



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias*
(Zucc) Lem. Cactácea en peligro de
extinción.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Alejandro Gaona Dehesa

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila



Ciudad Universitaria, CDMX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Gaona
Dehesa
Alejandro
21578408
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
309126960

2. Datos del tutor

Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Avila

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Ángel Salvador
Arias
Montes

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
Sonia
Vázquez
Santana

5. Datos del Sinodal 3

M. en C.
Octavio
González
Caballero

6. Datos del Sinodal 4

M. en C.
Luis Vidal
Pedrero
López

7. Datos del trabajo escrito

Regeneración *in vitro* de *Astrophytum
asterias* (Zucc) Lem. Cactácea en
peligro de extinción.
88 p
2018

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN FUE
REALIZADA EN EL LABORATORIO DE
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES
DEL JARDÍN BOTÁNICO DEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA DE LA
U.N.A.M., BAJO LA DIRECCIÓN DEL
DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ AVILA

A mamá y papá

A Axel

A Carmen†, Esteban, Jovita y Ramiro

A Joe y Chayito

A Alito

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes del jurado por las enseñanzas y por el tiempo dedicado a revisar mi trabajo:

Dr. Ángel Salvador Arias Montes.

Dra. Sonia Vázquez Santana

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

M. en C. Octavio González Caballero

M. en C. Luis Vidal Pedrero López

A la UNAM. Estudiar en ti siempre fue y será un sueño. Gracias no por hacerme un profesionista, sino por hacerme humano. Por dejarme estar en tus aulas mágicas y por la oportunidad de caminar los pasillos en donde caminaron y caminan gigantes. Gracias.

A la Facultad de Ciencias, por hacerme crítico y plural. Porque gracias a ti conocí a personas maravillosas. Porque en tus aulas y pasillos no solo aprendí Biología, aprendí humanidad. Por enseñarme a amar todas las formas y expresiones de vida por igual. ¡Gracias!

A mis maestros en la Facultad de Ciencias. Porque de ustedes me llevo sabiduría, Biología y lecciones de vida. Pero sobre de todo porque de muchos me llevo humanidad, diversidad y amor.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del IB-UNAM por dejarme realizar este proyecto y por proporcionarme las herramientas necesarias para poder terminarlo.

A Barbarita por tu cálida y amable forma de ser, por tu eterna disposición de ayudar y/o sacarnos de problemas en el laboratorio. ¡Gracias!

A M. en C. Octavio González Caballero por mostrarme y enamorarme del CTV en tu clase. Por los consejos, la paciencia y la confianza depositada para realizar el trabajo. Por tu amor por la enseñanza. Por tu amistad. ¡Gracias!

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila por ser mi padre académico. Por las anécdotas, los consejos y la confianza. También por las discusiones y los desencuentros, que reflejan, al final, que buscamos lo mismo. Por el amor que le tiene al laboratorio y a sus alumnos, por su calidez. Por las enseñanzas, las lecciones y los jalones de orejas. Por las risas. Por la bondad. Por la amistad. Lo estimo mucho. ¡Gracias!

A todos los alumnos de estancia, servicio social, prácticas y voluntarios. Porque a pesar de que venían de cerca o de muy lejos; o porque eran muy chiquitos o muy grandes. Porque estuvieron unos días o meses. Porque siempre tenían una disposición infinita de trabajar y ayudar. Porque me enseñaron mucho y permitieron, en ocasiones, que yo les enseñara.

En particular a Jorgito por la amistad, la bondad y la eterna sonrisa y disposición. A Andy y Vio por el cariño, por la amistad y por ser tan chiquitas y geniales, por darme esperanzas de un mundo mejor.

A mis amigas y amigos con los que crucé camino en el Laboratorio de CTV, porque sin ustedes esos largos días de preparación de medio, de ventas, días nacionales, y anexos, se hubieran tornado infinitos. Por las risas, anécdotas y chismes. En particular a mis compañeros "de generación", Alan, Lalo, Laura, Jair y Sarita; y a Ñañis, Silvana y Pao; sin ustedes no hubiera terminado esto. Por la solidaridad.

A mis amigas y amigos de la Facultad de Ciencias; a Armando, Charlie, Cisne, Cris, Iván, Mari y Yara. Por los buenos momentos, por los días eternos

en la fac, por las retas y los retos, por las pizzas, por las memorias indelebles. Por las risas. Al clan Esporopo-Lignina.

A Milo, Iván, Andy, Alan, Lula y Fati. Por ir de la mano. Por ser compañeros y confidentes. Por su amor. Nunca cambien beibis.

A Carmen†, Esteban, Jovita y Ramiro. Por hacerme sentir orgulloso de dónde vengo y a donde voy. Por ser mis primeros maestros ambientales, porque ustedes sembraron la primera semilla de Biología en mí. A Carmen por ser su ejemplo de amor y calidez infinita, por esos domingos de caldito de pollo, por enseñarme que unos frijolitos, queso y tortillas son todo lo que uno necesita en la vida. A Esteban por ese ejemplo de trabajo y vida, por enseñarme que el amor va mucho más allá del cariño, por las enseñanzas, por el amor a las plantas. A Jovita por su amor infinito, por las anécdotas, por ese ejemplo de entereza y fortaleza, por ser cimientos, piso y techo, por crear lo infinito con lo ínfimo. A Ramiro por ser ejemplo de entereza y honestidad, por esos domingos de futbol, por esa adicción a documentar y guardar, por enseñarme que el único vicio que uno debe tener es la vida. Les amo.

A Chayo y Joe. Madre y Padre. Por el ejemplo de amor y protección, por estar ahí. Por ese ejemplo de perdón y humildad. Por el amor infinito y por enseñarme que cuando uno tiene personas que lo aman, el resto sobra. Por mostrarme que las cosas se hacen desde el corazón y sin esperar nada a cambio. Con amor. Los amo.

A papá y mamá. Por darme herramientas y después dejarme volar, por dejar que me pierda, me encuentre y me vuelva a perder, por dejarme creer, ser, pensar, no creer, no ser y no pensar. Por enseñarme que lo que uno tiene dentro de la cabeza y el corazón es más importante que cualquier cosa material. A mamá por inspirarme con esa llama eterna que tienes dentro, por no parar y por amarme. A papá por enseñarme que uno debe hacer todo con amor. A ambos por amarme y convertirme en quien soy. Gracias.

A Axel. Por ser compañero de vida y confidente, por ser tan igual pero tan diferente. Por inspirarme con tu convicción y fortaleza en lo que eres y lo que crees. Por ir de la mano por siempre. Por ser pacificador y provocador. Por tu llama ardiente. Te amo.

A Alito. Sin ti nada de esto sería posible, por tu amor, bondad y desinterés. Por tu tiempo. Por tu disposición, por tu ayuda y por los momentos vividos. Por tu apoyo. Por estar siempre ahí. Por estar cada día de este viaje. Esto es por y para ti.

“Hay grandeza en esta visión de la vida, que con sus diferentes fuerzas, habiéndose originado de una o pocas formas; y que, mientras este planeta ha ido girando de acuerdo a la ley de la gravedad, desde un origen tan sencillo, hayan evolucionado, y sigan haciéndolo, una infinidad de las formas más bellas y más maravillosas”

-Charles Darwin

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Biodiversidad	4
Estado actual de la Biodiversidad	4
Biodiversidad en México	5
Plantas en México.....	6
Generalidades de la Familia Cactaceae.....	6
Importancia Económica y Social de la familia Cactaceae	8
Estado Actual de la Familia Cactaceae	9
Género <i>Astrophytum</i> Lemaire 1839.	10
Descripción Botánica del Género <i>Astrophytum</i> (Lem 1839)	11
Clasificación taxonómica.....	13
Descripción Botánica de <i>Astrophytum asterias</i>	14
Distribución de <i>Astrophytum asterias</i>	16
Estado actual de <i>Astrophytum asterias</i>	17
Cultivo de Tejidos Vegetales	19
Organogénesis.....	24
Medios de Cultivo	26
Reguladores de Crecimiento Vegetal	27
Aclimatización	29
Hiperhidratación	30
Dominancia Apical	32
Cultivo de Tejidos Vegetales en Cactaceae	33
Cultivo de Tejidos Vegetales en <i>Astrophytum</i>	35
Cultivo de Tejidos Vegetales en <i>Astrophytum asterias</i>	37
JUSTIFICACIÓN	38
OBJETIVOS	39
Objetivo General	39
Objetivos Particulares	39

MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Material Biológico.....	40
Medición y Pesaje de Semillas.....	40
Desinfección y Siembra de Semillas	41
Siembra de semillas <i>ex vitro</i>	42
Inducción morfogénica.....	42
Análisis de resultados.....	44
Aclimatización	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
Medición y Pesaje de las Semillas	46
Desinfección	47
Germinación <i>in vitro</i> de <i>Astrophytum asterias</i>	48
Respuestas morfogénicas.....	53
Organogénesis.....	58
Individualización y aclimatización	69
CONCLUSIONES.....	74
PERSPECTIVAS	77
BIBLIOGRAFÍA	79
APÉNDICE.....	88

FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 Países con mayor cantidad de especies de plantas vasculares....	6
Figura 2 Ejemplares adultos y en hábitat de las seis especies del género <i>Astrophytum</i>	12
Figura 3 Ejemplar de <i>A.asterias</i> con flores en antesis.....	13
Figura 4 Ficha informativa sobre <i>A.asterias</i>	15
Figura 5 Distribución geográfica de <i>A.asterias</i>	16
Figura 6 Etapas del Cultivo de Tejidos Vegetales.....	24
Figura 7 Estructura de la auxina ANA.....	28
Figura 8 Estructura de las citocininas Kinetina y BAP.....	29
Figura 9 Esquema del crecimiento de cactáceas con crecimiento monopódico.....	32
Figura 10 Ejemplo de medición en el software Axiovision®.....	40
Figura 11 Explantes de <i>A.asterias</i>	43
Figura 12 Germinación de <i>A.asterias in vitro</i>	51
Figura 13 Germinación de <i>A.asterias ex vitro</i>	52

Figura 14 Explantes de <i>A.asterias</i> en BAP/ANA.....	54
Figura 15 Explantes de <i>A.asterias</i> en KIN/ANA.....	56
Figura 16 Explantes de <i>A.asterias</i> en CONTROL.....	57
Figura 17 Frasco con medio cerca de agotarse.....	66
Figura 18 Respuesta morfogénica de los explantes de <i>A.asterias</i> a los diferentes tratamientos ensayados.....	68
Figura 19 Brotes individualizados de <i>A.asterias</i>	70
Figura 20 Plantas aclimatizadas de <i>A. asterias</i>	70

TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1 Algunos reportes de Cultivo de Tejidos Vegetales en Cactaceae.....	34
Tabla 2 Trabajos de Cultivo de Tejidos Vegetales en <i>Astrophytum</i>	36
Tabla 3 Reportes sobre la regeneración <i>in vitro</i> de <i>A.asterias</i>	37
Tabla 4 Proceso de desinfección utilizado.....	41
Tabla 5 Tamaño promedio de semillas de <i>A.asterias</i>	46
Tabla 6 Categorías de tamaños de semillas de la Familia Cactaceae.....	47
Tabla 7 Días hasta la germinación <i>in vitro/ex vitro</i>	48
Tabla 8 Brotes obtenidos a los 8, 11 y 12 meses de iniciada la inducción.....	67

GRÁFICA

Gráfica	Página
Gráfica 1 Porcentaje y tiempo de germinación de semillas maduras de <i>A. asterias</i> sembradas en dos condiciones, <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	51

ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4 diclorofenoxiacético

2iP: 6-(y,y-dimetilalilaminopurina)

A: Amenazada

ABA: Ácido abscísico

AIA/IAA: Ácido indol-3-acético

AIB/IBA: Ácido indol-3-butírico

ANA: Ácido a-naftalenacético

ATIB/TIBA: Ácido 2,3,5-Triodobenzoico

BAP: 6-Bencilaminopurina

CaCl: Cloruro de Calcio

CAM: Metabolismo ácido de las crasuláceas

CE: En peligro crítico

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

CONABIO: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad

CONANP: Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas

CPPU: Forclorofenuron, 1- (2- cloro - 4- piridil) 3- fenilurea)

CTV: Cultivo de Tejidos Vegetales

EN: En peligro de extinción

IUCN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

KIN: Kinetina

LC: Preocupación Menor

mg/l: Miligramos por litro

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

MS 50%: Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración

NOM-059: Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010

NPA: Ácido 1-naftalenacético

NT: Casi Amenazada

ONU: Organización de las Naciones Unidas

P: En peligro de extinción

PBZ: Paclobutrazol

Pr: Sujeta a protección especial

PROFEPA: Procuraduría Federal de Protección al Ambiente

PUT: Putrescina

RCV Reguladores de Crecimiento Vegetal

SEDUE: Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

TDZ: Tiodiazuron

UMA: Unidad de Manejo Ambiental

USFWS: United States Fish and Wildlife Service

v/v: volumen/volumen

VU: Vulnerable

RESUMEN

Astrophytum asterias es una cactácea endémica de Nuevo León y Tamaulipas en México, y del sur de Texas en Estados Unidos, está considerada como vulnerable por la IUCN, se encuentra en el Apéndice I de la CITES y está listada como en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010, por la destrucción de su hábitat, la colecta ilegal y limitantes biológicas como un lento crecimiento, una lenta maduración sexual, una obligada xenogamia, y una baja calidad en la polinización. Por lo cual son necesarias medidas que amortigüen el descenso de sus poblaciones naturales; una alternativa que ha resultado efectiva en distintas especies amenazadas, como las cactáceas, es el Cultivo de Tejidos Vegetales. En el presente estudio fue posible establecer las condiciones experimentales que permitieron la desinfección de semillas, la germinación *in vitro* y la posterior regeneración *in vitro* de *A. asterias*. Explantes (apicales, hipocótilos y raíces) obtenidos de 33 plántulas germinadas *in vitro* fueron sembradas en frascos con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con BAP/ANA 2/0.5 mg/l; KIN/ANA 2/0.5 mg/l y sin reguladores de crecimiento vegetal (CONTROL); con 11 réplicas por tratamiento. Las respuestas a los 12 meses de iniciada la inducción fueron: a) Formación de callo de color verdoso a marrón principalmente friable, pero en ocasiones compacto de color blanco o hialino, b) Respuesta organogénica principalmente de tipo indirecta a través de callo friable en el caso de los explantes ápice e hipocótilos, pero en ocasiones directa en el caso de raíces en el tratamiento control. La presencia de RCV no fue necesaria para el surgimiento de brotes, sin embargo al estar presentes aceleraban la aparición y el crecimiento de estos. La menor cantidad de brotes en explantes de tipo apical (22 brotes) y la aparición abundante de callo previa a la organogénesis, sugiere que *A. asterias* es una especie con una alta

concentración endógena de auxinas. En el tratamiento CONTROL se obtuvo el mayor número de brotes con un total de 82, seguido del tratamiento BAP/ANA con 74 brotes. El explante con una mayor cantidad de brotes totales a través de los tres tratamientos fue el explante hipocótilo con 101 brotes. El explante que regeneró una mayor cantidad de brotes por tratamiento fue el explante hipocótilo del tratamiento control con 60 brotes seguido del explante hipocótilo del tratamiento BAP/ANA con 41 brotes. Los brotes más consolidados se individualizaron y se subcultivaron a frascos con medio MS a los que se les cambiaron las tapas plásticas por películas plásticas con un filtro de 0.02 μm , con el objetivo de reducir la hiperhidratación. Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan al conocimiento y permiten observar el establecimiento de un método efectivo, pero mejorable, para la regeneración y conservación de *A. asterias*.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, depende del autor y criterio usado, se consideran 17 países megadiversos. México forma parte de este grupo (Sarukhán y Dirzo, 2001). Esta diversidad tiene su origen en razones históricas, como la complicada historia geológica y biogeográfica que el país ha tenido. Incluye la enorme variedad de ecosistemas, así como en los procesos ecológicos que son producto de la relación de los organismos entre sí y con su ambiente físico. En cuanto a pérdida de biodiversidad se refiere, por ejemplo, la cobertura vegetal original del país ha descendido en forma alarmante a través de los años, del 62% en 1976, al 54% en 1993 y 36% en 2002 al ritmo de 1% perdido por año (CONABIO-CONANP, 2009).

Al ser megadiverso posee gran cantidad de especies vegetales, según CONABIO-CONANP (2009), cuenta con el 9.56% de dicotiledóneas, 8% de monocotiledóneas, 15.31% de Gimnospermas, 8.19% de Pteridofitas, 7.45% de Briofitas y el 13.5% de especies descritas a nivel mundial; el último conteo de Villaseñor (2016) enlista 23,314 especies, de las cuales, 11,600, (el 49.8%) son endémicas, es decir, si llegaran a desaparecer de México desaparecerían del mundo (Fig. 1).

Dentro de esta diversidad, están las plantas de la familia Cactaceae, en la actualidad se han descrito entre 1400-1660 especies (Anderson, 2001, Hunt, 2006 y Ortega-Baes *et al.*, 2010) de las cuales aproximadamente 35% (581) se encuentran en la Red List de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). Asimismo 75 especies de la familia están en el Apéndice I de la CITES (Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora) debido a que sus poblaciones han descendido dramáticamente en las últimas décadas a causa de presiones antropogénicas como la colecta ilegal, la agricultura, el cambio de uso de suelo, el desarrollo urbano y amenazas naturales como patógenos. Los humanos han encontrado muchas formas de aprovechar a las cactáceas, como alimento, como herramienta y como plantas de ornato lo cual ha creado un mercado secundario y, en ocasiones ilegal, el de los coleccionistas; esto ha generado que muchas de estas plantas sean extraídas de su medio natural con fines comerciales, esta extracción indiscriminada ha llevado

a la familia a estar en riesgo, por lo cual es importante que se haga un esfuerzo de conservación muy grande para proteger a este grupo de plantas (Anderson, 2001). La inmensa demanda del sector aficionado en busca de plantas ornamentales ha provocado que los métodos tradicionales de propagación sean insuficientes para satisfacer la demanda de algunas especies (Lema-Ruminska y Kulus, 2014)

Es por esto que se deben buscar alternativas, no sólo de producción, que satisfagan esta demanda y eviten el daño a las poblaciones naturales; avances en la biotecnología de plantas nos proveen de nuevas opciones para la colección, multiplicación y conservación de corto a largo plazo de la biodiversidad vegetal, al usar técnicas *in vitro* (Cruz-Cruz *et al.*, 2013). Estas técnicas permiten lograr una alta tasa de propagación en condiciones asépticas. El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una rama de la biotecnología que permite lograr una gran cantidad de individuos en un tiempo relativamente corto, por lo cual es una alternativa poderosa para la conservación *ex situ* de la diversidad, así como para suplir a la demanda del comercio informal (George *et al.*, 2008).

Astrophytum asterias es una cactácea endémica de los matorrales espinosos y submontanos de Texas (Estados Unidos), Nuevo León y Tamaulipas (México), con 6,400 individuos estimados en condiciones silvestres (CONABIO-CONANP, 2009). Está sujeta a protección especial por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), se encuentra listada en el Apéndice I de la CITES (CITES, 2017) y es considerada como vulnerable (VU) por la lista roja IUCN (Hernández *et al.*, 2017), en virtud de presiones antropogénicas como la colecta ilícita, la introducción de maquinaria con fines agrarios y el desarrollo urbano en zonas en donde se distribuye, su inclusión en esta lista prohíbe por completo cualquier tipo de comercio a nivel mundial con la especie. Aunado a esto, presenta amenazas naturales que son típicamente fatales para la especie, pero que el cambio en su ambientes naturales ha agravado, que incluyen enfermedades causadas por *Phytophthora infestans*, infestaciones de un escarabajo cerambícido (*Moneilema armatum*) y el consumo de la parte aérea por parte de herbívoros (Terry *et al.*, 2012).

Asimismo, es una especie de lento crecimiento, xenogamia obligada y poblaciones fragmentadas y dispersas (USFWS, 2003). Sumado a esto, y a pesar de que es una especie propagada intensivamente por medios tradicionales, sólo se cuenta con 3 reportes de propagación por técnicas *in vitro* (Lizalde-Viramontes *et al.*, 2003, Lema-Ruminska y Kulus, 2012 y Mancilla, 2014). Por lo cual el objetivo de este estudio fue establecer condiciones de cultivo que permitan dirigir y controlar el desarrollo *in vitro* de células y tejidos de *A. asterias* para lograr la regeneración de plantas completas, con fines de conservación y, a futuro, comerciales.

En la presente investigación se logró la regeneración *in vitro* de plantas completas, así como un método de propagación de *A. asterias*.

ANTECEDENTES

Biodiversidad

Hay muchas formas de medir la biodiversidad, pero la más usada y común es contar las especies en un lugar determinado o "riqueza". Los conteos más recientes arrojan cerca de 1.5 millones de especies descritas, pero se estima que el número total de especies Eucariontes se encuentra entre 5 y 15 millones (Dirzo y Mendoza, 2008). Por lo cual se desconocen entre 70% y 90% de los organismos.

Esta riqueza no está distribuida uniformemente, es evidente que aumenta al acercarse al Ecuador, esta heterogeneidad es debida a factores físicos, biogeográficos, climáticos u orográficos que incrementan la productividad del ecosistema y un aumento en la disponibilidad de recursos en estos lugares. Lo cual provoca que haya una "sobrexpresión" de biodiversidad en solo algunos países llamados Megadiversos. Parece obvio notar que la diversidad no enfrenta estas barreras socio políticas, pero el hecho es que estas entidades existen y tienen estructuras económicas, ecológicas, históricas y sociales que hay que tomar en cuenta cuando se habla de biodiversidad global (Sarukhán y Dirzo, 2001).

Las características para considerar a un país Megadiverso son varias según el autor y la forma de medir la biodiversidad que se tome en cuenta. Sarukhán y Dirzo (2001) estimaron que 17 países Megadiversos (8.8% de los registrados en la ONU) contienen entre 66%-75% de la biodiversidad mundial, esto refleja una heterogeneidad enorme de recursos naturales, en cuanto a número de especies se refiere.

Estado actual de la Biodiversidad

El ser humano ha guardado una estrecha relación con la diversidad, el éxito de esta relación tiene como resultado el mantenimiento o alteración del equilibrio en el que esta biodiversidad se encuentra. Esta relación ha existido desde que el ser humano comenzaba a evolucionar, e incluso le permitió desarrollarse más rápido, pero en muchas ocasiones ha resultado negativa para el ambiente que lo rodea.

La extinción de especies es un proceso natural, y ocurre, incluso sin intervención humana, sin embargo, se ha acelerado masivamente, las especies se están extinguiendo a una velocidad no vista desde el último evento de extinción masiva –de 100 a 1000 veces más de lo considerado natural, al grado que algunos autores la han llamado la “sexta gran extinción” o el “Antropoceno” (Röckstrom *et al.*, 2009). Dentro de esta biodiversidad se encuentran las plantas, estas cuentan con una enorme diversidad de formas, tamaños, fisiologías y de miles de diferentes formas para afrontar la vida. Las estimaciones actuales en cuanto a especies totales de plantas dependen mucho del autor, la CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad) menciona que en el mundo hay alrededor de 292,555 especies de plantas, de las cuales solo se ha catalogado y clasificado a 200,000, aunque el número de especies totales podría ser mucho más elevado (CONABIO, 2014). En la actualidad la lista roja de la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) en su versión 2017.3 (2017), enlista 11,674 especies de plantas en alguna categoría de riesgo, y solo 5% de las especies descritas les ha sido analizado su riesgo de extinción, por lo cual esta estimación es aún corta y el número real de especies amenazadas puede ser mucho más alto.

Biodiversidad en México

Cabe mencionar que aparte de ser un país Megadiverso, México es un territorio con una alta tasa de endemismos, resultante de la diversidad orográfica y ecosistémica que genera una gran cantidad de vicarianzas y de la evolución o diversificación natural y cultural en el país. Alrededor de unas 15,000 especies de plantas mexicanas son endémicas, por lo cual si alguna de estas llegara a desaparecer, se extinguiría por completo del planeta, lo cual le da al país una gran responsabilidad de cuidar y proteger estas especies, algo no logrado hasta ahora (CONABIO, 2009). Es cuarto lugar mundial en especies de mamíferos, cuarto lugar mundial en endemismos de vertebrados, segundo lugar en reptiles, cuarto en anfibios, y quinto lugar en especies de plantas vasculares (CONABIO, 2009).

Dentro de esta enorme diversidad vegetal, la familia Cactaceae destaca por su amplia diversidad a nivel genérico y específico, ocupa el 5to lugar en diversidad

de especies a nivel nacional además de tener una gran importancia social y cultural para el país (Rzedowski, 1991; Arias, 1993; Jiménez-Sierra y Fuentes, 2007; Jiménez-Sierra, 2011).

Plantas en México

Según datos de CONABIO (Sarukhán *et al.*, 2009) México se encuentra en el quinto lugar mundial en diversidad de plantas vasculares. Con 23,313 especies descritas según el último conteo y una estimación de entre 27,000 y 30,000 (Sarukhán *et al.*, 2009; Villaseñor, 2016; Fig 1). De las cuales casi la mitad (49.8%), es endémica de nuestro país, cifra sólo superada, entre los países no insulares, por Sudáfrica (57.1%) (Villaseñor, 2016).

Los cinco países con mayor diversidad de especies de plantas vasculares (fuente: CONABIO 2006).



Figura 1. Países con mayor cantidad de especies de plantas vasculares. (Sarukhán *et al.*, 2009, p. 24).

De estas especies, 430 se encuentran en alguna categoría de riesgo en la lista de la IUCN, aunque la cantidad de plantas analizadas parece ser muy poca aún (alrededor de 5%). Dada la cantidad de cobertura vegetal retirada en México año con año (cerca de 0.5% por año o 523,639 ha por año) (Challenger y Dirzo, 2008; IUCN, 2017), se requerirá una coordinación de gobierno-legislación-comunidad científica, para poder revertir este patrón, de lo contrario el futuro parece ser muy oscuro para la fitobiota mexicana.

Generalidades de la Familia Cactaceae

Presentan tallos suculentos, y en la mayoría de los casos ausencia de hojas (que son remplazadas por espinas), meristemos laterales altamente especializados

llamados aréolas, cuerpos suculentos con córtex amplio que permite aumentar fácilmente el volumen al absorber agua, raíces tuberosas y metabolismo CAM (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1979; Anderson, 2001). Las cactáceas, exhiben una gran diversidad de tamaños y formas de crecimiento, pueden tener desde unos pocos centímetros hasta algunos metros de alto, a pesar de que viven principalmente en zonas áridas de matorral, pueden habitar en diferentes ecosistemas como en bosques tropicales, y los hay desde los epífitos hasta geófitos (Anderson, 2001; Hernández-Hernández, 2011).

La familia comprende cerca de 124 géneros con 1427 especies (Hunt, 2006; Ortega-Baes *et al.*, 2010). Se reconocen 4 subfamilias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae con 17, 2, 186 y 1222 especies respectivamente (Anderson, 2001; Hunt, 2006 y Ortega-Baes *et al.*, 2010). Esta diversidad puede ser explicada en distintos niveles: macroevolutivo (selección natural, deriva génica, mutación y evo-devo), taxonómico y ecológico (Ortega-Baes *et al.*, 2010).

Las cactáceas son nativas y endémicas de América, salvo una excepción, *Rhysalis baccifera* que, por dispersión, llegó a la África subsahariana (Anderson, 2001). Son plantas muy competitivas en ambientes ajenos y se han convertido en verdaderas amenazas y plantas invasoras en sitios tan lejanos de su origen como Australia, África o Asia (Anderson, 2001). Se reconocen tres o cuatro centros principales de diversidad, el noreste de México, el suroeste de los Andes, el este de Brasil y algunos autores mencionan el centro/sur de Brasil (Oldfield, 1997; Anderson, 2001; Boyle y Anderson, 2002; Ortega-Baes *et al.*, 2010).

México es el centro más importante de concentración de especies y endemismo de la familia Cactaceae a nivel mundial, con 46-66 géneros y 660-850 especies, y un endemismo de 30% en géneros y de 78% en especies (Oldfield, 1997; Ortega-Baes y Godínez-Álvarez, 2006; Jiménez-Sierra y Fuentes, 2007). Según Villaseñor (2016) la familia Cactaceae ocupa el séptimo lugar en cuanto a diversidad de especies vegetales en México con 677 y cuenta con el quinto género más diverso, *Mammillaria* con 169 especies.

Importancia Económica y Social de la familia Cactaceae

Habitantes prehistóricos de Mesoamérica exhibían ya una fuerte utilización de las cactáceas, posiblemente desarrollada por sus ancestros en Aridoamérica e influenciada por sus propias experiencias con los ambientes árido y subáridos locales (Casas y Barbera, 2002). Los primeros registros de restos de Cactáceas, se encontraron en cuevas de Tehuacán, Puebla y Guilá Naquitz, Oaxaca datan de 12,000.

En la actualidad su aprovechamiento se ha diversificado: se usan como alimento, con fines domésticos, medicinales, religiosos y políticos. En México existen evidencias fuertes de su aprovechamiento. En la barranca de Metztitlán, Hidalgo hasta 25% son aprovechadas por los pobladores de esa región para la obtención de materias primas, construcción (*Marginatocereus marginatus*), forraje (*Opuntia* sp. y *Cylindropuntia imbricata*), combustible, fines alimenticios (*Myrtillocactus geometrizans* y *Opuntia* sp.), medicinales (*Myrtillocactus geometrizans*), artesanales (*Opuntia* sp., *M. geometrizans* e *Isolatocereus dumortieri*) y cosméticos (*Marginatocereus marginatus*) (Jiménez-Sierra y Fuentes, 2007; Jiménez-Sierra, 2011).

Asimismo, la belleza y rareza de las plantas de esta familia ha provocado que uno de sus principales usos en la actualidad, sea el ornamental. Esto ha afectado directamente a la familia, pese a la existencia de legislaciones internacionales (CITES), y nacionales (NOM-059-SEMARNAT-2010) en las que se prohíbe el comercio de ejemplares, partes o sus derivados colectados directamente de sus hábitats naturales (Bárcenas, 2006).

Estado Actual de la Familia Cactaceae

De acuerdo a Goettsch *et al.* (2015) las 3 principales amenazas para las cactáceas, de mayor impacto al menor, son: la conversión de tierras para agricultura y acuacultura, la colección como recursos biológicos y el desarrollo con fines comerciales y residenciales.

Se ha estimado que en el periodo de 1977-1984 se exportaron cerca de 289 mil cactáceas en forma ilegal (Arias, 1993). Entre 1990 y 1991 la SEDUE (Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología) decomisó más de 700 mil ejemplares de cactáceas e incluso expulsó a nueve europeos por la extracción ilegal de estos (Godínez-Álvarez, 1992). Los decomisos, si bien en menor frecuencia y de menor cantidad de ejemplares, han continuado, como es expuesto por el reporte de PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente), que aseguró en Junio del 2017 48 ejemplares de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, especie incluida en el Apéndice I del CITES, los ejemplares tenían como destino Chong Quing, China (PROFEPA, 2017).

Se estima que más de 300 especies del Desierto Chihuahuense se comercializan de forma estable fuera del país, con Estados Unidos y Europa como los principales comercializadores. Esto llama la atención dado que las especies comercializadas no se encuentran de forma natural en estos países; en comparación, en México solo comercializan 91 especies, 28.6% de las comercializadas en los Estados Unidos, a pesar de ser el país con el mayor número de especies y endemismos en el mundo. Es decir, en los Estados Unidos se pueden encontrar en el comercio legal casi la totalidad de las especies del desierto chihuahuense, mientras que en México solo se pueden encontrar unas pocas (Bárcenas, 2006).

La CITES es una de las iniciativas para terminar con el comercio ilegal de especies amenazadas, regula la venta internacional de especies al incluirlas en apéndices que controlan el comercio de estas. CITES tiene enlistada a toda la familia Cactaceae en el Apéndice II (excepto *Pereskia spp.*, *Pereskopsis spp.* y *Quiabentia spp.*). Esto quiere decir que todo comercio de estas especies debe incluir un permiso de exportación antes autorizado por una autoridad científica (CITES, 1983). Adicional a esto enlista en su totalidad a los géneros *Ariocarpus*, *Discocactus*, *Pelecyphora*, *Strombocactus*, *Turbinicarpus* y *Uebelmannia* más 30 especies, y 3

subespecies (un total de 75 especies) en el Apéndice I (CITES, 2017). Lo cual indica que el estado de estas especies es tan crítico, y sus poblaciones naturales están tan mermadas, que el intercambio no académico y el comercio de estas especies está terminantemente prohibido a nivel mundial (CITES, 1983). A pesar de estas regulaciones establecidas a nivel mundial, es aún común el saqueo de sus ambientes naturales, y en algunos países como Argentina y México, a pesar de las regulaciones establecidas, el intercambio de cactáceas no es regulado de forma adecuada (Bárceñas, 2006; Jiménez-Sierra y Fuentes, 2007; Ortega-Baés *et al.*, 2010).

La lista roja de la IUCN enlista a 415 especies en alguna categoría de riesgo (28% de las especies), 139 en la categoría Vulnerable (9.4%), 177 en la categoría En Peligro de Extinción (11.98%), 99 en la categoría En Peligro Crítico (6.7%) y 2 (0.1%) como posiblemente extintas en la naturaleza, una de las cuales, *Mammillaria glochidiata*, habitaba en México (IUCN, 2016). Uno de los géneros que sufre una mayor depredación y reducción de sus poblaciones naturales es el género *Astrophytum*, y en particular *Astrophytum asterias*.

Género *Astrophytum* Lemaire 1839.

Charles Lemaire describió a la primera especie del género en 1839 a través de una planta colectada en el norte de México, que le parecía relacionada, pero distinta a una del género *Echinocactus* (Anderson, 2001). El nombre del género proviene del griego astron, que significa estrella, y phyton, que significa planta. En un inicio, muchos colocaron a las plantas de este género, y otras, en el género *Echinocactus*. Forma parte de la Subfamilia Cactoideae, y de la tribu Cacteeae. En la actualidad se reconoce a seis especies: *A. asterias*, *A. capricorne*, *A. coahuilense*, *A. caput-medusae*, *A. myriostigma* y *A. ornatum* (Vázquez-Lobo *et al.*, 2015) (Fig. 2).

Ejemplares del género han sido decomisados en cargamentos ilegales de cactáceas. En 2016 se decomisaron plantas no registradas de *A. capricorne* y *A. myriostigma* que formaban parte de un aseguramiento de una Unidad de Manejo Ambiental (UMA) compuesta por 350 ejemplares de 186 especies de 8 familias (PROFEPA, 2016). En 2017 se recuperaron 24 ejemplares de *A. myriostigma* como parte de un operativo, los individuos fueron depositados en las instalaciones de la

UMA “Jardín Botánico de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí” (PROFEPA, 2017).

No se encuentran más reportes recientes de decomisos sobre el género, pero es probable que el registro esté incompleto y no refleje la situación actual.

Descripción Botánica del Género *Astrophytum* (Lem 1839) (Fig. 2)

(Anderson, 2001; Valiente-Banuet y Godínez-Álvarez, 2002; Strong y Williamson, 2007; Becerra, 2010).

Plantas usualmente solitarias, globosas a columnares, verdes, cubiertas de finos y blancos mechones de tricomas, llamados estigmas, pero a veces glabras, de hasta 1.5 m de altura. De 4-10 costillas bien distinguibles. Tubérculos en una especie. Grandes aréolas, cercanas unas de otras pero distinguibles. Espinas presentes o ausentes. Flores nacientes del ápice de los tallos, de apertura diurna, infundibuliformes, largas, amarillas o amarillas con bases rojas; pericarpelo con escamas puntiagudas, obligadamente xenogámicas. Frutos globosos, semicarnosos, con escamas secas y densa lana, irregularmente dehiscente; con partes persistentes del perianto. Semillas con forma navicular, posiblemente hidrocoras de un color café-negruzco brillante, con testa casi lisa pero doblada hacia el hilum hundido, de más o menos 2.5 mm de diámetro (Fig. 4, C-E). Se distribuye en el sur de Texas, norte y centro de México (Fig. 5).

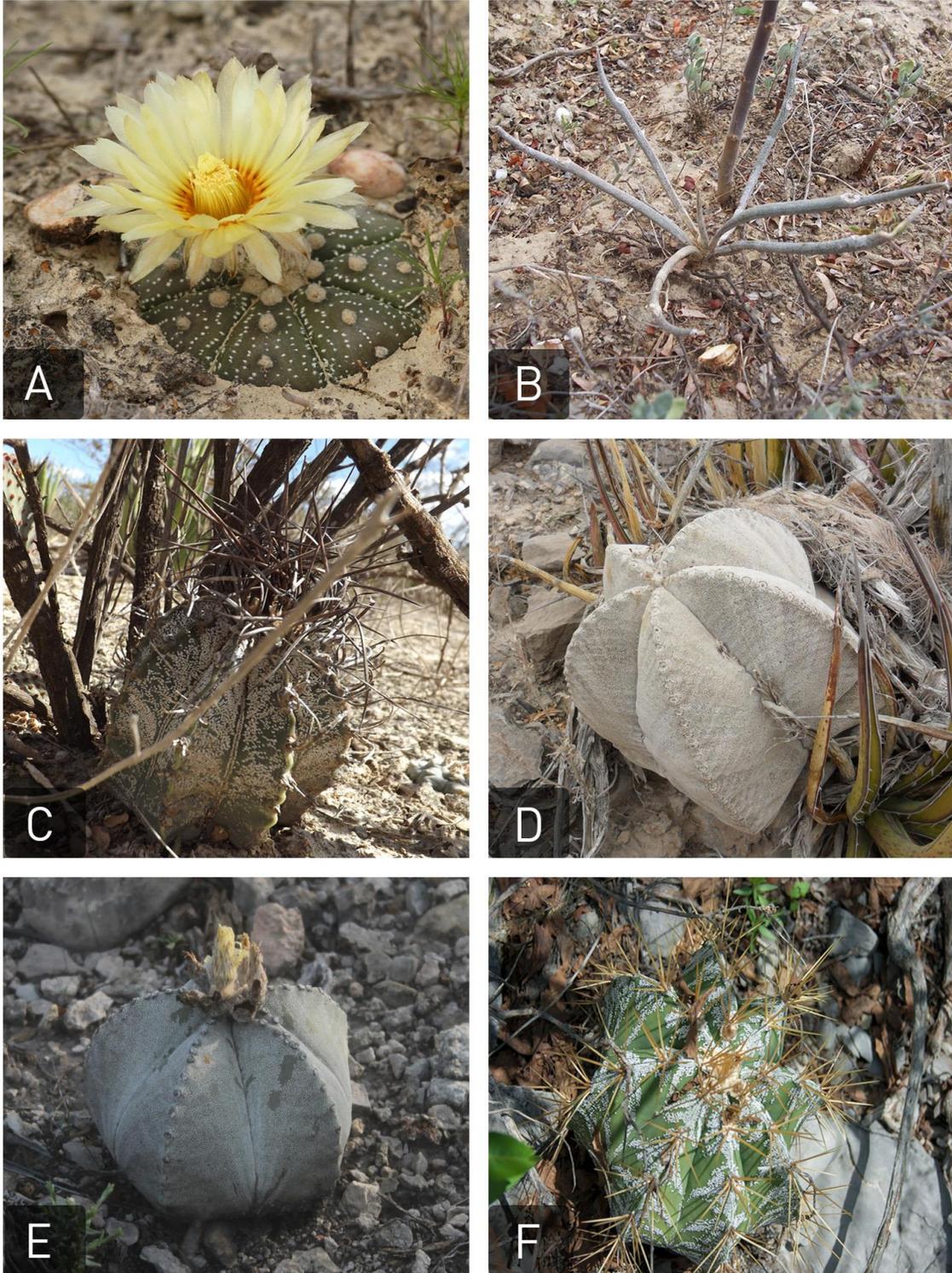


Figura 2. Ejemplares adultos y en hábitat natural de todos los miembros del género *Astrophytum*. A) *A. asterias*. B) *A. caput-medusae*. C) *A. capricorne*. D) *A. coahuilense*. E) *A. myriostigma*. F) *A. ornatum*. A: Matt Buckingham. B: Desconocido. C y D: Manuel Nevárez. E: Pedro Nájera. F: Alejandro Gaona. A-F: Obtenidas en: <https://www.naturalista.mx/observations>.

Clasificación taxonómica de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem.

(Anderson, 2001; USFWS, 2003; CONABIO-CONANP, 2009.)

Fue colectado por primera vez en Tamaulipas, México, en 1843 y nombrado *Echinocactus asterias* Zuccarini en 1843.

Reino: Plantae

Phyllum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cactoideae

Tribu: Cacteae

Género: *Astrophytum*

Especie: *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem.



Figura 3. Ejemplar de *Astrophytum asterias* con flores en antesis, creciendo en su hábitat natural. Tomada de <https://www.naturalista.mx/observations>. Crédito: Matt Buckingham.

Descripción Botánica de *Astrophytum asterias*

(Anderson, 2001; Martínez-Ávalos *et al.*, 2004; Strong y Williamson, 2007; Blair y Williamson, 2008; CONANP-CONABIO, 2009; Janssen *et al.*, 2010, USFWS, 2003 y 2013)

Plantas globosas deprimidas, que apenas sobresalen del nivel del piso, 2-7 cm de altura, 6-15 cm de diámetro, verdes en temporada de lluvias, grisáceas en época de secas, con numerosos estigmas, mechones de tricomas, llamados estigmas. Ocho costillas muy bajas, aplanadas, separadas por surcos agudos. Aréolas prominentes, circulares de 5-10 mm de diámetro. Espinas ausentes. Flores amarillas, de 2-4 cm de largo, 3-5 cm de diámetro (Figs. 3 y 4). Frutos no dehiscentes, tardan de 10-21 días en madurar, número de semillas entre 30-120 por fruto, el cual se desintegra al madurar dejando expuestas las semillas (Fig. 4). Es polinizada principalmente por abejas y se ha encontrado que *Diadasia rinconis* es su mejor polinizador; *Macrotera lobata*, *Ashmeadiella maxima* y *A. meliloti* son otros visitantes frecuentes. Es una planta que tiene un crecimiento lento en su estado silvestre (0.85-3.65mm por año), una maduración sexual relativamente tardía (alrededor de los 5 años), autoincompatibilidad, pocos individuos y poblaciones separadas la una con la otra, por lo cual experimenta limitaciones reproductivas importantes en su ecosistema natural en función de la disponibilidad o eficacia de los polinizadores.

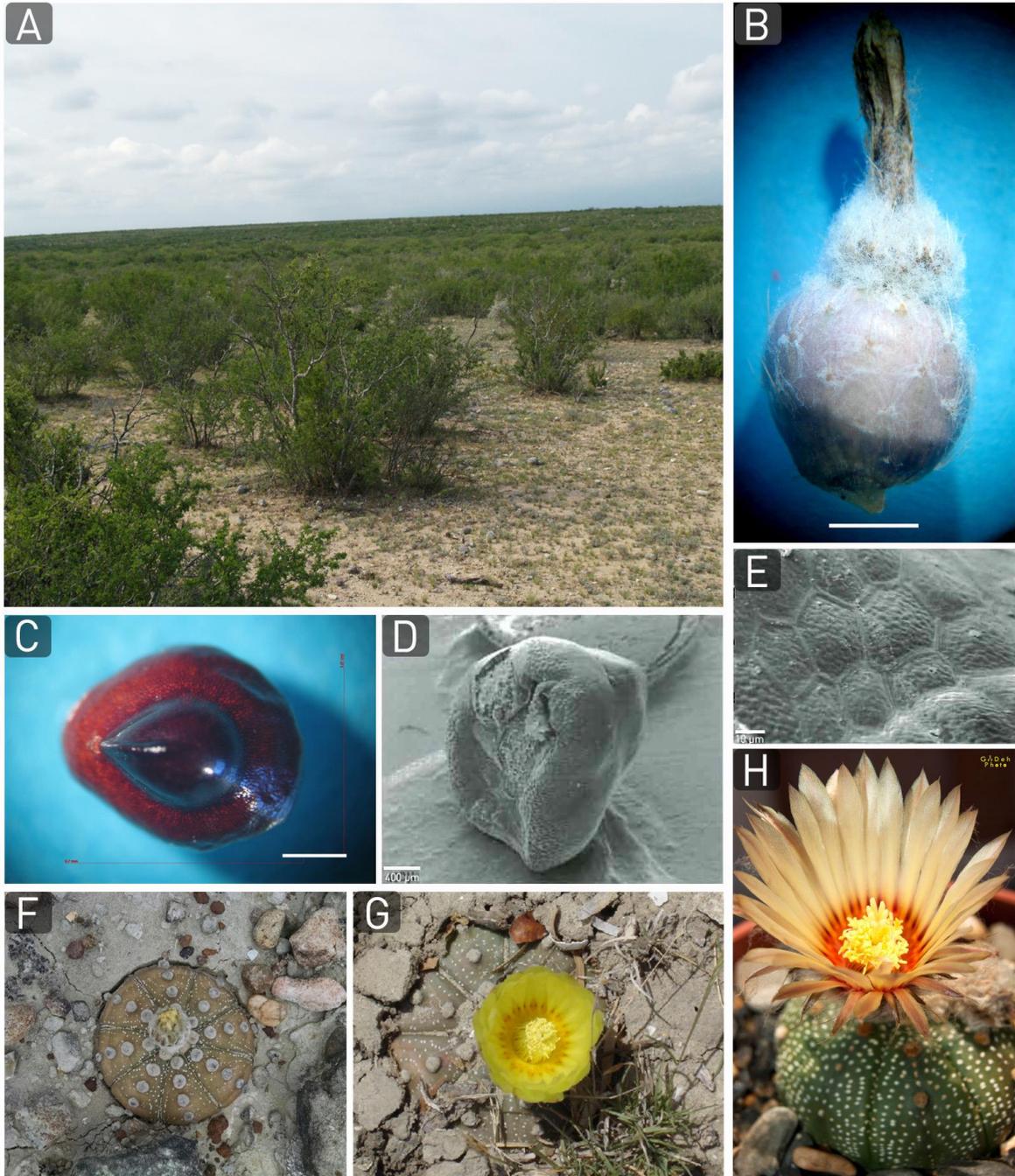


Figura 4. A) Matorral Tamaulipeco, ecosistema en donde habita *A.asterias*. B) Fruto maduro de *A.asterias*, barra = 5 mm. C) Semilla madura de *A.asterias*, barra=1mm. D) Microfotografía de semilla de *A.asterias*. E) Acercamiento a la testa de una semilla madura de *A.asterias*; se observa un arreglo isomorfológico con pentágonos y hexágonos limitados por los relieves marginales de las células seminales. F) Planta madura en hábitat. G) Planta en hábitat con flor en antesis. H) Planta de una colección personal en antesis. A: <http://www.nl.gob.mx/servicios/areas-naturales-protegidas>. B, C y H: Alejandro Gaona. D y E: (Barthlott y Hunt, 2000, p. 115). F: Dalton Neuharth en naturalista.mx/taxa/135434-Astrophytum-asterias/browse_photos. G: (Martínez-Ávalos *et al.*, 2007, p. 254).

Distribución de *Astrophytum asterias*

A. asterias crece en los pastizales y matorrales espinosos del sur de Texas, Tamaulipas y Nuevo León, México, se encuentra en arcillas granuladas en las formaciones de Catahoula y Frio en los Estados Unidos y en suelos calizos de origen Cenozoico y Mesozoico en Tamaulipas, México (USFWS, 2013) (Fig. 5).

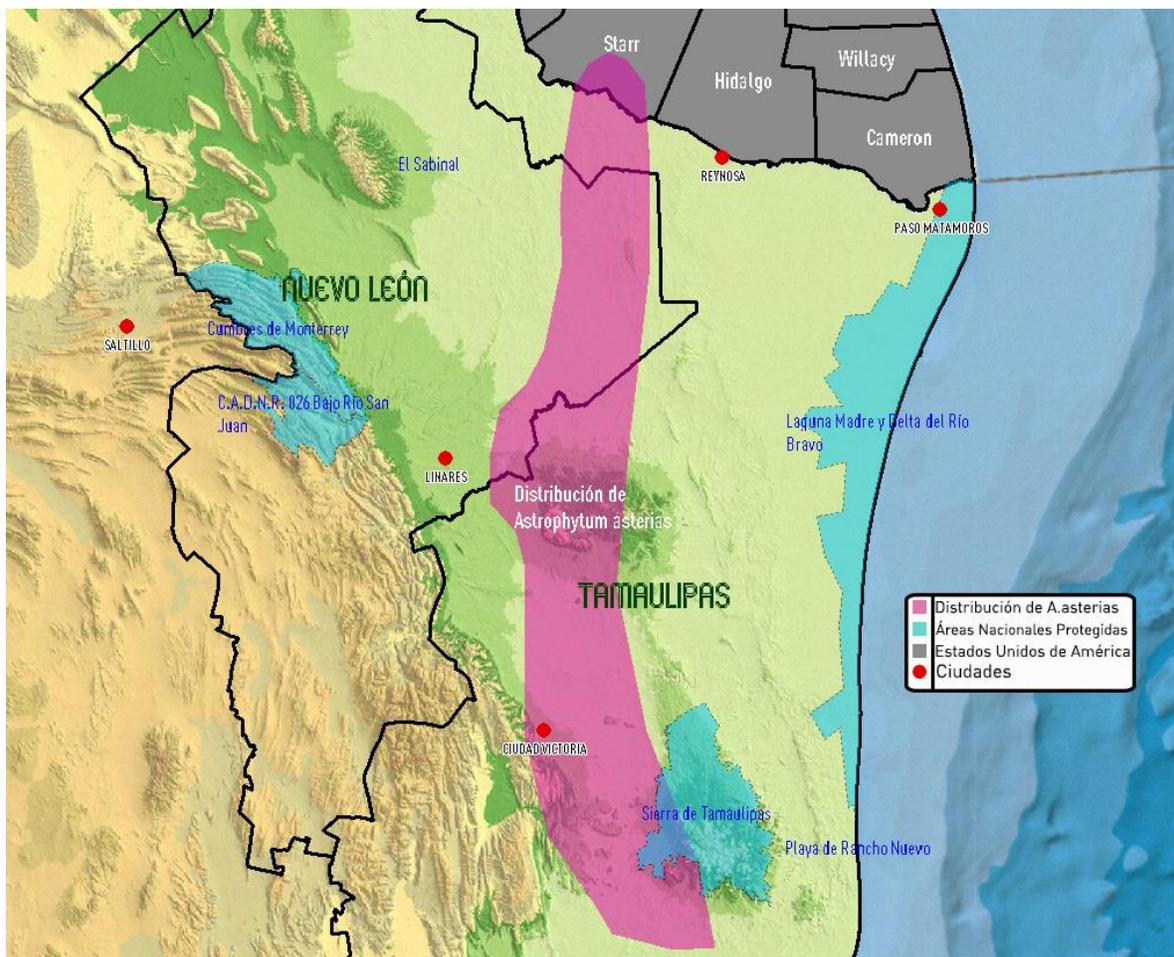


Figura 5. Distribución geográfica de *A. asterias*. Mapa realizado en Mapa digital de México 6.0 por Alejandro Gaona con datos de <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>.

Estado actual de *Astrophytum asterias*

El rango geográfico de *A. asterias* incluía las localidades de Hidalgo, Starr, Zapata y Cameron en el Sur de Texas y los estados de Nuevo León y Tamaulipas en México. Desaparecieron de Linares en Nuevo León debido a la colecta ilegal (USFWS, 2003).

Damude y Pool (1990) realizaron el primer reporte sobre el estado de la especie, poniendo en evidencia números poblacionales en descenso y amenazas antropogénicas hacia sus poblaciones naturales, fue enlistada federalmente por los Estados Unidos como en peligro de extinción desde el 18 de octubre de 1993. En 2003 la US Fish & Wildlife Service (USFWS), tomando en cuenta el estado grave de las poblaciones silvestres, propuso un plan de recuperación que proponía reclasificar a la especie como amenazada a través de la protección de poblaciones naturales y/o reintroducidas en su hábitat natural y en colecciones *ex situ* como bancos de semillas o jardines botánicos (USFWS, 2003).

Debido a esto, diversas organizaciones internacionales enlistan a *A. asterias* como amenazada. CITES la coloca en el Apéndice I; la IUCN la coloca en su lista roja como Vulnerable, categoría exclusiva de especies que están en peligro de extinción en estado silvestre debido a que sus poblaciones han experimentado una reducción de entre 30% a 50% en los últimos 10 años, una extensión de presencia estimada menor a 20,000 km² y de ocupación estimada en menos de 2,000 km², un tamaño estimado de la población menor a 10,000 individuos maduros y una probabilidad de extinción estimada de al menos, 10% en los próximos 10 años (IUCN, 2012). Asimismo, México, a través de la NOM-059-SEMARNAT-2010, la coloca en la categoría de "en peligro de extinción (P)" que se refiere a "*aquellas especies cuyas áreas de distribución o tamaño de sus poblaciones en el territorio nacional han disminuido drásticamente poniendo en riesgo su viabilidad biológica en todo su hábitat natural, debido a factores tales como la destrucción o modificación drástica del hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros*" (SEMARNAT, 2010).

Actualmente se conocen 33 sitios en donde se encuentra la especie, 24 en Starr County, Texas; siete sitios en Tamaulipas y dos en Nuevo León (USFWS, 2003 y 2013). Martínez-Ávalos *et al.* (2004) realizaron un censo y reportaron 717 individuos en el

estado de Nuevo León y 561 individuos en Tamaulipas, para un total de 1,278, con poblaciones de tamaños muy diferentes, de 10 a 704 individuos de 3.9 cm a 9.2 cm de diámetro y con una superficie total de 37,500m², es decir menos de 1% del territorio nacional. Este conteo, aunado al realizado mediante el plan de recuperación de la especie hecha por la USFWS (United States Fish and Wildlife Service) en 2013, que enlista 5,125 individuos en Texas, da como resultado un total de 6,403 individuos.

Es importante mencionar que 100% de las plantas se encuentran en tierras privadas y solamente 9 de los 24 dueños de los sitios ubicados en los Estados Unidos tienen un acuerdo de conservación, por lo que el futuro de estas poblaciones es incierto (Martínez-Ávalos *et al.*, 2004; USFWS, 2013 y 2013). En México, a pesar de tener un número mucho menor de plantas, no se tiene ningún plan de recuperación de las poblaciones naturales, o acuerdo de conservación con los dueños de las tierras en donde se encuentra la especie.

Martínez-Ávalos *et al.*, (2004) reportaron que debido a que las poblaciones siguen siendo escasas, a que están formadas por pocos individuos, que son de distribución restringida y por ser una especie muy solicitada por los coleccionistas debe seguirse considerando en la categoría de “en peligro de extinción” y permanecer en el Apéndice I de CITES.

Ya que es una cactácea de alto valor ornamental, la colecta ilegal ha afectado en gran medida a sus números poblacionales. Se reporta su cultivo desde 1930 y Clover (1932) describió su venta desde 1932. Se tienen registros de decomisos de cargamentos de hasta 400 ejemplares (USFWS, 2003). También pueden llegar a ser removidas por una confusión con el peyote (*Lophophora williamsii*), planta usada en ceremonias religiosas por algunas culturas nativas, debido a que comparten algunas zonas de distribución (Kilman, 2005).

Como parte del programa de manejo de la especie en los Estados Unidos, se han hecho algunos esfuerzos piloto de reintroducción mediante el plantado y sembrado, en su ambiente natural, de semillas, individuos jóvenes en primavera/verano y se obtuvo solamente 4% de germinación y 31% de supervivencia (Birnbaum *et al.*, 2011). Es propagada intensamente de forma

tradicional por aficionados, y en el sector comercial, las plantas tienen valores de \$50-\$100 por una planta de 4 cm de diámetro y aproximadamente 4-5 años de edad (Jair Colín y Tienda Tigridia, Com. Pers.).

Es por esto que son urgentes nuevas medidas para la conservación tanto *in situ* como *ex situ* de las especies. Y es en este punto, la conservación *ex situ*, que es posible y recomendable hacer uso del Cultivo de Tejidos Vegetales.

Cultivo de Tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una rama de la biotecnología, que hace posible propagar una gran cantidad de plantas a partir de pequeñas fracciones de tejido que pueden provenir de cualquier parte vegetativa de la planta, nos permite obtener plantas idénticas a la planta madre, en un corto tiempo y libres de patógenos en medios nutritivos bajo condiciones ambientales controladas (George *et al.*, 2008; González *et al.*, 2012). Está basado en el principio de totipotencialidad celular propuesto por Gottlieb Haberlandt en su clásico trabajo "Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen" (Haberlandt, 2003), donde sentó las bases del cultivo de células vegetales, y de cómo usar el principio de totipotencialidad para estudiar principios fisiológicos y morfológicos de las plantas (Krikorian y Berquam, 2003). También incluye técnicas y métodos usados en la investigación en múltiples disciplinas –como la transformación en biología molecular, la obtención de metabolitos secundarios o estudios fisiológicos en plantas-, y tiene muchas aplicaciones prácticas como en la propagación de plantas para aprovechamiento humano, ya sea para consumo directo o a través de la industria (Bhojwani y Razdan, 1996; George *et al.*, 2008; González *et al.*, 2012).

El CTV comprende un proceso de 5 etapas (George y Sherrington, 1984; George *et al.*, 2008; Kane, 2011; González, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013) (Fig. 6):

Etapa 0: Selección y preparación de las plantas madre y explante(s).

(Debergh y Maene, 1981; Preil, 2003; George *et al.*, 2008; Kane, 2011; González, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013)

Antes de comenzar la propagación se debe prestar atención al proceso de selección de la planta madre. La calidad del explante y de la subsecuente respuesta *in vitro* está significativamente influenciada por el estado fitosanitario, fisiológico y el genotipo de la planta donadora. En esta etapa se seleccionan las plantas madres de las cuales provendrá el explante, estas deberán encontrarse en el mejor estado posible (libres de enfermedades y con el mínimo daño posible) para que así sea posible lograr el éxito del proceso. En el caso de ser semillas en esta etapa se separan las que se encuentren en buena condición anatómica, y de ser posible se analiza su viabilidad con el tratamiento de cloruro de trifeníl tetrazolio; sin embargo habrá que considerar la cantidad de material con el que se cuente debido a que no es posible recuperar el material después de esta prueba. Asimismo es de suma importancia tener plenamente identificadas a las plantas a nivel de especie, variedad o incluso cultivar.

Etapa I: Establecimiento aséptico e iniciación de cultivos

(Debergh y Maene, 1981; Preil, 2003; George *et al.*, 2008; Kane, 2011; González, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013)

El objetivo de esta etapa es lograr la reproducibilidad al establecer asépticamente cultivos de la planta a propagar usando explantes viables. En esta etapa se elige el explante a inducir (semilla, hoja, tallo, raíz, etc.), así como el método de desinfección a utilizar, para lograr un estado aséptico de los cultivos. La elección del explante dependerá de la vía de regeneración a inducir, del objetivo del estudio y de la especie a propagar. Los explantes más comúnmente usados son secciones apicales o nodales con, al menos, una yema axilar. Por otro lado cuando el objetivo es la generación *de novo* de brotes o embriones somáticos, se pueden usar explantes de tallos, raíces, hojas o nucela. Es un paso importante porque

introduce el componente aséptico al proceso, por lo cual se trabaja en una campana de flujo laminar, con un mechero en un área totalmente aséptica. El éxito del resto del proceso depende, en gran parte, de esta etapa y su eficiencia es dependiente de la correcta elección del tipo de explante, la adecuada transferencia aséptica al medio de cultivo, de métodos adecuados de esterilización y de prevenir reacciones de estrés en el material usado, como lo pueden ser la oxidación o la necrosis de los tejidos. Esta etapa se considerará satisfactoria si un adecuado número de plantas ha sobrevivido sin contaminación y se mantiene en crecimiento.

Etapa II: Proliferación de Propágulos

(Debergh, 1981; Preil, 2003; George et al., 2008; Kane, 2011; González, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013)

El objetivo de esta etapa es lograr nuevos crecimientos en la planta o propágulos, que sean capaces de generar nuevas plantas. El suceso de un protocolo de propagación es ampliamente dependiente de la eficacia de esta etapa. Generalmente se inicia con la inducción mediante reguladores de crecimiento vegetal (RCV) como auxinas y/o citocininas; al elegir el o los RCV y su concentración, es importante considerar la posibilidad de efectos adversos que puedan tener en la sobrevivencia y enraizamiento de los brotes. Por ejemplo el uso de BAP (6-Bencilaminopurina) ha demostrado reducir los porcentajes de sobrevivencia en la Etapa IV, debido a su efecto supresor en el crecimiento radicular.

Los explantes pueden seguir tres vías (morfogenéticas) diferentes de regeneración:

- 1) Organogénesis (Tabla. 1)
- 2) Embriogénesis somática (Tabla. 3)
- 3) Activación de yemas preformadas (Tablas. 1, 2 y 3)

Los nuevos brotes se deben subcultivar periódicamente para proporcionarles medio nuevo y estimular su crecimiento. Los cultivos en esta etapa son

rutinariamente subdivididos en agrupaciones más pequeñas, brotes individualizados o segmentos nodales que sirvan para proliferaciones posteriores. Se espera que en cada subcultivo el número de brotes aumente de manera exponencial (Debergh y Maene, 1981; Preil, 2003; George *et al.*, 2008; Kane, 2011; González, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013).

Etapa III: Elongación y Enraizamiento

(Debergh y Maene, 1981; Preil, 2003; George *et al.*, 2008; Kane, 2011; González, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013)

Esta etapa puede involucrar: (1) Elongación de brotes previa al enraizamiento, (2) Enraizamiento de brotes individuales o agrupaciones de estos o (3) Preparación de cultivos para incrementar la supervivencia *ex vitro*. Tallos formados a través de organogénesis directa o indirecta, o de la activación de yemas preformadas requieren un paso adicional de enraizamiento o elongación para poder completar la formación de plantas completas; estas aún no son capaces de soportar su crecimiento en suelo, por lo cual en esta etapa se toman los pasos necesarios para que las plantas puedan realizar fotosíntesis por sí mismas y sin ninguna fuente exógena de carbohidratos. Los brotes obtenidos como resultado de la selección, el establecimiento y la inducción de las etapas anteriores se deben individualizar, elongar y enraizar para lograr plántulas y facilitar su establecimiento en el medio *ex vitro*. En el caso de que la vía de regeneración lograda haya sido la embriogénesis somática, es en esta etapa en donde se lleva a cabo la germinación de los embriones somáticos.

Se utilizan medios libres de RCV o con bajas concentraciones de citocininas para permitir la formación de raíces y la elongación de los brotes; también se pueden usar medios con auxinas para facilitar el enraizamiento. Esta etapa es intensiva y representa 70% del precio total de una planta micropropagada, por lo cual se deben buscar porcentajes altos de enraizamiento, de ser posible mayores a 95%.

Etapa IV: Trasplante y Aclimatización

(Debergh y Maene, 1981; Preil, 2003; George *et al.*, 2008; Kane, 2011; González, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013)

El éxito final de un protocolo depende de poder lograr la aclimatización del material obtenido, por lo cual, lograr la aclimatización es el máximo objetivo de un protocolo de propagación mediante CTV enfocado en la conservación *ex situ*. Ya que es en esta etapa en la que se logran plantas completas y adaptadas al medio *ex vitro*. Sin embargo, no es fácil de lograr ya que las plantas que se encuentran en cultivo *in vitro* están en un medio rico en nutrientes, en un ambiente con humedad alta, expuestas a luz artificial, con la temperatura controlada y pobre intercambio gaseoso. Este ambiente provoca en las plantas una serie de trastornos anatómicos, fisiológicos, morfológicos y citológicos -como una condición heterotrófica, pobre formación de cutícula, poca cera, estomas anormalmente grandes y abiertos todo el tiempo, pobre conexión vascular entre tallos y raíces, poca diferenciación del tejido mesófilo y cloroplastos pobremente desarrollados y con poca clorofila- que generan una pérdida excesiva de agua *ex vitro*, por lo cual esta adaptación no es fácil. Debido a esto se recomienda llevar este proceso de forma gradual, de no ser así esta etapa puede resultar en una gran pérdida del material obtenido en pasos anteriores, para poderle permitir a la planta una aclimatización gradual que no provoque condiciones de estrés.

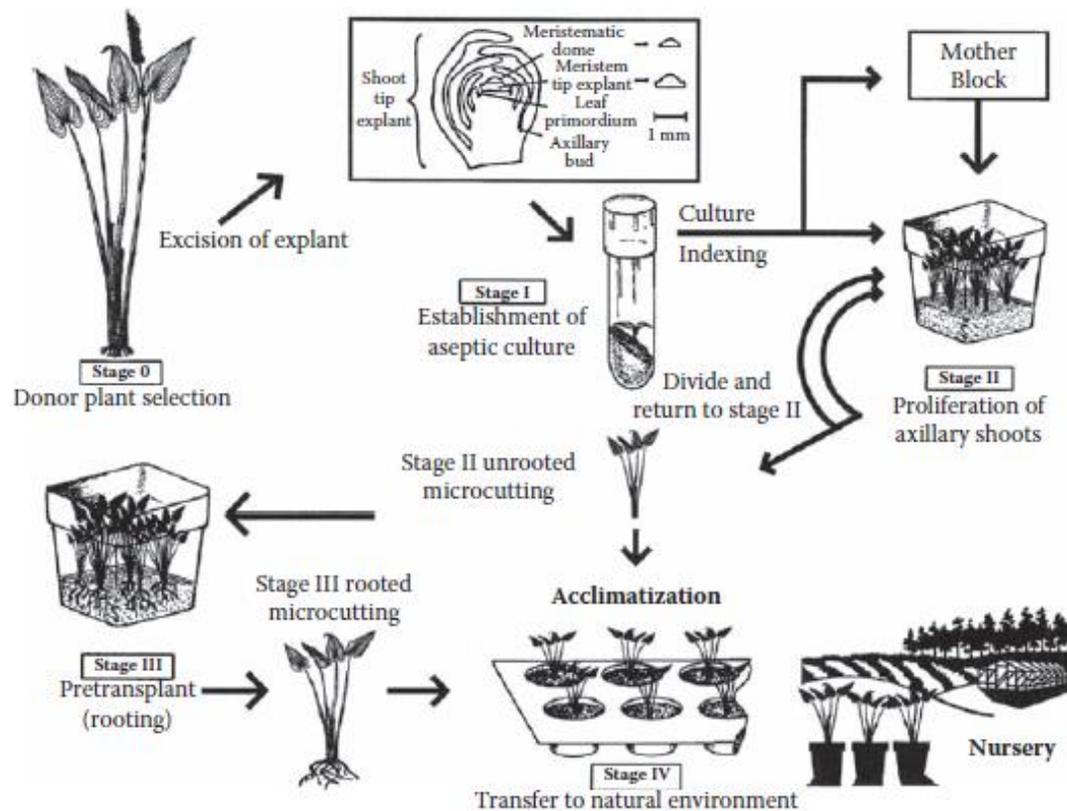


Figura 6. Diferentes etapas del Cultivo de Tejidos Vegetales. (Tomado de Kane, 2011, p. 183).

Organogénesis

Es la formación de órganos adventicios como tallos, hojas o raíces que, en respuesta a un estímulo hormonal, conlleva una serie de pasos (González, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013):

- Lograr competencia en las células para que puedan responder a los tratamientos con RCV.

- Inducir a las células competentes a formar un órgano específico, una vez inducidas las células se vuelven irreversiblemente comprometidas a formar el órgano incluso si el tratamiento con RCV es retirado.

A los tejidos capaces de producir una nueva estructura se les llama organogénicos, debido a que es posible generar *de novo* tallos (caulogénesis) y raíces (rizogénesis) con ellos; la formación de hojas *in vitro* generalmente conlleva la presencia de meristemas laterales, aunque a veces estas hojas aparecen sin una aparente formación de tallo, por lo cual hay opiniones divididas acerca de si estas

hojas surgieron *de novo* o son el resultado de un meristemo lateral que falló al surgir (George *et al.*, 2008).

-Organogénesis Directa

Es el tipo de organogénesis que implica el surgimiento de órganos adventicios directamente de los tejidos del explante, es decir, sin pasar por una etapa intermedia de callo (George *et al.*, 2008). Este tipo de organogénesis depende directamente del genotipo de la planta madre y de la naturaleza del explante inicial (Kane, 2011) (Tabla 1).

-Organogénesis Indirecta

La organogénesis indirecta, no meristemática o adventicia es la formación *de novo* de órganos a partir de tejidos ya diferenciados (Geneve, 2011). El callo es una masa irregular de células parenquimatosas con loci (sitios) meristemáticos, que no cuenta con una estructura organizada pero comúnmente muestra diferenciación celular, en su mayoría elementos traqueidales y está conformado por diferentes tipos celulares (Bhojwani y Dantu, 2013). Esta heterogeneidad es derivada del/los explantes multicelulares usados para formarlo y/o inducida por las condiciones del cultivo. El callo derivado de un mismo explante puede mostrar una gran variación en color, textura, cantidad de agua, densidad celular, y potencial quimiosintético y/o morfogenético (Bhojwani y Dantu, 2013). La organogénesis Indirecta se refiere a la formación de callo antes de la aparición de los nuevos órganos. Debido a la frecuente y periódica propagación del callo es un riesgo probable que los brotes resultantes sean diferentes genéticamente a la planta madre, debido a la variación somaclonal (variación genética); aunque esto depende directamente del explante empleado y de si este es o no, estable genéticamente (George *et al.*, 2008) (Tabla 1).

-Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual células somáticas se diferencian en embriones somáticos, estos se parecen morfológicamente a los embriones cigóticos, son bipolares y cuentan con órganos típicos de un embrión cigótico (George *et al.*, 2008). La embriogénesis somática es una vía de

micropropagación que, potencialmente y desde un punto de vista utilitario, da como resultado la tasa más alta de multiplicación. Esta vía demuestra el principio de totipotencialidad celular, ya que una sola célula se diferencia para formar un embrión somático (no es resultado de la unión de gametos), a diferencia de la organogénesis en la que grupos de células pueden intervenir en la formación del brote (Lema-Ruminska y Kulus, 2014). Los embriones somáticos son muy parecidos morfológicamente a embriones cigóticos formados en semillas, difieren, sin embargo, genéticamente ya que los embriones somáticos son clones genéticamente idénticos a la planta madre (Lema-Ruminska y Kulus, 2014). Y dado que son estructuras bipolares, no es necesario el proceso de enraizamiento (Tablas 1 y 2).

Medios de Cultivo

El medio de cultivo tiene una importancia muy grande en el CTV debido a que los tejidos y órganos vegetales usados son cultivados en un medio artificial, que debe suplir los nutrimentos necesarios para el crecimiento. Por lo cual el éxito del CTV como vehículo de propagación es altamente influenciado por el genotipo del material, las condiciones establecidas y la composición del medio de cultivo, este último es el más fácil de manipular (George *et al.*, 2008; Bhojwani y Dantu, 2013). La composición del medio es variable pero normalmente incluye elementos inorgánicos en abundantes cantidades o Macronutrientes (N, K, Ca, P, Mg y S), en cantidades traza o Micronutrientes (Fe, Ni, Cl, Mn, Zn, B, Cu y Mo), compuestos orgánicos (Vitaminas-aminoácidos), una fuente de carbono (Fructosa, Sacarosa), un gelificante (agar, agarosa, Gellan gum, Gel-rite) y RCV (Auxinas, Citocininas) (George *et al.*, 2008; Bhojwani y Dantu, 2013).

-Medio Murashige y Skoog (MS) (1962)

Es el medio más comúnmente usado en CTV cuando el objetivo es la regeneración. Fue formulado para el crecimiento óptimo de callo de tabaco, su desarrollo involucró varias curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de minerales esenciales. Es un medio alto en Cloro y Molibdeno, y bajo en Cobre, Calcio, Fósforo y Magnesio, en comparación a las cantidades encontradas en tallos de plantas consideradas como suficientes para un adecuado crecimiento (Murashige y

Skoog, 1962; George *et al.*, 2008). Es un medio con alto contenido en sales de Potasio y Nitrógeno, por lo cual provee de una alta tasa de crecimiento, una mejor respuesta a factores orgánicos y una mínima interferencia entre los componentes orgánicos e inorgánicos, por lo cual se considera adecuado para muchas especies y aplicaciones (Murashige y Skoog, 1962; Beyl, 2011).

Reguladores de Crecimiento Vegetal

Los RCV son moléculas orgánicas que regulan el crecimiento y desarrollo, son cruciales para el ciclo de vida de cualquier planta, los mutantes sin auxinas o citocininas no han sido encontrados, sugiriendo que su ausencia es letal (Taiz y Zeiger, 2010; Beyl, 2011). En el CTV son principalmente usadas auxinas y citocininas (George *et al.*, 2008). La cantidad y proporción de auxinas/citocininas, permiten dirigir las respuestas morfogénéticas -raíces, tallos, callo- deseadas en las células (Taiz y Zeiger, 2010; Beyl, 2011).

-Auxinas

Su nombre proviene del griego *auxein* que significa alargar, crecer (George *et al.*, 2008). Las caracteriza el tener un anillo aromático separado de un grupo carboxilo (Fig. 7) y son sintetizadas principalmente en los meristemos, hojas jóvenes y frutos/semillas (Taiz y Zeiger, 2010; Beyl, 2011). La auxina natural más comúnmente detectada en plantas es AIA (ácido indol-3-acético), aunque también se han encontrado 4-cloro-AIA y AIB (ácido indol-3-butírico) (George *et al.*, 2008). Son responsables de la división y elongación celular y de entrenudos, promueven, en combinación con citocininas, el crecimiento de callo, suspensiones celulares y órganos, y también regulan la respuesta morfogénica (George *et al.*, 2008; Bhojwani y Dantu, 2013). Las auxinas sintéticas más usadas son ANA (ácido a-naftalenacético) y AIB (también encontrada naturalmente), y auxinas fuertes como el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), dicamba y picloram (Bhojwani y Dantu, 2013). ANA es un RCV usado principalmente cuando se requiere de promover la morfogénesis, así como en el cultivo de tallos; al ser una auxina sintética es muy estable por lo cual permanece latente en el medio de cultivo (George *et al.*, 2008). Son usadas en un gran intervalo de concentraciones, desde 0.1 mg/l hasta 26 mg/l (Tabla 1).

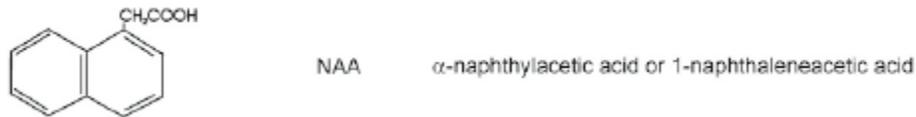


Figura 7. Estructura de la auxina ANA. (George et al., 2008, p. 180).

-Citocininas

En la naturaleza promueven la división celular, el retraso de la senescencia, desarrollo de cloroplastos, desarrollo vascular, intervienen en la modificación de la dominancia apical y la diferenciación del tallo (George *et al.*, 2008; Beyl, 2011; Bhojwani y Dantu, 2013). Las citocininas naturales, como la trans-zeatina, la 2iP (2-isopenteniladenina), y la dihidrozeatina, son moléculas derivadas de la adenina N⁶ sustituidas en el anillo purínico y se encuentran en las plantas como nucleósidos o nucleótidos, son sintetizadas en las raíces, aunque se ha visto que tejidos jóvenes son capaces de sintetizar citocininas (George *et al.*, 2008; Bhojwani y Dantu, 2013).

Las sintéticas como el TDZ (tidiazuron) o la difenilurea son derivadas de la fenilurea, se usan en CTV para mitigar la dominancia apical, disparar la división celular y para inducir la diferenciación de brotes adventicios (en sinergia con auxinas) desde callo y órganos, así como para inducir el desarrollo de yemas preformadas (Bhojwani y Dantu, 2013). Las citocininas más comúnmente usadas son la Kinetina (KIN, N⁶-furfuriladenina), BAP, 2iP, Zeatina (6-[4-hidroxi-3-metil but-2-enilamino]-purina) y TDZ (George *et al.*, 2008; Bhojwani y Dantu, 2013). La citocinina más eficiente y más usada en CTV es BAP, usada en el rango 1-10 μ M/0.1-2 mg/l, seguida de KIN usada en el mismo rango (Beyl, 2011) (Tabla 1 y Fig. 8). Estas han probado ser eficientes al estimular proliferación de brotes y formación de callo en especies leñosas y herbáceas (Beyl, 2011).

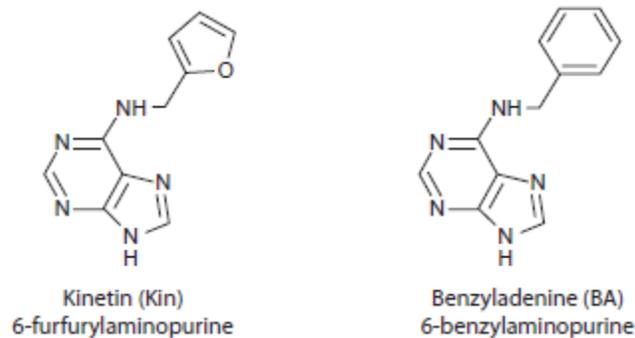


Figura 8. Estructura de las citocininas Kinetina y BAP. (Beyl, 2011, p. 38).

Aclimatización

Las condiciones físicas típicas de propagación como son una alta humedad, iluminación no adecuada, niveles bajos de CO₂, altos niveles de carbono en el medio y la presencia de RCV generan que plantas obtenidas mediante el CTV tengan varias deficiencias anatómicas, fisiológicas y morfológicas que impiden su correcta transición al medio *ex vitro* (Laforge et al., 1991; Kane, 2011; Osório et al., 2012). Sin embargo es necesario mencionar que las estructuras con estas deficiencias también pueden servir como reservorio de nutrientes para las nuevas estructuras, por lo cual cualquier intento de mejorar las reservas de las plantas *in vitro* debería mejorar la eficiencia de aclimatización (Laforge et al., 1991; Kane, 2011; Osório et al., 2012). La aclimatización es una etapa crucial para poder superar el estrés fisiológico impuesto por las condiciones *in vitro* y para poder garantizar el desarrollo de nuevas estructuras autótrofas que sean capaces de soportar las condiciones "normales" encontradas en el exterior (Pospíšilova et al., 1999; Carvalho y Amâncio, 2002).

Las plantas transferidas desde el ambiente *in vitro* a condiciones de invernadero o de campo experimentan una rápida pérdida de agua debido al ineficiente control de la transpiración (Osório et al., 2012). Para superar estas limitaciones, generalmente, las plantas son transferidas a sustrato esterilizado y bien drenado, son mantenidas a una alta humedad ambiental, luz reducida y una temperatura de 20-27°C, también pueden ser transferidas a un ambiente con mayor cantidad

de CO₂ (Carvalho y Amâncio, 2002; Kane 2011). La humedad es reducida gradualmente, hasta llegar al nivel ambiental, en un periodo de 1-4 semanas y puede ser mantenida de muchas formas como con cubiertas de humedad, domos plásticos, asperjado regular y sistemas de niebla (Kane, 2011). Las plantas pueden ser movidas, gradualmente, a intensidades de luz más altas para promover crecimiento vigoroso (Kane, 2011). El tiempo de aclimatización es variable y es muy dependiente de la especie con la que se esté trabajando, y del ritmo al que la especie sea capaz de generar nuevas estructuras ya adaptadas al medio exterior mientras las antiguas estructuras le proveen de carbohidratos almacenados en ellas (Kane, 2011).

Hiperhidratación

La hiperhidratación es un desorden morfológico y fisiológico caracterizado por un aumento de agua al interior de las células de tejidos, es causado por una desviación de carbohidratos de las rutas de síntesis de lignina y celulosa hacia la síntesis de aminoácidos (Pâques, 1991; Reyes-Vera *et al.*, 2008). Puede encontrarse en tallos, hojas, o incluso en callo, es uno de los principales problemas para el desarrollo de un protocolo de propagación mediante CTV, ya que puede provocar hasta 60% de pérdidas de material (Pâques, 1991). Los tejidos hiperhidratados son caracterizados por una apariencia vítrea, hojas y tallos translúcidos y la distorsión de órganos vegetales (Brand, 1993). Son diversos los factores que pueden promover la hiperhidratación, pero los principales son: el agente gelificante, al ser el principal modificador del potencial osmótico del medio, el uso de citocininas, la composición mineral del medio, en especial de amonio y el porcentaje de humedad relativa (que está estrechamente relacionado con la acumulación de amonio en el recipiente contenedor) (Pâques, 1991; Ziv, 1991).

Se han propuesto diversas formas de encarar la hiperhidratación, pero las más utilizadas son: reducir la temperatura y humedad ambiental de los cultivos (Kadleček *et al.*, 2001; Reyes-Vera *et al.*, 2008), reducir la concentración de citocininas y de iones de amonio en el medio (Brand, 1993), la sustitución completa de la fuente de nitrógeno (Mayor, 2003; Reyes-Vera *et al.*, 2008) y el aumento en la concentración de agar (Brand, 1993).

-SUN CAPS® (Sigma®)

Otro de los grandes problemas del cultivo *in vitro* es la aireación del recipiente contenedor, contar con un recipiente cerrado ayuda a prevenir la contaminación, pero limita el intercambio gaseoso, la disponibilidad de CO₂ y promueve la acumulación de etileno (Kadleček *et al.*, 2001). Hay varias alternativas para preparar a las plantas cuando aún se encuentran *in vitro* como: 1) la reducción de la humedad ambiental, usando tapas permeables al vapor de agua o por enfriamiento de la parte inferior del frasco; 2) incrementando la radiación; o 3) incrementando la concentración de CO₂ por ventilación forzada. Sin embargo estos procedimientos pueden llevar a un secado más rápido del medio de cultivo y a una incapacidad en el crecimiento de las plántulas (Pospíšilova *et al.*, 1999).

Las SUN CAPS® (Sigma®) son películas de polipropileno usadas como tapas, cuentan con un filtro de 0.02µm, son permeables a gases, lo que permite que CO₂, vapor de agua y etileno puedan salir y entrar del recipiente contenedor y han sido usadas con éxito en el tratamiento preaclimatización en especies de plantas como tabaco, clavel y papaya (Lai *et al.*, 1998; Pospíšilova *et al.*, 1999; Kadleček *et al.*, 2001; Majada *et al.*, 2001). Asimismo, debido al intercambio gaseoso y a la menor humedad ambiental pueden ayudar en el tratamiento de plantas hiperhidratadas. Estudios han demostrado que la distribución y abundancia de estomas, la presencia de ceras, y el funcionamiento de estomas mejora en función de la ventilación disponible (Majada *et al.*, 2001).

Dominancia Apical

Otro factor no muy discutido en la propagación mediante CTV, sobre todo el relacionado con la activación de yemas axilares, es la dominancia apical. La dominancia apical es la inhibición indirecta del crecimiento de brotes axilares, a través del movimiento basipétalo de las auxinas sintetizadas en el ápice, y de diversas señales como las estrigolactonas, por lo cual la remoción del ápice genera brotes laterales (Taiz y Zeiger, 2010; Brewer, 2009; Durbak *et al.*, 2012). Plantas con una fuerte dominancia apical, como el maíz, se caracterizan por tener un solo eje de crecimiento con pocos o nulos brotes laterales (Taiz y Zeiger, 2010).

Las auxinas regulan la diferenciación y organogénesis vegetal (en conjunción con citocininas que actúan modificando o estimulando la síntesis y el transporte de auxinas), los sitios de crecimiento e iniciación de órganos son caracterizados por tener una alta concentración de auxinas (Durbak *et al.*, 2012). Cline (1996) en su estudio sobre el efecto de auxinas endógenas en el surgimiento de brotes laterales con 10 especies de plantas, definió como “con fuerte dominancia apical” a las plantas que, en un estado intacto, tenían poca o nula brotación lateral. Ramírez Serrano y Teixeira (2008) mencionan que en cactáceas que presentan un crecimiento monopódico, es la producción de auxinas endógenas la que mantiene el control de dominancia en las aréolas subyacentes (Fig. 9). Bajo estos parámetros la planta utilizada en este estudio, *A. asterias*, tiene una fuerte dominancia apical provocada por un alto contenido de auxinas endógenas.

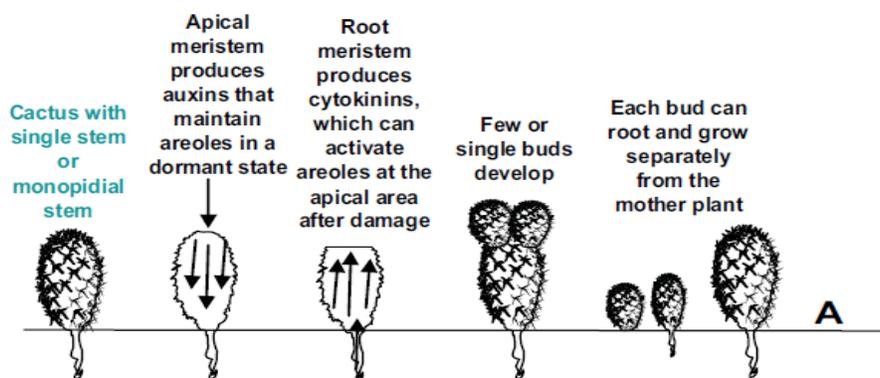


Figura 9. Esquema del crecimiento de cactácea con crecimiento monopódico (que no ramifican), en donde las auxinas tienen un control absoluto del estado de dominancia de las aréolas. (Ramírez- Serrano y Teixeira, 2008, p. 221).

Algunas opciones para terminar con la dominancia apical serían: retirar o lesionar el ápice, aumentar la concentración de citocininas, la utilización de bloqueadores del transporte polar de auxinas.

Cultivo de Tejidos Vegetales en Cactaceae

King (1957) fue el primero en usar esta herramienta en cactáceas, a partir de esta fecha, se ha usado el CTV en cactáceas para muchos fines como: producción de metabolitos, ingeniería genética y micropropagación por organogénesis, activación de yemas preformadas o embriogénesis somática (Tabla. 1) (Lema-Ruminska y Kulus, 2014).

El medio de cultivo más utilizado para la regeneración *in vitro* de cactáceas es el diseñado por Murashige y Skoog (1962) abreviado como MS. Debido a la morfología única de las cactáceas la forma de regeneración más utilizada es la activación de yemas axilares mediante la activación de meristemas ya existentes en ellas, las aréolas. Debido a esto los RCV más usados han sido las citocininas en concentraciones relativamente altas (BAP, KIN) en combinación con auxinas (ANA, AIA) o en ausencia de estas. Los resultados obtenidos han sido diversos desde la obtención de brotes mediante organogénesis directa e indirecta, la obtención de embriones somáticos, hasta la obtención de un protocolo de alta eficiencia que permitiría obtener 10,000 plantas en 150 días en *Coryphantha elephantidens* (Bhau y Wakhlu, 2015); lo que demuestra que es posible la propagación masiva de cactáceas mediante CTV. Diversos ejemplos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Algunos reportes de CTV en cactáceas. I/II-Apéndice I/II de CITES. A-Amenazada, P- En peligro de extinción, Pr-Sujeta a protección especial. LC-Preocupación Menor, NT-Casi amenazada, VU-Vulnerable, EN-En Peligro, CE-En peligro crítico. PBZ-Paclobutrazol, PUT-Putrescina.

Especie	Categoría (CITES/N OM-059-SEMARNA T-2010/IUC N)	Explante(s)	Medio + Combinación de RCV (mg/l)	Objetivo	Respuesta	Referencia
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	I/Pr/NT	Tubérculos plantas <i>in vitro</i>	MS + BAP 0,1,2,5 y ANA 0,0.1,0.5 y 1	Organogénesis y Embriogénesis somática	Brotos y embriones somáticos	Moebius-Goldammer <i>et al.</i> , 2003.
<i>Copiapoa humilis spp. tenuissima</i>	II/-/NT	Tubérculos planta <i>ex vitro</i>	MS +2,4-D 2; BAP 3, ANA 3 y AIA 0.57; ABA 0.02, 0. 2, 2 y 26	Embriogénesis somática	Embriones somáticos	Lema-Ruminska <i>et al.</i> , 2013.
<i>Coryphantha elephantidens</i>	II/A/LC	Ápices, partes medias (longitudinales y transversales) plántulas completas <i>ex vitro</i>	MS +BAP,K 0.1-2 y ANA,AIA, AIB 0.1-1	Protocolo de alta eficiencia	10,000 plantas en 150 días	Bhau y Wakhlu, 2015.
<i>Echinocactus grusonii</i>	II/P/EN	Plántulas <i>in vitro</i>	MS+ BAP 0.2, 0.4 y 0.6; 2-4D 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8; BAP 0.5, ANA 0.1.	Inducción de callo, Organogénesis y RAPD	Organogénesis indirecta	El-Kazzaz <i>et al.</i> , 1999.
<i>Epithelantha micromeris</i>	II/Pr/-	Plántulas <i>in vitro</i>	MS+ AG ₃ 3; BAP 0.1-0.65, KIN 0.1-1 y AIB 0.01-0.9, ANA 0.03-0.02.	Organogénesis	Organogénesis directa	Villavicencio <i>et al.</i> , 2012.
<i>Mammillaria albicoma</i>	II/Pr/EN	Meristemos florales	MS + BAP 5 y ANA 0.1	Organogénesis	Organogénesis indirecta	Wyka <i>et al.</i> , 2006.
<i>Mammillaria elongata</i>	II/-/LC	Ápices, partes medias y basales de plantas <i>ex vitro</i> (2 años)	MS + BAP 5 y ANA 0.03	Organogénesis	Organogénesis indirecta	Papafotiou <i>et al.</i> , 2001.
<i>Mammillaria hahniana ssp. woodsii</i>	II/A/NT	Médula de plantas <i>ex vitro</i> (2 años)	MS + AIA 2 y KIN 2	Organogénesis	Organogénesis indirecta	Kolář <i>et al.</i> , 1975
<i>Mammillaria gracilis</i>	II/-/-	Plántulas <i>in vitro</i>	MS	Estudio del estrés oxidativo	Organogénesis directa sin RCV	Balen <i>et al.</i> , 2009
<i>Mammillaria schiedeana</i>	II/A/V	Plántulas <i>in vitro</i>	MS + BAP 0, 0.5, 1, 2 y ANA 0.1	Organogénesis	Organogénesis directa	Soria-Campos <i>et al.</i> , 2013
<i>Melocactus glaucescens</i>	I/-/EN	Brotos <i>in vitro</i>	Tierra negra, Tierra y arena (2:1,1:1)	Influencia del sustrato en aclimatación	90%> de supervivencia	Vitória <i>et al.</i> , 2010
<i>Obregonia denegrii</i>	I/A/EN	Ápices, tubérculos, y	MS + 0.5; BAP 1 y ANA 2, BAP 1 y ANA 0.2, TDZ 0.2	Organogénesis	Organogénesis directa, CPPU con	Cardarelli <i>et al.</i> , 2010

		raíces de Plántulas <i>in vitro</i>	y ANA 0.1, TDZ 2 y ANA 0.1; Put 0.08, AgNO ₃ 1.7, y CPPU 12.1		mayor efectividad.	
<i>Parodia magnifica</i>	II/-/EN	Costillas de plantas <i>ex vitro</i> e hipocótilos de plantas <i>in vitro</i>	MS + 2,4-D 0.1, BAP 1; BAP 5	Organogénesis	Organogénesis indirecta	De Medeiros <i>et al.</i> , 2006
<i>Pelecypora aselliformis</i>	I/Pr/LC	Apicales y transversales de plántulas <i>in vitro</i>	MS + BAP 2+ 50 g/l sacarosa	Organogénesis	Organogénesis directa e indirecta	Molphe-Balch y Dávila., 2002
<i>Rebutia canigueralli</i> (<i>Sulcorebutia alba</i>)	II/-/LC	Segmentos con 3 aréolas de plántulas <i>in vitro</i>	MS (micronutrientes al 150%) + BAP 0.25-1	Activación aréolar	Organogénesis directa de origen axilar	Dabekausen <i>et al.</i> , 1991
<i>Turbincarpus laui</i>	I/Pr/CE	Plántulas <i>in vitro</i>	MS + BAP 2, 3 y ANA 0, 0.5	Organogénesis	Organogénesis indirecta	Mata <i>et al.</i> , 2001
<i>Turbincarpus valdezianus</i>	I/Pr/VU	Partes cilíndricas de Plántulas <i>in vitro</i>	MS+KIN 1; PBZ 3.4, PCa 1, SA 1 y AB 1	Control de hiperhidricidad	Pérdida total de hiperhidricidad con PBZ	García-Osuna <i>et al.</i> , 2011

Cultivo de Tejidos Vegetales en *Astrophytum*

Se tienen pocos registros de estudios en *Astrophytum* mediante CTV (Tabla 2). La especie más estudiada es *A. myriostigma* de la que hay reportes de regeneración (Molphe-Balch *et al.*, 1998; Chablé *et al.*, 2006; Álvarez y Chablé, 2009), de análisis de crecimiento según el regulador o medio (Santos *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2014) y de análisis fitoquímico (Garza, 2010). En *A. caput-medusae*, dos investigaciones en donde se obtuvo organogénesis (Hernández-Alva, 2013 y Camargo, 2017); de *A. capricorne* solo se registra un estudio, en el que se obtuvo organogénesis utilizando meristemas apicales (Cárdenas *et al.*, 1993). Finalmente, de *A. ornatum* solo se encuentra un estudio de regeneración *in vitro*, realizado con plántulas generadas *in vitro*, obteniendo organogénesis (Mendoza, 2007). La tabla 2 demuestra que el BAP y la KIN (en concentraciones de 0.1-2 mg/l), en el caso de las citocininas, y ANA y AIA (en concentraciones de 0.08-0.5 mg/l), en las auxinas, han sido los RCV más usados y que mejor respuesta han demostrado tener en investigaciones donde se buscaban respuestas organogénicas con el género.

Tabla 2. Trabajos sobre el género *Astrophytum*. Lemaire 1839. En CTV. I/II-Apéndice I/II de CITES. A-Amenazada, P- En peligro de extinción, Pr-Sujeta a protección especial. LC-Preocupación Menor, NT-Casi amenazada, VU-Vulnerable, EN-En Peligro, CE-En peligro crítico, CR-En peligro crítico.

Especie	Categoría (CITES/NO M-059-SEMARNAT - 2010/IUCN)	Explant(s)	Medio + Combinación de RCV (mg/l)	Objetivo	Respuesta	Referencia
<i>Astrophytum capricorne</i>	II/A/LC	Meristemo apical	MS + BAP 3 y 2,4-D 0.2	Organogénesis	Brotes	Comparán-Sánchez y Luna-Martínez, 2004.
<i>Astrophytum caput-medusae</i>	II/P/CR	Plántulas <i>in vitro</i>	MS 50% + BAP 0, 0.5, 1 y 2, ANA 0, 0.1 y 0.5	Organogénesis	Brotes	Hernández-Alva, 2013.
<i>Astrophytum caput-medusae</i>	II/P/CR	Plántulas <i>in vitro</i> y Tubérculos de plantas <i>ex vitro</i>	MS 50%, 100% + BAP 0, 0.1, 1 y 2; ANA 0, 0.1, 0.5 y 1. En puentes de papel	Organogénesis	Organogénesis directa y callo	Camargo, 2017.
<i>Astrophytum myriostigma</i>	II/A/LC	Segmentos de tallo de plantas <i>ex vitro</i> (2-3 años)	MS + BAP 1 y ANA 0.01	Organogénesis	Brotes	Molphe-Balch <i>et al.</i> , 1998
<i>Astrophytum myriostigma</i>	II/A/LC	Segmentos longitudinales de plántulas <i>in vitro</i>	MS Cacl 200%+ Kin 0.5, 1 y 2	Organogénesis	Brotes	Santos <i>et al.</i> , 2001
<i>Astrophytum myriostigma</i>	II/A/LC	Plántulas <i>in vitro</i>	MS 50% + KIN 0.5, BAP 1 y AIA 0.1, KIN 2 y AIA 0.08, KIN 2 y AIA 0.2, KIN 2 y AIA 0.5	Organogénesis	Brotes	Chablé <i>et al.</i> , 2006
<i>Astrophytum myriostigma</i>	II/A/LC	Embriones inmaduros de plantas <i>ex vitro</i>	MS + BAP 1, 1.5, 2 y AIA 0.08, 0.5, 1	Formación de Callo	Callo	Álvarez y Chablé, 2009
<i>Astrophytum ornatum</i>	II/A/VU	Plántulas <i>in vitro</i>	MS + BAP 0, 1, 2 y ANA 0, 0.5, 1; K 0, 1, 2 y 2,4-D 0, 0.5, 1.	Organogénesis	Callo, Brotes y activación aréolar	Mendoza, 2007

Cultivo de Tejidos Vegetales en *Astrophytum asterias*

Lema-Ruminska y Kulus (2012) estudiaron embriogénesis somática en diferentes condiciones de luz y diferentes concentraciones del RCV 2,4-D. Lizalde-Viramontes *et al.*, (2003) y Mancilla (2014), obtuvieron activación aréolar y organogénesis respectivamente. Es necesario resaltar que los trabajos mostrados en la tabla 3, son los únicos trabajos encontrados que relacionen al CTV y la especie en peligro de extinción *A. asterias*. Por lo cual son necesarios más estudios de CTV para el género y la especie.

Tabla 3 Reportes sobre la regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias*. I/II-Apéndice I/II de CITES. A-Amenazada, P- En peligro de extinción, Pr-Sujeta a protección especial. LC-Preocupación Menor, NT-Casi amenazada, VU-Vulnerable, EN-En Peligro, CE-En peligro crítico.

Especie	Categoría (CITES/NO M-059-SEMARNA T-2010/IUCN I/IUCN)	Explante(s)	Medio + Combinación de RCV (mg/l)	Objetivo	Respuesta	Referencia
<i>Astrophytum asterias</i>	I/P/VU	Plántulas germinadas <i>in vitro</i>	MS + BAP 0.5 y ATIB 1	Organogénesis	Activación aréolar	Lizalde-Viramontes <i>et al.</i> , 2003
<i>Astrophytum asterias</i>	I/P/VU	Secciones longitudinales de plántulas <i>in vitro</i> .	MS + 2,4-D 5, 7, 10	Embriogénesis somática en luz y oscuridad	Embriones en el tratamiento con luz	Lema-Ruminska y Kulus 2012
<i>Astrophytum asterias</i>	I/P/VU	Ápices e hipocótilos de plantas germinadas <i>in vitro</i> .	MS 50%, Peter's y Control + ANA 0, 0.1 y 0.5 y BAP 0, 1 y 2.	Obtener plantas completas a través de organogénesis	Brotos.	Mancilla., 2014

JUSTIFICACIÓN

Astrophytum asterias es una especie seriamente amenazada por el cambio de uso de suelo, la destrucción de su hábitat, la fragmentación de sus poblaciones y la colecta ilegal. Es endémica de una pequeña porción del sur de Texas (EU) y de Nuevo León y Tamaulipas (México). Tiene un gran potencial ornamental. Cuenta con un ciclo de vida, maduración y crecimiento lento, lo cual limita las posibilidades de conservación.

Cuenta con limitantes naturales ya que su maduración se da hasta los 5 años, no es autocompatible y no tiene capacidad de reproducción vegetativa, por lo cual las estrategias tradicionales de propagación en cactáceas no son suficientes para una especie que cuenta con cerca de 6500 individuos distribuidos de forma muy restringida en el medio silvestre, y con un alta demanda en el mercado tanto legal como ilegal.

Anteriormente, el CTV ha demostrado la propagación masiva de una cactácea con restricciones biológicas para su propagación tradicional como *A. asterias*, por lo que el presente estudio establece una alternativa para ayudar en la conservación de esta especie mediante el desarrollo de un protocolo de propagación in vitro que permita reproducirla, para cubrir la demanda de plantas, almacenamiento de germoplasma y ayudar en el conocimiento de su biología.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Lograr condiciones que permitan la regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias*.

Objetivos Particulares

- Lograr la germinación *in vitro* de semillas de *A. asterias*.
- Determinar el tipo de explante con mayor capacidad regenerativa.
- Evaluar la respuesta morfogénica de explantes de ápices, hipocótilos y raíces de plántulas de semillas germinadas *in vitro* en diferentes concentraciones y combinaciones de ANA/BAP y ANA/K.
- Lograr la regeneración *in vitro* de plantas completas.
- Enraizar brotes regenerados de *A. asterias*.
- Aclimatizar plantas regeneradas *in vitro* a condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se contó con 41 semillas de *Astrophytum asterias* procedentes de frutos maduros obtenidos de una planta de la colección del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. Las semillas fueron recolectadas del ejemplar el día 1 Agosto 2014 y fueron resultado de polinización xenogámica, todas provenían del mismo fruto y se mantuvieron en un sobre de papel a temperatura ambiente, desde la colecta hasta la desinfección y posterior siembra *in vitro*. Las semillas tenían 6 meses de ser colectadas al realizarse la siembra *in vitro*.

Medición y Pesaje de Semillas

Se realizó la medición y pesaje de 10 de las 41 semillas. Las semillas fueron seleccionadas al azar y la medición se realizó a través del software AXiovision® de Carl Zeiss® (Fig. 10). El pesaje se realizó en una balanza analítica Sartorius®.

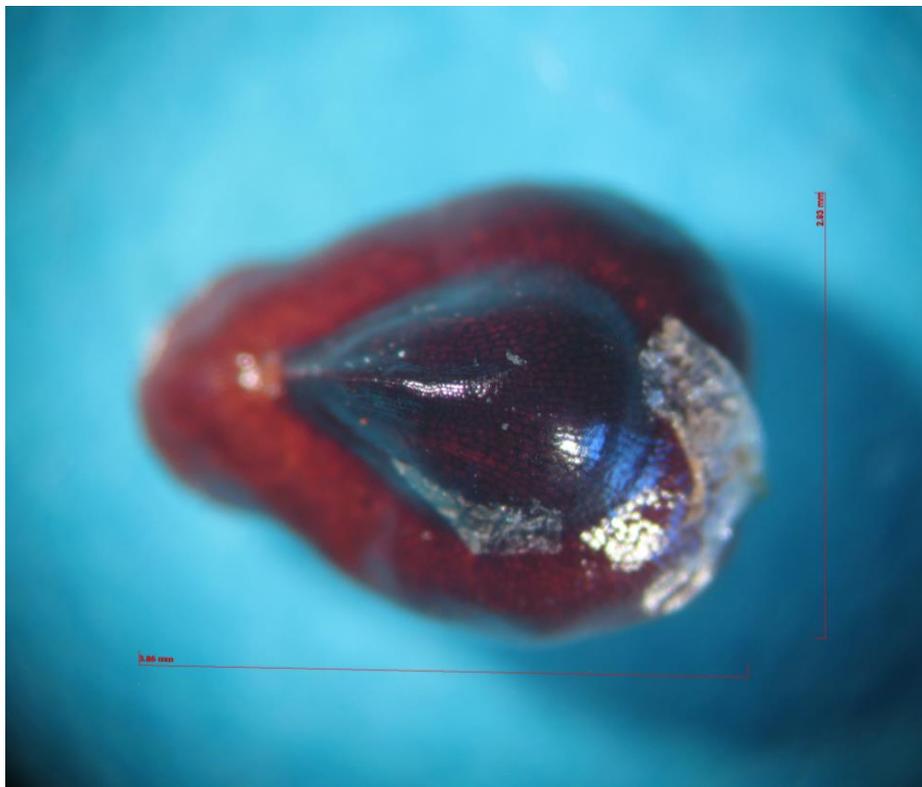


Figura 10. Ejemplo de la medición de semillas en el software Axiovision®

Desinfección y Siembra de Semillas

Se siguió el protocolo ya usado por Vargas (2017) con las siguientes modificaciones a los tiempos de inmersión y concentración: jabón antibacterial (15min en lugar de 10min y 15% en vez de 20%); en Soluvet® (5 min en lugar de 10 min y 2% en vez de 4%) y de cloro + Tween 80® (15min en lugar de 20min); mostrado en la tabla 4. Todos los pasos se realizaron con las semillas en constante agitación, y desde la inmersión en hipoclorito de sodio, dentro de la campana de flujo laminar. Se desinfectaron y sembraron por lotes. Separándose 8 para la siembra *ex vitro* y las 33 restantes se sembraron en 3 lotes de 11 semillas. El procedimiento se realizó dentro de la campana de flujo laminar, con un mechero Bunsen.

Solución	Concentración v/v	Tiempo (minutos)
Jabón Antibacterial	15%	15
Soluvet®	2%	5
Etanol	70%	1
Solución comercial de Hipoclorito de sodio + 1 gota de Tween 80®	15%	15
3 enjuagues con agua destilada esterilizada		

Posterior a la desinfección superficial, se sembró una semilla por frasco, 33 fueron sembradas en medio MS 50% de la concentración sales inorgánicas y compuestos orgánicos, con 30 g/l de sacarosa y 8.5 g/l de agar bacteriológico Bioxon®, a este medio se le ajustó el pH a 5.73 con HCl y NaOH 0.1, 0.5 y 1 N y se esterilizó en autoclave a 120 °C y 1.5 kg/cm² de presión por 17 minutos. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 26 ±2°C y bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Se realizó un subcultivo a los dos meses de la siembra en medio con la misma composición. Se esperó a que las plántulas resultantes tuvieran alrededor de 1 cm de altura para realizar los cortes (4 meses).

Siembra de semillas *ex vitro*

Dado el poco material con el que se contó, solo se sembraron 8 semillas en condiciones *ex vitro*, realizándoles el mismo método de desinfección que a las cultivadas *in vitro*, pero sembradas en una mezcla previamente esterilizada de tepojal y composta 3:1 y colocadas en una charola de plástico de 30 cm de largo por 15 cm de ancho con cobertura para conservar la humedad. Fueron incubadas en condiciones ambientales. Se evaluó si había contaminación en el material biológico, así como el porcentaje de germinación, el crecimiento y el desarrollo tanto *in vitro* como *ex vitro*.

Inducción morfogénica

Plántulas de 4 meses (ca. 1 cm de altura) posgerminación *in vitro* fueron disectadas para obtener tres tipos de explantes: ápices, hipocótilos y raíces. El ápice correspondió al epicótilo y presentó toda la región aréolar (Fig. 11A). La siguiente parte correspondió al hipocótilo, el cual no posee aréolas y fue dividido longitudinalmente en dos secciones laterales (Fig. 11B Y C). La raíz fue separada del resto de la planta mediante un corte transversal (Fig. 11D). Todos los explantes se sembraron en medio MS 100%, 30 g/l de sacarosa y bactoagar 8.5 g/l con diferentes concentraciones y combinaciones de RCV; se ensayaron 3 tratamientos: el control sin RCV, el tratamiento con BAP/ANA y el K/ANA, ambos con las concentraciones de 2/0.5 mg/l.

Se asignaron 11 plántulas por tratamiento, por lo cual se contó con 11 réplicas por cada tipo de explante por cada tratamiento. Se consideró una réplica al frasco con un ápice en el caso del explante ápice; dos secciones laterales de hipocótilo en el caso del hipocótilo y con las raíces restantes de la planta. Dando un total de 33 ápices, 33 hipocótilos y 33 raíces. Los cultivos se cubrieron por completo con papel aluminio por una semana después de realizar cortes o subcultivar, para evitar la oxidación y se mantuvieron a una temperatura de 26 ± 2 °C y, pasada la primera semana, un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

Después de seis semanas en medio de inducción, los explantes se subcultivaron al mismo medio pero con la mitad de la concentración de las combinaciones de

RCV originales (1/.25 mg/l). Al cumplirse 4 semanas en el medio a la mitad de concentración, los explantes se subcultivaron a medio MS basal. Fueron un total de 10 semanas de inducción. Posteriormente los explantes se subcultivaron cada 6 semanas a medio basal, pero al observarse oxidación e hiperhidratación posterior al subcultivo se procedió a no subcultivar hasta que el medio de cultivo se agotaba (2-3 meses). Al observar una gran proliferación de callo, cuatro meses después de la inducción, se subcultivó a medio MS 100% con 1g/l de carbón activado, asimismo se observó una ligera oxidación en el callo por lo cual se añadieron 100 mg/l de ácido ascórbico y 100 mg/l de ácido cítrico al medio. Finalmente se observó hiperhidratación en los brotes generados por lo cual se aumentó la cantidad de bactoagar primero a 9.5 g/l y luego a 10.5 g/l.

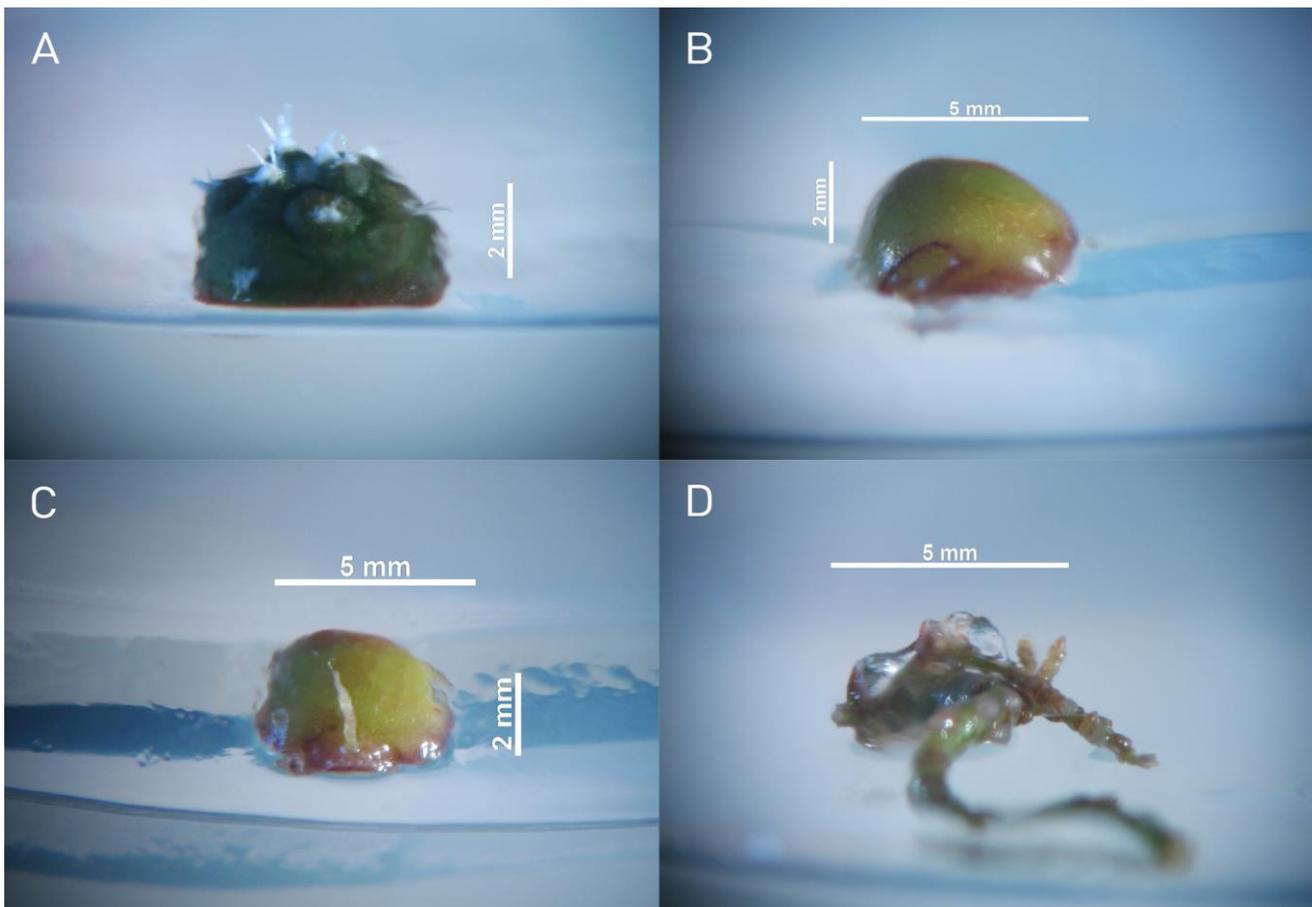


Figura 11. Explantes de *A. asterias*. A). Explante ápice B) y C). Hipocótilo D). Explante Raíz.

Análisis de resultados

Se analizó la normalidad de los datos de germinación, y al no ajustarse a la distribución normal se procedió a transformar los datos a su \log_{10} . Posteriormente se realizó una prueba de t para saber si existían diferencias significativas entre los tratamientos *in vitro* vs *ex vitro*. Se usó el software STATISTICA 8 de STATSOFT.

Aclimatización

Los brotes se revisaron 3 veces a la semana, en su apariencia física y tamaño. Los brotes que se observaban cercanos o más grandes a 1 cm, que se encontraran poco hiperhidratados y con una forma globular eran individualizados y plantados en medio MS 100%, con 10.5 g/l de agar bacteriológico, 100 mg/l de ácido cítrico y ácido ascórbico, 30 g/l de sacarosa.

Con el objetivo de enraizar los brotes individualizados, los 8 que contaban con una mejor apariencia morfológica (4 provenientes del tratamiento BAP/ANA y 4 provenientes del control, regenerados del hipocótilo, sin hiperhidratación, de forma esférica y de al menos 1 cm de altura). De ellos se subcultivaron uno por frasco, en medio MS 100%, con 10.5 g/l de agar bacteriológico, 100 mg/l de ácido cítrico y ácido ascórbico, 15 g/l de sacarosa. Sin embargo a 4 se les modificó el medio de manera que el NH_4NO_3 se eliminó y se sustituyó con 4.4 g/l de hidrolizado de caseína, para reducir la hiperhidratación de los tejidos, como fue realizado por Reyes-Vera *et al.*, (2008). Al resto se les subcultivó al mismo medio pero con 50% NH_4NO_3 . A todos los frascos en los que se subcultivaron los brotes se les cambió la tapa sólida de plástico por SUN CAPS® (Sigma®) que contienen un tamaño de poro de 0.02 μm . Los subcultivos se realizaron hasta que el medio se encontraba cerca de agotarse.

Al no observarse enraizamiento en los explantes a los 3 meses de realizado el cambio de tapas y medio se procedió a subcultivar a medio con la misma composición, pero agregándole 0.15 mg/l de AIA y 0.15 mg/l de AIB; se les dejó en ese medio durante 15 días, al terminar este periodo de tiempo se volvió a subcultivar al medio con el NH_4NO_3 al 50%.

Una vez que se observó crecimiento radicular, las plantas fueron sacadas del frasco con medio de cultivo, lavadas las raíces con agua de la llave para retirar restos de medio de cultivo y se plantaron en charolas plásticas con un sustrato estéril conformado por tepojal y tierra negra, en proporción 3:1. Se revisó la supervivencia hasta dos meses después del inicio de la aclimatización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medición y Pesaje de las Semillas

Tabla 5. Tamaño y peso promedio de semillas de <i>Astrophytum asterias</i> .			
Número de Semilla	Largo (mm)	Ancho (mm)	Peso (mg)
Promedio	3.64	2.99	2.27
Desviación estándar	0.45	0.40	0.41
Error Estándar	0.142	0.126	0.129

Sánchez-Salas *et al.*, (2015) usaron una muestra pequeña (20 semillas), realizaron mediciones en *Astrophytum myriostigma* y encontraron una longitud promedio de 3.1 mm, un ancho de 2.21 mm y un peso de 2.1 mg; obtuvieron errores promedio menores a 0.1, posiblemente debido que contaron con un tamaño de muestra mayor; estos datos no distan mucho de lo obtenido en el presente estudio considerando que son especies diferentes pero del mismo género. Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991) mencionaron que las semillas del género tienen 2 mm de longitud, y que *A. myriostigma* tiene semillas de 3 mm de longitud. Barthlott y Hunt (2000) reportan un promedio de 2.4 mm x 1.8 mm, Elizondo *et al.*, (1994) mencionan que las semillas de *A. capricorne* tienen 1.7-1.8 mm de longitud. Velasco y Nevárez (2002) describen a las semillas de *A. caput-medusae* como "grandes" de hasta 3 mm de largo, ninguno menciona el tamaño de *A. asterias*. La muestra analizada en el presente trabajo colocaría a las semillas de *A. asterias* como las más grandes del género (Tabla 5), las clasificaría como "muy grandes" en toda la familia de las cactáceas (Tabla 6), y como ovoides debido a su proporción de largo/ancho (1.22), según la clasificación de Barthlott y Hunt (2000).

Tabla 6. Categorías de tamaños de semillas en la familia Cactaceae según Barthlott y Hunt (2000). Sombreado el tamaño de las semillas de <i>A.asterias</i> .	
Extremadamente grandes	4.0-4.8 mm
Muy grandes	3.0-3.9 mm
Grandes	2.0-2.9 mm
Tamaño mediano (promedio)	1.2-1.9 mm
Pequeñas	0.9-1.1 mm
Muy pequeñas	0.3-0.8 mm

Desinfección

El método mostró ser eficiente ya que no hubo contaminación microbiana hasta el momento del corte de las plántulas (4 meses). Infante (1992) reportó 0% de contaminación al usar solamente hipoclorito de sodio al 10% v/v en *Mediocactus coccineus*. Quiala *et al.*, (2009) registraron 20% de contaminación al usar NaOCl al 2% v/v por 15 min y esto se redujo al 0% al usarlo por 20 min. Dentro del género *Astrophytum*, Villavicencio *et al.*, (1999 y 2009) reportan porcentajes de contaminación del 1-5% para *A. myriostigma*. Usaron un protocolo de desinfección similar, pero con un tiempo menor; sólo 5 min en jabón, 6 min en etanol en la misma concentración (70% v/v) e hipoclorito de sodio al 100% (6% concentración comercial) por 20 min más 2 a 3 gotas de Tween® 20 por cada 100 ml de solución. Lema-Ruminska y Kulus (2012) reportó 17.67% v/v de contaminación al desinfectar con etanol al 70% v/v e hipoclorito de sodio al 1.58% en semillas de *A. asterias*.

El Soluvel® no ha sido reportado, para cactáceas, en algún protocolo de desinfección para CTV. Vargas (2017) lo utilizó en *Agave guiengola* y obtuvo 100% de desinfección, como en el presente trabajo. Al ser una solución electrolizada de superoxidación, se menciona que demuestra una actividad germicida de amplio espectro y elimina bacterias, virus, hongos y esporas. Es inocuo por lo cual no genera oxidación en los tejidos y puede ser usado en un amplio espectro de concentración (de 1% a 100% v/v de concentración, de 30 segundos a 15 minutos de exposición) (Esteripharma, 2016). Por lo cual es posible que haya contribuido a lograr 0% de contaminación. Se recomienda su uso en protocolos de desinfección

relacionados en el CTV previo análisis para encontrar la concentración y tiempo de agitación correctos.

También es importante considerar el estado del material biológico, las semillas usadas provinieron de una planta de invernadero, por lo cual la cantidad de microorganismos que pudieron infectar o encontrarse en las semillas posiblemente fue menor al de un lote proveniente del ambiente natural de la planta. Se recomienda considerar el estado del material biológico, y probar el protocolo en material procedente de diferentes orígenes, e incluso plantas para comprobar su verdadera efectividad.

Germinación *in vitro* de *Astrophytum asterias*

Tabla 7. Días hasta la germinación <i>in vitro/ex vitro</i>		
Condición	Promedio (Días hasta la germinación)	Desviación Estándar
<i>In vitro</i> (n:33)	9.18 a	4.72
<i>Ex vitro</i> (n:8)	23.75 b	14.38

Diferentes letras significan diferencias significativas en promedio de días de germinación entre condiciones ($p < 0.01$).

El estado de germinación fue revisado diariamente, se consideró germinada a la semilla hasta el momento en que la radícula rompió la testa y emergió. Esta respuesta inició a los 3 días, se extendió hasta los 24 días, y llegó hasta 100% de germinación en el caso de los cultivos *in vitro*; en el caso de los cultivos *ex vitro*, la germinación inició a los 6 días y se extendió hasta los 36 días, pero solo llegó al 50%. En ambos casos la germinación ocurrió de forma asincrónica.

La germinación *in vitro* alcanzó 100% a los 24 días y el tiempo de germinación bajo las presentes condiciones tuvo un promedio de 9.18 días (Tabla 7). Los resultados mejoran lo obtenido por Lema-Ruminska y Kulus (2012) quienes obtuvieron 70% de germinación a partir del día 5 y por Mancilla (2014) que reportó germinación de 42.5% a la primera semana y de 100% a las 4 semanas (28 días) de iniciados los cultivos en medio MS 50%.

Los resultados coinciden con los reportes de Arredondo y Camacho (1995), quienes reportaron que las semillas de *A. myriostigma* alcanzaban un mayor porcentaje de germinación a 25° C (96%). Este porcentaje descendía en temperaturas menores y mayores a 25° C y tuvieron un tiempo promedio de germinación de 6 días, temperatura muy cercana a la observada en la cámara en donde se incubaron las semillas del presente estudio, por lo cual concluyó que no es necesario un tratamiento adicional para la germinación de semillas de esa especie.

Sánchez-Salas *et al.*, (2012) reportaron hasta 70% de germinación para *A. capricorne* y hasta 30% para *A. ornatum*. Mendoza (2007) obtuvo germinación a partir del segundo día de incubación y entre 75-83% de germinación. Se puede adjudicar el éxito en germinación al protocolo de desinfección que cumple las veces de escarificar la testa seminal, a que las semillas no tenían mucho tiempo de haber sido cosechadas (<1 año), a la adecuada temperatura de la cámara de incubación y a la humedad en el frasco en el que se encontraban.

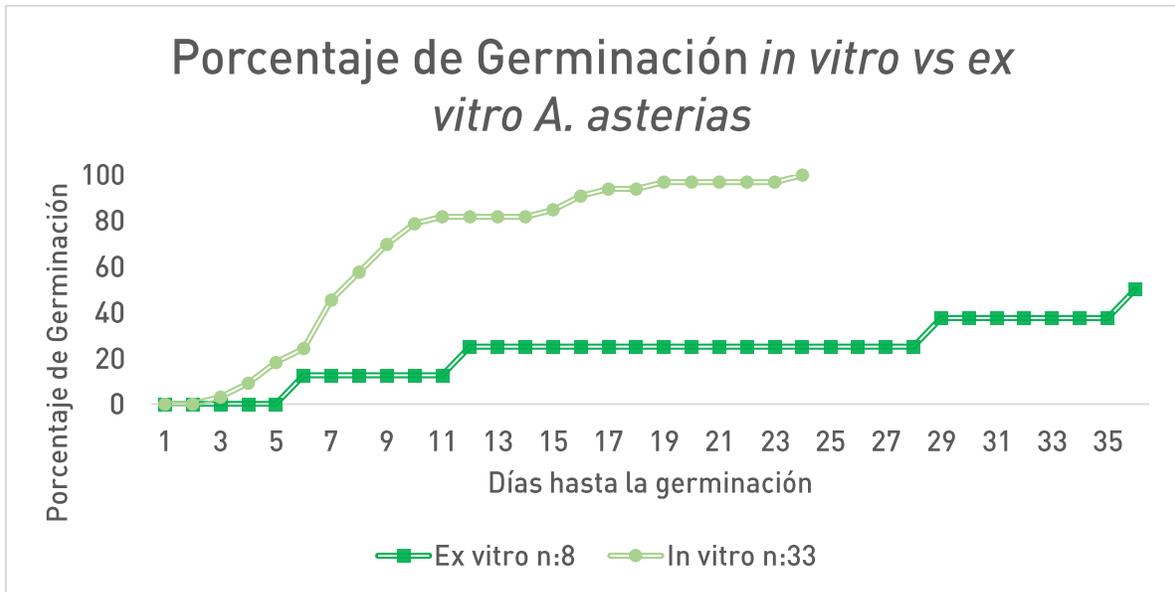
Se encontraron diferencias significativas en la germinación ($t=-3.47$, $P=0.0013$) entre las semillas cultivadas *in vitro* y las sembradas *ex vitro*, las primeras demostraron una germinación más rápida (promedio de 9.18 días contra 23.75 días, Gráfica 1) y un desarrollo más rápido (surgimiento de aréolas a las 5-7 semanas de la siembra), mientras que las *ex vitro* no presentaron surgimiento areolar hasta las 20 semanas. Birnbaum *et al.*, (2011) reportaron que la germinación y supervivencia de plántulas de *A. asterias* en su hábitat natural es mayor en lugares en donde tienen mayor humedad y sombra en una parte del día, lo que podría explicar por qué su desarrollo y supervivencia es mayor en las condiciones de humedad cercanas al 100% que ofrecen los cultivos (frascos) *in vitro*.

Asimismo, las diferencias también podrían deberse a lo mencionado por Santos *et al.* (2001), en relación a que un alto porcentaje de germinación puede deberse al alto contenido de sales en el medio (a pesar de haber usado MS 50%), que parecería asemejarse al sustrato alto en sales sódicas en el que estas plantas crecen en su ambiente natural (USFWS, 2013).

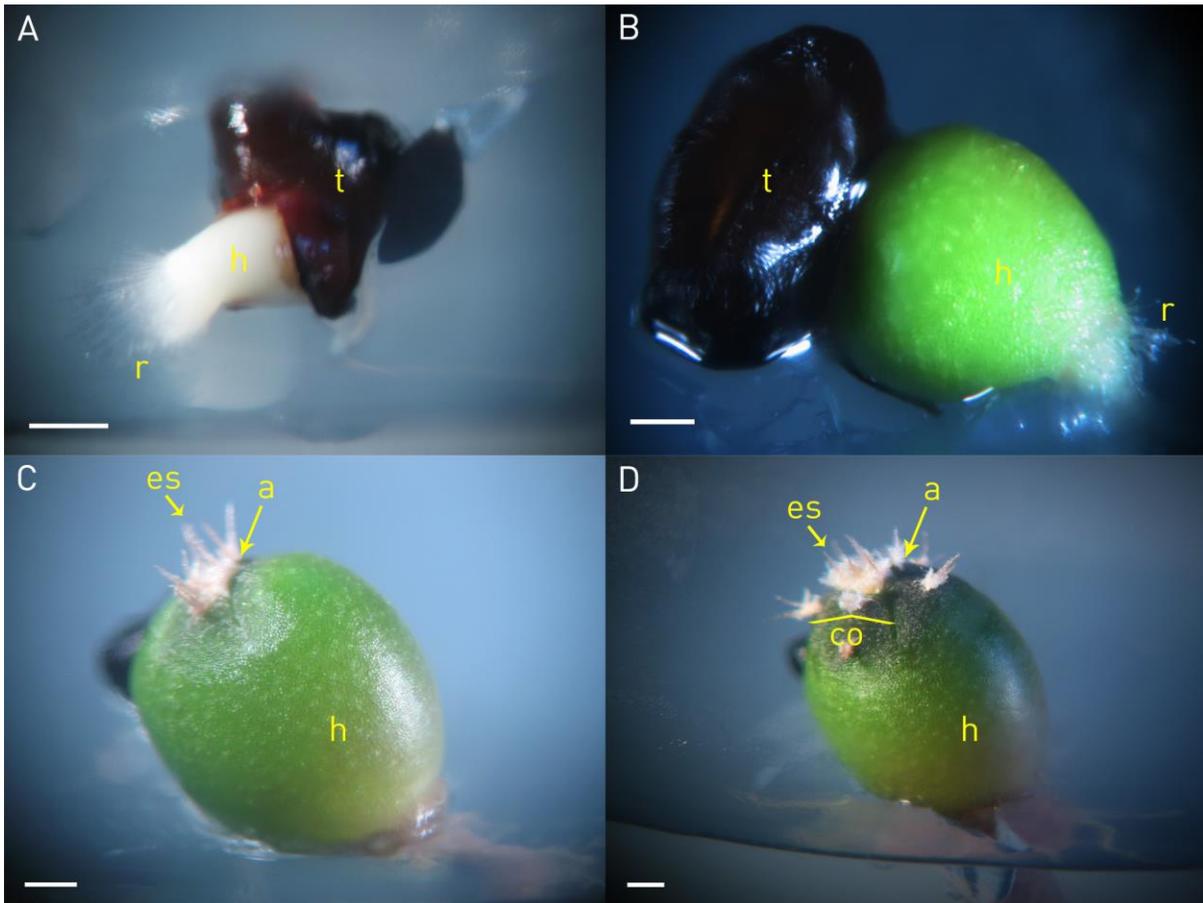
A pesar de las diferencias temporales en el desarrollo entre las dos condiciones la morfología de las plántulas no fue diferente entre ellas. Las plántulas tuvieron generalmente una forma ovoide (Figs. 12C y 13D). Se apreciaba primero el surgimiento de la radícula, evidenciada por numerosos pelos radiculares (Fig. 12A), seguida por el hipocótilo aún sin clorofila. Posteriormente, en el caso de los cultivos *in vitro*, se observó que el hipocótilo y la raíz se desarrollaron en la primera semana (Fig. 12B-D). Los cotiledones se presentaron como dos pequeñas protuberancias esféricas, de cerca de 1 mm, en el ápice. Fueron visibles por un mayor tiempo en el caso de las plantas *ex vitro* (fueron visibles hasta los 131 días en algunas plantas) debido al lento desarrollo (Fig. 13C y D), y efímeros en el caso de los *in vitro* (visibles hasta los 40 días) (Fig. 12C).

A las 4-5 semanas de la siembra, en los cultivos *in vitro* surgieron las primeras aréolas y espinas abriéndose paso entre los cotiledones (Fig. 12C y D), en el caso de los cultivos *ex vitro* la primer aréola se observó hasta las 13 semanas (Fig. 13D). En ambos casos la región apical adquirió un tono color verde oscuro, que se aclaraba hasta llegar a la región basal del hipocótilo, en donde el tono era amarillento (Fig. 12C y D). Asimismo las aréolas sólo cubrían la región más cercana al ápice, no se extendían a lo largo de la plántula (Fig 12C y D, Fig 13D). Las subsecuentes aréolas surgieron, en ambos casos, por el centro de la región apical de la planta (Fig 12C y 13D).

Es interesante mencionar que en estado adulto la planta no presenta espinas sin embargo, en este caso *in vitro*, se observaron espinas hasta las 15 semanas de iniciados los cultivos.



Gráfica 1. Porcentaje y tiempo de germinación de semillas maduras de *A. asterias* sembradas en dos condiciones, *in vitro* y *ex vitro*. Punto o cuadro= porcentaje de germinación a los "x" días *in vitro* o *ex vitro*.



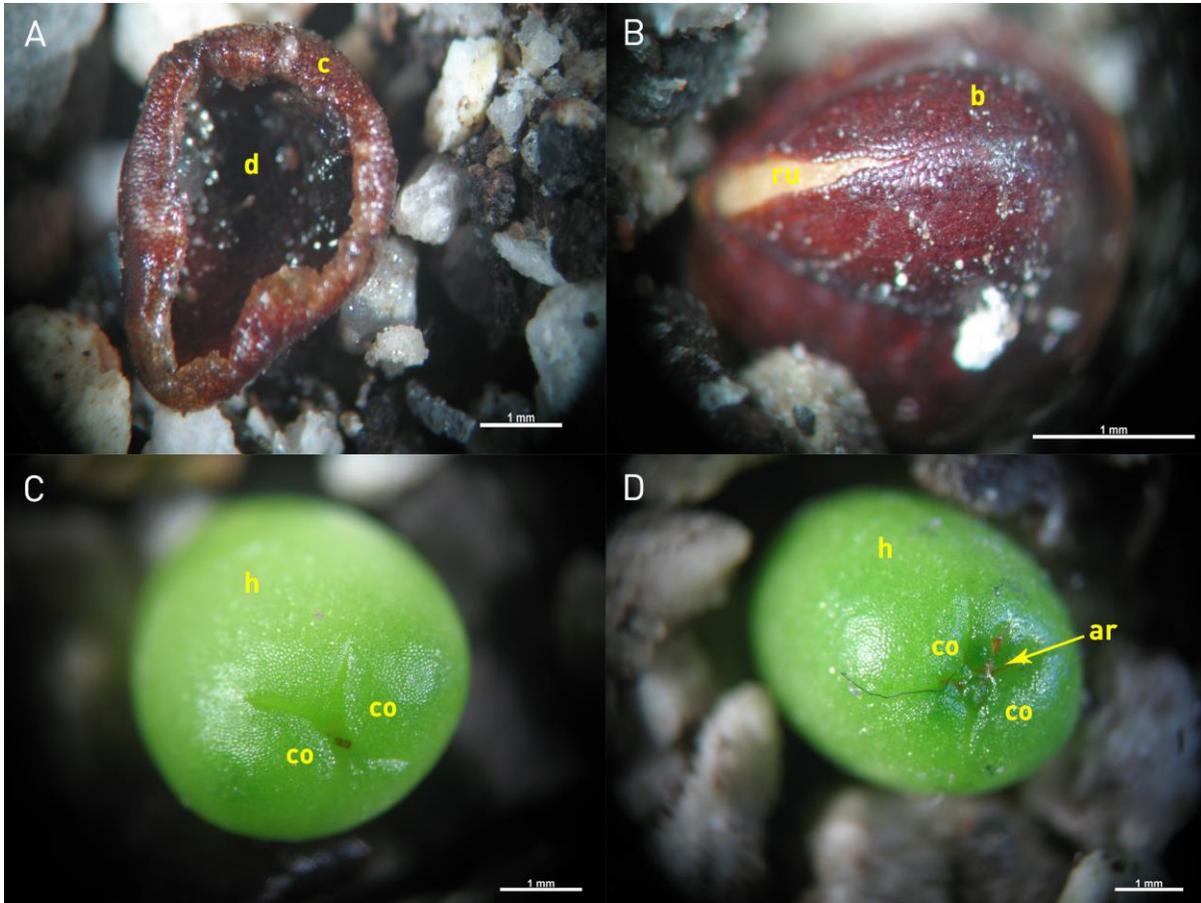


Figura 12 (Página anterior). A. *asterias in vitro*. A) Semilla germinada se observa a la radícula emergiendo por la zona hilo-micropilar de la semilla y al hipocótilo, aún sin clorofila. B) Plántula a 1 semana de la siembra, aún se observa que la plántula no ha abandonado los restos de la testa por completo; presencia de clorofila en la plántula, nótese los primeros pelos radiculares surgidos de la radícula. C) Plántula a las 7 semanas de la siembra, ya abandonó la testa de la semilla por completo, asimismo se nota la presencia de espinas y aréolas, así como una raíz verdadera. D) Plántula a las 13 semanas de la siembra, se observa el desarrollo en la planta de espinas, aréolas e incluso el inicio de las costillas. Barra=1 mm. a=aréolas, co=costilla, es=espinas h=hipocótilo, r=radícula, t=testa de la semilla.

Figura 13. A. *asterias ex vitro*. A) Semilla a las 2 semanas de la siembra, aún no había registrado ningún cambio o señal de germinación. B) Semilla a las 4 semanas de la siembra, se denota el área de la quilla, y una ruptura en la testa por donde emergerá la planta. C) Plántula a las 8 semanas de la siembra, se distinguen ya los cotiledones y el hipocótilo. D) Plántula a las 13 semanas de la siembra, surgimiento de la primer aréola. Barra 1 mm. ar=aréola, b=región de la quilla, c=región del hilum co=cotiledón, d=cámara vacía, h=hipocótilo y ru=ruptura de la testa.

Respuestas morfogénicas

Tratamiento BAP/ANA 2/0.5 mg/l (Fig. 14)

Los explantes apicales y de hipocótilos se mantuvieron con una oxidación ligera en la zona de corte. La formación de callo ocurrió en los tres tipos de explantes, a los 10 días de iniciado el tratamiento en los explantes apicales y de hipocótilos. Se observó la presencia de callo que tenía diferentes aspectos: callo friable, fácilmente desmenuzable de color verde claro a verde oscuro con algunas zonas de color marrón o rojizas con capacidad regenerativa; callo compacto, que iniciaba de forma hialina pero siempre se volvía blanquecino o verde muy claro, este era de consistencia dura, muy difícil de disgregar y no se observó regeneración. En algunos explantes se desarrollaban estructuras que asemejaban ser tricomas de color amarillo y parecían estar asociados a los brotes, pero al pasar el tiempo estos dejaron de aparecer en los cultivos. El callo surgió siempre de la zona de corte, en todos los explantes (Fig. 14).

Este tratamiento mostró el crecimiento más rápido y masivo de los distintos tipos de callo. Los ápices mostraron ensanchamiento y crecimiento de callo en la zona de corte. Los primeros brotes, de aproximadamente 5 mm de diámetro, se comenzaron a presentar 3 meses después de la inducción a partir de callo de diversas coloraciones, verde/café/rojizo, pero siempre de apariencia friable, es decir por vía indirecta, en el caso del explante hipocótilo. En el caso del explante raíz los brotes surgieron a los 6 meses de iniciada la inducción, directamente del tejido radicular, por lo cual se formaron por la vía directa (Fig. 14).

Monostori *et al.*, (2012) registraron hiperhidratación en explantes con la combinación de RCV BAP/ANA, asimismo obtuvieron respuesta hasta las 8 semanas después de iniciada la inducción y, debido al lento crecimiento de los brotes de *Melocactus salvadorensis*, a las 14 semanas de la inducción transfirió a medio con la cuarta parte de concentración de citocininas (BAP de 4 mg/l a 1 mg/l). Molphe Balch y Dávila (2002) obtuvieron crecimiento de callo a partir de la zona de corte, y obtuvieron brotes en las aréolas a partir de la semana 6 y hasta la semana 12 de inducción, asimismo reportaron problemas de hiperhidratación controlados al

aumentar la concentración de agar en el medio a 10-12 g/l, en 21 spp. de cactáceas. Chablé *et al.*, (2006) obtuvieron brotes entre los 30 y 60 días de la inducción en *A. myriostigma*.

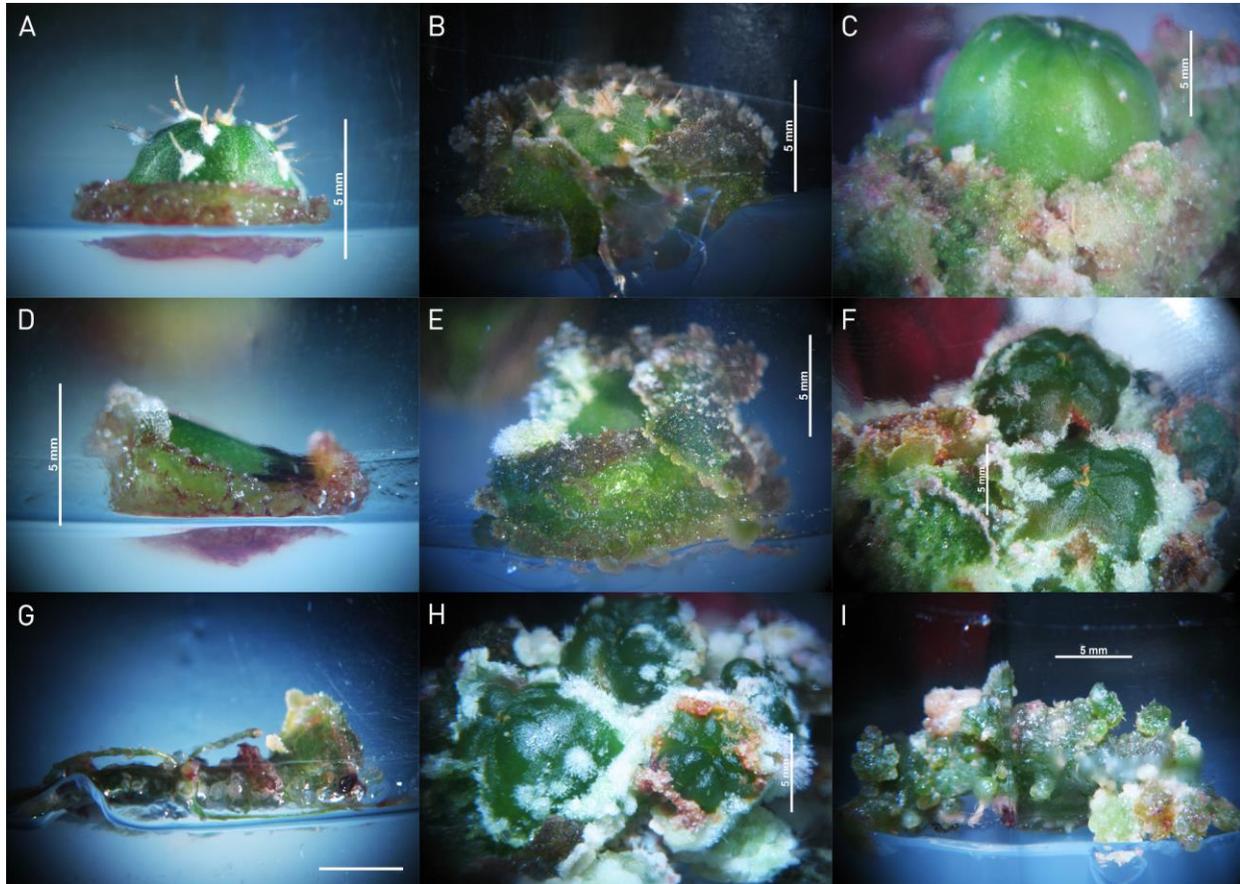


Figura 14. Explantes de *A. asterias* en BAP/ANA. A), B) y C) Ápices a las 1, 4 y 26 semanas de la inducción; se observa la apariencia friable y coloración verde oscura del callo, el callo surgió de la zona de corte. D), E) y F) Explantes de hipocótilo a las 1, 4 y 26 semanas de la inducción; se denota el surgimiento de callo de consistencia friable a partir de la zona de corte, así como la coloración verde fuerte, marrón y rojiza del callo, así como algunos brotes de apariencia hialina. G), H) e I) Explantes de raíz a las 1, 24 y 26 semanas de la inducción; se observa el surgimiento de brotes de forma directa así como el surgimiento de callo blanquecino de la base de los brotes. Barra=5 mm.

Tratamiento KIN/ANA 2/0.5 mg/l (Fig.15)

En este tratamiento la formación de callo ocurrió en los tres tipos de explantes. Se observó callo de diferentes consistencias: friable, callo fácilmente separable de color verde claro a verde fuerte, en ocasiones con algunas zonas rojizas; callo compacto, de consistencia dura, no disgregable, de coloración blanca a verde claro. El crecimiento de callo comenzó a surgir de forma más lenta, a los 15-30 días, en los explantes ápice e hipocótilo, y menos abundante que el otro tratamiento con citocinina, BAP/ANA (Fig. 15A, B y D, E).

Los ápices mostraron un ligero crecimiento de callo en la zona de corte, elongación (ápices de hasta 1 cm de alto) y una organización areolar no vista en el resto de los tratamientos que no respetaba a las costillas y parecía haber perdido el orden. Las aréolas se organizaban de forma espiralada sin respetar el orden visto normalmente en la especie (Fig. 15C).

Los explantes laterales exhibieron crecimiento de callo en la zona de corte, de apariencia compacta y que fue capaz de regenerar pocos brotes, y de una morfología diferente, bajo las condiciones ensayadas; se observó el surgimiento de raíces a partir de callo (Fig. 15F).

Las raíces presentaron ensanchamiento y cambio de coloración, del café claro que mostraban al momento de la inducción, a verde fuerte. Crecimiento de callo de diferentes consistencias y tonalidades (de friable a compacto y de verde claro a verde fuerte) y algunas protuberancias en su superficie que aparentaron ser brotes, pero nunca se desarrollaron como tales, o que posiblemente iniciaron como brotes y posteriormente se desorganizaron (Fig. 15H).

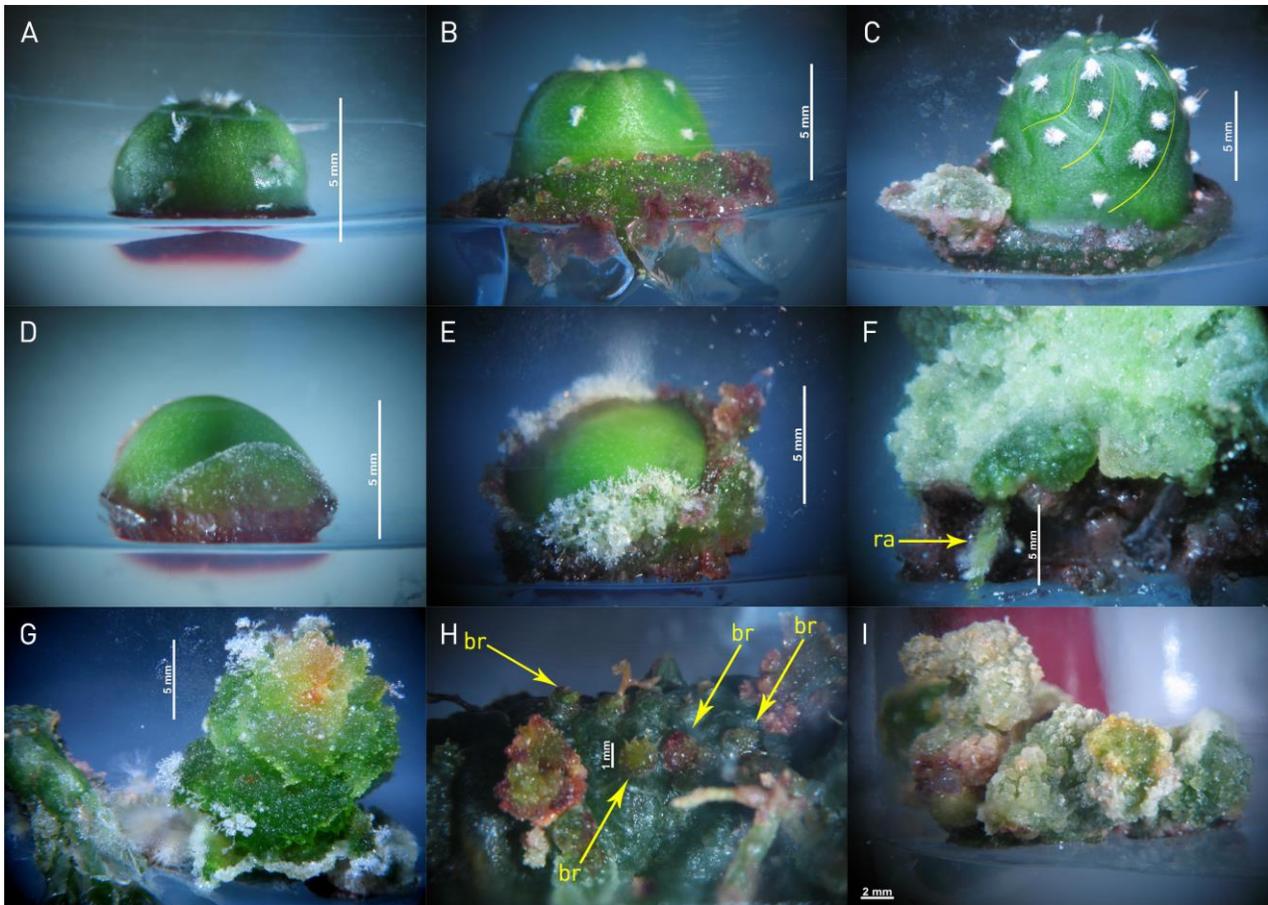


Figura 15. Explantes de *A. asterias* en KIN/ANA. A), B) y C) Ápices a las 1, 4 y 23 semanas de la inducción; se observa el poco surgimiento de callo, se observa friable y verde oscuro en la imagen B y compacto en la imagen C, se observa la organización “espiralada” de las aréolas. D), E) y F) Explantes de hipocótilo a las 1, 4 y 23 semanas; se observa un crecimiento medio de callo compacto y blanquecino, en la imagen F, se observa rizogénesis (5-9 mm). G), H) e I) Raíces a las 23, 31 y 44 semanas de la inducción. Se observa crecimiento medio de callo, asimismo se observa callo verde oscuro y friable en la imagen G, que cambia a blanquecino y compacto en la imagen I, se observan “brotes” que nunca se diferenciaron. br=brotes, ra=raíz

Control (Fig. 16)

En este tratamiento la formación de callo ocurrió en los explantes de hipocótilo y de raíz, aunque en el explante raíz la aparición de callo fue muy reducida y solo se generó en zonas cercanas al surgimiento de brotes (Fig. 16H e I). Se observó callo de diferentes consistencias: friable, callo fácilmente separable de color verde claro a verde fuerte, en ocasiones con algunas zonas rojizas; callo compacto, de consistencia dura, no disgregable, de coloración blanca a verde claro.

En el tratamiento control se observó oxidación en la zona de corte, acompañada de enraizamiento de los ápices entre los 10-15 días de iniciada la inducción (Fig. 16A-C); se observó crecimiento de las raíces, pero un muy lento crecimiento del ápice (Fig. 16A,B y D,E).

El crecimiento de callo se observó en explantes de hipocótilo, fue muy poco (1-5 mm) y comenzó a presentarse después de los primeros 45 días, 38 días más lento que en el tratamiento BAP/ANA y 20-25 días más lento que en el tratamiento KIN/ANA (Fig. 16, D-F).

Las raíces mostraron ensanchamiento y surgimiento de brotes por vía directa, asimismo mostraron regeneración en la zona de corte de un nuevo "ápice", pero este detenía su crecimiento a pesar de tener raíces (Fig. 16, G-I).

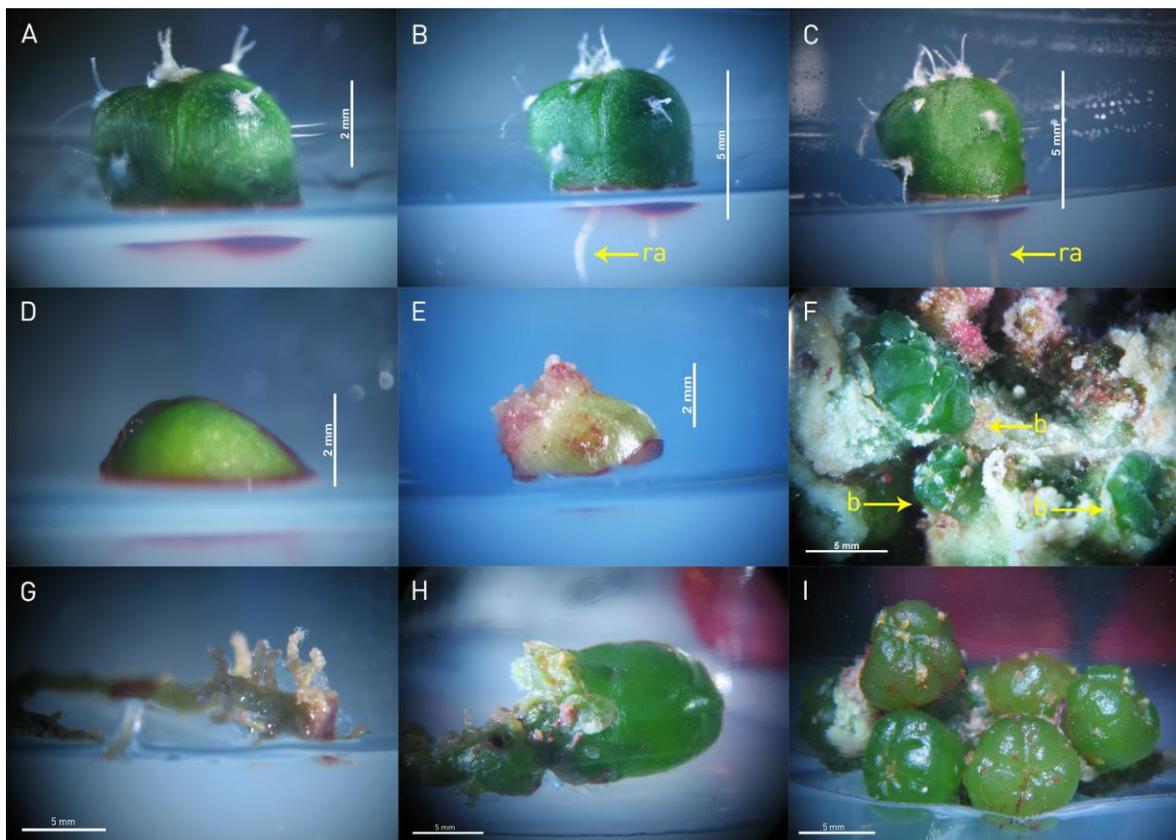


Figura 16. Explantes de *A. asterias* en el tratamiento CONTROL. A), B) y C) Ápices a las 1, 2 1/2 y 4 1/2 semanas de la inducción; Se observa un nulo crecimiento del ápice, aún después de haber adquirido raíces. D), E) y F) Explantes de hipocótilo a las 1, 4 y 36 semanas; se observa un ligero crecimiento de callo, y en F se observan brotes de 2-5 mm. G), H) e I). Explantes de raíz a las 1, 31 y 32 semanas. ra=raíces, b=brotes.

Organogénesis

El desarrollo de los brotes fue evaluado mensualmente. Debido a la respuesta relativamente lenta de los explantes, ésta se registró a los 8 y 12 meses de iniciados los cultivos (Tabla 8).

En el presente trabajo se considera como brotes a aquellas estructuras que presentaban una región apical central y tubérculos que después diferenciaban en costillas, en algunas ocasiones presentaban aréolas (Olguín, 1994).

Es necesario señalar que en muchos brotes observados, no se alcanzaba a ver una separación visible. La parte basal del tallo no se diferenciaba por completo, e incluso se llegaba a formar más callo, ya fuera de la base de los brotes o de la periferia de estos. Lo cual indicaba que era callo del explante original, por lo tanto algunos brotes se llegaban a perder o eran cubiertos por el callo que crecía alrededor, o en ocasiones perdían su forma y formaban nuevos callos. El pequeño tamaño de los tallos puede deberse a la morfología de la especie (muy poco crecimiento vertical), también a la auxina colocada en el medio de inducción que puede inhibir la diferenciación completa de los brotes y provocar, en algunos casos, la reversión al estado desdiferenciado, es por esto que el carbón activado generó un mejoramiento en la diferenciación al adsorber los remanentes de auxina en los tejidos (Pan y Staden, 1998; George *et al.*, 2008).

La regeneración de brotes, en la mayoría de los casos, implicó la formación previa de callo (en los explantes ápice e hipocótilo de todos los tratamientos), es decir, la vía de regeneración principal fue la organogénesis indirecta (Fig. 18). Se observaron algunos casos de organogénesis directa, a partir del explante raíz del control (Fig.16l) y en ápices dañados de brotes expuestos al hidrolizado de caseína, pero siempre al estar ausente el meristemo apical, ya sea por escisión (en el caso de el explante raíz) o por daño (en el caso de los brotes expuestos al hidrolizado de caseína).

Olguín (1994) en su trabajo realizado con *Ariocarpus retusus* también reportó dificultad en la diferenciación y ausencia de separación entre el brote y el callo circundante. *A. retusus* es una especie, como *A. asterias*, que no tiene un

crecimiento vertical sustancioso, por lo cual es muy posible que el pequeño tamaño del tallo de los brotes se deba a su morfología innata.

Tras el tiempo de inducción en los respectivos tratamientos (10 semanas), los explantes se subcultivaron a medio MS 100% sin ninguna concentración de RCV, a los 3 meses de iniciada la inducción. Al estar ya en medio sin RCV, se comenzó a observar la diferenciación de brotes caracterizada por el surgimiento de un nódulo color verde claro a verde oscuro, el ápice, de apariencia más sólida que el resto del callo y la posterior diferenciación de costillas, y de aréolas. En todos los casos los brotes, al observarse por primera vez, tenían un diámetro de 2-5 mm.

El mayor número de brotes a los 12 meses de iniciada la inducción se obtuvo en el control, carente de RCV, con un total de 82 brotes regenerados (promedio de 2.49 ± 1.25); 0 provenientes del explante ápice, 60 del explante hipocótilo por organogénesis indirecta (promedio de 5.46 ± 3.25) y 22 del explante raíz por organogénesis directa (promedio de 2 ± 1.72), y como ocurrió en la mayor parte de los brotes obtenidos en todos los tratamientos, el enraizamiento fue casi nulo. A 12 meses de iniciados los cultivos el explante más exitoso en cuanto a número de brotes fue el hipocótilo (60), seguido de las raíces (22) y ápices (0) (Tabla 8).

Los brotes obtenidos en el control se caracterizaron por tener una morfología más parecida a la de la planta en la naturaleza, forma esférica, costillas bien delineadas y color verde oscuro, en el caso del explante hipocótilo. Al ser obtenidos por organogénesis indirecta surgieron siempre de callo friable que se originó de la zona de corte de los explantes de hipocótilo. Los brotes del explante raíz surgieron a lo largo de todo el explante, por lo cual se descarta que provengan de un fragmento remanente de hipocótilo, asimismo, no se observó crecimiento de callo en la zona de diferenciación de los brotes por lo cual surgieron de forma directa, solo se observó poco callo lejos de los brotes, era de apariencia blanquecina y compacta que no generó diferenciación (Fig. 16).

El control fue el segundo más rápido en presentar respuesta (después del tratamiento BAP/ANA) que presentó formación de callo (45 días) y una posterior diferenciación tardía (6 meses). Los brotes provenientes de este tratamiento tenían una morfología normal, forma esférica, simétrica y el surgimiento areolar era

sincrónico al crecimiento, pero conservaban una apariencia hiperhidratada y transparente (Fig. 16l) que también se observó pero en mayor dimensión en el tratamiento BAP/ANA.

Lema-Ruminska y Kulus (2012) obtuvieron callo y brotes laterales en *A. asterias*, además de embriones somáticos en 15% de explantes cortados por los ejes longitudinales y sembrados medio en MS sin RCV. El número de embriones somáticos obtenidos por los autores en el mismo medio y con explantes del mismo tipo fue menor, pero el número de raíces y brotes laterales formados fue mayor en relación a tratamientos con 5, 7 y 10 mg/l de 2,4-D, no mencionan tiempos de respuesta. Ellos atribuyen la respuesta en el medio control al daño mecánico provocado en los explantes al hacer cortes, y mencionan que el daño mecánico puede mejorar y acelerar la respuesta embriogénica pero no proveen una explicación al respecto.

En el presente trabajo también se obtuvo morfogénesis en explantes de hipocótilo en medio MS sin RCV, sin embargo solo se obtuvo organogénesis, no embriogénesis como en el trabajo de Lema-Ruminska y Kulus (2012). La obtención de brotes es atribuida a las altas concentraciones de auxinas endógenas que tiene el tejido inicial y a la escisión del ápice realizada en el presente trabajo, lo que rompe la dominancia apical del resto de los tejidos. Esto es evidenciado por la falta de respuesta en los explantes de ápice. La ausencia de embriogénesis en el presente trabajo podría deberse a una diferencia en el daño mecánico al obtener los explantes, o al tipo de corte realizado (longitudinal contra transversal).

Karimi *et al.*, (2010) proponen que las aréolas al presentar meristemas, tienen una influencia negativa en la formación de callo y brotes, debido a la dominancia apical que las auxinas ejercen, pero positiva en la formación de raíces, por lo cual cuando los tejidos son liberados del ápice se forman brotes y/o callo y al tenerlo se forman raíces. Lo anterior ocurrió en el presente estudio, los explantes que fueron liberados del meristemo apical (hipocótilos y raíces), fueron los que presentaron una respuesta organogénica y de callo más abundante (los hipocótilos 105 vs ápices 22 brotes en total, los hipocótilos 1-3 cm de callo vs ápices 0.5-0.9 cm de callo)(Tabla 8). Los que aún contaban con ápice formaron raíces (Tabla 8).

Asimismo los resultados expresados coinciden con lo propuesto por Ramírez-Serrano y Teixeira (2008), que las cactáceas con un tallo simple o crecimiento monopodial, como *A. asterias*, tienen una fuerte dominancia apical mediada por un alto contenido de auxinas endógenas. Ramírez-Serrano y Teixeira (2008) recomiendan el uso de medio sin auxinas pero con citocininas y la remoción o daño del ápice o la interrupción del transporte polar de las auxinas para activar las aréolas, si lo que se pretende es propagar cactáceas con crecimiento monopodial, como *A. asterias*, *Strombocactus disciformis*, *Ariocarpus retusus* y *Aztekium hintonii*. Medio sin o con una baja cantidad de auxinas (0.01-0.2 mg/l), pero con citocininas y sin remoción apical para cactáceas con un tallo prolífero o cespitoso (plantas que cuentan con crecimiento vegetativo debajo del ápice por lo cual las aréolas que se encuentran en esta zona no están bajo la influencia de la dominancia apical) como *Mammillaria gracilis*, *M. prolifera* o *M. schiedeana*.

El segundo tratamiento con mayor regeneración fue el tratamiento BAP/ANA 2/0.5 mg/l, con un total de 74 brotes (2.24 ± 0.81); 18 provenientes del explante ápice (1.64 ± 1.63), 41 del explante hipocótilo (3.73 ± 1.2) y 15 del explante raíz (1.36 ± 1.36) a los 12 meses de iniciados los cultivos. A los 12 meses de iniciados los cultivos en este tratamiento el explante más exitoso fue el hipocótilo (41), seguido del ápice (18) y raíces (15) (Tabla 8). Este tratamiento fue el que presentó una respuesta más rápida, el callo inició su formación a los 20 días de iniciada la inducción surgía a partir de la zona de corte. Posteriormente comenzó a diferenciarse en brotes a los 180 días de iniciada la inducción, sin embargo estos parecían tener una forma diferente, eran ovalados o tenían una forma irregular en vez de ser esféricos, presentaban hiperhidratación, lucían hialinos y no eran sólidos, no había surgimiento areolar o estaba reducido (Fig. 18A-F).

La regeneración de cactáceas mediante tratamientos con BAP/auxina ha sido ampliamente reportada en la bibliografía y BAP es probablemente la citocinina más usada en el CTV de cactáceas (George *et al.*, 2008) (Tablas 1, 2 y 3).

A las 40 semanas de iniciada la inducción en *A. ornatum*, Mendoza (2007) obtuvo un promedio de 9 brotes al considerar todos los brotes, en medio BAP/ANA 2/0.5 mg/l, y de 2.93 ± 1.96 , en una repetición de su mejor tratamiento, considerando

solo los brotes viables y sin hiperhidratación, al usar medio sólo con la citocinina BAP 2 mg/l, 8 semanas en medio de inducción y 16 semanas en medio MS sin RCV. Los brotes iniciaron su desarrollo durante el periodo de inducción a las 5-7 semanas del inicio. El desarrollo de los brotes se dio de forma más rápida en el caso de *A. ornatum* (5-7 semanas vs 12 en la presente investigación). Las diferencias pueden deberse a que *A. ornatum* es una especie de más rápido y abundante crecimiento que *A. asterias*. El primer promedio de brotes reportado por Mendoza (2007) en medio BAP/ANA 2/0.5 mg/l es superior al obtenido en esta investigación (9 vs 2.24) y lo obtenido en la repetición es similar a lo aquí reportado (2.93 vs 2.24). En ambos casos se utilizaron explantes obtenidos del corte longitudinal de plántulas obtenidas *in vitro*, de entre 1 cm y 1.5 cm de longitud, lo cual daña el meristemo apical y de acuerdo con Ramírez-Serrano y Teixeira (2008) detiene la influencia que este tiene sobre las aréolas subyacentes y mejora el rendimiento.

Lizalde-Viramontes et al., (2003) encontraron que a concentraciones de BAP mayores a 1 mg/l se observaba un alto número de brotes regenerados. Estos tenían una morfología no habitual, una diferenciación mínima y eran incapaces de formar raíces (como ocurrió en el presente estudio), y un crecimiento abundante de callo que impedía la proliferación de brotes; esto fue resuelto al agregar 1 mg/l del bloqueador del transporte polar de auxinas ATIB (Ácido Triyodobenzoico). El mismo estudio encontró un promedio de 2.3 ± 0.27 brotes al usar medio con la composición BAP/ ATIB 0.5/1 mg/l.

En la presente investigación se encontraron promedios superiores en los tratamientos BAP/ANA (3.73 ± 1.2 en hipocótilo, 2.24 ± 0.81 promediando los 3 tipos de explante) y CONTROL ($5.46 \pm$ en hipocótilo, y 2.49 ± 1.25 promediando los 3 tipos de explante) a los 12 meses de iniciada la inducción, pero con un mayor grado de variabilidad, es decir el error estándar de la muestra fue mayor en el presente estudio (Tabla 8), posiblemente esté relacionado con el uso de auxinas que generaban callo e inhibían la respuesta. Otra diferencia encontrada fue que en el presente trabajo la proliferación de callo se detuvo agregando carbón activado al medio para poder adsorber el remanente de ANA, no bloqueando su transporte polar como lo mencionan Lizalde-Viramontes et al., (2003).

Está demostrado que las auxinas pueden alterar la fisiología pre programada de las plantas (George *et al.*, 2008) por lo cual un exceso de éstas o su aplicación a plantas que ya tengan una alta concentración endógena puede provocar modificaciones morfológicas, asimismo una alta concentración de citocininas puede provocar hiperhidratación que genera una apariencia hialina y tallos anormalmente grandes, y en plantas suculentas como las cactáceas una morfología fuera de lo común (Beyl, 2011).

Finalmente, la menor regeneración a los 12 meses de iniciada la inducción fue con el tratamiento KIN/ANA 2/0.5 mg/l, con un total de 19 brotes (promedio de 0.58 ± 0.32), 4 provenientes del explante ápice (promedio de 0.36 ± 0.27), 4 del explante hipocótilo (promedio de 0.36 ± 0.27) y 11 de raíz (promedio 1 ± 0.9) (Tabla 8). En este tratamiento se observó el crecimiento de raíces a partir de callo, pero nunca a partir de los brotes obtenidos. Presentó una respuesta organogénica mínima, solo observándose el desarrollo de poco callo a partir de los 15-30 días en el caso de los explantes ápice y raíz (1-5 mm de callo) y más abundante en el caso del explante hipocótilo (5-9 mm). En ambos casos el callo surgió de la zona de corte, se presentó elongación del explante ápice e hiperhidratación en el explante raíz (Fig. 18M-R).

La citocinina Kinetina ha sido usada con éxito en diversas ocasiones en CTV, incluso provocando un mayor número de brotes que otras citocininas. Villavicencio *et al.*, (2012) no encontraron diferencias significativas entre el promedio de brotes resultantes con tratamientos que usaron BAP/ANA y tratamientos que usaron KIN/AIB, sin embargo, observaron una reducción de 15% en la altura de los brotes y concluyeron que la proporción citocinina/auxina 10:1 es la mejor para la propagación de *Epitelantha micromeris*, obteniendo promedios de hasta 15 brotes/explante en medio MS.

En el género *Astrophytum* la Kinetina también fue usada por Santos *et al.*, (2001) obtuvieron un promedio de 14.5 brotes por explante en *A. myriostigma* a 90 días de inducidos en medio MS 50% al utilizar Kinetina a 2 mg/l y realizaron cortes longitudinales (que rompieron la dominancia apical). Concluyeron que utilizar KIN a 2 mg/l en medio MS 50% con el doble de cloruro de calcio fue el mejor

tratamiento para la regeneración de *A. myriostigma* y que, al aumentar el tiempo de cultivo aumentó la cantidad y mejoró la calidad de los brotes obtenidos.

Chablé *et al.*, (2006) obtuvieron promedios de 7.0, 5.5, 3.0, 2.4 y 1.3 brotes al utilizar 0.5, 2.0/0.08, 2.0/0.2, 2.0 y 2.0/0.5 de KIN y KIN/AIA en *A. myriostigma*. En todos los casos, excepto en el 2.0, utilizaron MS 50% y el Cloruro de Calcio al 200% de la concentración original. Los autores concluyeron que la Kinetina fue la mejor citocinina para la regeneración de *A. myriostigma* debido a que permitió la elongación y aumentó el número de brotes obtenidos, sin embargo acotaron que, cuantitativamente, BAP y BAP/ANA permitieron los mejores promedios (9.2 brotes por explante). Asimismo, mencionaron que, en pruebas previas, el uso de medio MS 100% mostró la formación de callo, y presentó efectos negativos en la formación de brotes, algo que no observaron con MS 50% que aumentó la regeneración *in vitro* y mejoró la regeneración.

Mendoza (2007) obtuvo en *A. ornatum* un promedio de brotes de 5.95 ± 3.93 en medio MS Kinetina 2 mg/l después de 24 semanas del inicio de la inducción, este promedio de brotes es casi el doble que el obtenido en el mismo trabajo (2.93 ± 1.96) utilizando la citocinina BAP a una concentración de 2 mg/l.

En la presente investigación se lograron cantidades menores de brotes a los mencionados para otros reportes con la citocinina Kinetina. Se obtuvo un desarrollo mucho más lento (aparición de callo a las 4 semanas, rizogénesis a las 14 semanas y organogénesis muy reducida). Sin embargo algunos resultados coincidieron con lo mencionado en estudios anteriores como la elongación de los explantes, la aparición de callo y la rizogénesis. El promedio de brotes fue de (0.58 ± 0.32), cantidad menor a la vista en Santos *et al.*, (2001) 14.5 brotes, Chablé *et al.*, (2006) 9.2 brotes en *A. myriostigma* y Mendoza (2007) 5.95 en *A. ornatum* al usar Kinetina.

Esto pudo deberse a diferentes factores, como la forma en que se obtuvieron los explantes. En todos los estudios mencionados se utilizaron explantes longitudinales de plántulas de entre 1-2 cm, que rompieron con la dominancia apical (Ramírez-Serrano y Teixeira, 2008). En el presente estudio se utilizaron explantes transversales de ápice, longitudinales de hipocótilo y raíz, por lo cual, al menos los ápices aún se encontraban sometidos a la influencia reguladora de las auxinas del ápice. Otro

factor es el uso de auxinas que promovieron el crecimiento de callo y pudieron inhibir la organogénesis (George *et al.*, 2008). La Kinetina no ha sido reportada como regulador en algún protocolo con *A. asterias*, por lo cual lo reportado en el presente estudio es el primer reporte de uso de KIN en *A. asterias*. Debido a esto es posible que las diferencias con trabajos de otras especies del género puedan ser producto de la fisiología propia de la especie y la KIN no sea una citocinina que genere una respuesta organogénica en *A. asterias*. Sin embargo se recomienda el uso de diferentes concentraciones (mayores y menores a 2 mg/l) de KIN con y sin auxinas para poder definir con claridad si la Kinetina es una citocinina que pueda generar respuesta en un protocolo de regeneración de CTV en el que se utilizó a *A. asterias*.

Las condiciones de cultivo ensayadas en la presente investigación (tipo de explante, su estado de desarrollo, medio nutritivo, RCV cuando fueron empleados; tipo, tamaño de recipiente, luz, temperatura, promovieron la inducción y desarrollo de los brotes hasta que los explantes se encontraban en medio de cultivo sin RCV y con carbón activado debido a que la proliferación de callo no permitía la regeneración. Hasta 6-8 meses de iniciada la inducción que se apreció diferenciación sustancial (agrupaciones celulares, surgimiento de ápices, diferenciación areolar y de brotes) y esta continuó hasta la conclusión del estudio.

Una vez en el medio basal se apreció hiperhidratación, que fue paralela a la diferenciación y aparición de regenerantes, y su crecimiento se vió favorecido en medio con una alta cantidad de bacto-agar que limitara la disponibilidad de agua, por lo cual la cantidad de este fue aumentada en 2 ocasiones (de 8.5 g/l a 9.5 g/l a 10.5 g/l). Esta hiperhidratación fue la principal razón para que los subcultivos fueran espaciados lo más posible, con el objetivo de permitir la evaporación del agua presente en el medio y disminuir su presencia en el mismo (Fig. 17). Los subcultivos se realizaban hasta que el medio era prácticamente agotado (2-3 meses, Fig. 17).

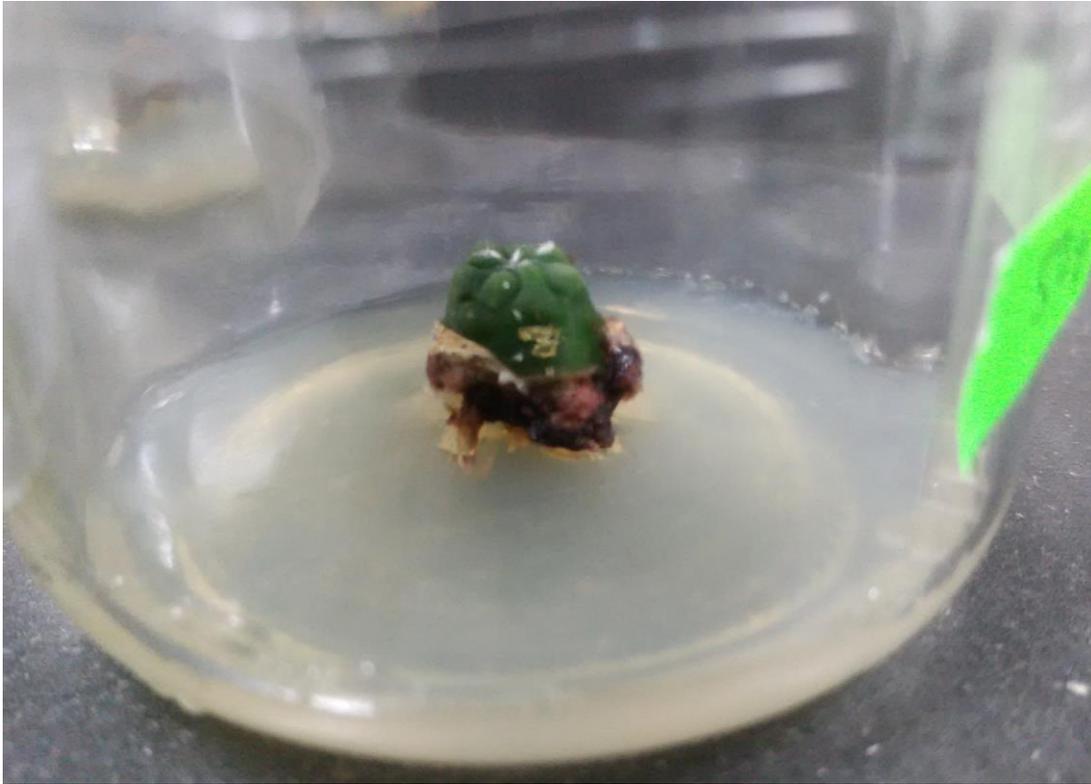


Figura 17. Ejemplo de frasco al tiempo de subcultivo, se aprecia el medio cerca de agotarse.

Se observó regeneración en todos los tratamientos, no así en todos los explantes (los explantes ápice tuvieron poca regeneración, sólo 4 y 18 brotes en el caso de los tratamientos KIN/ANA y BAP/ANA respectivamente y 0 brotes en el caso del control). El tratamiento con un mayor número de brotes fue el control.

Se observó una capacidad regenerativa diferencial en el tipo de explante, debido a que la formación de brotes se encontró asociada principalmente al explante de hipocótilo, seguido de la raíz y el ápice (105, 48 y 22 brotes, respectivamente)(Tabla 8). En todos los casos la regeneración se dio por vía indirecta, a excepción del explante raíz del tratamiento control que presentó organogénesis directa. Este es un resultado relevante debido a que se esperaba que los ápices tuvieran una mayor respuesta organogénica debido a la presencia de aréolas.

Ramírez-Serrano y Teixeira, (2008) mencionan que la presencia de ápice en especies que presentan un crecimiento monopódico genera una inhibición de las aréolas subyacentes, por lo cual si no se rompe esta dominancia apical el surgimiento de brotes es inhibido. Esto explica por qué los explantes con un mejor rendimiento fueron aquellos que quedaron libres del ápice (Explante hipocótilo con 105 brotes totales y explante raíz con 48 brotes totales) (Tabla 8). Asimismo explican porqué el explante con menor respuesta fue el ápice (explante ápice, 22 brotes totales) (Tabla 8). En ambos casos la vía de regeneración fue por organogénesis indirecta.

Tabla 8. Brotes obtenidos a los 8 meses, 11 meses y 12 meses de realizados los cortes. *Brotes obtenidos de manera directa.					
Tratamiento (mg/l)	Explantes	8 meses	11 meses	12 meses	Promedio ± e.e.
2 BAP/0.5 ANA	Ápice	4	11	18	1.64 ± 1.63
	Hipocótilo	4	7	41	3.73 ± 1.2
	Raíz	6	12	15	1.36 ± 1.36
	Totales	14	30	74	2.24 ± 0.81
2 KIN/0.5 ANA	Ápice	0	3	4	0.36 ± 0.27
	Hipocótilo	1	1	4	0.36 ± 0.27
	Raíz	0	3	11	1 ± 0.9
	Totales	1	7	19	0.58 ± 0.32
Control	Ápice	0	0	0	0
	Hipocótilo	17	41	60	5.46 ± 3.25
	Raíz	10	15	22*	2 ± 1.72
	Totales	28	56	82	2.49 ± 1.25
Brotes Totales		43	93	175	

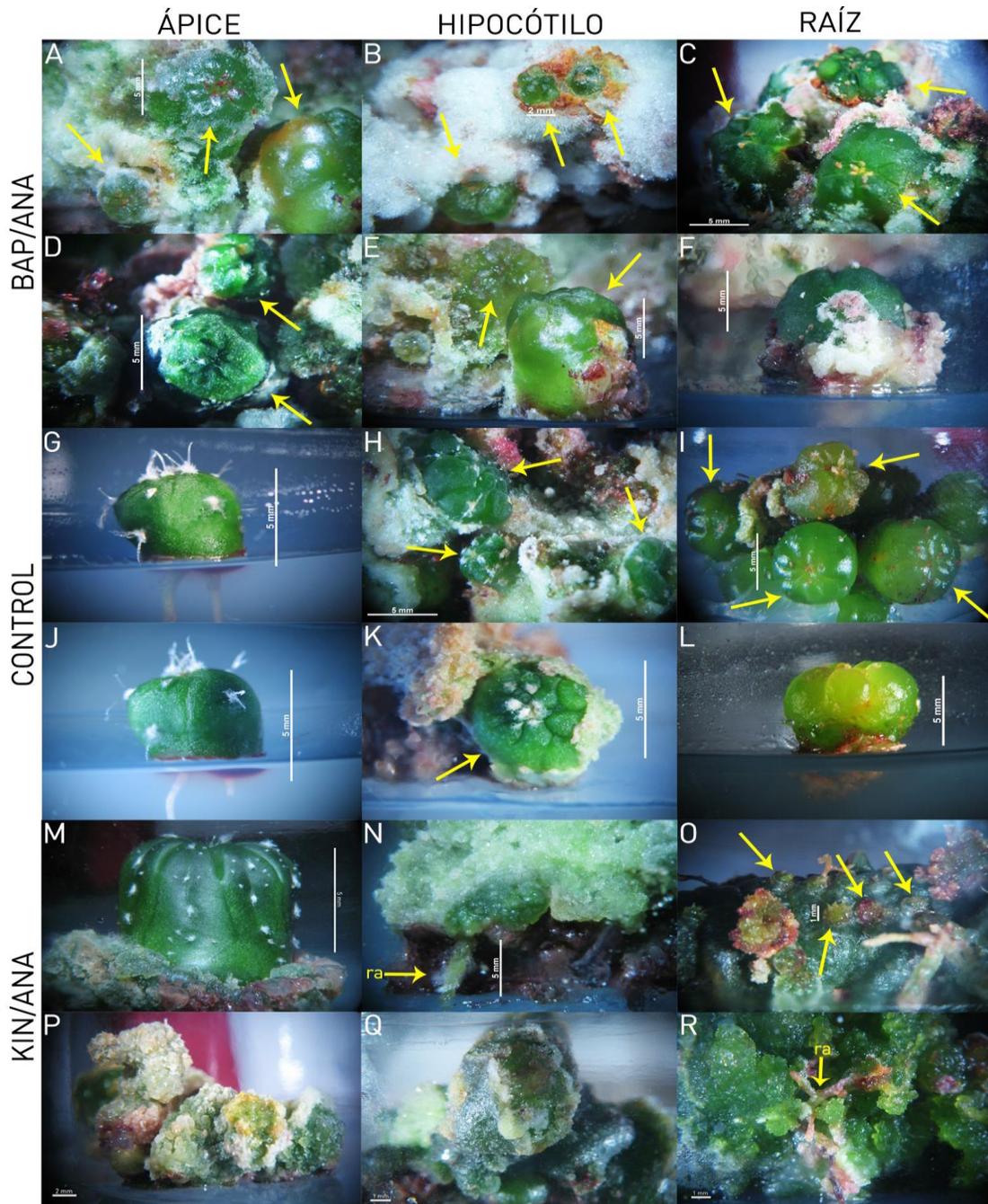


Figura 18. Respuesta morfogénica de los explantes de *A. asterias* a los diferentes tratamientos ensayados (todas las imágenes ilustran generación por vía indirecta, la única excepción es la imagen I que representa regeneración por vía directa): A), B), C), D), E) y F) Se observan brotes en el tratamiento BAP/ANA, es notable la forma irregular e hiperhidratada característica de brotes del tratamiento. F) Brote individualizado del tratamiento BAP/ANA, se observa crecimiento de callo en la base. G) y J) Se observan ápices que no generaron brotes o callo pero que regeneraron raíces. H), I), K) y L) Se observan brotes en el tratamiento control; con una morfología globosa, carentes de espinas, acorde a lo visto en la especie y una ligera hiperhidratación en algunos casos, delatada por la apariencia hialina, vidriosa e hinchada del brote. I) Se observa la regeneración de brotes por vía directa; a pesar de la hiperhidratación se observa la forma globosa deprimida y las costillas características de las especie. L) Brote individualizado del tratamiento control con la característica forma globosa deprimida de la especie, se observa hiperhidratación. M) y O) Se observa el aumento en tamaño de los ápices y raíces en el tratamiento KIN/ANA. N), P), Q) y R). Se observa el crecimiento de callo y de algunas raíces en explantes de KIN/ANA. ra=raíces. Escalas B, P y Q= 2 mm, O y R= 1 mm. El resto 5 mm.

Individualización y aclimatización

De los 8 brotes iniciales individualizados (todos provenían del control, explante raíz y se dieron de forma directa) se observó daño apical en los 4 sometidos al medio MS con hidrolizado de caseína sustituyendo al NH_4NO_3 , mientras que a los que se les redujo el NH_4NO_3 al 50% presentaban una apariencia normal (Fig. 19). El daño se manifestó como despigmentación en la zona apical los 7 días de haber sido colocados en el medio con el hidrolizado de caseína. Este daño culminaba en la muerte del ápice, para después comenzar con la diferenciación de brotes con apariencia sólida, morfología esférica, costillas bien definidas, aréolas con abundantes tricomas y estigmas característicos de la especie (Fig. 19).

Después del daño apical este tratamiento se descartó y todos los brotes que fueron individualizados subsecuentemente se sembraron en el primer medio MS con el NH_4NO_3 reducido al 50%.

Se observó reducción de la hiperhidratación en 100% de los explantes, la coloración cambió del verde claro observado al momento del subcultivo, a verde oscuro, se observaban más sólidos y en algunos casos se vió un crecimiento muy ligero (≤ 2 mm) de callo en la base. No se observó enraizamiento en ningún brote en este medio.

Se observaron raíces hasta los 3-5 días de que fue retirado el medio con AIA/AIB 0.15/0.15 mg/l, en los 4 brotes que no presentaron daño apical; este se retiró debido al crecimiento de callo en la base de los brotes. Se observaron de 1-3 raíces nuevas, de color blanco-verdoso, surgidas de la parte central del brote. No se observó el surgimiento de pelos radiculares. Se logró el enraizamiento en 4 de los 8 brotes expuestos al medio AIA/AIB 0.15/0.15 mg/l.

Estas 4 plantas fueron aclimatizadas. A los 2 meses de transferencia al suelo se obtuvo 75% de supervivencia. Las plantas sobrevivientes tenían una apariencia sólida, color verde y una forma esférica muy acorde a lo observado en plantas obtenidas de forma tradicional (Fig. 20). Se observó un crecimiento promedio de 0.6066 mm de diámetro.

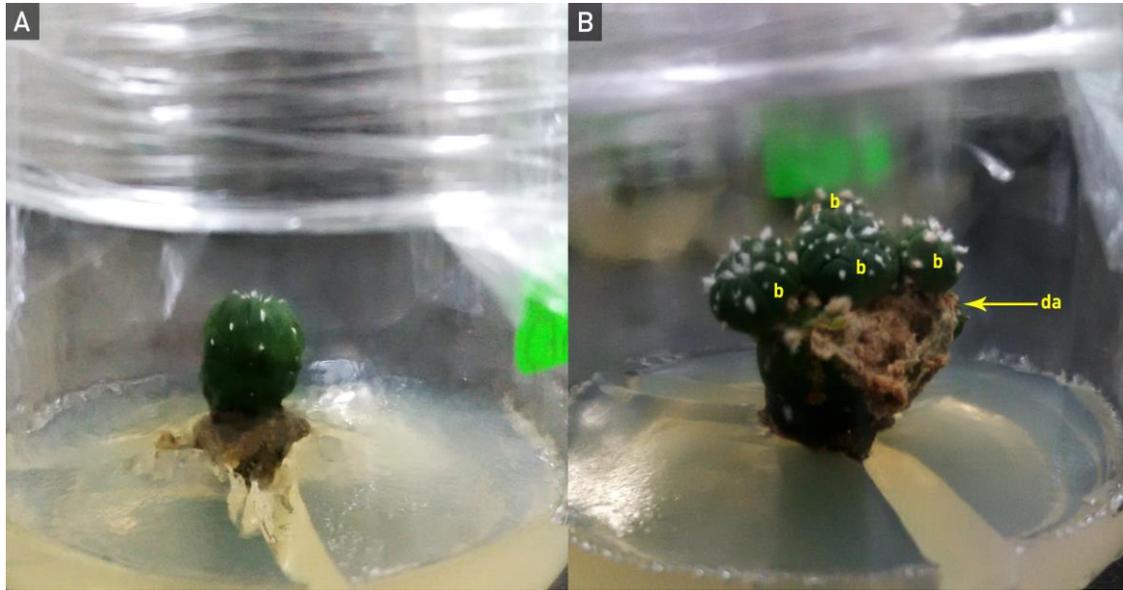


Figura 19. Brotes individualizados de *A. asterias*; A: Brote con el NH_4NO_3 reducido 50%, se observa morfología normal. B: Brote al que le fue sustituido el NH_4NO_3 por hidrolizado de caseína, se observa daño del ápice, así como brotes resultantes del rompimiento de la dominancia apical; b: brote, da: daño apical.

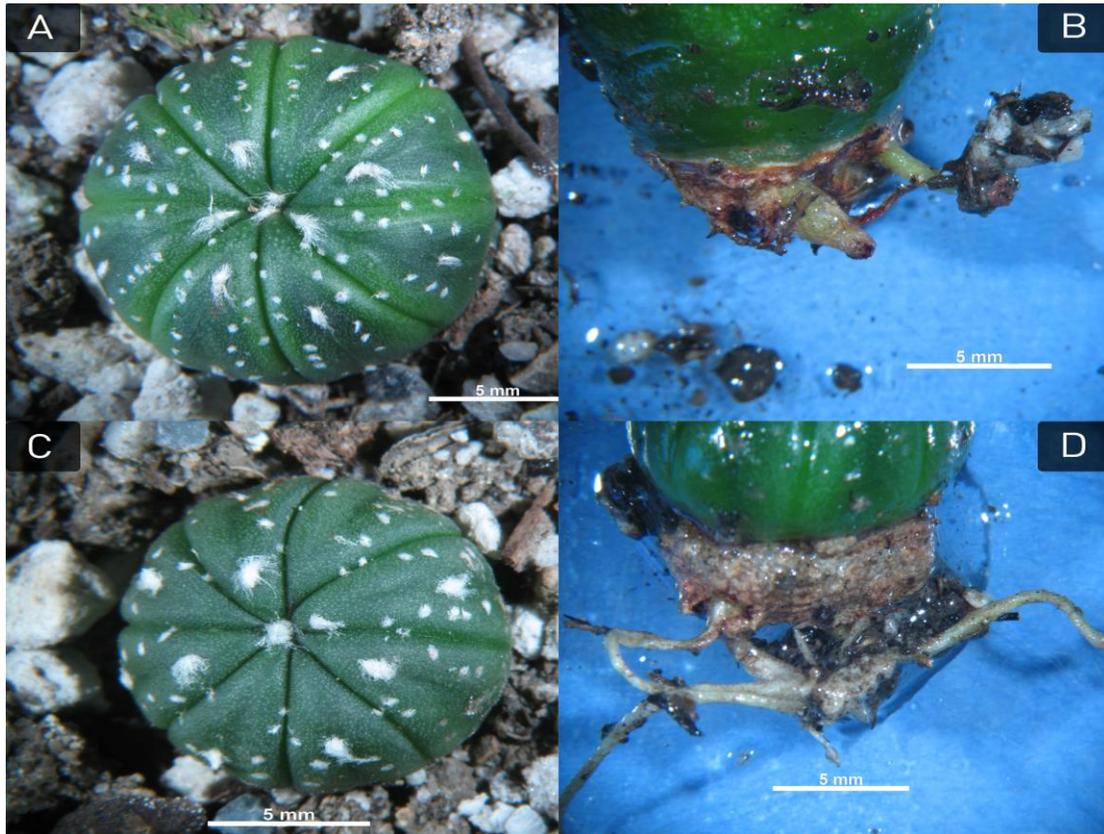


Figura 20. A) y C) Vista superior de plantas de *A. asterias* a 2 meses de iniciada la aclimatización. B) y D). Vista de raíces de plantas de *A. asterias*.

Molphe-Balch *et al.*, (1998) obtuvo un enraizamiento de 75% en *A. myriostigma* y una supervivencia de 90% 4 semanas después de iniciada la aclimatización, al usar IBA en concentración 1.0 mg/l.

El hidrolizado de caseína ha sido reportado en *Helianthus annuus* L. (nombre común: girasol, *Asteraceae*) por Mayor *et al.*, (2003) y en *Atriplex canescens* (nombre común: chamiso, *Chenopodiaceae*) por Reyes-Vera *et al.*, (2008). Es utilizado como una fuente orgánica de nitrógeno alternativa con el objetivo de reducir la hiperhidratación en los tejidos y es "una mezcla de alrededor de 20 aminoácidos y amonio" (Beyl, 2011). Mayor *et al.*, (2003) utilizaron 250, 500 y 750 mg/l (5.68%, 11.36% y 17.04% de lo usado en el presente estudio) sin retirar el NH_4NO_3 , ellos reportan que el hidrolizado de caseína mejoró la cantidad de brotes, sin embargo no les fue útil para reducir la hiperhidratación. Reyes-Vera *et al.*, (2008) lo utilizaron con una concentración de 4.4 g/l y con tapas que permitían el intercambio gaseoso llegando a una reversión de la hiperhidratación en 66 % de los explantes.

Se ha visto que la hiperhidratación del tejido aumenta de forma lineal si la cantidad de nitrato de amonio en el medio aumenta de la misma forma a las 12 semanas de iniciados los tratamientos en *Amelanchier arborea* (Brand, 1993), por lo cual el reducir el NH_4^+ incrementa la lignificación y reduce la hiperhidratación (Ziv, 1991) y puede mejorar la morfogénesis (Ziv, 1991). Debido a que el NH_4^+ reduce el contenido de lignina en tallos en 50% y puede reducir el xilema hasta en 70%.

Ninguno de los estudios antes mencionados registró daño apical o de algún tipo al exponerlos a medio con hidrolizado de caseína, como sucedió en el presente estudio; el daño pudo deberse a una acidificación del medio generada por: la asimilación de aminoácidos por parte de la planta, el desbalance de pH provocado por la ausencia del ion NH_4^+ ; al no contar con uno de los iones el balance normal se rompe (Fig. 19) (George *et al.*, 2008).

Asimismo la morfología y fisiología de las plantas estudiadas es muy diferente (*A. canescens* y *H. annuus* son arbustos con metabolismos C_4 y C_3 respectivamente), por lo cual los requerimientos iónicos y nutricionales pueden ser diferentes. El hidrolizado de caseína con el objetivo de reducir la hiperhidratación no ha sido

reportado en Cactaceae, por lo cual se recomienda hacer una aplicación en otras especies de la familia para ver si los regenerantes presentan los mismos daños ante la presencia de esta fuente orgánica de nitrógeno, así como probar con concentraciones menores, posiblemente al 25%, 50% y 75% de los 4.4 g/l.

La utilización de recipientes ventilados en la etapa final del cultivo *in vitro* con el objetivo de estimular la supervivencia de las plantas en condiciones *ex vitro* también ha sido evaluado por Reyes-Vera *et al.* (2008) que utilizó películas de polipropileno con una membrana de 10 mm y poro de 0.22 μm (Magenta Corp.) con éxito en *A. canescens*. Los autores lograron reversión de la hiperhidratación en 67% de los explantes sometidos al tratamiento, así como diferencias significativas con respecto al uso de tapas normales.

Majada *et al.*, (2000 y 2001) en *Dianthus caryophyllus* (clavel) utilizaron Sun caps® (Sigma®) e identificaron diferencias morfológicas y anatómicas en hojas a las 4 semanas de iniciados los cultivos, como una cutícula más gruesa, mayor cantidad de almidón, pobre desarrollo de xilema, mayor contenido de celulosa y un número de estomas similar a las plantas *ex vitro*. Los tallos presentaron un mayor grado de organización, mayor cantidad de esclerénquima y floema al utilizar segmentos nodales de 1 cm de altura; lo cual sugiere que la morfogénesis puede ser controlada a través de la modificación de los factores ambientales encontrados en el recipiente de cultivo *in vitro*.

Lai *et al.*, (1998) utilizaron tapas con un filtro de 0.02 μm y midieron periódicamente los niveles internos de etileno y oxígeno en yemas axilares de *Carica papaya*; encontraron un incremento de 41% en el número de brotes ≥ 0.5 cm, un incremento de 42% en expansión de hojas y un incremento de 17% en el número de hojas, en comparación con explantes sin aireación a las 4 semanas de iniciados los tratamientos. También encontraron niveles de etileno cercanos a 0 y niveles de oxígeno mayores a los encontrados en recipientes sin aireación, dato que insinúa que el material con aireación tiene una mayor capacidad fotosintética al no aireado.

Mendoza (2007) utilizó tapas de polipropileno, a las cuales se les realizó un orificio central de 8 mm de diámetro, el cual se cubrió por ambos lados con una capa de

cinta Micropore®. Encontró que el porcentaje de supervivencia *ex vitro* fue mayor en los brotes enraizados cuando incluyeron una etapa previa con recipientes ventilados.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y en trabajos ya citados indican que las plantas tienen mayores posibilidades de sobrevivir y se desarrollan mejor si se les somete a una etapa de pre-aclimatización que implique aireación. La aireación genera un mejor rendimiento fotosintético provocado por un aumento en la concentración de CO₂ (Pospíšilova *et al.*, 1999) y órganos mejor preparados para realizar fotosíntesis (hojas y tallos) (Majada *et al.*, 2000 y 2001). Asimismo provoca un decremento en los niveles de etileno en el recipiente (relacionados al aumento en hiperhidratación, estrés del material, reducción de las capacidades fotosintéticas y en la capacidad de aclimatización) (Ziv, 1991; Navarro *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

- Se logró establecer un protocolo de desinfección para semillas de *Astrophytum asterias*, logrando un establecimiento aséptico de 100% del material.
- El medio MS 50% resultó ser adecuado para la germinación de semillas de *A. asterias*.
- Se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al tiempo de germinación de semillas de *A. asterias* en condición *in vitro* (9.18 días) vs *ex vitro* (23.75 días). Se obtuvo un mayor porcentaje de germinación en la condición *in vitro* (100%) vs *ex vitro* (40%).
- A los 12 meses de realizados los cortes se obtuvieron dos tipos principales de respuestas: formación de callo (friable y compacto) y organogénesis de tallos de forma indirecta, es decir, mediante una fase previa de callo.
- A los 12 meses iniciada la inducción en el CONTROL se regeneraron un mayor número de brotes (82) con un promedio por explante de 2.48. El tratamiento BAP 2/0.5 ANA tuvo un mayor porcentaje de respuesta organogénica (39.4%).
- La citocinina BAP en combinación con ANA fue la que mayor respuesta morfogénica produjo (74 brotes totales y 2.24 por explante), en comparación de Kinetina/ANA (19 brotes totales y 0.58 por explante) a los 12 meses de iniciada la inducción.
- La respuesta de los explantes bajo el tratamiento K/ANA 2/0.5 mg/l fue más lenta (15-30 días), y presentó una morfología diferente (ápices elongados,

callo compacto, brotes aparentes pero no adecuadamente diferenciados) a la habitual en la especie. Sin embargo, se sugiere se hagan más pruebas con diferentes concentraciones (0.5-3 mg/l) y en ausencia de auxinas para descartar por completo su aplicación en *A. asterias*.

- El explante hipocótilo obtuvo un mayor porcentaje, promedio y número de brotes (todos por vía indirecta) totales a través de todos los tratamientos a los 12 meses de iniciada inducción (51.4%, 3.18 ± 105). Por lo cual fue el más apto para la regeneración en *A. asterias*.
- Se obtuvo una respuesta más abundante en plantas sin RCV, y una respuesta reducida (22 brotes totales) en el explante ápice para todos los tratamientos lo cual parece indicar que *A. asterias* es una especie con una fuerte dominancia apical, y una alta concentración endógena de auxinas.
- La respuesta organogénica casi siempre fue subsecuente a la aparición de callo, a excepción del explante raíz en el tratamiento control, y coincidió con la adición al medio de 1 g/l de carbón activado, por lo cual se considera que la vía morfogenética que siguieron los explantes fue organogénesis indirecta. Solamente 12.57% de los brotes se generó por organogénesis directa.
- Se logró la reversión de la hiperhidratación de brotes individualizados al combinar el uso de Sun caps® con una reducción de 50% de NH_4NO_3 en el medio de cultivo.
- Sustituir el NH_4NO_3 por 4.4 g/l de hidrolizado de caseína genera daño apical en brotes individualizados de *A. asterias*.
- La utilización de Sun caps® en combinación con una reducción de 50% de NH_4NO_3 es un tratamiento de preaclimatización exitoso en *A. asterias* ya que ayuda al enraizamiento y prepara a las plantas para el ambiente *ex vitro*.

- El uso de AIB/AIA 0.15/0.15 mg/l genera enraizamiento de brotes individualizados de *A. asterias* entre 3-5 días de ser regresados al medio original.
- El tratamiento de preaclimatización dio como resultado 75% de supervivencia a los 2 meses de iniciada la aclimatización.
- Se logró establecer un protocolo de regeneración de nuevas plantas de *A. asterias* mediante técnicas de CTV a partir de plantas germinadas *in vitro*.

PERSPECTIVAS

- Se sugiere que sean retirados los primeros milímetros de ápice (con el objetivo de retirar la zona meristemática) o se utilicen cortes longitudinales con el objetivo de romper la dominancia apical de la planta e impulsar su reproducción vegetativa (Tabla 8).
- Se podría explorar el uso de una mayor concentración inicial de gelificante (10 g/l \leq) solo o en combinación con un osmorregulador, probar el uso de sistemas de inmersión temporal y/o sustituir (o reducir) el nitrato de amonio en el medio para eliminar la hiperhidratación (como se observó en el presente trabajo) y poder facilitar el enraizamiento y posterior aclimatización de los brotes obtenidos.
- *Astrophytum asterias* es una especie con una fuerte dominancia apical. Como es sugerido por la incapacidad de generar brotes en explantes que aún tenían el ápice, el rápido enraizamiento de los mismos, la incapacidad de propagación vegetativa (lo que sugiere una alta concentración de auxinas endógenas), el crecimiento de callo y diferenciación aún en el tratamiento control y la mejor respuesta organogénica en explantes sin ápice. Por lo cual la respuesta organogénica es tardía o ausente. Se sugiere el uso de medio con citocininas pero sin auxinas, o el uso de bloqueadores del transporte de auxinas endógenas como ATIB, β -ANA o NPA (Ácido 1-naftalenacético), para mejorar y acelerar la respuesta organogénica.

- Se sugiere se realice un barrido de citocininas y la exploración de citocininas diferentes a las usadas en la presente investigación (Kinetina y BAP). Con el objetivo de encontrar la citocinina adecuada para la propagación de *A. asterias*. En el presente trabajo la citocinina BAP fue la de mejor rendimiento.
- Se sugiere probar con concentraciones menores y mayores a 4.4 g/l de hidrolizado de caseína en ausencia y en combinación de concentraciones de NH_4NO_3 menores a 100% para poder determinar el mejor método de reducción de la hiperhidratación en la especie.
- Se sugiere el uso de Sun caps[®], desde que se cuenta con brotes individualizados, como tratamiento de preaclimatización. Sin embargo se propone se hagan pruebas más exhaustivas en combinación con otros factores como la reducción de NH_4^+ del medio, el aumento en la concentración de gelificante, modificaciones en la concentración de sacarosa y el uso de sustancias que modifiquen el potencial hídrico del medio, como lo pueden ser sorbitol, manitol.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, A.J. y Chablé, M.F. (2009). Regeneración *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* a partir de embriones inmaduros. *Instituto Tecnológico de Roque. VI Verano de Ciencia, CONCYTEG*, 80-83.
- Anderson, E.F. (2001). *The Cactus Family*. Portland, E.U.A: Timber Press.
- Arias, Salvador. (1993). Cactáceas: conservación y diversidad en México.
- Arredondo, A. y Camacho, F. (1995) Germinación de *Astrophytum myriostigma* (Lemaire) en relación con la procedencia de las semillas y la temperatura de incubación. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. Tomo XL (2), 34-38.
- Balen, B., Tkalec, M., Pavoković, D., Pevalak-Kozlina, B. y Krsnik-Rasol, M. (2009). Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 36–45.
- Bárceñas, R.T. (2006). Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. *Biodiversitas*, 68, 11-15.
- Barthlott, W. y Hunt, D. (2000). Seed-Diversity in the Cactaceae: subfamily Cactoideae. *Succulent Plant Research*. Volume Five.
- Becerra, J.L., Romero, U., Berumen, S. y Martínez, E. (2010). Análisis Morfológico de la Semilla de *Astrophytum myriostigma* Lem. *Boletín Nakari*, 21(3), 39-45.
- Beyl, C. (2011). Getting Started with Tissue Culture-Media Preparation, Sterile Technique, and Laboratory Equipment. En: Trigiano, R.N. y Gray, D.J. (Eds.), *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology* (pp. 11-26). Florida, E.U.A.: CRC Press.
- Bhau, B.S. y Wakhlu, A.K., (2015). A highly efficient *in vitro* propagation protocol for elephant tusk cactus: *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13, 215-219.
- Bhojwani, S.S. y Razdan, M.K. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Amsterdam, Holanda: Elsevier.
- Bhojwani, S.S. y Dantu, P.K. (2013). *Plant Tissue Culture: An introductory Text*. Uttar Pradesh, India: Springer.
- Birbaum, S., Poole, J., y Williamson, P. (2011). Reintroduction of Star Cactus *Astrophytum asterias* by Seed Sowing and Seedling Transplanting, Las Estrellas Preserve, Texas, USA. *Conservation Evidence*, 8, 43-52.
- Blair, A.W. y Williamson, P.S. (2008). Effectiveness and Importance of Pollinators to the Star Cactus (*Astrophytum asterias*). *The Southwestern Naturalist*, 53(4), 423-430.
- Boyle, T.H. y Anderson, E. (2002). Biodiversity and conservation. En: Nobel, P.S. (Ed.), *Cacti. Biology and Uses*. (pp. 125–141). Los Angeles, E.U.A.: University of California Press.

Brand, M.H. (1993). Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35, 203-209.

Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. (1979). *Las Cactáceas de México*. UNAM, D.F., México: Biblioteca de Ciencias. Vol I.

Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. (1991). *Las Cactáceas de México* (2^{da} Ed.). UNAM, D.F., México: Biblioteca de Ciencias. Vol II.

Brewer, P. y Beveridge, C.A. (2009). Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science*, 14(7), 364-372.

Camargo, A. (2017). *Cultivo in vitro*, como estrategia de conservación de *Astrophytum caput-medusae* y de *Mammillaria luethy* (Cactaceae), especies amenazadas. Tesis de maestría, UNAM, CDMX, México.

Cardarelli, M., Borgognone, D. y Colla, G. (2010). *In vitro* propagation of *Obregonia denegrii* (Cactaceae). *Propagation of Ornamental Plants*, 10, 29–36.

Cárdenas, E., Ojeda, M. C., Torres, T. E. y Sáenz, E. O. (1993). Micropropagation of *Astrophytum capricorne* (A. Dietrich) Britton & Rose 1922, an endangered cactus from N.E. Mexico. *Botanic Gardens Micropropagation News*, 1(6), 75-76.

Carvalho, L. y Amâncio, S. (2002). Effect of ex vitro conditions on Growth and acquisition of autotrophic behaviour during de acclimatisation of chestnut regenerated in vitro. *Scientia Horticulturae*, 95, 151-164.

Casas, A. y Barbera, G. (2002). Mesoamerican Domestication and Diffusion. En: Nobel, P.S. (Ed.), *Cacti. Biology and Uses*. (pp. 143–162). Los Angeles, E.U.A.: University of California Press.

Castro, J.L., Chablé, M.F. y Alvarado, B. (2014). Efecto de BA y AIA en la brotación múltiple *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* (Lem, 1839) Cactácea en peligro de Extinción.

Chablé, M.F., Alvarado, B., Ramirez, P.J.G., Rangel, A. y Cruz, C.A. (2006). Regeneración *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* (Moell.) Kays y evaluación sustratos. *Instituto Tecnológico de Roque*. 4 p.

Challenger, A. y R, Dirzo. (2008). Factores de cambio y estado de la biodiversidad. En R, Dirzo., R, González. y I, March. (Eds.), *Capital natural de México, Vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

CITES. (1983). *Text of the Convention – 1 Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*. Gaborone.

CITES. (2017). *Apéndices I, II y III en vigor a partir del 4 de Abril de 2017*.

Cline, M. (1996). Exogenous Auxin Effects on Lateral Bud Outgrowth in Decapitated Shoots. *Annals of Botany*, 78, 255-266.

Clover, E.U. (1932). *Astrophytum* in the United States. *Desert Plant Life* 5: 20-21.

Comparán-Sánchez, S. y Luna-Martínez, J. (2004). Propagación por cultivo de tejidos de la especie *Astrophytum capricorne* Britton et Rose. En: Hernández, R.M.P., Cházaro, H.R.M., Cházaro, B.M.J. y Vázquez, G.J.A. (Eds.), *Libro de Resúmenes IV Congreso Mexicano y Latinoamericano y del Caribe de cactáceas y otras suculentas del 3 al 9 de mayo del 2004*, Guadalajara, Jalisco, México.

CONABIO-CONANP. (2009). Cacto estrella (*Astrophytum asterias*). *Fichas de especies mexicanas*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México, D.F.

CONABIO. (2014) ¿Qué es la biodiversidad? Recuperado el 20 de agosto de 2014, de http://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/que_es.html.

Cruz-Cruz, C., González-Arno, M. y Engelmann, F. (2013). Biotechnology and Conservation of Plant Diversity. *Resources*, 2, 73-95.

Dabekaussen, M.A.A., Pierik, R.L.M., Laken, J.D. y HoekSpaans, J. (1991). Factors affecting the areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Raush. *Scientia Horticulturae*, 46, 283-294.

Damude, N. y J. Poole. (1990). *Status Report on Echinocactus Asterias: Summary*. Albuquerque, New Mexico: U.S. Fish and Wildlife Service.

de Medeiros, L.A., de Ribeiro, R.C., Gallo, L.A., de Oliveira, E.T. y Soares, M.E. (2006). *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 165-169.

Debergh, P.C. y Maene, L.J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, 14, 335-345.

Dirzo, R. y Mendoza, E. (2008). *Biodiversity*. General Ecology.

Durbak, A., Yao, H. y McSteen, P. (2012). Hormone signaling in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 92-96.

El-Kazzaz, A.A., Saker, M.M. y Mona, H.H. (1999). *In vitro* micropropagation and molecular genetic analysis of cactus (*Echinocactus grusonii*) variants using SDS-PAGE and RAPD fingerprinting. *Arab Journal of Biotechnology*, 2, 79-88.

Elizondo, J., Valdés, J., Arias, S. y Hatch, S. (1994). Micromorfología de las semillas de algunas especies de la tribu Cactaeae (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. Tomo XXXIX (3), 59-67

Esteripharma. (2016). Soluvet. Recuperado el 20 de septiembre de 2016, de <http://www.esteripharma-agrovet.com/productos.php>

García-Osuna, H.T., Benavides, A., Escobedo, L., Villarreal, J.A. y Cornejo, E. (2011). Hyperhydricity control of *in vitro* shoots of *Turbincarpus valdezianus* (Moller) Gl. & F. *Phyton*, 80, 175-179.

Garza, R. (2010). Análisis fitoquímico y actividad biológica de los extractos de tallos y tejidos *in vitro* de *Astrophytum myriosigma* (Lem, 1839) y *Astrophytum capricorne* (Dietrich, 1922) fam. Cactaceae. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León. N.L., México, 101 p.

Geneve, R.L. (2011). Propagation from Nonmeristematic Tissues-Organogenesis. En: Trigiano, R.N. y Dennis, J (Eds.), *Plant tissue culture, development and biotechnology* (pp. 245-258). Florida, U.S.A: CRC Press.

George, E.F. y Sherrington, P.D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture — Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Basingstoke. Exegentics Limited.

George, E., Hall, M. y De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd Ed.) Volume 1. The Background. Dordrecht, Holanda, Springer.

Godínez-Álvarez, H. (1992). Hecho en casa. *Oikos, Boletín del Centro de Ecología*.

Goettsch, B. *et al.* (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature plants* 142.

González, O. *et al.* (2012). El Cultivo de Tejidos Vegetales; alternativa de oportunidades para el desarrollo de México. *UNISIERRA*.

Haberlandt, G. (2003). Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. En: Laimer, M., Rücker, W. (Eds.), *100 years since Gottlieb Haberlandt*. Springer-Verlag Wien GmbH.

Hernández-Alva, M. (2013). *Análisis de la variabilidad genética y cultivo in vitro de Digitostigma caput-medusae (Cactaceae): Como estrategia integral de conservación*. Tesis de Maestría. UNAM, CDMX, México.

Hernández-Hernández, T., Hernández, H.M., De-Nova, J.A., Puente, R., Eguiarte, L.E. y Magallón, S. (2011). Phylogenetic Relationships and Evolution of Growth Form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany*, 98(1), 44:61.

Hunt, D. (2006). *The new cactus lexicon*. Remous, Milborne Port, UK, DH Books.

Infante, R. (1992). *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 155-159.

IUCN. (2012). *Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1*. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. vi + 34pp. Originalmente publicado como IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. (2012) Second edition. (Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN.

IUCN. (2016). *Red List Category for all Plant Classes and Families*. Versión 2016.3. Diciembre 2016.

IUCN. (2017). *IUCN Red List versión 2017-3: Table 5*. Diciembre 2017.

Janssen, G.K., Poole, J.M. y Williamson, P.S. (2010). *The Research and Recovery of Star Cactus (Astrophytum asterias)*. Texas Parks & Wildlife, Texas, E.U.A.

Jiménez-Sierra, C.L. y Fuentes, A. (2007). Uso y Manejo de las Cactáceas en la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 7(1), 78-85.

Jiménez-Sierra, C.L. (2011) Las Cactáceas Mexicanas y los Riesgos que Enfrentan. *Revista Digital Universitaria*, 12(1).

Kadleček, P., Tichá, I., Haisel, D., Čapkova, V. y Schäfer, C. (2001). Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science*, 161, 695-701.

Kane, M. (2011). Propagation by Shoot Culture. En: Trigiano, R.N. y Gray, D.J. (Eds.), *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. (pp. 181-192) Florida, E.U.A., CRC Press. Taylor & Francis Group.

Karimi, N., Mofid, M.R., Ebrahimi, M. y Naderi, R. (2010). Effect of areole and culture medium on callus induction and regeneration *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *Trakia Journal of Sciences*, 8(2), 31-35.

Kilman, M. (2005). *A Tale of Two Cacti: Studies in Astrophytum asterias and Lophophora williamsii*. Tesis de Doctorado, Texas A&M University, Texas, E.U.A.

King, M.R. (1957). Studies in the tissue culture of cacti. *Cactus Succulent Journal*, 29, 102-104.

Kolář, Z., Bártek, J. y Vyskoř, B. (1975). Vegetative Propagation of Cactus *Mammillaria woodsii* Craig through Tissue Cultures. *Specialia*, 32(5), 668-669.

Krikorian, A.D. y Berquam, D.L. (2003). Plant Cell and Tissue Cultures: The Role of Haberlandt. En: Laimer, M; Rucker, W. (Eds). *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Viena, Austria, Springer Verlag Wien GmbH.

Laforge, F., Lussier, C., Desjardins, Y. y Gosselin, A. (1991). Effect of light intensity and CO₂ enrichment during *in vitro* rooting on subsequent growth of plantlets of strawberry, raspberry and asparagus in acclimatization. *Scientia Horticulturae*, 47, 259-269.

Lai, C.C., Yu, T.A., Yeh, S.D. y Yang, J.S. (1998). Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53, 221-225.

Lema-Ruminska, J. y Kulus, D. (2012). Induction of Somatic Embryogenesis in *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. In The Aspect of Light Conditions and Auxin 2, 4-D Concentrations. *Acta Scientiarum Polonorum*, 11(4), 77-87.

Lema-Ruminska, J., Goncerzewicz, K. y Gabriel, M. (2013). Influence of Abscisic Acid and Sucrose on Somatic Embryogenesis in Cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. Forma *monstruosa*. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-7.

Lema-Ruminska, J. y Kulus, D. (2014). Micropropagation of Cacti—a review. *Haseltonia*, 19, 46-63.

- Lizalde-Viramontes, H., Pérez-Molphe, B.E., Pérez-Reyes, M.E. y Dávila-Figueroa, C. (2003). Propagación de nueve especies de cactáceas mexicanas por cultivo de tejidos. *Scientia Naturae*, 5(2), 21-31.
- Majada, J.P., Tadeo, F., Fal, M.A. y Sánchez-Tamés, R. (2000). Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated Carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 207-214.
- Majada, J.P., Sierra, M.I. y Sánchez-Tamés, R. (2001). Air Exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Scientia Horticulturae*, 87, 121-130.
- Mancilla Villanueva, P.L. (2014). *Regeneración in vitro de Astrophytum asterias (Zucc.) Lem. y Mammillaria bombycina Quehl (Cactaceae)*. Tesis de Licenciatura, UNAM, CDMX, México.
- Martínez-Ávalos, J. G., Mandujano, M.C., Golubov, J., Soto, M. y Verhulst, J. (2004). Análisis del Método de Evaluación de Riesgo (MER) del "Falso Peyote" (*Astrophytum asterias (Zucc.) Lem.*) en México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, Tomo XLIX, 49(4), 118-127.
- Martínez-Ávalos, J.G., Golubov, J., Mandujano, M.C. y Jurado, E. (2007). Causes of individual mortality in the endangered star cactus *Astrophytum asterias* (Cactaceae): The effect of herbivores and disease in Mexican populations. *Journal of Arid Environments*, 71, 250-258.
- Mata, M., Monroy, M.A., Moebius, K. y Chávez, V.M. (2001). Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass ET Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37, 400-404.
- Mayor, M.L., Nestares, G., Zorzoli, R. y Picardi, L.A. (2003). Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 99-103.
- Mendoza, G. (2007). *Propagación in vitro de Astrophytum ornatum (de Candolle) Weber (Cactaceae), especie amenazada de extinción*. Tesis de Licenciatura, UAEH, Hidalgo, México.
- Moebius-Goldammer, K.G., Mata-Rosas, M. y Chávez-Ávila, V.M. (2003). Organogenesis and Somatic Embryogenesis in *Ariocarpus Kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an Endemic and Endangered Mexican Species. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 39, 388-393.
- Molphe-Balch, E., Pérez Reyes, M.E., Villalobos Amador, E., Meza Rangel, E., Morones Ruiz, L. y Lizalde Viramontes, H.J. (1998). Micropropagation of 21 species of Mexican Cacti by Axillary Proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 34 (Abril-Junio), 131-135.
- Molphe-Balch, E.P. y Dávila-Figueroa, C.A. (2002). *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P.strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38, 73-78.
- Monostori, T., Tanács, L. y Mile, L. (2012). Studies on *in vitro* propagation methods in cactus species of the genera *Melocactus*, *Cereus* y *Lobivia*. *ACTA HORTICULTURAE*, 937, (255-261).
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, 15, 473-497.

Navarro, C., Teisson, C., Côte, F. y Ganry, J. (1994). Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plants (*Musa* AAA, cultivar 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. *Scientiae Horticulturae*, 60, 41-54.

Oldfield, S. (1997). *Cactus and succulent plants: status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC cactus and succulent specialist group. International Union for Conservation of Nature and Natural resources, Gland, Switzerland, y Cambridge, UK.

Olguín, L.P. (1994). *CULTIVO in vitro DE Ariocarpus retusus SCEIDW. (Cactaceae), ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN*. Tesis de Licenciatura, UNAM, CDMX, México.

Ortega-Baes, P. y Godínez-Álvarez, H. (2006). Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity and Conservation*, 15, 817-827.

Ortega-Baes, P., Sühring S., Sajama, J., Sotola, E., Alonso-Pedano, M., Bravo, S. y Godínez-Álvarez, H. (2010). Diversity and Conservation in the Cactus Family. En: Ramawat, K.G., (Ed.) *Desert Plants: Biology and Biotechnology*. Berlín, Alemania: Springer.

Osório, M. L., Osório, J., Gonçalves, S., David, M. M., Correia, M. J. y Romano, A. (2012). Carob trees (*Ceratonia siliqua* L.) regenerated *in vitro* can acclimatize successfully to match the field performance of seed-derived plants. *Trees*, 26, 1837-1846.

Pan, M.J. y Staden, J. (1998). The Use of Charcoal in *in vitro* culture- A review. *Plant Growth Regulation*, 26, 155-163.

Pâques, M. (1991). Vitrification and Micropropagation: Causes, Remedies and Prospects. *Acta Horticulturae*, 289, 283-290.

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

Pospíšilova, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. y Plzáková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42 (4), 481-497.

Preil, W. (2003). Micropropagation of Ornamental Plants. En: Laimer, M; Rucker, W. (Eds). *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt* (115-135). Viena, Austria, Springer Verlag Wien GmbH.

PROFEPA. (2016). Asegura PROFEPA 350 ejemplares de flora silvestre a UMA de San Gabriel Amacuitlapilco, Morelos. Recuperado el 1 de Mayo de 2018, de <https://www.gob.mx/profepa/prensa/asegura-profepa-350-ejemplares-de-flora-silvestre-a-uma-de-san-gabriel-amacuitlapilco-morelos>.

PROFEPA. (2017). Asegura PROFEPA 48 ejemplares de cactus en AICM que pretendían ser enviados a China. Recuperado el 1 de mayo de 2018, de <https://www.gob.mx/profepa/prensa/asegura-profepa-48-ejemplares-de-cactus-en-aicm-que-pretendian-ser-enviados-a-china>.

Quiala, E., Matos, J., Montalvo, G., de Fera, M., Chávez, M., Capote, A., Pérez, N., Barbón, R. y Kowalski, R. (2009). *In Vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *J.PACD*, 11, 18-25.

- Ramírez-Serrano, C., Teixeira da Silva, J.A. (2008). Micropropagation of Cactus Plants (Cactaceae). En: Teixeira da Silva, J.A. (Ed.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology V* (219-226). Kagawa, Japón: Global Science Books.
- Reyes-Vera, I., Potenza, C. y Barrow, J. (2008). Hyperhydricity reversal and clonal propagation of four-wing saltbush (*Atriplex canescens*, Chenopodiaceae) cultivated *in vitro*. *Australian Journal of Botany*, 56, 358-362.
- Röckstrom, Johan *et al.*, (2009). A safe operating space for humanity. *Nature*, 461, 472-475.
- Sánchez-Salas, J., Jurado, E., Flores, J., Estrada-Castillón, E y Muro-Pérez, G. (2012). Desert species adapted for dispersal and germination during floods: Experimental evidence in two *Astrophytum* species (Cactaceae). *Flora*, 207, 707-711.
- Sánchez-Salas, J., Flores, J., Muro-Pérez, G., Arias-Montes, S y Jurado, E. (2015). Morfometría de Semillas en la cactácea amenazada de extinción *Astrophytum myriostigma* Lemaire. *Polibotánica*, 39, 119-131.
- Santos, M., del Campo, J.M., Arredondo, A., Santos, M. (2001). Efecto del medio de cultivo, Kinetina y agentes osmóticos sobre la respuesta morfogénica de *Astrophytum myriostigma* (CACTACEA) *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24 (2).
- Sarukhán, J., Dirzo, R., (2001). Biodiversity-rich countries. En: Levin, S.A., (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity* (pp. 419–436), Vol. 1, Academic Press, San Diego, CA.
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón, J., Dirzo, R., Llorente, J., Halffter, G., González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S. y de la Maza, J. (2009). *El capital natural de México*. CONABIO.
- SEMARNAT. (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. SEMARNAT, CDMX, México. Publicada en el diario oficial de la federación el Jueves 30 de Diciembre del 2010.
- Strong, A.W. y Williamson, P.S. (2007). Breeding System of *Astrophytum asterias*: an endangered cactus. *The Southwestern Naturalist*, 52(3), 341-346.
- Soria-Campos, D., López-Escamilla, A.L. y Olguín-Santos, L.P. (2013). Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. En: Pulido-Flores, G. y Monk, S. (Eds.). *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, Volumen II* (pp. 121–128). Lincoln, N.E., E.U.A.: Zea Books.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5^{ta} Ed). Sinauer Associates, Inc.
- Terry, M., Pepper, A.E., Strong, A.W., Tarin, D.M., Price, D.M. y Manhart, J.R. (2012). Genetic Structure of a Population of the Endangered Star Cactus (*Astrophytum asterias*) in Southern Texas. *The Southwestern Naturalist*, 57(2), 182-188.
- U.S. Fish & Wildlife Service. (2003). *Recovery Plan for Star Cactus (Astrophytum asterias)*. Albuquerque, New Mexico: U.S. DOI Fish and Wildlife Service.

U.S. Fish & Wildlife Service. (2013). *Recovery Plan for Star Cactus (Astrophytum asterias) 5-year review: summary and evaluation*. Corpus Christi, Texas. U.S. DOI Fish and Wildlife Service, Corpus Christi Ecological Services Field Office.

Valiente-Banuet, A. y Godínez-Álvarez, H. (2002). Population and Community Ecology. En: Nobel, Park. S. (Ed.) *Cacti: Biology and Uses* (pp. 91-108). California, E.U.A. University of California Press.

Vargas, A.J. (2017). Micropropagación de *Agave guiengola* Gentry, especie endémica amenazada del estado de Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Vázquez-Lobo, A., Aguilar, G., Arias, S., Golubov, J., Hernández, Tania y Mandujano MC. (2015). Phylogeny and biogeographic history of *Astrophytum* (Cactaceae). *Systematic Botany*, 40(4) DOI 10.1600/036364415X690094.

Velasco, C.G. y Nevárez, M. (2002). Nuevo género de la familia Cactaceae en el Estado de Nuevo León, México: *Digitostigma caput-medusae* Velasco et Nevárez sp. nov. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, Tomo XLVII, 47(4), 76-86.

Villaseñor, J.L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, 559-902.

Villavicencio, E.E., Villegas, A., Arellano, G. y Vargas, J. (1999). Desarrollo de brotes *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, Tomo XLIV, 44(2), 49-55.

Villavicencio, E. E., Cano, A. y Juárez, A. (2009). *Micropropagación producción de plantas del bonete o birrete de obispo, cactácea ornamental amenazada de extinción del desierto Chihuahuense* (Folleto Técnico No. 39). Campo Experimental Saltillo, Saltillo, Coah, México. CIRNE-INIFAP, 42 p.

Villavicencio, EE., González, A. y Carranza, M.A. (2012). Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.)F.A.C. Weber Ex Britt. & Rose Cactácea Ornamental Y Recurso Fitogenético Del Desierto Chihuahuense. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(14), 83-99.

Vitória, S., Lima-Brito, A. y Ferreira de Santana, J.R. (2010). Influência do substrato e do enraizamento na aclimatização de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo propagados *in vitro*. *Rev. Ceres, Viçosa*, 57(6), 803-809.

Wyka, T.P., Hamerska, M. y Wróblewska, M. (2006). Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87, 27-32.

Ziv, M. (1991). Quality of Micropropagated plants—Vitrification. *In Vitro Cell.Dev.Biol*, 27, 64-69.

APÉNDICE

Apéndice A. Composición del medio Murashige y Skoog pH 5.7 utilizado, modificado de Murashige y Skoog (1962).

Componentes		MS 100% (g/l)	MS 50% (g/l)
Macronutrientes	(NH ₄)NO ₃	1.65	0.825
	KNO ₃	1.9	0.950
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.37	0.185
	KH ₂ PO ₄	0.17	0.085
CaCl ₂ *2H ₂ O		0.44	0.22
Micronutrientes	MnSO ₄ *H ₂ O	0.01689	0.00844
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.0086	0.0043
	H ₃ BO ₃	0.0062	0.0062
	KI	0.00083	0.000415
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.00025	0.000125
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0.000025	0.0000125
	CoCl ₂ *6H ₂ O	0.000025	0.0000125
FeEDTA	FeSO ₄ *7H ₂ O	0.0278	0.0139
	Na ₂ EDTA	0.0373	0.01865
Vitaminas	Tiamina	0.0001	0.00005
	Ácido Nicotínico	0.0005	0.00025
	Piridoxina * HCl	0.0005	0.00025
Inositol		0.10	0.05
Glicina		0.002	0.001
Carbohidratos	Sacarosa	30	15
Agente Gelificante	Agar Bacteriológico	8-10.5	8-10.5
Agentes Antioxidantes	Ácido Ascórbico	0.10	0.05
	Ácido Cítrico	0.10	0.05
Carbón Activado		1	0.5