerdo a lo reportado por Pérez-Molphe-Balch *et al.* (2002) la sobrevivencia en condiciones *ex vitro* de 3 especies columnares fue igual o mayor al 75%, sin embargo no mencionan el tipo de sustrato utilizado. Los experimentos realizados en *Notocactus magnificus* para su establecimiento *ex vitro* no dieron buenos resultados ya que la sobrevivencia fue de máximo 20% al utilizar una mezcla de composta y arena (De Medeiros *et al.*, 2006).



**Figura 20.** Acclimatización de un brote de *Backebergia militaris*. **A)** Brote individualizado en medio adicionado con carbón activado. **B)** Raíces bien desarrolladas del brote de 3 cm. **C)** Plántula en maceta cubierta con un domo de plástico. **D)** Plántula tras 1 año en condiciones *ex vitro*. R. Raíces. Barra=1 cm.

### Análisis anatómico

Los estudios de morfología de plántulas de cactáceas son escasos al igual que los estudios anatómicos y fisiológicos (Loza-Cornejo *et al.*, 2003). De acuerdo a la literatura consultada, sólo se ha realizado un estudio anatómico para esta especie, de la región vegetativa y el cefalio de un individuo adulto (Vázquez-Sánchez, 2002). Por lo que el presente estudio sería el primero en describir estructuras en un estado juvenil.

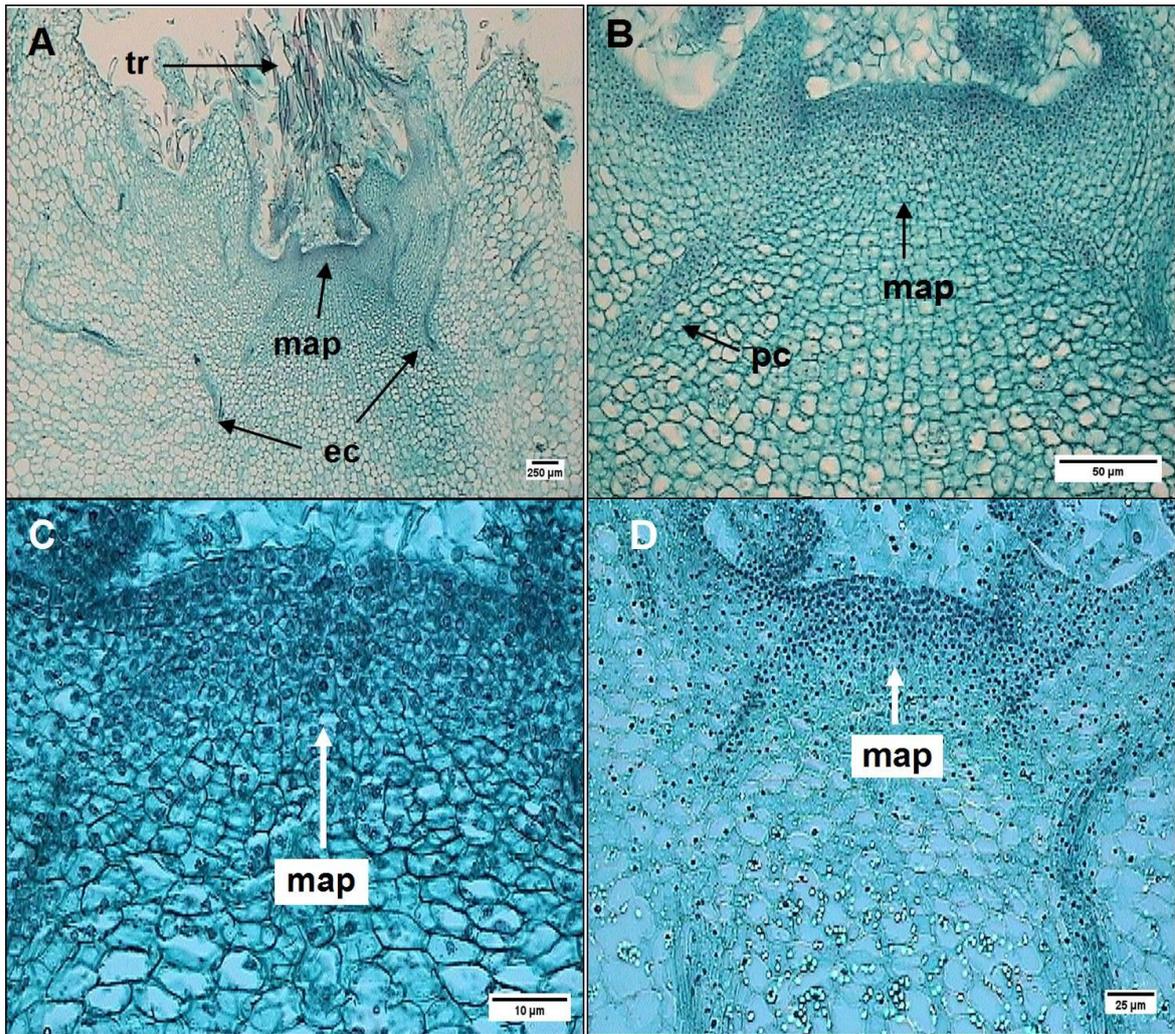
## Plántula proveniente de invernadero

El análisis anatómico se llevó a cabo para distinguir diferencias estructurales entre la parte apical de tallo y la parte basal de éste, que pudieran explicar la respuesta morfogénica que solo ocurrió en explantes laterales de tallo de las plántulas provenientes de invernadero, mientras que en ápices establecidos *in vitro*, sí se observó la formación de brotes (Fig. 17A).

Tanto en la sección apical como en la basal del tallo se observó la presencia de zonas meristemáticas. Los meristemas son regiones de células en división activa que dan lugar a células que se diferencian en nuevos tejidos de la planta (Evans *et al.*, 2003). Estas regiones también fueron observadas en plántulas con 30 días de *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C.Weber ex Mathsson) Buxb., las zonas presentaron un arreglo organizado y compacto con células relativamente pequeñas (Loza-Cornejo *et al.*, 2003).

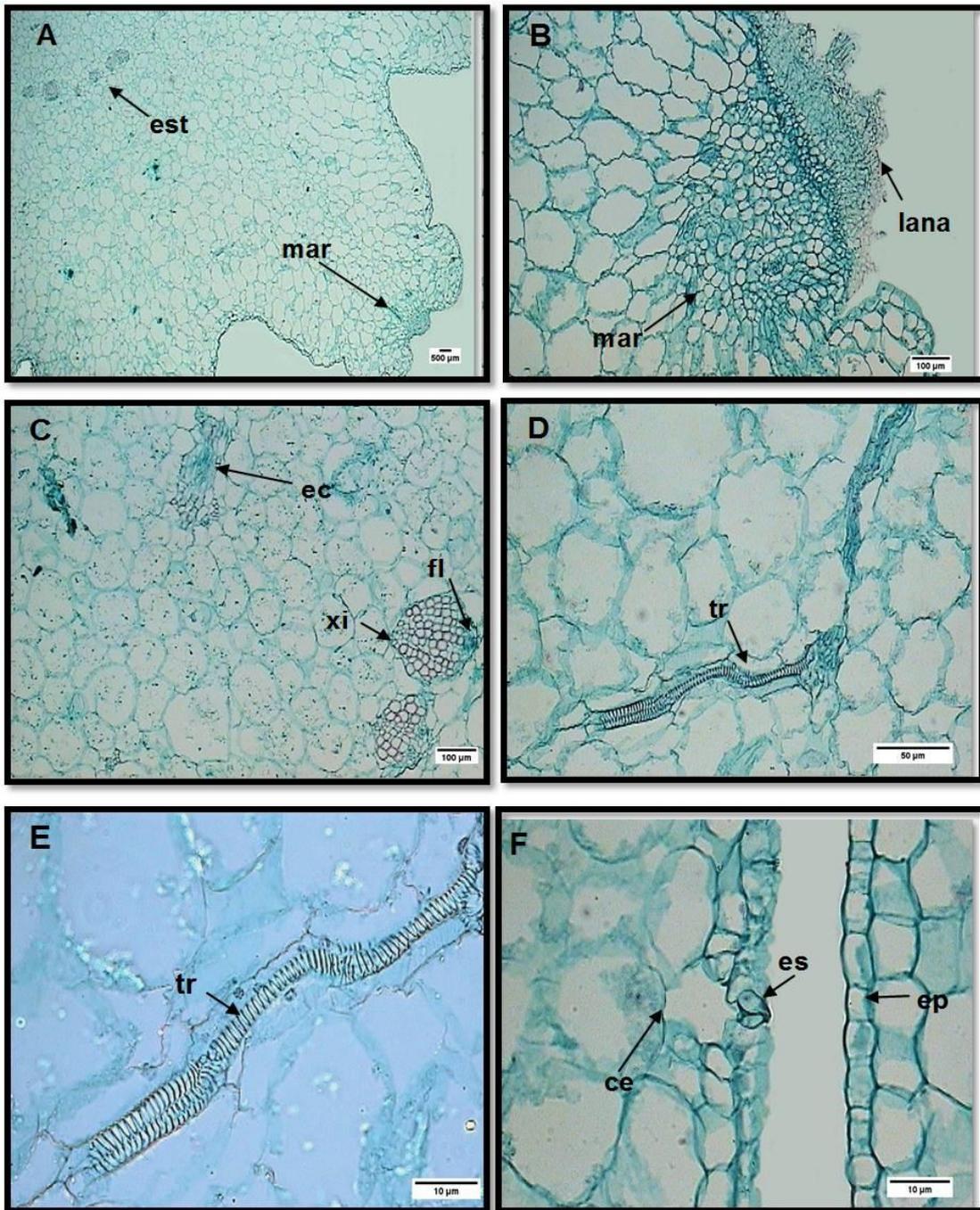
La diferencia entre el ápice y el lateral de tallo se encontró en la cantidad y distribución de las células meristemáticas presentes. El ápice tenía un número mayor y distribuidas a lo largo de la sección, mientras que en el lateral, las células fueron más escasas y abarcaban sólo una pequeña zona de la areola (Fig. 21C y 22B).

Además de las células meristemáticas, otro tipo celular no diferenciado que se observó fue el procámbium, cuyas células son alargadas y también con núcleos prominentes (Fig. 20B), al igual que lo observado por Téllez-Román (2012) en *Mammillaria plumosa* F.A.C.Weber en un primordio de brote de 60 días. La zona del meristemo apical posee una gran cantidad de tricomas, podrían ser espinas, lana u otros elementos de protección (Fig. 22A).



**Figura 21.** Sección longitudinal de la parte apical de tallo de *Backebergia militaris*. **A)** Meristemo apical, se observan células pequeñas y abundantes, además de elementos de conducción tanto longitudinales como transversales, cc. **B)** Detalle del meristemo apical, se observan células del procambium, cc. **C)** Células con núcleos prominentes en la zona meristemática, cc. y **D)** Detalle del tamaño de los núcleos en el meristemo apical respecto a las células que conforman la parte basal del ápice, cf. Abreviaturas: cc=campo claro, cf=contraste de fases, map= meristemo apical, pc= procambium, tr= tricomas.

En la parte basal del tallo se observaron estructuras especializadas como elementos traqueales estrechos de paredes secundarias con engrosamientos anulares y helicoidales (Fig. 22D y E) como lo reportado en *Pachycereus grandis* Rose a un mes de edad (Loza-Cornejo y Terrazas, 2011).



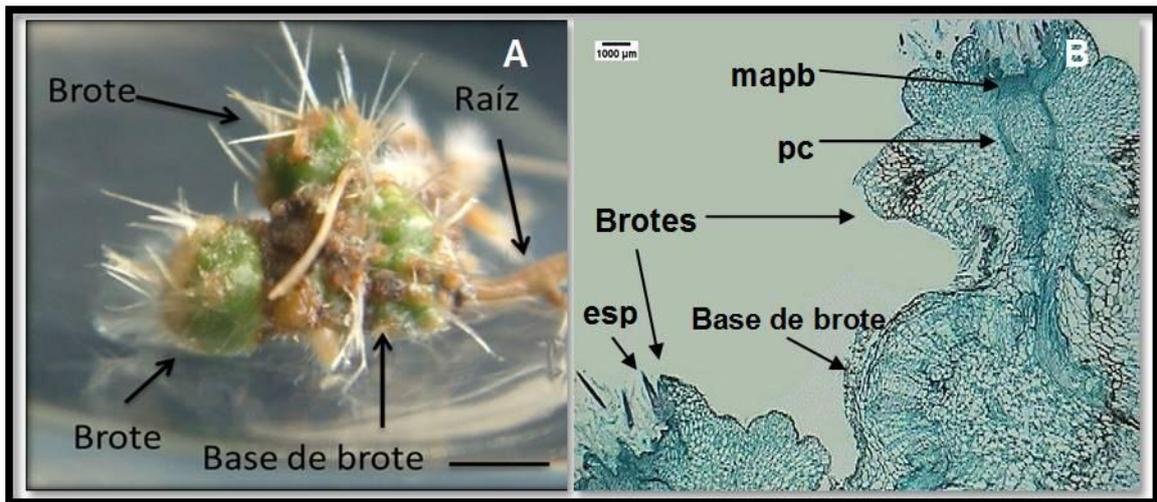
**Figura 22.** Secciones basales de tallo de *Backebergia militaris*, secciones longitudinales (L) y transversales (T). **A)** Areola de una costilla (T), cc. **B)** Areola (L), cc. **C)** Haces vasculares (L), cc. **D)** Tejido vascular (T), cc. **E)** Traqueidas con elementos espiralados (T), cf. **F)** Cámara estomática y epidermis (L), cc. Abreviaturas: cc= campo claro, cf= contraste de fases, mar= meristemo areolar, est= estele, ec= elementos de conducción, xi= xilema, fl= floema, tr= traqueida, ce= cámara estomática, ep= epidermis, es= estoma.

Como se observa en la Fig. 22F el grosor de la epidermis es de solo una célula por lo que se descartó la posibilidad de que la epidermis fuera la causa principal de la poca o nula penetración de los RCV al resto del tejido dando como respuesta la morfogénesis.

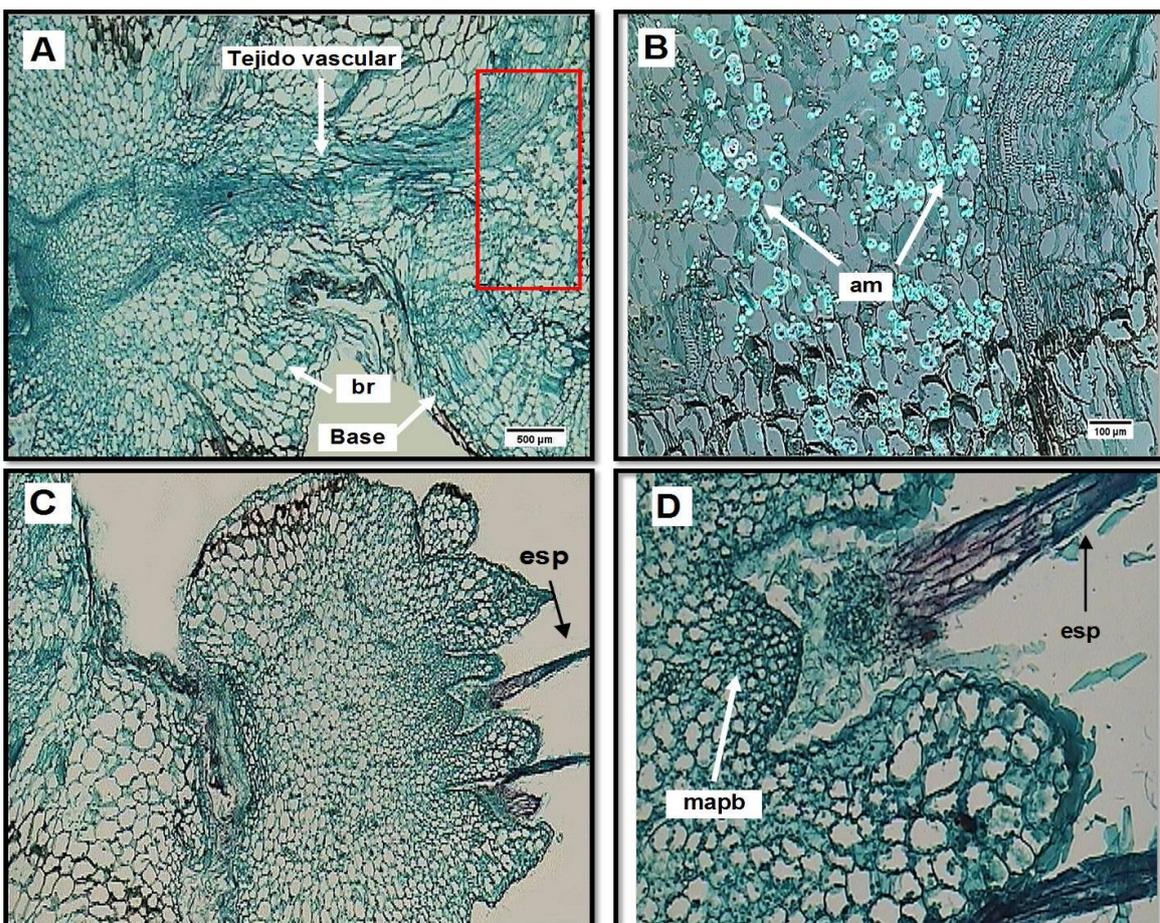
Aun cuando la parte apical y basal de tallo poseen regiones o zonas meristemáticas, con células capaces de diferenciar nuevas estructuras debido a su bajo nivel de diferenciación, una de las posibles explicaciones para la respuesta morfogénica presente solo en la parte media del tallo, puede ser atribuida a la dominancia apical. Las auxinas y citocininas tienen importantes papeles en la regulación de la dominancia apical. La región apical es una rica fuente de auxinas, sin embargo pueden ser reemplazadas si el ápice es retirado (George *et al.*, 2008).

### **Brotos regenerados *in vitro***

Las estructuras reveladas muestran conexión vascular entre el explante original y los brotes regenerados (Fig. 23B), en esa zona se observan células ya especializadas como son las traqueidas. Es importante mencionar que también se observó acumulación de almidón (amiloplastos) en la base del explante (Fig. 24B). El parénquima de reserva puede almacenar diversas sustancias como almidón, proteínas, lípidos, glúcidos simples, sales minerales y agua. Las sustancias de reserva pueden estar como concreciones sólidas (proteínas o granos de almidón) o disueltas dentro de vacuolas o el citoplasma (Alonso-Peña, 2011). La presencia de gránulos de almidón puede estar asociada a la naturaleza de la planta, ya que la mayor parte de su reproducción es vegetativa, por lo que necesita de la energía acumulada en la rama para que el nuevo brote pueda crecer. En las secciones apicales y lateral de tallo de la plántula cultivada en invernadero, no se observaron estas estructuras posiblemente debido a que la etapa de desarrollo en la que se tomaron las muestras no era proliferativa, por lo que no era necesario para la planta acumular energía de reserva para el desarrollo de nuevos brotes.



**Figura 23.** Brotes de *B. militarís* regenerados *in vitro* (Medio MS 50% sólido con KIN 3.0 mg/L) utilizados para el ensayo de anatomía. **A)** Explante original (base de brote) con dos brotes formados al término de 5 meses de cultivo. **B)** Sección longitudinal de los brotes regenerados *in vitro*, cc. Abreviaturas: mapb.= meristemo apical de brote, pc= procambium, esp=espina, cc=campo claro. Barra=4mm.



**Figura 24.** Secciones longitudinales de los brotes regenerados. **A)** Conexión vascular entre el explante original y un brote, cc. **B)** Acumulación de almidón en la base del explante, cf. **C)** Detalle de un brote, cc., x50 y **D)** Meristemo apical de brote, cc., x200. Abreviaturas: cc= campo claro, cf = contraste de fases, mapb = meristemo apical de brote, am = amiloplastos, esp = espina, br =brote.

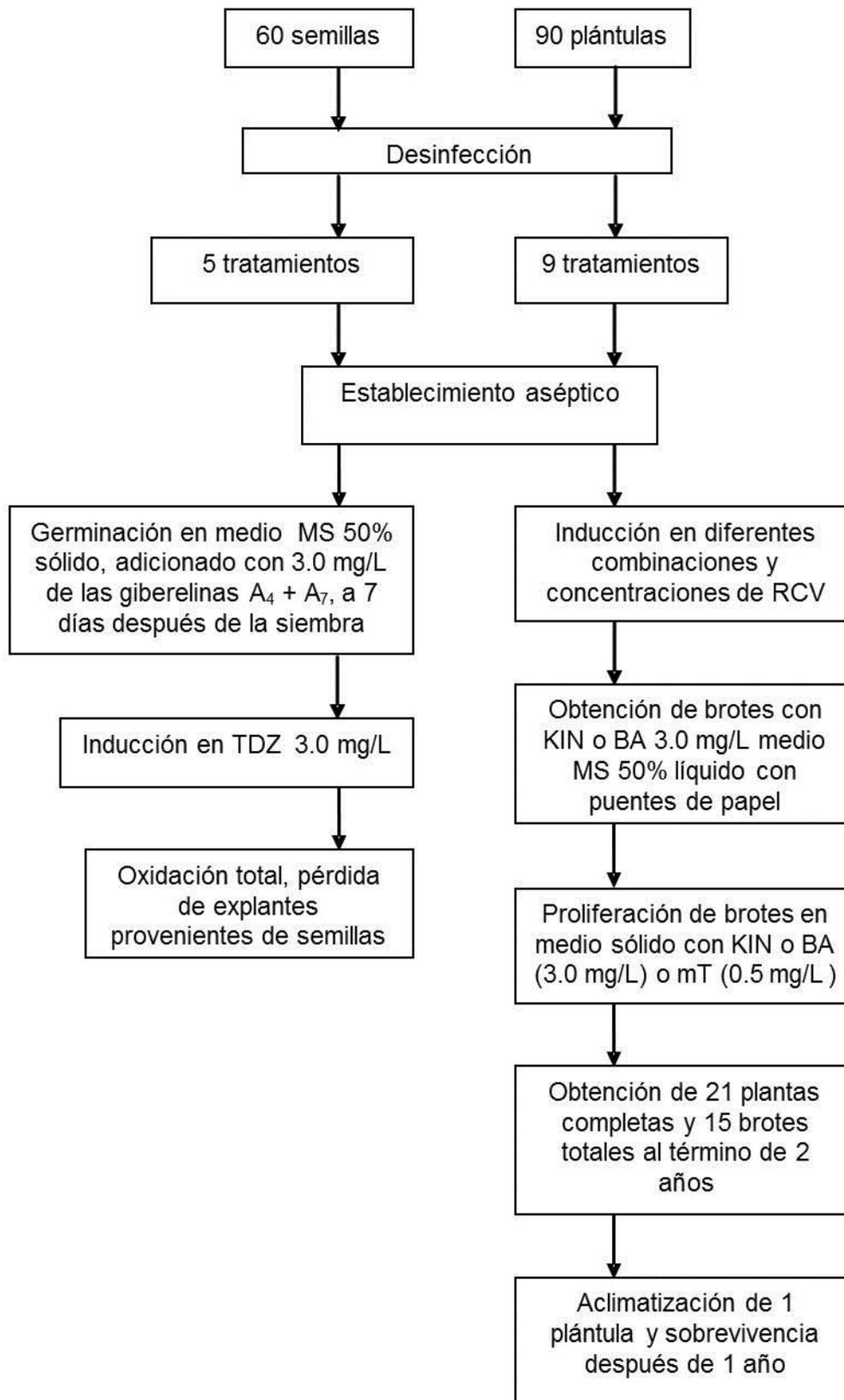
Se pudo observar además que los brotes se formaron de manera directa, es decir sin la presencia de una masa desorganizada de células (callo). No todas las células de un explante contribuyen a la formación de callo; los principales factores para la estimulación de una respuesta (organogénesis o embriogénesis somática directa o indirecta) dependen de la naturaleza, concentración y tiempo de exposición a los RCV empleados, estado de las fitohormonas endógenas, la fuente y el estado fisiológico del explante, el medio de cultivo y las condiciones de cultivo utilizadas (Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

Las amenazas a la biodiversidad son numerosas, por tal motivo es necesario realizar acciones que disminuyan o contrarresten los efectos de la pérdida de ecosistemas y todo lo que este alberga. La aplicación de biotecnologías como es el cultivo *in vitro* es una alternativa con potencial para la conservación de especies amenazadas. El establecimiento aséptico del material vegetal es el factor fundamental para el desarrollo de protocolos para la micropropagación.

En la presente investigación se logró el establecimiento aséptico de *Backebergia militaris* lo que permitirá en un futuro desarrollar un protocolo para su micropropagación, así como permitir su conservación a través del mantenimiento del material vegetal en condiciones *in vitro*.

#### 4. CONCLUSIONES

- ❖ El retiro de la testa redujo de manera considerable la contaminación de las semillas, permitiendo el establecimiento *in vitro* del 98.75% de los embriones aislados.
- ❖ Se logró el establecimiento *in vitro* de explantes provenientes de plántulas, mediante el empleo de antibiótico y fungicidas, presentándose contaminación menor al 30%.
- ❖ A partir de 266 explantes laterales de tallo sembrados, únicamente 2 de ellos fueron regenerantes.
- ❖ Se logró la regeneración de plantas completas mediante la activación de areolas, con el empleo de BA o KIN (3.0 mg/L) al término de 38 y 41 días de inducción respectivamente.
- ❖ El empleo de medio líquido con puentes de papel y la adición de PVP al medio disminuyó la oxidación de los explantes.
- ❖ Para la proliferación de los brotes las tres citocininas ensayadas: BA, KIN (3.0 mg/L) y mT (0.5 mg/L), resultaron efectivas sin embargo para poder ver una diferencia significativa entre tratamientos se deben realizar más repeticiones.
- ❖ El enraizamiento de ápices de brotes o brotes completos fue mayor en medio sólido MS al 50% con adición de carbón activado 0.5 g/L (71.42%), mientras que en medio líquido con puentes de papel se obtuvo un 50% de enraizamiento al término de 30 días.
- ❖ La aclimatización de una plántula de *B. militaris* regenerada *in vitro* resultó con su sobrevivencia después de un año en condiciones *ex vitro*.
- ❖ Al término de 2.5 años se obtuvieron 21 plantas y 15 brotes, con los que se podrán iniciar nuevos ciclos de proliferación, con la ventaja de que el material vegetal está aséptico y no se presenta oxidación en los explantes.
- ❖ El análisis anatómico no evidenció diferencias estructurales entre la parte apical de tallo y la parte basal, por lo que la diferencia en la respuesta puede ser atribuida a las concentraciones endógenas de fitohormonas.
- ❖ Para conocer el origen de formación de brotes se necesita realizar un análisis anatómico adicional en etapas más tempranas de su desarrollo.



**Figura 25.** Diagrama general para la regeneración *in vitro* de *Backebergia militaris*.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta-Echeverría**, M., Sánchez-Bravo, J. y M. Bañón Arnao. 2000. En: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.). Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill-Interamericana. España. 522 pp.
- **Albany**, N., Vilchez, J., León de Sierralta, S., Molina, M. y P. Chacín. 2006. Una metodología para la propagación *in vitro* de *Aloe vera* L. Revista de la Facultad de Agronomía. (LUZ) 23(2): 213-222.
- **Alonso-Peña**, J. R. 2011. Manual de Histología Vegetal. Mundi-Prensa eds. España. 326pp.
- **Álvarez**, S.J. 1993. Contribución de la Sociedad Mexicana de Botánica a la Investigación y Conservación de la Biodiversidad. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.44: 51-57.
- **Álvarez-Moctezuma**, J.G., Rodríguez de la O, J.L. y J. García-Ruíz. 2008. Desinfección y selección inóculo *in vitro* de *Abies religiosa*. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 14(1): 11-14.
- **Anderson**, E.F. 2001. The Cactus Family. Timber Press, USA. 776p.
- **Aparecida de Oliveira**, S., Pires da Silva Machado, M.F., Prioli, A. J. y C. Aparecida Mangolin. 1995. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). In vitro Cellular Development Biology-Plant 31(1): 47-50.
- **Arias**, S. 1993. Cactáceas: Conservación y Diversidad en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 44:109-115.
- **Arias**, M. S. 1997. Distribución general. En: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. Suculentas mexicanas Cactáceas. CVS Publicaciones. México. pp. 17-25.
- **Arias**, S., Terrazas, T. y K. Cameron. 2003. Phylogenetic Analysis of *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereeae) base on Chloroplast and Nuclear DNA sequences. Systematic Botany 28(3): 547-557.
- **Arias**, S., Guzmán, U., Mandujano, M.C., Soto Galván, M. y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. Cactáceas y suculentas mexicanas 50 (4): 100-125.
- **Arias**, S. y **Terrazas**, T. 2008. × *Pachebergia* (Cactaceae), a nothogenus from western México. Revista Mexicana de Biodiversidad 79:23-28.
- **Arreola**, N.H.J. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. Suculentas mexicanas Cactáceas. CVS Publicaciones. México. pp. 27-31.

- **Ávila-Díaz**, I., Oyama, K., Gómez-Alonso, C. y R. Salgado-Garciglia. 2009. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 99(3): 335-343.
- **Azcona-Guerrero**, C.A. 2009. Organogénesis directa de *Melocactus curvispinus subsp. dawsonii* (BRAVO) N.P. TAYLOR, 1991 a partir de explantes de tallo y germinación *in vitro* de *Mammillaria haageana subsp. elegans* D.R. HUNT, 1997. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana, Región Xalapa. México. 41pp.
- **Azofeifa**, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Revisión Bibliográfica. Agronomía Mesoamericana 20 (1): 153-175.
- **Becerra**, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. CONABIO. Biodiversitas 32: 1-5.
- **Benítez**, I.S. 2001. Conservación de recursos fitogenéticos *ex situ*. En: Berretta, A., Rivas, M. (eds.). Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Montevideo, Uruguay. IICA-PROCISUR pp. 77-88.
- **Beyl**, C.A. 2011. Getting Started with Tissue Culture-Media Preparation, Sterile Technique, and Laboratory Equipment. En: Trigiano, R.N. y Gray D.J. (eds.) Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology. CRC Press Taylor & Francis Group, USA. pp. 11-26.
- **Borges**, M., Aguilera, N., Saborí, G. y J. Vázquez, 1999. Influencia de distintos antioxidantes en la micropropagación del ñame (*Dioscorea alata* L.). Centro Agrícola 26 (2): 69-71.
- **Borges-García**, M., Destrade-Batista, R., Meneses-Rodríguez, S., Gómez-Kosky, R. Malaurie, B., Hamon, P. y L.C. Demenorval. 2011. Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. Revista Colombiana de Biotecnología 13(2): 221-228.
- **Bowes**, G. B. 1999. A colour Atlas of Plant Propagation and Conservation. Manson Publishing Ltd. London, U, K. 224 pp.
- **Bravo-Hollis**, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. UNAM. México. 743 pp.
- **Bravo-Hollis**, H. y **Sánchez-Mejorada**, H. 1991. Las cactáceas de México. Vol. II. UNAM. México. 404 pp.
- **Bravo-Hollis**, H. y **Scheinvar**, L. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. CONACYT-FCE. México, D.F. 233 pp.
- **Bustamante**, E. y **Búrquez**, A. 2005. Fenología y biología reproductiva de las cactáceas columnares. Cactáceas y suculentas mexicanas 50(3): 68-88.

- **Cabrera**, H. S.L, Chávez, A.V.M., Sandoval, Z.E., Litz, R.E y F. Cruz. 2008. Morfogénesis *in vitro* de *Dioon merolae* De Luca, Sabato & Vázquez-Torres (Zamiaceae, Cycadales) a partir de megagametofitos y embriones cigóticos. *Interciencia* 33 (12): 929-934.
- **Camarena**, R. 2005. Organografía comparada de plántulas de las especies del género *Pachycereus* (Berger) Britton & Rose (Cactaceae). Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 64pp.
- **Casas**, A. 2002. Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. *CONABIO. Biodiversitas* 40:18-23.
- **Cattabriga**, A. 2004. *Backebergia militaris* (Audot) H. Bravo Hollis. *Cactus & Company* 8(2): 131-162.
- **Challenger**, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad México.
- **Chávez**, A. V. M. 1993. Embriogénesis somática a partir de foliolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis Profesional Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 140 pp.
- **Chawla**, H. S., 2003. *Plant Biotechnology. A Practical Approach*. Science Publishers, Inc. USA.
- **Choreño-Tapia**, J. M., González-Rosas, H., Terrazas-Delgado, T. y A. Hernández-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de areolas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8(2): 183-196.
- **Cline**, M.G. 1991. Apical dominance. *The Botanical Review* 57 (4):318-358.
- **CONABIO**. 1998. *La Diversidad Biológica de México: Estudio de País*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- **CONABIO**. 2006. *Capital Natural y Bienestar Social*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- **CONABIO**. 2010. *Catálogo de metadatos geográficos*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- **Cortés**, A. A.R, Gutiérrez, L. I y M. Kazuko, A. 1998. Effect of *Backebergia militaris* Cactus Extract on Intestinal Smooth Muscle Contractility. *Phytotherapy Research*: 12(7):480-483.

- **Dávalos-Moscol**, M. 1998. Cefalosporinas de tercera generación. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna. 11(1): 38-41. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/spmi/v11n1/Cefalosporinas.htm>
- **De la Barrera**, E. y P. S. **Nobel**. 2003. Physiological ecology of seed germination for the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. Journal of Arid Environments 53:297-306.
- **De la Rosa-Carrillo**, M., Domínguez-Rosales, M.S., Pérez-Reyes, M.E. y E. Pérez-Molphe-Balch. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. Interciencia 37(2): 114-120.
- **De Medeiros**, L.A., de Ribeiro, R.C. S., Gallo, L.A., De Oliveira, E. T. y M.E.S.P. Demattê. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 165–169.
- **Dodds**, J. H. y **Roberts**, L. W. 1985. Second edition. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 232 pp.
- **Esparza-Izunsa**, R.S. 2004. Formación de callo e inducción de un cultivo de células en suspensión en *Lophophora williamsii*. Tesis de Maestría. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. 87 pp.
- **Evans**, D.E., Coleman, J.O.D. y A. Kearns. 2003. Plant Cell Culture. The Basics from background to bench. BIOS Scientific Publishers. 194 pp.
- **Ezcurra Real de Azúa**, E. 1998. Patrones biogeográficos de las cactáceas columnares de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. G003. México D. F.
- **Figuroa**, R., Tamayo, J., González, S., Moreno, G. y L. Vargas. 2011. Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (*Hylocereus undatus*). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 12(1): 44-50.
- **Flores-Martínez**, A., Manzanero, G., Rojas-Aréchiga, M., Mandujano, M. y J. Golubov. 2008. Importancia de la latencia de las semillas para la conservación de una cactácea endémica de Oaxaca, México. Cactáceas y suculentas mexicanas. 53 (4): 115-122.
- **Franco-Martínez**, I. 1997. Legislación y conservación. En: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. Suculentas mexicanas Cactáceas. CVS Publicaciones. México. pp. 101-111.
- **Galván-Torres**, A. 2005. Micropropagación de *Neobuxbaumia tetetzo* (Cactaceae) del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, con fines de conservación *ex situ*. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 52 pp.

- **García, C. P., Rivero, R. M., Ruiz, J. M. y L. Romero.** 2003. The Role of Fungicides in the Physiology of Higher Plants: Implications for Defense Responses. *The Botanical Review* 69 (2): 162-172.
- **Geneve, R.L.** 2011. Propagation from Nonmeristematic Tissues-Organogenesis. En: Trigiano, R.N. y Gray D.J. (Eds.). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press Taylor & Francis Group, USA pp 245-258.
- **George, E. F. y Sherrington, D. P.** 1984. *Plant propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories*.
- **George, E. F., Hall, M.A. y Geer-Jan De Klerk.** 2008. Third edition. *Plant propagation by tissue culture, Vol. 1*. Springer. 501 pp.
- **Gibson, A.C., Spencer, K.C. Bajaj, R. y J. L. McLaughlin.** 1986. The ever-changing landscape of cactus systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73:532-555.
- **Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F. y M. Tucci.** 2002. In vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.
- **Godínez-Álvarez, H., Valverde, T. y P. Ortega-Baes.** 2003. Demographic Trends in the Cactaceae. *The Botanical Review* 69(2): 173-203.
- **Gómez-Juárez, J.L., Morales, J.E., Lechuga-Corchado, J.A. y F. Cruz-Sosa.** 2006. Reproducción *in vitro* del garambullo, *Myrtillocactus geometrizans* (Martius) Console. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 51(2):36-45.
- **Gómez, J.** 2007. Efecto de tratamientos antioxidantes para el establecimiento *in vitro* de dos genotipos de caña de azúcar del Ingenio La Grecia, Honduras. Proyecto especial de graduación para optar al título de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, Honduras. 14 p.
- **González-Caballero, O.** 2008. Regeneración *in vitro* de *Turbincarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R.A. Foster y análisis de los regenerantes por RAPDs. Tesis profesional de Maestría. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 106 pp.
- **González-Rosas, H., Herrera-Meléndez, J.A. y C. Ramos-Villaseñor.** 2006. Multiplicación *in vitro* de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott, a partir de esporas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12(1): 131-136.
- **Guzmán, U.** 1997. Grupos taxonómicos. En: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. *Suculentas mexicanas Cactáceas*. CVS Publicaciones. México. pp. 37-41.
- **Guzmán, U., Arias, S. y P. Dávila.** 2007. *Catálogo de Cactáceas Mexicanas*. Universidad Nacional Autónoma de México.

- **Hernández, H.M. y Godínez-Álvarez, H.** 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26: 33-52.
- **Kakimoto, T.** 2003. Biosynthesis of cytokinins. *Journal Plant Research* 116: 233-239.
- **Kane, M.** 2011. Propagation by Shoot Culture. En: Trigiano, R.N. y Gray D.J. (eds.). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press Taylor & Francis Group, USA pp 181-190.
- **Karimi, N., Mofid, M.R., Ebrahimi, M. y R. Naderi.** 2010. Effect of areole and culture medium on callus induction and regeneration *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Trakia Journal of Sciences* 8(2): 31-35.
- **Kelley, W.N.** 1993. *Medicina interna*. Volumen 1. Editorial Médica Panamericana. 1536 pp.
- **Lara, M.L.** 2010. Micropropagación de *Aporocactus flagelliformis* (L.) Lem. (Cactaceae), especie endémica de México: propuesta para su conservación y aprovechamiento. Tesis de Licenciatura (Biología) Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 98 pp.
- **Lascuráin, M., List, R., Barraza, L., Díaz-Pardo, E., Gual-Sill, F., Maunder, M., Dorantes, J. y V. E. Luna.** 2009. Conservación de especies *ex situ*. En: Sarukhán, J (Ed) *Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, pp. 517-544.
- **Linington, I.M.** 1991. *In vitro* propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27(1): 81–88.
- **Loyola-Vargas, V.M., De la Peña, C., Galaz-Ávalos, R.M. y F.R. Quiroz-Figueroa.** 2008. Plant Tissue Culture. En: Walker, J.M., Rapley, R. (eds.) *Molecular Biotechnology Handbook*. 2nd Edition. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 875-904.
- **Loza-Cornejo, S., Terrazas, T., López-Mata, L. y C. Trejo.** 2003. Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (Cactaceae): su significado adaptativo. *Interciencia* 28(2): 83-89.
- **Loza-Cornejo, S. y Terrazas, T.** 2011. Morfo-anatomía de plántulas en especies de Pachycereeae: ¿hasta cuándo son plántulas? *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 88:1-13.
- **Machado, M.F.P.S. y Prioli, A.J.** 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) by areole activation. *In vitro Cellular Development Biology-Plant* 32 (3):199-203.
- **Martínez-Meyer, E., Sosa-Escalante, E. y F. Álvarez.** 2014. El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección?. *Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl.* 85: S1-S9.

- **Martínez-Palacios**, A. 2007. *Backebergia militaris* (Audot) Bravo ex Sánchez-Mejorada (Cactaceae) un recurso industrial en grave riesgo de extinción. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 52(4):122-127.
- **Martínez-Ruiz**, R., Azpíroz-Rivero, H.S., Rodríguez de la O, J. L., Cetina-Alcalá, V. M., Gutiérrez-Espinosa, M.A. y J. Sahagún-Castellanos. 2005. Micropropagación clonal *in vitro* en *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla*. *Ra Ximhai* 1 (1): 111-130.
- **Mauseth**, J.D., Terrazas, M. Vázquez Sánchez y S. Arias. 2005. Field observations on *Backebergia* and other cacto from Balsas Basin, México. *Cactus and Succulent Journal* (Los Angeles) 77:2-13.
- **Mauseth**, J. D. 2006. Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany* 98(5): 901-926.
- **Medel-Narváez**, A., Flores-Hernández, A., Armendáriz-Erivez, S. y E. Santamaría-César. 2001. Técnicas de desinfestación y siembra *in vitro* de embriones maduros de falso peyote (*Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* (Eng.) *Shumann*), (Cactaceae). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 2(1):53-59.
- **Mier-Romero**, G., González-Caballero, O., Estrada-Galván, B., Chávez-Ávila, V.M. y M. Mata-Rosas. 2010. Regeneración *in vitro* de *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britt. & Rose (Cactaceae). VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas.
- **Mittermeier**, R. y **Goettsch**, C. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. En Sarukhán, J. y R. Dirzo (comps.). México ante los retos de la biodiversidad. CONABIO. México.
- **Moebius-Goldammer**, K.G., Mata-Rosas, M. y V.M. Chávez-Avila. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Sschum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 39(4):388-393.
- **Mroginski**, L., Sansberro, P. y E. Flaschland. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Echenique, V., Rubinstein, C. y L. Mroginski (eds.) *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA. 35-42 pp.
- **Murthy**, B.N.S., Murch, J. y P.K. Saxena. 1998. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cellular Development Biology –Plant* 34 (4): 267-275.
- **Neyra**, L. y **Durand**, L. 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de país. Parte II. Recursos naturales. Biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, pp. 62-96.
- **Núñez**, M.C., Engleman, E. M. y J. Márquez, G. 2001. Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 68:5-13.

- **Núñez**, I., González-Gaudio, E. y A. Barahona. 2003. La Biodiversidad: Historia y contexto de un concepto. *Interciencia* 28(7): 387-393.
- **Ojeda-Zacarías**, M.C., Luna-Olvera, H.A., Verde-Star, M.J., Torres-Cepeda, T.E., Pereyra-Alfárez, B., Iracheta-Donjuan, L., Olivares-Sáenz, E., Salazar-Sáenz, R. y E. Cárdenas-Cerda. 2006. Multiplicación *in vitro* del piñón azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski). *Revista Internacional de Botánica Experimental* 75:109-113.
- **Ojeda-Zacarías**, M.C., Vázquez Alvarado, R.E. y H. Rodríguez-Fuentes. 2010. Establecimiento *in vitro* de nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Revista salud pública y nutrición* 5: 176-181. VIII Simposium- Taller Nacional y 1<sup>er</sup> Internacional "Producción y Aprovechamiento del Nopal".
- **Ortega-Baes**, P. y **Godínez-Alvarez**, H. 2006. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation* 15:817-827
- **Ortega-Baes**, P., Shüring, S., Sajama, J., Sotola, E., Alonso-Pedano, M., Bravo, S. H. Godínez Álvarez. 2010. Diversity and Conservation in the Cactus Family. En: Ramawat, K.G. (Ed.) *Desert Plants. Biology and Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 157-173.
- **Ortiz** M, J.G. y **Alcántara** G., R. 1997. Propagación *in vitro* de Peyote (*Lophophora williamsii* (Lemaire) Coulter). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 42: 3-6.
- **Pan**, M.J. y **Van Staden**, J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture- A review. *Plant Growth Regulation* 26(3):155-163.
- **Pelah**, D., Kaushik, R.A., Mizrahi, Y. y Y. Sitrit. 2002. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 81-84.
- **Pérez-Molphe-Balch**, E., Pérez-Reyes, M.E., Villalobos-Amador, E., Meza-Rangel, E., Morones-Ruiz, L.R. y H. J. Lizalde-Viramontes. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular Development Biology -Plant* 34(2): 131-135.
- **Pérez-Molphe-Balch**, E., Pérez-Reyes, M.E, Dávila-Figueroa, C.A. y E. Villalobos-Amador. 2002. In Vitro Propagation of Three Species of Columnar Cacti from the Sonoran Desert. *HortScience* 37(4): 693-696.
- **Pierik**, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 324 pp.
- **Pospíšilová**, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. y S. Plzáková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4): 481-497.

- **PROFEPA.** Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. 2010. Pérdida de Biodiversidad. Recuperado el 12 de febrero de 2014, de [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/435/1/mx/perdida\\_de\\_biodiversidad.html](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/435/1/mx/perdida_de_biodiversidad.html)
- **Quiala, E.,** Montalvo, G. y J. Matos. 2004. Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal* 4(4): 195-199.
- **Quiala, E.,** Matos, J., Montalvo, G., de Feria, M., Chávez, M., Capote A., Pérez N., Barbón, R., y B. Kowalski. 2009. *In Vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 11: 18-25.
- **Quintana-Sierra, M.E.,** Robledo-Paz, A., Santacruz-Varela, A., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Carrillo-Castañeda, G. y J.L. Cabrera-Ponce. 2005. Regeneración *in vitro* de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Agrociencia* 39(6): 647-655.
- **Ramírez-Malagón, R.,** Aguilar-Ramírez, I., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J. L., H. G. y N. Ochoa-Alejo. 2007. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43(6): 660-665.
- **Raven, P.H.,** Evert, R.F. y S.E. Eichhorn. 1992. *Biología de las plantas. Regulación del crecimiento y del desarrollo: las hormonas vegetales.* Ed. Reverte. México. pp 475-492.
- **Razdan, M.K.** 2003. *Introduction to plant tissue culture. Second edition.* Enfield. New Hampshire. USA.
- **Retes-Pruneda, J. L.,** Valadez-Aguilar, M. de L., Pérez-Reyes, M. E. y E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Econria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81: 9-16.
- **Ríos, D.,** Sandoval, D. y C. Gómez. 2010. *In vitro* culture of *Peumus boldus* Molina via direct organogenesis. *Molecular Medicinal Chemistry. IDECEFYN* 21: 70-72.
- **Rivas, M.** 2001. Conservación *in situ* de los recursos fitogenéticos. En: Berretta, A., Rivas, M. (eds.). *Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur.* Montevideo, Uruguay. IICA-PROCISUR pp. 63-76.
- **Roca, W. M. y Mroginski L. A. (Ed.).** 1991. *Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones.* Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 970pp.
- **Rojas-Aréchiga, M.,** Orozco-Segovia, A. y C. Vázquez-Yanes. 1997. Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México. *Journal of Arid Environments* 36: 571-578.

- **Rojas-Aréchiga, M. y Vázquez-Yanes, C.** 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44: 85-104.
- **Rodríguez, G.M.** 2006. Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hild. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología), Universidad Nacional del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. 85 pp.
- **Ronquillo-Vázquez, N.** 2009. Regeneración *in vitro* y conservación *ex situ* de *Mammillaria theresae* Cutak. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 114 pp.
- **Ruvalcaba-Ruiz, D., Rojas-Bravo, D. y A.J., Valencia-Botín, A. J.** 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12: 139-143.
- **Sánchez, H. M.A., Sánchez, H.C., Villanueva, V. C., Gil, V. I., Jiménez, R., M.C. y I. Sánchez, C.** 2009. Multiplicación *in vitro* vía organogénesis en calabaza. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 11-22.
- **Sánchez-Cuevas, M. C. y J. L. Salaverría.** 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista UDO Agrícola* 4 (1): 21-26.
- **Sánchez-Morán, M.R y Pérez-Molphe-Balch, E.** 2007. Propagación *in vitro* de *Browningia candelaris* (Cactaceae) usando metatopolina. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 4(2):16-18.
- **Sánchez-Olate, M., Ríos, D., Pedraza, M., Pereira, G., Castellanos, H. y R. Escobar.** 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* (Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados. *Bosque* 25(1): 123-128.
- **Sánchez-Ruiz, F.H., Furuya-Meguro, A.T., Arroniz-Padilla, S., Gómez-Moreno, A. y L. Gómez.** 2009. Comparación de la acción bactericida de hipoclorito de sodio y Microcyn 60. *Revista Odontológica Mexicana* 13(1): 9-16.
- **Sandoval, E., Rojas, A., Guzmán, C., Carmona, L., Ponce, R.M., León, C., Loyola, C., Vallejo, M.A. y A. Medina.** 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 278 pp.
- **Santos-Díaz, M. del S.** 2005. Micropropagación de *Ferocactus glaucescens* Britton & Rose, cactácea mexicana de valor ornamental. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 2(3): 6-8.
- **Santos-Díaz, M. del S., Méndez-Ontiveros, R., Arredondo-Gómez, A. y M. de L. Santos-Díaz.** 2003. *In vitro* Organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 39 (5):480-484.

- **Sarasan**, V., Cripps R., Ramsay, M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast, G. y J.K. Rowntree. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants - progress in the past decade. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 42 (3): 206-214.
- **Sarukhán**, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón J., Dirzo, R., Llorente-Bousquets, J., Halffter, G. González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S. y J. de la Masa. 2009. Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F. 100 pp.
- **Sarukhán**, J., Carabias, J., Koleff, P. y T. Urquiza-Haas. 2012. Capital natural de México: Acciones estratégicas para su valoración, preservación y recuperación. Comisión nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D.F. 91pp.
- **Saucedo-Gutierrez**, S. 2006. Regeneración *in vitro* de *Cephalocereus apicicephalium* y *Echinocereus pentalophus*, cactáceas nativas de México. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. 154 pp.
- **Segura**, J. 2000. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill-Interamericana. España. pp. 285-303.
- **SEMARNAT** (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna Silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, 30 de diciembre de 2010. México, D.F.
- **Shishkova**, S., García-Mendoza, E., Castillo-Díaz, V., Moreno, N.E., Arellano, J. y J. Dubrovsky. 2007. Regeneration of roots from callus reveals stability of the developmental program for determinate root growth in Sonoran Desert Cactaceae. *Plant Cell Reports* 26(5):547-557.
- **Shoemaker**, W.C., Ayres, S.M., Grenvick, A. y P.R Holbrook. 2002. Tratado de Medicina Crítica y Terapia Intensiva. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. 2256 pp.
- **Smith**, R.H., Burdick, P.J., Anthony, J. y A.A. Reilley. 1991. *In Vitro* propagation of *Coryphantha macromeris*. *HortScience* 26(3):315.
- **Smith**, R.H. 2000. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. Second Edition. Academic Press, USA pp. 231.

- **Soberón, M. J. y Llorente, B. J.** 1993. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO). Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.44: 3-17.
- **Soria-Campos, D., López-Escamilla, A.L., y L.P. Olguín-Santos.** 2013. Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. In: Pulido-Flores G. y Scoot Monk (Eds.). Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, Volumen II (Lincoln, NE: Zea Books).
- **Soto-Cortés, C.** 2013. Evaluación de la regeneración *in vitro* de brotes de *Echinocactus grusonii* (Cactaceae) utilizando medio líquido. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 75 pp.
- **Taiz, L. y Zeiger, E.** 2006. Plant Physiology. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc., U.S.A. 764pp.
- **Téllez-Román, J.** 2012. Morfogénesis *in vitro* de cactáceas. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad. Fisiología Vegetal. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 171 pp.
- **Terrazas, T., Cházaro, M. y H. Arreola.** 2013. *Pachycereus militaris*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 07 March 2014.
- **Thorpe, T. A.** 2007. History of plant tissue culture. Molecular Biotechnology 37(2): 169-180.
- **Tisserat, B.** 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. Journal of Experimental Botany 30(6): 1275-1283.
- **Torres-Muñoz, L. y Rodríguez-Garay, B.** 1996. Somatic Embryogenesis in the Threatened Cactus *Turbincarpus pseudomacrolele* (Buxbaum & Backeberg). Journal of the Professional Association for Cactus Development 1: 36-38.
- **Trejo-Orozco, C.K., Ramírez-Serrano, C. y R. Soltero-Quintana.** 2005. Micropropagación de cactáceas. Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. XVI Semana Nacional de Investigación Científica. ISBN: 970-27-0770-6.
- **Valiente-Banuet, A.** 2002. Vulnerabilidad de los sistemas de polinización de cactáceas columnares de México. Revista Chilena de Historia Natural 75: 99-104.

- **Vázquez-Sánchez**, M. 2002. El cefalio de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (cactaceae): morfología y anatomía. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla. 48 pp.
- **Vázquez-Sánchez**, M., Terrazas, T. y S. Arias. 2005. Morfología y anatomía del cefalio de *Cephalocereus senilis*. Anales del Jardín Botánico de Madrid 62(2): 153-161.
- **Vázquez-Yanez**, C. 1997. Extraordinarias administradoras de agua. En: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. Suculentas mexicanas Cactáceas. CVS Publicaciones. México. pp. 49-53.
- **Velázquez**, V. L. 2011. Cultivo *in vitro* de *Escontria chiotilla* y *Lemaireocereus hollianus* (Cactaceae). Tesis de Maestría. División de Ciencias Biológicas y la Salud. Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana. 90 pp.
- **Vega-Krstulovic**, C., Bermejo-Franco, J.C., Villegas-Alvarado, G., Quezada-Portugal, J., Aguilar-Llanos, M. y E. Conde-Velasco. 2007. Propagación masiva de *Polylepis tomentella* Weddell ssp. nana mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Ecología en Bolivia 42(2):102-120.
- **Villalobos-Arámbula**, V. 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. pp. 55-64. En: Robert, M. y V.M., Loyola (comp.) El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 167p.
- **Villalobos**, V. M. y **Thorpe**, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. M. y Mroginski, L.A. (Ed.). Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp 127-141.
- **Villaseñor**, J.L. 2003. Diversidad y distribución de las magnoliophyta de México. Interciencia 28(3): 160-167.
- **Yáñez-Martínez**, M. 2011. Regeneración *in vitro* de *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología) Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 86 pp.
- **Zamora**, H.C. 2007. Micropropagación de *Thelocactus bicolor* (Galeotti ex Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). Tesis de Licenciatura (Biología) Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 45 pp.

#### Citas de internet

<http://gobiernodemichoacan.blogspot.mx/2009/11/la-presa-j-mugica-mayor-generator-de.html>

<http://www.cites.org>

[www.rap-al.org](http://www.rap-al.org)

## 6. ANEXOS

### APÉNDICE I

Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

Componentes		MS 100% (g/L)	MS 50% (g/L)
<b>Macronutrientes</b>	(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1.65	0.825
	KNO <sub>3</sub>	1.9	0.950
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.37	0.185
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	0.085
<b>CaCl<sub>2</sub>* 2H<sub>2</sub>O</b>		0.44	0.220
<b>Micronutrientes</b>	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0.01689	0.00844
	ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.0086	0.0043
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062	0.0031
	KI	0.00083	0.000415
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.00025	0.000125
	CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0.000025	0.0000125
	CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0.000025.	0.0000125
<b>FeEDTA</b>	FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.0278	0.0139
	Na <sub>2</sub> EDTA	0.0373	0.0186
<b>Vitaminas</b>	Tiamina	0.0001	0.0001
	Ácido Nicotínico	0.0005	0.0005
	Piridoxina * HCl	0.0005	0.0005
<b>Inositol</b>		0.10	0.10
<b>Glicina</b>		0.002	0.002
<b>Carbohidratos</b>	Sacarosa	30	30
<b>Agente gelificante</b>	Gellangum	3.5	3.5
	Agar bacteriológico Bioxon	9	9

## APÉNDICE II

Nombre comercial, nombre químico y propiedades de las sustancias utilizadas como desinfectantes.

Nombre comercial	Nombre químico	Propiedades
<b>Cloro</b>	Solución de Hipoclorito de sodio (NaOCl)  5% de cloro libre	Posee un amplio poder bactericida, destruye bacterias, hongos, esporas y virus. La actividad solvente, y las propiedades antimicrobianas son debidas primariamente a: a) la habilidad del hipoclorito de sodio de oxidar e hidrolizar las proteínas celulares, b) la liberación de cloro, para formar ácido hipocloroso y c) a largo plazo, su habilidad osmótica de extraer líquidos fuera de las células (Sánchez-Ruiz <i>et al.</i> , 2009).
<b>Tween 80</b>	Tween 80	Es un detergente que rompe la tensión superficial, permitiendo que el explante esté en mejor contacto con el químico.
<b>Benomil</b>	Benlate®	Este fungicida y su principal metabolito, carbendazim, se unen a los microtúbulos (estructura importante de todas las células) y por eso interfieren en algunas funciones celulares, como la división de las células y los mecanismos de transporte intracelulares.
<b>Captán</b>	Captan Ultra	El ingrediente activo carboxamida reacciona con las enzimas silfihdrílicas con producción de tiosfogeno, sustancia tóxica para las células fúngicas, e interfiere el proceso de respiración celular en los hongos por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo micelar.
<b>Ciprofloxacina</b>	Ciprofloxacino	Son potentes contra las bacterias gramnegativas aerobias más resistentes como <i>Pseudomona</i> , <i>Acinetobacter</i> y <i>Enterobacter</i> . Todos los microorganismos anaerobios son resistentes (Kelley, 1993). El mecanismo de acción involucra la inhibición de las enzimas girasas (topoisomerasa) del DNA (Shoemaker <i>et al.</i> , 2002)

<b>Cefotaxima</b>	Cefotaxima	Es activo contra la mayoría de Enterobacteriaceae, excepto las especies de <i>Enterobacter</i> (Shoemaker <i>et al.</i> , 2002). Interfiere con la síntesis del componente péptidoglucano de la pared celular bacteriana (Dávalos-Moscol, 1998).
-------------------	------------	--

### APÉNDICE III

Preparación del Fijador Navashin (Sandoval *et al.*, 2005)

Solución "A"

Trióxido de cromo	1g
Ácido acético glacial	7 ml
Agua destilada	92 ml

Solución "B"

Formaldehído (37-40%)	30 ml
Agua destilada	70 ml

Deben mezclarse cantidades iguales de las soluciones "A" y "B" justo antes de usar y fijar el material.