



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus fissuratus* (Engelm.)
K. Schum. (Cactaceae), especie en peligro de
extinción.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA DE LOURDES VÁZQUEZ SERVÍN



DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. LAURA PATRICIA OLGUÍN SANTOS

México, D.F.

2016.



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Vázquez
Servín
María de Lourdes
58 40 42 32
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305020158

2. Datos del tutor

M. en C.
Laura Patricia
Olguín
Santos

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Ángel Salvador
Arias
Montes

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Sonia
Vázquez
Santana

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Ana Laura
López
Escamilla

7. Datos del trabajo escrito

Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus fissuratus* (Engelm.) K. Schum. (Cactaceae), especie en peligro de extinción.
93 p.
2016

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría de la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos en el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM, dentro del taller de “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”.

A la Vida por siempre regalarme retos y enseñanzas.

A mi madre y a mi padre, gracias por su infinito amor que con su paciencia y soporte soy más fuerte cada día.

A mis hermanos por ser mis cómplices desde que llegué a este mundo.

A mi pequeña Ximena por motivarme a ser mejor persona.

A mis amigos por compartir los mejores momentos y permanecer en los peores.



La única diferencia entre un sueño y una meta es una fecha.

AGRADECIMIENTOS

- A las autoridades de la Facultad de Ciencias de la UNAM por abrirme las puertas de la máxima casa de estudios y permitir mi formación académica.
- Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM por brindarme el acceso a las instalaciones y equipo necesario para el desarrollo de este trabajo.
- A la M. en C. María Eugenia Muñiz Díaz de León por la asesoría técnica y el acceso a las instalaciones y equipo del Taller de Plantas I y II que facilitó la realización de este trabajo.
- A la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos y la M. en C. Argelia Díaz Rico por el mantenimiento de los cultivos en las Cámaras de Ambientes Controlados.
- Al M. en C. Ricardo Wong y el M. en C. Aldebarán Camacho por la asesoría y apoyo técnico para la obtención de los cortes histológicos de los embriones somáticos y las microfotografías.
- A la Dra. Ana Laura López Escamilla y la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos por dirigirme en este trabajo con paciencia, por compartir su conocimiento sobre las técnicas del cultivo de tejidos vegetales y por apoyarme cuando fue necesario.
- A las profesoras del taller “Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que crecen en ambientes contrastantes”: Judith Márquez Guzmán, Sonia Vázquez Santana, Margarita Collazo Ortega, Laura Patricia Olgún Santos, Ana Laura López Escamilla y Karina Jiménez Durán por sus comentarios y observaciones durante la realización del proyecto.
- Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, Coordinador Académico del Invernadero de la Facultad, por permitir mi estancia en las instalaciones durante la redacción del manuscrito.
- A todos mis profesores que impulsaron mi formación como Bióloga y de quienes aprendí a ver los aspectos de la Vida desde diferentes enfoques, especialmente a Ana María Velasco, Mónica Elías, Laura Calvillo, Sergio Cevallos, Rosalba Esquivel, Francisco Reséndiz y Víctor López.
- A los sinodales, la Dra. Judith Márquez Guzmán, el Dr. Ángel Salvador Arias Montes, la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, la Dra. Sonia Vázquez Santana y la Dra. Ana Laura López Escamilla por la revisión y el enriquecimiento de este trabajo.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
• Características generales de las cactáceas	3
○ Semillas	4
• Latencia	5
• Germinación	6
• Importancia y usos de las cactáceas	9
• Género <i>Ariocarpus</i> , distribución geográfica y estado de conservación	10
• <i>Ariocarpus fissuratus</i>	13
• El Cultivo de Tejidos Vegetales	16
• Problemas frecuentes en el cultivo <i>in vitro</i>	21
• Cultivo de Tejidos Vegetales en cactáceas	23
• Cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Ariocarpus</i>	24
○ Organogénesis	25
○ Embriogénesis somática	27
JUSTIFICACIÓN	30
OBJETIVOS	31
HIPÓTESIS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	31
• Material biológico	31
• Desinfección superficial y siembra de semillas	32
• Elongación de las plántulas en medio líquido	34
• Obtención de explantes	34
• Inducción de organogénesis	35
• Inducción de embriogénesis somática	36
○ Proliferación de los embriones somáticos	36
○ Maduración de los embriones somáticos (ABA/GA ₃)	36
○ Germinación de los embriones somáticos (Phytigel)	37
○ Cortes histológicos de embriones somáticos	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
• Colecta del material biológico	40
• Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>A. fissuratus</i>	40
• Desarrollo <i>in vitro</i> de las plántulas de <i>A. fissuratus</i>	50
• Elongación de las plántulas	57
• Respuestas morfogénicas en el medio de inducción	58
○ Formación de callo (BA/ANA)	58
○ Formación de callo (K/2,4-D).	60
○ Organogénesis indirecta	63
○ Embriogénesis somática	65
• Proliferación de los embriones somáticos	70
• Maduración de los embriones somáticos	72
• Germinación de los embriones somáticos	74
• Histología de los embriones somáticos	76
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	88

ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABA	ácido abscísico
AIB	ácido indol-3-butírico
ANA	ácido α -naftalenacético
BA	n ⁶ -benciladenina
CA	carbón activado
CITES	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
ES	embriones somáticos
FAA	formol: ácido acético: alcohol etílico
GA ₃	ácido giberélico
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
K	kinetina
LRW	LR White
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
MS 50%	medio MS a la mitad de macronutrientes y micronutrientes
MS 50% sac	medio MS a la mitad de macronutrientes, micronutrientes y de sacarosa
NOM	Norma Oficial Mexicana
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

RESUMEN

Todos los taxa del género *Ariocarpus* son endémicos del Desierto Chihuahuense, están sujetos a protección especial, amenazados o en peligro de extinción debido a que son especies de lento crecimiento, sumado a la colecta ilegal excesiva de plantas y semillas silvestres, y la destrucción de su hábitat. En el presente trabajo se utilizaron las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para explorar la germinación de las semillas y la respuesta de los tejidos de plántulas cultivadas *in vitro* como una aportación para el establecimiento de metodologías de propagación que repercutan en la conservación de esta especie. A partir de ejemplares silvestres de *A. fissuratus* mantenidos en invernadero se obtuvieron frutos producto de polinizaciones manuales. Semillas cosechadas en los años 2008, 2009, 2011, 2012 y 2013 fueron germinadas *in vitro*, con un tiempo de almacenamiento de un mes a seis años. Se evaluó el porcentaje de germinación en dos medios de cultivo en función del tiempo de almacenamiento; se obtuvo el máximo de germinación (86.7%) en semillas con dos años de almacenamiento seguido de 83.3% en semillas con cuatro años. Las plántulas en medio Murashige y Skoog (MS) se transfirieron a medio líquido MS para promover su elongación, al alcanzar la talla adecuada se disecaron en explantes longitudinales, laterales, centrales y tubérculos y se sembraron en medio MS adicionado con N6-benciladenina (0, 1, 2, 3 y 5 mgL⁻¹) combinado con ácido α -naftalenacético (0, 0.5 y 1 mgL⁻¹), y kinetina (0, 0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) en combinación con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (0, 0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) como medio de inducción. En todos los explantes se obtuvo callo, se oxidaron en la zona del corte y el 3% se oxidó completamente en ausencia de la auxina. Los únicos brotes obtenidos fueron por organogénesis indirecta a partir del callo de tubérculos cultivados con N6-benciladenina 3 mgL⁻¹ combinada con ácido α -naftalenacético 0.5 mgL⁻¹. Se formaron embriones somáticos a partir del callo producido en tubérculos con N6-benciladenina 3 y 5 mgL⁻¹ y en combinación con ácido α -naftalenacético 1 mgL⁻¹. Éstos proliferaron en medio MS enriquecido con sacarosa 75 gL⁻¹ y maduraron en medio MS, sacarosa 75 gL⁻¹ adicionado con ácido abscísico (1 mgL⁻¹), combinado con ácido giberélico (1 mgL⁻¹) y carbón activado (2 gL⁻¹). Los embriones somáticos no lograron germinar en medios solidificados con agar 8.5 gL⁻¹ y 10 gL⁻¹ o Phytigel® 5 gL⁻¹ y enriquecidos con sacarosa 75 gL⁻¹ debido a que entraron en ciclos repetitivos de formación de callo. Se realizaron cortes histológicos de las estructuras obtenidas para corroborar su identidad como embriones somáticos.

INTRODUCCIÓN

México es un país megadiverso y recibe tal clasificación porque junto con otras naciones contienen la mayor diversidad de especies en el mundo. Esta biodiversidad se debe a su ubicación geográfica, que propicia una gran variedad de climas y tipos de vegetación únicos, como los humedales de Cuatrociénegas, Coahuila (Valverde *et al.*, 2005; CONABIO, 2012). El matorral xerófilo es el tipo de vegetación que cubre la mayor parte del territorio mexicano, desde la Península de Baja California, el altiplano desde Chihuahua y Coahuila hasta Jalisco, Guanajuato, Hidalgo y el Estado de México, prolongándose al sur en forma de faja en Puebla hacia Oaxaca. Su clima es extremo, la temperatura media anual oscila entre 12-26°C y la precipitación media anual en general es inferior a 700 mm (Rzedowski, 2006). Las cactáceas son uno de los grupos de plantas más representativos de las regiones áridas y semiáridas, con amplia distribución en el continente americano, siendo México el principal centro de diversidad, además del suroeste de los Estados Unidos, Perú, Bolivia y Brasil (Hernández y Godínez, 1994; Arakaki *et al.*, 2011). México tiene un alto índice de endemismo de cactáceas a nivel genérico (73%) y de especies (78%). Muchas de ellas se encuentran bajo una fuerte presión de colecta y a la destrucción de su hábitat, además cuentan con una habilidad limitada para restablecerse demográficamente después de un evento de perturbación. Lo anterior deriva en que un número significativo de cactáceas mexicanas se hayan incluido en listados de plantas amenazadas a nivel nacional por la NOM-059-SEMARNAT-2010 y a nivel internacional por la Lista Roja de la UICN (SEMARNAT, 2010; Fitz *et al.*, 2013).

Ariocarpus fissuratus es una cactácea de lento crecimiento y endémica del Desierto Chihuahuense, no está enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 y en la lista roja de la UICN se considera en la categoría de “preocupación menor”. Aun así, algunas poblaciones tienen un número reducido de individuos debido a la colecta ilegal de ejemplares silvestres y a diversas actividades antropogénicas (Villavicencio *et al.*, 2006; SEMARNAT, 2010, Fitz *et al.*, 2013).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) aplicado a especies de cactáceas amenazadas y a algunas del género *Ariocarpus* ha sido reportado con buenos resultados obteniendo brotes adventicios y embriones somáticos (Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994; Moebius, 2003; Gómez, 2008; Jofre-Garfias *et al.*, 2010). Pocos son los trabajos con *A. fissuratus* por lo que se emplearon las técnicas de CTV para evaluar la viabilidad, tiempo de almacenamiento y germinación de las semillas de esta especie, así como llevar a cabo ensayos con reguladores de crecimiento para promover respuestas morfogénicas.

ANTECEDENTES

En el mundo se calculan aproximadamente 1400 especies de cactáceas (Mabberley, 1997 citado por CONABIO, 2012), de las cuales se distribuyen en México 693 especies y 386 subespecies comprendidas en 68 géneros (Guzmán *et al.*, 2007). Nuestro país alberga 37% de éstos (25 géneros) clasificados como endémicos, cuenta con 518 especies y 206 subespecies que están distribuidas sólo en nuestro territorio nacional por lo que es un grupo bien representado en México (Guzmán *et al.*, 2003; Villavicencio *et al.*, 2006).

Las cactáceas son componentes muy importantes y numerosos de la flora xerófila mexicana, sólo superados en cantidad por miembros de las familias Asteraceae, Fabaceae, Orchidaceae, Poaceae, Euphorbiaceae y Rubiaceae. Se les pueden hallar representadas en los distintos tipos de vegetación, y con el transcurso del tiempo adquirieron formas y hábitats diversos como adaptaciones a los diferentes ambientes (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

- **Características generales de las cactáceas**

Son plantas suculentas que se caracterizan por almacenar agua en sus órganos. Poseen un sistema radicular ramificado que les permite aprovechar rápidamente la precipitación de agua, la gruesa cutícula de cera evita la transpiración excesiva (Mauseth, 2006). El metabolismo CAM (metabolismo del ácido crasuláceo) es una alternativa a la ruta fotosintética que permite a la planta fijar CO₂ atmosférico durante la noche cuando la pérdida de agua se minimiza y la fotorrespiración se reduce, presentan tallos fotosintéticos y hojas modificadas en espinas (Cushman y Bohnert, 1997; Mauseth, 2006; Arakaki *et al.*, 2011). La estructura que caracteriza a las cactáceas es la aréola, ésta es una región meristemática o una yema axilar altamente especializada (Mauseth, 1983; Gibson y Nobel, 1986 citados por Anderson, 2001) presente en todas las etapas del desarrollo (Mauseth, 2006), tiene origen en la reducción de los entrenudos cortos resultando una masa de nudos compactados y las yemas axilares asociadas; una aréola se origina en el ápice de los tubérculos (protuberancia cónica o cilíndrica del tallo, también llamada podario) de donde surgen espinas, brotes, tallos florales y lana, entre otras estructuras (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Anderson, 2001; Mauseth, 2006). Presentan diferentes formas de vida que incluyen arbórea, trepadora, rastrera,

epífitas o geófitas; algunas son dimórficas ya que producen diferentes tipos de anatomía y/o morfología en las diferentes etapas de sus vidas (Mauseth, 2006; Arakaki *et al.*, 2011).

Cactoideae y Opuntioideae ocupan casi todos los hábitats terrestres desde desiertos, praderas, bosques, selvas y zonas alpinas; las hojas en la subfamilia Cactoideae son microscópicas por lo que el córtex del tallo realiza la actividad fotosintética (Mauseth, 2006).

- **Semillas**

Las semillas son la unidad móvil y de reproducción sexual de las plantas, tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenecen, siendo uno de los elementos más eficaces para que ésta se disperse en tiempo y espacio, de modo que las plantas encuentran nuevos sitios y microambientes (Doria, 2010).

Las semillas de las cactáceas tienen su origen en los óvulos campilótopos rara vez anátropos, con el funículo frecuentemente curvado alrededor, crasinucelados y bitegumentados. Se desarrollan en el interior de frutos parecidos a bayas. Presentan variaciones en forma, tamaño, estructura, características del embrión y color de la testa (Niembro, 1989).

El número de semillas producidas por fruto puede variar entre frutos de la misma especie e incluso frutos de una misma planta, depende de la edad de la planta, el número de flores por planta y el tamaño de la planta (Del Castillo, 1988 citado por Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

El tipo de dispersión de las semillas de cactáceas puede ser por animales (zooecoria), viento (anemocoria) o agua (hidroecoria), según sean las características

estructurales del fruto y de las semillas (Bregman, 1988 citado por Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Las semillas de cactáceas tienen gran potencial para formar bancos de semillas, pues entre sus características algunas especies requieren de luz para germinar, son de tamaño pequeño, pueden requerir de un periodo de postmaduración para germinar y longevidad ecológica (Rojas-Aréchiga y Batis, 2001). La serotinia se presenta cuando una planta retiene al menos una porción de sus semillas en alguna estructura vegetativa y/o reproductiva, retrasando la dispersión. En cactáceas, los frutos pueden quedarse inmersos en el tallo de la planta, o bien las espinas y lana que se encuentran en el ápice pueden impedir la dispersión inmediata de las semillas (Santini, 2011). Tanto la formación de bancos de semillas en el suelo como bancos aéreos (serotinia) generados por cactáceas han sido poco estudiados.

- **Latencia**

La latencia de las semillas es el proceso donde las actividades fisiológicas se detienen de manera reversible, incluso cuando las condiciones como la humedad, aireación y temperatura, son adecuadas para la germinación (Bewley, 1997; Baskin y Baskin, 2014). Harper (1957) y Roberts (1972) citados por Murray (1984) reconocieron tres tipos de latencia o dormancia:

1. *Latencia innata o primaria*. Impide la germinación en la planta madre y durante un tiempo después de su dispersión. Producida por la presencia de compuestos inhibitorios endógenos en la testa, es necesario lavar las semillas o imbibirlas durante un tiempo después de la siembra por medio de riegos frecuentes para obtener altas tasas de germinación, es decir, en condiciones naturales las

semillas necesitan largos periodos de humedad para lavar los inhibidores solubles de su testa.

2. *Latencia forzada o quiescencia*. Regulada por las condiciones ambientales como la luz, la temperatura y la humedad.

3. *Latencia inducida o secundaria*. Las semillas se mantienen dormantes aun cuando están bajo condiciones favorables para la germinación. No se había reportado este tipo de latencia en cactáceas hasta el trabajo de Flores *et al.*, 2006 donde se menciona que la skotolatencia (se refiere al tipo de latencia secundaria inducida por la oscuridad, se rompe con el estímulo de la giberelina y/o luz) está presente en ocho especies de cactáceas del Desierto Chihuahuense.

El papel de las sustancias inhibitorias en la germinación de las semillas de cactáceas parece tener implicaciones ecológicas, aporta información de las condiciones ambientales en las que habitan. Los inhibidores solubles presentes en la testa o en la pulpa de los frutos controlan la germinación, manteniendo el estado latente hasta que las condiciones ambientales sean adecuadas para el crecimiento (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

- **Germinación**

La germinación es el reinicio del crecimiento del embrión, paralizado durante las fases finales de la maduración. Los procesos fisiológicos de crecimiento exigen actividades metabólicas aceleradas y la fase inicial de la germinación consiste principalmente en la activación de los procesos por aumento en la humedad y la actividad respiratoria de la semilla. La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluye la respiración, síntesis proteica y movilización de reservas, la división y el alargamiento celular en

el embrión provocan la ruptura de las cubiertas seminales por la emergencia de la radícula (Chong *et al.*, 2001; Baskin y Baskin, 2005). La germinación ocurre en tres fases sucesivas que se superponen parcialmente (Chong *et al.*, 2001; Koornneef *et al.*, 2002; Baskin y Baskin, 2014).

FASE I. Debido a la imbibición, hay intensa absorción de agua de los distintos tejidos que forman la semilla, causando su hinchamiento y ablandamiento de la testa (sólo este fenómeno se produce tanto en semillas vivas como muertas porque es independiente de la actividad metabólica de la semilla). Ocurre un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

FASE II. Intensificación de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio, translocación y asimilación de las reservas alimentarias para el crecimiento del embrión. La absorción de agua se reduce o se detiene por completo.

FASE III. Crecimiento y división celular que provoca la emergencia de la radícula y posteriormente del epicótilo. Se reanuda la absorción de agua y la actividad respiratoria aumenta (Fig. 1).

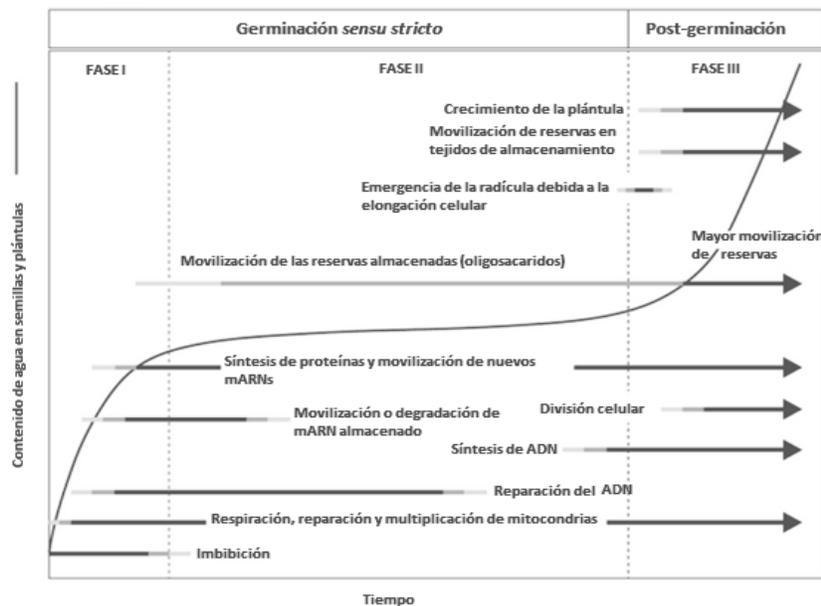


Figura 1. Fases de la germinación de semillas, se llevan a cabo cambios bioquímicos, moleculares y celulares que inician con el proceso de imbibición (Tomado y traducido de Bewley *et al.*, 2013).

En las primeras dos fases los procesos de germinación son reversibles, pero a partir de la fase de crecimiento se entra en una situación fisiológica irreversible. Si la semilla supera esta fase tendrá que originar una plántula o por el contrario morir. Para que la germinación ocurra la semilla debe ser viable, sana, no debe estar en latencia o aplicar algún método para romperla y con favorables condiciones ambientales (agua, temperatura, oxígeno y luz), (Sadhu, 1989; Baskin y Baskin, 2005, 2014). La semilla se encontrará en estado latente durante un tiempo variable, dependiendo de la especie, hasta que adquiera su capacidad de germinar (Chong *et al.*, 2001). Las pruebas de germinación se conducen bajo condiciones óptimas y como resultado, el valor de germinación establece el nivel óptimo de eficiencia esperado del lote de semillas (McDonald, 2005). La capacidad de germinación de una semilla se basa en una respuesta binaria (germinada/no germinada), un atributo cualitativo del proceso de germinación, generalmente convertido en un atributo cuantitativo como el porcentaje. Según Labouriau, 1983 (citado por Ranal y Santana, 2006), la germinabilidad o capacidad germinativa de una muestra de semillas es el porcentaje de semillas en el cual el proceso de germinación alcanza el máximo, bajo determinadas condiciones.

Hay pocos trabajos que evalúen la pérdida de viabilidad a través del tiempo, aunque los datos sugieren que la mayoría de las semillas de cactáceas tienen un comportamiento de almacenamiento ortodoxo (Roberts, 1972 citado por Murray, 1984). Las condiciones óptimas para el almacenamiento de semillas a largo plazo no son conocidas para la mayoría de las especies de cactáceas (Alcorn y Martin, 1974 citados por Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

- **Importancia y usos de las cactáceas**

Tienen una notable importancia ecológica como alimento y refugio para animales, evitan la erosión eólica y pluvial gracias a sus raíces; también han sido importantes en la vida del hombre como fuente de alimento, bebida, forraje y medicina, siendo además muy apreciadas como especies ornamentales en México y el extranjero (Diagre, 2004), lo que ha provocado su colecta indiscriminada de forma ilegal, colocando a varias especies en riesgo de extinción (Alanís y Velazco, 2008), principalmente porque son plantas suculentas de lento crecimiento y porque muchas de sus especies se reproducen exclusivamente por semillas o producen un número escaso de ellas.

En México, las especies del género *Ariocarpus* tienen importancia ritual y son valoradas por diversos grupos étnicos como los tarahumaras. Ellos le atribuyen a *Ariocarpus fissuratus* propiedades similares a las del peyote (*Lophophora williamsii*) como son rituales y medicinales pues es un narcótico natural que alivia fiebres y dolores reumáticos. Los huicholes lo consideran como un “cacto malo” que ocasiona locura permanente al igual que *A. retusus* (Furst, 1971). La tintura de *A. kotschoubeyanus* con etanol se usa como analgésico sobre moretones o golpes leves. El mucílago de los *Ariocarpus* es empleado para preparar pegamentos o adhesivos que usan para reparar la alfarería rota (Batis y Rojas, 2002). Rodríguez *et al.* (2010) determinaron la presencia de metabolitos y grupos funcionales en extractos metanólicos de *A. retusus* y *A. kotschoubeyanus* demostrando su actividad antibacteriana y antifúngica, y abre la posibilidad para el desarrollo y formulación de nuevos fármacos antimicrobianos.

- **Género *Ariocarpus*, distribución geográfica y estado de conservación**

Comúnmente a las plantas del género *Ariocarpus* se les conoce como: hikuli sunami, tsumiri, sunami, living rock, star rock, peyote cimarrón, falso peyote, wanamé, biznaga peyotillo, chautle o cactus chaute (Anderson, 2001).

Son plantas pequeñas, tuberosas, geófitas, tuberculadas, de color verde glauco cenizo a verde olivo, a veces rojo púrpúreo; las raíces son fusiformes; los tubérculos son lisos o fisurados, producen lana y presentan espinas en los estadios tempranos de desarrollo, en estado adulto las espinas están ausentes. El periodo de floración es en otoño, las flores emergen del ápice, son radiales, blancas, amarillas o púrpúreas y con antesis diurna y son polinizadas por abejas. El fruto es una baya de color blanquecino, verde claro, rosa o rojo; al madurar se seca (Fig. 2 a), permitiendo la liberación y dispersión de las semillas (pequeñas, piriformes y negras; Fig. 2 b) por agua, viento u hormigas (Aguilar-Morales *et al.*, 2011).

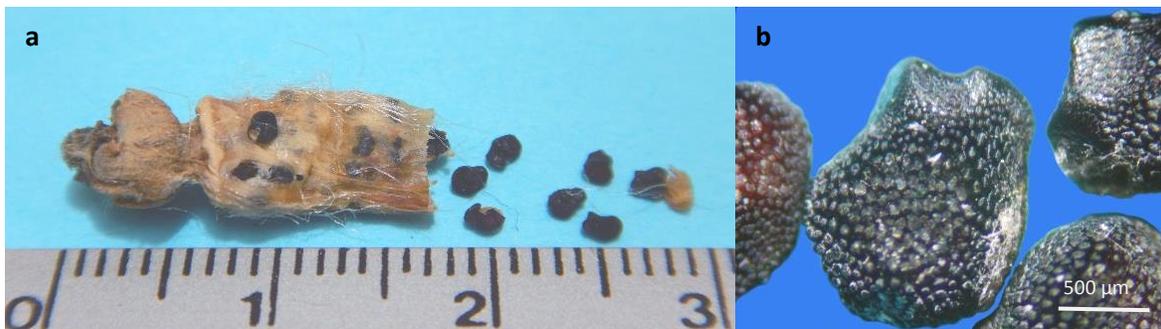


Figura 2. Fruto maduro y semillas de *Ariocarpus fissuratus* (a) y ornamentación de la testa (b).

El género *Ariocarpus* es monofilético y se distribuye en el Desierto Chihuahuense, crecen preferentemente sobre suelos calizos o ligeramente alcalinos formando parte de matorrales xerófilos y rosetófilos (Aguilar-Morales *et al.*, 2011).

El género *Ariocarpus* de acuerdo a la publicación “Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México” (Guzmán *et al.*, 2007), consta de cinco especies y dos de ellas incluyen subespecies:

- A. agavoides* (Castañeda) E.F. Anderson, 1962
- A. fissuratus*
 - ssp. *bravoanus* (H.M. Hern. & E.F. Anderson) Lüthy, 1999
 - ssp. *fissuratus* (Engelm.) K. Schum., 1894
 - ssp. *hintonii* (Stuppy & N.P. Taylor) E.F. Anderson & Fitz Maurice, 1998
 - ssp. *lloydii* (Rose) U. Guzmán, 2003
- A. kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum., 1897
- A. retusus*
 - ssp. *retusus* Scheidw., 1838
 - ssp. *scapharostroides* Halda & Horáček, 1997
 - ssp. *trigonus* (F.A.C. Weber) E.F. Anderson & Fitz Maurice, 1997
- A. scaphirostris* Boed., 1930

Debido a que el género aún se encuentra en valoración taxonómica, en el presente trabajo se designará que la especie empleada fue *A. fissuratus*.

Las especies de más amplia distribución son *A. fissuratus* y *A. retusus*; *A. kotschoubeyanus* cuenta con varias poblaciones en seis estados de la república, pero su hábitat es altamente especializado. Los taxa *A. agavoides*, *A. fissuratus* ssp. *bravoanus* y *A. scaphirostris* se consideran de distribución restringida por presentar una o pocas localidades conocidas (Aguilar-Morales *et al.*, 2011).

No obstante, *A. fissuratus* no se encuentra enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), algunas de sus áreas de distribución o tamaño de sus poblaciones han disminuido, por ejemplo, en la Sierra de San Marcos, Coahuila, el grado de deterioro de las poblaciones es alto debido al disturbio del hábitat y la fuerte incidencia de actividades humanas como pastoreo de bovinos y caprinos, la extracción de materiales para la construcción, minería, extracción de fibra de lechuguilla (*Agave lechuguilla*) y cera de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica*) (Villavicencio *et al.*, 2006).

La Lista Roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), tiene por objetivo proveer información y análisis sobre la situación,

tendencias y amenazas de las especies con el fin de informar y tomar medidas para la conservación de la biodiversidad; y considera a *A. fissuratus* en la categoría de *Preocupación menor* (Oldfield, 1997; Arias *et al.*, 2005; Fitz *et al.*, 2013).

En la tabla 1 se proporciona la distribución por estados de los taxa y sus estatus de amenaza de acuerdo a los listados mencionados.

Tabla 1. Estatus de amenaza de especies y subespecies del género *Ariocarpus* de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010: *Pr-Sujetas a protección especial, A-Amenazada, P-En peligro de extinción*; y la UICN: *LC-preocupación menor, NT-casi amenazada, EN –en peligro de extinción*. (-) *Datos no evaluados*. El género completo se encuentra en el Apéndice I de la CITES (Basada en la clasificación de Guzmán *et al.*, 2003, 2007)

Especie	Subespecies	Distribución	NOM-059	UICN
<i>A. agavooides</i>	---	S.L.P y Tamaulipas.	Pr	EN
<i>A. fissuratus</i>	<i>A. fissuratus</i> ssp. <i>bravoanus</i>	S.L.P., Tamaulipas,	P	EN
	<i>A. fissuratus</i> ssp. <i>fissuratus</i>	N.L., Coahuila,	-	LC
	<i>A. fissuratus</i> ssp. <i>hintonii</i>	Chihuahua, Zacatecas y	P	-
	<i>A. fissuratus</i> ssp. <i>lloydii</i>	Durango.	-	-
<i>A. kotschoubeyanus</i>	---	S.L.P., Tamaulipas, N.L., Coahuila, Zacatecas y Querétaro.	Pr	NT
<i>A. retusus</i>	<i>A. retusus</i> ssp. <i>retusus</i>	S.L.P., Tamaulipas, N.L., Coahuila, Zacatecas y Durango.	Pr	LC
	<i>A. retusus</i> ssp. <i>scapharostroides</i>	Tamaulipas y N.L.	-	-
	<i>A. retusus</i> ssp. <i>trigonus</i>		A	LC
<i>A. scaphirostris</i>	---	N.L.	P	EN

Además, las especies de *Ariocarpus* se enlistan en la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) en su Apéndice I, éste establece que el comercio sólo se permite en casos excepcionales tales como el intercambio científico o cuando los ejemplares fueron

propagados artificialmente en viveros registrados ante la Secretaría de la CITES como ocurre con República Checa, Italia, Alemania y Suiza pues muchas especies de cactáceas entre ellas los *Ariocarpus* se reproducen en éstos lugares (Benítez y Dávila, 2002; CITES, 2013).

- ***Ariocarpus fissuratus***

A. fissuratus (ANEXO I) es una especie endémica del Desierto Chihuahuense se extiende al sur de Texas, Estados Unidos (localidad tipo) y en México se distribuye en: Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas (Aguilar-Morales *et al.*, 2011; Fig. 3). En el estado de Coahuila está distribuida



Figura 3. Región del Desierto Chihuahuense, se señalan las Áreas Naturales Protegidas en las que se distribuye *Ariocarpus fissuratus*: Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatrociénegas (★) y en la Reserva de la Biósfera de Mapimí (●) Tomado y modificado de Granados-Sánchez, 2011.

junto con *A. kotschoubeyanus* y *A. retusus*. Las poblaciones de *A. fissuratus* se encuentran en los municipios de Cuatrociénegas, Ocampo, General Cepeda, Parras de la Fuente y Viesca. Es la única especie de *Ariocarpus* que se encuentra dentro de Áreas Naturales Protegidas: el Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatrociénegas y en la Reserva de la Biósfera de Mapimí (Aguilar-Morales *et al.*, 2011). Se distribuye preferentemente en el matorral xerófilo y en menor frecuencia en pastizal (Nobel, 2002; Villavicencio *et al.*, 2006).

Son **plantas** geófitas, casi planas, de color verde grisáceo a pardo que llega a camuflarse con las rocas vecinas. Los **tubérculos** se acomodan en espiral, tienen aspecto rugoso y al centro un surco longitudinal con abundante lana blanca-grisácea (Fig. 4). Tiene una cutícula rugosa muy gruesa



Figura 4. Ejemplar silvestre de *Ariocarpus fissuratus* en floración (Tomado de Villavicencio *et al.*, 2006).

comparable a la que poseen algunas especies del género *Pachycereus*; la epidermis está conformada por células rectangulares con paredes periclinales más largas, además es altamente convexa (no plana como en muchas especies de cactáceas) por ello en ésta especie y en *A. retusus* se denomina como papilosas (Loza-Cornejo y Terrazas, 2003). En la época de floración es más fácil localizarlas por sus **flores** grandes y de color pálido a rosa encendido (diámetro de 3.78 ± 0.11 cm) que salen de la región apical de la planta, viven hasta dos días (permanecen en antesis) y producen néctar. Las plantas florecen a mediados de octubre de manera sincrónica (sin embargo, algunas comienzan a florecer desde agosto), el pico de floración dura una semana en las poblaciones del Valle de Cuatrociénegas, Coahuila; siendo el mayor número de flores abiertas en los días tres y cuatro (Martínez, 2007).

Presenta hercogamia, es decir, cuando los pistilos tienen una mayor longitud que los estambres, (es un tipo de separación espacial de los sexos en flores

hermafroditas) y homogamia, donde la maduración de las anteras y la receptividad del estigma es simultánea. Es una especie xenógama pues demanda de polinizadores para la entrecruza y producción de semillas (Jiménez-Sierra *et al.*, 2009). La florivoría es alta y la sincronía reproductiva podría ser una estrategia adaptativa para evitar a los florívoros y asegurar la entrecruza.

En ambientes áridos, es común que las plantas presenten bajo reclutamiento por reproducción sexual y la forma principal de propagación es vegetativa, sin embargo, *A. fissuratus* tiene como único medio de perpetuación y dispersión la producción de progenie de tipo sexual. Las plantas de *A. fissuratus* comienzan a ser reproductivas cuando alcanzan un diámetro de cuatro centímetros y la mayoría de ellas presentan de una a tres flores por cada evento reproductivo (Martínez, 2007; Martínez-Peralta y Mandujano, 2011). En *A. fissuratus* se da el síndrome de melitofilia (polinización por abejas).

El **fruto** es una baya carnosa de color verde claro, al madurar se seca (Fig. 5 a) permitiendo la liberación y la dispersión de las semillas por agua, viento u hormigas (Aguilar-Morales *et al.*, 2011). La maduración de los frutos comienza desde enero, aunque la mayoría madura entre febrero y marzo. Martínez, (2007) reportó que para el mes de mayo las paredes del fruto ya se han roto y las semillas quedan en el surco lanoso (Fig. 5 b) o entre los tubérculos de las plantas y

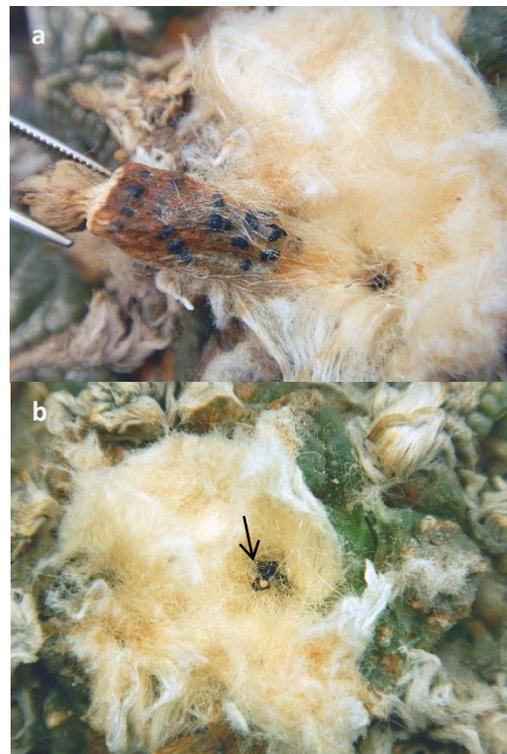


Figura 5. Extracción de un fruto maduro de *A. fissuratus* (a) y retención de las semillas más basales (b) en el ápice lanoso (flecha).

que al llegar las lluvias arrastran con ellas para favorecer la germinación en el suelo. Además, reporta que no logró la germinación de las semillas de *A. fissuratus*, y sugiere que dichos resultados pudieron darse porque las semillas presentaron: 1) algún tipo de latencia, 2) fueron colectadas cuando el fruto aún estaba inmaduro, o 3) existe serotinia entre los tubérculos de la planta, es decir, la lana de los tubérculos jóvenes, retienen las semillas evitando su dispersión. La retención de las semillas se ha reportado para especies del género *Mammillaria* y la retención de los frutos en géneros como *Ariocarpus* (Fig. 6), *Aztekium*, *Coryphantha*, *Echinocactus*, *Lophophora*, *Obregonia* y *Pelecypora* (Santini, 2011).



Figura 6. Ejemplar silvestre de *Ariocarpus fissuratus* en fructificación, mantenido en invernadero durante 12 años.

Los estudios de propagación constituyen una alternativa para la conservación de las cactáceas, posibilita obtener plantas a través de métodos artificiales y podría disminuir la demanda de ejemplares silvestres. La propagación de cactus puede hacerse de tres maneras: 1) germinación de semillas que permite la diversidad genética de las poblaciones, 2) propagación vegetativa por métodos tradicionales (brotes, esquejes, división de ejemplares cespitosos o por injertos), y 3) por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Doria, 2010).

- **El Cultivo de Tejidos Vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una propuesta en favor de la conservación de los recursos vegetales (Fay, 1994). Se basa en el principio de que una planta

consta de varios órganos los cuales están compuestos por diferentes tejidos especializados constituidos a su vez por células individuales, que pueden ser cultivados *in vitro* bajo condiciones asépticas utilizando un medio nutritivo. El medio está constituido de sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes), compuestos orgánicos (vitaminas y aminoácidos) además de una fuente de carbono (Loyola-Vargas, 2006). Un componente adicional es el carbón activado (CA) cuyo efecto es diverso, desde estimular el crecimiento y diferenciación en orquídeas, zanahoria, hiedra y tomate, hasta inhibirlo en tabaco y soya; tiene propiedad adsorbente y oscurece el medio, ayuda a reducir la toxicidad pues remueve compuestos como los fenoles producidos durante el cultivo (Razdan, 2003); en cactáceas previene la oxidación del callo, induce la elongación y crecimiento vigoroso de plántulas y brotes, estimula y reduce el tiempo para el enraizamiento (Pérez-Molphe *et al.*, 1998; Papafotiou *et al.*, 2001; Castro-Gallo *et al.*, 2002; Bautista, 2016). Se adicionan reguladores de crecimiento y los más empleados en CTV son: auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico.

Las *auxinas* inducen la división celular, la elongación de las células y por lo tanto de los tallos y entrenudos, están involucradas en el tropismo, la dominancia apical, la abscisión y el enraizamiento; frecuentemente se usan el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido α -naftalenacético (ANA), el ácido indol-3-butírico (AIB), el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naftoxiacético (ANO), el picloram y dicamba (Razdan, 2003).

Las *citocininas* son derivados de la adenina con función en la división celular, la modificación de la dominancia apical y la diferenciación de brotes en el cultivo de tejidos vegetales, entre las más usadas están la 6-benzilaminopurina (BAP) o N⁶-

benziladenina (BA), la 6- γ , γ -dimetilalilaminopurina (2iP), la 6-furfurilaminopurina (kinetina), el thidiazuron (TDZ), y las citocininas naturales (i⁶ ade y zeatina) (Razdan, 2003).

Las *giberelinas* actúan en sinergia con las auxinas y citocininas o por el contrario en algunos casos inhiben el crecimiento. El ácido giberélico (GA₃) es el más utilizado *in vitro* para promover la elongación de las plántulas enanas. Debe prepararse un stock fresco y filtrarse al medio esterilizado. El *ácido abscísico* puede promover o inhibir el crecimiento de callo dependiendo la especie y junto con las giberelinas, modulan la germinación de los embriones somáticos y cigóticos (Razdan, 2003).

El medio de cultivo puede ser líquido o sólido que emplea un agente gelificante que es una matriz que soporta los explantes y evita que los tejidos mueran por falta de oxígeno (Razdan, 2003). La porción de tejido u órgano diferenciado se llama explante, que iniciará su crecimiento y divisiones celulares en cultivo bajo condiciones controladas de luz, temperatura y pH para así obtener diferentes respuestas morfogénicas (Sánchez *et al.*, 2002; Pedroza-Manrique *et al.*, 2007; Chawla, 2009).

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales se han aplicado a especies de interés agroalimentario y ornamental principalmente permitiendo su propagación masiva, así mismo para la conservación de especies amenazadas, aquellas plantas que presentan problemas de propagación por métodos convencionales como las forestales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Chávez, 1993; Fay, 1994; Alegría, 2001).

Las semillas representan un explante ideal para establecerlo en condiciones *in vitro* ya que la principal ventaja de utilizar plántulas provenientes de la germinación *in*

in vitro es que las células, los tejidos y los órganos jóvenes son más competentes para responder a la inducción de la ruta organogénica o embriogénica, ya que entre más se diferencian los tejidos, éstos pierden esa capacidad y se tornan recalcitrantes para responder. Además, permite realizar técnicas de desinfección más severas en las semillas debido a que la cubierta seminal protege al embrión, en cambio los agentes desinfectantes podrían causar oxidación y estrés a los tejidos que entren en contacto con ellos (Bhojwani y Razdan, 1996; Benson, 2000).

El CTV tiene su mayor expresión en la micropropagación, ésta consiste en la multiplicación masiva de brotes a partir de un explante con potencial de diferenciarse cuando es cultivado en condiciones favorables bajo un balance de reguladores de crecimiento apropiado y un ambiente fisicoquímico controlado, regenerando individuos similares al explante donante (Rojas *et al.*, 2004; Royero *et al.*, 2007; Ramos-Parra *et al.*, 2010).

En la micropropagación es posible obtener diferentes rutas morfogénicas dependiendo del explante usado, así como las concentraciones hormonales bajo las cuales se incuba el explante. Básicamente se tienen dos rutas: 1) Organogénesis directa e indirecta consiste en la regeneración de brotes (plantas sin raíces), si se forman a partir del explante es directa; cuando se forma primero una masa desorganizada de células denominada callo y a partir de esta se desarrollan los brotes entonces se habla de organogénesis indirecta y 2) Embriogénesis somática directa e indirecta que es el desarrollo de estructuras similares en forma y función a los embriones cigóticos, pero difieren en que los somáticos no pasaron por una recombinación genética previa y por lo tanto son

genéticamente iguales al explante (directa) o callo (indirecta) que le dio origen (Lee *et al.*, 2010; Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

La embriogénesis somática es similar a la embriogénesis cigótica y se observan las mismas etapas. Posterior a la formación del cigoto éste se divide en la célula micropilar y la célula basal, ésta a su vez se divide para formar **el suspensor del embrión** y se forman las células que van a formar al embrión. Las células del embrión se dividen hasta que llega a la **etapa globular**, en el cual las células que lo forman tienen un arreglo esférico, aquí se diferencia la protodermis a partir de las células superficiales y el procambium a partir de las células que están en el centro del embrión. Después en las células del embrión se dan divisiones laterales que forman a los cotiledones, los cuales se diferencian morfológicamente del resto del embrión, y para la **etapa de corazón**, las células del córtex se forman del meristemo primordial y el meristemo radicular, en este estado el procambium comienza a formar al tejido vascular. Cuando los cotiledones se alargan comienza la **etapa de torpedo**, en éste el meristemo apical está más diferenciado y el procambium comienza a formar el eje central del hipocótilo-raíz, también se diferencia el meristemo radicular. Para cuando se alcanza la **etapa cotiledonar** ya se encuentran diferenciados los meristemas, tanto el apical como el radicular, están divididos por el hipocótilo y los cotiledones se encuentran también formados (Gilbert, 2003; Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

El proceso de embriogénesis somática consta de dos etapas: la inducción y la expresión. La competencia de las células que son más capacitadas para la embriogénesis puede ocurrir espontáneamente con la simple manipulación de los cultivos bajo condiciones *in vitro* por las concentraciones endógenas de

fitohormonas o inducida cuando se agregan los reguladores del crecimiento al medio de cultivo, las auxinas son muy importantes para la polarización de la célula inicial y ocurra la división asimétrica (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

En condiciones *in vitro* en muchas especies no se observa el desarrollo de un suspensor porque no se divide y se pierde en el desarrollo del embrión, el suspensor es una estructura importante en el desarrollo de la radícula y la simetría final de la planta completa (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012). Las diferentes estructuras embrionarias son compactas, nodulares, de color blanco o amarillo cremoso (Schumann *et al.*, 1995; Gómez, 1998).

Por medio de estas técnicas es posible propagar una gran cantidad de plantas a partir de pequeñas muestras de material vegetal y manipular las plantas o variedades masivamente con características sobresalientes; tratando de solucionar la baja disponibilidad y alta demanda de plantas. También mediante el CTV es posible producir sustancias útiles en la medicina y alimentos a través del cultivo de células en suspensión en biorreactores, o bien empleando el mejoramiento genético (fusión de protoplastos o ingeniería genética) (Fay, 1994; Rojas *et al.*, 2004; González-Caballero *et al.*, 2012).

- **Problemas frecuentes en el cultivo *in vitro***

En el cultivo de tejidos vegetales se presentan frecuentemente tres problemas: contaminación, oxidación e hiperhidratación (Kevers *et al.*, 2004; Sathyanarayana, 2007).

La contaminación puede ocurrir por bacterias, levaduras, hongos o ácaros en cualquier etapa de la técnica, por la transferencia de esporas que germinen y proliferen rápidamente en el medio o por contacto directo con medio

incompletamente esterilizado, soluciones o superficies. Se controla con antibióticos y se previene con la técnica aséptica, la esterilización de herramientas y los medios de cultivo, y la desinfección del material vegetal (Sathyanarayana, 2007).

La oxidación es debida a radicales libres de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos caracterizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular. Se controla con el uso de adsorbentes como el carbón activado, antioxidantes y subcultivos frecuentes sin el tejido necrosado (Razdan, 2003; Kevers *et al.*, 2004; Azofeifa, 2009).

La hiperhidratación, también llamada vitrificación, caracterizada por el crecimiento traslúcido, vítreo o hiperhídrico, es un desarrollo anormal de los tejidos cultivados *in vitro*, donde los órganos adquieren un aspecto cristalino, atrofiado, engrosado y turgente al grado de romperse y desorganizarse en callo (Debergh *et al.*, 1981; Kevers *et al.*, 1984; Phan y Hegedus, 1986; Ziv, 1991; Kevers *et al.*, 2004), altera la morfología y anatomía de hojas, tallos y raíces, inicialmente se creía que sólo afectaba a plantas leñosas, pero se ha reportado también en herbáceas (Phan y Hegedus, 1986). Los órganos hiperhidratados incrementan su volumen, adquieren una apariencia traslúcida, quebradiza y frágil. Las hojas son anchas, gruesas con malformaciones (ondulaciones o arrugas), tienen bajos niveles de clorofila y deficiente actividad enzimática que resulta en una pobre asimilación de carbono (Ziv, 1991), hay gran desarrollo del parénquima esponjoso en el mesófilo pero las células están hiperhídricas (el control hídrico de las células es regulado por las propiedades de elasticidad y plasticidad que aportan la celulosa y lignina

principalmente) y el parénquima en empalizada es reducido o ausente, hay grandes espacios intercelulares que pueden estar ocupados por agua, las células tienen paredes delgadas con grandes vacuolas en el citoplasma, existe déficit de ceras epicuticulares tanto en cantidad como en calidad, disfunción de las células guarda de los estomas debido a que el arreglo de las microfibrillas de cutina, pectina y celulosa tienen alto contenido en calcio y no tienen la orientación típica por tanto están abiertos permanentemente (Kevers *et al.*, 1984). La raíz tiene conexión vascular incompleta con el tallo y las bandas vasculares no tienen la organización normal (Ziv, 1991). La hiperhidratación se controla con la modificación de las concentraciones de sacarosa, otros carbohidratos, sales como el CaCl_2 y NH_4 del medio e incrementando la concentración de los agentes gelificantes (Debergh *et al.*, 1981; Al-Atabee y Power, 1990; Singha *et al.*, 1990; Ziv, 1991).

- **Cultivo de Tejidos Vegetales en cactáceas**

La micropropagación de cactáceas generalmente se inicia con la germinación *in vitro* de semillas, las plántulas resultantes son utilizadas como fuente de explantes. Por lo que es importante identificar si las semillas tienen que pasar un periodo de latencia, por ejemplo, *Coryphantha retusa* no necesita de un periodo de latencia y pueden germinar las semillas de un fruto fresco (Ruvalcaba-Ruiz *et al.*, 2010). Cuando se trabaja con semillas es importante llevar un control de las condiciones de almacenamiento (tiempo, temperatura y humedad), de otro modo no podrán generarse datos sobre su tasa de germinación (Rosa-Carrillo *et al.*, 2012). En cactáceas son escasos los trabajos que aíslan el área meristemática o aréola debido a que es riesgoso, puede dañarse al intentar remover las espinas lanosas que la cubren o bien que quede contaminada (Choreño-Tapia *et al.*, 2002; Azcona, 2009);

por eso se usan plántulas obtenidas *in vitro*. Las respuestas obtenidas en tejidos cultivados *in vitro* son la organogénesis o la embriogénesis somática directas, que comprenden respectivamente el desarrollo de nuevos órganos o brotes (tallos) a partir de la activación de meristemos preexistentes (aréolas) y embriones somáticos a partir del explante y, la organogénesis y embriogénesis somática indirectas se refieren al desarrollo de brotes, órganos o embriones somáticos precedidos por la formación de callo (Mauseth, 1977; Starling y Dodds, 1983; Gratton y Fay, 1990; Fay y Gratton, 1992). La propagación de cactáceas vía organogénesis ya ha sido reportada para especies de los géneros *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Aztekium*, *Browningia*, *Cephalocereus*, *Coryphantha*, *Ferocactus*, *Thelocactus* y *Neobuxbaumia*, siendo las especies del género *Mammillaria* las más trabajadas *in vitro*, sin embargo, la embriogénesis somática ha sido un evento más bien esporádico en este grupo de plantas y del que existen escasos reportes, como en los géneros *Ariocarpus*, *Aztekium*, *Leuchtenbergia*, *Mammillaria*, *Opuntia* y *Turbincarpus* (López-Escamilla *et al.*, 2008).

- **Cultivo *in vitro* del género *Ariocarpus***

Como se ha señalado dentro de la familia de las cactáceas, uno de los grupos que presenta escasos trabajos de micropropagación son los miembros del género *Ariocarpus*, una de las limitantes es obtener un número suficiente de semillas para realizar los ensayos *in vitro* y los escasos puntos meristemáticos que presenta *per se* la planta. Además, su respuesta *in vitro* refleja su lento crecimiento *in vivo*.

Uno de los principales obstáculos para su micropropagación es la dificultad para utilizar tejidos vegetales maduros por la presencia de cutículas rugosas y gruesas que dificultan el proceso de desinfección superficial previo a la siembra, aunado a

que las aréolas espiníferas, meristemos ubicados en el ápice de los tubérculos, dejan de ser funcionales en estado adulto impidiendo la reproducción vegetativa, como en el caso de *A. retusus* (Olguín, 1994). Por esta razón, el establecimiento de los cultivos asépticos preferentemente se inicia con la germinación de semillas para la obtención de plántulas que serán la fuente de explantes. Se han realizado trabajos utilizando diferentes tipos de explantes a partir de plántulas germinadas *in vitro*, como son: raíces, explantes laterales, centrales y tubérculos, éstos últimos han resultado ser eficientes ya que tienen en el extremo la aréola.

El medio que más se ha empleado es el Murashige y Skoog (MS; *ANEXO II*) al 100% (Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994; Moebius, 2003) o al 50% de sus sales inorgánicas (Gómez, 2008), complementándolo con sacarosa (entre 15 gL⁻¹ y 30 gL⁻¹) como fuente de carbono y agua de coco (Stuppy y Nagl, 1992). Los reguladores de crecimiento más utilizados han sido las combinaciones de BA/ANA (0-5/0-5 mgL⁻¹) y K/2,4-D (0-5/0-5 mgL⁻¹), pero también se ha empleado thidiazuron en concentraciones de 0.11-11 mgL⁻¹.

Las especies hasta ahora cultivadas, han mostrado su potencial regenerativo principalmente por dos rutas morfogénicas: organogénesis y embriogénesis somática, ambas de forma directa e indirecta (Stuppy y Nagl, 1992; Olguín, 1994; Moebius, 2003; Gómez 2008; Jofre-Garfias *et al.*, 2010).

- **Organogénesis**

Entre las especies en las que se ha reportado la organogénesis, principalmente la formación de tallos (brotes), está *A. retusus* (Olguín, 1994). La formación de brotes ocurrió después de 12 meses. El mayor número de brotes (48) por tratamiento se obtuvo en BA 2 mgL⁻¹ previa formación de callo en los explantes laterales (21

brotos), centrales (17 brotes) y tubérculos (10 brotes), pero también se formaron por organogénesis directa a partir de la activación de las aréolas espiníferas en el ápice de los tubérculos. La respuesta en tratamientos con 2iP fue menor que con BA/ANA, siendo el mejor tratamiento 2iP 1 mgL⁻¹ (25 brotes) en explantes laterales. El resto de los tratamientos, sobre todo aquellos en presencia de la auxina, desarrollaron gran cantidad de callo.

Para evitar el daño y la muerte de las plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de *A. kotschoubeyanus*, se utilizaron como explantes únicamente los tubérculos (Moebius, 2003). En la quinta semana ocurrió la organogénesis directa en los tubérculos cultivados con BA 5 mgL⁻¹, BA/ANA 1/0.5 y 3/1 mgL⁻¹. Después de 15 semanas, 100% de los explantes cultivados con 3 mgL⁻¹ de la citocinina, en ausencia o presencia de la auxina, respondieron formando un número similar de brotes por tratamiento: BA 3 mgL⁻¹ (12 brotes) y BA/ANA 3/0.5 mgL⁻¹ (11 brotes). La formación de brotes por organogénesis indirecta a partir de callo, se observó a la sexta semana en un amplio rango de combinaciones BA/ANA (1-5/0.1-1 mgL⁻¹).

Moebius (2003) distinguió dos tipos de brotes de acuerdo a su morfología y el tiempo en que se desarrollaron. Los primeros obtenidos con BA 1 mgL⁻¹ y BA/ANA 3/1 mgL⁻¹, de lento desarrollo a partir de callo compacto, tuvieron una morfología normal; los segundos, a partir de callo friable y rápido desarrollo, fueron brotes asimétricos de aspecto hiperhidratado obtenidos en las más altas concentraciones de la citocinina (BA 5 mgL⁻¹ y BA/ANA 5/1 mgL⁻¹).

La respuesta de los explantes de *A. fissuratus* ssp. *bravoanus* fue escasa en general, lo que refleja la dificultad de propagar vegetativamente a las especies de este género. El mejor tratamiento para la formación de brotes fue K/2,4-D 0.1/1mgL⁻¹

¹ en el que obtuvo seis brotes, seguido de 0.1/5 y 0.5/1 mgL⁻¹ (dos brotes en cada uno) y un brote con 2,4-D 5 mgL⁻¹ y uno más con ANA 3 mgL⁻¹ (Gómez, 2008).

Jofre-Garfias *et al.* (2010) obtuvieron con TDZ 4 mgL⁻¹, 12 brotes de *A. agavoides* por frasco de cultivo a partir de la semana 20.

- **Embriogénesis somática**

Stuppy y Nagl (1992) reportaron la formación de embriones somáticos (ES) a partir del callo obtenido de plántulas germinadas *in vitro* de *A. retusus* en medio MS complementado con sacarosa 20 gL⁻¹, agar 10 gL⁻¹ y agua de coco al 20%. Los ES (5 mm) presentaron color verde, sus dos cotiledones, éstos nuevamente se desorganizaron en callo embriogénico. Después de 14 meses se desarrollaron numerosos y diminutos ES (3 a 4 mm) en agregados de color amarillo pálido, algunos con pequeñas aréolas y espinas, pocos de ellos siguieron las etapas de desarrollo de los embriones cigóticos. También se observaron embriones con dos, cuatro y hasta cinco cotiledones. Los ES se aislaron en medio basal SH, donde, a los dos días, produjeron pelos radiculares y se desarrollaron como una plántula normal, de color verde oscuro, después de cuatro semanas; sin embargo, éstos entraron en ciclos repetitivos de formación de callo. Los autores también lograron injertar plántulas originadas por embriogénesis somática de *A. retusus* sobre *Pereskiaopsis velutina* con sobrevivencia exitosa.

También en *A. retusus*, Olgúin (1994) obtuvo la embriogénesis somática de forma eventual. Los ES se formaron en el callo verde claro, friable, húmedo con áreas cristalinas, formado de un explante lateral en medio MS bajo inducción de BA/ANA 0.5/0.1 mgL⁻¹; también proliferaron en la base de los tejidos cultivados que estaban en contacto con la superficie del medio de cultivo, donde el callo presentó color

rojizo de aspecto oxidado. Pocos ES germinaron en el callo embriogénico donde se formaron, las plántulas fueron transferidas a medio basal donde adquirieron su aspecto normal, pero sólo una sobrevivió.

Moebius (2003) obtuvo ES en *A. kotschoubeyanus* a partir del callo de tubérculos después de cuatro meses con BA/ANA 2/0.5, 2/1 y 3/0.1 mgL⁻¹ y, a partir del quinto mes vía directa, en los tubérculos cultivados con K 5mgL⁻¹ y K/2,4-D 5/0.1 mgL⁻¹. Observó estructuras nodulares con un tamaño menor a un milímetro de aspecto húmedo, blanco o amarillo opaco hasta verde. Logró la germinación de 10 ES y 25 maduraron con suncaps® (Sigma) y medio MS50 CA 1 gL⁻¹ sin embargo, proliferaron poco. En cambio, con el uso del mismo medio, pero con tapas de plástico germinaron cinco, maduraron 12 y proliferaron medianamente.

En la siguiente tabla se resumen los trabajos realizados con las especies del género *Ariocarpus* y las mejores respuestas morfogénicas que se han obtenido al cultivarlas *in vitro*.

Tabla 2. Trabajos de propagación *in vitro* de miembros del género *Ariocarpus* con las mejores respuestas obtenidas en su cultivo

Especie	Explante	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mgL ⁻¹)	Respuesta morfogénica	Autor
<i>A. retusus</i>	Callo de plántulas Laterales	MS y SH MS	- BA (2) / BA/ANA (0.5/0.1)	ES Brotos / ES	Stuppy y Nagl, 1992 Olguín, 1994
<i>A. kotschoubeyanus</i>	Tubérculos	MS	BA/ANA (3/1) / (2/0.5) (2/1) (3/0.1)	Brotos / ES	Moebius, 2003
<i>A. fissuratus</i> ssp. <i>bravoanus</i>	Tubérculos	MS50%	K/2,4-D (0.1/1)	Brotos	Gómez, 2008
<i>A. agavoides</i>	Ápices de plántulas	Eriksson	TDZ (4)	Brotos	Jofre-Garfias <i>et al.</i> , 2010

MS = medio Murashige y Skoog (1962), **SH** = medio Schenk y Hildebrandt (1971), **BA** = N⁶-benziladenina, **ANA** = ácido α-naftalenacético, **K** = kinetina, **2,4-D** = ácido 2,4-diclorofenoxiacético, **TDZ** = thidiazuron, **ES** = embriones somáticos.

En el presente trabajo se utilizaron las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para explorar la germinación *in vitro* de las semillas de *A. fissuratus* cosechadas en diferentes años, así como la respuesta al medio de inducción de los explantes obtenidos de las plántulas cultivadas *in vitro*, lo anterior como una aportación para el establecimiento de metodologías de propagación que repercutan en la conservación de las especies de este género.

JUSTIFICACIÓN

Ariocarpus fissuratus es una cactácea de lento crecimiento sin reclutamiento de individuos por propagación vegetativa. Ejemplares silvestres han sido extraídos ilegalmente y algunas de sus poblaciones se han reducido por la destrucción progresiva de su hábitat. Debido a que en la propagación *in vitro* y el establecimiento aséptico de los cultivos preferentemente se inicia a partir de semillas, resulta importante estudiar los aspectos relacionados con la germinación, la viabilidad y el tiempo de almacenamiento, además de explorar el potencial regenerativo de los tejidos y conocer la ruta para su propagación *in vitro*. Por lo anterior, el cultivo de tejidos vegetales se propone como una alternativa para la propagación y conservación de esta cactácea.

OBJETIVOS

General

Establecer las condiciones experimentales para el cultivo *in vitro* de *Ariocarpus fissuratus*.

Particulares

- ~ Evaluar el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas con respecto a su tiempo de almacenamiento.
- ~ Evaluar las respuestas morfogénicas de los explantes en diferentes concentraciones de citocininas/auxinas.

HIPÓTESIS

Ho. El tiempo de almacenamiento de las semillas de *A. fissuratus* tendrá influencia en el porcentaje de germinación *in vitro* y la adición de reguladores del crecimiento inducirá respuestas morfogénicas en los diferentes tipos de explantes.

Ha. El tiempo de almacenamiento de las semillas de *A. fissuratus* no tendrá influencia en el porcentaje de germinación *in vitro* y los reguladores de crecimiento no inducirán respuestas morfogénicas en los diferentes tipos de explantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

• Material biológico

Como material biológico se utilizaron semillas procedentes de frutos obtenidos por la polinización manual cruzada de cinco ejemplares silvestres colectados en 2004 en el Cerro "El Anteojo" (26° 50' 57.4" N y 102° 6' 0.1"W, 770 m.s.n.m), Municipio de Cuatrociénegas, Coahuila que se mantuvieron en condiciones de invernadero en la Facultad de Ciencias, UNAM.

Para las siembras *in vitro* se emplearon semillas cosechadas entre los meses de marzo y julio de 2008, 2009, 2011, 2012 y 2013. En el 2010 no se realizó la polinización manual por que la floración fue asincrónica y no hubo fructificación.

Las semillas se contaron y se almacenaron en bolsas enceradas a temperatura ambiente hasta su siembra (junio del 2012, abril del 2013 y agosto del 2014).

- **Desinfección superficial y siembra de semillas**

Las semillas se lavaron con agua destilada y detergente líquido comercial Salvo® (3 gotas/50 mL de agua) durante 15 minutos, después se enjuagaron con agua destilada utilizando una pequeña coladera de plástico, posteriormente se colocaron en un crisol de porcelana (Gooch) y se escarificaron sumergiéndolas en H₂SO₄ concentrado durante 30 segundos y se enjuagaron con agua destilada. Se desinfectaron en etanol al 70% (v/v) durante dos minutos y finalmente con hipoclorito de sodio concentrado (NaOCl, 6% de cloro activo) adicionado con Tween 80 (3 gotas/50 mL) durante 20 minutos. En la campana de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Todo el proceso se llevó a cabo en agitación continua (Olguín, 1994).

Las semillas se germinaron en dos medios de cultivo: 1) Murashige y Skoog (1962) al 50% de todos sus componentes, sacarosa 15 gL⁻¹, carbón activado (CA) 1.5 gL⁻¹ y agar bacteriológico Bioxon® 8 gL⁻¹ (MS 50%+sac+CA) y 2) MS al 50% de macronutrientes y micronutrientes, adicionado con sacarosa 30 gL⁻¹, carbón activado (CA) 1.5 gL⁻¹ y agar bacteriológico Bioxon® 8 gL⁻¹ (MS 50%+CA).

Semillas de las cosechas (2008, 2009, 2011, 2012, 2013) se sembraron en el 2012, 2013 y 2014 que corresponden a la siembra 1, 2 y 3 respectivamente.

Por cada año de cosecha se sembró un total de 270 semillas, 90 semillas por cada siembra realizada, cada una comprendida de tres lotes de 30 semillas cada uno. En total se sembraron 1170 semillas. Se sembraron 5 semillas por frasco Gerber® (capacidad 120 mL) con 30 mL de medio. Las semillas de la siembra 1 (2012) de las cinco cosechas se sembraron en medio MS 50%*sac*+CA, las semillas de la siembra 2 y siembra 3 (2013 y 2014 respectivamente) de las mismas cosechas se sembraron en medio MS 50%+CA. El tiempo de almacenamiento de las diferentes cosechas, se describe en la Tabla 3 según la fecha en que se sembraron.

Tabla 3. Tiempo de almacenamiento de las semillas de *A. fissuratus*, sembradas en medio MS 50%*sac*+CA (siembra 1) y MS 50%+CA (siembra 2 y siembra 3)

Años de cosecha de semillas de <i>A. fissuratus</i>	Siembra 1 (2012)	Siembra 2 (2013)	Siembra 3 (2014)	Total de semillas por cosecha
	Tiempo de almacenamiento (años)			
2008	4	5	6	270
2009	3	4	5	270
2010	-	-	-	-
2011	1	2	3	270
2012	1 mes	1	2	270
2013	-	-	1	90
Total de semillas por siembra	360	360	450	1170

El diseño se realizó en bloques (años de cosecha) con tres repeticiones de 30 semillas cada una. La germinación se evaluó diariamente durante 30 días, se consideró como criterio de germinación la emergencia de la radícula y que tuviera 1 mm de longitud. Se realizó una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para los datos de germinación y posteriormente un ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey para determinar diferencias estadísticamente significativas en las cosechas de semillas de *A. fissuratus*. Las pruebas se realizaron con el paquete estadístico SPSS 15.0 y las gráficas respectivas en Excel.

Así mismo se evaluó el porcentaje de hiperhidratación al finalizar el tiempo asignado para la evaluación de la germinación (día 30).

- **Elongación de las plántulas en medio líquido**

Para promover la elongación de los tallos (epicótilos) e incrementar el número de tubérculos en menor tiempo, las plántulas de 0.5 cm de longitud se transfirieron del medio de germinación a medio líquido MS+CA (1.5 gL⁻¹) adicionado con sacarosa 30 gL⁻¹ sobre puentes de papel filtro Whatman No. 1. Se emplearon 25 plántulas de las siembras 1 y 2 de cada cosecha, permanecieron 25 días en este medio hasta que presentaron de tres a cinco tubérculos, posteriormente se subcultivaron al mismo medio pero sólido MS+CA (1.5 gL⁻¹) adicionado con sacarosa 30 gL⁻¹ y agar bacteriológico Bioxon® 8.5 gL⁻¹.

A todos los medios de cultivo empleados en las diferentes etapas experimentales del trabajo: germinación de semillas, elongación de las plántulas, medio de inducción, proliferación, maduración y germinación de los ES se les ajustó el pH a 5.7-5.8 y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1.5 Kg/cm² durante 18 minutos.

- **Obtención de explantes**

Una vez que las plántulas midieron al menos 1 cm de longitud (8 meses de edad) y tenían entre tres y cinco tubérculos, se seccionaron para obtener explantes. Se les eliminó la raíz con un corte transversal; para la inducción en BA/ANA se disecaron longitudinalmente para obtener por cada plántula dos explantes laterales y uno central, cada uno con un tubérculo, y de uno a tres tubérculos individualizados. Para la inducción con K/2,4-D, y debido a que el grosor de las plántulas (4 meses de edad) no fue suficiente para obtener de ellas explantes centrales, se obtuvieron por cada una, dos explantes longitudinales y dos o tres tubérculos (Fig. 7). En las

plántulas hiperhidratadas pero que conservaron sus tubérculos organizados, éstos se utilizaron también como fuente de explante.

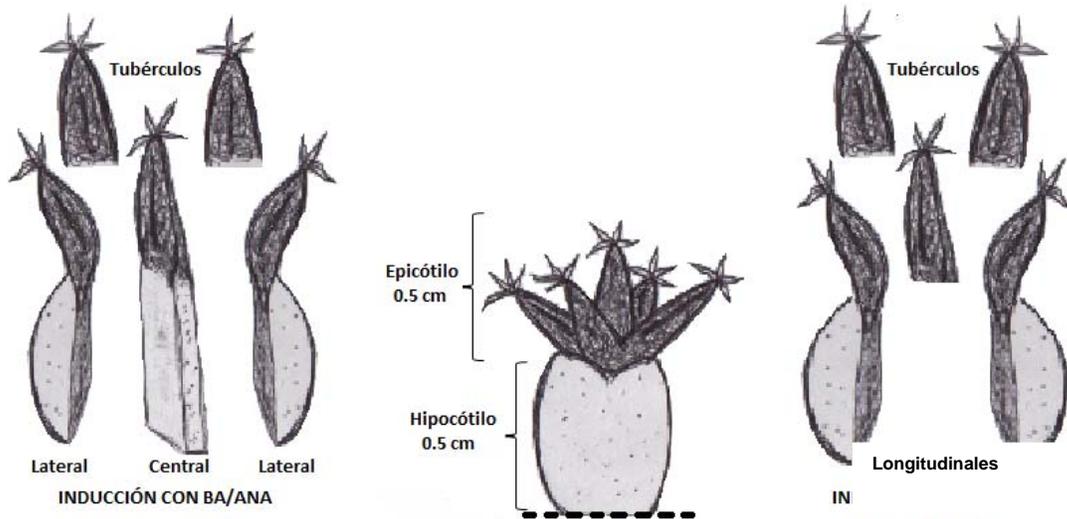


Figura 7. Tipos de explantes obtenidos de plántulas desarrolladas *in vitro* de *A. fissuratus* de aproximadamente 8 meses de edad para inducción con BA/ANA y 4 meses de edad para K/2,4-D.

- **Inducción de organogénesis**

Los explantes se cultivaron en medio MS adicionado con N⁶-Benciladenina (BA) (0, 1, 2, 3 y 5 mgL⁻¹) combinado con ácido α -Naftalenacético (ANA) (0, 0.5 y 1 mgL⁻¹), sacarosa 30 gL⁻¹ y agar bacteriológico Bioxon[®] 8.5 gL⁻¹. El medio se distribuyó en frascos Gerber[®] (capacidad 120 mL) con 25 mL.

Para cada tratamiento se emplearon cinco plántulas (cinco explantes centrales, diez laterales y por lo menos seis tubérculos).

Después de tres meses en el medio de inducción, los explantes con algún tipo de respuesta morfogénica se subcultivaron dos veces cada dos meses y medio en medio sólido MS+CA (2 gL⁻¹), sacarosa 30 gL⁻¹ y agar bacteriológico Bioxon[®] 8.5 gL⁻¹.

Para las etapas de germinación, elongación de las plántulas e inducción de la organogénesis los cultivos se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h luz/8 h oscuridad y luz fría blanca fluorescente $35\text{-}40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

- **Inducción de embriogénesis somática**

Para la inducción de la embriogénesis somática se emplearon y Kinetina (K) (0, 0.5, 1 y 2 mgL⁻¹) en combinación con ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (0, 0.5, 1 y 2 mgL⁻¹), sacarosa 30 gL⁻¹ y agar bacteriológico Bioxon® 8.5 gL⁻¹. Por cada tratamiento se utilizaron seis plántulas, sembrando doce explantes longitudinales y por lo menos nueve tubérculos. Los cultivos se mantuvieron en 25 ± 2°C y en condiciones de obscuridad durante dos semanas y posteriormente se cambiaron a 16 h luz/8 h oscuridad y luz fría blanca fluorescente 35-40 μmol m⁻² s⁻¹.

Los explantes permanecieron cuatro meses en el medio de inducción; del callo que se formó se subcultivó aproximadamente 1 cm³ en medio sólido MS+CA (2 gL⁻¹) adicionado con sacarosa 30 gL⁻¹ y agar bacteriológico Bioxon® 8.5 gL⁻¹. Se realizaron dos subcultivos cada tres meses y medio.

- **Proliferación de los embriones somáticos**

El callo que presentaba características embriogénicas se subcultivó 1 cm³ en cajas Petri con 40 mL de medio MS y tres diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60 y 75 gL⁻¹) +CA (2 gL⁻¹), agar bacteriológico Bioxon® 8.5 gL⁻¹, para cada tratamiento se emplearon tres cajas. La primera semana permanecieron en oscuridad total cubiertas con papel aluminio a 25 ± 2°C, y posteriormente se les proporcionó fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad y luz fría blanca fluorescente 35-40 μmol m⁻² s⁻¹. Se realizaron dos subcultivos en medio fresco cada cuatro meses.

- **Maduración de los embriones somáticos (ABA/GA₃)**

Para promover la maduración del callo embriogénico se realizaron diferentes estrategias. Se subcultivó callo en los siguientes medios de cultivo: 1) MS50%+CA, 2) MS+CA, 3) MS+ABA, 4) MS+GA₃ y 5) MS+CA+GA₃ donde permanecieron en

incubación cuatro meses realizando un subcultivo cada dos meses en el mismo medio fresco.

El callo proveniente del tratamiento MS + ABA después de su primer subcultivo (dos meses) fue transferido a medio MS+GA₃ o a MS+CA+GA₃ (tratamientos 6 y 7) en ambos medios el callo permaneció dos meses más de incubación (Tabla 4).

A los medios de cultivo se les adicionó sacarosa 75 gL⁻¹ y agar bacteriológico Bioxon® 10 gL⁻¹; Ácido abscísico (ABA), Ácido Giberélico (GA₃) 1 mgL⁻¹, carbón activado (CA) 2 gL⁻¹. La unidad experimental consistió en 1 cm³ de callo embriogénico en cada caja de Petri con 40 mL de medio, se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Tabla 4. Tratamientos usados para la maduración de los embriones somáticos, los cuales se incubaron durante cuatro meses. Se adicionó al medio MS 75 gL⁻¹ de sacarosa, CA (2 gL⁻¹), los reguladores de crecimiento ABA o GA₃ (1 mgL⁻¹) y 10 gL⁻¹ de agar bacteriológico.

	Subcultivo cada dos meses en el mismo medio de cultivo	Subcultivo cada dos meses en un medio de cultivo diferente
Tratamientos	1) MS 50%+CA	6) MS + ABA → MS + GA ₃
	2) MS + CA	7) MS + ABA → MS + CA + GA ₃
	3) MS + ABA	
	4) MS + GA ₃	
	5) MS + CA + GA ₃	

○ **Germinación de los embriones somáticos (Phytigel)**

Los embriones somáticos se subcultivaron al medio MS adicionado con sacarosa 75 gL⁻¹, Phytigel® 5 gL⁻¹, con y sin carbón activado (CA) 2 gL⁻¹. La unidad experimental consistió en frascos Gerber® (capacidad 120 mL) con 25 mL de medio y embriones somáticos seleccionando aquellos que estaban en etapa de corazón.

- **Cortes histológicos de embriones somáticos**

Técnica de inclusión en LR White (LRW). Embriones en etapas globular, corazón, y torpedo se fijaron en FAA (Formol, Ácido acético, Alcohol etílico) durante 48 horas con un cambio en FAA nuevo a las 24 horas. Posteriormente, se deshidrataron en alcoholes graduales (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y dos cambios en alcohol absoluto, permaneciendo una hora en cada uno de ellos). Al finalizar la deshidratación se colocaron las estructuras embrionarias en tubos Eppendorf de 2 mL para infiltrarse en LRW al 25%, 50%, 75% y 100%, por 24 horas cada concentración a 4°C. Cada una de las estructuras embrionarias se colocó y orientó en cápsulas de gelatina que contenían LRW puro, se polimerizaron a 60°C por 12 horas (López-Curto *et al.*, 2005). Se realizaron cortes longitudinales semifinos de 1.5 µm con un ultramicrotomo de rotación MT 990 y cuchillas de vidrio con barquilla. Posteriormente se tiñeron con Azul de Toluidina al 1% y se enjuagaron con agua destilada. Se observó al microscopio fotónico.

El registro macrofotográfico de los cultivos de semillas, plántulas, callo y brotes se realizó con una cámara Canon PowerShot A620, el registro microfotográfico de estructuras embrionarias se realizó con el microscopio estereoscópico Leica EZ4 HD y de cortes histológicos con el microscopio Leica DM500 analizadas con el software Leica LAS EZ.

En las figuras 8 y 9 se muestran los diagramas de flujo de la metodología empleada.

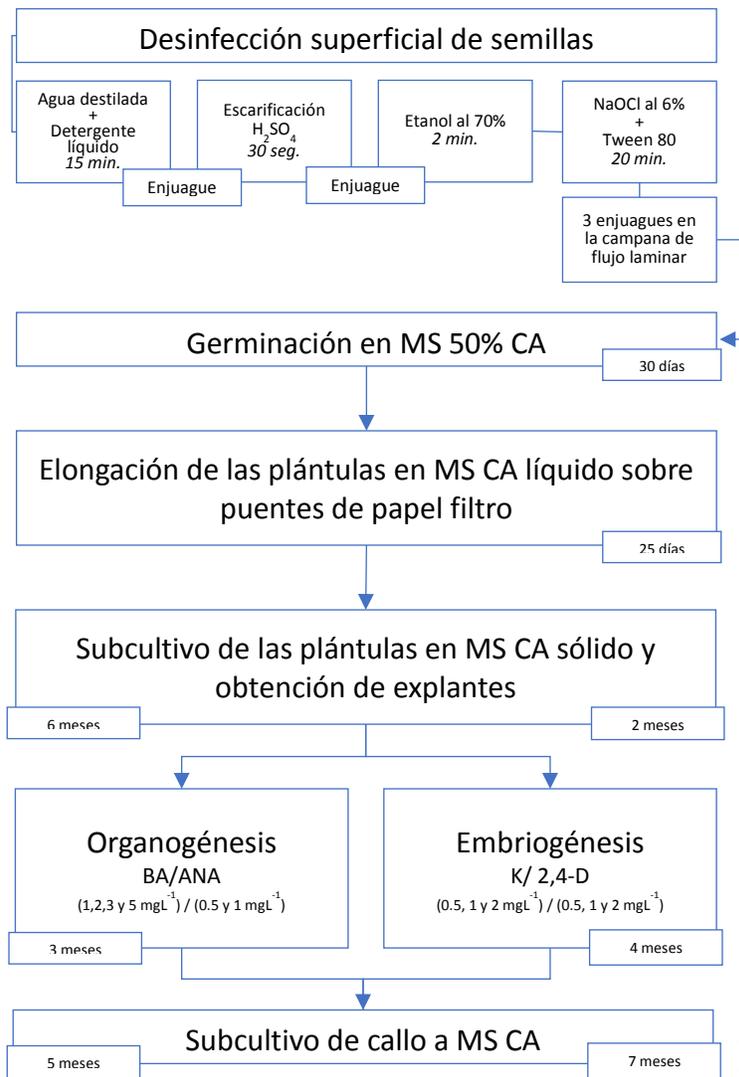


Figura 8. Resumen de la metodología empleada para el cultivo de semillas y explantes *in vitro* de *A. fissuratus*.

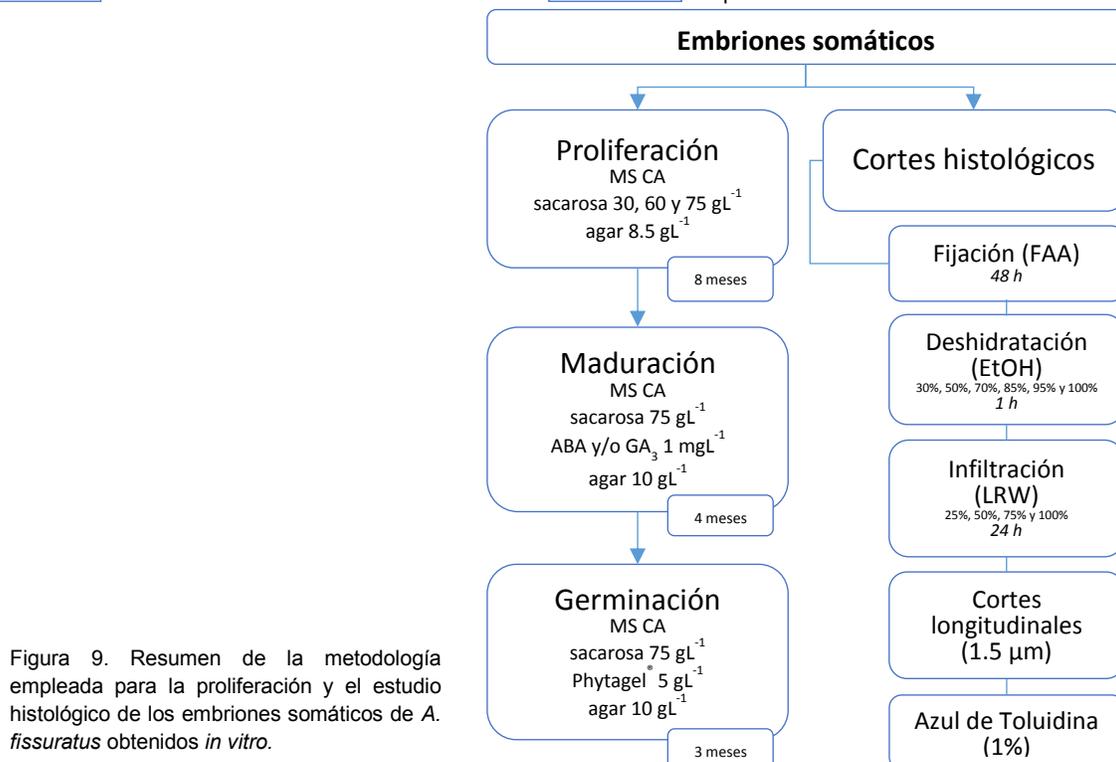


Figura 9. Resumen de la metodología empleada para la proliferación y el estudio histológico de los embriones somáticos de *A. fissuratus* obtenidos *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Colecta del material biológico**

Se contabilizó el número de semillas de cada uno de los frutos que se cosecharon cada año (Tabla 5).

Tabla 5. Número de semillas (media \pm error estándar) de *A. fissuratus* desde el primer evento de fructificación (2007) hasta 2013 de plantas silvestres mantenidas en invernadero.

Cosecha de frutos de <i>A. fissuratus</i> (año)	Número de frutos obtenidos	Número de semillas por fruto
2007	1	9
2008	9	51.1 \pm 0.98
2009	10	51.4 \pm 0.59
2010	---	---
2011	5	59.2 \pm 1.09
2012	5	58.6 \pm 0.38
2013	2	86.5 \pm 1.45

Se puede observar que el número de frutos obtenidos varió cada año desde uno hasta 10 y por lo tanto el número de semillas obtenidas, salvo la primera cosecha (2007) con el menor número de semillas y la última (2013) donde se obtuvo el mayor número de semillas. La cantidad de semillas obtenidas oscila entre 51 y 59, ésta cantidad es similar a lo que Martínez (2007) reportó cuando examinó frutos de plantas silvestres de *A. fissuratus* y obtuvo 69.79 \pm 9.88 semillas por fruto, ella estimó que sólo el 59.38% de los óvulos (117.57 \pm 3.75) se transforman en semillas, probablemente por restricciones en los recursos de la planta. En condiciones de invernadero es muy probable que las condiciones sean más estables y por ello el número de semillas sea muy similar en los diferentes años, aunado a que la polinización fue manual mientras que en campo dependen de las abejas que visitan las flores.

- **Germinación *in vitro* de semillas de *A. fissuratus***

La técnica de desinfección propuesta por Olguín (1994) para *Ariocarpus retusus* fue exitosa también para *A. fissuratus*.

Baskin y Baskin (2014), muestran un listado con el tipo de latencia y germinación de algunas especies de suculentas perennes entre ellas Cactaceae, el tipo de latencia reportada es la fisiológica o latencia primaria según la clasificación de Harper (1957) citado por Murray (1984) principalmente, pero también se ha reportado la skotolatencia (presentan latencia secundaria inducida por la oscuridad y se rompe con el estímulo de luz) como en algunas especies de *Turbinicarpus*, *Mammillaria*, *Ariocarpus*, *Peleciphora*, *Thelocactus* y *Echinomastus* (Flores *et al.*, 2006; Flores y Jurado, 2011; Ruíz-González *et al.*, 2011).

Ensayos previos sobre la siembra *in vitro* de semillas de *A. fissuratus*, realizados por Olgún (com. pers.), mostraron la ausencia de germinación, posiblemente a causa de la latencia que reporta Martínez (2007) para la misma especie, o bien, por efecto de su cubierta seminal gruesa que impidió la imbibición. Por tal motivo, en este trabajo, se aplicó un tratamiento de escarificación con ácido sulfúrico, previo a la desinfección superficial de las semillas, que facilitó el rompimiento de la testa.

Durante el proceso de germinación de *A. fissuratus* se observó a simple vista que la protrusión de la radícula parece ocurrir a través del opérculo, la germinación de este tipo es muy común en Cactaceae (Bregman y Bouman, 1983).

La germinación inició entre los cuatro y siete días, excepto en aquellas semillas con un año de almacenamiento (9 días, cosecha 2012/siembra 1) y 6 años (30 días, cosecha 2008/siembra 3). El máximo germinativo se alcanzó entre los 20 y 30 días, sólo la cosecha 2012/siembra 3 (2 años de almacenamiento) finalizó precozmente a los 15 días (Tabla 6). Esto concuerda con lo reportado por Arredondo *et al.* (2007) quienes obtuvieron 70% de germinación de las semillas *A. retusus* de menos de un año de ser cosechadas, escarificadas con H₂SO₄ concentrado durante 15 segundos

y sembradas en agua con agar al 1% e iniciaron la germinación entre los dos y seis días, finalizando entre los siete y doce días.

Las semillas con más tiempo de almacenamiento (5 y 6 años) registraron porcentajes de 18.9% y 3.3% respectivamente. Al realizar las siembras con diferentes tiempos de almacenamiento se observó un decremento de 65% a 3.3% en las semillas almacenadas por más de seis años y de 83% a 18% en las almacenadas cinco años. Lo que nos demuestra que las semillas de *A. fissuratus* con más de 5 años de almacenamiento son poco viables (Tabla 6).

Las semillas almacenadas 1 año presentaron un porcentaje de germinación similar a aquellas almacenadas por 3 años (48 y 57%), lo que probablemente indique por un lado que las semillas requieren de un periodo de postmaduración y por otro con 3 años de almacenamiento empiece una pérdida de la viabilidad (Tabla 6).

Tabla 6. Tiempo en días de inicio y término de la germinación *in vitro* de *A. fissuratus* y porcentaje máximo alcanzado.

Tiempo de almacenamiento de semillas de <i>A. fissuratus</i> (años)	Inicio de germinación (días)	Término de germinación (días)	Máximo germinativo a los 30 días (%)
< 1	5-9	21-28	31.1-43.3
1 - 2	4-6	15-26	48.9-56.7
2 - 5	4-6	20-28	57.8-86.7
> 5	30	30	3.3-18.9

Esto concuerda con Rojas-Aréchiga y Batis (2001), quienes mencionan que la germinación por debajo de 50% podría deberse a la falta de maduración del embrión o requerimiento de un mayor tiempo de almacenamiento y a lo reportado por Flores *et al.* (2008) en *Turbinicarpus lophophoroides* y *T. pseudopectinatus* quienes evaluaron el porcentaje de germinación en semillas almacenadas en bolsas de papel a temperatura ambiente por uno y cuatro años, corroborando que a mayor tiempo de almacenamiento éste se incrementó.

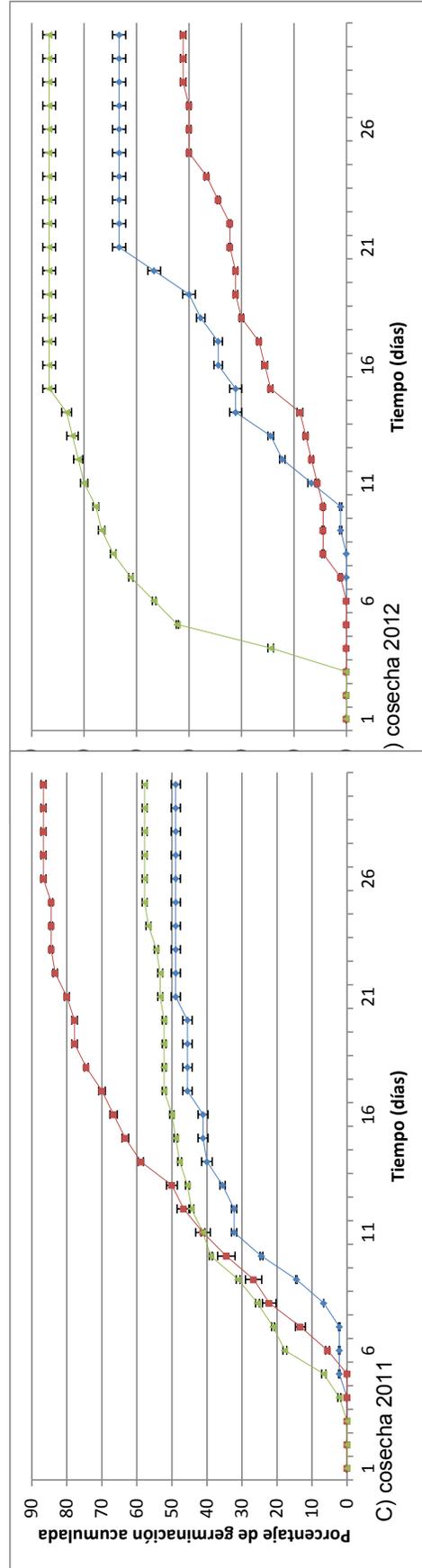
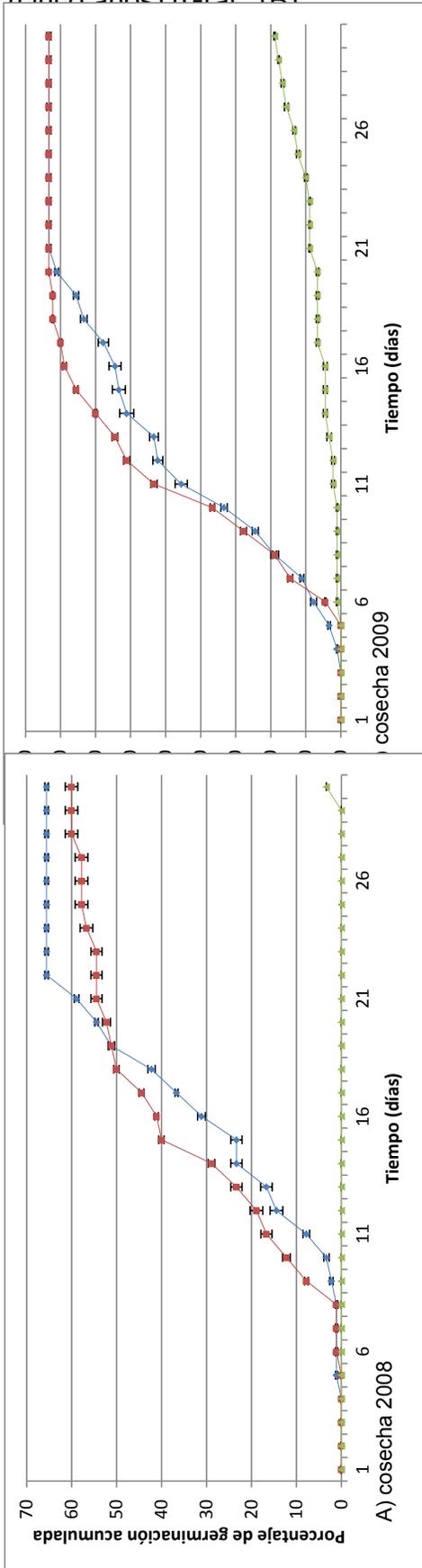
En otro trabajo de Flores *et al.* (2006) germinaron semillas de 28 taxa de cactáceas entre ellas el género *Ariocarpus* que almacenaron desde un mes hasta tres años en bolsas de papel, a temperatura ambiente hasta su siembra. Reportaron para *A. retusus* ssp. *trigonus* (94%), *A. fissuratus* ssp. *bravoanus* (66%), *A. kotschoubeyanus* (56%), *A. retusus* ssp. *retusus* (53%), *A. fissuratus* ssp. *hintonii* (36%) señalan los autores que los bajos porcentajes se debieron a que presentan latencia fisiológica, pues al finalizar el experimento disecaron las semillas y observaron embriones sanos, así mismo los autores señalan que la germinación mayor o igual a 70% se presenta en especies que carecen de latencia.

Los porcentajes obtenidos en *A. fissuratus* estuvieron en función al tiempo de almacenamiento, ya que se alcanzaron porcentajes por arriba de 70%, lo que indicaría que las semillas carecen de latencia y aquellas que presentaron porcentajes menores puede ser que entren en latencia fisiológica (si tienen poco tiempo de almacenamiento) o que ya no son viables (si se han almacenado más de cinco años).

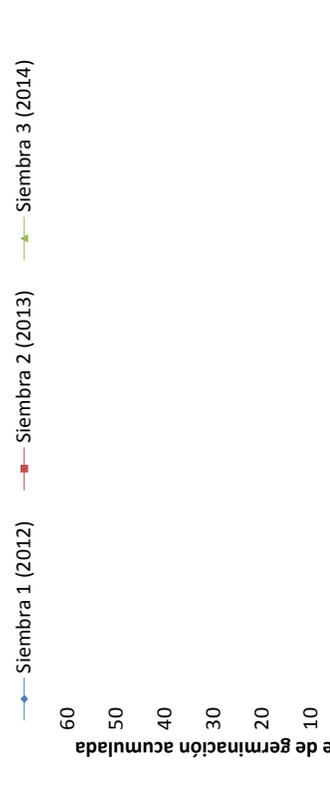
En la gráfica 1 se muestran las curvas del porcentaje de la germinación acumulada *in vitro* de las cuatro cosechas y sus tres diferentes siembras: El porcentaje de germinación de *A. fissuratus* evaluado a los 30 días muestra que la cosecha 2008 de la siembra 1 (4 años de almacenamiento) tuvo 65.5% de germinación que contrasta con la siembra 3 (6 años) al tener solo 3.3% de germinación (Gráf. 1A). Esto indica que las semillas de *A. fissuratus* perdieron su viabilidad, casi en su totalidad, después de seis años de almacenamiento. Caso similar ocurre con la cosecha 2009 que con cuatro años de almacenamiento se obtuvo el mayor

porcentaje (83.3%) el cuál disminuyó (18.9%) con un año más de almacenamiento

(cinco años) (Gráf. 1B)



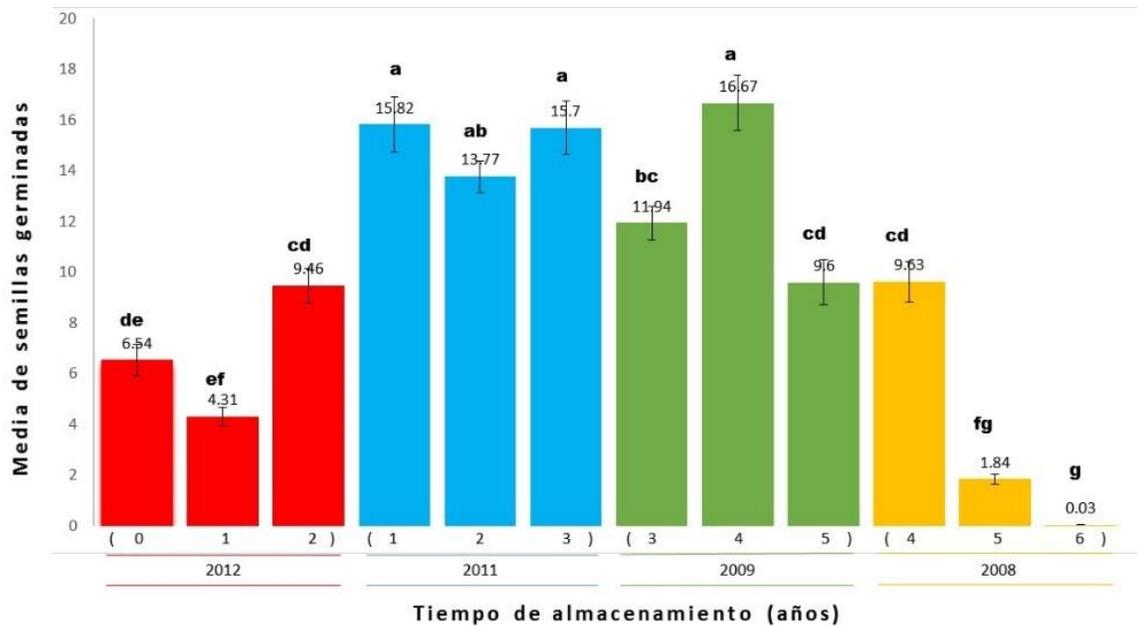
Gráfica 1. Curvas de germinación acumulada in vitro de semillas de *A. fissuratus* cosechadas en diferentes años. Se obtuvieron porcentajes entre el 56.7% y 86.7% en semillas almacenadas entre un año y dos meses (cosechas 2012 y 2013 en la siembra 3), y cuatro años y 11 meses (cosecha 2008 en la siembra 1); sin embargo, los porcentajes mayores al 80% se obtuvieron en semillas almacenadas entre dos y cuatro años en las cosechas del 2009 y 2011. Media ± error estándar.



Las semillas de la cosecha 2011, almacenadas un año tuvieron 48.9%, y a los dos años el máximo porcentaje de germinación (86.7%), pero cuando se almacenaron por más de tres años, el porcentaje disminuyó a 57.8% (Gráf. 1C). De igual manera en la cosecha 2012, el mayor porcentaje se alcanzó a los dos años (56.7%), sin embargo, aquellas semillas almacenadas en un intervalo de uno a doce meses, presentaron un porcentaje similar relativamente bajo (43.3% y 31.1%, respectivamente) lo que indica que las semillas requieren un tiempo de maduración postcosecha (Gráf. 1D; Flores *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2008).

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento de las semillas cosechadas en los diferentes años ($F= 54.881$; $P= 0.00$). La prueba de Tukey separó ocho grupos *a*, *ab*, *bc*, *cd*, *de*, *ef*, *fg* y *g*. Al analizar los datos y relacionarlos con los tiempos de almacenamiento podemos englobarlos en tres grandes grupos: con una media de 0.03 a 1.8 de semillas germinadas y que tienen más de 5 años de almacenamiento, el segundo grupo con una media de 4 a 6 semillas germinadas y corresponden a las semillas almacenadas menos de un año y el tercer grupo con una media de 9 a 16 semillas germinadas que abarca aquellas que fueron almacenadas de uno a cinco años (Gráf. 2).

Estos datos muestran que el proceso de maduración se fue dando posteriormente a su cosecha en los diferentes años, de tal forma que cada fecha de cosecha presenta su máximo porcentaje de germinación dentro del rango de uno a cinco años. Las semillas cosechadas en 2008 y 2009, con cuatro años de almacenamiento tuvieron como máximo porcentaje de germinación 65% y 83% respectivamente. Mientras que las cosechadas en 2011 y 2012 con dos años de almacenamiento obtuvieron 86% y 56%.



Gráfica 2. Número de semillas germinadas de *A. fissuratus* a diferentes tiempos de almacenamiento (0 = 1 mes). Media \pm error estándar.

Éstos porcentajes no son directamente proporcionales al tiempo de almacenamiento, están involucradas también las condiciones ambientales que prevalecieron durante la formación del fruto, las semillas y su almacenamiento.

Se han realizado diversos trabajos que evalúan el porcentaje de germinación en relación al tiempo que han sido cosechadas como Rojas-Aréchiga *et al.* (2008) que obtuvieron el 60% de la germinación de semillas de cinco meses de *Obregonia denegrii* y semillas de dos meses de *Tubinacarpus valdezianus* ambas sembradas en agua-agar 1% o Rosas-López y Collazo-Ortega (2004) con semillas de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus* almacenadas tres y cuatro meses respectivamente que fueron germinaron en agua-agar 1% a los 13 y 14 días, con 20% y 100% máximo de germinación.

El medio de cultivo es un factor que influye en la geminación *in vitro*, la ausencia de solutos en él crea mayor potencial hídrico y por lo tanto las semillas tienen mayor disponibilidad de agua, sin embargo, el agua con agar sólo acelera la germinación,

pero no mantiene el crecimiento de las plántulas pues no hay nutrientes en este medio. Las sales del medio MS 50% reducen el potencial hídrico del agua con agar al 1%, la disponibilidad del agua es más restringida y los nutrientes del medio mantienen el crecimiento y el desarrollo de las plántulas; las semillas de *Polaskia chichipe* y *Echinocactus platyacanthus* en medio MS 50% alcanzaron 80% de germinación en 50 días y 100% en 28 días respectivamente (Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004). En *A. fissuratus* se empleó como medio de germinación MS 50% con agar al 0.8%, medio en el que las plántulas pueden seguir su desarrollo para ser fuente de explante en la inducción morfogénica, el tiempo en que inició la germinación concuerda con lo reportado por Rosas-López y Collazo-Ortega (2004).

Semillas de cactáceas han sido germinadas en medio MS con porcentajes similares a los que se presentaron en *A. fissuratus*. Las semillas de un fruto maduro de *Cereus jamacaru* germinaron en medio MS en 60% (Monteiro *et al.*, 2009), *Mammillaria densispina* en MS 50%, el 75% en 102 días, *M. coahuilensis* y *M. candida* en MS 25% alcanzaron más de 90% en 26 días (Comparán y Carranza, 2009). Salas-Cruz *et al.* (2011) usaron zeolita como material soporte con medio MS, el medio le aporta los nutrientes que mantienen el crecimiento de las plantas, mientras que la zeolita retiene la humedad, permite el intercambio catiónico y brinda el soporte adecuado para las raíces; tanto en medio MS 50% con zeolita como en MS 50% con agar los porcentajes de germinación fueron similares a los presentados en éste trabajo con semillas almacenadas de *A. fissuratus* por menos de un año (bajo porcentaje por falta de maduración) o por más de cinco años (bajo porcentaje debido a la pérdida de la viabilidad): *Astrophytum capricorne* (47.4%), *A. myriostigma* (54%),

Echinocereus reichenbachii (31.8%), *M. prolifera* (22.9%) y *Sclerocactus scheeri* (27.4%) (Salas-Cruz *et al.*, 2011).

Olguín (1994), empleó para *A. retusus* la misma formulación y concentración de sales de medio MS que la utilizada para *A. fissuratus*, pero sin carbón activado, a los 50 días posteriores a la siembra obtuvo 63.8% germinación, probablemente porque sólo tenían tres meses de almacenamiento. Moebius (2003), en semillas de *A. kotschoubeyanus* logró germinar 90% en un periodo de 8 a 30 días en medio MS 50% más 30 gL⁻¹ de sacarosa, no reportó con exactitud la edad o tiempo de almacenamiento de las semillas, pero sugiere que con el paso del tiempo la viabilidad podría decrecer. Gómez (2008) reportó 86.6% en la germinación de las semillas de *A. bravoanus* (actualmente *A. fissuratus* ssp. *bravoanus* según clasificación de Guzmán *et al.*, 2003) a los 25 días después de la siembra en medio MS 50% más 30 gL⁻¹ de sacarosa y empleó semillas con menos de un año de almacenamiento. Medel-Narváez *et al.* (2001) extrajeron embriones de semillas de *A. fissuratus* ssp. *fissuratus* y los sembraron en medio MS, los cuales germinaron al segundo día y alcanzaron 94% mientras que las semillas con testa y sin tratamiento pregerminativo sembradas en el mismo medio de cultivo tuvieron un menor porcentaje de germinación (9.8%) después de 21 días e iniciando la germinación en el día 11.

En la presente tesis las semillas de *A. fissuratus* almacenadas entre un mes y un año se obtuvo un porcentaje entre 31.1% y 43.3%, notablemente menor en comparación con los datos obtenidos por Olguín (1994) y Gómez (2008) en semillas almacenadas por periodos de tiempo similares de *A. retusus* (63.8%) y *A. fissuratus* ssp. *bravoanus* (86.6%). Por lo que las semillas de *A. fissuratus* se encontrarán en

estado latente durante un tiempo variable, hasta que en un momento dado adquieran su capacidad para germinar o por el contrario pierdan su viabilidad.

En general, en los estudios sobre la germinación de semillas de cactáceas, incluidas las del género *Ariocarpus*, son escasos los reportes sobre la influencia del tiempo (longevidad o edad de las semillas) que podrían afectar su viabilidad. En la mayoría de los trabajos se evalúan variables como los tratamientos pregerminativos (Arredondo *et al.*, 2007; Arredondo, 2008), los medios o sustratos de germinación (Olguín, 1994; Medel-Narváez *et al.*, 2001; Moebius, 2003; Rosas-López y Collazo-Ortega, 2004; Flores *et al.*, 2006; Arredondo *et al.*, 2007; Lone *et al.*, 2007; Gómez, 2008; Flores *et al.*, 2008; Rojas-Aréchiga *et al.*, 2008; Comparán y Carranza, 2009; Monteiro *et al.*, 2009; Flores y Jurado, 2011; Ruíz-González *et al.*, 2011; Salas-Cruz *et al.*, 2011), el fotoperiodo y pocas veces el termoperiodo (Flores y Jurado, 2006; Lone *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2011; Ruíz-González *et al.*, 2011), factores que también son muy importantes en la respuesta germinativa. Aún es insuficiente lo que se conoce respecto a los requerimientos de germinación en semillas de cactáceas, su viabilidad, longevidad y las condiciones óptimas para su almacenamiento (Alcorn y Martin, 1974 citados por Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000). Hay pocos trabajos que evalúen la pérdida de viabilidad a través del tiempo, aunque los datos sugieren que la mayoría de las semillas de cactáceas tienen un comportamiento de almacenamiento ortodoxo (Roberts, 1972 citado por Murray, 1984). En las semillas de cactáceas que pasan por un periodo de latencia, debe llevarse un control sobre las condiciones de almacenamiento (tiempo, temperatura y humedad), de otro modo no podrán generarse conclusiones sobre su tasa de germinación al no ser comparables (Rosa-Carrillo *et al.*, 2012). Los estudios

sobre germinación y establecimiento de las plántulas también son importantes para entender las estrategias reproductivas de la especie, la propagación artificial y su conservación.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la respuesta germinativa de *A. fissuratus* representan datos importantes para entender el comportamiento de estas semillas *in vitro* y el tiempo óptimo de almacenamiento, en el que las semillas alcanzaron su maduración, y así obtener el mayor porcentaje de germinación para dar un mayor aprovechamiento al material biológico con el que se iniciarán los cultivos *in vitro*.

- **Desarrollo *in vitro* de las plántulas de *A. fissuratus***

El desarrollo de plántulas obtenidas *in vitro* se evaluó durante un año, tiempo en el que alcanzaron 1 cm de longitud (Fig. 10). Previo a la siembra, las semillas recibieron un método de escarificación químico con H₂SO₄ concentrado que permitió el adelgazamiento de la testa para facilitar su imbibición (Fig. 10 a). Al germinar las semillas (día uno) la radícula de 1 mm, de color blanco protruyó la cubierta seminal desde el extremo micropilar a través del opérculo y penetró posteriormente en el medio de cultivo y, en aquellos casos en que quedó expuesta sobre el medio, se observaron pelos radiculares (Fig. 10 b-d). Las plántulas de dos a tres días de edad (Fig. 10 e-g) tuvieron un hipocótilo globular de 2 mm, de color blanco-amarillento y en algunos casos rojizo; el hipocótilo continuó con su forma globular, hasta los seis días, adquirió color verde y alcanzó 2.5 mm de longitud (Fig. 10 h). Entre los siete y ocho días, los cotiledones (menores a 1 mm de diámetro) se observaron carnosos y pequeños con más claridad, (Fig. 10 i). Entre los nueve y quince días, el hipocótilo (3 mm de longitud) fue de color verde brillante, los

cotiledones estaban bien definidos y cónicos (<1 mm) (Fig. 10 j), y del ápice de la plántula entre los cotiledones emergió una aréola con tres a cinco espinas setosas (Fig. 10 k); a los 30 días la emergencia de los tubérculos (<1 mm) fue secuencial de uno en uno e inicialmente tuvieron una coloración verde claro y textura lisa (Fig. 10 l, m) y se fueron oscureciendo conforme alcanzaban los 45 días (Fig. 10 n). A los 60 días las raíces midieron 15 mm de largo y 2 mm de diámetro (Fig. 10 ñ) y desarrollaron raíces secundarias (Fig. 10 o), la forma de la plántula era elíptica como lo reportó Olguín (1994) para *A. retusus*. Cuando tuvieron entre 70 y 90 días de edad, la raíz principal fue más gruesa (6 mm) y se alargó hasta 25 mm, poco ramificada y blanca, con este sistema radicular las plántulas incrementan el área de contacto con el medio de cultivo; el ápice de las plántulas desarrolló por lo menos dos tubérculos (2-3 mm), de color verde oscuro (Fig. 10 p). A los seis meses, el hipocótilo midió 4 mm de alto por 6 mm de ancho y ya se habían desarrollado tres tubérculos (2 mm de largo), tenían un aspecto café verdoso, de textura ligeramente rugosa y ensanchados de la base (3 mm) (Fig. 10 q). Finalmente, cuando las plantas cumplieron doce meses de edad, los cotiledones ya no fueron evidentes, el hipocótilo se redujo en volumen (3 mm de alto por 4 mm de ancho) y presentó rugosidades; para entonces se habían desarrollado cuatro y hasta seis tubérculos con dos o tres espinas setosas de 4 mm y en la base de éstas apenas fueron perceptibles unos cuantos tricomas o lana, además de pequeñas rugosidades transversales. En los tubérculos más viejos ya se observó la fisura central longitudinal (3 a 5 mm) que los recorre de la base a la punta característica de la especie (Fig. 10 r).

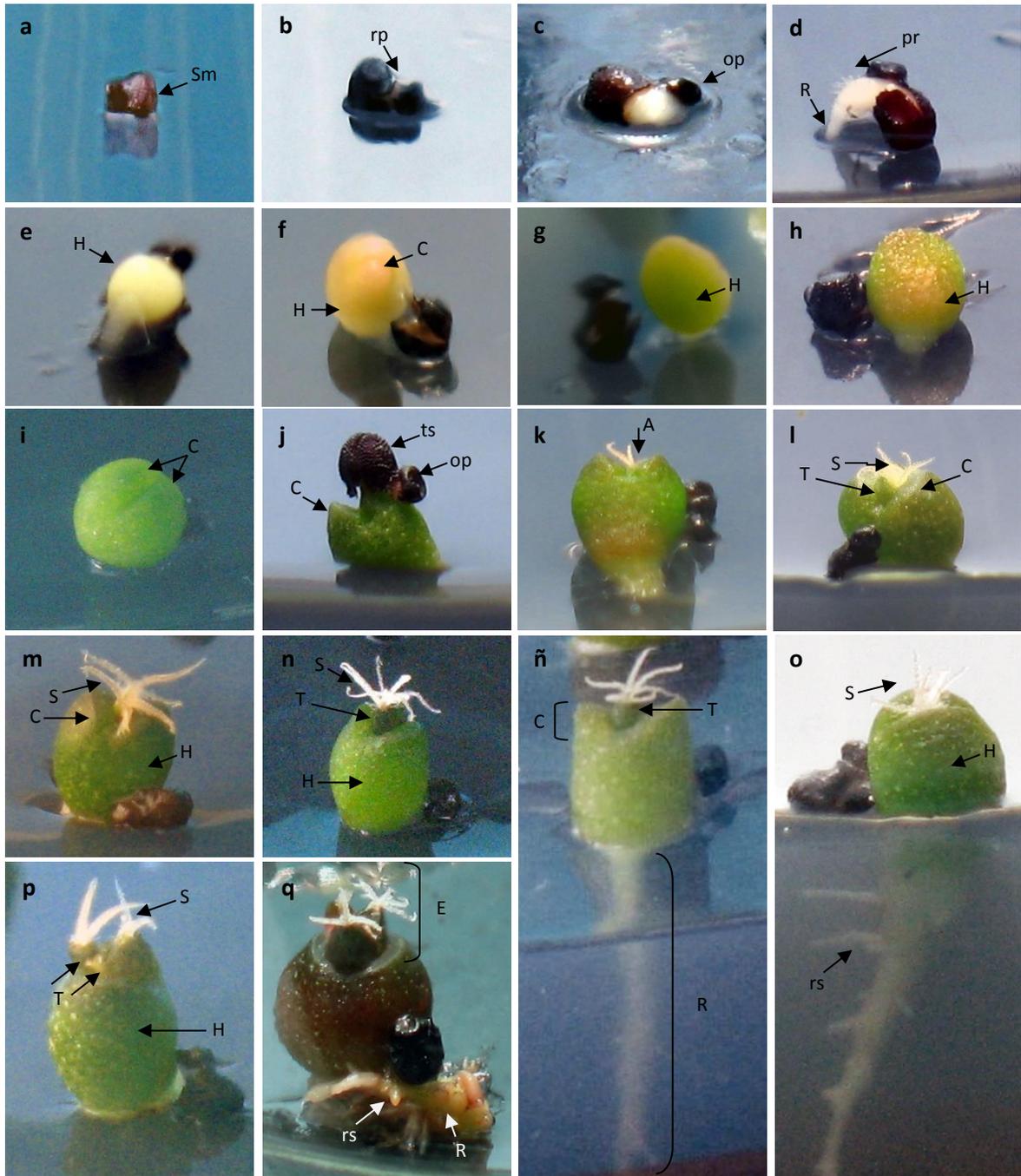


Figura 10. Germinación y etapas del desarrollo *in vitro* de las plántulas de *Ariocarpus fissuratus*. Se observa la ruptura de la testa y el crecimiento del embrión, así como la emergencia de la radícula a través del opérculo (a-c), la radícula se inserta en el medio de cultivo (d) desarrollo del hipocótilo de color blanco-amarillento (e-f) hipocótilo verde (g-i), desarrollo de los cotilédones de forma cónica, pequeños y carnosos (j); desarrollo de la aréola con el primer tubérculo (k) y sucesivo desarrollo de los tubérculos con arreglo espiralado (l-n). Radícula tuberosa con ramificaciones secundarias y terciarias (ñ-o). Los tubérculos maduros desarrollan una fisura central longitudinal y varias fisuras transversales (p-r).

Barra=5 mm

Sm-semilla, *rp*-ruptura de la testa, *op*-opérculo, *R*-radícula, *pr*- pelos radicales, *H*-hipocótilo, *C*-cotilédones, *ts*-testa, *A*-aréola, *S*-espinas setosas, *T*-tubérculos, *E*-epicótilo, *rs*-raíces secundarias, *fiss*-fisura central del tubérculo y *tr*-tricomas.

Loza-Cornejo y Terrazas (2011) mencionan que en la tribu Pachycereeae (Cactoideae) los cambios morfo-anatómicos como la desaparición de cotiledones, la presencia de costillas, el establecimiento del cámbium vascular, la mayor acumulación de xilema secundario y la diferenciación de los haces vasculares medulares permiten establecer el límite entre la etapa de plántula y planta joven.

En *A. fissuratus* (Tribu Cactaeae, Cactoideae) los cotiledones fueron reduciéndose en tamaño desde los tres meses de edad y ya no se distinguen del hipocótilo a los doce meses similar a lo observado en *Stenocereus queretaroensis*; Barthlott y Voit (1979) citados por Loza-Cornejo *et al.* (2003), indicaron que a medida que se reducen los cotiledones es mayor el desarrollo del hipocótilo, posiblemente porque es en el hipocótilo y no en los cotiledones donde se almacenan las reservas durante el desarrollo postgerminativo. La secuencia del desarrollo de las plántulas de *A. fissuratus* corrobora el lento crecimiento de las especies de este género.

Uno de los problemas frecuentes en el cultivo de tejidos es la hiperhidratación de las plántulas, la cual se puede presentar en diferentes etapas de su desarrollo, provocando la desorganización de los tejidos y la formación de callo desmenuzable; esto tuvo como consecuencia la pérdida de fuente de explantes laterales, centrales y de tubérculos para los posteriores experimentos de la inducción morfogenética.

El porcentaje de hiperhidratación de *A. fissuratus* se evaluó al finalizar los 30 días en el medio de germinación para detectar el número de plántulas disponibles para explantes, se contabilizó el número de las plantas hiperhidratadas entre el número de semillas germinadas en cualquier etapa del desarrollo, las plantas restantes se utilizaron como fuente de explantes para inducir las respuestas morfogenéticas (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de plántulas sembradas *in vitro* de *A. fissuratus* hiperhidratadas de los diferentes años de cosecha. Se estimó el número real de plántulas potencialmente útiles como fuente de explantes.

Años de cosecha de semillas de <i>A. fissuratus</i>	Siembra 1 (2012)	Siembra 2 (2013)	Siembra 3 (2014)
2008	21/59=35.5%	13/54=24%	3/3=100%
2009	20/75=26.6%	17/75=22.6%	4/17=23.5%
2010	-	-	-
2011	12/44=27.2%	6/78=7.6%	9/17=17.3%
2012	13/39=33.3%	4/28=14.2%	17/51=33.3%
2013	-	-	7/51=13.7%
Total de plántulas vigorosas	151	195	89

La hiperhidratación ocurrió en plántulas de cuatro a nueve días; a esta edad tienen aproximadamente 5 mm de alto, presentaron forma globular, color verde y el doble de tamaño que en el desarrollo normal (Fig. 11 a), además presentan los cotiledones redondeados y voluminosos en lugar de cónicos (Fig. 11 b). En plántulas de 15, 30 y 45 días el hipocótilo retuvo demasiada agua provocando la ruptura de los tejidos (Fig. 11 c-e), en algunas plántulas (3 a 12 meses) llegó a formarse callo en la región entre la raíz y la base del hipocótilo por lo que las raíces de esas plántulas no crecieron más allá de 10 mm de largo y finalmente se oxidaron (Fig. 11 d-h). La hiperhidratación fue un evento irreversible, e independientemente de la etapa en donde inició, todas las plántulas se desorganizaron en callo desmenuzable (Fig. 11 i, j).

En la germinación de las semillas de *A. fissuratus* se emplearon dos concentraciones de sacarosa en el medio MS 50%. En la siembra 1 (2012), con 15 gL⁻¹ de sacarosa, se obtuvieron 30.4% de plántulas hiperhidratadas, mientras que en la siembra 2 y 3 (2013 y 2014) con 30 gL⁻¹ de sacarosa el resultado fue menor (17% y 28.7% de plántulas vitrificadas respectivamente).

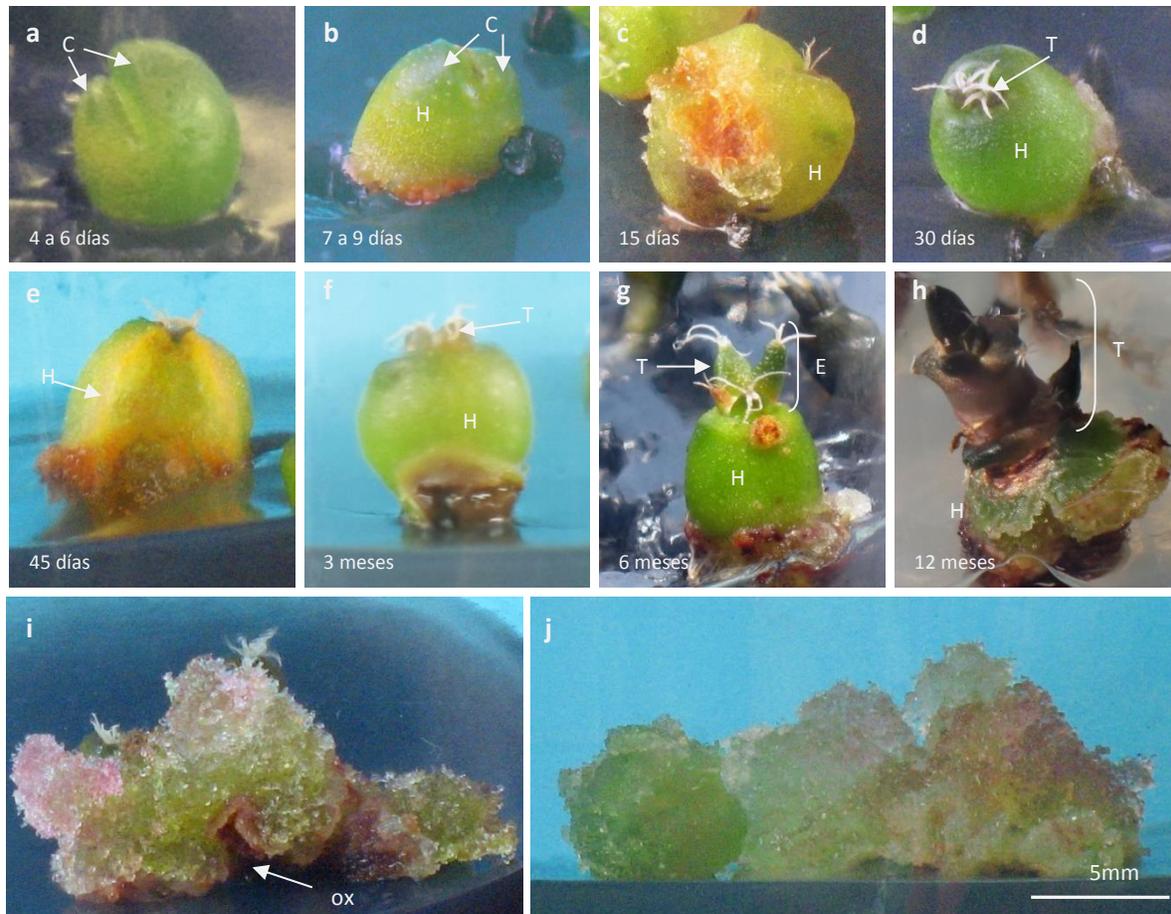


Figura 11. Aspecto de plántulas hiperhidratadas en diferentes etapas del desarrollo *in vitro* de *A. fissuratus*. La hiperhidratación es un desarrollo anormal de los tejidos, los órganos adquieren un aspecto traslúcido y se transforman en turgentes al grado de romperse. Las fotografías no representan una secuencia del avance de la hiperhidratación sino los síntomas de este fenómeno en determinada etapa del desarrollo *in vitro*, desde los cuatro días de edad hasta un año (a-h); finalmente se desorganizaron en callo (i-j).

H-hipocótilo, *C*-cotiledones, *T*-tubérculos, *E*-epicótilo, *ox*-oxidación.

Es posible que el incremento en la concentración de la sacarosa haya influido en la disminución de la vitrificación de las plántulas. Se ha relacionado la vitrificación de los brotes de clavel, calabaza, sauce, ciruela, alcachofa y cactáceas a tres causas principalmente: un medio rico en nutrientes minerales como el MS (Ziv, 1991), el potencial hídrico del medio regulado por carbohidratos como la sacarosa y el manitol; y la concentración del agar (Debergh *et al.*, 1981).

Aunque se redujo el porcentaje de plántulas dañadas al incrementar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo a 30 gL⁻¹, ésta no influyó en el tiempo de inicio de germinación.

El estado físico del medio de cultivo (disponibilidad de agua por medio del gelificante y de la concentración de sales) y la atmósfera del contenedor son los principales factores que inducen la vitrificación y pueden ser controlados (Debergh *et al.*, 1981; Al-Atabee y Power, 1990; Singha *et al.*, 1990; Ziv, 1991) cuando los cultivos vitrificados son transferidos a condiciones no vitrificantes, los tejidos aquí desarrollados tendrán una morfología y anatomía normales; sin embargo, los tejidos vítreos no se recuperan de este estado (Kevers *et al.*, 2004).

Por lo tanto, la hiperhidratación puede ser controlada al modificar las concentraciones en el medio de: sales (CaCl₂ y NH₄), agentes gelificantes y carbohidratos; pero también incorporando al medio compuestos como la florigidina que interviene en la síntesis de lignina y la GA₃ en la síntesis de celulosa, pectina y hemicelulosa involucradas en la construcción de la pared celular (Higgins y Jacobsen, 1978, citados por Al-Atabee y Power, 1990; Phan y Hegedus, 1986); además de tratamientos en los cultivos con bajas temperaturas (4 °C) y en oscuridad (Phan y Hegedus, 1986).

La hiperhidratación se ha reportado en el cultivo *in vitro* de cactáceas tanto en brotes de *Mammillaria candida*, *M. craigii*, *M. formosa*, *M. oscura*, *M. sphacelata* y *M. uncinata* (Pérez-Molphe *et al.*, 1998), *Pediocactus* sp. (Ziv, 1991), así como en las plántulas de *Mammillaria carmenae*, *M. herrerae*, *M. theresae* donde 20% de las plántulas obtenidas *in vitro* mostraron una morfología anormal y callo (Retes-Pruneda *et al.*, 2007); en *M. haageana* ssp. *elegans* algunas plántulas se

desarrollaron anormalmente con callo en el hipocótilo y las aréolas (Azcona, 2009). Para reducir la formación de callo inducido por BA en *Pelecyphora aselliformis*, Santos-Díaz *et al.* (2003) emplearon CA al 1%, obtuvieron además el enraizamiento de los brotes.

En *A. fissuratus* 24.7% de las plántulas obtenidas *in vitro* se hiperhidrataron aun utilizando el MS al 50% con CA.

- **Elongación de las plántulas**

Para promover la elongación de las plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* y el desarrollo de los tubérculos, las plántulas de 20 días de edad con una longitud mínima de 5 mm (Fig. 12 a), fueron transferidas a medio líquido MS+CA con puentes de papel filtro. Se emplearon 25 plántulas de cada cosecha de la siembra 1 y de la siembra 2. Transcurridos 25 días se realizó un segundo subcultivo en el mismo tipo de medio, pero sólido (con agar 8.5 gL⁻¹) para continuar con su desarrollo hasta que los tubérculos alcanzaran 0.5 cm de longitud y ser usados como explantes en la inducción morfogénica.

Después de permanecer una semana en medio líquido se desarrolló el primer tubérculo de las plántulas (de 1 mm a 1.5 mm) y ya comenzaba a emerger el segundo, ambos de color verde oscuro (Fig. 12 b); durante la segunda semana emergió el tercer tubérculo (Fig. 12 c), a la tercera se elongaron los primeros tres tubérculos (3 mm), y fue visible la aréola del cuarto, el hipocótilo incrementó su longitud de 4 a 6 mm (Fig. 12 d). Finalmente, entre la tercera y la cuarta semana, los primeros cuatro tubérculos se alargaron y ensancharon (5 mm por 3 mm) y emergió el quinto. El medio líquido estimuló en 25 días el crecimiento y desarrollo de las plántulas, logrando que a los 45 días de cultivo alcanzaran la talla de 1 cm

(Fig. 12 e), mientras que en el medio sólido la misma longitud se obtuvo transcurrido un año (Fig. 10 r).

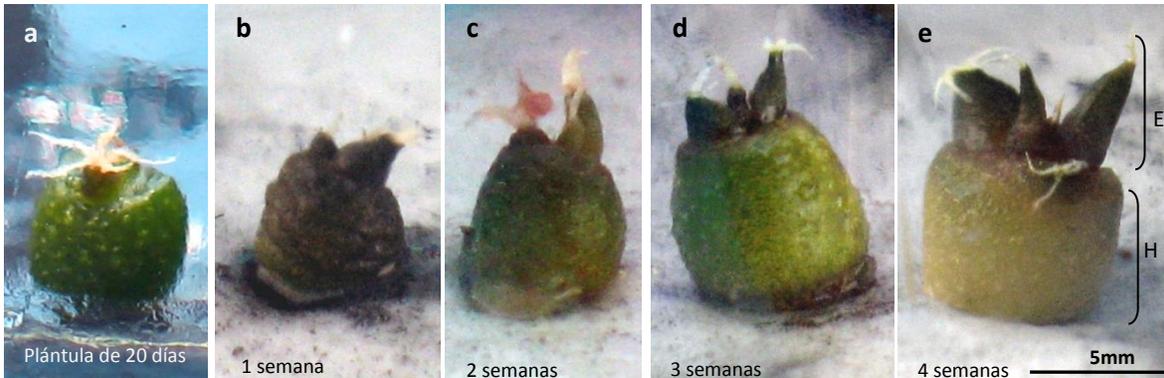


Figura 12. Las plántulas de *A. fissuratus* de 20 días de edad (a) se transfirieron a medio líquido MS+CA durante 25 días. (b) En una semana en medio líquido se elongó el tubérculo inicial y emergió el segundo, (c) emergió el tercer tubérculo en la segunda semana, (d) se elongaron los primeros tres tubérculos, emergió la aréola del cuarto tubérculo y aumentó el volumen del hipocótilo en la tercera semana; y (e) en la cuarta semana se ensancharon los primeros cuatro tubérculos y emergió el quinto. H-hipocótilo, E-epicótilo

El tiempo de permanencia en medio líquido (25 días) y la posterior transferencia al medio sólido se determinó de acuerdo a la respuesta de los tejidos, evitando los primeros síntomas de hiperhidratación en el hipocótilo. Las plántulas de la siembra 1 permanecieron seis meses en el medio sólido y las plántulas de la siembra 2 permanecieron dos meses para continuar con su desarrollo (Fig. 10) hasta la obtención de los explantes.

- **Respuestas morfogénicas en el medio de inducción**

- **Formación de callo (BA/ANA)**

La primera respuesta en el medio de inducción fue la formación de callo en todos los tipos de explantes (centrales, laterales y tubérculos); éstos adquirieron una coloración café rojiza en la zona del corte que pudo haber derivado o no en la oxidación completa del explante, o en la formación de callo desmenuzable verde intenso y de aspecto húmedo que posteriormente desarrolló estructuras celulares alargadas y hialinas. A las dos semanas en el medio de inducción el 4% de los

explantes centrales (3/75) desarrolló raíces adventicias por organogénesis indirecta en los tratamientos con ANA 0.5 mgL⁻¹ (cuatro raíces), BA 2 mgL⁻¹ (una raíz) y BA 3 mgL⁻¹ (una raíz); sin embargo, al primer mes las raíces que se habían formado se desorganizaron en callo. El volumen de callo aumentó manteniendo su aspecto desmenuzable, húmedo y verde. A partir de los dos meses, en todos los tipos de explantes se observó un cambio en la coloración de la superficie del callo que se tornó verde más intenso sólo en las concentraciones BA 1 a 5 mgL⁻¹ combinadas con ANA 0.5 y 1 mgL⁻¹. A los tres meses de inducción los tres tipos de explantes presentaban callo desmenuzable, verde olivo, de aspecto húmedo, el mayor volumen de callo formado en la etapa de inducción lo obtuvieron los explantes centrales, luego los laterales y finalmente los tubérculos. Los explantes centrales formaron un mayor volumen de callo debido a que éstos tenían dos superficies de corte donde proliferaron las células del parénquima del hipocótilo por el efecto de los reguladores del crecimiento; los laterales, sólo tenían una superficie de corte y en el caso de los tubérculos fue la menor, aunado a que en sus ápices presentan yemas meristemáticas, las cuales por efecto de las auxinas endógenas y la dominancia apical mantuvieron por más tiempo la integridad de los tejidos (Fig. 13). Para evitar la inhibición de las respuestas morfogenéticas debido a la prolongada exposición de los reguladores de crecimiento en los tejidos, el callo se subcultivó en MS+CA, medio en el que permaneció durante cinco meses, realizando, a los dos meses y medio, solo un subcultivo a medio fresco.

El efecto de la alta concentración de BA en ausencia de ANA en *Pelecypora aselliformis* se reportó que la alta concentración de BA desencadenó el desarrollo de callo (Santos-Díaz *et al.*, 2003) y corresponde a lo obtenido para *A. fissuratus*.

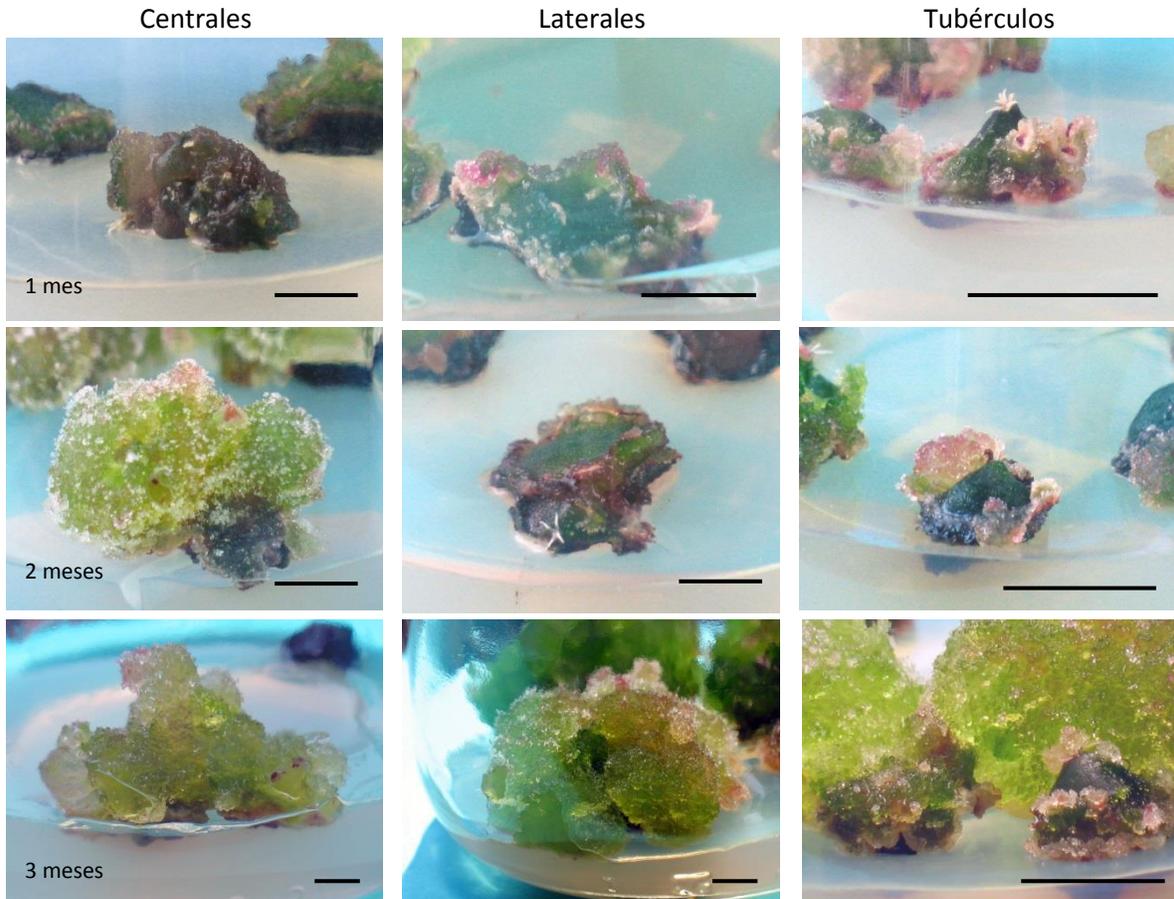


Figura 13. Formación de callo desmenuzable de color café rojizo a partir de explantes centrales, laterales y tubérculos de *A. fissuratus* en diferentes concentraciones y combinaciones de BA/ANA a los tres meses todos los explantes mostraron callo desmenuzable de color verde olivo y de aspecto húmedo. Barra: 1 cm

○ **Formación de callo (K/2,4-D).**

A partir de explantes longitudinales y tubérculos, se promovió la formación de callo con K/2,4-D para inducir la embriogénesis somática.

En ausencia de 2,4-D, los explantes longitudinales y tubérculos no desarrollaron callo. A mayor concentración de la auxina fue mayor el volumen de callo que se produjo; el tipo de callo que se formó después de cuatro meses en el medio de inducción fue húmedo y de color verde olivo, pero a diferencia del que se produjo en BA/ANA éste formó cúmulos de callo de aspecto granular, de color verde con áreas rojizas (Fig. 14).

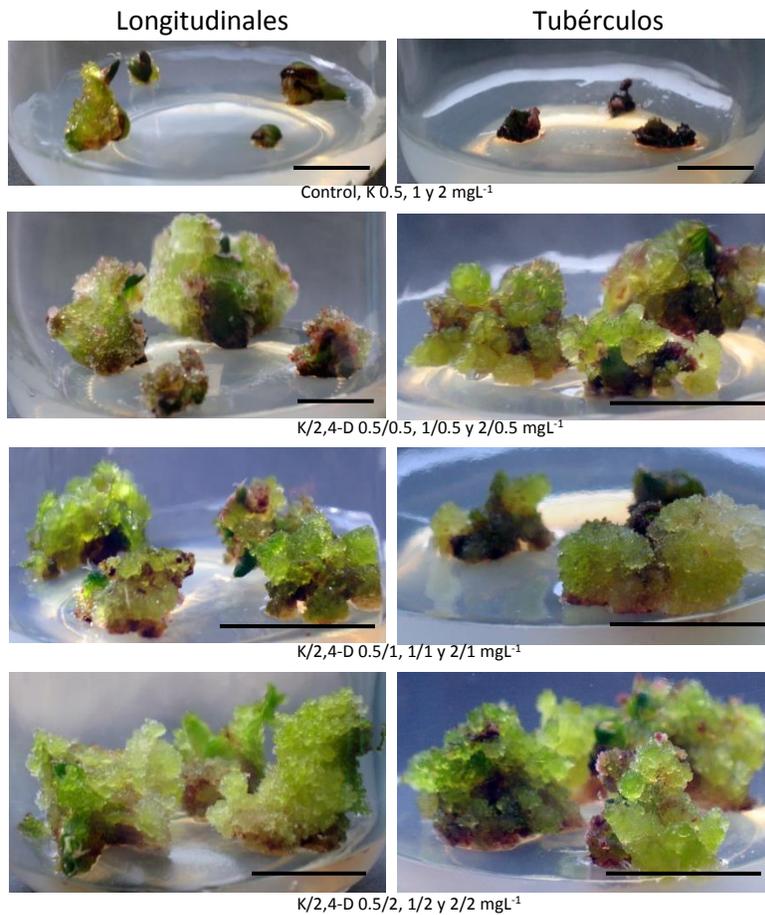


Figura 14. Formación de callo desmenuzable de color verde olivo a partir de explantes longitudinales y tubérculos de *A. fissuratus* en diferentes concentraciones y combinaciones de K/2,4-D, excepto en ausencia de la auxina. Se observó oxidación en la base de los explantes. Tiempo de incubación cuatro meses. A mayor concentración de la auxina se incrementó el volumen de callo. Barra: 2 cm

Después de dos subcultivos en medio MS+CA, los cultivos incubados durante siete meses sólo formaron callo hialino con algunas tonalidades verdes.

Se han reportado tres tipos de callo embriogénico según variaciones en color, estructura, textura y respuesta (Schumann *et al.*, 1995). El primero es un callo compacto globular, nodular de color amarillo

claro y muy denso, constituido por células pequeñas isodiamétricas; el segundo es un callo irregular, desmenuzable, de apariencia más o menos traslúcida con regiones densas y color café claro; el último tipo de callo es extremadamente desmenuzable, de células gigantes traslúcidas y no es morfogénico. En *A. fissuratus*, con BA/ANA, se obtuvo el primer y segundo tipo de callo, los cuales desarrollaron a los embriones somáticos. Con K/2,4-D se formaron grandes volúmenes de callo no regenerativo. No obstante, el 2,4-D es la auxina que se ha reportado como promotora de la embriogénesis.

Oxidación. La muerte celular se presentó en algunos explantes debido a la necrosis por oxidación de tejidos cultivados *in vitro*. Todos los explantes en ambos barridos hormonales adquirieron una tonalidad rojiza de aspecto oxidado en la superficie del tejido que estaba en contacto con el medio desde el primer día de cultivo. El porcentaje de oxidación de los explantes cultivados con BA (2-5 mgL⁻¹) en ausencia de la auxina fue bajo (1 a 3%) después de permanecer tres meses en el medio de inducción (Fig. 15). Con K/2,4-D, no se presentó la oxidación de los explantes.



Figura 15. Oxidación completa de los explantes centrales, laterales y de tubérculos en las concentraciones de BA (2, 3 y 5 mgL⁻¹) en ausencia de la auxina, después de tres meses en cultivo. Barra: 0.5 cm

La oxidación es debida a los radicales libres de diferentes componentes celulares, así como a la oxidación de los compuestos fenólicos caracterizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son químicamente muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Azofeifa, 2009).

Durante el cultivo *in vitro* existe una alta humedad relativa por lo que se genera hipoxia en los tejidos y a su vez una variedad de especies reactivas de oxígeno (como el anión superóxido, radicales hidroxilos y el peróxido de hidrógeno) que al asociarse con moléculas celulares dañan las membranas y otras estructuras; estas sustancias reactivas son eliminadas mediante enzimas defensivas y antioxidantes (Kevers *et al.*, 2004) o controladas con subcultivos frecuentes sin el tejido necrosado en medio con CA debido a sus propiedades adsorbentes (Razdan, 2003).

o Organogénesis indirecta

La formación de brotes en *A. fissuratus* sólo ocurrió por organogénesis indirecta a partir del callo obtenido de tubérculos cultivados con BA/ANA 3/0.5 mgL⁻¹ después de 11 meses (tres meses en medio de inducción y ocho meses en medio basal) (Fig. 16 a). Los brotes (tres) se desarrollaron inmersos en un callo compacto verde claro, los que se subcultivaron en medio MS para promover su elongación, sin embargo, a los ocho meses se hiperhidrataron y formaron callo (Fig. 16 b) y después de 16 meses dos, de los tres brotes, murieron (Fig. 16 c).



Figura 16. Brotes desarrollados en callo compacto generado en cultivo de tubérculos con BA/ANA 3/0.5 mgL⁻¹ y subcultivados a medio basal para su elongación (a). A los ocho meses, los brotes se hiperhidrataron y generaron callo en la base (b), después de 16 meses sólo sobrevivió uno de los tres brotes (c). Barra:2 cm

Kevers *et al.* (2004) mencionaron que bajo un ambiente estresante sólo los genotipos con las combinaciones de genes apropiadas tienen la capacidad de sobrevivir y reproducirse, es probable que la sobrevivencia de solo un brote sea debida al genotipo, a las concentraciones hormonales endógenas, o a la presencia de tejidos recalcitrantes, es decir, tejidos cuyas células han perdido la capacidad de responder a las condiciones inductivas y ya no son competentes desde etapas muy tempranas del desarrollo (Bhojwani y Razdan, 1996).

Los tejidos pueden ser recalcitrantes durante su cultivo *in vitro* por diversas causas, entre las que se destacan, los factores genéticos que los predeterminan, la pérdida de la competencia morfogenética y la capacidad de totipotencialidad debidas al envejecimiento y a la presencia de radicales libres por estrés (Benson, 2000). Algunas especies que se consideraron recalcitrantes se han logrado regenerar *in*

vitro, esto ha dependido de los cambios efectuados oportunamente en los medios de cultivo, la selección de los genotipos y los explantes (Bhojwani y Razdan, 1996). Se ha reportado la regeneración de brotes por organogénesis directa a partir de las aréolas de los tubérculos en *A. kotschoubeyanus*, *A. retusus* y *A. fissuratus* ssp. *bravoanus*, y en *A. agavoides* únicamente a partir del callo, al igual que en *A. fissuratus*.

Rodríguez-Garay y Rubluo (1992), obtuvieron brotes en *Aztekium ritteri* por la activación de las aréolas de otros brotes individualizados en medio MS adicionado con BA 0.1 mgL⁻¹ y BA/ANA 1/0.01 mgL⁻¹. Después de ocho meses se individualizaron los nuevos brotes, cuya morfología fue normal. Sólo dos brotes de 60 desarrollaron raíces en el medio MS con AIB 2 mgL⁻¹ y uno de ellos fue transferido a sustrato esterilizado compuesto por arena y peat moss en partes iguales y sobrevivió en condiciones de invernadero.

No obstante, los cultivos *in vitro* de *A. fissuratus* se iniciaron con tejidos jóvenes, éstos no respondieron a la inducción con BA/ANA como lo reportado en otras especies del mismo género, aun así, las citocininas tuvieron una influencia importante, por ejemplo, en explantes de *A. retusus* cultivados con BA 2 mgL⁻¹ se obtuvieron hasta 48 brotes por tratamiento con la mayor cantidad de brotes en los explantes laterales (21), seguido de los centrales (17) y los tubérculos (10) (Olguín, 1994). Moebius (2003) reportó para *A. kotschoubeyanus* la obtención de 38 brotes en 33% de los explantes de tubérculos cultivados en medio MS con BA/ANA 3/1 mgL⁻¹ y 37 brotes en 16% de los tubérculos sembrados con BA 1 mgL⁻¹. Jofre-Garfias *et al.* (2010) emplearon otro tipo de citocinina para la micropropagación de *A. agavoides*, sembraron los ápices de las plántulas en medio Eriksson (1965)

adicionado con thidiazuron 4 mgL^{-1} , se formó callo y al transferir los cultivos a medio basal a partir de la semana 20 se obtuvieron 12 brotes por recipiente, los cuales enraizaron en el mismo medio.

Por el contrario, en *A. fissuratus* ssp. *bravoanus* la generación de brotes se presentó bajo influencia principalmente de las auxinas en el medio MS. Se obtuvo un brote en un explante de tubérculo cultivado con ANA 3 mgL^{-1} y un brote también en 2,4-D 5 mgL^{-1} , al combinar AIB/ANA $2/0.5 \text{ mgL}^{-1}$ obtuvo 5 brotes y 7 brotes con 1 /0.1 mgL^{-1} después de 12 semanas en cultivo. También indujo brotes en los tratamientos K/2,4-D $0.1/5$ y $0.5/1 \text{ mgL}^{-1}$ (dos brotes en cada uno) y $0.1/1 \text{ mgL}^{-1}$ (seis brotes), regenerados por organogénesis directa del ápice de los tubérculos (Gómez, 2008). Es posible entonces, que en *A. fissuratus* se requiera explorar el efecto de mayores concentraciones de una o varias auxinas para la obtención de más brotes, como lo reportó Gómez (2008) para *A. fissuratus* ssp. *bravoanus*.

○ **Embriogénesis somática**

Debido a la falta de respuesta organogénica en los explantes cultivados con BA/ANA, se exploró la respuesta de los explantes en medio adicionado con 2,4-D, con la finalidad de obtener regenerantes vía embriogénesis somática. Esta auxina sintética se ha reportado como inductora de la ES en otras especies vegetales (Vacca *et al.*, 2014).

Considerando que el callo embriogénico es producido principalmente por tejidos jóvenes e inmaduros (Schumann *et al.*, 1995), en este caso se utilizaron tejidos de plántulas germinadas *in vitro*, se esperaba la respuesta embriogénica de los explantes cultivados con K/2,4-D, sin embargo, ésta fue nula en todos los tratamientos, siendo la formación de callo la única respuesta.

En *A. fissuratus*, los embriones somáticos proliferaron a partir de las células de un primer embrión de dos maneras: formándose embriones somáticos secundarios directamente de la superficie del embrión y, mediante el callo obtenido de la dediferenciación continua de los ES primarios. La literatura menciona estas dos vías en que se lleva a cabo la embriogénesis somática secundaria o repetitiva (también llamada cíclica, recurrente, accesoria o adventicia): a) directamente sobre el cuerpo de un ES previamente formado se originan nuevos embriones somáticos y, b) cuando los tejidos de los ES se desorganizan y prolifera callo verde hialino seguido de la diferenciación de nuevos ES, éste es más común en presencia de una auxina, pero ambas vías pueden encontrarse en las mismas condiciones de cultivo (Raemakers *et al.*, 1995; Jaiwal y Singh, 2003; Agarwal *et al.*, 2004). La embriogénesis somática secundaria tiene potencial para la propagación a gran escala y la transformación genética dirigiendo la proliferación del tejido embriogénico al subcultivar los ES primarios en un medio suplementado con auxinas (Jain *et al.*, 1995; Mujiby Šamaj, 2005).

Después de siete meses en cultivo, el desarrollo de los embriones somáticos ocurrió de forma indirecta en el callo formado a partir de explantes de tubérculos cultivados inicialmente con BA 3 y 5 mgL⁻¹, y las mismas concentraciones de la citocinina más 1 mgL⁻¹ de la auxina: BA/ANA 3/1 y 5/1 mgL⁻¹ (tres meses) y posteriormente subcultivados en medio MS basal con CA (cuatro meses), además del tratamiento control (Fig. 17). Inicialmente se observaron nódulos o masas proembriogénicas blancas que sobresalían del callo desmenuzable verde intenso y a medida que el callo, alrededor de estas áreas se dividía, proliferaron más masas de este tipo (Fig. 17 a). Los embriones somáticos (ES) que se desarrollaron en el tratamiento control

y con BA/ANA 3/1 y 5/1 mgL⁻¹ se observaron en etapa globular y algunos alcanzaron etapas posteriores e incluso germinaron, aunque con síntomas de hiperhidratación, (Fig. 17 b, c); los embriones en los tratamientos en ausencia de ANA se desorganizaron en callo en el transcurso de una semana.

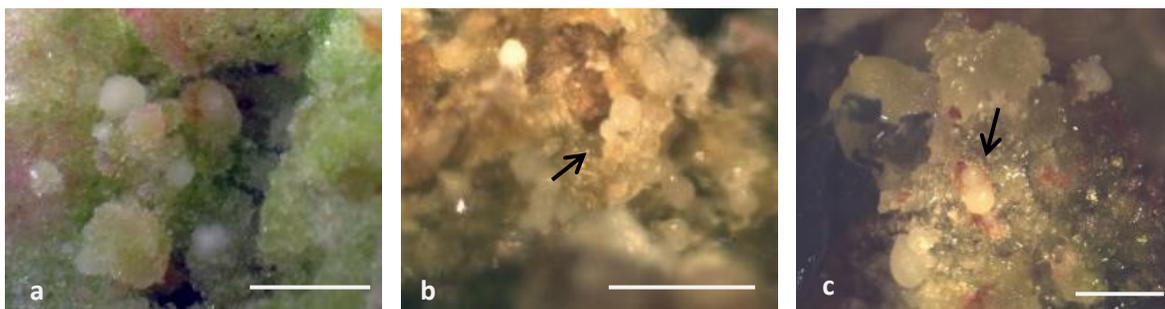


Figura 17. Embriogénesis somática indirecta inducida a los siete meses. Se formaron masas proembriogénicas (a) sobre el callo desmenuzable verde intenso, proliferaron embriones somáticos globulares (flechas) en el control y los tratamientos con BA/ANA 3/1 y 5/1 mgL⁻¹ (b, c). Barra: 2 mm

La embriogénesis somática se ha reportado en algunas especies de cactáceas, incluidas las del género *Ariocarpus*. En *A. retusus* los ES se formaron de manera indirecta a partir del callo generado de plántulas germinadas *in vitro* en medio MS adicionado con agua de coco 20% (v/v) después de tres a cuatro meses. Los primeros embriones eran grandes (5 mm) verdes, pero nuevamente se desorganizaron en callo y posteriormente de éste surgieron numerosos ES más pequeños (Stuppy y Nagl, 1992). En la misma especie, Olguín (1994), también reportó la formación de ES a partir de callo, friable y húmedo con áreas cristalinas, generado de un explante lateral cultivado con BA/ANA 0.5/0.1 mgL⁻¹, donde algunos lograron germinar y establecerse como plántulas.

La respuesta en *A. fissuratus* coincidió con lo ocurrido en *A. retusus*, donde también se formaron estructuras embriogénicas de manera espontánea en el medio sin reguladores del crecimiento, sin embargo, la incorporación de un complejo orgánico, como el agua de coco, lo hace un medio de cultivo químicamente no definido y difícil

de replicar, a diferencia de utilizar un medio basal de formulación definida. En ambas especies la respuesta embriogénica también ocurrió con los mismos reguladores del crecimiento, solo que para promoverla en *A. fissuratus* se requirieron concentraciones más elevadas de BA/ANA (3/1 y 5/1 mgL⁻¹) que en *A. retusus* (BA/ANA 0.5/0.1 mgL⁻¹).

En *A. kotschoubeyanus*, Moebius (2003) también obtuvo embriogénesis somática indirecta con la misma serie de reguladores del crecimiento y en concentraciones similares (BA/ANA 2/0.5, 2/1 y 3/0.1 mgL⁻¹), en este caso a partir del callo de tubérculos, y ES vía directa en los tubérculos inducidos con K 5 mgL⁻¹ y K/2,4-D 5/0.1 mgL⁻¹. Es posible que la falta de respuesta de *A. fissuratus* a la K/2,4-D sea debida a la concentración utilizada, ya que los tubérculos de *A. kotschoubeyanus* respondieron mejor en altas concentraciones de K (5 mgL⁻¹) y no a la máxima utilizada en *A. fissuratus* (2 mgL⁻¹), por lo que al parecer esta última especie necesita niveles altos de citocininas para estimular la respuesta embriogénica de sus tejidos, aunque éstos sean jóvenes.

En otras cactáceas, como *Aztekium ritteri*, también se reportó la formación de embriones somáticos obtenidos del callo inducido con K/2,4-D 2/2 mgL⁻¹, los cuales proliferaron al subcultivarlos en medio MS basal; sin embargo, éstos no lograron germinar por el crecimiento incontrolado de estructuras lanosas (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992). Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1998) también reportaron en *A. ritteri*, *Turbinicarpus pseudomacrolele*, *Opuntia ficus-indica* y *Mammillaria san-angelensis* las etapas tempranas de la embriogénesis somática. Gomes *et al.* (2006) realizaron la histología de los embriones somáticos de *Opuntia ficus-indica*, donde encontraron los haces vasculares de los embriones como un sistema independiente

a los explantes que los originaron, indicaron que la nutrición de los ES es autónoma a diferencia de los brotes que se nutren del explante o del callo que los origina, además, en los ES el tejido vascular conecta a los meristemas radicular y apical.

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta según la cantidad de ES desarrollados en el callo: la primera es de baja frecuencia puede ocurrir en diversos tipos de callo y se forman pocos ES por cada tipo, se expresan entre las 12 y las 14 semanas de inducción; están aislados o en grupos pequeños y se desarrollan completamente, pasando por las diferentes etapas (globular, corazón, torpedo y maduro o cotiledonar). El otro tipo es de alta frecuencia, donde los ES se expresan entre las 16 y las 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en etapa globular, agrupados en un número mucho mayor, pero en un número menos diverso de callo (Williams y Maheswaran, 1986; Gómez, 1998). En *A. fissuratus* se obtuvo embriogénesis somática de baja frecuencia en las concentraciones de BA 3 y 5 mgL⁻¹ y las características del callo embriogénico obtenido con BA/ANA 3/1 y 5/1 mgL⁻¹ correspondieron al tipo de alta frecuencia ya que se desarrollaron ES en etapa globular, corazón y torpedo simultáneamente y de manera abundante.

Porciones de aproximadamente 1 cm³ del callo embriogénico de *A. fissuratus* se subcultivaron en medio MS. Después de un mes, los ES proliferaron y en un mismo cultivo fue posible observar las diferentes etapas de desarrollo (globular, corazón y torpedo), de forma asincrónica. Los pequeños ES inicialmente fueron hialinos y posteriormente blancos (Fig. 18 a). Éstos aumentaron su volumen y adquirieron forma esférica o de corazón, al mismo tiempo que cambiaron a color verde (Fig. 18 b). Algunos ES se elongaron y fue evidente el desarrollo de la raíz, sin embargo,

éstos entraron en ciclos repetitivos de formación de callo evitando la consolidación de los tejidos del embrión (Fig. 18 c-d).

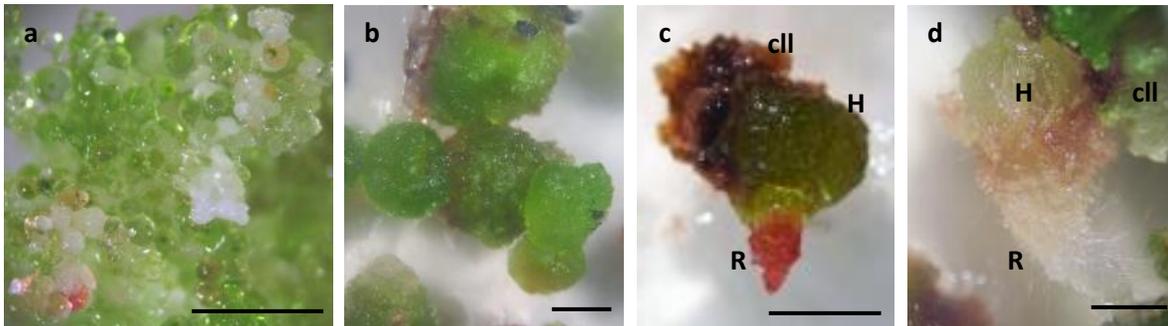


Figura 18. Callo embriogénico de ocho meses cultivado en medio MS (a) y etapas del desarrollo embrionario (b-d) donde el hipocótilo de los ES tuvo síntomas de hiperhidratación. Barra:1 mm
cII- callo, H-hipocótilo, R-radícula

- **Proliferación de los embriones somáticos**

Para promover la proliferación y maduración de los ES se exploraron tres concentraciones de sacarosa (30, 60 y 75 gL⁻¹) en el medio de cultivo. Los carbohidratos pueden tener varias funciones, además de ser una fuente de energía, al elevar su concentración causan un incremento en el potencial osmótico, restringiendo así la disponibilidad de agua en el medio de cultivo y favoreciendo su maduración (Carrier *et al.*, 1997 citado por González, 2014).

Los ES de *A. fissuratus* obtenidos tanto en el control como en los tratamientos con BA/ANA 3/1 y 5/1 mgL⁻¹ proliferaron en mayor cantidad y se desarrollaron con aspecto normal en el medio MS+CA adicionado con sacarosa 75 gL⁻¹.

Durante la primera semana, en las tres concentraciones de sacarosa, se observaron embriones en etapas globular, corazón y torpedo (Fig. 19 a-c). Sin embargo, después de cuatro meses y hasta los ocho, fueron notables las diferencias entre la cantidad y desarrollo de los embriones en las diferentes concentraciones de sacarosa; con 30 gL⁻¹ se formaron pocos embriones que se desarrollaron hasta etapa torpedo y se desorganizaron en callo verde oxidado en la base (Fig. 19 d),

con 60 gL^{-1} se formaron masas blancas de embriones compactos (Fig. 19 e), resultó difícil distinguir las etapas embrionarias además algunos se desorganizaron en callo. Finalmente, con 75 gL^{-1} se desarrollaron masas proembriogénicas y embriones globulares en mayor abundancia (Fig. 19 f) por lo que se determinó que ésta es la mejor concentración para la proliferación de los embriones somáticos.

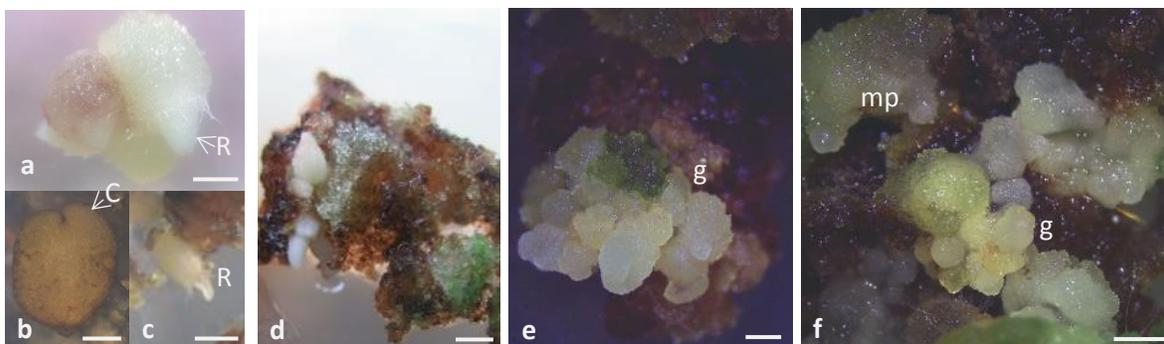


Figura 19. Desarrollo de las diferentes etapas globular, corazón y torpeda (**a,b,c**) de los ES a partir de callo embriogénico sembrado en MS CA con sacarosa $30, 60$ y 75 gL^{-1} con 12 meses de incubación. Se observó el efecto de la sacarosa en el desarrollo y cantidad de ES en etapa globular siendo escasos con 30 gL^{-1} (**d**), medianamente abundantes con 60 gL^{-1} (**e**) y abundantes con 75 gL^{-1} (**f**).
mp-masas proembriogénicas, *g*-globular. Órganos: *R*-radícula, *C*-cotiledones. Barra: 1 mm

Seguido todos los cultivos fueron transferidos a medio MS+CA con sacarosa 75 gL^{-1} para que continuaran proliferando los ES. En la primera semana se oxidó el callo embriogénico pero los ES comenzaron a germinar a partir de los cinco días (Fig. 20 a), proliferaron entre 15 días (Fig. 20 b) y 30 días (Fig. 20 c). Se mantuvieron los cultivos en frascos (Fig. 20 d), proliferaron ES hasta cubrir la superficie del medio de cultivo en tres meses (Fig. 20 e).

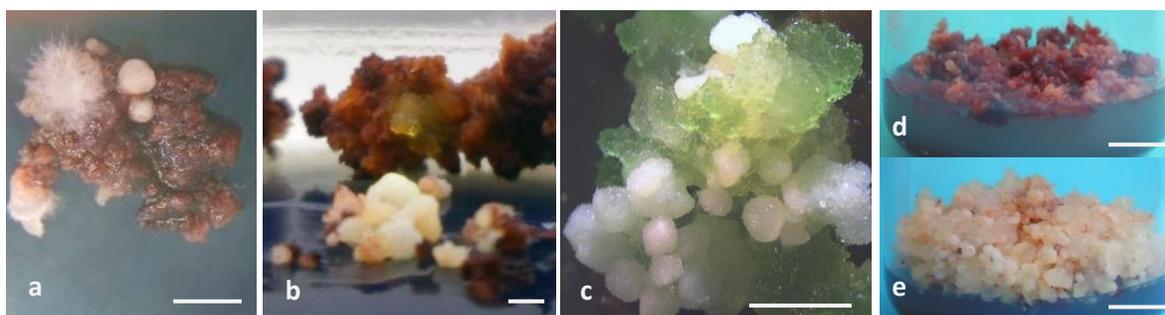


Figura 20. Callo embriogénico de 17 meses en medio MS+CA y sacarosa 75 gL^{-1} . Inicialmente el callo embriogénico se oxidó y germinaron un par de embriones (**a,b**), posteriormente se desarrolló callo verde desmenuzable húmedo y dio origen a estructuras embriogénicas (**c**). Barra:1mm. Los cultivos en frascos se oxidaron al momento del subcultivo (**d**), pero después de tres meses proliferaron los ES (**e**). Barra: 2 cm

Thorpe *et al.* (1972, 1973 y 1974) citados por Debergh *et al.* (1981) probaron que los carbohidratos son necesarios para los procesos que requieren alta energía como la formación de brotes o los embriones somáticos y enfatizan su papel osmorregulador en el medio de cultivo. Es por eso que los ES de *A. fissuratus* se desarrollaron en mayor abundancia a partir de las masas proembriogénicas en el medio adicionado con sacarosa 75 gL⁻¹ y evitaron su oxidación con CA 2 gL⁻¹. En *Carica papaya* (Caricaceae) se demostró que con sacarosa al 7% (70 gL⁻¹) se mejoró la embriogénesis somática y en *Gentiana kurroo* (Gentianaceae) el medio suplementado con sacarosa 0.2-0.4% estimuló la eficiencia del aparato fotosintético de los embriones somáticos (Fitch *et al.*, 1993 y Rybczyński *et al.*, 2007 citados por Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

- **Maduración de los embriones somáticos**

Para promover la maduración de los embriones somáticos y obtener plántulas regeneradas *in vitro* de *A. fissuratus*, el medio MS se complementó con ácido giberélico y/o ácido abscísico (tratamientos presentados en la Tabla 3). Las giberelinas promueven la germinación de las semillas pues regulan la ruptura de la latencia embrionaria, *in vitro* la adición de GA promueve el proceso de regeneración y la germinación de los embriones somáticos. El ácido abscísico cuando suplementa el medio cultivo inhibe la germinación precoz y coordina la maduración de los embriones somáticos (Gómez, 1998; Razdan, 2003; Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012).

El callo en el que maduraron los ES de *A. fissuratus* presentó diferentes características morfológicas y de coloración (Fig. 21), distinguiendo tres tipos:

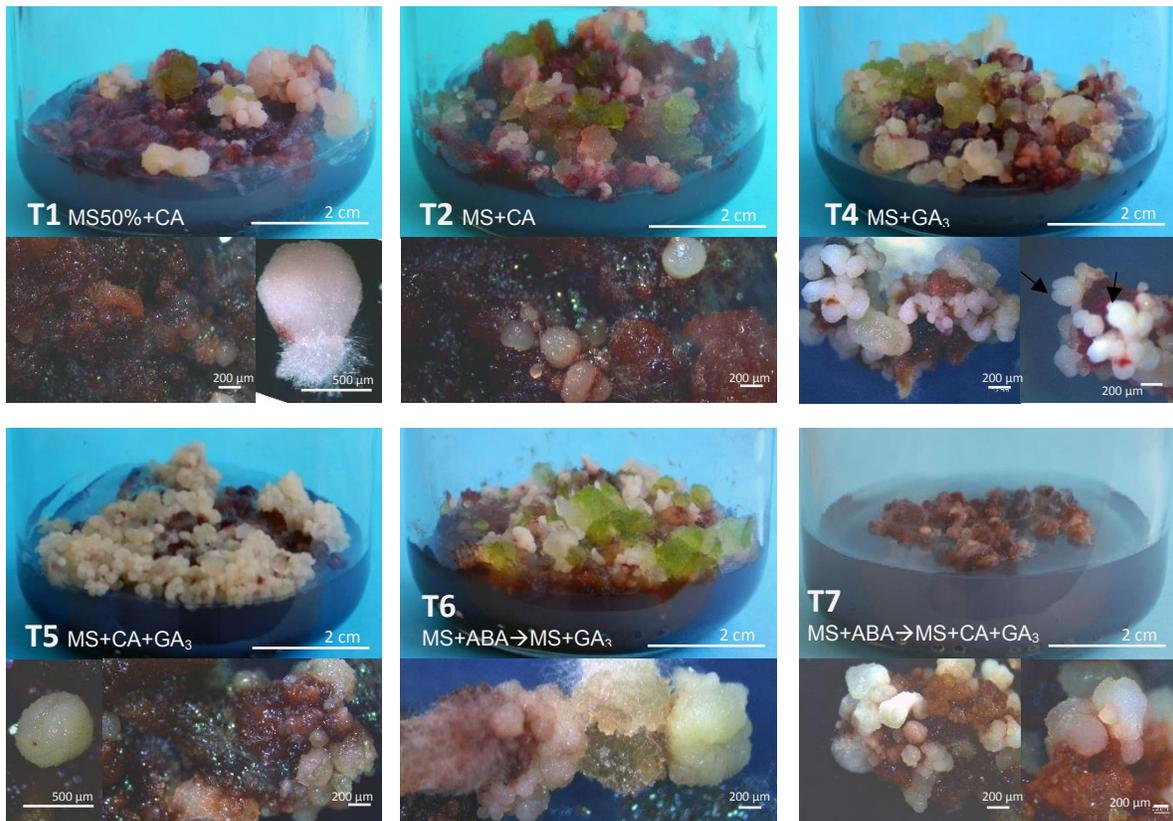


Figura 21. Aspecto del callo en los diferentes tratamientos de maduración de los ES con ABA, GA₃ y CA. El callo presentó diferentes características morfológicas y de coloración. En los cultivos en los tratamientos T1 y T2 predominó el callo oxidado y escasos ES globulares. Los cultivos en MS+ABA (T3) se perdieron por contaminación. Los cultivos de T4 y T6 tuvieron callo verde y algunas zonas rojizo con ES en diferentes estados de desarrollo, sin embargo, los tejidos de los embriones estuvieron más organizados en el tratamiento T4 respecto a todos los demás, logrando desarrollar ES en corazón (flechas). Y en los cultivos T5 y T7 prevaleció el callo rojo intenso con mayor abundancia de ES globulares que en T1 y T2.

Callo rojo intenso (CRI). Se encontró en contacto con el medio de cultivo con coloración rojiza muy intensa que pudo haber derivado de la oxidación. Presentaba una gran cantidad de estructuras globulares blancas que se definieron como el primer estado de los ES, fue el tipo de callo más abundante.

Callo rojo (CR). Presentó una coloración rojiza, sin contacto con el medio de cultivo y asociado con callo hialino o callo verde olivo, se observó el desarrollo asincrónico de los ES ya que había etapas globulares y de corazón.

Callo verde olivo (CVO). Se desarrollaron ES en estados globular corazón y torpedo, a partir de esta etapa la mayoría de los embriones se desdiferenciaron formando nuevamente callo verde intenso.

La morfología de los callos embriogénicos en este trabajo coincide con la reportada por Olguín (1994) para *A. retusus*, en donde se observó callo desmenuzable, de color verde claro y con zonas donde el tejido estaba oxidado, en estas zonas se daba la mayor presencia de los embriones y se encontraban más desarrollados. De la misma manera se observaron similitudes con lo reportado por Stuppy y Nagl (1992) en cuanto a la procedencia por embriogénesis somática indirecta, el desarrollo de los ES y los tipos de callo embriogénico.

Tanto Stuppy y Nagl (1992) como Olguín (1994) reportaron que fueron pocos los ES en etapa globular que lograron desarrollarse normalmente hasta germinar en plántulas, ya que se desdiferenciaban dando lugar nuevamente a callo, a pesar de esto la embriogénesis somática tiene la ventaja de obtener estructuras bipolares con meristemas apical y radicular, y se obtienen en mayor cantidad que los brotes (tallos sin raíces) generados vía organogénesis.

- **Germinación de los embriones somáticos**

En *Ariocarpus retusus* (Stuppy y Nagl, 1992) se reportó la germinación de los embriones somáticos en medio MS incrementando la concentración de agar a 10 gL⁻¹; en estas mismas condiciones los ES obtenidos en *A. fissuratus* no germinaron por lo que para promover su germinación se utilizó Phytigel® como agente gelificante y la adición de carbón activado.

La presencia del carbón activado favoreció la proliferación y posterior desarrollo de los ES, evitando que se desorganizaran más rápidamente en callo (Fig. 22 A) como ocurrió con los ES en ausencia de él (Fig. 22 B). Los beneficios del carbón activado se deben a sus propiedades de adsorción, ya que tiene una fina red de poros en la que se concentran las sustancias tóxicas, los inhibidores y los exudados fenólicos

que liberan los tejidos cultivados; además oscurece el medio de cultivo y libera reguladores del crecimiento y nutrientes de manera paulatina (Razdan, 2003; Thomas, 2008).

Muchos ES pasaron de la etapa globular a la etapa de corazón, adquirieron coloración verde y se elongaron (Fig. 22), pero al hiperhidratarse resultó difícil identificar si alcanzaban etapas posteriores del desarrollo, e impidiendo determinar el momento en que éstos germinaban.

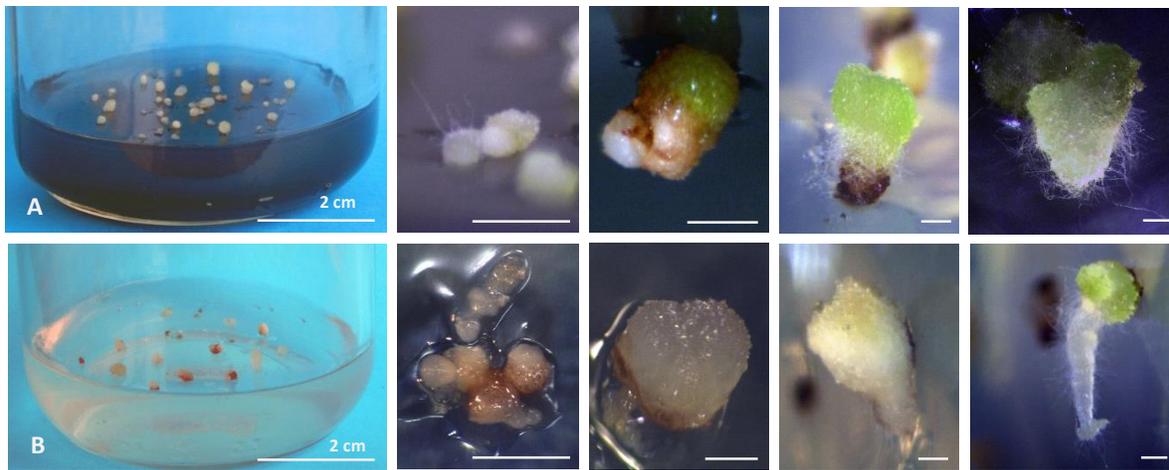


Figura 22. Cultivo de ES para promover su germinación con Phytigel® 5 gL⁻¹ con y sin CA. La presencia del carbón activado favoreció la proliferación de los ES y evitó su oxidación (A), sin carbón activado los tejidos se desorganizaron más rápido (B). Los ES globulares se alargaron y adquirieron coloración verde, sin embargo, la hiperhidratación limitó su desarrollo hacia etapas embrionarias posteriores, así como su capacidad para germinar. Barra: 500 μm

El agar es el agente gelificante más común en el cultivo *in vitro*, contribuye con el potencial mátrico y la humedad relativa, regula la disponibilidad de agua, nutrientes y reguladores de crecimiento disueltos en el medio de cultivo (Debergh *et al.*, 1981).

Las respuestas de las plantas cultivadas con otro agente gelificante como sustituto del agar depende de las concentraciones usadas y la especie vegetal (Ziv, 1991).

El uso de Phytigel® (5 gL⁻¹) en *A. fissuratus* no favoreció la germinación de los ES ya que continuaron con los síntomas de hiperhidratación desencadenando su desarrollo en callo que pudo o no ser embriogénico. En *Turbinicarpus*

pseudomacrochele fue posible germinar embriones somáticos después de cuatro meses usando medio basal y 5 gL⁻¹ de Phytigel® y desarrollando plántulas con morfología normal (Torrez-Muñoz y Rodríguez-Garay, 1996).

La falta de germinación de los ES en *A. fissuratus* pudo deberse a anomalías en los meristemas, no ser funcionales o tener una organización parcial. Si alguno de los meristemas del embrión no está desarrollado, no puede formar al resto del cuerpo (Dodeman *et al.*, 1997; Singh y Chaturvedi, 2009). La germinación de los embriones somáticos depende de la disponibilidad de agua en el cultivo, determinado por el potencial hídrico y el potencial mátrico, ambos regulados por los solutos y los agentes gelificantes (Ziv, 1991).

- **Histología de los embriones somáticos**

Los embriones somáticos tienen características morfológicas y fisiológicas similares a los embriones cigóticos, son estructuras bipolares con un sistema vascular. Con base en estudios histológicos su origen puede ser unicelular donde la masa proembriogénica que forma a los ES procede de la segmentación de una sola célula; o multicelular, cuando varias células se segmentan, terminan fusionándose y forman una sola masa proembriogénica. Las diferentes estructuras embrionarias son compactas, nodulares y de color blanco o amarillo cremoso (Schumann *et al.*, 1995; Gómez, 1998).

La primera etapa de la embriogénesis identificada fue la globular, en los cultivos de *A. fissuratus*, ésta estuvo asociada principalmente a la base del callo que estaba en contacto con el medio y se presentó en los tres tipos de callo (CRI, CR y CVO), se diferenciaron a partir de las masas proembriogénicas que tenían un aspecto blanco y hialino hasta formar pequeñas estructuras esféricas blancas.

Histológicamente en la etapa globular se pudo observar la protodermis rodeando a cada embrión (Fig. 23 a), los embriones solitarios estaban formados por células pequeñas de tamaño uniforme y citoplasma denso, a diferencia de las células del callo que fueron mucho más grandes y con enormes espacios intercelulares (Fig. 23 b,c), en la protodermis se observaron zonas con divisiones anticlinales y periclinales, grandes vacuolas y con núcleos densos (Fig. 23 d). Cuando el cuerpo del embrión incrementó su tamaño se distinguieron los polos radicular y apical, sin ser aún evidentes los cotiledones, se observó el procambium formado por células pequeñas alargadas con núcleos densos (Fig. 23 e,f). En el polo apical no hay un meristemo bien definido, pero se observaron por debajo de la protodermis algunas células meristemáticas que se caracterizan por ser pequeñas y con núcleos grandes (Fig. 23 g); en la región media del embrión que correspondería al hipocótilo, se detectó el procambium constituido por células alargadas de núcleos grandes (Fig. 23 h); el polo radicular presentó un grupo de células más organizadas, que pudiese dar lugar al meristemo radicular (Fig. 23 i).

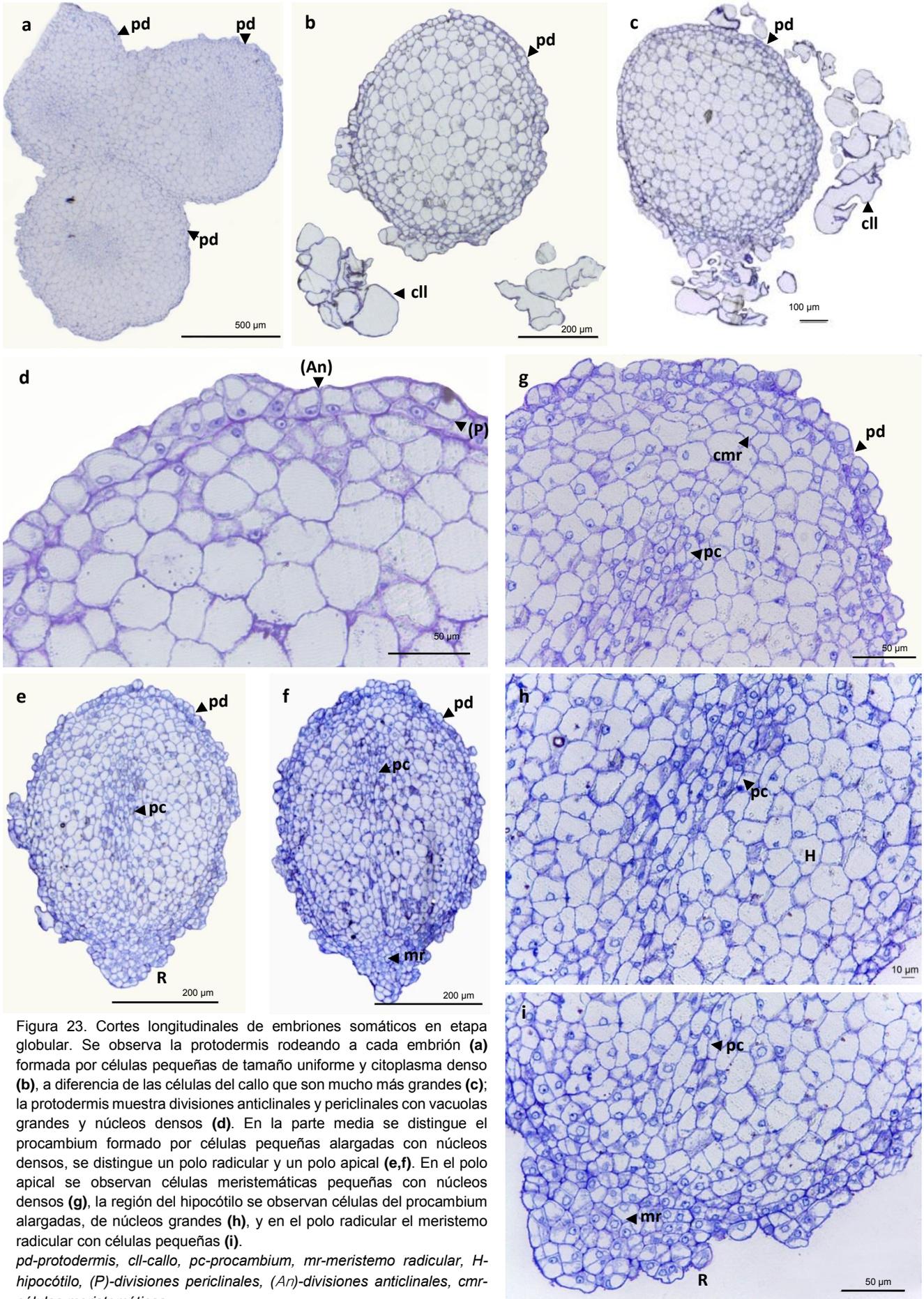


Figura 23. Cortes longitudinales de embriones somáticos en etapa globular. Se observa la protodermis rodeando a cada embrión (a) formada por células pequeñas de tamaño uniforme y citoplasma denso (b), a diferencia de las células del callo que son mucho más grandes (c); la protodermis muestra divisiones anticlinales y periclinales con vacuolas grandes y núcleos densos (d). En la parte media se distingue el procambium formado por células pequeñas alargadas con núcleos densos, se distingue un polo radicular y un polo apical (e,f). En el polo apical se observan células meristemáticas pequeñas con núcleos densos (g), la región del hipocótilo se observan células del procambium alargadas, de núcleos grandes (h), y en el polo radicular el meristemo radicular con células pequeñas (i).
pd-protodermis, *cli*-callo, *pc*-procambium, *mr*-meristemo radicular, *H*-hipocótilo, *(P)*-divisiones periclinales, *(An)*-divisiones anticlinales, *cmr*-células meristemáticas.

En embriones en etapa de corazón se observaron apenas en formación los cotiledones, en el centro de éstos se distingue una pequeña región con células isodiamétricas diminutas (Fig. 24 a), el cuerpo del embrión no fue del todo esférico, se observaron trazas de haces vasculares a lo largo del cuerpo del embrión (Fig. 24 b), no fue posible distinguir un meristemo bien delimitado, pero sí una zona con características meristemáticas en el ápice del embrión. En la zona de la radícula, se observó una zona meristemática más teñida con células isodiamétricas, de núcleos grandes y citoplasma denso (Fig. 24 c). En algunos cortes de embriones se evidenciaron los síntomas de hiperhidratación en los que se comenzaba a desorganizar el ápice (Fig. 24 d), mientras que el polo radicular se mantenía organizado con el meristemo y los haces vasculares (Fig. 24 e).

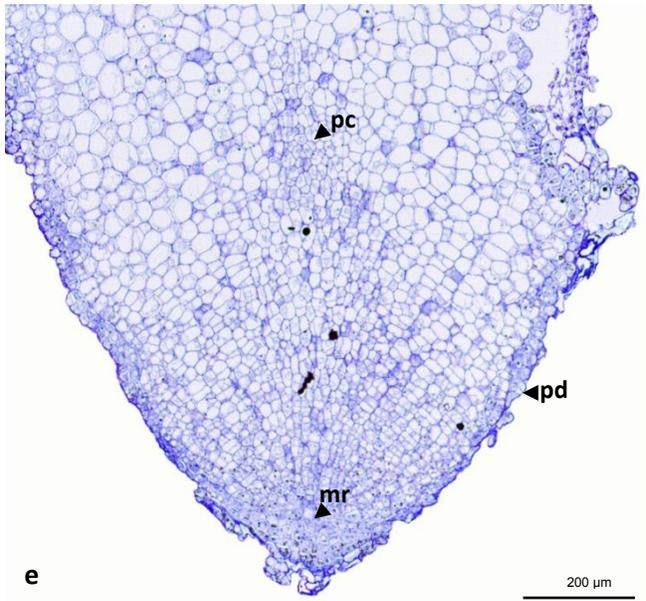
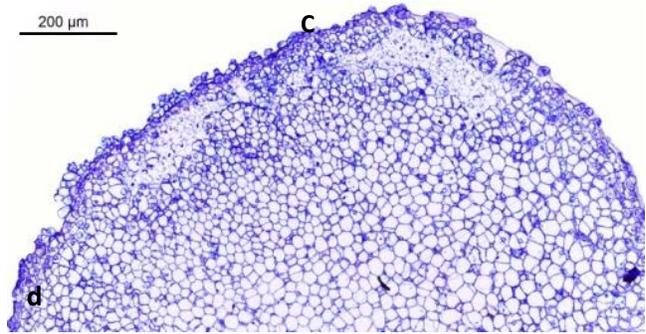
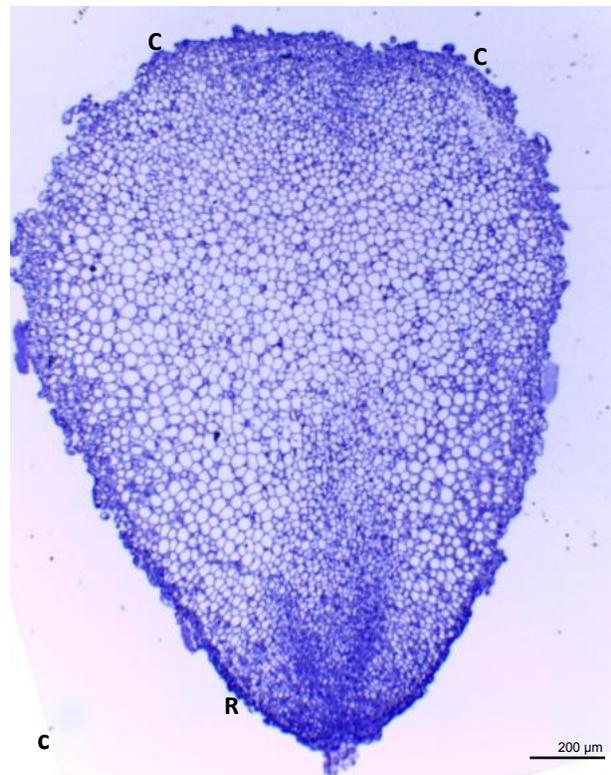
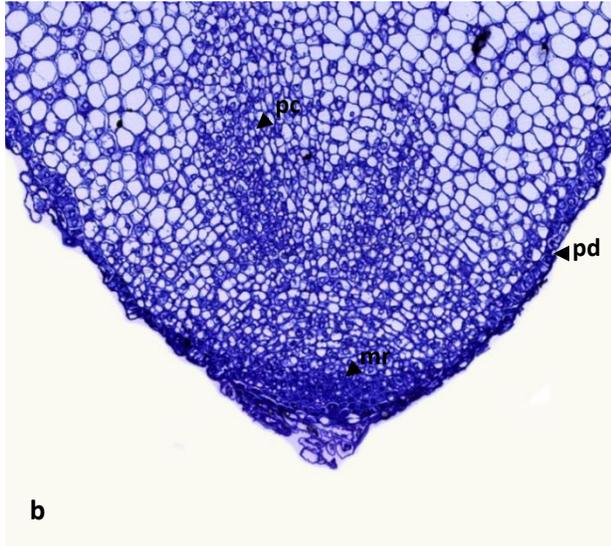
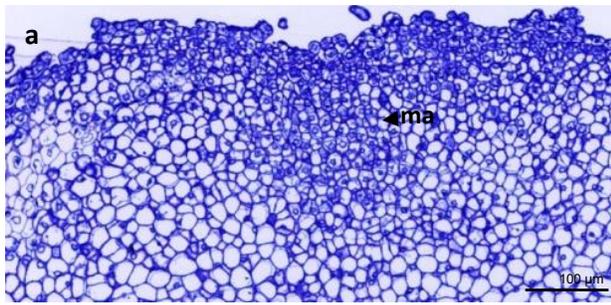


Figura 24. Cortes longitudinales de embriones somáticos en etapa de corazón. Se observan los polos apical (a) y radicular (b), en el polo apical se distingue una zona más densa conformado de pequeñas células isodiamétricas característico de una zona meristemática así como los cotiledones en desarrollo, y en el polo radicular trazas de haces vasculares y una zona meristemática en la radícula (c). Los embriones hiperhidratados no mostraron organización de los tejidos en la región apical y al costado del hipocótilo (d,e).

pd-protodermis, pc-procambium, mr-meristemo radicular, ma-meristemo apical, C-cotiledón

Los embriones en etapa de torpedo tienen cotiledones más diferenciados, el hipocótilo alargado y tejido vascular desde la raíz hasta los cotiledones, la epidermis no tuvo continuidad, debido a la hiperhidratación de los tejidos de los embriones *in vitro* (Fig. 25 a,b); la mayoría de los embriones de esta etapa presentaron sus tejidos desorganizados por la hiperhidratación observándose las células con amplios espacios intercelulares (Fig. 25 c), se observaron lo que posiblemente eran traqueidas de banda ancha (TBS's) (Fig. 25 d) cuyas paredes secundarias anulares fueron como las descritas por Garrett *et al.* (2010) y Loza-Cornejo y Terrazas (2011), la radícula mostró células iniciales de la caliptra y lisis de las células más externas de la misma (Fig. 25 e).

En la familia Cactaceae se ha reportado la embriogénesis somática o embrionía adventicia a partir de la nucela (*Mammillaria*, *Opuntia*, *Pereskia*) o de tejidos cercanos al cigoto (*Cereus jamacaru*), muchas veces el embrión cigótico degenera y el embrión de la semilla proviene de algún tejido somático, incluso a veces a partir de la fusión de masas embriogénicas se forman embriones con tres y cinco cotiledones; la embriogénesis sexual y la nucelar es comparable (Johri *et al.*, 1992). La embriogénesis somática es la máxima expresión de la totipotencialidad de las células vegetales, es la habilidad de las células de llevar a cabo una serie de etapas coordinadas del metabolismo y la morfología para producir una planta completa o esporofito normal sin la participación de los procesos sexuales. Sin embargo, identificar las condiciones *in vitro* óptimas es muy difícil debido a la amplia variedad de factores que contribuyen a la inducción, desarrollo y conversión de los embriones somáticos en plantas (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2012), incluidos el genotipo de la planta, el tipo y estado fisiológico del explante (Gómez, 1998).

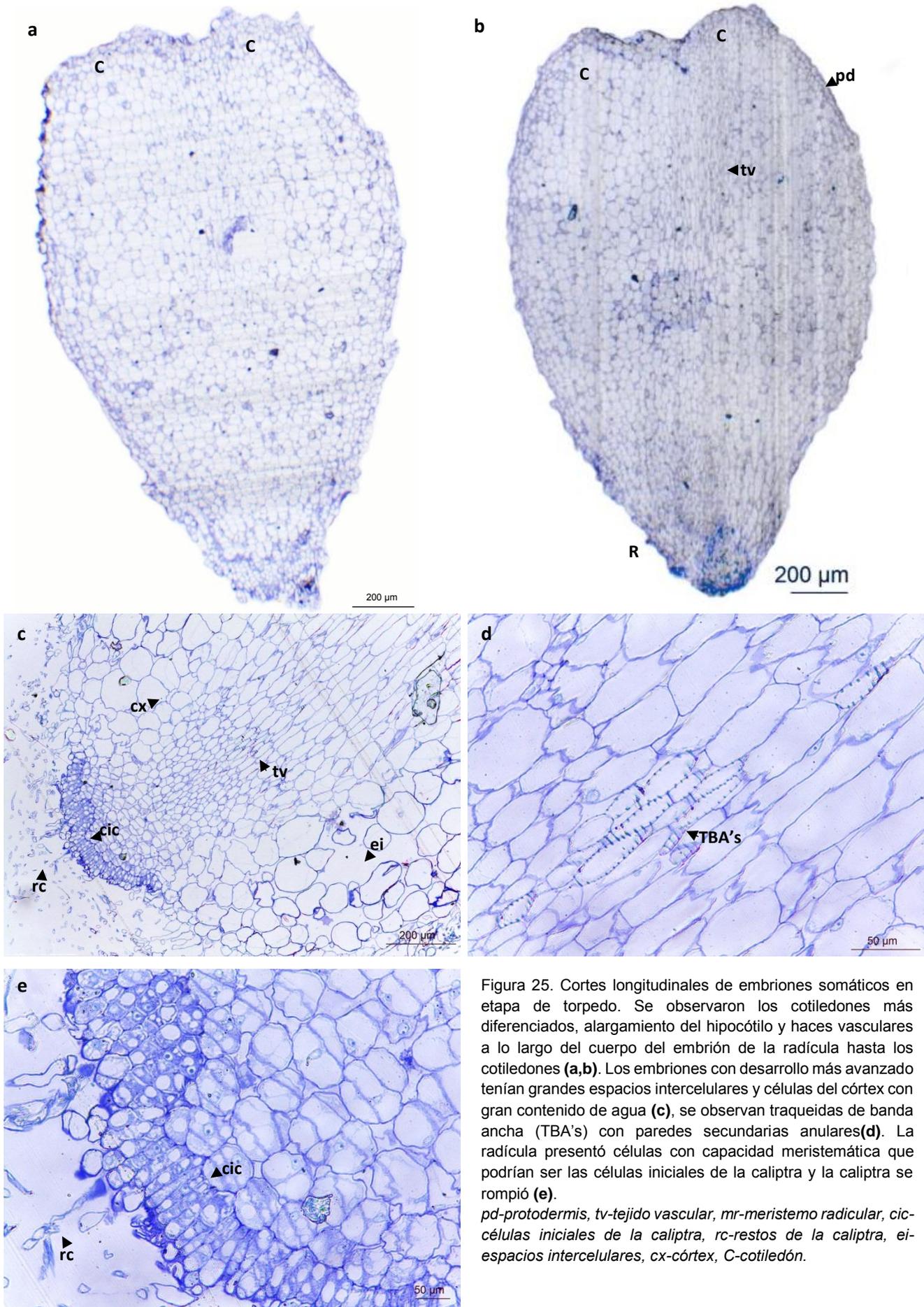


Figura 25. Cortes longitudinales de embriones somáticos en etapa de torpedo. Se observaron los cotiledones más diferenciados, alargamiento del hipocótilo y haces vasculares a lo largo del cuerpo del embrión de la radícula hasta los cotiledones (a,b). Los embriones con desarrollo más avanzado tenían grandes espacios intercelulares y células del córtex con gran contenido de agua (c), se observan traqueidas de banda ancha (TBA's) con paredes secundarias anulares(d). La radícula presentó células con capacidad meristemática que podrían ser las células iniciales de la caliptra y la caliptra se rompió (e).
pd-protodermis, tv-tejido vascular, mr-meristemo radicular, cic-células iniciales de la caliptra, rc-restos de la caliptra, ei-espacios intercelulares, cx-córtex, C-cotiledón.

Las embriogénesis en cactáceas ha sido una respuesta morfogenética difícil de dirigir y en la mayoría de los casos ha sido una expresión espontánea por multifactores, por lo que es necesario llevar a cabo más investigaciones y desarrollar estrategias para conocer y lograr su proliferación y maduración. En el caso del género *Ariocarpus*, en los trabajos reportados no se ha logrado establecer una técnica que sea repetible y son pocas las plántulas que se han obtenido por esta vía. Este trabajo es una aportación importante para esta especie que aun así es una opción factible que no hay que abandonar y buscar opciones para logrado como probablemente el establecimiento de cultivos en suspensión para obtener la maduración y germinación para llevar las plántulas a un estado adulto.

El futuro de los recursos naturales depende de la capacidad que se tenga para revertir el proceso de saqueo de especies silvestres, convirtiendo el gusto de la colección de estas plantas por mecanismos que impliquen su protección, conservación y cultivo *ex situ*. Los estudios desarrollados sobre aspectos de la germinación y técnicas de propagación masiva, podrían disminuir la demanda de ejemplares silvestres y por lo tanto favorecer la conservación de las especies.

El cultivo *in vitro* de *Ariocarpus fissuratus* representó dificultades inherentes a la biología de la especie principalmente. Debido a que en la propagación *in vitro* y el establecimiento aséptico de los cultivos preferentemente se inicia a partir de semillas, resultó importante estudiar los aspectos relacionados con la germinación, la viabilidad y el tiempo de almacenamiento. En esta especie se corroboró que, además de ser necesario romper la latencia con métodos químicos, éstas requieren un periodo de postmaduración de aproximadamente dos años para obtener un mayor porcentaje de semillas germinadas. A esto se suma el lento crecimiento y el

tiempo que requieren las plántulas para alcanzar la talla mínima para la obtención de los explantes, además de la ubicación de los puntos meristemáticos, restringidos a la parte superior de la plántula (meristemo apical y ápice de los tubérculos) que es la última en desarrollarse, a diferencia de otras cactáceas como el género *Mammillaria* que los presentan en todo el tallo. *A. fissuratus*, a diferencia de otras especies del mismo género, tuvo una escasa respuesta a la formación de brotes (tallos sin raíces) vía organogénesis, sin embargo, mostró un mayor potencial regenerativo vía embriogénesis somática, ruta que en cultivo de tejidos se prefiere por obtener estructuras bipolares que incluyen ambos meristemas (apical y radicular) y puede ser más prolífica, siempre y cuando se logre la maduración y germinación de los embriones somáticos en plántulas.

CONCLUSIONES

- El tiempo de almacenamiento influyó en el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *A. fissuratus*. El mayor porcentaje (86.7%) se obtuvo en semillas almacenadas por 2 años, lo que corrobora que éstas requieren un periodo de postmaduración. Los menores porcentajes se obtuvieron en semillas almacenadas un año (31.1%) y con 6 años de almacenamiento (3.3%).
- Las plántulas cultivadas en medio MS sólido tardaron 12 meses en alcanzar 1 cm de longitud para la obtención de explantes. Una estrategia para acortar el tiempo es transferir plántulas de 20 días de edad a medio líquido MS+CA (1.5 gL⁻¹) con puentes de papel filtro para alcanzar la misma talla en menor tiempo (25 días).
- La hiperhidratación de las plántulas se controló incrementando la concentración de agar en el medio MS de 8 a 8.5 gL⁻¹ y empleando CA 1.5 gL⁻¹.

- La formación de brotes ocurrió por organogénesis indirecta a partir del callo obtenido de tubérculos en BA/ANA 3/0.5 mgL⁻¹ después de once meses de cultivo. Sólo se obtuvieron tres brotes, de los cuales sobrevivió uno y no enraizó.
- La embriogénesis somática se indujo en el tratamiento control y los tratamientos con BA 3 y 5 mgL⁻¹ y BA/ANA 3/1 y 5/1 mgL⁻¹ después de siete meses de cultivo, y se expresó en medio MS basal + CA 2 gL⁻¹.
- La respuesta organogénica o embriogénica en los explantes cultivados con K/2,4-D fue nula.
- Los embriones somáticos proliferaron y mantuvieron sus tejidos más organizados en medio MS adicionado con sacarosa 75 gL⁻¹. La oxidación del callo embriogénico se evitó adicionando a este medio CA 2 gL⁻¹.
- El desarrollo de los embriones somáticos en los cultivos fue asincrónico observándose al mismo tiempo diferentes etapas (globular, corazón y torpedo).
- Los cortes histológicos demostraron la bipolaridad de las estructuras embrionarias, observándose células meristemáticas en la región apical y de la raíz, así como un sistema vascular en desarrollo e independiente del callo que los originó.
- Los embriones somáticos comenzaron a germinar en el medio de cultivo, sin embargo, éstos entraron en ciclos repetitivos de formación de callo y más embriones somáticos.
- *Ariocarpus fissuratus* demostró su potencial regenerativo *in vitro*. Si bien éste fue prácticamente nulo vía organogénesis, la ruta más factible para su propagación *in vitro* puede ser la embriogénesis somática, una vez que se logre su germinación y establecimiento *ex vitro*.

ANEXO I

***Ariocarpus fissuratus* (Engelmann) Schumann, 1984** (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991)

Plantas que se elevan escasamente de la superficie del suelo, subglobosas, con el ápice aplanado o algo convexo, hasta de 15 cm de diámetro; de color verde grisáceo o verde pardusco. **Tubérculos** imbricados, grandes, triangulares, de 20 a 30 mm de anchura en la base, con la punta más o menos redondeada hasta aguda y la superficie aplanada o algo convexa, con fisuras numerosas, irregulares, con un surco longitudinal, lanoso, de 10 a 15 mm de longitud y 3 a 4 mm de anchura. **Aréola** florífera en la base del surco areolar. **Flores** brotando de la región florífera basal del surco de los tubérculos jóvenes del ápice, de 3 a 4 cm de diámetro, de color blanco hasta purpúreo. **Fruto** ovoide, de color verde pálido, de 10 mm de longitud. **Semillas** tuberculado-rugosas, negras.

- **Clasificación taxonómica (Guzmán *et al.*, 2007)**

Reino Plantae Haeckel, 1866

División Magnoliophyta Cronquist, Takht. & Zimmerm., 1966

Clase Magnoliopsida Cronquist, Takht. & Zimmerm., 1966

Orden Caryophyllales

Familia Cactaceae Juss., 1789

Subfamilia Cactoideae Eaton, 1836

Género *Ariocarpus* Scheidw., 1838

Especie *Ariocarpus fissuratus* (Engelmann) K. Schumann, 1894

ANEXO II

Medio de Cultivo Murashige y Skoog (MS), 1962.

COMPONENTES	mgL⁻¹
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
Micronutrientes	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FE-EDTA	
Na ₂ -EDTA	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Compuestos orgánicos	
Myo-Inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl (B ₆)	0.5
Tiamina-HCl (B ₁)	0.1
Glicina	2.0
Fuente de carbono	
Sacarosa	30 gL ⁻¹

pH 5.7-5.8

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal S., K. Kanwar y D. Sharma. 2004. Factors affecting secondary embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. *Scientia Horticulturae* 102: 359- 368.
- Aguilar-Morales G., C. Martínez-Peralta, T. Feria-Arroyo, J. Golubov y M.C. Mandujano. 2011. Distribución geográfica del género *Ariocarpus* Scheidweiler (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 56(2): 49-63.
- Alanís F.G. y C.G. Velazco. 2008. Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noroeste de México. *Ciencia UANL* 11(1):5-11.
- Al-Atabee J.S. y J.B. Power. 1990. Control of Vitrification and *In Vitro* Flowering of Plantlets Regenerated from Callus of *Dimorphotheca aurantiaca* (Compositae). *Journal of Plant Physiology* 136: 705-709.
- Alegria I. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). Investigación Agraria. *Producción y Protección Vegetal* 16(1): 5-24.
- Anderson E. 2001. The Cactus Family. Timber Press. Portland, Oregon, USA 776 pp.
- Arakaki M., P.A. Christin, R. Nyffeler, A. Lendel, U. Eggli, R.M. Ogburn, E. Spriggs, M.J. Moore y E.J. Edwards. 2011. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(20):8379-8384.
- Arias S., U. Guzmán, M.C. Mandujano, M. Soto y J. Golubov. 2005. Las especies Mexicanas de Cactáceas en riesgo de extinción: una comparación entre los listados NOM-ECOL-2001 (México), la lista roja (UICN) y CITES. *Cactáceas Suculentas Mexicanas* 50:100-125.
- Arredondo G.A., A. Rocha y J. Flores. 2007. Rompimiento de latencia en semillas de cinco especies de cactáceas del Desierto Chihuahuense. Campo experimental San Luis. CIRNE-INIFAP- San Luis Potosí, México. Folleto Técnico No. 32. 19 pp.
- Arredondo G.A. 2008. Nuevas técnicas para el rompimiento de la latencia en semillas de cactáceas, no agresivas al productor. Campo experimental San Luis. CIRNE-INIFAP- San Luis Potosí, México. Folleto Técnico. 28 pp.
- Azcona C.A. 2009. Organogénesis directa de *Melocactus curvispinus* subsp. *dawsonii* (Bravo) N.P. Taylor, 1991 a partir de explantes de tallo, y germinación *in vitro* de *Mammillaria haageana* subsp. *elegans* D.R. Hunt, 1997. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. México. 48 pp.
- Azofeifa Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Baskin C.C. y J.M. Baskin. 2005. Seed Dormancy in Wild Flowers. En: McDonald, M. B. y F. Y. Kwong (Eds.). *Flower Seeds: Biology and Technology*. CABI. p: 163-181.
- Baskin C.C. y J.M. Baskin. 2014. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier Inc. 1600 pp.
- Batis A. y M. Rojas. 2002. El peyote y otros cactus alucinógenos de México. CONABIO. *Biodiversitas* 40: 12-17.
- Bautista M.E. 2016. Propagación *in vitro* de *Mammillaria humboldtii* Ehrenb. (Cactaceae), especie endémica amenazada. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 85 pp.
- Benítez H. y P. Dávila. 2002. Las cactáceas mexicanas en el contexto de la CITES. CONABIO. *Biodiversitas* 40: 8-11.
- Benson E.E. 2000. Special Symposium: *In vitro* plant recalcitrance. Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant* 36:163-170.
- Bewley J.D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9:1055-1066.
- Bewley J.D., K. Bradford, H. Hilshorst y H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer. 392 pp.
- Bhojwani S.S. y M.K. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier. Amsterdam. 766 pp.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las Cactáceas de México. Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. p: 252-263.
- Bregman R. y F. Bouman. 1983. Seed germination in Cactaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 86(4): 357-374.
- Castro-Gallo I., E. Meza-Rangel, M. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2002. Propagación *in vitro* de 10 especies mexicanas de cactáceas. *Scientiae Naturae* 4(2): 5-24.

- Chávez V. 1993. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado (Doctorado en Ciencias (Biología)). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 148 pp.
- Chawla H.S. 2009. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers. USA, New Hampshire. 715 pp.
- Chong C., B. Bible y Hak-Yoon Ju. 2001. Germination and emergence. En: M. Pessarakli (Ed.). Handbook of plant and crop physiology. 2a. ed. New York: Marcel Dekker Inc, p.85-146.
- Choreño-Tapia, J.M., H. González-Rosas, T. Terrazas-Salgado y A. Hernández-Livera. 2002. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8(2): 183-196.
- CITES. 2013. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Apéndices I, II y III. 47 pp. Página en red: <https://cites.org/sites/default/files/esp/app/2013/S-Appendices-2013-06-12.pdf>
- Comparán S. y M. Carranza. 2009. Germinación *In vitro* de tres especies del género *Mammillaria* endémicas de Coahuila, México. Libro Científico Anual Agricultura, Ganadería y Ciencia Forestal UAAAN-2007. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 281-286 p.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2012. Página en red: <http://www.conabio.gob.mx/> Consultada 15 septiembre 2012.
- Cushman J.C. y H.J. Bohnert. 1997. Molecular Genetics of Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiology* 113:667-676.
- Debergh P., Y. Harbaoui y R. Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiologia Plantarum* 53: 181-187.
- Diagre D. 2004. Michael Scheidweiler y Henri Galeotti: los padres del género *Ariocarpus* (CACTACEAE). *Elementos: ciencia y cultura* 11(54): 53-60.
- Dodeman V., G. Ducreux y M. Kreis. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48(313): 1493- 1509.
- Doria J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales* 13(1):74-85.
- Fay M.F. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and other succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10: 33-48.
- Fay M.F. 1994. In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3: 176-183.
- Fitz B., M. Sotomayor, M. Terry, K. Heil, W.A. Fitz, H.M. Hernández y R. Corral-Díaz. 2013. *Ariocarpus fissuratus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T152093A596380. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T152093A596380.en>. Consultado el 10 de noviembre 2016.
- Flores J., E. Jurado y A. Arredondo. 2006. Effect of light on germination of seeds of *Cactaceae* from the Chihuahuan Desert, Mexico. *Seed Science Research* 16: 149–155.
- Flores J., E. Jurado y J. Jiménez-Bremont. 2008. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology* 23: 43-46.
- Flores J. y E. Jurado. 2011. Germinación de especies de cactáceas en categoría de riesgo del Desierto Chihuahuense. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2(8): 59-69.
- Furst P.T. 1971. *Ariocarpus retusus*, the “false peyote” of Huichol tradition. *Economic Botany* 25(2): 182-187.
- Garrett T., C.V. Huynh y G. North. 2010. Root contraction helps protect the “living rock” cactus *Ariocarpus fissuratus* from lethal high temperatures when growing in rocky soil. *American Journal Botany* 97(12): 1951-1960.
- Gilbert S. F. 2003. Developmental Biology. 7ª Ed. Sinauer Associates Inc. USA. 838 pp.
- Gomes F., F. Heredia, P. Silva, O. Facó y F. Campos. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. (Cactaceae). *Scientia Horticulturae* 108: 15- 21.
- Gómez R.J. 2008. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus*, Hernández y Anderson (CACTACEAE), especie endémica mexicana en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 71 pp.
- Gómez R.K. 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez-Ponce J.N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba, pp: 57-79.

- González O., M.M. 2014. Maduración y germinación de embriones somáticos de Linaloe *in vitro* y *ex vitro*. Tesis de Maestra en Ciencias (Postgrado Forestal). Colegio de Postgraduados. Montecillo Texcoco, Estado de México. México. 146 p.
- González-Caballero O., W. Juárez-Pérez, N. Ronquillo-Vázquez, B. Estrada-Galván, P. Heredia-Guzmán, A. Jiménez-Rodríguez, M. Mata-Rosas y V.M. Chávez-Ávila. 2012. El cultivo de Tejidos Vegetales: alternativa de oportunidades para el desarrollo de México. *La vida en la Sierra* 3(1): 5-9.
- Granados-Sánchez D., A. Sánchez-González, R. Granados y A. Borja. 2011. Ecología de la vegetación del Desierto Chihuahuense. *Revista Chapingo-Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 17:11-130.
- Gratton J. y M.F. Fay. 1990. Vegetative Propagation of Cacti and Other Succulents *In Vitro*. En: Pollard J. y J. Walker. *Methods in Molecular Biology*. The Humana Press, pp: 219-225.
- Gutiérrez-Mora A., A. González-Gutiérrez, B. Rodríguez-Garay, A. Ascencio-Cabral y L. Li-Wei. 2012. Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations. En: Ken-Ichi Sato (Ed.), *Embryogenesis*, InTech, p: 229-248.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2003. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. UNAM, CONABIO. México, D.F. 315 pp.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2007. Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. México. 90 pp.
- Hernández H. M. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26: 33-52.
- Jain S.M., P.K. Gupta y R.J. Newton. 1995. Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 2 — Angiosperms. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands 513 pp.
- Jaiwal P.K. y R.P. Singh. 2003. Improvement Strategies of Leguminosae Biotechnology. Volume 10 — Focus on Biotechnology. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 411 pp.
- Jiménez-Sierra C.L., M.L. Matias-Palafox y M.G. Jiménez-Sánchez. 2009. Aspectos demográficos y reproductivos de *Pachycereus weberi* (J.M. Coult) Backeb. (Cactaceae) en una nueva localidad en el Estado de Hidalgo, México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 54(2): 36-47.
- Jofre-Garfias A., A. Nava-Cedillo, G. Hernández-Hernández y J. Simpson. 2010. Micropropagation of *Ariocarpus agavoides* with thidiazuron and DNA variability. *In Vitro and Cellular Developmental Biology-Plant*. Biol. 46 (Suppl 1): S93-S211.
- Johri B.M., K.B. Ambegaokar y P. Srivastava. 1992. Comparative embryology of Angiosperms. Vol. 1 Springer Verlag. Berlin 614 pp.
- Kevers C., M. Coumans, M.F. Couman-Gillès y T. Gaspar. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 61: 69-74.
- Kevers C., T. Franck, R. Strasser, J. Dommès y T. Gaspar. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181-191.
- Koornneef M., L. Bentsink y H. Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. Current Opinion. *Plant Biology* 5: 33-36.
- Lee H., A. Laguna, J. Murguía, L. Iglesias-Andreu, B. García, D. Escobedo, Y. Martínez, F. Barredo y N. Santana. 2010. Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(4): 323-332.
- Lone A., L. Takahashi, R. Faria y L. Unemoto. 2007. Germination of *Melocactus bahiensis* (Cactaceae) in different substrates and temperatures. *Scientia Agraria* 8(4):365-369.
- López-Curto M. de L., J. Márquez- Guzmán y G. Murguía- Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. 2ª Edición. Coordinación de Servicios Editoriales. Facultad de Ciencias UNAM. México. 178 pp.
- López-Escamilla A.L., L.P. Olgún-Santos, J. Márquez-Guzmán y M. López-Herrera. 2008. Establecimiento y propagación *in vitro* de cactáceas mexicanas. En: *Biología de la conservación: uso y manejo de la biodiversidad*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. p: 55-64.
- Loyola-Vargas V.M. 2006. The Components of the Culture Media. En: Loyola-Vargas V. y F. Vázquez-Flota (Eds). *Plant Cell Culture Protocols*. Second Edition. Humana Press Inc. New Jersey p: 369-384.
- Loza-Cornejo S. y T. Terrazas. 2003. Epidermal and hypodermal characteristics in North American Cactoideae (Cactaceae). *Journal of Plant Research* 116: 27-35.

- Loza-Cornejo S., T. Terrazas, L. López-Mata y C. Trejo. 2003. Características morfo-anatómicas y metabolismo fotosintético en plántulas de *Stenocereus queretaroensis* (CACTACEAE): su significado adaptativo. *Interciencia* 28(2): 83-89.
- Loza-Cornejo S. y T. Terrazas. 2011. Morfo-Anatomía de plántulas en especies de Pachycereeae: ¿Hasta cuándo son plántulas? *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 88: 1-13.
- Martínez C. 2007. Biología floral de *Ariocarpus fissuratus* (Engelmann) Schumann (Cactaceae) en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 67 pp.
- Martínez-Peralta C. y M. C. Mandujano. 2011. Reproductive ecology of the endangered living rock cactus, *Ariocarpus fissuratus* (Cactaceae). *The Journal of the Torrey Botanical Society* 138(2): 145–155.
- Mauseth J.D. 1977. Cactus Tissue Culture: A Potential Method of Propagation. *Cactus & Succulent Journal (U.S.)* 49: 80-81.
- Mauseth J.D. 2006. Structure-Function Relationship in Highly Modified Shoots of Cactaceae. *Annals of Botany* 98:901-926.
- McDonald M. B. 2005. Flower Seed Physiology and Plug Germination. En: McDonald, M. B. y F. Y. Kwong (Eds.). *Flower Seeds: Biology and Technology*. CABI. p: 145-162.
- Medel-Narváez A., A. Flores-Hernández, S. Armendáriz-Erives y E. Santamaría-César. 2001. Técnicas de desinfestación y siembra *in vitro* de embriones maduros de falso peyote (*Ariocarpus fissuratus* var. *fissuratus* (Eng.) Schumann), (Cactaceae). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 2(1): 53-59.
- Moebius K.G. 2003. Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) especie amenazada endémica de México. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 76 pp.
- Monteiro Do Rêgo M; E. Rodrigues, E. Ramalho Do Rêgo y J. Pereira. 2009. *In vitro* seed germination of Mandacaru (*Cereus jamacuru* DC.). *Revista Caatinga* 22(4):34-38.
- Mujib A. y J. Šamaj. 2005. Somatic Embryogenesis: Volume 2—Plant Cell Monographs. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 354 pp.
- Murashige T. y F.A. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Murray D.R. 1984. Seed physiology: Germination and Seed Mobilization. Academic Press. 310 pp.
- Niembro R.A. 1989. Semillas de plantas leñosas. Morfología comparada. Ed. Limusa. México, D.F. 224 pp.
- Nobel P. 2002. Cacti: Biology and Uses. University of California Press. Los Angeles, California, USA. 280 pp.
- Oldfield S. (comp.). 1997. Cactus and Succulent Plants. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Cactus and Succulent Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 10+212 pp.
- Olguín L.P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 85 pp.
- Papafotiou M., G.N. Balotis, PT. Louka y J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65: 163-167.
- Pedroza-Manrique J.A., S.R. González-Molina y D.C. Téllez-Ortiz. 2007. Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L.) Jacq: una especie en vías de extinción. *Revista Colombiana de Biotecnología* 9(2): 33-44.
- Pérez-Molphe B.E., M.E. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones y H. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34(2): 131-135.
- Phan C.T. y P. Hegedus. 1986. Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in *in vitro* culture, called 'vitreous plants'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6: 83-94.
- Raemakers C.J.J.M., E. Jacobsen y R.G.F. Visser. 1995. Secondary somatic embryogenesis and application in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107.
- Ramos-Parra M., F. Ulín-Montejo, J.A. Aguilar-Nieto, I.L. Solís-Trápala y J.B. Fierro-Carbajal. 2010. Modelación y estimación del volumen de tejido vegetal *in vitro* de *Strombocactus disciformis* basada en mediciones no intrusivas. *Universidad y Ciencia* 26(2): 195-203.
- Ranal M.A. y D.G. Santana. 2006. How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 1-11.
- Razdan M.K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. Second Edition. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, USA. 375 pp.

- Retes-Pruneda J., M. Valadez-Aguilar, M. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2007. Propagación *in vitro* de Especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (CACTACEAE). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81: 7-16.
- Rodríguez G., M. Morales, M. Verde, A. Oranday, C. Rivas, A. Núñez, G. González y J. Treviño. 2010. Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41(1): 55-59.
- Rodríguez-Garay B. y A. Rubluo. 1992. *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal (U.S.)* 64: 116-119.
- Rojas S., J. García y M. Alarcón. 2004. Propagación asexual de plantas: conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. CORPOICA. Colombia, Florencia. 55 pp.
- Rojas-Aréchiga M. y C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44:85-104.
- Rojas-Aréchiga M., y A.I. Batis. 2001. Las semillas de cactáceas... ¿forman bancos en el suelo? *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46(4): 76-82.
- Rojas-Aréchiga M., J. Golubov, O. Romero y M.C. Mandujano. 2008. Efecto de la luz y la temperatura en la germinación de dos especies de cactáceas en CITES I. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 53(1): 51-57.
- Rosa-Carrillo M.L., M.S. Domínguez-Rosales, M. Pérez-Reyes y E. Pérez-Molphe-Balch. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazada del género *Turbinicarpus*. *Interciencia* 37(2): 114-120.
- Rosas-López U. y M. Collazo-Ortega. 2004. Condition for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Goss.) Backerberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto fa. *grandis* (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). *ФТОП: International Journal of Experimental Botany* 2004: 213-220.
- Royero M., T.E. Vargas y M. Oropeza. 2007. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ñame). *Interciencia* 32(4): 247-252.
- Ruiz-González S., M. Rojas-Aréchiga y M.C. Mandujano. 2011. Descripción morfológica y germinación de las semillas de *Echinomastus unguispinus*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 56(2): 36-44.
- Ruvalcaba-Ruiz D., D. Rojas-Bravo y A.J. Valencia-Botín. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12(1): 139-143.
- Rzedowski J. 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Sadhu M. K. 1989. Plant Propagation. New Age International Publishers. New Delhi, India. 287 pp.
- Salas-Cruz L.R., R. Foroughbackch-Pournabav, M.d.L. Díaz-Jiménez, M.L. Cárdenas-Ávila y A. Flores-Valdes. 2011. Germinación *in vitro* de cactáceas, utilizando zeolita como sustrato alternativo. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (3): 565-575.
- Sánchez N., V. Rebollo-Camacho y M. Mata. 2002. Inducción de brotación múltiple en *Diospyros riojae* Gómez-Pompa por medio de cultivo de tejidos vegetales. *Foresta Veracruzana* 4(1): 41-46.
- Santacruz-Ruvalcaba F., A. Gutiérrez-Mora y B. Rodríguez-Garay. 1998. Somatic embryogenesis in some cactus and agave species. *Journal of the Professional Association for Cactus* 3: 15-26.
- Santini B. 2011. La serotinia en cactáceas: retención y retraso en la dispersión de sus semillas. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 8(1):7-8.
- Santos-Díaz M. D. S., R. Méndez-Ontiveros, A. Arredondo-Gómez, y M.D.L. Santos-Díaz. 2003. *In vitro* organogenesis of *Peleciphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39(5): 480-484.
- Sathyanarayana B.N. 2007. Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols. I. K. International Pvt Ltd. 316 pp.
- Schumann G., U. Ryschka, J. Schulze y E. Klocke. 1995. Anatomy of Somatic Embryogenesis. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 30: 71-86.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-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. Segunda edición. *Diario Oficial de la Federación* (30 de diciembre de 2010). México, D. F.
- Singh M. y R. Chaturvedi. 2009. An Efficient Protocol for Cyclic Somatic Embryogenesis in Neem (*Azadirachta indica* A Juss.). *Proceedings of International Conference on Energy and Environment* 1: 656-658.

- Singha S., E. Townsend y G. Oberly. 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoot *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23: 135-142.
- Starling R.J. y J.H. Dodds. 1983. Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya* 1:84-90.
- Stuppy W. y W. Nagl. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya* 10:85-88.
- Thomas D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26(6): 618-631.
- Torres-Muñoz L. y B. Rodríguez-Garay. 1996. Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbinicarpus pseudomacrolele* (Buxbaum & Backeberg). *Journal of professional Association for Cactus Development* 1: 36-38.
- Vacca M., M. Bonomo, Z. Avilés y L. Díaz. 2014. Inducción de callos embriogénicos y formación de proembriones somáticos de *Pterogyne nitens* Tull "tipa colorada". *Revista Colombiana de Biotecnología* 2: 194-202.
- Valverde T., J.A. Meave, J. Carabias y Z. Cano-Santana. 2005. Ecología y Medio Ambiente. Pearson. México, D.F. 230 pp.
- Villavicencio E., J.J. López, O. U. Martínez y G. García. 2006. Distribución digitalizada y características ecológicas del género *Ariocarpus* spp. en Coahuila. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Publicación Especial Núm. 8. Coahuila, México. 53 p.
- Williams E.G. y G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.
- Ziv M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: Debergh P.C. y R.H. Zimmerman (eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. p: 45-69.