



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**REGENERACIÓN *in vitro* DE *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. y *Mammillaria bombycina* Quehl (CACTACEAE)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO  
PRESENTA:**

**MANCILLA VILLANUEVA PAMELA LILIÁN**

**DIRECTOR DE TESIS BIÓL. JUAN ROMERO ARREDONDO**

**ÁREA DE MORFOFISIOLOGÍA VEGETAL**

**MÉXICO, D. F., OCTUBRE DE 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## CONTENIDO

	Páginas
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
II.1 Generalidades de la familia Cactaceae	2
II.2 Distribución geográfica de la familia Cactaceae	3
II.3 Importancia de las cactáceas	4
II.4 Marco legal de las cactáceas	6
II.5 Cultivo de tejidos vegetales	7
II.6 Tipos de cultivos	8
II.7 Cultivo de tejidos vegetales en cactáceas	9
II.8 Generalidades e importancia de las especies estudiadas	10
II.8.1 <i>Astrophytum asterias</i> (Zucc.) Lem.	10
II.8.1 <i>Mammillaria bombycina</i> Quehl	13
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	16
V.1 Objetivo general	16
V.2 Objetivos particulares	16
VI. MATERIAL Y MÉTODO	17
VI.1 Material biológico	17
VI.2 Medios de cultivo	17
VI.3 Escarificación y desinfestación de semillas	18
VI.4 Siembra <i>in vitro</i> (germinación)	19
VI.5 Regeneración <i>in vitro</i> (corte y cultivo de inóculos)	19

VI.6 Obtención de tejido calloso	21
VII. RESULTADOS	22
VII.1 Desinfestación de semillas	22
VII.2 Germinación	22
VII.2.1 Germinación de semillas de <i>Astrophytum asterias</i>	22
VII.2.2 Germinación de semillas de <i>Mammillaria bombycina</i>	25
VII.3 Desarrollo <i>in vitro</i> de inóculos apicales y laterales	27
VII.4 Cultivo de tejido calloso espontáneo	45
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
VIII.1 Desinfestación	48
VIII.2 Germinación	49
VIII.3 Regeneración <i>in vitro</i> de inóculos apicales y laterales	50
VIII.4 Regeneración de tejido calloso espontáneo	53
IX. CONCLUSIONES	55
X. LITERATURA CITADA	57
XI. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	61

## Resumen

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la regeneración *in vitro* de inóculos apicales y laterales de *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina*, dos cactáceas que se encuentran amenazadas y catalogadas como especies sujetas a protección especial por la NOM-059-ECOL-2001.

El estudio se realizó en tres fases, la primera consistió en obtener plántulas asépticas mediante el cultivo *in vitro* de semillas de *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina*. Para ello se emplearon cuatro diferentes medios basales tales como el testigo, tricloroacético, M.S. al 50% y Peter's, donde el porcentaje de germinación más alto para la primer especie fue del 100% en el M.S. y para la segunda fue de 61% en el Peter's.

En la segunda fase se realizaron cortes de las plántulas de *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina* para obtener inóculos de ápice y de tallo e inducir la formación de brotes y raíces adventicias para lo cual se estudiaron los efectos de nueve diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y ANA (benzilaminopurina y ácido naftalenacético) en tres diferentes medios de cultivo: Murashige y Skog (M.S. al 50%), Peter's y testigo (agua-agar).

Los inóculos se mantuvieron bajo condiciones de incubación controladas, los cuales respondieron morfogénicamente con la formación de brotes axilares y raíces adventicias. El análisis estadístico determinó que la mejor regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias* fue de los tratamientos pertenecientes al grupo A, mientras que para *Mammillaria bombycina* no se encontró diferencia significativa, por lo tanto los grupos A y B promovieron la brotación y enraizamiento del tejido vegetal de igual forma.

La tercer fase consistió en evaluar el desarrollo de callo que se presentó de manera espontánea en plántulas asépticas empleando tres medios de cultivo: Murashige y Skog (M.S. al 50%), Peter's y testigo (agua-agar) con nueve diferentes concentraciones de citocininas y auxinas. El tejido no presentó respuesta morfogénica, se concluyó que es necesario continuar con el estudio de esta parte del trabajo con la finalidad de encontrar las condiciones adecuadas que promuevan su diferenciación a brotes y raíces.

## I. INTRODUCCIÓN

El término biodiversidad se puede definir como la riqueza y variedad natural de organismos que existen en constelaciones de plantas, animales y microorganismos sostenidos como entes vivientes acomodados en forma compleja en los biomas o ecosistemas que caracterizan al planeta, pero también implica la distribución de los organismos, en muchos casos de sus interacciones, su diversidad genética, de su conservación, su uso, consumo y estudio (Dirzo, 1990; PROCER, 2007).

Cuanto mayor sea la diversidad vegetal en el mundo, más seres vivos se pueden beneficiar de ella. Como consecuencia la conservación de las floras regionales y de cada país, trae consigo la supervivencia de todas las formas de vida animal, incluyendo la especie humana (Neyra y Duran, 1988).

La flora mexicana está considerada como una de las más ricas y variadas del mundo, presentando también un elevado índice de endemismo, ya que varias entidades taxonómicas son autóctonas. Dentro de la gran diversidad florística de México, se encuentra la familia Cactaceae, la cual destaca por su amplia representatividad en el nivel genérico y específico. Su mayor significancia se alcanza en las regiones áridas y semiáridas, ampliamente representadas en México. Las cactáceas son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal por factores de perturbación, principalmente por la destrucción de sus hábitats naturales, depredación y la recolecta ilegal de las poblaciones silvestres, debido a que poseen una combinación de características biológicas y ecológicas inherentes que las hacen extremadamente vulnerables, por lo que se requiere de estrategias que permitan un conocimiento total de dichas especies vegetales para su propagación, conservación y usos a corto tiempo. Es importante señalar que es una familia muy demandada por su uso como plantas ornamentales (Hernández y Godínez, 1994; Quiala *et al.*, 2004).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades de la familia Cactaceae

Las cactáceas pertenecen al grupo de las llamadas xerófitas suculentas. Sus características morfológicas y anatómicas fueron adquiridas por herencia de caracteres de antiguas líneas evolutivas y por tendencias evolutivas más recientes, por lo que sus adaptaciones las hace altamente especializadas. El tallo tiene una estructura suculenta o crasa, puede almacenar y conservar agua en sus tejidos. La fotosíntesis se lleva a cabo generalmente en la superficie del tallo, sigue una ruta metabólica peculiar conocida como “metabolismo ácido crasuláceo” (CAM) economizando agua, ya que el intercambio gaseoso se realiza durante la noche cuando la temperatura del ambiente es más baja, reduciendo la superficie transpiratoria (Bravo-Hollis, 1978; Oviedo-Reyes, 2003; Manzo, 2010; Jiménez-Sierra, 2011).

La raíz facilita la absorción rápida del agua por la gran longitud que adquiere, además, es capaz de conservar el líquido. Los tubérculos o podarios son los pecíolos de las hojas hipertrofiadas. Las areolas (homólogas a las yemas) dan origen a hojas reducidas (espinas, escamas o gloquidios), nuevos tallos, flores, cerdas, pelos y raíces adventicias. Las espinas varían en tamaño, número y colorido según la especie, sirven como defensa frente a depredadores, como protección a la radiación solar y bajas temperaturas, algunas contribuyen a la dispersión de propágulos al adherirse al pelaje de algunos animales y ser transportados (Bravo-Hollis, 1978; Oviedo-Reyes, 2003; Manzo, 2010; Jiménez-Sierra, 2011).

Sólo en los géneros que divergieron primero (*Pereskia*, *Quiabentia* y *Pereskiopsis*) existen hojas integradas por limbo y pecíolo. Las flores se dividen en tres grupos según su forma: infundibuliforme, tubulares y campaniformes. Casi todas las cactáceas producen flores hermafroditas, las cuales suelen abrirse de día en la mayoría de los géneros, mientras que, otros lo hacen durante la noche. La mayoría de los cactus son alógamos (se necesitan dos individuos de la misma

especie para la fecundación). El polen es transportado por insectos, colibríes y murciélagos. Los frutos se denominan bayas y son carnosos, semicarnosos o secos, estos últimos en muchos casos son comestibles. Las semillas presentan variación en número, forma, tamaño, estructura y color de la testa dependiendo de la especie (Bravo-Hollis, 1978; Oviedo-Reyes, 2003; Manzo, 2010; Jiménez-Sierra, 2011).

## **2.2 Distribución geográfica de la familia Cactaceae**

Las cactáceas pueden encontrarse en diversos ecosistemas y cualquier tipo de vegetación a excepción de la acuática, alcanzando su máximo desarrollo en los matorrales xerófitos que abarcan diversos tipos de vegetación de las zonas áridas y semiáridas con la mayor extensión en México, prácticamente 30% de la cobertura total del territorio (SEMARNAT y CONABIO, 2009), así como en bosques tropicales caducifolios. Además, exhiben una extensa radiación en diversos hábitats, incluyendo el dosel arbóreo de los Neotrópicos, ya que aproximadamente el 10% de las especies son epífitas y semiepífitas (Cota-Sánchez, 2008). Son plantas nativas del continente americano. Se distribuyen desde el norte de Canadá, a una latitud de 56° N, hasta el estrecho de Magallanes en América del Sur a una latitud de 55° S y desde el nivel del mar, en dunas costeras, hasta los 5100 m en Perú (Bravo- Hollis y Sánchez Mejorada, 1991; Becerra, 2000; Jiménez-Sierra, 2011).

México es sin duda el principal centro de diversidad cactológica en América, como resultado en gran medida de la compleja topografía del territorio y su posición en el continente donde convergen diversos climas y confluyen las dos grandes regiones biogeográficas de América: la Neártica y la Neotropical, lo que origina una zona de transición de elementos florísticos templados y tropicales (Hernández-Oria *et al.*, 2007; PROCER, 2007).

No se tiene un consenso acerca del número exacto de géneros y especies de la familia Cactaceae. Sin embargo, Hernández y Godínez (1994) estiman que la misma cuenta con una riqueza de 300 géneros y un total de 2500 especies y se

siguen describiendo nuevas especies e inclusive géneros. Mientras que Padrón-Pereira (2012) calcula que dicha familia contiene entre 1500 y 1800 especies, tradicionalmente divididas en tres subfamilias: Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoideae, siendo sugerida una cuarta subfamilia: Maihuenioideae.

México es el más importante centro de concentración y abundancia de cactáceas, Bravo-Hollis (1978) y Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991), consideran 744, mientras que Hunt (1992) reconoce 559 especies. Hernández y Godínez (1994) calculan un total de 48 géneros y 563 especies.

El endemismo en la familia Cactaceae a nivel de especie alcanza valores de entre 78-80% (aproximadamente 517 especies) en México (Ortega-Baés y Godínez-Alvarez, 2006). En este sentido, al comparar los niveles de endemismo de especies de cactus en otros países encontramos que existen altas proporciones de cactáceas endémicas, entre los que destacan: Brasil (176), Perú (170), Argentina (158), Bolivia (153), Estados Unidos (86), y Chile (83) (Cota-Sánchez, 2008).

### **2.3 Importancia de las cactáceas**

Las cactáceas cumplen un papel importante en los aspectos ecológico, cultural, social, alimenticio, medicinal y económico. Desde el punto de vista ecológico son plantas que se adaptan muy bien en suelos pobres en materia orgánica. Son organismos que abren sus estomas durante la noche para incorporar CO<sub>2</sub> atmosférico y los cierran durante el día para evitar la pérdida de H<sub>2</sub>O por transpiración. Los estomas abren por la noche cuando la humedad del ambiente es más elevada e impiden que haya pérdida de agua del organismo hacia el exterior. Algunas cactáceas tienen en sus raíces micorrizas capaces de fijar el nitrógeno del aire (Ojeda-Zacarias *et al.*, 2008).

En cuanto a lo social y cultural, han representado un símbolo para nuestro país desde antes de la Conquista. Las antiguas tribus nahuatlacas que eran grupos de hombres errantes a los que sus dioses les habían prometido una tierra para poder establecerse, en el año 1325 encontraron un nopal que crecía sobre

rocas bañadas por las olas con una majestuosa águila real postrada, de tamaño y belleza excepcionales con una serpiente entre sus garras, sus alas se abrieron hacia el sol naciente, fundando sobre ese lugar la ciudad de Tenochtitlán (lugar del nopal petreo, de *Tenochtli*- formado por, *Tetl*- piedra, *Nochtli*- nopal y *Tlan*- lugar de). Antecedentes históricos e información cultural registran la importancia que adquirieron entre tribus prehispánicas y se ha confirmado en códices indígenas que escaparon de la destrucción, por lo que tienen un alto valor étnico y más recientemente científico (Sánchez-Mejorada, 1982).

Algunos frutos y tallos de las cactáceas forman parte de la dieta alimentaria de los pueblos indígenas de zonas áridas y semiáridas del país, se consumen como fruta de temporada, aguas frescas, helados o paletas, botana, ensalada, acompañando carnes o pescados, mermeladas, como fruta en almíbar o pasas, licor, las flores se consumen como verdura en algunos guisos. Con respecto a sus propiedades medicinales, contienen sustancias químicas (alcaloides, saponinas, pigmentos y antibióticos) de interés farmacológico e industrial y hasta cosmético en la producción de gomas, jabones, cauterizador, tintas, entre otros (Manzo, 2010; Ojeda-Zacarias *et al.*, 2008; Arias, 2010).

En el ámbito económico, han sido objeto de comercio en mercados por su rareza y belleza, como plantas ornamentales que alcanzan costos elevados en dólares en Estados Unidos de América, Europa y Asia. El ornamental es el uso más relevante para este grupo de cactáceas; existe comercio legal (Viveros, UMAs) pero también ilegal, sobre todo internacional (Manzo, 2010; Ojeda-Zacarias *et al.*, 2008).

También cabe mencionar que las cactáceas son importantes desde el punto de vista de la construcción, delimitación de terrenos y por la gran cantidad de productos y usos que el hombre ha obtenido de ellas, pudiendo mencionar material de construcción, leña, herramientas, postes, sellador y uso ceremonial. También son utilizadas como forraje y juguetes. La diversidad de la familia ha sido alterada por la modificación de sus ecosistemas, poniendo en riesgo a varias de sus especies (Manzo, 2010; Sánchez-Mejorada, 1982; Ojeda-Zacarias *et al.*, 2008; Arias, 2010).

## II.4 Marco legal de las cactáceas

Las cactáceas son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal. Han sido sometidas a presiones antropogénicas por la transformación del hábitat, la sobreexplotación de especies, contaminación de los ecosistemas e introducción de especies invasoras, principalmente (SEMARNAT y CONABIO, 2009).

La transformación del hábitat implica cambios en la cobertura y uso del suelo, debido al crecimiento de comunidades urbanas y rurales, así como de la infraestructura (camino, carreteras, tendidos eléctricos y presas), de igual forma actividades de tipo agrícolas y ganaderas. La extracción ilegal de organismos de su medio natural, transporte o comercio no autorizado de ejemplares, afecta directamente a las poblaciones silvestres de flora en México, lo que ubica a la sobreexplotación de las especies entre los principales factores responsables de la extinción local. Las diversas actividades antropogénicas han propiciado la degradación de los hábitats (SEMARNAT y CONABIO, 2009) y con ello han contribuido a la disminución de poblaciones de cactáceas.

Una de las herramientas comúnmente usadas para valorar el estado actual de las especies es su representatividad en las listas internacionales de especies con prioridad en conservación. Tal es el caso de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) que evalúa el estado de conservación de las especies alrededor del mundo, o los Apéndices de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2009), que tiene como función establecer un marco de referencia legal internacional para la prevención del comercio de las especies amenazadas con los diferentes niveles de amenaza que resultan de su comercio internacional y sus restricciones particulares.

En el plano nacional, existe un marco legal conocida como Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010 para la protección ambiental de especies de flora y fauna silvestre mexicana en categorías de riesgo, se elaboró para la conservación de la biodiversidad en nuestro país, la cual incluye de manera

particular a la familia Cactaceae y sus componentes. Siendo su objetivo reconocer las especies o poblaciones silvestres en riesgo en el territorio mediante un listado para la protección, aprovechamiento y comercio de los organismo (CONABIO y SEMARNAT, 2008; SEMARNAT, 2010).

A pesar de los esfuerzos, la extracción de especies de sus hábitats no ha disminuido y su demanda sigue creciendo. Esto aunado a su distribución restringida, lento crecimiento, bajo índice de reproducción y supervivencia así como la sobreexplotación, es importante plantear estrategias de conservación y protección, lo que hace necesario desarrollar proyectos que ayuden a resolver esta problemática. Una técnica que ha sido utilizada con éxito en la propagación de algunas especies de cactáceas es el cultivo de tejidos vegetales (Ojeda-Zacarias *et al.*, 2008).

## **II.5 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales, se refiere a una serie de técnicas que se utilizan en investigación y en producción comercial de productos de origen vegetal. Una de sus aplicaciones es la micropropagación. Los términos micropropagación, propagación *in vitro* y propagación por cultivo de tejidos vegetales, son sinónimos y hacen referencia al procedimiento que consiste en el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos, en un medio de cultivo artificial para lograr el desarrollo y producción de plantas completas *in vitro*. El proceso de propagación *in vitro* conlleva cinco fases: Fase 0) la selección de plantas madre donadoras de inóculos, las cuales deben encontrarse en condiciones fisiológicas y sanitarias óptimas; Fase 1) el establecimiento del cultivo, se introducen los inóculos iniciales previamente sometidos a una desinfección bajo condiciones de asepsia en el medio que darán origen a embriones somáticos o brotes; Fase 2) multiplicación, a partir de las yemas axilares de los tallos en desarrollo o mediante la inducción de yemas adventicias; Fase 3) elongación de los tallos, crecimiento y enraizamiento; y Fase 4) aclimatación de plantas completas trasplantadas a un substrato (*ex vitro*)

mediante la exposición progresiva a condiciones controladas de luz, temperatura y humedad (Barba *et al.*, 2001; Quiala *et al.*, 2004).

La técnica de cultivos de células vegetales posee las características siguientes: a) Se realiza a microescala, b) optimiza las condiciones ambientales, en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y hormonales, c) elimina todos los microorganismos (hongos y bacterias), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nematodos), d) generalmente no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, permitiendo que un tejido aislado pueda dar origen a un callo, o pueda desarrollarse de otras formas poco usuales—por ejemplo, la formación de órganos, embriogénesis somática—, e) la capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permiten manipulaciones que antes eran imposibles (Martínez-Rendón, 2007).

## **II.6 Tipo de cultivos**

Una planta está compuesta de diferentes partes como son órganos, tejidos y células, por lo cual existen diferentes tipos de cultivo *in vitro* (George y Sherrington, 1984) que a continuación se enlistan:

Cultivo de plantas intactas: se inicia con la siembra de semillas *in vitro*, obteniéndose primero plántulas y finalmente una planta. Cultivo de embriones: cultivo del embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla. Cultivo *in vitro* de un órgano aislado: existen distintos tipos—por ejemplo, cultivo de meristemas, de ápices del vástago, de raíces, de anteras—. generalmente una porción (de tejido o un órgano) aislado de una planta—inóculo— y su cultivo. Cultivo de callo: denominado así, cuando una porción de tejido es desdiferenciado *in vitro*, originando una masa amorfa de células denominada callo. Cultivo de células aisladas: es el crecimiento de células individuales, obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión, con la ayuda de enzimas o mecánicamente. Cultivo de protoplastos: obtenidos a partir de células, por digestión enzimática de la pared.

## II.7 Cultivo de tejidos vegetales en cactáceas

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido aplicadas satisfactoriamente en la propagación de diferentes especies de cactáceas amenazadas. Entre estas especies se encuentran: *Astrophytum capricorne*, *Mammillaria sp*, *Melocactus holguinensis*, *Melocactus matanzanus*, *Pilosocereus robinii* y *Pilosocereus sp*. En general las cactáceas se han propagado usando inóculos como areolas y mediante la germinación de semillas, siendo éstas últimas el material vegetal inicial más utilizado, las cuales varían en abundancia en el fruto de acuerdo a la especie con la que se trabaje, se desinfectan y establecen fácilmente con el empleo de hipoclorito de sodio, las mismas que se colocan directamente en el medio de cultivo (Manzo, 2010; Quiala, *et al.*, 2003).

Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en compuestos orgánicos (carbohidratos, hormonas, vitaminas, aminoácidos, amidas, purinas, pirimidinas, hexitales y ácidos orgánicos), sales inorgánicas (macro y micronutrientes), complejos naturales (pulpa de plátano, leche de coco, emulsión de pescado, zumos de frutas, extractos de levadura e hidrolizado proteico) y materiales de soporte (agar) (Murashige, 1974; Manzo, 2010). Se ha observado en un gran número de cactáceas que la proliferación de brotes axilares se obtiene al adicionar al medio de cultivo cantidades altas de citocininas para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas laterales, aunque los brotes en crecimiento son capaces de sintetizar pequeñas cantidades de citoquininas, es insuficiente para soportar el desarrollo y crecimiento *in vitro*. Por lo que más del 85% de los medios de cultivo empleados en la micropropagación incluyen como suplemento alguna citoquinina. El regulador del crecimiento más utilizado para la obtención de nuevos brotes en la familia Cactaceae es la 6-BAP (6-bencilaminopurina), en combinación con el regulador del crecimiento ANA (ácido naftalenacético) en cantidades bajas (Pérez-Molphe, *et al.*, 1998; Ruvalcaba-Ruiz, *et al.*, 2010; Quiala, *et al.*, 2003).

Malda *et al.* (1999) consiguieron una multiplicación masiva de plantas de *Escobaria mínima* y *Obregonia denegri*, de la dos especies, la última se encuentra

en peligro de extinción. Hicieron una comparación de cultivos *in vitro* y *ex vitro* y registraron una tasa de crecimiento mayor *in vitro*, tal vez debido al uso de reguladores de crecimiento.

## **II.8 Generalidades e importancia de las especies estudiadas**

### **II.8.1 *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem.**

*Astrophytum asterias* está clasificada como especie en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010 y se encuentra enlistada en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2009), que protege y regula a las especies del comercio internacional.

El género *Astrophytum* consta de cinco especies, todas apreciadas comercialmente. *A. asterias* habita en matorral espinoso tamaulipeco que ha sido bastante impactado por la influencia humana. En las regiones donde se distribuye se han observado consecuencias negativas sobre la distribución y abundancia de esta especie (U. S. Fish y Wildlife Service, 2003). El cambio de uso de suelo para actividades agrícolas y ganaderas han deteriorado el matorral al grado de colocar a varias especies en riesgo de desaparecer.

El cultivo de *Astrophytum asterias* por semillas no es difícil en invernaderos. La dificultad radica en la obtención de semillas, dado que se trata de especies de polinización cruzada. En las localidades donde habita se suele macerar con etanol ya que por su parecido al peyote (*Lophophora williamsi*) se le atribuye propiedades curativas y alucinógenas. Resulta también muy apreciado en horticultura (Torres *et al.*, 2010)

Es una planta pequeña de tallo globoso, aplanado de 4 a 7 cm de altura y 6 a 15 cm de diámetro. De color verde claro a oliváceo grisáceo, con tricomas o escamas blancas, sin espinas. El cuerpo está dividido en ocho secciones vagamente triangulares; cada sección está formada por 6 a 10 hendiduras estrechas (generalmente son 8), redondeadas y aplanadas que dividen a la planta. Las areolas se sitúan en fila sobre las costillas. Durante períodos de

humedad, el cactus es de color verde opaco y durante las sequías, la planta se vuelve marrón y se entierra a ras del suelo, camuflado casi a la perfección. Resiste temperaturas promedio de 21 a 24 °C a mínimas de 5 °C. Las flores son de color amarillo con el centro naranja, de 3 cm de largo y 6 a 15 cm de diámetro (figura 1). Florece de abril a octubre. Los frutos son de color verde a gris-rojizo, algo oscurecidos por lanosidad blanca, alrededor de 1.25 cm de largo, ovales y carnosos en la madurez. Las semillas se producen de 56 a 95, brillantes, de color pardo oscuro, con una ampliación de la cámara de la cubierta formando un collar alrededor del hilo. Se le conoce como cacto estrella o falso peyote (Ballesteros, 1978; Martínez-Ávalos *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2010; U. S. Fish y Wildlife Service, 2003).

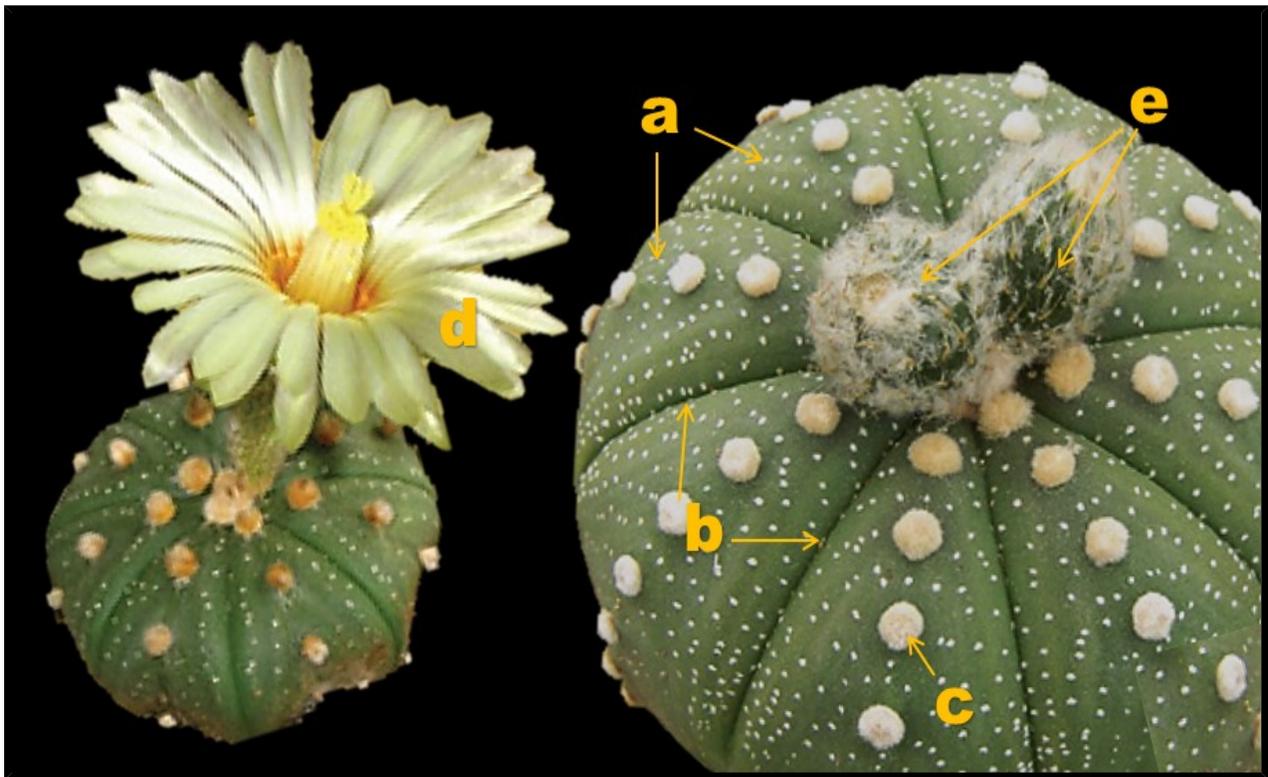


Figura 1. *Astrophytum asterias*. a) se muestran las secciones vagamente triangulares. b) hendiduras estrechas. c) areolas. d) flor. e) frutos.

*Astrophytum asterias* se distribuye en zonas áridas y semiáridas de Tamaulipas y Nuevo León, en México y sur de Texas, en Estados Unidos de América (figura 2). Se establece en dos tipos de comunidades vegetales: matorral espinoso tamaulipeco (MET) y matorral submontano (MS), a altitudes de 50 a 180 metros en sitios con temperatura promedio anual de 21 a 24°C. Se encuentra en áreas bajo diferentes tipos de suelos ricos en materia orgánica, en suelos calizos, francos y arcillosos, en pendientes con alta pedregosidad (grava) así como en sitios susceptibles a inundaciones (U. S. Fish y Wildlife Service, 2003).

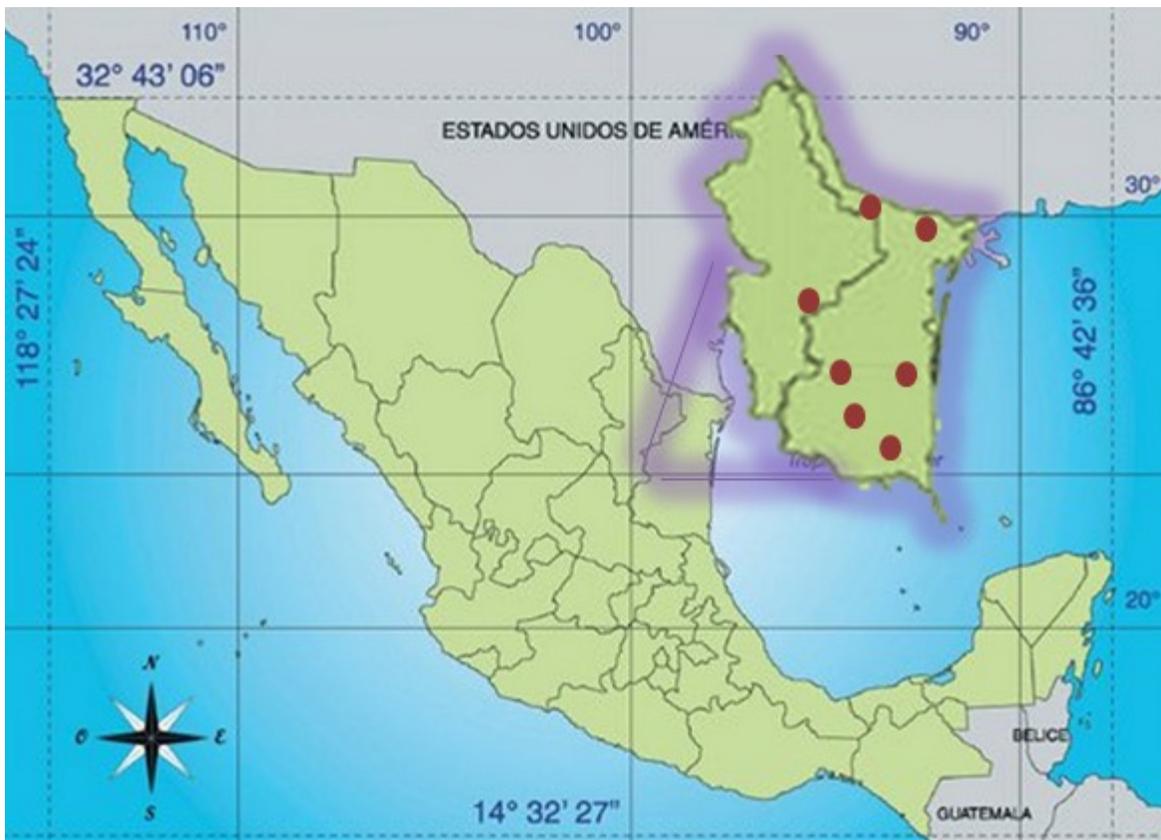


Figura 2. Distribución geográfica de *Astrophytum asterias* (tomado de [conevyt.org.mx](http://conevyt.org.mx) y modificado de acuerdo a Torres *et al.*, 2010).

### **II.8.2 *Mammillaria bombycina* Quehl**

*Mammillaria bombycina* es una especie de gran valor ecológico, ornamental y económico, endémica de México, que se distribuye en Aguascalientes y Jalisco (Figura 4), específicamente en la Ciénega de Quijas, sobre el nivel del mar a 2350 m. Se encuentra catalogada como especie sujeta a Protección especial por la NOM-059-ECOL-2001 y se encuentra en el Apéndice II de CITES (CITES, 2009)

Plantas de tallo simple o cespitoso en la base, globoso-aplanado cuando jóvenes, cortamente cilíndrico, claviforme cuando adultos. Alcanzan 18 cm de altura y 7 cm de diámetro, ápice hundido y provisto de abundante lana blanca. Se ramifica por brotes basales o laterales y llegan a formar colonias o matas con los hijuelos que emergen. Los tubérculos están dispuestos en series espiraladas de 11 a 18; cónicos a cilíndricos redondeados en el ápice y axilas con fieltro de color blanco. Con mucílago acuoso o latex. Las areolas son dimorfas, las espiníferas están situadas en el ápice de los tubérculos, provistas de fieltro cuando jóvenes, con o sin cerdas. Las espinas se diferencian en centrales y radiales (a veces sólo radiales o centrales), son variables en formas (rectas, ganchudas, delgadamente aciculares y lisas), en número (de 30 a 40, espinas centrales de 2 a 4), en longitud de 2 a 20 mm (la espina superior de 7 mm, la inferior de 20 mm) y en color (blancas a amarillentas o ámbar con la punta marrón a pardo rojizo): están dispuestas en las areolas en formas diversas. Las flores generalmente se disponen cerca del ápice (corona), de aspecto infundibuliforme o campanulado, de 15 mm de longitud y diámetro, con el margen ciliado, de color verde rojizo hacia la base y arriba de color blanco, amarillo, rosado, rojo o púrpura; el pedicarpelo sin escamas (figura 3). Los frutos son bayas pequeñas, más o menos globosas o priformes a claviformes, de 20 mm de longitud por 10 mm de diámetro. Las semillas tienen testa de estructura reticulada, foveolada y de color castaño rojizo oscuro a negra; el embrión es ovoide o algo cilíndrico, muy succulento, con cotiledones reducidos (Ballesteros, 1978; Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Charle, 2008).

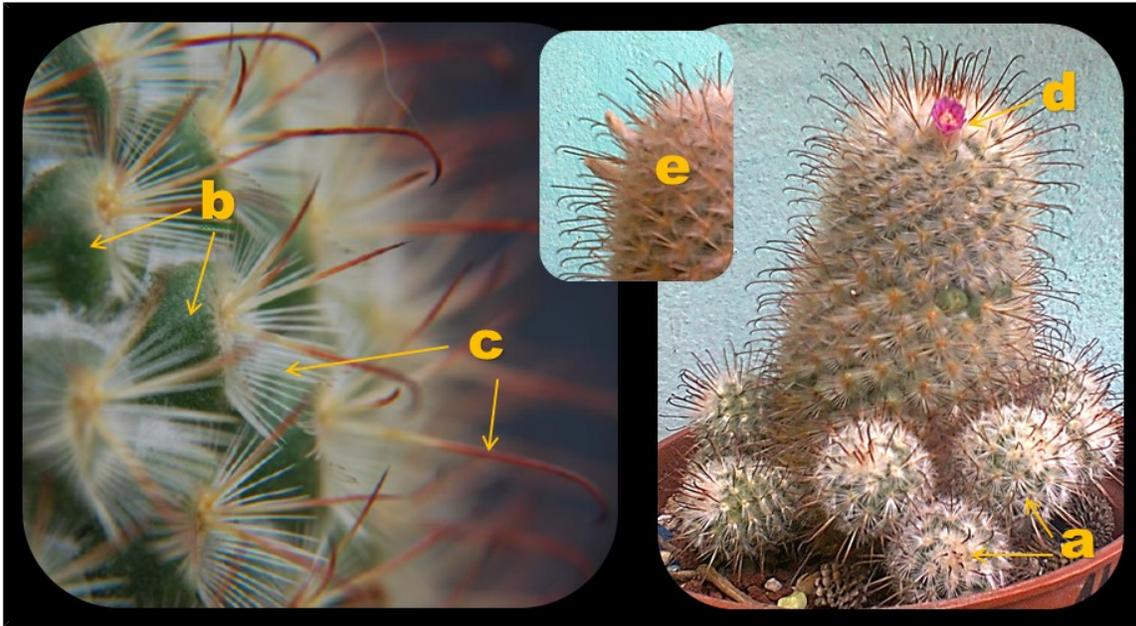


Figura 3. *Mammillaria bombycina*. 3a brotes. 3b detalle de los tubérculos o mamilas. 3c espinas radiales y centrales. 3d flor. 3e frutos emergentes.

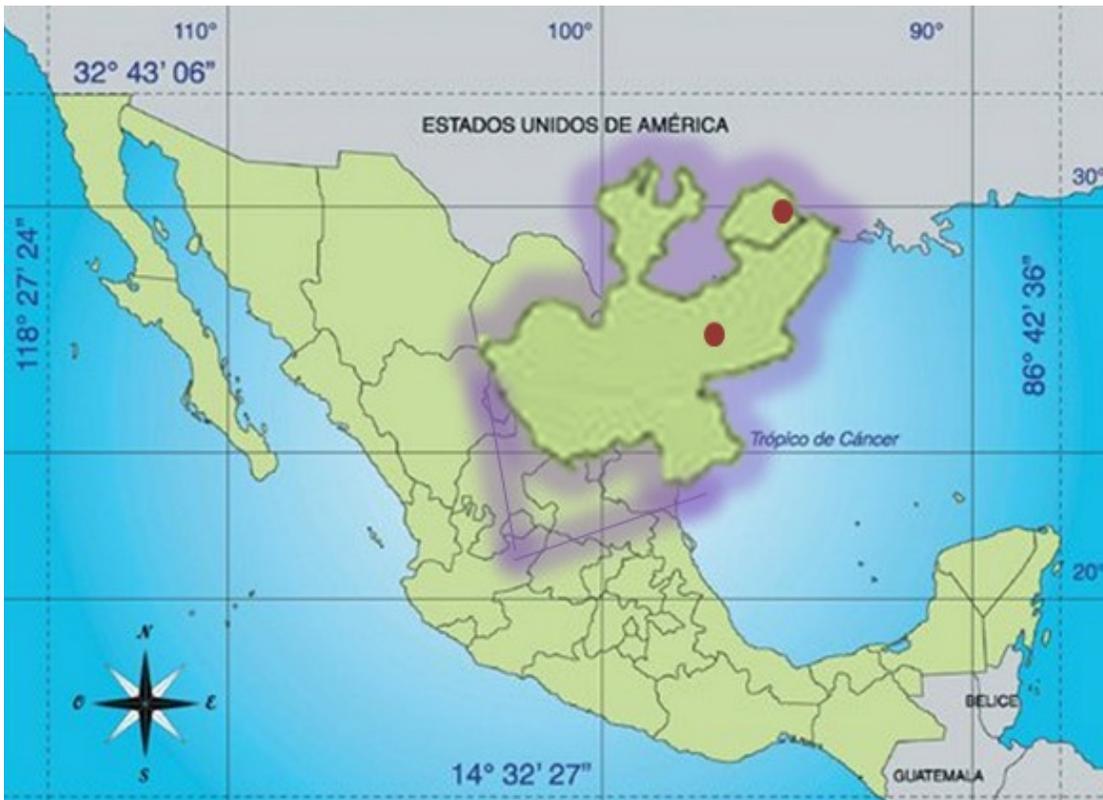


Figura 4. Distribución geográfica de *Mammillaria bombycina* (tomado de conevyt.org.mx y modificado de acuerdo a Guzmán *et al.*, 2003).

### III. JUSTIFICACIÓN

México es reconocido como uno de los países más importantes por su biodiversidad y su gran diversidad vegetal, dentro de la cual destaca la familia Cactáceae (Quiala, *et al.*, 2004; PROCER, 2007; Ojeda-Zacarias *et al.*, 2008; Manzo, 2010). En la actualidad, casi todas las especies están severamente amenazadas debido a la destrucción de su hábitat natural y la sobreexplotación de ejemplares silvestres, debido a la popularidad que han adquirido en el nivel mundial y alta demanda de organismos por lo atractivo de su forma, variedad de sus espinas y la belleza de sus flores. Es así que se ha colocado a las cactáceas en tratados y listados que establecen su preservación como especies raras, amenazadas o en peligro de extinción, como son la Norma Oficial de la Federación (NOM-059-Ecol-2010) y la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES).

Se requiere aplicar métodos que aseguren la preservación de las especies de cactáceas, por ejemplo la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales en la propagación de especies en peligro de extinción que permita obtener plantas que puedan ser utilizadas para realizar investigaciones, así como para ofrecer una alternativa para su comercialización y uso (CITES, 1995; SEMARNAT, 2010; Quiala, *et al.*, 2004; Manzo, 2010).

*Astrophytum asterias* no emite vástagos, lo que hace necesario realizar estudios de su propagación a partir de semillas, mientras que para *Mammillaria bombycina*, que si emite brotes, es indispensable el estudio del comportamiento de la especie desde su propagación a partir de semillas. Ambas especies se encuentra catalogadas como sujetas a Protección especial por la NOM-059-ECOL-2010 y están en el Apéndice II de CITES con una categoría 2. A estos factores hay que añadir sus características reproductivas: son plantas de lento crecimiento (Ballesteros, 1978; Hernández y Godínez, 1994; CITES, 2009; Manzo, 2010).

#### **IV. HIPÓTESIS**

Se espera que al cultivar inóculos apicales y laterales de plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas de *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina*, se formen brotes aéreos cuando la concentración de citocinina sea mayor a la de auxina. Si la concentración de auxina es superior a la de citocinina se formarán raíces adventicias.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **V.1 Objetivo general**

Obtener plantas completas de *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina* a través de la propagación *in vitro* de cultivo de tejidos vegetales.

##### **V.2 Objetivos particulares**

Evaluar el porcentaje de germinación de *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina* en cuatro tratamientos diferentes: medio MS, fertilizante Peter's, ácido tricloro-acético y testigo (agua con agar).

Estudiar el efecto de nueve diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y ANA (benzilaminopurina y ácido naftalenacético) en la morfogénesis de inóculos apicales y laterales de plántulas de *Astrophytum asterias* en tres medios de cultivo.

Estudiar el efecto de nueve diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y ANA (benziladenina y ácido naftalenacético) en la morfogénesis de inóculos de plántulas de *Mammillaria bombycina* en tres medios de cultivo.

Evaluar el desarrollo de callo de ambas especies utilizando tres medios de cultivo: Murashige y Skog (M.S. al 50%), Peter's y testigo (agua con agar).

## **VI. MATERIAL Y MÉTODO**

### **VI.1 Material biológico**

Las semillas de *Astrophytum asterias* fueron adquiridas con un proveedor en un invernadero ubicado en Cuernavaca. Las semillas de *Mammillaria bombycina* fueron recolectadas y extraídas de frutos secos de organismos reproductivos adquiridos en el mercado de Cuernavaca en diferentes fechas de 2010 y 2012. Las semillas beneficiadas de ambas especies se etiquetaron y depositaron en frascos de vidrio a temperatura ambiente, para evitar su contaminación, humedecimiento o pérdida.

### **VI.2 Medios de cultivo**

Para el diseño experimental se prepararon cuatro tratamientos, el testigo y tres medios de cultivo: 1) tratamiento con ácido tricloroacético, 2) Peter's y 3) M.S. al 50%. Todos los tratamientos estuvieron constituidos principalmente de agua destilada y agar-agar. En cada medio se realizaron cinco repeticiones y cada frasco contenía 20mL de solución. Se esterilizaron durante 15 minutos en autoclave a 1.5 kg/cm<sup>2</sup> a una temperatura de 120 °C.

El testigo estuvo constituido por agua destilada y agar, el pH fue de 5.7± y con este dato se procuró que los otros tres medios tuvieran esta medida. Para lo cual se utilizó ácido clorhídrico (HCl). Para el medio de cultivo denominado "ácido tricloroacético" se empleó para ajustar el pH a 5.7 el ácido tricloroacético (Cl<sub>3</sub>CCOOH).

En el medio M.S. se utilizaron 4.2 gL<sup>-1</sup> de macro y micronutrientes al 50% de la fórmula original empleada por Murashige y Skog (cuadro 1) y en el medio Peter's se agregaron 5 gL<sup>-1</sup> de un balance nutricional de sales (cuadro 2) En ambos se adicionaron vitaminas en las cantidades de 2.5 mgL<sup>-1</sup> de niacina, 0.5 mgL<sup>-1</sup> de piridoxina y 2 mgL<sup>-1</sup> de tiamina, como fuente de carbohidratos se utilizaron 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa. Se agarizó cada uno de los medios con 5 gL<sup>-1</sup>.

Cuadro 1. Comparación de la cantidad empleada del medio MS al 50% en mg.L-1 con la fórmula original de Murashige-Skoog (1974).

<b>Macronutrientes</b>	<b>100%</b>	<b>50%</b>	<b>Micronutrientes</b>	<b>100%</b>	<b>50%</b>
<b>NO<sub>3</sub> NH<sub>4</sub></b>	1650	825	<b>BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub></b>	6.2	3.1
<b>NO<sub>3</sub>K</b>	1900	950	<b>SO<sub>4</sub>Mn. 4H<sub>2</sub>O</b>	22.3	11.15
<b>SO<sub>4</sub> Mg.7H<sub>2</sub>O</b>	370	185	<b>SO<sub>4</sub>Zn. 4H<sub>2</sub>O</b>	8.6	4.3
<b>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>K</b>	170	85	<b>MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.25	0.125
<b>Cl<sub>2</sub> Ca.2H<sub>2</sub>O</b>	440	220	<b>SO<sub>4</sub>Cu. 5H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.0125
<b>EDTA Na<sub>2</sub></b>	37.3	18.65	<b>Cl<sub>2</sub>Co. 6H<sub>2</sub>O</b>	0.025	0.0125
<b>SO<sub>4</sub>Fe.7H<sub>2</sub>O</b>	27.8	13.9	<b>IK</b>	0.83	0.415

Cuadro 2. Balance nutrimental de las sales utilizadas en la germinación *in vitro* de semillas de las especies *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina* (tomado de Romero, 2008).

<b>Macronutrientes</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Micronutrientes</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Nitrógeno Total (N)</b>	24	<b>B</b>	0.00034
<b>Amoniacal</b>	5.4	<b>Cu</b>	0.02
<b>Nitrato</b>	4.8	<b>Mn quelado</b>	0.02
<b>Urea</b>	14	<b>Mo</b>	0.0009
<b>P<sub>2</sub>O<sub>3</sub> disponible</b>	8	<b>Zn</b>	0.0009
<b>K<sub>2</sub>O soluble</b>	16	<b>Otros</b>	36.9
<b>Mg total</b>	0.4		
<b>S</b>	4.7		

### VI.3 Escarificación y desinfestación de semillas

Para facilitar el manejo de las semillas, estas se colocaron en una gasa estéril que se sujetó con hilo de algodón para evitar su pérdida y se sometieron a una inmersión en 100 mL de agua a 50° C durante cinco minutos. Se verificó que la temperatura se mantuviera lo más constante posible. Se optó por este tratamiento debido a que en experiencias pasadas, se observó que germinaron rápidamente. Una vez que las semillas fueron escaldadas, se retiró la gasa y fueron sumergidas en etanol al 70% durante cinco minutos. Enseguida se enjuagaron con agua destilada estéril y tres gotas de jabón líquido comercial Ajax® durante 30 minutos sobre una parrilla de calentamiento con agitación constante. Posteriormente fueron enjuagadas y colocadas en una solución de hipoclorito de sodio comercial

4:1. Transcurridos 20 minutos, las semillas se lavaron con agua destilada estéril de tres a cinco veces hasta que se retiró toda la espuma posible. Este último procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones.

#### **VI.4 Siembra *in vitro* (germinación)**

Se colocaron ocho semillas de *Astrophytum asterias* en cada frasco que funcionó como unidad experimental y 20 semillas de *Mammillaria bombycina* por frasco. En total se emplearon 40 frascos, 20 por especie y 160 semillas de *A. asterias* y 400 semillas de *M. bombycina*. Los cultivos se colocaron en una cámara de incubación, donde recibieron 16 horas luz por ocho de oscuridad con una temperatura de 26° C.

Como criterio de germinación para ambas especies se tomó en cuenta el rompimiento de la testa de las semillas y la emergencia de la radícula. Cada semana se registró el número de semillas germinadas por frasco. Los datos se obtuvieron a lo largo de siete semanas. Posteriormente se obtuvo el porcentaje de germinación total. Se realizaron gráficas de germinación acumulada por cada una de las especies para los cuatro tratamientos con el programa Microsoft Excel 2010.

#### **VI.5 Regeneración *in vitro* (corte y cultivo de inóculos)**

Para la regeneración *in vitro* se prepararon medios de cultivo M.S. al 50% y Peter's y el medio testigo conformado por agua y agar-agar. Para cada uno de estos medios de cultivo se experimentó con nueve tratamientos que consistieron diferentes concentraciones y combinación de BAP (bencil amino purina) y ANA (ácido naftalén acético). El diseño de la combinación de ambos reguladores del crecimiento se observa en el cuadro 3.

Cuadro 3. Concentración y combinación de hormonas del crecimiento vegetal.

	Tratamientos								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
ANA (mgL-1)	0	0	0	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5
BAP(mgL-1)	0	1	2	0	1	2	0	1	2

El material biológico que se empleó para las pruebas de regeneración *in vitro* fueron las plántulas obtenidas de la germinación aséptica. Se procuró que fueran de organismos bien desarrollados y grandes. Para evitar la oxidación del material vegetal se realizaron cortes sumergidos en una solución de ácido ascórbico en agua destilada (1g / 1L). Se seccionaron las plántulas con cortes apicales y laterales (Figura 5). En total se obtuvieron tres inóculos por cada plántula empleada, los mismos que se plantaron en los medios de cultivo. Los inóculos fueron plantados de forma separada para evitar su posible muerte o contaminación. Los cultivos se colocaron en la cámara de incubación bajo un fotoperiodo de 16 horas luz por ocho de oscuridad a una temperatura de 26 °C.

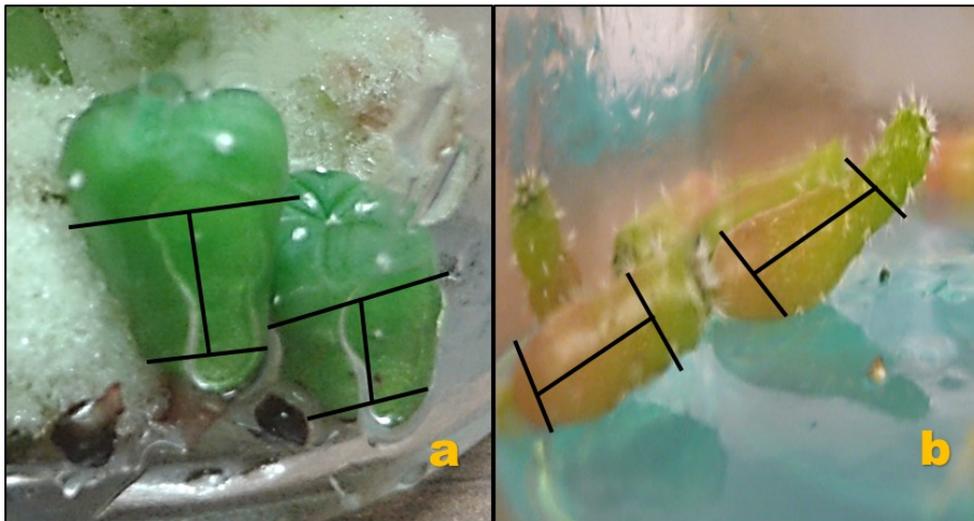


Figura 5. Corte transversal y lateral de plántulas obtenidas de la germinación aséptica de semillas de *Astrophytum asterias* (a) y *Mammillaria bombycina* (b).

Las variables de respuesta cuantificadas fueron el número de raíces adventicias y brotes producidos por inóculo. Asimismo se registró la oxidación por unidad experimental, formación o no de callo, friabilidad y coloración del mismo. A las variables cuantitativas se les aplicó un análisis estadístico con un diseño completamente al azar, en el cual se determinó el valor de F calculada para encontrar la diferencia significativa. Para este análisis se empleó el programa Microsoft Excel 2010.

## VI.6 Obtención de tejido calloso

Además de los inóculos apicales y laterales empleados para ser cultivados *in vitro*, también se utilizó tejido calloso obtenido de plántulas “reventadas” de la prueba de germinación. El tejido seleccionado fue cortado en inóculos que se colocaron tres cortes por frasco en dos medios: MS y Peter’s y el testigo conformado por agua y agar-agar. Se realizaron tres tratamientos (cuadro 4) hormonales por medio de cultivo. Se hicieron cinco repeticiones por tratamiento. Las variables morfogénéticas que se evaluaron fueron el número de raíces y brotes adventicios con un análisis estadístico para un diseño completamente al azar, donde se determinó el valor de F calculada, mediante el empleo del programa Microsoft Excel 2010.

Cuadro 4. Tres tratamientos con diferente combinación de hormonas del crecimiento vegetal.

Tratamientos		
ANA (mgL-1)		BAP(mgL-1)
0	T1	0
0.1	T2	1
0.5	T3	2

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Desinfestación de semillas

Se obtuvo una contaminación de 18.75% por bacterias y 5% por hongos en el medio Peter's de los cultivos de *Mammillaria bombycina* tanto en el medio empleado para la germinación como en el de la morfogénesis. No se observó contaminación en *Astrophytum asterias* en ningún tratamiento.

### VII.2 Germinación

#### VII.2.1 Germinación de semillas de *Astrophytum asterias*

El cien por ciento de germinación se alcanzó con el medio M. S. al 50%, seguido del medio tricloacético con 75 por ciento. Con el medio Peter's se obtuvo 65.6 por ciento y la germinación más baja fue en el testigo con 53.1 por ciento (cuadro 5). La ruptura de la testa y la emergencia de la radícula inició en el medio M.S. al 50% y testigo durante la primera semana. Mientras que la germinación en el medio Peter's y tricloacético fue hasta la segunda semana. El porcentaje total de germinación en el medio testigo y tricloacético se consiguió en la tercera semana de iniciado el experimento de germinación. En cambio en el medio M.S. al 50% fue hasta la cuarta y el del medio Peter's hasta la sexta semana (figura 6).

Cuadro 5. Porcentaje de germinación de semillas de *Astrophytum. asterias*.

Medios	Porcentaje de germinación por semana							Total
	1	2	3	4	5	6	7	
Testigo	40.62	40.62	53.12	53.12	53.12	53.12	53.12	53.1%
Tricloroacético	0	41.66	75	75	75	75	75	75%
M. S. 50%	42.5	57.5	95	100	100	100	100	100%
Peter's	0	40.62	62.5	62.5	62.5	65.62	65.62	65.6%

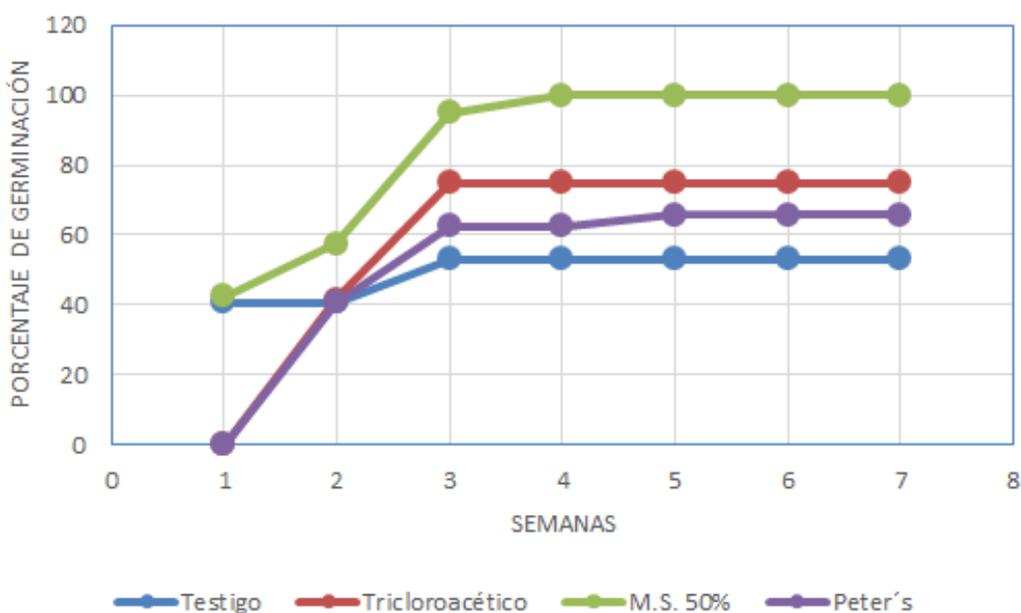


Figura 6. Comparación de los porcentajes de germinación de *Astrophytum asterias*.

Para determinar si existió diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó un análisis estadístico para un diseño completamente al azar, utilizando los datos del número de plántulas emergidas por tratamiento de la germinación *in vitro* de *Astrophytum asterias* (cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza de los datos de la germinación de *Astrophytum asterias*.

GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM= cuadrado medio, F cal.= F calculada y F tab.= F de tablas.

Fuentes de Variación	GL	SC	CM	F cal.	F tab.
Tratamientos	3	435.45	145.15		0.05= 3.239
Error	16	244.8	15.3	9.4869	0.01= 5.292
Total	19	680.25			

El análisis estadístico mostró que existió diferencia significativa siendo el valor de F calculada mayor a los valores de F de tablas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos evaluados para la germinación *in vitro* de semillas de *Astrophytum asterias*. Para lo cual se aplicó una prueba de Duncan para identificar el medio que mejor

promovió la germinación de dicho material. Para realizar esta prueba se tomaron los rangos estudentizados significativos (RES) para  $p$  (número de medias para rangos probados) de 2-4 y se calcularon los rangos mínimos significativos (RMS) con  $\alpha=0.05$  (cuadro 7) y  $\alpha=0.01$  (cuadro 8).

Cuadro 7. Valores de RES y RMS para experimento con  $\alpha=0.05$

<b>P</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>RES</b>	2.99	3.14	3.23
<b>RMS</b>	5.24	5.49	5.65

Cuadro 8. Valores de RES y RMS para el experimento con  $\alpha=0.01$

<b>P</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>RES</b>	4.13	4.3	4.42
<b>RMS</b>	7.22	7.54	7.53

Las medias correspondientes a cada tratamiento de menor a menor de acuerdo a su valor son: testigo 2.42, tricloroacético 2.57, Peter's 3 y M.S. 6.14. Con lo cual se demuestra que existe diferencia significativa entre algunos de los tratamientos y por lo que observa al tratamiento M.S. al 50% como el más adecuado para la germinación de semillas de cactáceas de la especie *Astrophytum asterias*, seguido de los tratamientos Peter's, tricloroacético y testigo como los menos adecuados para la germinación del material biológico, debido a que son significativamente iguales.

### VII.2.2 Germinación de semillas de *Mammillaria bombycina*

El comportamiento de la germinación en *Mammillaria bombycina* se puede observar el cuadro 9 y la figura 7. El porcentaje de germinación mayor se logró en el medio Peter's con 61 por ciento, seguido del medio tricloroacético con 54 por ciento y por último el medio MS con 49 y el testigo con 48 por ciento (cuadro 6).

La germinación inicio lentamente en la primera semana en el medio Peter's con la emergencia de la radícula en una semilla. A partir de la segunda semana se

presenta germinación en todos los demás medios de cultivo (cuadro 6 y figura 7). El porcentaje de germinación total se alcanza en la quinta semana en el medio Peter's y en la sexta semana se concluye la germinación en los medios MS, tricloacético y testigo (cuadro 9 y figura 7).

Cuadro 9. Porcentaje de germinación de semillas de *Mammillaria bombycina*

Medios	Porcentaje de germinación por semana							Total
	1	2	3	4	5	6	7	
Testigo	0	5	6	6	10	48	48	48%
Cl <sub>3</sub> COOH	0	7	9	9	15	54	54	54%
M.S. al 50%	0	13	34	40	45	49	49	49%
Peter's	1	25	56	60	61	61	61	61%

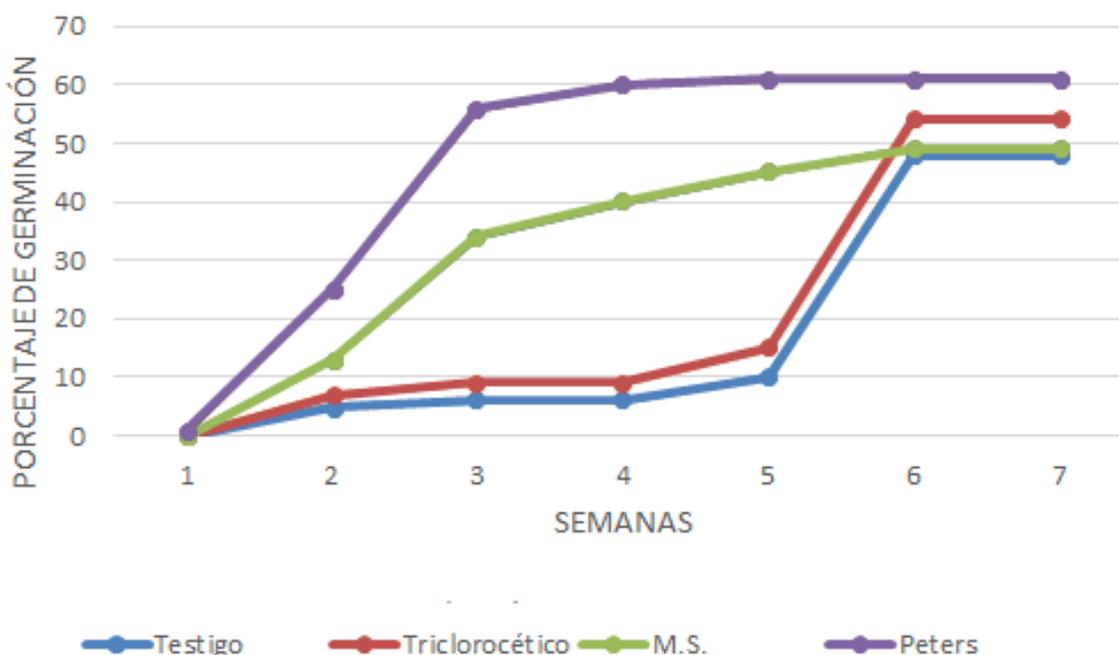


Figura 7. Comparación de los porcentajes de germinación de *Mammillaria bombycina*.

El análisis determinó estadísticamente que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos evaluados para la germinación *in vitro* de semillas de *Mammillaria bombycina*. Con lo cual se denota que los cuatro medios utilizados

promueve de igual manera la germinación de semillas de esta especie (cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza para los datos de la germinación de *Mammillaria bombycina*

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F cal.</b>	<b>F tab.</b>
Tratamientos	3	10774.9	2877.33		0.05= 3.239
Error	16	8632	539.5	0.53	0.01= 5.292
Total	19	19406.9			

### VII.3 Desarrollo *in vitro* de inóculos apicales y laterales

El medio que desarrolló mayor cantidad de brotes adventicios considerando todos los tratamientos en *Astrophytum asterias* fue el M.S. al 50% con 60 brotes, seguido por el medio Peter's con 17 y por último el testigo (agar con agua) con cero brotes (cuadro 11).

Cuadro 11. Total de brotes en los tres medios para *Astrophytum asterias*.

<b>Medios</b>	<b>Total de brotes</b>
<b>Testigo</b>	0
<b>M.S. al 50%</b>	60
<b>Peter's</b>	17

En relación con los nueve tratamientos hormonales para esta especie, el tratamiento nueve (ANA 0.5/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) fue el que produjo la mayor cantidad de brotes en medio M.S. al 50% con un total de 52 brotes. Los tratamientos cuatro (ANA 0.1/ BAP 0 mgL<sup>-1</sup>), siete (ANA 0.5/ BAP 0 mgL<sup>-1</sup>) le siguieron con tres brotes cada uno y finalmente el tratamiento dos (ANA 0/ BAP 1 mgL<sup>-1</sup>) logró la cantidad de dos brotes. Mientras que la mejor respuesta morfogénica en el medio Peter's se registró en el tratamiento tres (ANA 0/BAP 2 mgL<sup>-1</sup>) con nueve brotes, el tratamiento cuatro (ANA 0.1/ BAP 0 mgL<sup>-1</sup>) con cuatro brotes, seguido del

tratamiento ocho (ANA 0.5/ BAP 1 mgL<sup>-1</sup>) con tres brotes y el que produjo menor cantidad fue el tratamiento nueve (ANA 0.5/ BAP 2 mgL<sup>-1</sup>) con un brote; en la figura 8 se muestra la comparación del total de la brotación entre los diferentes tratamientos para los tres medios acomodados de mayo a menor.

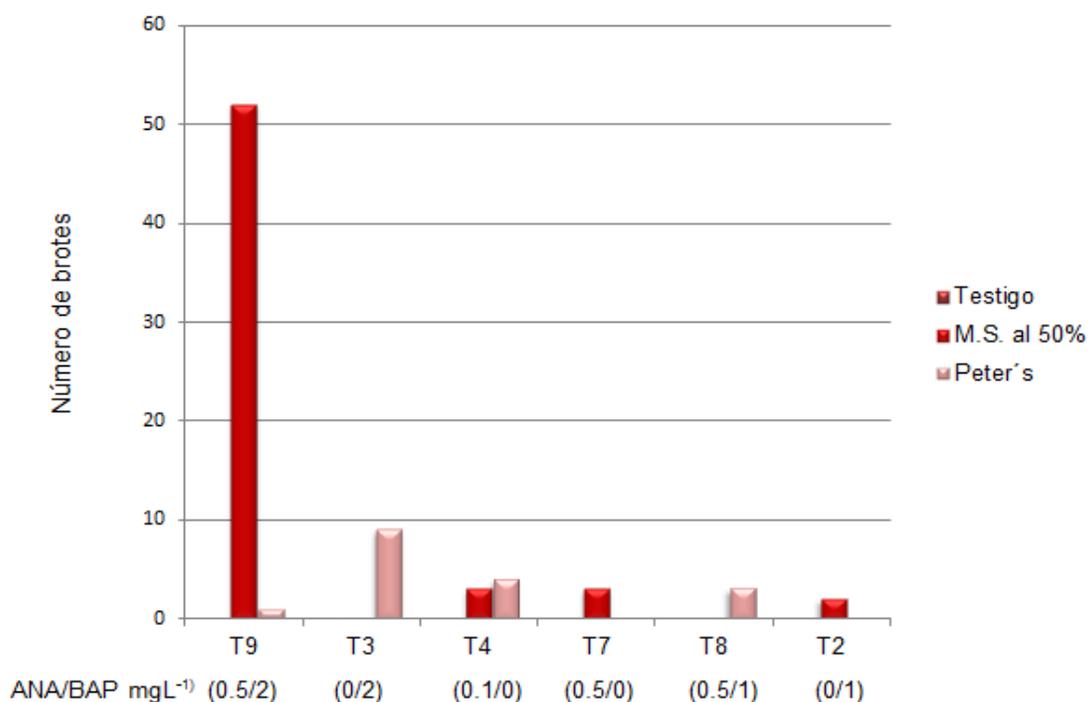


Figura 8. Comparación de la producción de brotes de inóculos de *Astrophytum asterias* entre los diferentes tratamientos en los tres medios.

La formación de raíz tuvo lugar a partir de 45 días de haberse realizado el cultivo *in vitro* de inóculos de *Astrophytum asterias*, en el medio M. S. al 50% con un total de nueve raíces adventicias, en el medio Peter's así como en el testigo no hubo respuesta morfogénica (cuadro 12), el tiempo de registro duró cerca de tres semanas cuando ya no se observaron nuevas respuestas de enraizamiento (figura 9).

Cuadro 12. Total de raíces en los tres medios para *Astrophytum asterias*.

Medios	Total de brotes
Testigo	0
M.S. al 50%	9
Peter's	0

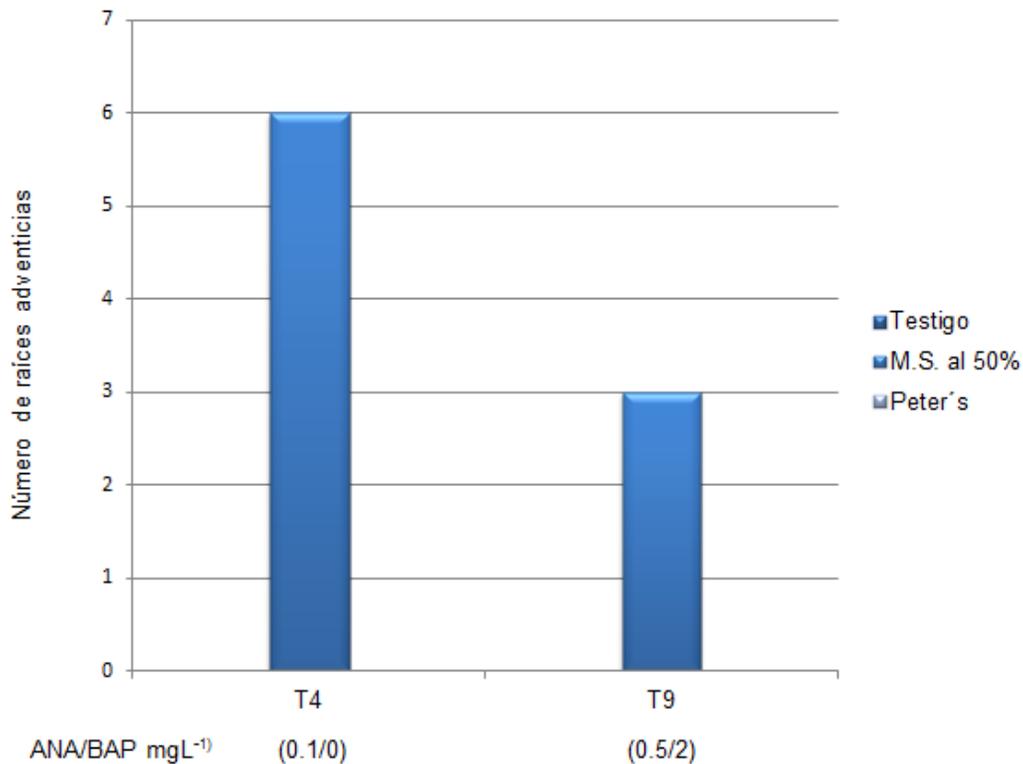


Figura 9. Comparación de la producción de raíces adventicias de inóculos de *Astrophytum asterias* entre los diferentes tratamientos en los tres medios.

El medio que propició el desarrollo de brotes adventicios tomando en cuenta todos los tratamientos empleados para el cultivo de inóculos apicales y laterales de *Mammillaria bombycina* fue el M. S. al 50%, la respuesta se inició a los ocho días de haberse realizado el cultivo del material, en el cual se produjo un total de 31 brotes adventicios, seguido del medio Peter's y el testigo con cero brotaciones (cuadro 13).

Cuadro 13. Total de brotes en los tres medios para *Mammillaria bombycina*.

Medios	Total de brotes
Testigo	0
M.S. al 50%	31
Peter's	0

En relación con los nueve tratamientos hormonales para esta especie, el tratamiento cinco (ANA 0.1/ BAP 1 mgL<sup>-1</sup>) obtuvo un total de 29 brotes, seguido de los tratamientos dos (ANA 0/ BAP 1 mgL<sup>-1</sup>) y cuatro (ANA 0.1/ BAP 0 mgL<sup>-1</sup>) con un brote cada uno. En la figura 10 muestra la comparación de respuestas morfogénicas entre los tres tratamientos para *Mammillaria bombycina* en los tres medios empleados.

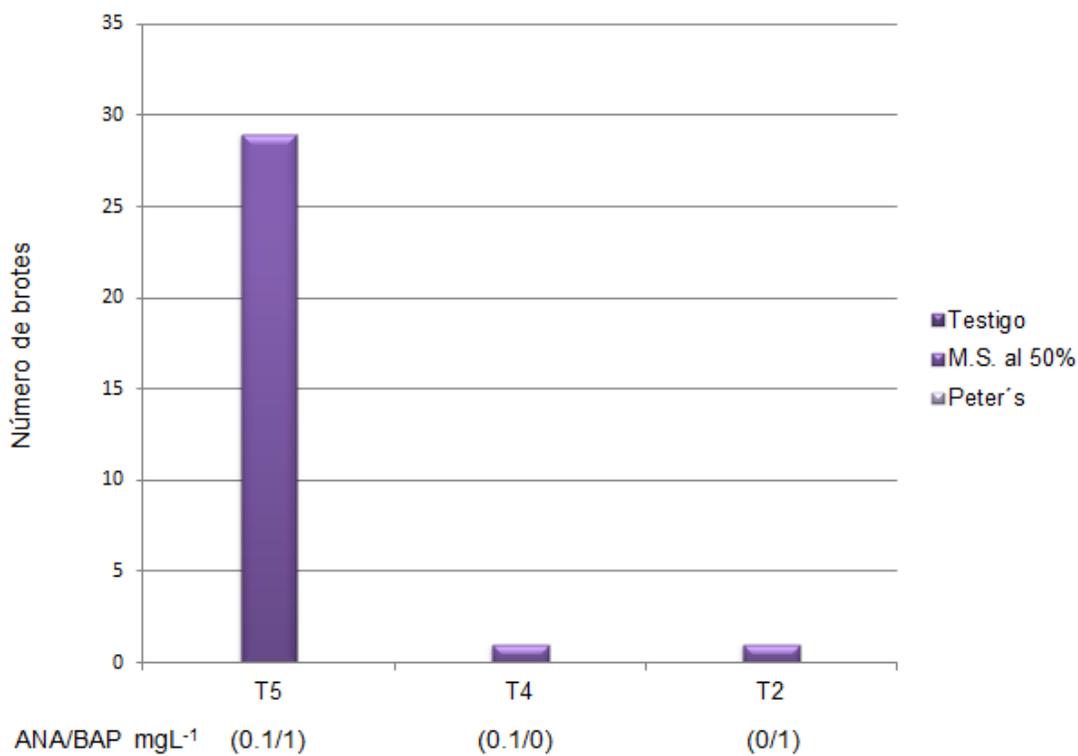


Figura 10. Comparación del número de brotes de inóculos de *Mammillaria bombycina* en los tres medios.

El medio que desarrolló mayor cantidad de raíces adventicias considerando todos los tratamientos en *Mammillaria bombycina* fue el M.S. al 50% con un total de 13 raíces, mientras que el Peter's solo se produjo una raíz. El medio testigo no obtuvo respuesta morfogénica alguna (cuadro 14).

Cuadro 14. Total de raíces adventicias en los tres medios para *Mammillaria bombycina*.

Medios	Total de brotes
Testigo	0
M.S. al 50%	13
Peter's	1

En el medio M. S. al 50% el enraizamiento de inóculos de *Mammillaria bombycina* tuvo lugar el tratamiento siete (ANA 0.5/ BAP 0 mgL<sup>-1</sup>) con un número de ocho y el tratamiento dos (ANA 0/ BAP 1 mgL<sup>-1</sup>) con cinco raíces adventicias. El tratamiento del medio Peter's que obtuvo la mejor producción de raíces adventicias fue el cuatro (ANA 0.1/ BAP 0 mgL<sup>-1</sup>) con una raíz en total. La figura 11 muestra la comparación gráfica entre los tres medios y la relación de los nueve tratamientos para el número de raíces en orden ascendente a descendente.

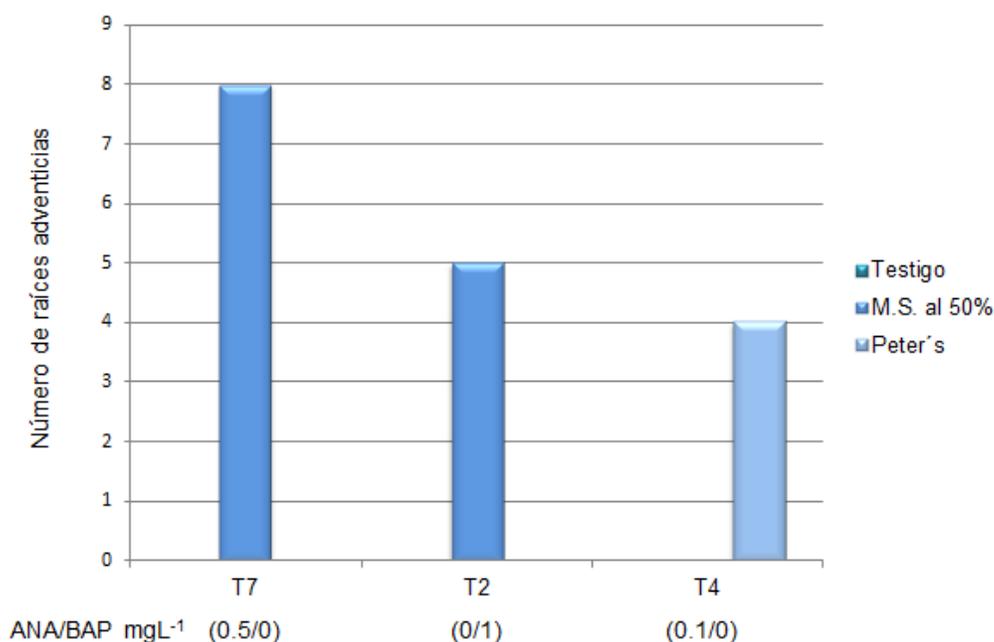


Figura 11. Comparación del número de raíces adventicias de inóculos de *Mammillaria bombycina* en los tres medios.

Se realizó un análisis estadístico para un modelo de bloques completamente al azar, utilizando el número de brotes de la regeneración *in vitro* del corte de plántulas de *Astrophytum asterias* (cuadro 15) y estadísticamente se encontró una

diferencia significativa entre los nueve tratamientos de los tres medios al resultar el valor de F calculada mayor a los valores de F de tablas ( $p > 0.05$ ) y se realizó una prueba de Tukey.

Cuadro 15. Análisis de varianza de la brotación a partir del cultivo de inóculos de *Astrophytum asterias*.

Fuentes de Variación	GL	SC	CM	F cal.	F tab.
Tratamientos	1	7.999	96.888		0.05= 4.494
Error	16	203	25.375	3.818	0.01= 8.531
Total	17	210.999			

La media de cada medio basal son Testigo cero, Peter's de 4.6 y del M.S. al 50% fue 6.5, de menor a menor según su valor respectivamente. Con lo cual la prueba de Tukey demostró que existe una diferencia significativa entre ambos medios, siendo el grupo A (conformado por los tratamientos dos (ANA 0/1 BAP  $\text{mgL}^{-1}$ ), cuatro (ANA 0.1/0 BAP), siete (ANA 0.5/0 BAP) y nueve (ANA 0.5/2 BAP)) los que mejor promueven la regeneración *in vitro* del corte de plántulas de *Astrophytum asterias*, seguido por los tratamientos del grupo B (nueve (ANA 0.5/2 BAP), ocho (ANA 0.5/1 BAP), cuatro (ANA 0.1/0 BAP) y tres (ANA 0/2 BAP)) los menos adecuados para dicho propósito (cuadro 16).

Cuadro 16. Los grupos se establecieron en orden ascendente en cuanto al número de brotes de cada tratamiento y se determinó que aquellos que contenían el más alto fueron del grupo A y aquellos con el más bajo se agruparon en el B.

Tratamientos	Número de brotes	Grupo	Grupo
<b>MS</b>	2, 4, 7, 9	60	A
<b>Peter's</b>	9, 8, 4, 3	17	B

El número de brotes de la regeneración *in vitro* del corte de plántulas de *Mammillaria bombycina* se manejaron como bloques completamente al azar

utilizando un análisis estadístico, en el cual no se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (cuadro 17).

Cuadro 17. Análisis de varianza de los datos de brotación a partir del cultivo de inóculos de *Mammillaria bombycina*

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F cal.</b>	<b>F tab.</b>
Tratamientos	1	4.5	4.5		0.05= 4.494
Error	16	37	4.625	0.972	0.01= 8.531
Total	17	41.5			

Se aplicó un análisis estadístico para un modelo de bloques completamente al azar, utilizando el número de raíces adventicias de la regeneración *in vitro* del corte de plántulas de *Astrophytum asterias* (cuadro 18), en el cual no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 18. Análisis de varianza de la producción de raíces a partir del cultivo de inóculos de *Astrophytum asterias*.

<b>Fuentes de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F cal.</b>	<b>F tab.</b>
Tratamientos	1	0.5	0.5		0.01= 8.531
Error	16	4	0.5	1	0.05= 4.494
Total	17	4.5			

Se aplicó el análisis estadístico utilizando un modelo de bloques completamente al azar, empleando el número total de raíces en la regeneración *in vitro* de inóculos apicales y laterales del corte de plántulas de *Mammillaria bombycina* y estadísticamente no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos al resultar el valor de F calculada menor a los valores de F de tablas ( $p < 0.05$ ) (cuadro 19).

Cuadro 19. Análisis de varianza de los datos del desarrollo de raíces a partir del cultivo de inóculos de *Mammillaria bombycina*.

Fuentes de Variación	GL	SC	CM	F cal.	F tab.
Tratamientos	1	0.8888	0.8888		0.01= 8.531
Error	16	5.8888	0.7361	1.2074	0.05= 4.494
Total	17	6.7776			

Las características también registradas corresponden al medio M.S. al 50% donde el tratamiento que presentó la menor oxidación fue el nueve (ANA 0.5/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) también ocurrió el alargamiento del inóculo de ápice, el cual mostró brotes con coloraciones variables de verde aclaro a fuerte (figura 12a), mientras que los cortes laterales se fueron a la producción de tejido caloso de tipo friable, de color blanco y pronto se dio el surgimiento de raíces adventicias de color blanco (figura 12b).

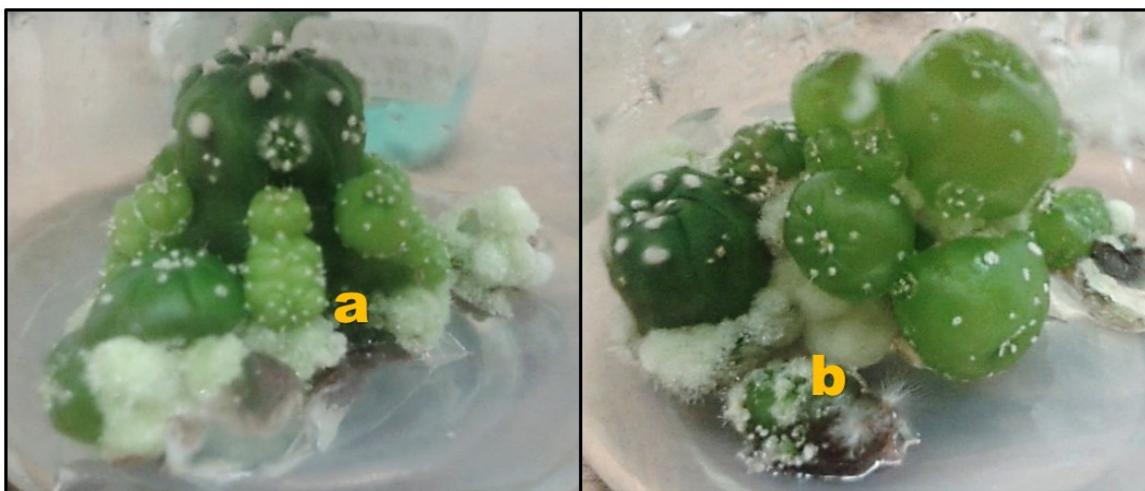


Figura 12. Tratamiento nueve, inóculos de *Astrophytum asterias*. a) callo y brotes. b) brotes y raíces adventicias.

En el tratamiento la oxidación se presentó en el área de corte, se produjo callo no friable de color verde en los inóculos laterales (figura 13a). Mientras que el corte de ápice logró una excelente cicatrización y desarrolló raíces adventicias de coloraciones entre marrón y verdosa (figura 13b).

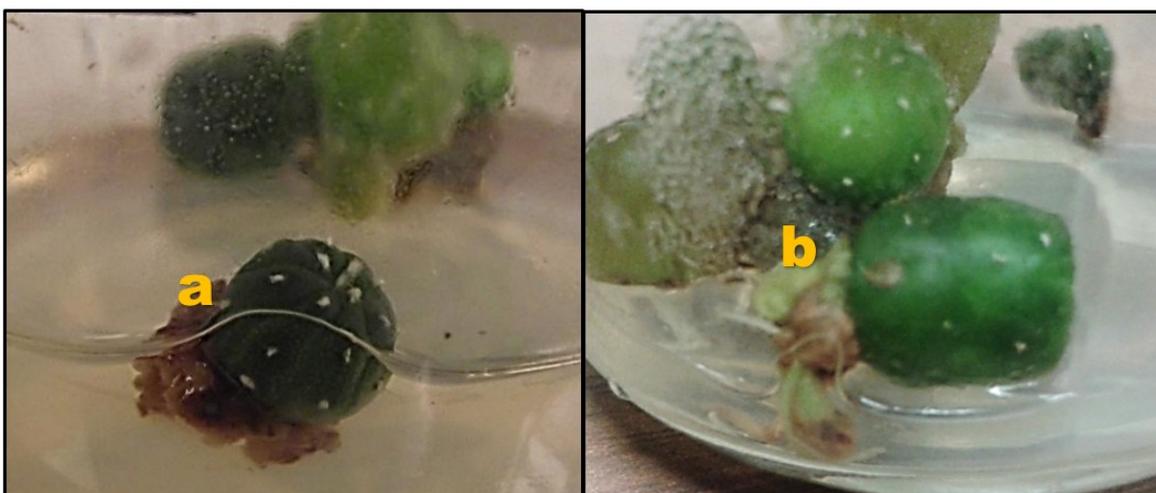


Figura 13. Tratamiento cuatro con producción de callo no friable verde. a) tejido calloso alrededor del área de corte en el inóculo apical. b) raíces adventicias.

Los tratamientos dos (ANA 0/1 BAP  $\text{mgL}^{-1}$ ) y cinco (ANA 0.1/1 BAP  $\text{mgL}^{-1}$ ) tuvieron una cicatrización exitosa con una ligera oxidación en áreas de corte, seguida de una producción de callo no friable a friable de color blanco a amarillo verdoso (figura 14a) en todos los inóculos y después de seis semanas se diferenció a brotes que fueron muy abundantes (figura 14b). En el caso particular del cinco, el inóculo de ápice tuvo un alargamiento con oxidación del callo alrededor del área de corte (figura 14c). El tratamiento seis (ANA 0.1/2 BAP  $\text{mgL}^{-1}$ ) presentó oxidación en el área de corte seguida de la producción de tejido calloso de blanco a verdoso, de tipo friable. En el inóculo de ápice se perdió el callo producido a causa de la oxidación. El callo de los inóculos laterales presentó oxidación que no afectó el tejido.

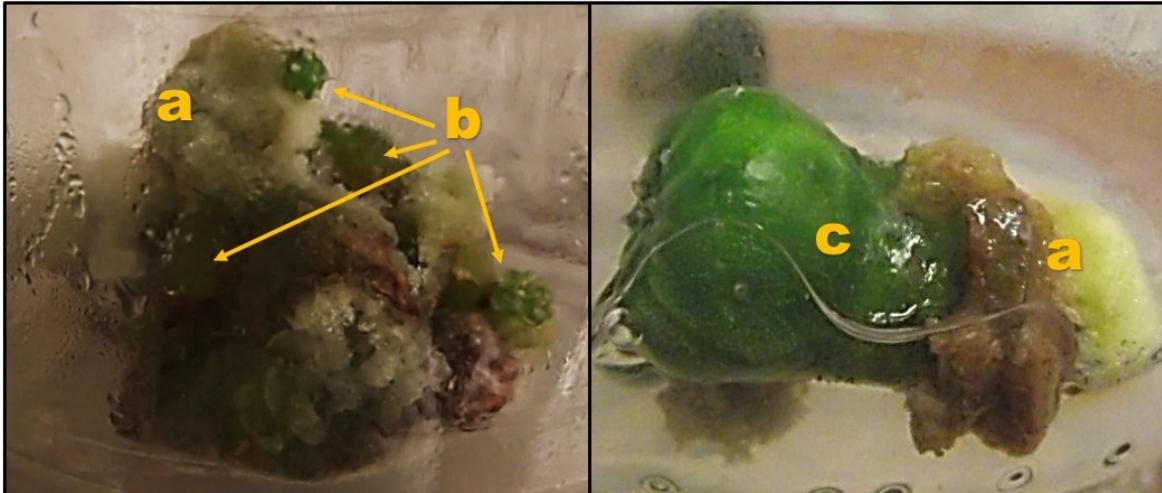


Figura 14. Tratamiento 2 y 5. a) tejido calloso. b) brotes. c) inóculo apical.

El tratamiento tres (ANA 0/2 BAP  $\text{mgL}^{-1}$ ) obtuvo una alta producción de tejido calloso de tipo friable de color blanco que se fue tornando verde (figura 15a), dónde el producido por los inóculos laterales y el apical se unificaron. También se presentó el mayor índice de muerte del tejido causado por oxidación en la mayoría de los cultivos. Los inóculos laterales habían comenzado con la producción de tejido calloso y el apical no tuvo respuesta alguna (figura 15b)



Figura 15. Tratamiento 3. a) abundante tejido calloso. b) oxidación.

En el tratamiento el siete (ANA 0.5/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) la oxidación fue predominante en los inóculos laterales y se perdieron, las heridas de los inóculos de ápice cicatrizaron de forma correcta, se produjo una ligera oxidación sin pérdida y sin más cambios (figura 16a). Los tratamientos uno (ANA 0/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) y ocho (ANA 0.5/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) tuvieron producción de tejido calloso blanco a verde con apariencia turgente (figura 12b) que pronto comenzó a oxidarse hasta perderse por completo el tejido, la oxidación fue descontrolada y los cultivos del uno se perdieron por completo. En tanto que los del ocho permanecieron sin cambios (figura 16c).

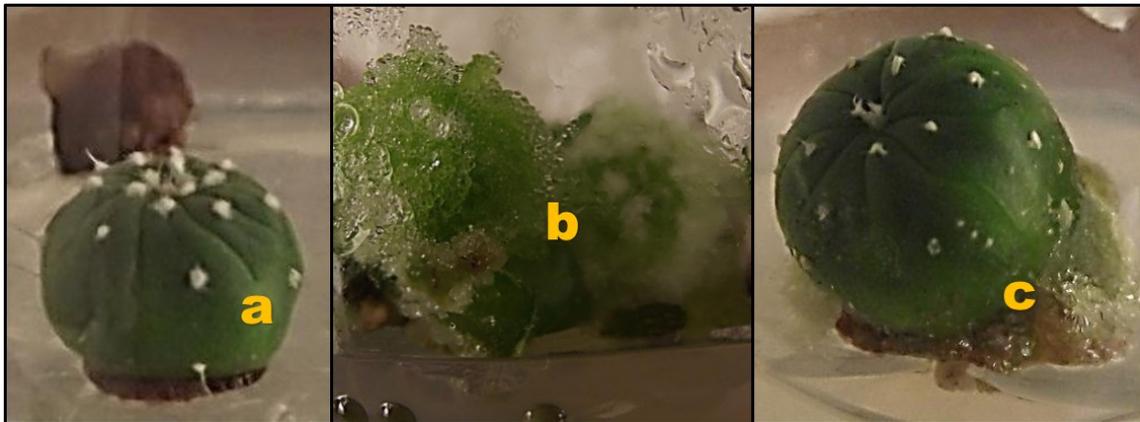


Figura 16. Tratamientos 7, 1 y 8. a) inóculo apical con oxidación. b) tejido calloso. c) oxidación del callo.

El medio Peters adicionado con las diferentes concentraciones de la combinación de hormonas del crecimiento vegetal en el cultivo de inóculos de *Astrophytum asterias*, el tratamiento tres (ANA 0/2 BAP) tuvo una excelente cicatrización y menor oxidación del material, hubo producción de callo de no friable a friable, de blanco a verde, con apariencia turgente (figura 17a), el color azul del medio comenzó a desaparecer conforme el tejido calloso crecía (figura 17b). Se presentó una brotación con tejidos turgentes que reventaron y continuaron diferenciándose a tejido calloso, que a su vez se diferenció en brotes muy abundantes (figura 17c).

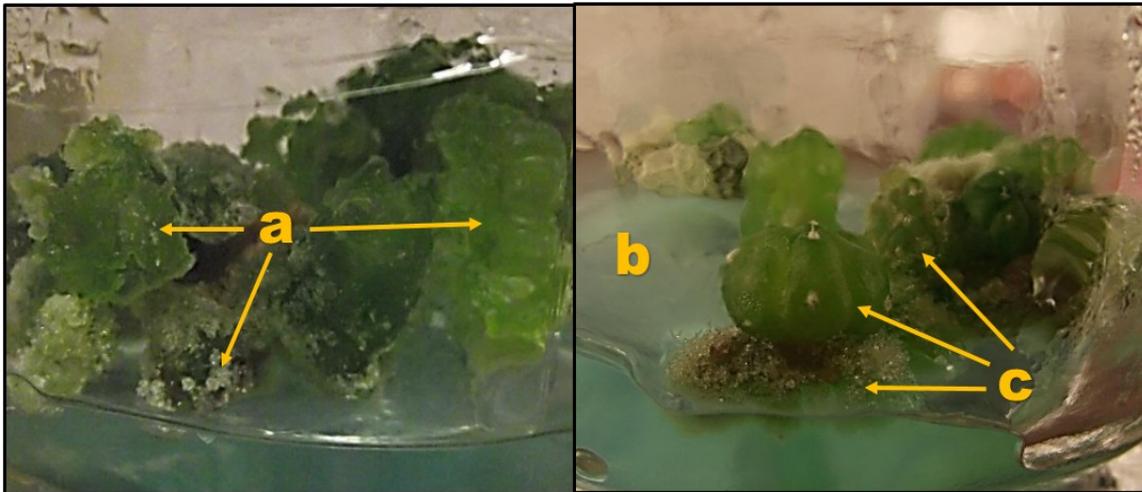


Figura 17. Alta callogénesis y brotación en tejidos del tratamiento 3. a) tejidos calloso fotosintético.. b) medio que se volvió blanco. C) brotes.

Los tratamientos seis (ANA 0.1/2 BAP  $\text{mgL}^{-1}$ ) y nueve (ANA 0.5/2 BAP  $\text{mgL}^{-1}$ ) presentaron oxidación en el área de corte sin pérdida del material. Se presentó producción de tejido calloso de tipo friable, de blanco a verde principalmente en el área de corte, donde la apariencia oxidada fue cubierta casi por completo (figura 18a). En ambos tratamientos, el callo friable y blanco, presentó puntas que asemejaban agujas de origen mineral cristalino (figura 18b). En el seis los inóculos laterales tuvieron brotación escasa con apariencia turgente. El inóculo de ápice en uno de los cultivos del tratamiento nueve no presentó callo pero si un brote que le dio una apariencia doble de meristemo apical (figura 18c).

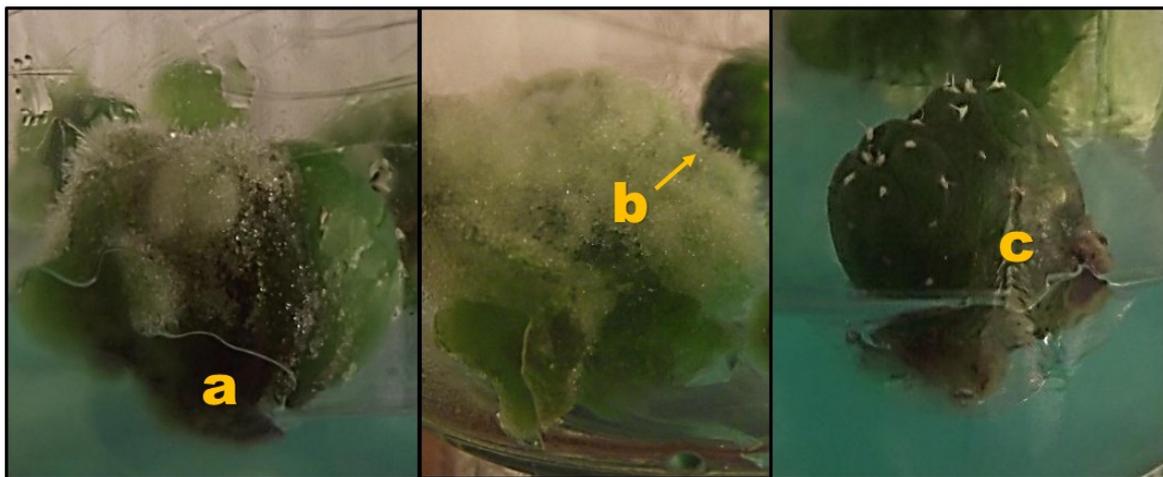


Figura 18. Tratamientos 6 y 9. a) Inóculo apical. b) formación de agujas. c) brote en inóculo apical.

El tratamiento cuatro (ANA 0.1/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) obtuvo cicatrización seguida de una ligera oxidación en los inóculos laterales. El material se tornó de un color verde brillante y permaneció sin más cambios, mientras que los inóculos laterales presentaron una ligera oxidación (figura 19a). Los tratamientos uno (ANA 0/0 BAP mgL<sup>-1</sup>), dos (ANA 0/1 BAP mgL<sup>-1</sup>), cinco (ANA 0.1/1 BAP mgL<sup>-1</sup>), siete (ANA 0.5/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) y ocho (ANA 0.5/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) presentaron el mayor grado de oxidación, que no pudo controlarse y todo el material se perdió (figura 19b).

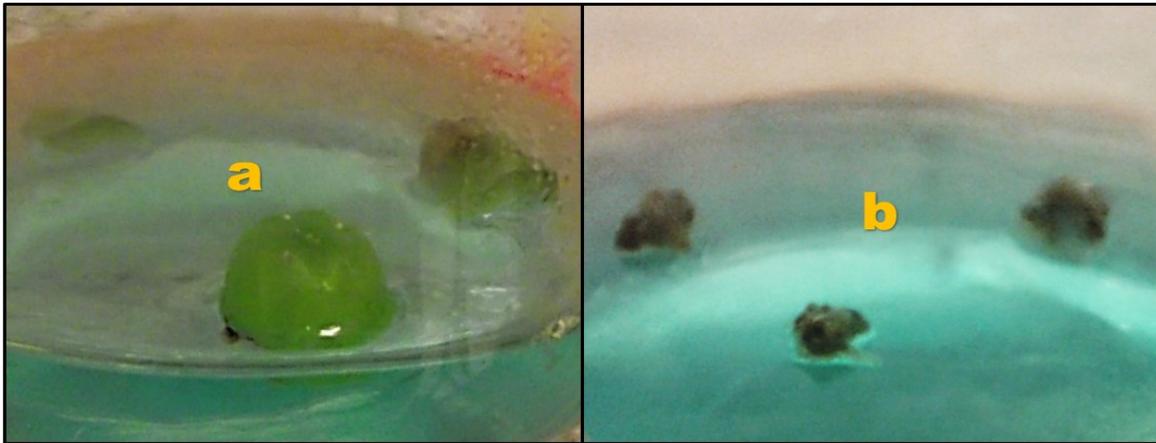


Figura 19. Oxidación en los tratamientos 4 y 8. a) tejidos muy verdes. b) inóculos muertos.

En el medio M.S. al 50 % con *Mammillaria bombycina*, los inóculos laterales del tratamiento el tratamiento dos (ANA 0/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) se fueron a la producción de tejido calloso de tipo friable, de color amarillo a verdoso, con ligeras tonalidades rosadas (figura 20a). Pasado un mes y medio comenzó la brotación con espinas blancas (figura 20b). El inóculo de ápice cicatrizó y las raíces adventicias eran de color rojizo y blanco (figura 20c).

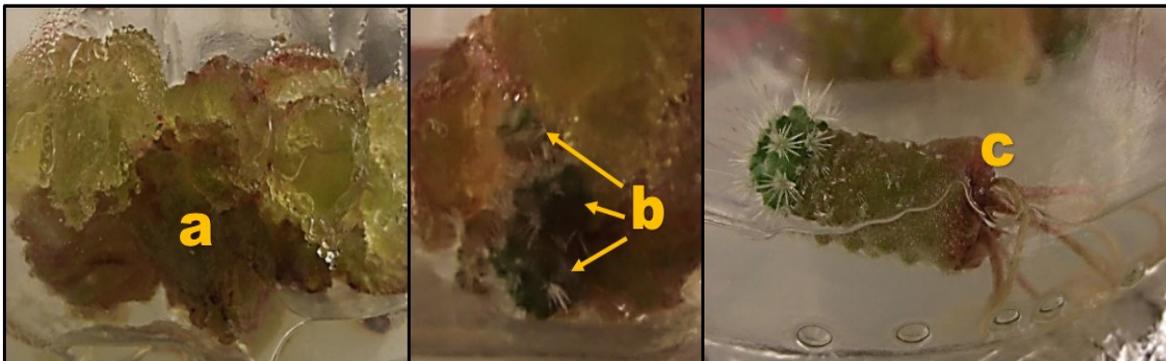


Figura 20. Tratamiento 2. a) callo amarillo verdoso. b) brotación. c) enraizamiento del inóculo apical.

En el tratamiento siete (ANA 0.5/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) se observó el desarrollo de raíces adventicias de color blanco en el corte apical después del mes de haberse cultivado (figura 21a), el inóculo de ápice presentó abundante espinación blanca, los inóculos laterales se oxidaron y murieron (figura 21b).

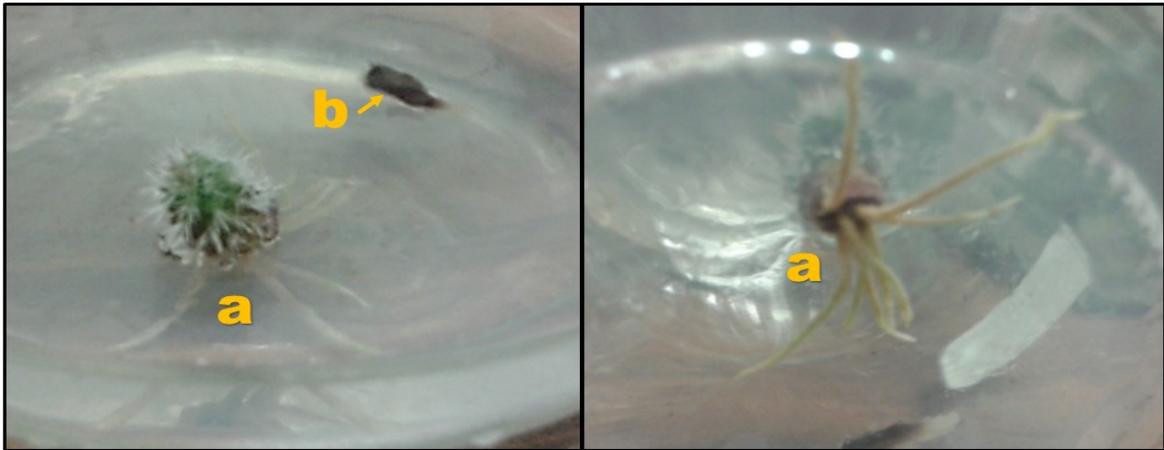


Figura 21. Tratamiento 7. a) raíces adventicias. b) oxidación.

Los tratamientos cinco (ANA 0.1/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) y cuatro (ANA 0.1/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) obtuvieron una alta brotación (figura 22a) y abundante producción de tejido caloso (figura 22b), cabe mencionar que en ambos tratamientos se produjo callo, pero en el cinco este se diferenció a brotes con espinación de color blanca. La producción de callo de los inóculos laterales y apicales se unió y se desarrolló como un solo tejido, el cual tenía una consistencia friable, de color blanco a amarillo-verdoso y una alta concentración de pigmentos rosados, muy notable en el tratamiento cinco (figura 22c).

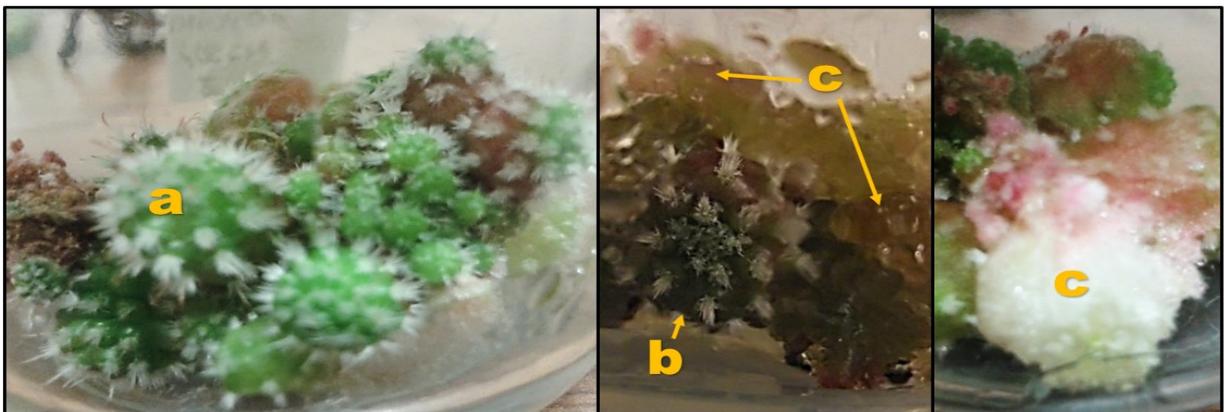


Figura 22. Alta brotación en los tratamientos cinco y cuatro. a) brotación sin callo. b) brotes con callo. c) callo amarillo y blanco con coloraciones rosadas.

Los tratamientos tres (ANA 0/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) y seis (ANA 0.1/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) tuvieron una cicatrización libre de oxidación. Los inóculos laterales del tres comenzaron con la producción de callo que se pigmentó ligeramente de color rosa (figura 23a), que transcurridas cuatro semanas comenzaron con la diferenciación a brotes con espinas de color blancas (figura 23b). El inóculo apical se alargó y alcanzó una abundante espinación lateral blanca y otra de tipo ganchuda rojiza (figura 23c). Mientras que al pasar el mes los inóculos laterales en el seis se oxidaron por completo y se perdieron (figura 23d), los apicales presentaron también espinación blanca muy abundante (figura 23e).

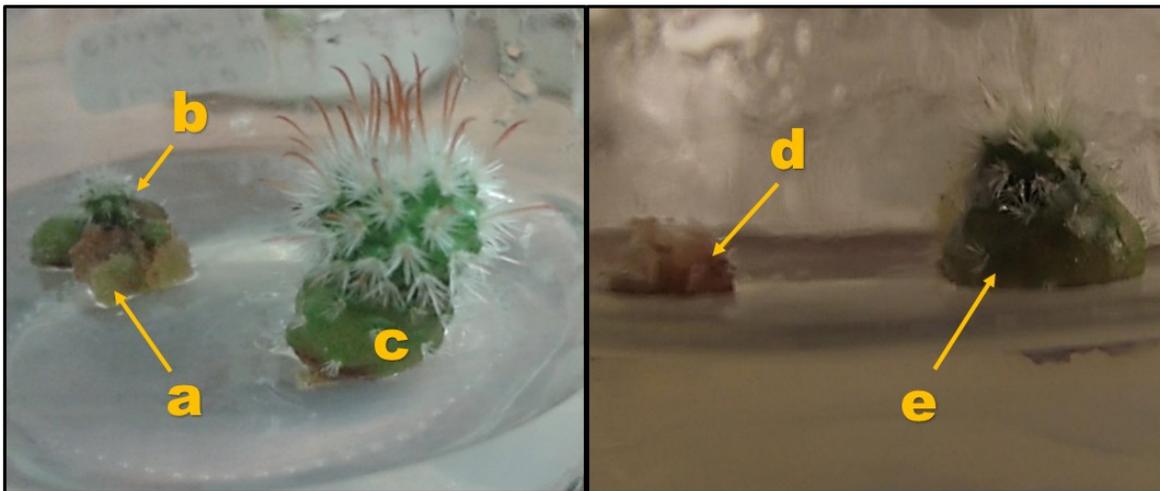


Figura 23. Tratamientos tres y seis. a) callo ligeramente rosa. b) brotes. c) inóculo apical alargado. d) Oxidación y muerte de inóculos laterales del 6. e) inóculos apicales con espinación blanca.

En los tratamientos uno (ANA 0/0 BAP mgL<sup>-1</sup>), ocho (ANA 0.5/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) y nueve (ANA 0.5/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) la oxidación fue predominante, la mayoría de los tejidos se perdieron, a pesar de que el nueve había presentado producción de callo blanco (figura 24a). A las dos semanas se presentó contaminación en el ocho y nueve, provocada principalmente por bacterias blancas con una consistencia lechosa (figura 24b); en el caso particular del ocho, los agentes contaminantes presentes fueron hongos.

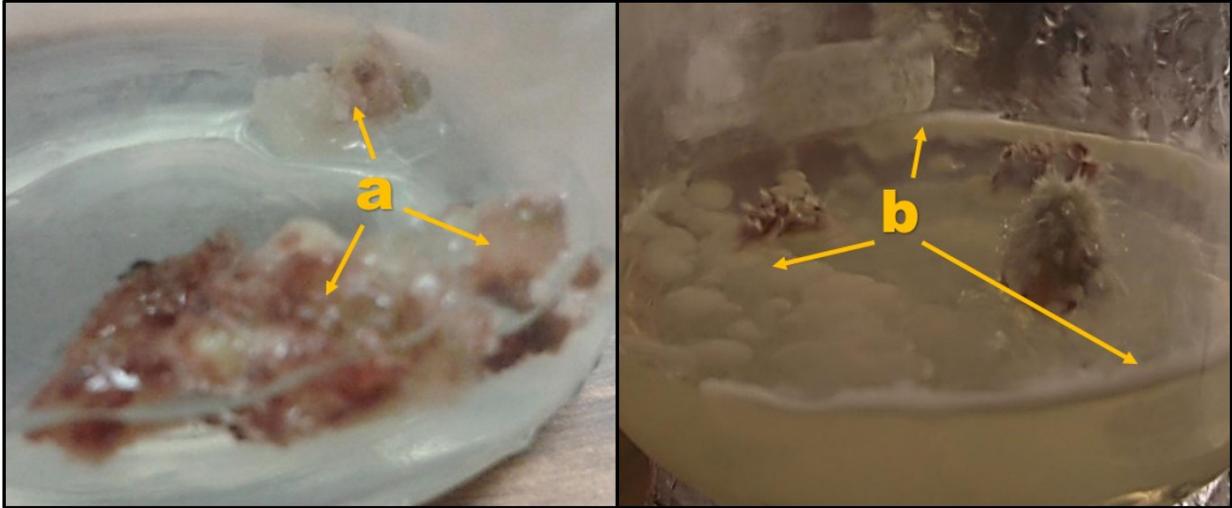


Figura 24. Material oxidado de los tratamientos ocho y nueve. a) oxidación. b) oxidación y contaminación.

El medio Peter's donde se cultivaron los cortes de plántulas de *Mammillaria bombycina*, el tratamiento seis (ANA 0.1/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) el material comenzó a producir tejido calloso de color verde con ligera coloración rosa, con áreas oxidadas. El material desdiferenciado de los inóculos laterales, en uno de los frascos, se dio un único brote al haber pasado un mes de su siembra, éste presentó espinas laterales blancas en las mamilas y espinas ganchudas rojizas muy cercanas al ápice (figura 25).

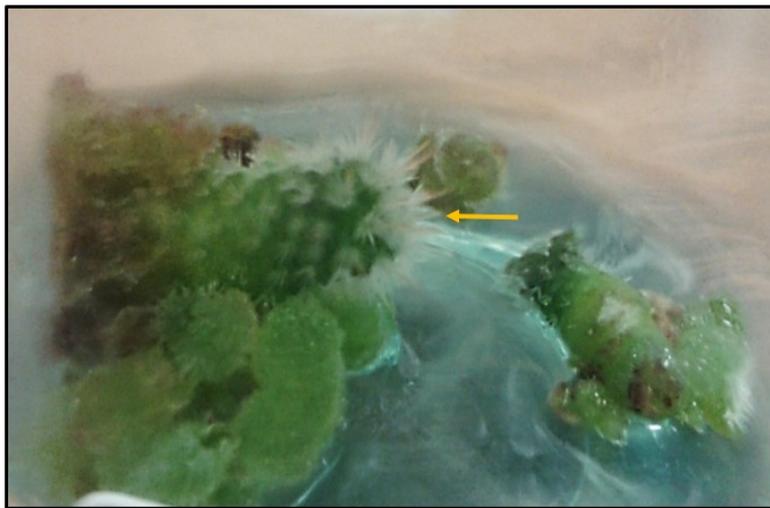


Figura 25. Callogenesis y brotación.

En el tratamiento nueve (ANA 0.5/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) los cortes tanto laterales como apicales se obtuvo la producción de tejido calloso de color amarillo con una ligera concentración de pigmentos rosados (figura 26a). En los inóculos de ápice se logró una excelente cicatrización y éste se alargó, con una espinación blanca muy abundante (figura 26b). En el cuatro (ANA 0.1/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) la respuesta fue similar con respecto a la cicatrización del material, los cortes laterales se tornaron rosados y el corte de ápice también presentó crecimiento tanto apical como basal, desapareciendo poco a poco el color azul del medio y los tejidos se tornaron de un color verde intenso (figura 26c).

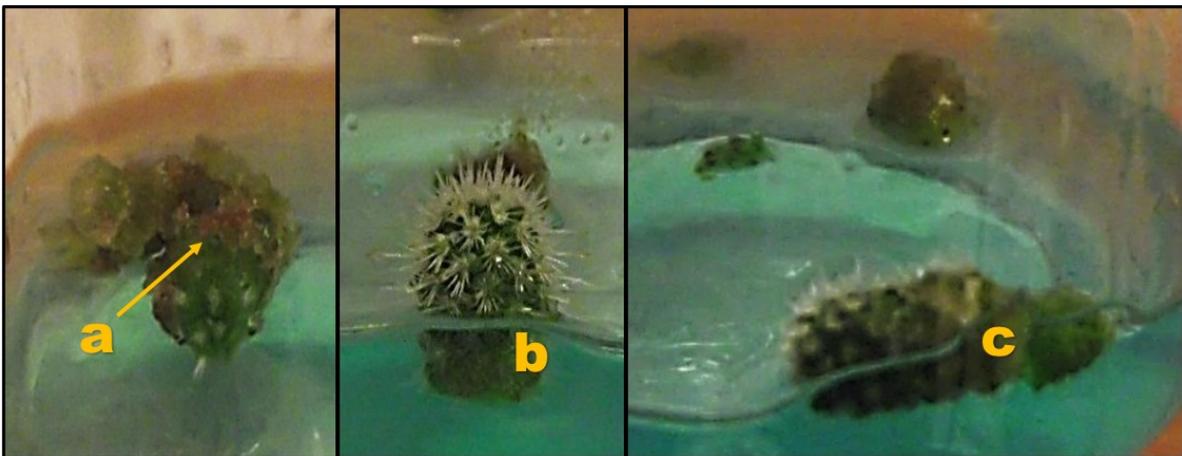


Figura 26. Tratamientos nueve y cuatro. a) callo verde con áreas rosadas. b) espinación blanca y abundante. c) alargamiento del inóculo.

En el caso del tratamiento tres (ANA 0/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) el tejido presentó una vitrificación que provocó la pérdida de todo el material biológico a pesar de que el inóculo de ápice había comenzado con la producción de callo blanco y friable (figura 27a). Los tratamientos uno (ANA 0/0 BAP mgL<sup>-1</sup>), dos (ANA 0/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) y siete (ANA 0.5/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) presentaron el mayor grado de oxidación y pérdida del material (figura 27b). Finalmente en el ocho (ANA 0.5/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) presentó oxidación y no fue posible seguir registrando resultados debido a que los cultivos se contaminaron con bacterias (figura 27c).

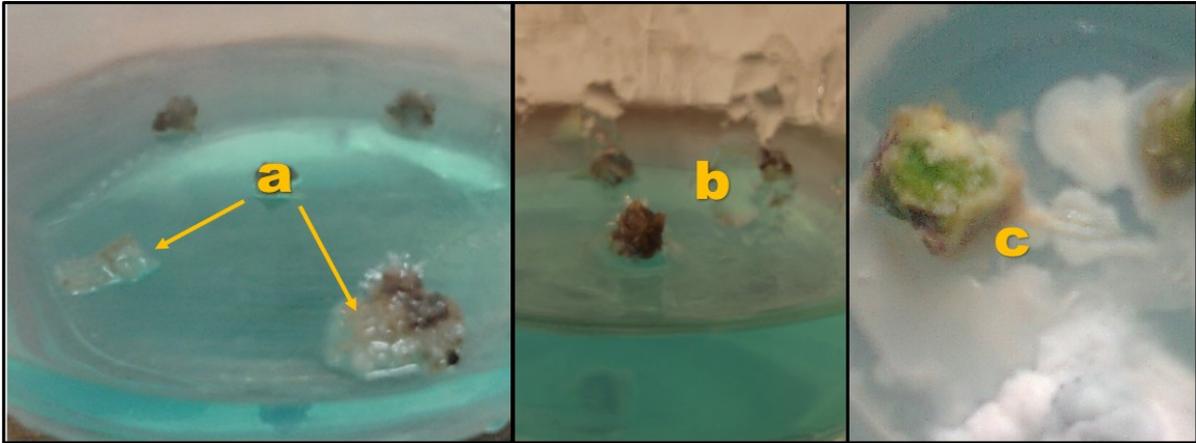


Figura 27. Pérdida del material en los tratamientos 1, 2, 3, 7 y 8. a) vitrificación y muerte. b) oxidación total de los tejidos. c) oxidación y contaminación.

#### VII.4. Cultivo de tejido calloso espontáneo

Se presentó en algunas plántulas de *Astrophytum asterias* inducción indirecta de callo de blanco a verdoso, friable con indicios de brotes en medio basal M.S. al 50% libre de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) (figura 28a). El tejido de *Mammillaria bombycina* también presentó desdiferenciación, cuyo material espontáneo era hiperhidratado con áreas rosadas. Posteriormente comenzó a oxidarse hasta perderse casi por completo (figura 28b). En el medio Peter's existió producción de tejido calloso con su posterior muerte.



Figura 28. Medios basales libres de RCV. a) *Astrophytum asterias*. b) *Mammillaria bombycina*.

El tejido calloso espontáneo subcultivado de la especie *Astrophytum asterias*. en los tres medios en un principio comenzó a crecer y los inóculos alcanzaron casi el mismo tamaño (3 cm aproximadamente). El tejido tenía una apariencia hiperhidratada, con un porcentaje de 11.1% y las zonas oxidadas representaron el 33.3%.

En ninguno de los tratamientos de los tres medios de cultivo empleados se registró respuesta morfogenética. En el tratamiento uno (ANA 0/BAP 0) (figura 29a) el tejido tenía una tonalidad de blanca-amarilla hasta verdosa con áreas oxidadas. Para el tratamiento dos (ANA 0.1/BAP 1) los tres cortes crecieron hasta casi unirse (figura 29b), coloración blanco-verdoso y se oxidó. Con el tratamiento tres (ANA0.5/ BAP 2), el callo se tornó más verde y la oxidación no fue muy notoria, los tejidos crecieron hasta parecer una misma masa de células (figuras 29c y 29d).

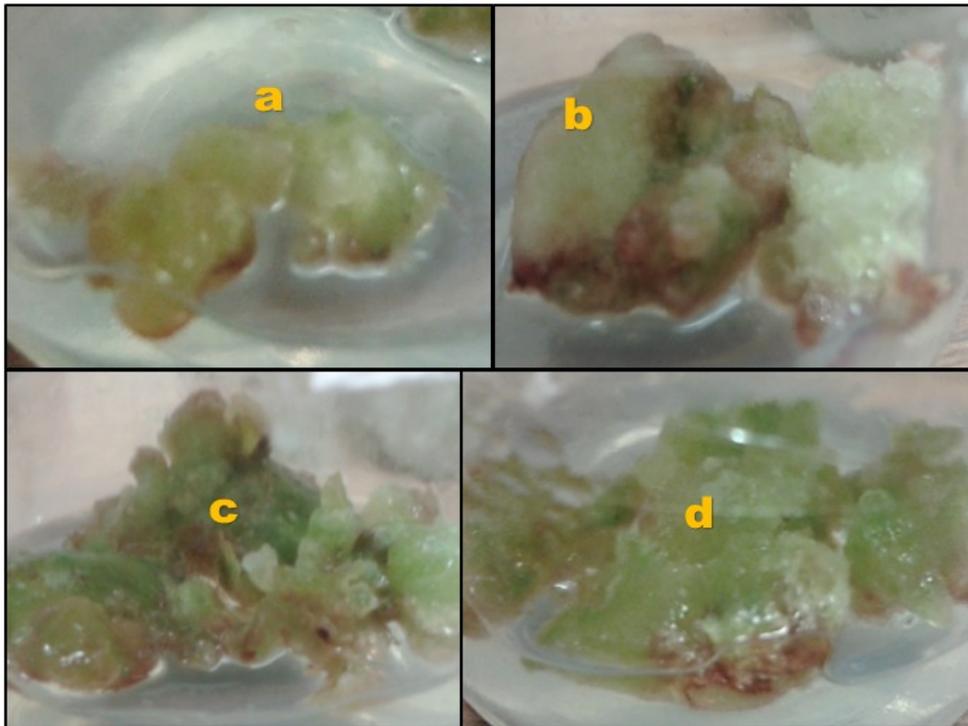


Figura 29. Cultivo de tejido calloso espontáneo. a) tratamientos 1. b) tratamiento 2. c) y d) tratamiento 3.

El callo espontáneo subcultivado de *Mammillaria bombycina* tampoco registró respuesta morfogénica alguna, pero si el mayor grado de oxidación en los todos los tratamientos de los tres medios de cultivo, cuyo porcentaje de oxidación fue del 100. No se observó crecimiento significativo, su aspecto era hiperhidratado con zonas blancas, solo el tratamiento tres tenía una coloración verdosa.

El tratamiento uno (ANA 0/BAP 0) obtuvo los tejidos más oxidados (figura 30a), En el dos (ANA 0.1/BAP 1) el callo presentó oxidación más oscura, algunas áreas del tejido eran blancas (figura 30b). El tejido calloso tuvo una apariencia friable y un crecimiento ascendente, la coloración verdosa fue única para el del tratamiento tres (ANA 0.5/BAP 2) y no hubo respuesta alguna aún con oxidación presente (figura 30c).

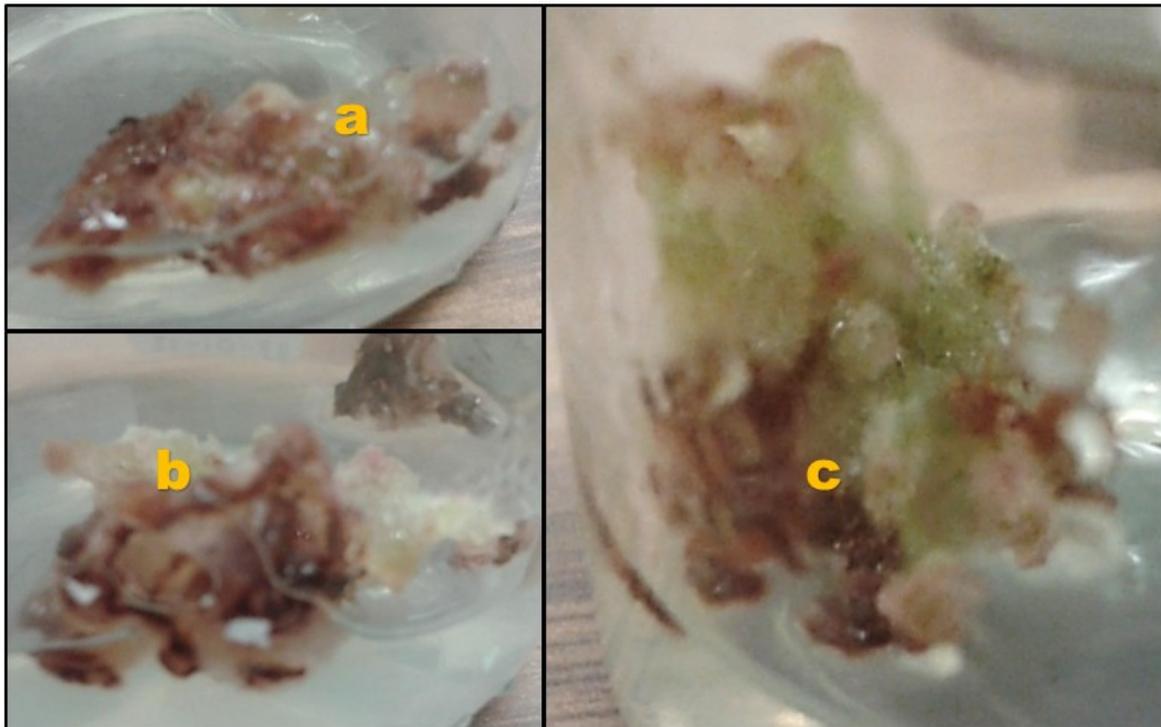


Figura 30. Cultivo de callo espontáneo de *Mammillaria bombycina*. a) tratamiento 1. b) tratamiento 2. c) tratamiento 3.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### VIII.1 Desinfestación

La contaminación observada en el experimento de germinación y morfogénesis en el medio de cultivo Peter's para *Mammillaria bombycina* posiblemente se debió a que la concentración del desinfectante y el tiempo de permanencia en él, no fueron suficientes para eliminar bacterias y esporas de hongos que posteriormente al encontrar condiciones de humedad, temperatura y nutrimentos se desarrollaron favorablemente. Para este experimento el tiempo de exposición del material a la solución de hipoclorito fue de 20 minutos, Flores (2004) utilizó la misma solución durante 30 minutos en agitación constante y registró el 6% de contaminación por hongos en la desinfección de semillas de *Pelecypora strobiliformis* y menciona que su posible contaminación fue debida a errores del operador. Es posible que existiera también una mala manipulación del material biológico lo cual provocó el ingreso de agentes patógenos a los cultivos.

Las semillas de *Astrphytum asterias* tienen testa lisa de acuerdo a Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991) y ese rasgo facilita la penetración del desinfectante y posiblemente por esta razón no se observó contaminación. Las semillas de *Mammillaria bombycina* poseen una testa foveolada (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada. 1991) que complica la acción del hipoclorito de sodio, por ello es mayor la probabilidad de que se presente contaminación, como sucedió en este estudio con el medio Peter's.

La contaminación registrada en general tras un mes de haberse realizado la siembra se debió posiblemente a agentes patógenos que se encontraban presentes en el ambiente en general, debido a que al manipular los frascos era necesario sacarlos de la cámara de incubación para registrar sus respuestas y fotografiarlos, en tanto que en ese proceso los microorganismos y esporas pudieron acceder por descuido del operador, ya que al estar sellados los cultivos, no se tuvo el cuidado necesario en las manos al tocar mesas, cuadernos y otros instrumentos sin ser previamente desinfectados.

## VIII.2. Germinación

La importancia de utilizar semillas en la propagación y conservación de cactáceas radica en la necesidad de mantener la diversidad genética, por lo que es conveniente iniciar cultivos a partir de este material, además que éstas son capaces de resistir una enérgica esterilización superficial y germinar bajo condiciones asépticas *in vitro* para obtener plantas libres de patógenos, mismas que pueden ser utilizadas como fuente de inóculos (Manzo, 2010).

Las diferencias en la germinación entre ambas especies dependen del grado o tipo de latencia que presenten. Las semillas de *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina* fueron sumergidas con la finalidad de desgastar la cubierta seminal y promover una imbibición y emergencia de la radícula más rápida. Sin embargo, los diferentes porcentajes de germinación obtenidos en este estudio, nos conducen a suponer que probablemente las semillas pudieran ser vanas o inviábiles (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). La muerte o ausencia del embrión no fue posible demostrarlo debido a que no se realizaron cortes de la semilla ni se ejecutaron pruebas de viabilidad.

El porcentaje de germinación del 100 por ciento en M.S. al 50% está vinculado a que las semillas estaban en un estado quiescente y dado que en dicho medio se brindaron las condiciones ambientales de temperatura, humedad y luz, pudieron germinar exitosamente. No obstante que esas condiciones se pudieron conseguir en el resto de los medios. El medio M.S. al 50% proporciona un componente iónico y osmótico que garantiza niveles apropiados de presión osmótica para que los solutos contenidos en el interior de la semilla no se pierdan durante la imbibición por permeabilidad de las membranas que presentan propiedades de cristal fluido más que de gel (Azcón- Bieto y Talón. 2000 ).

La pérdida de solutos por parte de la semilla puede modificar la germinación misma. Así, el componente iónico y osmótico de los medios Peter's, testigo y tricloroacético pudieron modificar la presión osmótica provocando o no una mayor pérdida de solutos, lo cual se observó en la germinación de semillas de la especie *Astrophytum asterias*, ya que para *Mammillaria bombycina* el medio Peter's fue el

que mejor porcentaje de germinación presentó, que comparado con el M. S. al 50% que contiene en su composición inorgánica Cl y Na iónicos, de los cuales Romero-Schmidt, *et al.* (1992) demostraron que a medida de que la concentración de cloruro de sodio aumenta en el medio, el porcentaje de germinación disminuye debido a que la sodicidad provoca un descenso de la permeabilidad de la pared celular.

Las semillas que si presentaron germinación, pudieron verse influidas por las características genéticas de las mismas y posiblemente a que el tiempo de almacenaje y las condiciones en las que se hizo después de su recolecta no fue mucho. Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) en un medio sin reguladores y sin escarificación obtuvieron 80% de germinación, en semillas de *Echinocactus platyacanthus* de cuatro meses de edad. Las semillas de *Mammillaria bombycina* que germinaron con un tiempo más prolongado desde el día en que se sembraron, al ser recolectadas de frutos secos no se tenía claro cuánto era el tiempo que llevaban expuestas y es posible que la imbibición fuera lenta.

### **VIII.3. Regeneración *in vitro* de inóculos apicales y laterales**

La regeneración a brotes en inóculos apicales y laterales de *Astrophytum asterias* se logró principalmente en los tratamientos nueve (ANA 0.5/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) y dos (ANA 0/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) del medio M.S. al 50% y solo en el tratamiento tres (ANA 0/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) del medio Peter's. Esto se debió posiblemente a los reguladores vegetales adicionados al medio que promovieron la brotación, pues en estos tratamientos la cantidad de BAP fue superior a la de ANA que jugó un papel importante en el desarrollo y morfogénesis de los tejidos cultivados *in vitro*. Puesto que las citocininas se encontraron en concentraciones adecuadas con las auxinas, indujeron la formación de vástagos y la cantidad de hormonas endógenas de los inóculos fueron insuficientes o estuvieron dentro del equilibrio auxina-citocinina para esta respuesta (Carhuarica, *et al.*, 2012)

Los brotes surgidos a partir de inóculos de plántulas de *Mammillaria bombycina* se registraron en los tratamientos cinco (ANA 0.1/1 BAP mgL<sup>-1</sup>), cuatro

(ANA 0.1/0 BAP mgL<sup>-1</sup>), tres (ANA 0/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) y dos (ANA 0/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) del medio M.S. al 50%, así como en el tratamiento seis (ANA 0.1/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) del medio Peter's, de los cuales se pudo observar también que la cantidad de citocininas adicionadas fue superior a la de auxinas. Esta respuesta morfogénica tuvo lugar a partir de la diferenciación celular del tejido calloso que se presentó en el material cultivado. Al igual que ocurrió con los inóculos de la especie anterior, los reguladores del crecimiento vegetal tuvieron una gran influencia sobre la diferenciación de brotes adventicios del tejido, puesto que las citocininas son capaces de promover la brotación, además cabe mencionar también que el éxito de la regeneración de tejidos vegetales a órganos y plantas completas, va en función de la variabilidad genética y de la calidad del inóculo utilizado, de la planta madre con la cual se inició el cultivo (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005).

La formación de raíces adventicias en inóculos de *Astrophytum asterias* se dio en los tratamientos nueve (ANA 0.5/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) y cuatro (ANA 0.1/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) únicamente en el medio M.S. al 50% donde la combinación de hormonas vegetales varió, en el tratamiento nueve donde la concentración de BAP fue superior a la de ANA, las raíces adventicias fueron de menor longitud y delgadas, mientras que en el tratamiento cuatro las auxinas fueron las únicas adicionadas al medio y las raíces fueron de mayor longitud y más gruesas. Ambas respuestas se dieron en inóculos apicales, en los cuales los meristemos de manera natural sintetizan auxinas que originan enraizamiento, por lo que la concentración endógena de auxinas pudo ser más alta que la de citocininas adicionadas al medio y lejos de volverse tóxicas, estimularon el desarrollo de raíces adventicias. Margara (1998) menciona que los microelementos del medio resultan favorables para el equilibrio auxina-citocinina, principalmente los presentes en el medio M.S. al 50% y es posible que los nutrientes en el medio Peter's no fueron suficientes para activar procesos enzimáticos y de crecimiento, por lo que no se registró respuesta.

La regeneración de raíces adventicias en inóculos de *Mammillaria bombycina* se presentó en los tratamientos dos (ANA 0/1 BAP mgL<sup>-1</sup>) y siete (ANA 0.5/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) ambas respuestas se dieron en los cortes de ápice. Es posible que al realizar los cortes de las plántulas la producción endógena de las raíces que

fueron eliminadas se vio debilitada o truncada, mientras la producción natural de auxinas en el ápice fue superior al tratarse de organismos jóvenes, lo que desató la respuesta morfogénica en el tratamiento dos donde las auxinas adicionales fueron nulas, así en el tratamiento siete la concentración de citocininas fue de cero y que sumada la adición de ANA al medio promovió el enraizamiento en el tratamiento siete, existiendo una condición de tolerancia a un posible nivel tóxico (Azcón- Bieto y Talón. 2000).

El tejido calloso se presentó en el material biológico en varios tratamientos de los medios M.S. al 50% y Peter's, posiblemente como respuesta a los cortes realizados para el cultivo de inóculos apicales y laterales, ya que en condiciones naturales la aparición de callo se da como una respuesta a daños mecánicos sufridos por influencia del medio ambiente o por invasión de ciertos microorganismos, debido a que las plantas tienen un potencial endógeno para la formación de callo para reparar dicha lesión (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005) se generó y resultó un problema en condiciones de laboratorio, pues en estos cultivos no fue capaz de diferenciarse y solo continuó creciendo como una masa amorfa. Este crecimiento del tejido pudo también ser consecuencia de la alta división celular que tuvo lugar en los cultivos *in vitro* causada por alteraciones o cambios de factores epigenéticos originados por la forma en que se establecieron los cultivos ante una concentración óptima en los medios por la adición de auxinas y citocininas.

Los callos provenientes de una misma plántula presentaron características diferentes en su morfología, color, friabilidad, grado de diferenciación y producción de metabolitos secundarios, encontrándose inóculos que rindieron mejores respuestas dentro de un mismo medio de cultivo, en los cuales, posiblemente las condiciones fisicoquímicas y nutricionales actuaron sobre los tejidos y orientaron la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación que les proporcionó características propias y únicas. De acuerdo con Manzo (2010) la callogénesis es uno de los principales problemas que presentan las cactáceas durante el cultivo *in vitro*, cuyo material no es capaz de detener su crecimiento y

que con frecuencia tiende a oxidarse o generar brotes que no son capaces de seguir un desarrollo y crecimiento a plantas completas.

La hiperhidratación se observó en diferentes tratamientos para ambas especies, tanto en inóculos como en brotes y callo que surgieron de estos, debido a que para esta parte del experimento se utilizaron únicamente medios M.S. al 50% y Peter's, es probable que la concentración de sales, así como el agente gelificante, las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal, la humedad relativa, el bajo enriquecimiento de CO<sub>2</sub> y el potencial hídrico, fueron factores que provocaron este cambio fisiológico y anatómico (Perez *et al.*, 1998). En seguida se presentó vitrificación sólo en inóculos de *Mammillaria bombycina* en el tratamiento tres (ANA 0/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) del medio Peter's posiblemente como respuesta al tipo de citocinina que se empleó y a la calidad regenerativa de la plántula de la cual se obtuvieron los tejidos (Villavicencio, *et al.*, 1999).

#### **VIII.4. Regeneración de tejido calloso espontáneo**

La turgencia que se presentó en ciertas plántulas pudo ser debida a la acumulación de solutos en las vacuolas de las células oclusivas, como el potasio iónico que se encuentra en el balance nutricional de sales utilizadas en la fórmula de los medios M.S. al 50% y el medio Peter's, puesto que la luz provoca la acumulación de K<sup>+</sup> en dichas células y para este experimento el fotoperíodo al cual se sometieron los organismos fue de 16 horas de luz por ocho de oscuridad, contribuyó a su acumulación la cual provocó que el estoma se abriera y tuviera mayor contacto con la alta demanda evaporativa del ambiente del frasco, con lo cual se perdió el equilibrio osmótico y el agua que entró a la vacuola fue superior a la cantidad que salió. A esto se suma que la concentración de sales de los medios, posiblemente elevada, indujo a las plántulas a producir compuestos orgánicos que crearon un ajuste osmótico que impidió que el líquido saliera de los tejidos y se produjeron fisuras en la epidermis que al encontrarse con un ambiente húmedo, lejos de cicatrizar, reventó por completo el material biológico por deformación vacuolar de las células (Serrana-Rodríguez, 2007).

La falta de respuesta morfogénica en los cultivos de tejido caloso, tanto de *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina* para este experimento, pudo verse influida por los niveles de hormonas vegetales adicionadas en los tratamientos, ya que promovieron una proliferación continua, acelerada y abundante de células meristemáticas, las cuales respondieron con facilidad a estos estímulos de concentración de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. El aumento de volumen de los callos fue debido a que las auxinas promovieron el alargamiento e inhibieron la diferenciación celular, mientras que las citocininas estimularon la división, como ya se mencionó antes, el éxito de la regeneración de tejidos vegetales a órganos y plantas completas, depende de la variabilidad genética y de la calidad del inóculo utilizado (Calva-Calva y Pérez-Vargas, 2005).

La apariencia oxidada de los tejidos se produjo por una situación de estrés como consecuencia del daño causado por los cortes que se realizaron, que estimularon el metabolismo de compuestos fenólicos, los cuales son sustancias lábiles que se acumularon, se oxidaron y causaron que el callo se oscureciera (López, 2011; Preece y Compton, 1991), a pesar del uso de la solución de ácido ascórbico los inóculos se tornaron marrones, lo cual se describe como un fenómeno frecuente observado durante la micropropagación (Romero-Germán, 2013) a todo esto se suma el crecimiento y multiplicación celular que provocaron el desgaste de los nutrimentos y carbohidratos presentes en los medios M.S. al 50% y Peter's que culminó con la muerte del todo el material biológico.

## IX. CONCLUSIONES

El cultivo de inóculos apicales y laterales de plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas de ambas especies, donde se esperaba la formación de brotes aéreos cuando la concentración de citocinina fuera mayor a la de auxina y la concentración de auxina fuese superior a la de citocinina formara raíces adventicias se logró, con lo que se concluye que la hipótesis de este trabajo es cierta y se acepta.

La obtención de plantas completas de las especies *Astrophytum asterias* y *Mammillaria bombycina* mediante un método de micropropagación *in vitro* de tejidos vegetales fue posible, por lo tanto el objetivo general de este estudio se alcanzó.

De la evaluación del porcentaje de germinación en los cuatro diferentes tratamientos utilizados para obtener plántulas de *Astrophytum asterias* se encontró mediante el análisis estadístico que existió diferencia significativa entre éstos al obtenerse un valor de F calculada mayor al de F de tablas, seguido de la prueba de Duncan con el cual se concluyó que el medio M.S. al 50% es el más adecuado para la germinación de semillas con una media de 6.14. Mientras que con *Mammillaria bombycina* el medio con un mayor número de plántulas fue el Peter's, aunque estadísticamente no se encontró una diferencia significativa por lo tanto se determinó que los cuatro tratamientos utilizados para la germinación de semillas de ésta especie promovieron de igual forma la obtención de organismos vegetales.

La respuesta morfogénica de los inóculos apicales y laterales obtenidos de plántulas de *Astrophytum asterias* en nueve diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y ANA (benziladenina y ácido naftalenacético) en tres medios de cultivo fue la esperada al obtenerse brotación y enraizamiento. Se obtuvieron en el medio M.S. al 50% un total de 60 brotes y 17 en el medio Peter's, mientras que para la formación de raíces adventicias solo el M.S. registró 9. El tratamiento con mayor brotación fue el nueve (ANA 0.5/2 BAP mgL<sup>-1</sup>) con un total de 52 brotes, del medio M.S. y la mejor respuesta en el medio Peter's fue del tratamiento tres (ANA 0/BAP 2 mgL<sup>-1</sup>) con nueve brotes, la respuesta de formación

de raíces fue del tratamiento cuatro (ANA 0.1/0 BAP mgL<sup>-1</sup>) del medio M.S. con 7 raíces adventicias. El análisis estadístico registró una diferencia significativa entre F calculada mayor a F de tablas y se aplicó la prueba de Tukey con la cual se concluye que los mejores tratamientos utilizados para la regeneración *in vitro* son el dos (ANA 0/1 BAP mgL<sup>-1</sup>), cuatro (ANA 0.1/0 BAP), siete (ANA 0.5/0 BAP) y nueve del bloque A del medio M.S. al 50%.

La brotación en inóculos de *Mammillaria bombyna* fue posible en el medio M.S. al 50% con un total de 31 brotes, del cual el tratamiento cinco (ANA 0.1/ BAP 1 mgL<sup>-1</sup>) obtuvo un total de 29, en tanto, el desarrollo de raíces adventicias tuvo lugar en los medios M.S. y Peter's siendo el tratamiento siete (ANA 0.5/ BAP 0 mgL<sup>-1</sup>) que produjo ocho raíces del primer medio y el tratamiento cuatro (ANA 0.1/ BAP 0 mgL<sup>-1</sup>) con una raíz del segundo medio respectivamente. El análisis estadístico de la regeneración de brotes y el que se realizó para la morfogénesis de raíces determinaron que no existió una diferencia significativa, por lo tanto se concluyó que el efecto de las diferentes concentraciones y combinaciones de BAP y ANA (benziladenina y ácido naftalenacético) entre los nueve tratamientos de los tres medios de cultivo empleados promueven de igual forma la regeneración de brotes y raíces en inóculos apicales y laterales de la especie *M. bombycina*.

El cultivo de tejido calloso no arrojó resultados de diferenciación en los nueve tratamientos de cada uno de los tres medios de cultivo empleados para este experimento, lo cual hace imprescindible continuar con este estudio de manera particular con el fin de encontrar condiciones adecuadas para su cultivo a fin de lograr una diferenciación a brotes y raíces adventicias, es así que, este objetivo no se logró de manera satisfactoria.

## X. LITERATURA CITADA

Azcón- Bieto, J. y M. Talón. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill interamericana. Ediciones Universitat Barcelona: España. 134 pp.

Ballesteros, F. 1978. Las cactáceas y las otras plantas suculentas. Floraprint: España. 142 pp.

Barba, A. A., R. B. S. Luna y A. J. Romero. 2001. Micropropagación vegetal. Editorial Trillas: México. 107 pp.

Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas* (CONABIO) **32**: 2-5.

Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México, México. Pp. 743.

Bravo- Hollis, H. y H. Sanchez Mejorada. 1991. Las cactaceas de México. Vol II Universidad Autonoma de México, México. 404 pp.

Carhuarica, E. K., Oliver, S. J., Gonzales, A. J. y L. J. Rodriguez. 2012. Introducción y multiplicación *in vitro* del cultivo de ajo variedad Morado Barranquino. *Revista Perú biología*. 19 (3): 341-344 pp.

CONABIO y SEMARNAT. 2009. Cuarto Informe Nacional de México al Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D.F.

Cota-Sánchez. J.H., 2008. Evolución de cactáceas en la región del Golfo de California. pp 67-79. En: Estudios de las Islas del Golfo de California. Flores-Campaña, L.M. (ed). Universidad Autónoma de Sinaloa-Gobierno del Estado de Sinaloa-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. 221 pp.

Charle, A. I. 2008. *Mammillaria bombycina* Quehl 1910. 2 pp. Recuperado desde: [www.fichas.suculentas.es](http://www.fichas.suculentas.es)

Dirzo, R. 1990 La biodiversidad como crisis ecológica actual ¿qué sabemos? Ciencias, especial 4. Pág. 49.

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

George, E. F. y Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratorios. Exegetics Limited: 709 pp.

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

Hernández, M. H. y H. A. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta botánica Mexicana*. **26**: 33-52.

Hernández-Oria, J. G., R. Chávez-Martínez y E. Sánchez-Martínez. 2007. Factores de riesgo en las cactáceas amenazadas de una región semiárida en el sur del desierto chihuahuense, México. *Interciencia*. **32** (11): 728 pp.

Hunt, D. 1992. CITES Cactaceae checklist. Royal Botanic Gardens, Kew. Surrey. 190 pp.

López, E. C. 2011. Reacciones de hipersensibilidad en plantas cultivadas *in vitro*. *Universia Bilioteca de Recursos*. **26**. Recuperado desde: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros26/26reacciones.html>

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

Manzo, R. S. M. 2010. Propagación *in vitro* de *Mamillaria coahuilensis* var. *Coahuilensis* (Boedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semillas para su conservación. Tesis de Maestría: Colegio de postgraduados, campus Montecillos. Postgrado de recursos genéticos y productividad fruticultura. Montecillos, Texcoco, Estado de México.

Margara J. M. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los Meristemos y la Organogénesis. Editorial Mundi - Prensa. Madrid: España. 110 pp.

Martínez-Rendón, A. Y. 2007. Evaluación fisiológica de brotes regenerados *in vitro* de *Echinocactus grusonii* Hildmann (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM: México, D. F.

Murashige, T. 1974. Plan Propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*. **25**: 136 pp.

Neyra, G. L. y D. L. Durán. 1988. Biodiversidad. Recursos naturales. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 62 -63 pp.

Ojeda-Zacarias, M del C., H. Rodríguez-Fuentes y A. Gutiérrez-Diez. 2008. Micropropagación de cactáceas. Facultad de Agronomía, UANL y Museo Bernabé de las Casas. Tesis de licenciatura. Nuevo León: México. 144 pp.

Ortega-Baes, P. y H. Godínez-Alvarez. 2006. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodivers Conserv.* **15**: 817- 827.

Oviedo-Reyes, M. R. 2003. Mantenimiento y propagación de cactáceas y crasuláceas para su conservación en el jardín botánico IB-UNAM. Tesis de Licenciatura. UAM Iztapalapa, México, D. F.

Padrón-Pereira, C. A. 2012. Innovaciones en el agordesarrollo de las cactáceas. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.* **3** (1): 39-79.

Pérez, M. B. E., M. E. R. Pérez, E. A. Villalobos, E. R. Meza, del R. R. Morones y H. J. V. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular Developmental Biology-Plant.* **34**: 131-135.

Pérez-Molphe-Balch, E., Villalobos, E., Meza, E., Morones L. R. y J. Lizalde. 1998. Propagation of 21 species of Mexican cactoby axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* **34**: 131-135.

Preece JE, ME y Compton 1991. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 17. In YPS Bajaj (Ed): Berlin. Páginas: 168-189.

Quiala, E., G. Montalvo y J. Matos. 2004. Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. *Biotecnología Vegetal.* **4** (4): 195-199 pp.

Romero-Germán, M., O. González-Caballero, B. Estrada-Galván, V. M. Chávez-Ávila y M. Mata-Rosas. 2013. Regeneración *in vitro* de *Carnegieia gigantea* (Engelm.) Britt. & Rose (Cactaceae). VII Simposio Internacional sobre la Flora y Fauna en Zonas Áridas. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Jardín Botánico. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México y Jardín Botánico Francisco Javier Clavijero. Instituto de Ecología A. C. Jalapa, Veracruz: México. 182 pp.

Romero, R. T. 2008. Fertilizantes comerciales como sustituto en el cultivo *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). Especie mexicana. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D. F.

Romero-Schmidt, H.L., Vega-Villasante, F., Nolasco, H. y Montan, C. 1992. The effect of darkness, freezing, acidity and salinity on seed germination of *Ferocactus peninsulae* *Ferocactus peninsulae*, Cactaceae. *Journal of Arid Environments.* **23** (4): 389-395 pp.

Rojas-Aréchiga, M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* **44**: 85-104.

Rosas-López, U. y M. Collazo-Ortega. 2004. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia Cichipe* (Goss.) Backerberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto fa. *Grandis* (Rose) Bravo-Holis (Cactaceae). Yton: 213-220 pp.

Ruvalcaba-Ruiz, D., D. Rojas-Bravo y A. J. Valencia-Botín. 2010. Poroagacion *in vitro* de *Coryphantharetusa* (Britton& Rose) un cactus endémico y amenazado. Tropical and Suptropical Agroecosystems. **12**: 140 pp.

Sánchez-Mejorada, R. H. 1982. Algunos usos Prehispánicos de las CACTÁCEAS entre los indígenas de México. Editor: Gobierno del Estado de México. Toluca, México. 48 pp.

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 silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. DIARIO OFICIAL: México. 4-11 pp.

SEMARNAT y CONABIO. 2009. Cuarto Informe Nacional de México al Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D.F.

Serrana-Rodríguez. 2007. Regulación osmótica en células vegetales. Recuperado desde: <http://www.uruguayeduca.edu.uy>

Torres, B. E., L. C. Galindo y G. A. Domínguez. 2010. Cacto estrella (*Astrophytum asterias*). Fichas de especies mexicanas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. CONABIO: México, D.F. 1-3 pp.

U. S. Fish y Wildlife Service.2003. Star cactus (*Astrophytum asterias*). Recovery Plan. Albuquerque, New México. 1-17 pp.

Villavicencio, G. E. E., A. M. Villegas, G. O. Arellano y J. H. Vatgas. 1999. Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophuyum myriostigma* Lem. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. **44**: 1-4 pp.

## XI. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

Arias, S. 2010. Diversidad de cactáceas y su aprovechamiento en México. Instituto de Biología. Jardín Botánico, UNAM: México, D. F. Recuperado Desde: [http://www.inecc.gob.mx/descargas/con\\_eco/2010\\_sem\\_megadiverso\\_pres\\_06\\_sarias.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/con_eco/2010_sem_megadiverso_pres_06_sarias.pdf)

Calva-Calva, G. y J. Pérez-Vargas. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista digital Universitaria*. 6 (11). Recuperado desde: [http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov\\_art104a.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf)

CITES. 2009. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Recuperado desde: <http://www.cites.org/esp/resources/especies.html>.

Jiménez-Sierra, C. L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. 12 (1) Recuperado desde: <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num1/art04/index.html>

Martínez-Ávalos, J. G., J. Golubov, M. C. Mandujano y E. Jurado. 2012. Causas de la mortalidad del falso peyote (*Astrophytum asterias* Zucc. Lem). Causas de la mortalidad del falso peyote (*Astrophytum asterias* Zucc. Lem). *Journal of Arid Enviroments*. 71: 350-258. Recuperado desde <http://www.revistaciencia.uat.edu.mx/index.php/CienciaUat/article/221>

PROCER: Programa de conservación de especies en riesgo 2007-2012. Recuperado desde: <http://www.procer2007-2012.htm>

Quiala, E, G. Montalvo, De Feria M, Matos J, Mederos R, Chávez M, Capote A, Pérez N. 2003. Propagación *in vitro* de dos especies endémicas de Cuba en categoría de amenaza. V Taller Internacional sobre recursos fitogenéticos. Recuperado desde: <http://www.fitogen'2003/isbn959-246-089-2.html>