



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regeneración *in vitro* de *Aztekium valdezii*,
cactácea endémica de México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

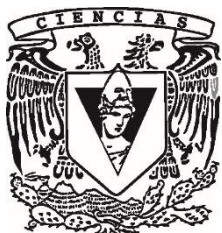
B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Jocelyn Alondra Vega Domínguez

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Octavio González Caballero



Ciudad Universitaria, CDMX. 2019



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

Vega
Domínguez
Jocelyn Alondra
58971429
Universidad Nacional
Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
309334183

2. Datos del tutor

M. en C.
Octavio
González
Caballero

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Sol
Cristians
Niizawa

4. Datos del sinodal 2

Biól.
Gabriel
Olalde
Parra

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Avila

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Alfredo
López
Caamal

7. Datos del trabajo escrito

Regeneración *in vitro* de
Aztekium valdezii,
cactácea endémica de
México.
82p
2019

Agradecimientos

A los integrantes del jurado por la revisión de esta tesis, por su tiempo, sus acertados comentarios y consejos que me permitieron mejorar esta investigación:

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, por su confianza, enseñanzas, el tiempo compartido y las pláticas mientras tomaba fotografías en su oficina, sé que ambos las vamos a extrañar.

Al M. en C. Octavio González Caballero, por tu amistad, porque gracias a ti conocí el maravilloso mundo del CTV, gracias también por la paciencia y por todo el tiempo invertido, lo logramos.

Al Biól. Gabriel Olalde Parra, por ser un excelente profesor y hacerme amar aún más a las cactáceas, gracias por tu disposición y tu buen humor siempre.

Al M. en C. Alfredo López Caamal, por tu tiempo y dedicación en revisar mi escrito, también por todos los consejos, gracias.

Al Dr. Sol Cristians Niizawa por sus acertados comentarios y por siempre estar al pendiente del avance del escrito y los trámites.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*, por permitirme conocer profesores increíbles, a mis mejores amigos y por formarme como profesionista.

Al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por alojarme durante todo este tiempo, en especial y con mucho cariño a Barbarita, por siempre estar dispuesta a ayudar y por tu amistad.

A todos mis amigos del laboratorio: Sarita, Alan, Jair, Lalo, Ñaña, Silvana, Pao, Lau, Ivonne, Auris, Emma, Vio, Erick, Andy, Dulce (y a los que me faltó mencionar), ya sea que se encontraban en servicio social o en el taller,

siempre fue un gusto compartir campana, días nacionales, o días de lavado con ustedes.

A mis mejores amigas Nahui, por siempre estar ahí, y por compartir todo, a Cin, por hacerme reír siempre y a Liz por aparecer cada dos años, las amo.

A mi abuelita Ana María por sus cuidados, enseñanzas, consejos y su amor, a mis abuelitos Elvirita† y Lucio†, no saben cuánto los extraño y como me gustaría que vieran esto.

A toda la familia Domínguez y Vega, por las anécdotas.

A mi mamá Ángeles, por darme la vida y quererme siempre, por enseñarme a siempre seguir adelante y nunca rendirme, por amarme como soy, a mi papá Juan por todo el esfuerzo que siempre hizo por darme lo mejor y por consentirme siempre, los amo demasiado, nunca podré agradecerles todo lo que han hecho por mí, esto es para ustedes.

A Belén, por siempre procurarme y cuidarme, gracias a ti conocí a dos cosas maravillosas, Leo y Ari que me enseñaron el verdadero significado de la paciencia y el amor incondicional, son los mejores.

A Ale, ambos sabemos que fuiste una pieza clave para la culminación de este trabajo, muchas gracias por siempre alentarme a seguir adelante, por hacerme creer que podía lograrlo, por tu ayuda, por todo el tiempo que me acompañaste en el laboratorio, la biblioteca, en mis trámites, por tu amor incondicional y por estos maravillosos cinco años ♥.

Índice

Introducción.....	1
Antecedentes	4
Biodiversidad	4
Pérdida de la biodiversidad vegetal.....	6
Generalidades de la Familia Cactaceae.....	6
Importancia ecológica de las cactáceas	9
Importancia económica de las cactáceas en México	9
Situación actual de la Familia Cactaceae en México.....	11
Descripción del género <i>Aztekium</i>	14
Clasificación taxonómica de <i>Aztekium valdezii</i> Velazco, Alvarado et Arias 2013.....	15
Descripción de <i>A. valdezii</i>	17
Situación actual de <i>A. valdezii</i>	17
Conservación <i>in situ</i>	19
Conservación <i>ex situ</i>	20
Métodos convencionales de propagación en cactáceas.....	20
Conservación de germoplasma	21
Cultivo de tejidos vegetales	22
Principales problemas durante el establecimiento <i>in vitro</i>	27
Contaminación.....	28
Oxidación.....	29
Microinjertos.....	30
Cultivo de tejidos en cactáceas.....	31
Cultivo de tejidos en el género <i>Aztekium</i>	33
Objetivo general	35
Objetivos particulares.....	35
Materiales y Métodos	36
Material vegetal	36
Desinfección de las semillas.....	36
Disección e inducción morfogénica de explantes	37
Resultados y Discusión	41
Medición y peso de las semillas	41
Desinfección de las semillas.....	42
Germinación <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i>	43
Inducción morfogénica de explantes	49
Tratamiento 1 BAP/ANA 1/0.2 mg/L.....	50
Tratamiento 2 BAP/ANA 0.5/0.025 mg/L	55
Vías de regeneración	59
Microinjertos.....	63
Conclusiones	68
Bibliografía	70

Abreviaturas

2,4-D: Ácido 2,4 diclorofenoxiacético

AIA: Ácido indol-3-acético

ANA: Ácido α -naftalenacético

ANP: Área Natural Protegida

BAP: 6-Bencilaminopurina

CAM: Metabolismo ácido de las crasuláceas

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

CTV: Cultivo de Tejidos Vegetales

IBA: Ácido indol-3-butírico

IUCN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

K: Kinetina

mg/L: Miligramos por litro

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

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

PPO: Enzima polifenol oxidasa

PVP: Polivinilpirrolidona

RCV: Reguladores de Crecimiento Vegetal

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

UANL: Universidad Autónoma de Nuevo León

UMA: Unidades de Manejo para la conservación de la vida silvestre

v/v: volumen/volumen

Resumen

Aztekium valdezii es una especie de reciente descubrimiento (2013), endémica de Nuevo León, su población conocida se encuentra restringida a la Sierra Madre Oriental, en una zona de aproximadamente 2 km². No se encuentra en ninguna categoría de riesgo en la NOM-059-SEMARNAT-2010 o en algún apéndice en CITES, por lo cual es necesario generar estrategias para su conservación, ya que la colecta ilegal podría poner en riesgo las poblaciones a largo plazo, debido a que solo se encuentran restringidas a unas cuantas cañadas dentro de la Sierra Madre Oriental. Una alternativa para contribuir a la conservación de *Aztekium valdezii* es por medio del cultivo de tejidos vegetales, ya que nos permite la multiplicación rápida a partir de poco material vegetal. El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones de cultivo *in vitro* para dirigir el desarrollo de las células a la regeneración de plantas de *A. valdezii*. Se sembraron 45 semillas en medio MS de las cuales se obtuvo el 70% de germinación. Pasados seis meses se obtuvieron dos tipos de explantes: tallo y raíz; los cuales fueron sembrados *in vitro* con medio MS al 50% con 100 mg/L de ácido cítrico, 100 mg/L de ácido ascórbico, 0.5 g/L de PVP y adicionado con BAP/ANA (1 / 0.2 y 0.5/ 0.025 mg/L) y sin Reguladores de Crecimiento Vegetal. Los explantes de tallo tuvieron una mayor formación de callo después de 30 días de la inducción. El tratamiento BAP/ANA 1/0.2 mg/L presentó al cabo de 18 meses 15.8 brotes por explante, siendo el valor obtenido más alto. Después de 18 meses de iniciados los cultivos, los brotes más desarrollados y consolidados (ca. 0.5 cm alt.) fueron microinjertados *in vitro* sobre plántulas germinadas *in vitro* de *Hylocereus undatus*, lo cual estimuló su crecimiento. Los resultados obtenidos nos permitieron conocer un poco más acerca del crecimiento y la capacidad de regeneración de *A. valdezii* para poder contribuir a su conservación.

Introducción

La Familia Cactaceae es nativa del continente americano y alberga cerca de 1800 especies que se distribuyen en cuatro centros de diversidad en regiones áridas y semiáridas. Los centros más importantes de diversidad de cactáceas se encuentran en la región centro y norte de México hasta el suroeste de Estados Unidos conocido como la ecorregión del Desierto de Chihuahua, y la zona árida y semiárida del suroeste de la región Andina (Arias y Flores, 2013, Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015).

México, Argentina, Perú, Bolivia, Chile y Costa Rica tienen la más grande proporción de especies endémicas. México es considerado el centro más importante de concentración y diversificación de géneros y especies de cactáceas a nivel mundial, ya que cuenta con más de 600 especies, de las cuales aproximadamente 80% son endémicas al país (Ortega-Baés *et al.*, 2010).

En México el aprovechamiento de las cactáceas es variado, se utilizan como alimento, forraje e incluso como cercos vivos. Sin embargo, debido a sus extrañas formas y grandes flores, las cactáceas son utilizadas primordialmente como plantas de ornato, siendo ésta una de las principales razones por la que los aficionados las coleccionan (Jiménez, 2011).

A pesar de ser ampliamente usadas alrededor del mundo, actualmente se tiene un pobre conocimiento sobre el daño natural que los herbívoros y las enfermedades pueden tener en las poblaciones naturales de cactáceas; solo han sido descritos algunos casos, la mayoría sobre cactáceas invasivas o cultivadas, como *Hylocereus* y *Opuntia*. En poblaciones naturales, el daño por enfermedades y herbívoros no está bien documentado, existiendo solo unos pocos estudios dedicados al impacto de insectos,

mamíferos y patógenos sobre la mortalidad de cactáceas (Martínez-Ávalos *et al.*, 2007).

En muchas especies de cactáceas, la capacidad de regeneración es restringida, y una vez dañadas, las plantas mueren (Lema-Ruminska y Kulus, 2012). La actividad humana es otra gran amenaza para las cactáceas. La agricultura, el uso de herbicidas y otros pesticidas, la asignación de nuevas áreas a la siembra, la urbanización y el progreso de infraestructura, la construcción de caminos, presas y minas; así como la introducción de pastos exóticos para el pastoreo de ganado y la extracción de ejemplares provenientes de poblaciones naturales representan serias amenazas para muchas especies de cactáceas (Taylor, 1997).

La extracción masiva de cactáceas para su posterior venta ha afectado en gran medida a algunas especies. Por ejemplo, la localidad tipo de *Pelecyphora strobiliformis* cerca de Miquihuana en Tamaulipas, México, fue prácticamente eliminada debido al comercio de éstas en Europa (Sotomayor *et al.*, 2004). Por otro lado, la gran demanda de costillas de Saguaro (*Carnegiea gigantea*) para fabricar muebles en Estados Unidos se satisface legal e ilegalmente importando plantas de México, ya que en Estados Unidos ésta es una especie protegida. Asimismo, debido a la recolección y al pastoreo muchas cactáceas globosas continúan siendo destruidos *in situ* (Jiménez-Sierra y Eguiarte, 2010)

Aztekium valdezii es una especie de reciente descubrimiento, endémica del estado de Nuevo León, México. Debido a su belleza y rareza, esta especie ha sido objeto de un intenso saqueo de las poblaciones naturales. Las senadoras Marcela Guerra Castillo, Blanca Alcalá Ruiz, Graciela Ortiz González y Angélica de la Peña Gómez firmaron una iniciativa que fue aprobada para proteger el área donde ésta se distribuye y exhorta a diversas autoridades a proteger a *Aztekium valdezii*, por lo cual es

importante generar estrategias para su conservación y así evitar, en un futuro cercano, que sus poblaciones se encuentren en grave peligro de desaparecer.

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una herramienta que se ha empleado con éxito en la propagación de especies en peligro de extinción o de lento crecimiento. El éxito del CTV radica en la gran cantidad de plantas que se pueden generar a partir de poco material inicial en un tiempo relativamente menor en comparación con otros métodos de propagación convencionales de cactáceas, para así satisfacer la demanda de plantas.

En el presente estudio se logró la regeneración *in vitro* de *A. valdezii* y se abre una nueva posibilidad de ayudar a la conservación de la misma, en donde se podría cubrir de manera legal la demanda de plantas y así contribuir a la protección de las poblaciones naturales.

Antecedentes

Biodiversidad

El término biodiversidad se refiere a la variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que la conforman. Comprende también la gama de ecosistemas, de especies y de sus poblaciones, así como las diferencias genéticas entre los individuos que las constituyen (Jiménez *et al.*, 2010).

Cerca de dos terceras partes de la biodiversidad mundial se localizan en poco más de una docena de países conocidos como países megadiversos (Sarukhán *et al.*, 2009). México es un país Megadiverso por su elevado número de especies pero también por su riqueza de endemismos, de ecosistemas y por la gran variabilidad genética (Fig.1) (Espinosa y Ocegueda, 2008).

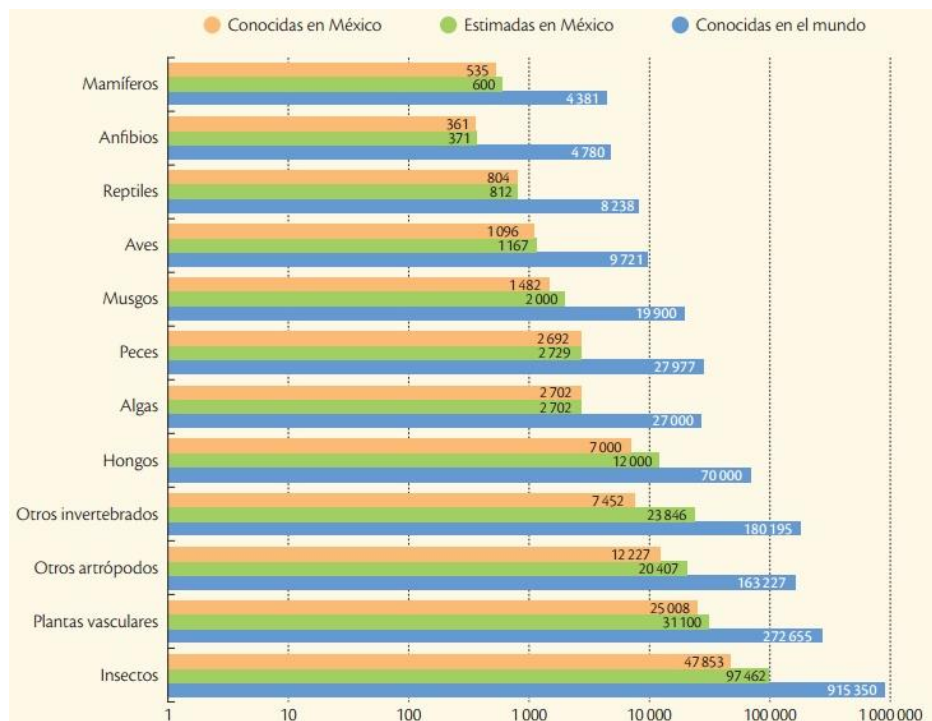


Figura 1. Diversidad de especies de hongos, plantas y animales en el mundo y en México. (CONABIO, 2006.)

México ocupa el primer lugar en el mundo en riqueza de reptiles, el segundo en mamíferos y el cuarto en anfibios y plantas (Fig. 2). Aproximadamente el 50% de las especies de plantas que se encuentran en nuestro territorio son endémicas, esto se traduce en aproximadamente 15,000 especies (CONABIO, 2008). CONABIO (2008) reportó que para algunas familias de plantas como las cactáceas esta cifra es aún mayor, con 83% de especies y variedades que se encuentran sólo en nuestro territorio (Fig. 2).



Figura 2. Las cinco familias de plantas con mayor número de especies nativas de la flora de México y sus porcentajes de endemismo. (CONABIO, 2008).

Como se puede observar, (Fig. 2) los niveles de endemismo en estas familias botánicas son muy altos. Debido a que las especies endémicas generalmente tienen áreas de distribución restringida, éstas son más vulnerables e incluso corren un mayor peligro de extinción en comparación con plantas de amplia distribución. Lo anterior ocurre debido a que son pocos los sitios que presentan las condiciones ambientales idóneas para que completen su ciclo de vida.

Pérdida de la biodiversidad vegetal

La pérdida de biodiversidad, es un problema creciente; el cambio climático y algunas actividades antropogénicas como la sobreexplotación, el saqueo de especies y la falta de protocolos para la conservación contribuyen a que el número de especies en alguna categoría de riesgo aumente constantemente (Jiménez Sierra, 2011).

Las causas de extinción de plantas mexicanas no se encuentran bien documentadas en comparación con los vertebrados. Sin embargo, se ha señalado que la fragmentación, pérdida del hábitat y la colecta ilegal con fines comerciales, entre otros factores afectan a muchas especies y familias de plantas (Sosa y Platas, 1998; Flores-Palacios y Valencia-Díaz, 2007).

Aunado a las causas mencionadas, algunas especies vegetales poseen características intrínsecas de su biología reproductiva y fisiología que las hace más susceptibles a estas actividades. Algunos ejemplos de estas características son: la baja viabilidad y producción de semillas y el lento crecimiento (López y Olguín, 2013). Debido a la belleza de sus flores, algunas especies de Cactaceae y Orchidaceae, son altamente cotizadas en el mercado, motivo por el cual sus poblaciones silvestres han estado sometidas a presiones de colecta (López y Olguín, 2013). Por lo que una de las familias que se encuentra más amenazada, es la familia Cactaceae.

Generalidades de la Familia Cactaceae

La familia Cactaceae incluye entre 100 y 150 géneros y aproximadamente 1800 especies en el mundo, con alta diversidad y gran número de endemismos en México (Arias y Flores, 2013). Se estima que en el país hay

669 especies, y que más de 70% de los géneros y de las especies son endémicas (Hernández *et al.*, 2007).

Con excepción de *Rhipsalis baccifera*, las cactáceas se encuentran estrictamente en el continente americano (Anderson, 2001). México es el país con la más alta diversidad de cactáceas del continente (Godínez-Álvarez y Ortega-Baes, 2007). Las zonas desérticas y semidesérticas del país, representadas por los desiertos de Sonora y Chihuahua, las selvas bajas caducifolias y la depresión del Balsas, contienen una gran diversidad de cactáceas (Jiménez, 2011). Entre las zonas con mayor diversidad en el centro de México, destacan el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la Barranca de Metztitlán (Jiménez, 2011).

El estado de Nuevo León ha sido señalado como un estado con una alta riqueza a nivel de especies y géneros, siendo colocado en segundo o tercer lugar a nivel nacional (González, 2004; Guzmán *et al.*, 2003). Sin embargo, es en las inmediaciones de la Sierra Madre Oriental y la Planicie Costera del Golfo en donde se localizan géneros endémicos como *Geohintonia*, *Aztekium* y *Digitostigma* (Del Conde *et al.*, 2009; Anderson, 2001; Velazco y Nevarez, 2002).

Las especies pertenecientes a la familia Cactaceae han desarrollado adaptaciones que les permiten enfrentar las adversas condiciones climáticas de las zonas áridas. La mayoría de sus características morfológicas y fisiológicas están relacionadas con el uso eficiente del agua. Su forma globosa y robusta les permite almacenar agua, al mismo tiempo que disminuye la superficie de la planta expuesta al sol. La existencia de una cutícula impermeable que cubre toda la planta evita la pérdida de agua por transpiración; la entrada y salida del agua está regulada por los estomas (Becerra, 2000).

Al igual que otras plantas como las crasuláceas y los agaves, las cactáceas realizan la fotosíntesis CAM. Este tipo de fotosíntesis consiste en un desfasamiento en el tiempo del intercambio gaseoso. Durante la noche, cuando la temperatura es menor, se abren los estomas para realizar el intercambio gaseoso, y el dióxido de carbono captado es almacenado en el tejido de la planta en forma de ácidos orgánicos. En el día cesa la transpiración y, aprovechando la luz solar, realiza la síntesis de carbohidratos a partir de estos ácidos orgánicos (Becerra, 2000).

Dado que las cactáceas disminuyen la transpiración durante el día, se evita la pérdida excesiva del agua. Este proceso las obliga a producir grandes masas de tejido de almacenamiento, y la energía que gasta la planta en producir este tejido repercute directamente en su crecimiento, ya que la proporción entre el tejido de almacenamiento y el de crecimiento es mayor en la mayoría de las plantas, motivo por el cual las cactáceas tienen un lento crecimiento. La falta de hojas y la presencia de espinas, ayuda a la planta a disminuir el calor provocado por la incidencia de los rayos solares (Becerra, 2000).

Importancia ecológica de las cactáceas

Los cactus ofrecen alimento, refugio y hábitat a muchos organismos, como lo son pequeños mamíferos (roedores y murciélagos), aves, reptiles y un gran número de insectos (Jiménez, 2011). Las cactáceas columnares, con flores nocturnas, tienen una gran importancia para fauna como los murciélagos, los cuales actúan como sus polinizadores y dispersores de semillas. Por lo tanto, la desaparición de uno de estos grupos llevaría inevitablemente a la extinción del otro (Jiménez, 2011).

Por ejemplo, los murciélagos son conocidos polinizadores de algunas cactáceas columnares como el “viejito” (*Cephalocereus senilis*) y de otras cactáceas que representan recursos económicos significativos para los humanos (como flores y frutos). Por lo tanto, la desaparición de este grupo de plantas en sus ambientes naturales llevaría a un proceso de empobrecimiento biológico de las comunidades desérticas y semidesérticas de México, y a una pérdida de muchas especies útiles (Jiménez, 2011) y potencialmente útiles.

Importancia económica de las cactáceas en México

Las características morfológicas que presentan las cactáceas en cuanto a su forma y color las hacen sumamente atractivas para los colectores y cultivadores, por lo que tienen gran demanda en el mercado de plantas ornamentales, tanto a nivel nacional como internacional (Sánchez-Mejorada, 1982). Asimismo, muchas cactáceas ofrecen algún beneficio al hombre y han sido utilizadas como forraje para el ganado, combustible, fuente de alimento y materias primas (Tabla 1).

Tabla 1. Usos que se le han dado a varios géneros de cactáceas en México (Becerra, 2000).	
Género	Usos
<i>Lophophora</i>	Propiedades alucinantes, empleado en ceremonias
<i>Opuntia</i>	Los tallos y frutos se consumen como alimento
<i>Stenocereus</i>	Los tallos se utilizan como cercos vivos y los frutos se consumen
<i>Hylocereus</i>	Los frutos se consumen y por sus flores se considera ornamental
<i>Acanthocereus</i>	Los tallos y los frutos son comestibles, el tallo también tiene uso medicinal

Algunas especies son muy apreciadas por los coleccionistas y son buscadas por su rareza, de tal suerte que han estado sujetas a un tráfico ilegal, lo que ha llevado a poner en riesgo a varias especies (Jiménez, 2011). En el mercado ilegal, las cactáceas llegan a alcanzar grandes precios.

Por ejemplo, en 1994 compradores japoneses ofrecían dos mil dólares por un ejemplar de *Geohintonia mexicana* o de *Aztekium hintonii* (Becerra, 2000). En el Tercer Festival Cultural de las Cactáceas, San Ángel 2017, un injerto de *Aztekium valdezii*, alcanzaba los \$2000 por un ejemplar de aproximadamente 4 cm de diámetro.

Situación actual de la Familia Cactaceae en México

Cuando los españoles llegaron a México, la rareza y hermosura de estas plantas los sorprendió de tal manera que inmediatamente comenzaron a coleccionarlas y enviarlas a Europa, iniciando así un comercio que a lo largo de los años las ha llevado a ser uno de los grupos de plantas más amenazados en nuestro país. La posición de México en el ámbito del comercio internacional de cactáceas es lamentable en relación con la diversidad de especies. Más de 300 especies de cactáceas del Desierto Chihuahuense, se comercializan en forma estable fuera del país (Bárcenas, 2006).

México posee el mayor número de especies y endemismos de cactáceas en el mundo, y se comercializan 91 especies, la diversidad cactológica comercializada en México representa sólo 28.6% de la comercializada en Estados Unidos, aun cuando la mayoría de las especies son endémicas al territorio nacional (Bárcenas, 2006). Por lo que hay que encontrar la manera de propagar y comercializar legalmente a *A. valdezii*, para satisfacer la demanda y no afectar poblaciones naturales, utilizando el CTV que nos ayuda a obtener plantas en un tiempo más corto que los métodos convencionales de propagación.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, actualmente 275 especies de cactáceas se encuentran en alguna de las cuatro categorías de riesgo, de las cuales 255 son endémicas. Estas cifras son alarmantes ya que nos indican que más del 40% de las especies presentes en México están en peligro (Tabla 2).

Tabla 2. Cactáceas ornamentales con alta demanda en el mercado internacional y su estatus de conservación.

Género	Especies	Estatus	Endémica de México
<i>Ariocarpus</i>	<i>A. agavoides</i>	CITES I; E; Pr	Endémica
	<i>A. retusus</i>	CITES I; Pr	Endémica
<i>Astrophytum</i>	<i>A. asterias</i>	CITES I; E; Pr	Endémica
	<i>A. myriostigma</i>	V; Th	Endémica
<i>Aztekium</i>	<i>A. hintonii</i>	R; Sp	Endémica
	<i>A. ritteri</i>	CITES I; R; Th	Endémica
<i>Geohintonia</i>	<i>G. mexicana</i>	Sp	Endémica
<i>Lophophora</i>	<i>L. diffusa</i>	R; Id	Endémica
	<i>L. williamsii</i>	Sp	No Endémica
<i>Obregonia</i>	<i>O. denegrii</i>	CITES I; R; Th	Endémica
<i>Strombocactus</i>	<i>S. disciformis</i>	CITES I; Th	Endémica

(Adaptada de Perez-Molphe *et al.*, 2015. Estatus: CITES I: Apéndice I; IUCN: V (Vulnerable), R (Rara), E (En peligro), I (Indeterminado); NOM_059-SEMARNAT-2010: Id (En peligro), Th (Amenazada), Sp (Protección especial)).

La lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN, brinda información taxonómica sobre el estado de conservación y distribución de plantas, hongos y animales. Este sistema está diseñado para determinar el riesgo relativo de extinción. El objetivo principal de la Lista Roja de la IUCN es catalogar y resaltar aquellos organismos que corren un mayor riesgo de extinción global (es decir, los que figuran como En Peligro Crítico, En Peligro y Vulnerable), también incluye información sobre organismos que se clasifican como extintos en la naturaleza y taxones que no pueden evaluarse debido a información insuficiente o a los que están cerca de alcanzar los umbrales de amenazados (IUCN, 2017).

La CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) es un acuerdo internacional en el que se agrupan las especies de plantas y animales que se encuentran en peligro para regular o en su caso detener su comercio internacional para contribuir a la conservación de dichas especies. Esta lista consta de 3 apéndices según el grado de amenaza, el Apéndice I que incluye especies en peligro de extinción y su comercio está prohibido, el Apéndice II que incluye especies amenazadas, pero que su comercio debe ser moderado para evitar que las poblaciones de las especies incluidas se vean afectadas y en el Apéndice III encontramos especies protegidas en algún país pero que se controla su comercio.

Como se mencionó anteriormente, las cactáceas son una familia de plantas que se encuentra amenazada por el saqueo y comercio ilegal de muchas de sus especies, es por eso que toda la familia completa se encuentra dentro del Apéndice II de CITES. Sin embargo algunas especies enlistadas en el Apéndice I de CITES son: *Ariocarpus spp.*, *Astrophytum asterias*, *Aztekium ritteri*, *Mammillaria pectinifera*, *Pelecyphora spp.*, entre otras.

Dentro de los géneros que tienen una gran importancia comercial por su rareza encontramos al género *Aztekium*, que cuenta con especies endémicas de Nuevo León y que por ser plantas de lento crecimiento y extrañas formas alcanzan precios elevados.

Descripción del género *Aztekium*

Aztekium es un género compuesto por solo tres especies, morfológicamente homogéneo de plantas globoso-deprimidas a cortamente cilíndricas. Este género se caracteriza por una combinación de caracteres morfológicos: tallos cortos, menores de 10-15 cm de diámetro, verde grisáceos, las costillas bien definidas, angostas y estriadas longitudinalmente, las aréolas muy próximas entre sí, con espinas restringidas a las aréolas apicales, cortas, aplanadas y recurvadas. Las flores emergen en el ápice de tallo, el pericarpelo y el tubo receptacular desnudos, los tépalos y estambres escasos, las semillas menores de 0.8 mm de longitud y con estrofiolo (Boedeker, 1929). Su crecimiento es muy lento, uno de los más lentos dentro de la familia (Quail, 2002).

Las plantas de este género crecen en el matorral xerófilo típico del norte de México pero en ambientes particulares definidos por paredes o colinas con yesos o calizas (Anderson *et al.*, 1994; Rzedowski, 2006). Dentro de este género encontramos solo a tres especies, *A. ritteri*, *A. hintonii* y *A. valdezii* (Velazco *et al.*, 2013) (Fig. 3).



A) *A. ritteri*

B) *A. hintonii*

C) *A. valdezii*

Figura 3. Especies que conforman el género *Aztekium*, las plantas se encuentran creciendo en su hábitat natural. A) *A. ritteri* planta con flor en antesis, B) *A. hintonii* y C) *A. valdezii* planta con flor en antesis.

Clasificación taxonómica de *Aztekium valdezii* Velazco, Alvarado et Arias
2013

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cactoideae

Tribu: Cacteae

Género: *Aztekium* Boedeker 1929

Especie: *Aztekium valdezii* Velazco, Alvarado et Arias 2013



Figura 4. Imagen de *A. valdezii*. Tomada de plantsrocksthings.tumblr.com

Distribución y hábitat de *A. valdezii*

La única población conocida de *Aztekium valdezii* se encuentra aislada en las inmediaciones de la Sierra Madre Oriental, en el estado de Nuevo León y se localiza en una zona de aproximadamente 2 km² en Rancho Guadalupe. Habita en cañadas similares a las de *A. ritteri*, es este mismo complejo, lo que ayuda a mantener sus poblaciones aisladas de ejemplares de *A. ritteri* (Fig. 5).

El tipo de vegetación en el que se encuentra *A. valdezii* es de tipo matorral submontano y matorral desértico. Algunas especies que se presentan en los alrededores del hábitat destacan: *Cordia boissieri*, *Acacia rigidula*, *Celtis pallida*, *Caesalpinia mexicana*, *Agave lechuguilla*, *Agave striata*, *Echinocereus penthalophus*, *Ferocactus hamatacanthus* por mencionar algunas. Por otro lado, *Selaginella lepidophylla* crece en asociación con *A. valdezii* (Velazco et al., 2013).

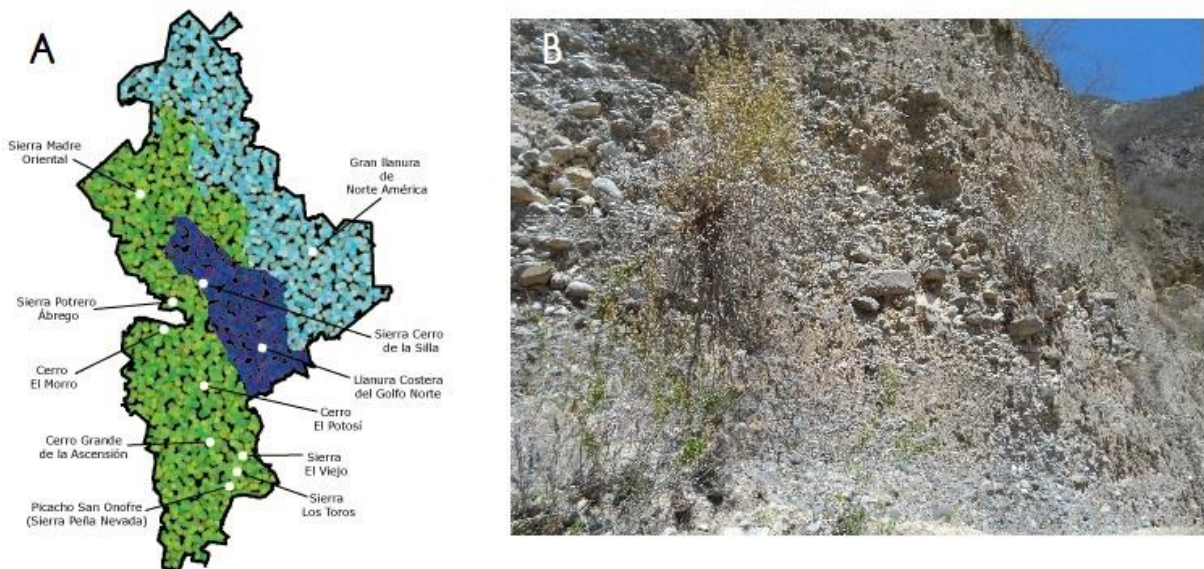


Figura 5. A) Distribución de *A. valdezii*. B) Se muestran las cañadas en las que habita *A. valdezii*.

Descripción de *Aztekium valdezii*

Plantas simples o ramificadas desde la base. Tallo globoso, hasta 6 cm de altura y 6 cm de diámetro, de color verde grisáceo; costillas hasta 5, sin costillas secundarias, aréolas contiguas cubiertas con tricomas blanco-amarillento en aréolas jóvenes, espinas 3 (-4) por aréola (Fig. 6). Presenta caracteres morfológicos que permiten ubicarla como una novedad en el género *Aztekium*, el número bajo de costillas (5 como máximo) y el estrofiolo muy desarrollado en la semilla, representan las diferencias más consistentes de este taxón con los otros miembros de *Aztekium* (Velazco et al., 2013).



Figura 6. *Aztekium valdezii*, medida aproximada de ejemplares en su hábitat, se aprecian sus características principales, las cinco costillas con los tubérculos comprimidos.

Situación actual de *A. valdezii*

Al ser una especie de reciente descubrimiento en el año 2013, causó un gran impacto entre los coleccionistas. Actualmente puede encontrarse en venta en algunas páginas de internet como eBay® (Fig. 7). Sin embargo,

no se menciona si estas plantas son propagadas en algún vivero, UMA o bien, si son extraídas de las poblaciones naturales.

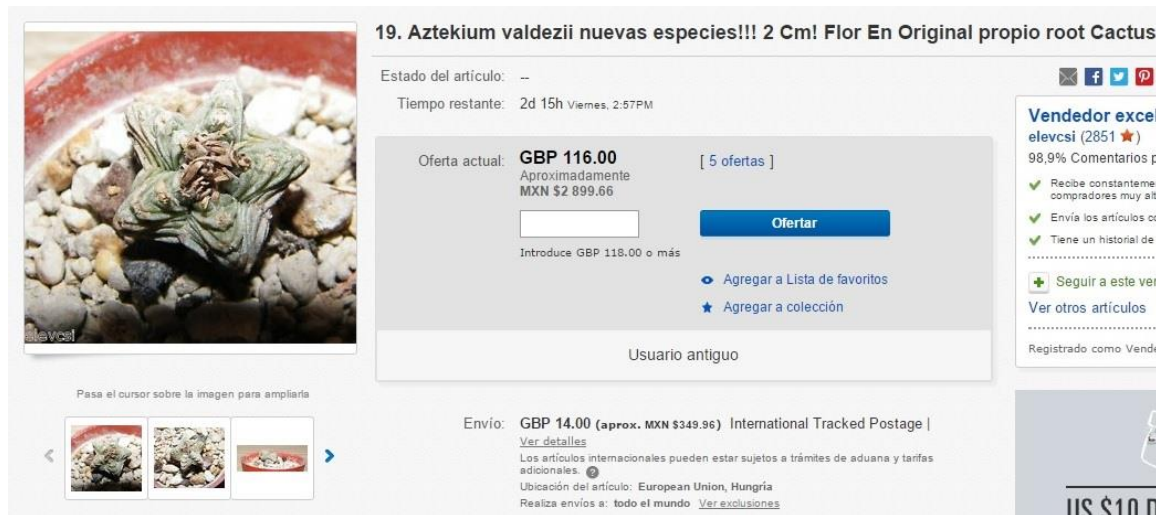


Figura 7. Oferta de plantas de *Aztekium valdezii* en internet.

Como se puede apreciar en la Figura 7, el precio de una planta que apenas rebasa los 2 cm es de aproximadamente \$2 899. Existe una petición por parte del Senado de la República para proteger a esta cactácea e investigar los posibles casos de tráfico ilegal. En esta petición se menciona que se subastaban por internet plantas y se brindaba la ubicación exacta de las poblaciones naturales incluso antes de que se publicara la descripción de esta especie. El comercio ilegal puede ser considerado como una de las principales amenazas debido a que en internet es posible encontrar una gran cantidad de información sobre estas especies. Inclusive, como se menciona anteriormente, es posible conocer las localidades exactas en donde crecen estas plantas en nuestro país (Álvarez *et al.*, 2004).

La especie fue descubierta durante el año 2013, no se encuentra en ninguna categoría de riesgo de la IUCN y la última actualización de la lista de la NOM-059 fue en el 2010, por lo que no se encuentra dentro de

ninguna categoría. Solo se enlista en el Apéndice II de CITES junto con el resto de la familia Cactaceae que regula su comercio. Para evitar la pérdida de esta y otras especies deben plantearse estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*.

Conservación *in situ*

La conservación *in situ* implica que las especies permanecen en sus hábitats naturales, expuestos a los procesos de selección natural tanto en ecosistemas naturales como agroecosistemas. La conservación *in situ* puede llevarse a cabo en áreas protegidas o fuera de ellas. La característica principal de este tipo de conservación, es que la variabilidad genética del germoplasma evoluciona con el ambiente, seleccionando las frecuencias alélicas que mejor se adaptan a las condiciones ambientales en las que crecen (IICA, 2010).

La conservación de especies *in situ* se ha pretendido lograr con la declaratoria de Áreas Naturales Protegidas, corredores biológicos o las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA). En Nuevo León existen 29 Áreas Naturales Protegidas (ANP) que abarcan una extensión de casi 2.46% del territorio de acuerdo a la página de Internet del Gobierno del Estado de Nuevo León (CONANP, 2019). Sin embargo, esto no es suficiente para controlar la colecta ilegal y proteger a las poblaciones silvestres de *A. valdezii*.

De acuerdo a la página de la CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas), todos los estados de la Republica cuentan con ANP's; en total existen 182, que cubren 25.4 millones de hectáreas, sin embargo, podemos darnos cuenta de que no son suficientes dado el gran número de especies de plantas y animales que se encuentran en peligro de extinción en nuestro país (CONANP, 2019).

Conservación *ex situ*

La conservación *ex situ* implica que el material genético sea protegido en alguna localidad fuera del área de distribución de la población progenitora. Esta estrategia se puede realizar utilizando tanto material reproductivo como semillas y polen conservados en bancos, árboles vivos plantados en arboreta, jardines botánicos o plantaciones de conservación, establecidos a partir de semillas o partes vegetativas (FAO, 2017).

En esta forma de conservación, el objetivo es evitar la pérdida de la diversidad de los recursos genéticos a través de una cuidadosa selección, tanto de los individuos y las procedencias a reproducir, como de las áreas de plantación, incluyendo el desarrollo de técnicas apropiadas para su cultivo. Es especialmente útil para ciertas especies o géneros combinar los procedimientos y conocimientos profundos del sistema de reproducción y la biología de las especies, así como la metodología del cultivo en plantaciones y del almacenamiento de las semillas y polen. Las especies leñosas empleadas en plantaciones se incluyen en esta categoría (FAO, 2017).

En el estado de Nuevo León se encuentra el Jardín Botánico “Biol. Glafiro Alanis Flores” de la UANL y también el del Fideicomiso en Parque Fundidora. Ambas estrategias (Conservación *in situ* y *ex situ*) son complementarias para poder contribuir a la conservación de especies en peligro.

Métodos convencionales de propagación en cactáceas

Los cactus son comúnmente propagados por semillas o esquejes, pero estos métodos tienen muchos inconvenientes (Ault y Blackmon, 1987). Las semillas son a menudo difíciles de obtener debido a la incompatibilidad, tienen bajas tasas de germinación y las plántulas suelen ser de crecimiento

lento (Ault y Blackmon, 1987). Por ejemplo, *Astrophytum asterias*, tiene un crecimiento lento en su estado silvestre (0.85 - 3.65 mm por año), una maduración sexual relativamente tardía (alrededor de 5 años), autoincompatibilidad, pocos individuos y poblaciones separadas la una con la otra, por lo cual experimenta limitaciones reproductivas importantes (Gaona, 2018).

Por otra parte, la propagación por esquejes no siempre es factible y a menudo sólo permite una baja tasa de multiplicación. Estas dificultades se ven agravadas por la limitada disponibilidad de individuos de las especies que están en peligro de extinción (Clayton *et al.*, 1990). También se presentan limitaciones en la aplicación de la propagación vegetativa, ya que está casi restringida a cactáceas columnares y las especies globosas no son susceptibles de ser multiplicados por esta vía puesto que el número de plantas que se pueden generar está limitada por el número de tallos, hijuelos o esquejes en la planta adulta (Pérez-Molphe *et al.*, 2015).

Conservación de germoplasma

Nuevo León es el segundo estado con el mayor número de especies de cactáceas en el país; riqueza que ha sido objeto de un intenso saqueo (Sánchez *et al.*, 2010). Esta situación, aunada a la perturbación paulatina y a la destrucción de su hábitat por la apertura de nuevas áreas de agricultura y ganadería, la construcción de caminos y carreteras, el avance de la urbanización, el sobrepastoreo y los incendios forestales, ha significado en un exterminio de poblaciones de algunas especies, en particular de las más raras en la naturaleza, como los géneros de cactáceas *Geohintonia* y *Aztekium*, lo que las ubica en una situación de

amenaza, que justifica las diversas iniciativas orientadas a la conservación y el conocimiento de este grupo de plantas (Sánchez *et al.*, 2010).

La pérdida de biodiversidad en nuestro país es muy grave, por lo cual debemos contribuir a crear alternativas que nos permitan conservar nuestras especies. La reproducción *in vitro* de cactáceas constituye uno de los principales mecanismos para contribuir a la conservación de la diversidad genética, lo que permite la multiplicación rápida de poco material vegetal, con un bajo impacto sobre las poblaciones silvestres (Giusti *et al.*, 2002; Sánchez, 1999).

Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta de la biotecnología que se basa en la totipotencialidad celular, esto quiere decir que a partir de una sola célula, podemos obtener un organismo completo, así, podemos fragmentar esta planta y a partir de cualquier órgano o tejido inoculado en un medio de cultivo con todos los nutrientes necesarios, y condiciones de luz, temperatura, pH y adicionando reguladores de crecimiento vegetal podemos obtener, una vez superada la etapa experimental, en un corto tiempo miles de plantas clonadas y libres de patógenos (González *et al.*, 2012).

Entre las ventajas que presenta el cultivo de tejidos vegetales sobre los métodos tradicionales de propagación podemos mencionar al incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo. Debido a esto, se requiere muy poco material (explantes) para iniciar los cultivos, el tiempo de multiplicación es menor y se tiene un mayor control sanitario del material que se propaga (Abdelnour y Vincent, 1994).

En 1957 Merrill King reportó inducción de callo en algunas especies de cactáceas. La aplicación del cultivo de tejidos puede superar ciertas limitaciones asociadas a la propagación convencional de cactáceas.

Por ejemplo, 1 cm de crecimiento en el tallo de *Pelecyphora aselliformis*, toma de 2 a 3 años en condiciones de invernadero y más de 4 años en la naturaleza, mientras que bajo condiciones *in vitro*, gracias a la alta humedad, altas concentraciones de carbohidratos y los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), el desarrollo de plántulas puede ser mucho más rápido (alrededor de 60 días) en comparación con las plantas cultivadas *ex vitro* (Clayton *et al.*, 1990; Santos-Diaz *et al.*, 2003; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2002); como *Mammillaria woodsi* que requiere al menos un año o más para alcanzar el mismo tamaño que las plantas regeneradas *in vitro* después de unos pocos meses en cultivo (Vyskot y Jara, 1984).

Dentro del proceso de propagación por Cultivo de Tejidos Vegetales se pueden diferenciar 5 etapas (González *et al.*, 2012).

- Etapa 0. Selección de las plantas madres.

En esta etapa se seleccionan y acondicionan las plantas madres que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro*. Estas plantas deben estar libres de patógenos y sin ningún daño aparente de plagas superficiales para poder proseguir con las siguientes etapas.

- Etapa I. Establecimiento aséptico de los cultivos.

Se debe seleccionar el explante con el que se hará el cultivo. Éstos pueden ser semillas, fragmentos de tallos, hojas o raíces, incluso flores, anteras o

yemas preformadas, para proceder a su desinfección con soluciones detergentes o fungicidas para eliminar los agentes contaminantes. Al momento de la siembra *in vitro* se deberán mantener las condiciones de asepsia al inocular el material bajo condiciones de una campana de flujo laminar para evitar futura contaminación. Todos los materiales utilizados para el manejo de las plantas deben estar esterilizados para evitar contaminación en los cultivos.

Una ventaja importante que ofrecen los métodos de CTV es la posibilidad de usar prácticamente cualquier órgano o un fragmento del órgano seleccionado (Lema-Ruminska y Kulus, 2014). El tipo, el tamaño, la edad y la posición del explante utilizado puede influir en la eficiencia del protocolo de propagación (Dahanayake y Ranawake, 2011). Es por esto que se deben elegir de manera correcta las plantas madre, con las que se iniciaran los cultivos, también se debe verificar la viabilidad de las semillas y su estado de maduración para poder así obtener resultados favorables en la regeneración de plantas.

- Etapa II. Multiplicación del tejido.

A partir de los explantes asépticos obtenidos en la Etapa I, se emplean medios de cultivo con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) para dirigir las respuestas morfogénicas de las células. Dichas respuestas pueden ser: (1) organogénesis, (2) embriogénesis somática o (3) activación de yemas preformadas, las dos primeras pueden ser directas o indirectas si primero se genera una masa desorganizada de células denominada callo que debe subcultivarse para poder obtener, posteriormente, brotes o embriones somáticos.

En la organogénesis podemos obtener órganos como tallos, raíces u hojas. En cuanto a la embriogénesis somática podemos obtener embriones que no fueron resultado de la fusión de gametos. De esta forma podemos obtener miles de plantas en un periodo de tiempo muy corto y todas ellas, prácticamente, con características uniformes y libres de patógenos.

- Etapa III. Elongación y enraizamiento.

En la Etapa II se obtienen brotes pequeños y sin raíz, estos deben individualizarse y enraizarse hasta desarrollar plántulas completas. En el caso de los embriones somáticos, se deben germinar para poder obtener plantas. Los brotes obtenidos se transfieren a un medio de cultivo que promueva el enraizamiento, usualmente con IBA, AIA o con la adición de carbón activado.

- Etapa IV. Aclimatización.

Es necesario aclimatizar a las plantas de forma gradual al medio externo por lo que se debe disminuir la humedad relativa e incrementar la intensidad de luz. En esta etapa, las plantas pasan de una condición mixotrófica a una autotrófica, pues las plantas al estar en un medio de cultivo con todos los nutrientes necesarios para desarrollarse, el proceso de la fotosíntesis se ve disminuido.

Medio de cultivo y reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

La selección del medio de cultivo es crucial para la eficiencia en el cultivo de tejidos. Dado que el medio va a contribuir al crecimiento de todas las células, y los cambios en el medio a menudo son necesarios para los

diferentes tipos de respuesta en el crecimiento de un explante (Smith, 2006).

Los medios de cultivo están compuestos principalmente por: macronutrientes, micronutrientes, una fuente de carbono, reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas, agente solidificante, aminoácidos y otros suplementos de nitrógeno (George *et al.*, 2008).

Uno de los medios más usados es el medio Murashige and Skoog (MS) que tiene como característica su alto contenido en nitrato, potasio y amonio, en comparación con otros medios de cultivo (Murashige y Skoog, 1962; Smith, 2006).

Las fitohormonas y sus inhibidores son sustancias producidas por las plantas y regulan su respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad, ayudando de esta manera a regular y coordinar los procesos esenciales para el desarrollo normal de las plantas (Wain, 1980; Doerner, 2000; Crozier *et al.*, 2000).

La respuesta de las células, tejidos y órganos cultivados *in vitro* dependen de los niveles endógenos y de los RCV exógenos que se añaden al medio de cultivo (Pérez-Molphe *et al.*, 2015). Las auxinas son requeridas por todas las células vegetales para la división y formación de raíces, y en altas concentraciones pueden suprimir la morfogénesis (Smith, 2006). Las citocininas son empleadas, solas o en combinación con auxinas, para estimular la división celular y controlar la morfogénesis; adicionarlas al medio en cultivos de tallo, se sobrepone a la dominancia apical y libera la dormancia de los meristemas laterales (George *et al.*, 2008).

Los RCV más utilizados para inducir organogénesis directa en cactáceas son la 6-benciladenina (citocinina) (BAP), ácido naftalenacético (ANA), el

ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (IBA). Asimismo, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es utilizado para promover la formación de callo y/o embriogénesis somática en diferentes explantes y especies de cactáceas (Pérez-Molphe *et al.*, 2015).

La proliferación de callo a partir de tejidos de la mayoría de plantas dicotiledóneas requiere la presencia tanto de auxinas como de citocininas en el medio de cultivo (George *et al.*, 2008). Las citocininas también se requieren para fomentar el crecimiento de las yemas axilares y reducir la dominancia apical en los cultivos de plantas con hojas anchas. Pero los niveles de citocininas que son demasiado altos, causan muchos brotes pequeños que por lo general no elongan y pueden presentar un fenómeno llamado hiperhidratación (George *et al.*, 2008).

Principales problemas durante el establecimiento *in vitro*

Los explantes requieren de una desinfección superficial antes de ser cultivados en medio nutritivo. Generalmente se utiliza una solución de hipoclorito de sodio, algunos explantes, como las semillas, son muy pequeños y se desinfectan en tubos de centrifuga para sedimentar las semillas y decantar las soluciones con una pipeta (Smith, 2006). Las semillas son más resistentes a ser expuestas durante un mayor tiempo a altas concentraciones de agentes desinfectantes que las partes vegetativas de las plantas (Infante, 1992; Da Costa *et al.*, 2001).

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales, o la inducción de algunas especies de plantas, está limitado en gran medida por la oxidación de los explantes y el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996; Laukkanen *et al.*, 2000; Murkute y Shanti-Patil, 2003; Tang y Newton, 2004).

Contaminación

El establecimiento de cultivos asépticos puede ser un reto con algunas plantas. Adicionalmente, el proceso inicial de desinfección del material vegetal, especialmente si las plantas son raras y el material es limitado, puede resultar caro y tardado (Smith, 2006).

La contaminación es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales. Produce cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial (Debergh y Zimmerman, 1991). La contaminación puede provenir de microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante o puede deberse al mal manejo durante la manipulación por parte del operador. Asimismo, puede ser ocasionada por un mal funcionamiento de los equipos como las autoclaves o campanas de flujo laminar o mala asepsia de las áreas de incubación (Debergh y Zimmerman, 1991).

El efecto negativo de los microorganismos contaminantes sobre las plantas *in vitro* puede ser considerable tomando en cuenta que compiten con ellas por los elementos nutritivos del medio y les provocan daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o la liberación al medio de cultivo de metabolitos tóxicos (George, 1993). De esta forma, pueden reducir los coeficientes de multiplicación, inhibir el enraizamiento y ocasionar la muerte de las plantas (George, 1993).

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y la prevención de la contaminación (Pérez, 1998). Existen varias estrategias para controlar y manejar la contaminación durante el CTV, las cuales incluyen la prevención mediante la selección y el tratamiento de la planta madre, la desinfección superficial

del explante y la identificación de los microorganismos contaminantes, el control de la contaminación a través del uso de sustancias antimicrobianas y el cultivo de meristemos (Niedz y Bausher, 2002).

Oxidación

La oxidación de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) dando como resultado la producción de quinonas. Estas últimas son altamente reactivas, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.*, 1996; Bray *et al.*, 2000).

En el caso particular de cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado al explante, los cortes que sufre el tejido, la composición del medio de cultivo, y el volumen del frasco de cultivo, entre otras causas. (George, 1993; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van Staden *et al.*, 2006; Abdelwahd *et al.*, 2008).

Las estrategias para evitar los procesos de oxidación del explante cultivado *in vitro*, son diversas. Para algunas especies el problema disminuye con el uso de medio líquido (Zepeda y Sagawa, 1981), pero también se puede adicionar carbón activado (Harikrishnan *et al.*, 1997), de polivinil pirrolidona (Chacón y Gómez, 1996) o la sustitución del regulador de crecimiento (Jambor-Benczur *et al.*, 1997). Desafortunadamente, un único método no siempre es suficiente debido a la complejidad del problema, requiriéndose una solución integral. Por ejemplo, Fernández (2014) observó que los explantes de *Backebergia militaris* presentaban una severa oxidación. Para contrarrestarlo, desinfectó y sembró nuevos explantes en medio líquido adicionado con PVP en diferentes concentraciones.

Microinjertos

Los injertos *in vivo* son una técnica antigua que comúnmente se usa para la propagación de especies de cactáceas con el fin de contrarrestar el lento crecimiento de estas plantas (Cullmann *et al.*, 1986). El uso de Injertos en la propagación comercial ha sido restringido debido a las bajas tasas de éxito atribuidas a la falta de consistencia en las técnicas usadas, problemas de contaminación de hongos o bacterias y el estrés por deshidratación en el área de unión del injerto (Maldonado y Zapien, 1977). Una alternativa potencial para evitar algunos de estos problemas es el microinjerto de plántulas *in vitro*, que se realiza bajo condiciones asépticas y de alta humedad relativa (Burger, 1985; Hartmann *et al.*, 1997).

Los microinjertos se desarrollaron en la década de 1980 y consisten en colocar explantes de ápices o tallos sobre la superficie expuesta de un portainjerto, al cortar su parte apical (Rehman y Gill, 2015). La transferencia de explantes de ápices a portainjertos, puede llevarse a cabo *in vivo* o *in vitro*. Antes de microinjertar, es necesario preparar el portainjerto. Los portainjertos empleados, son comúnmente reproducidos a partir de semilla, pero también es posible utilizar brotes micropropagados (George *et al.*, 2008).

Usualmente los injertos en condiciones *in vitro* tienen varias ventajas tanto para la producción comercial como para la investigación; se ha aplicado para la mejora de varias especies de árboles, eliminación de virus y estudio de conexiones fisiológicas entre portainjertos e injertos (Rehmann, 2015). El origen del portainjerto, la posición del injerto en el portainjerto, el tamaño del injerto, las condiciones de luz y temperatura, la composición del medio de cultivo y los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal,

tienen un efecto importante en el éxito de los microinjertos (Rehmann, 2015).

En la literatura se pueden encontrar algunos artículos recientes sobre injertos y microinjertos en plantas como cítricos y rosáceas; en contraste, son pocos los resultados al buscar información sobre microinjertos en plantas suculentas. Estrada-Luna y colaboradores (2002) realizaron injertos en forma horizontal y en forma de cuña con algunas especies de *Opuntia*, para determinar el mejor método para microinjertos *in vitro* el cual fueron los injertos en forma horizontal. Bach (2009) menciona que una de las metas en el injerto de cactus es producir un gran número de brotes robustos en un corto periodo de tiempo. Por lo tanto, el uso de microinjertos nos permitiría propagar vegetativamente plantas raras, en peligro de extinción o difíciles en un tiempo menor en comparación con los métodos convencionales.

Cultivo de tejidos en cactáceas

Las cactáceas como muchas de las plantas suculentas, son de lento crecimiento. Sin embargo, se ha podido demostrar su potencial regenerativo cuando son cultivadas *in vitro* (López y Olgún, 2013). La aplicación del CTV puede superar ciertas limitaciones asociadas con la propagación convencional de cactáceas (Clayton *et al.*, 1990). Es por esto que el cultivo *in vitro* es una buena herramienta para la conservación y propagación de cactus que se encuentran amenazados. En la Tabla 3 se muestran algunos trabajos de CTV en cactáceas y las respuestas obtenidas.

Tabla 3. Algunos trabajos previos en la familia Cactaceae, mostrando el explante, la concentración de RCV y los resultados obtenidos.

Especie	Explante	Tratamiento	Respuesta (tiempo)	Referencia
<i>O. amyclaea</i>	Cladodios	MS con BA 1mg/L	Brotos (25 días)	Villalobos et al., 1991
<i>A. retusus</i>	No se menciona	MS con agua de coco	Callos y embriones somáticos	Stuppy y Nagl, 1992).
<i>C. senilis</i>	Aréolas	MS con ANA 0.3 + BA 3.0 mg/L y ANA 0.3 + K 3.0 mg/L	Brotos (21 días)	Choreño, 2002.
<i>Echinocereus knippelianus</i> , <i>E. schmollii</i> , <i>Escontria chiotilla</i> , <i>Mammillaria carmenae</i> , <i>M. carmenae fo. rubrisprina</i> , <i>M. herrerae</i> , <i>M. theresae</i> , <i>Melocactus curvispinus</i> y <i>Polaskia chichipe</i> .	Aréolas	MS, 3% de sacarosa, con BA (0.5, 1.0 y 2.0 mg /L ; 2- isopentiladenina (2iP) (1.0, 3.0 y 5.0 mg L)	Brotos (45-60 día)	Retes-Pruneda, et al., 2017
<i>Astrophytum asterias</i>	Tallos y raíces	MS sin reguladores, BAP/ANA 2/0.5 mg/L, KIN/ANA 2/0.5 mg/L	Brotos (1 mes a 3 meses)	Gaona, 2018
<i>Coryphanta elephantidens</i>	Cultivos de callo	MS con BAP 1.5mg/L	Brotos (150 días)	Bhau y Wakhlu, 2015
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	Tubérculos de plantas obtenidas <i>in vitro</i>	MS con BAP/ANA 13.3/5.4 µM	Brotos (5 semanas)	Moebius-Goldammer et al., 2003

Cultivo de tejidos en el género *Aztekium*

Se han realizado muy pocas investigaciones de propagación *in vitro* en *A. hintonii* y *A. ritteri* (Tabla 4). Existe un solo reporte de investigación con *A. valdezii* debido a su reciente descubrimiento.

Tabla 4. Algunos reportes sobre la propagación *in vitro* con especies del género *Aztekium* donde se muestra la respuesta obtenida y los RCV empleados.

Especie	Explante	Tratamiento	Respuesta	Referencia
<i>Aztekium ritteri</i>	Brotos de plantas germinadas <i>in vitro</i>	MS con 0.1 BA sola y 0.1 BA /0.01ANA 2 KIN /2 2,4-D 1, 2ANA; 1, 2IBA mg/L	Brotos, Embriones somáticos, Callo	Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992
<i>Aztekium ritteri</i>	Aréolas	MS con (2.5mg/L BAP; 1.0mg/L ANA; 2.0mg/L AS; 2.0g/L PVP). Y (1.0mg/L BAP; 1.0mg/L ANA).	Callo y brotes hiperhidratados	Navarro <i>et al.</i> , 2009
<i>Aztekium ritteri</i>	Semillas Tallo	MS con 1.0 mg/L GA3 MS con ANA 0.5 mg/L, AS 2.0 mg/L, PVP 2.0 g/L y BAP (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/L)	Plántulas Callo y brotes	Felix, 2011.
<i>Aztekium hintonii</i>	Callo	0.1 y 0.5mg/LI de 2,4-D y 0.1 y 0.5mg/L de K	Callo y embriones somáticos.	Calderón, 2007.
<i>Aztekium hintonii</i> y <i>A. ritteri</i>	Semillas	Germinación en condiciones <i>in vivo</i>	Germinación	Quail, 2002
<i>Aztekium hintonii</i> y <i>A. valdezii</i>	Semillas y costillas	MS 50% con 1g/L de carbón activado y MS 25% con 45g/L sacarosa, 20g/L de D-Sorbitol, 1g/L de carbón activado y sin RCV	Germinación y obtención de brotes	Fuentes, 2017

Justificación

Aztekium valdezii es una cactácea de reciente descubrimiento, endémica de Nuevo León, con importantes funciones ecosistémicas, es considerada de alto valor ornamental pero no ha sido incluida en la NOM-059, no obstante que ha sido objeto de un intenso saqueo, presenta lento crecimiento, poblaciones reducidas, y grandes huecos en su información, que en conjunto la ponen en riesgo de extinción. A pesar de que tiene valor comercial, y su colecta y venta son ilegales, poco o nada se cultiva, por lo que una alternativa es la aplicación de cultivo de tejidos vegetales que ha probado ser una útil herramienta biotecnológica y que permitiría como con otras especies su estudio, propagación, conservación y como alternativa de aprovechamiento sustentable.

Objetivos

Objetivo general

- Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* para dirigir el desarrollo de las células para la regeneración de brotes de *Aztekium valdezii*.

Objetivos particulares

- Establecer un protocolo de desinfección para el establecimiento aséptico de semillas de *A. valdezii*.
- Comparar la germinación *in vitro* y *ex vitro*
- Explorar las respuestas morfogénicas de explantes, tallos y raíces de *A. valdezii*.
- Describir el efecto de auxinas y citocininas en el control del desarrollo para la regeneración de órganos.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron 45 semillas de *Aztekium valdezii*, que fueron colectadas el 16 de mayo de 2014, en la Sierra Madre Oriental. A partir de éstas se obtuvo el peso promedio y la longitud de las semillas para su posterior siembra *in vitro* y *ex vitro* tanto en sustrato como en medio de cultivo.

Desinfección de las semillas

Se emplearon dos protocolos de desinfección:

El primer lote fue de diez semillas las cuales se colocaron en una bolsa de té vacía para facilitar su manipulación. Primero se enjuagaron con agua destilada, posteriormente se colocaron en una solución de Extran 2% v/v (30 minutos), para cambiarlas a una solución de etanol 70% v/v (30 segundos), y finalmente a una solución de hipoclorito de sodio 15% v/v (15 minutos) para concluir con tres enjuagues con agua destilada estéril.

En el segundo protocolo se omitió la bolsa de té y se emplearon tres lotes de diez, quince y diez semillas cada uno y consistió en sumergirlas en solución jabonosa 20% v/v (20 minutos), solución de etanol 70% v/v (1 minuto), solución de Soluvet® 4% v/v (15 minutos), solución de fungicida Captán® 1g/L (90 minutos), solución de hipoclorito de sodio 20%v/v (20 minutos) finalizando con tres enjuagues de agua destilada estéril. Todas las soluciones empleadas se prepararon con agua destilada estéril. Todo el proceso se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar con ayuda de una gradilla y tubos Eppendorf® de 0.5 mL esterilizados previamente. Se colocó una semilla por tubo y el cambio de soluciones y los enjuagues se realizaron con ayuda de jeringas estériles de 3 mL.

Germinación *in vitro*

Se utilizaron semillas del segundo protocolo de desinfección y se inoculó una semilla por frasco en medio de cultivo MS modificado con 50% de la concentración de macro y micronutrientes y 100% de la concentración de compuestos orgánicos (MS 50%), sacarosa 3% pH 5.7, y 8.5 g/L de agar.

Germinación *ex vitro*

Se utilizaron semillas del segundo protocolo de desinfección, se sembraron 5 semillas de *A. valdezii* en una maceta de plástico con una mezcla de sustrato que contenía tepojal y tierra negra con proporción 3:1, las semillas solo se dejaron caer en el sustrato, no se enterraron y se regaron cada diez días con ayuda de un aspersor con agua destilada. Fueron mantenidas en condiciones de invernadero.

Disección e inducción morfogénica de explantes

La siembra de explantes de tallos y raíces se realizó en medio MS 50% con 30 g/L de sacarosa y 3.8 g/L de Gellan Gum, se añadieron 100 mg/L de ácido cítrico, 100 mg/L de ácido ascórbico, 0.5 g/L de PVP, con una concentración de BAP/ANA 1/0.2 mg/L para el Tratamiento 1; BAP/ANA 0.5/0.025 mg/L para el Tratamiento 2; y el control sin RCV. Fue sembrado un explante por frasco de cultivo, con un periodo de inducción de 10 semanas.

En el Tratamiento 1 se emplearon 7 plántulas de 4 a 5 meses de edad, de las cuales solo 4 presentaban aréolas. Debido a su pequeño tamaño (1-2 mm) se realizó un único corte separando la raíz para obtener así dos tipos de explante: tallo y raíz (Fig. 8 A y B).

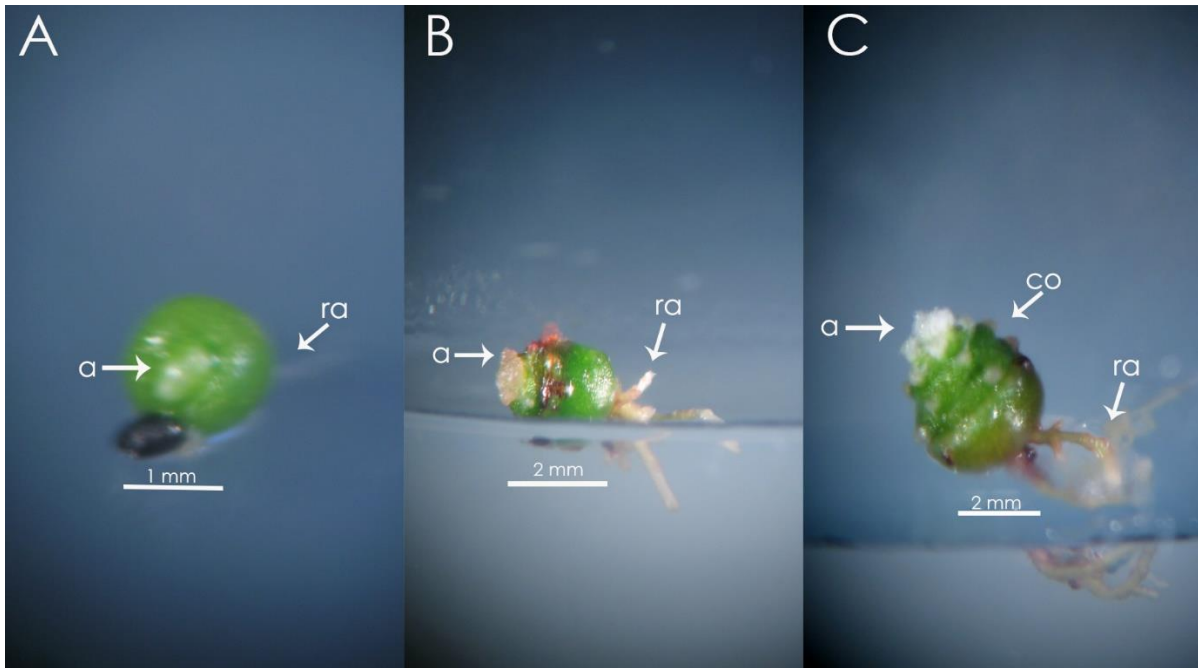


Figura 8. A y B) Plántulas empleadas en el Tratamiento 1 y el Control. En la Figura A se observa el comienzo de la formación de aréolas, el tallo de una textura lisa y raíz no ramificada, en la Figura B la raíz se aprecia más desarrollada y con ramificaciones y el ápice con aréolas más definidas; C) Plántulas utilizadas en el Tratamiento 2, las aréolas del ápice presentan lana, se aprecia la formación de costillas y las raíces son más largas. a:aréolas, ra:raíces, co:costillas.

En cada frasco se sembró un explante (de tallo o de raíz) y se realizaron 7 repeticiones para cada tipo de explante. Después de 5 semanas en el medio de inducción inicial, se subcultivaron en medio MS 50% al que se le disminuyó la concentración de RCV BAP/ANA 0.2/.06 mg/L donde permanecieron 5 semanas más y finalmente se subcultivaron en medio de cultivo MS 50% con 30 g/L de sacarosa sin RCV con los antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico) y 0.5g/L de adsorbente PVP. En este medio de cultivo, se realizaron subcultivos cada 3 meses.

Para el Tratamiento 2 se utilizaron plantas más grandes de aproximadamente 8 meses de edad, con un tallo de unos 3 mm y raíz de 5 mm, todas presentaban aréolas bien definidas (Fig. 8C). Al igual que en el Tratamiento 1, se realizó un solo corte separando el tallo y la raíz; se sembró

un explante por frasco (de tallo o raíz) y se realizaron 5 repeticiones para cada tipo de explante. Se mantuvieron por 5 semanas en medio de cultivo MS 50% con 30 g/L de sacarosa y una concentración BAP/ANA de 0.5 / 0.025 mg/L.

Posteriormente se subcultivaron en medio de cultivo MS 50% con 30 g/L de sacarosa y una concentración BAP/ANA 0.25/0.05 mg/L y después de 5 semanas se subcultivaron en medio de cultivo MS 50% con 30 g/L de sacarosa sin RCV, en este medio de cultivo, se realizaron subcultivos cada 3 meses.

Para el Control se mantuvieron en medio MS 50% con 30 g/L de sacarosa y antioxidantes, con un subcultivo constante, aproximadamente cada 3 semanas, durante un año.

Transcurrido un año, al no consolidarse los brotes obtenidos en el Tratamiento 1, se decidió realizar microinjertos con los brotes obtenidos en la inducción de *A. valdezii*. Como portainjerto se utilizaron plantas de *Hylocereus undatus* de 4 cm de altura aproximadamente germinadas *in vitro* en medio MS 100%. Estos se realizaron en la campana de flujo laminar bajo condiciones de asepsia. Con la ayuda de pinzas y bisturí se procedió a separar brotes del callo de *A. valdezii* que medían aproximadamente de 3-5 mm y presentaban aréolas. Éstos se mantuvieron en cajas Petri estériles mientras a plantas de *H. undatus* de 3-4cm, se les cortó el ápice para obtener portainjertos de 2-3cm de altura. Posteriormente ambos se tomaron con las pinzas y se unieron por la parte recién cortada, como se muestra en la Figura 9.

Se sembró un microinjerto por frasco, con un total de 10 repeticiones, no se añadieron RCV y los subcultivos fueron cada 6 semanas en medio MS 100%. Se observaron cada semana, durante 6 meses.

Para todos los cultivos *in vitro*, todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 1.5 kg/cm² de presión durante 17 minutos. Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara de incubación con una temperatura de 25± 2 °C y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

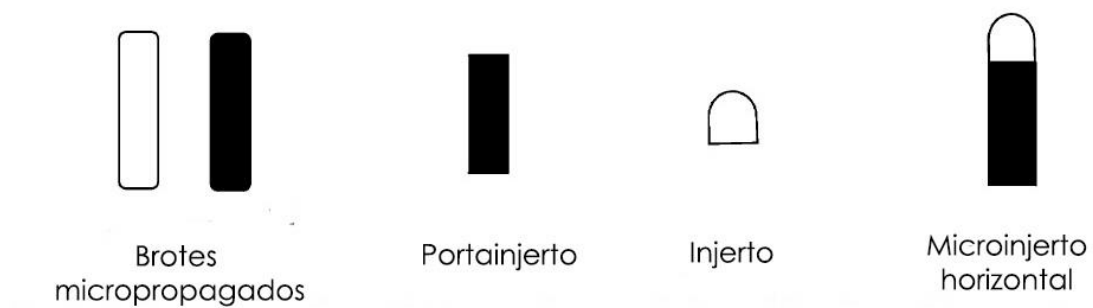


Figura 9. Esquema tomado de Estrada-Luna 2002

Resultados y discusión

Medición y peso de las semillas

Las medidas promedio de las semillas de *A. valdezii* (Fig. 10) fueron de 0.6 mm de ancho (desviación estándar 0.013, error estándar 0.004), 0.882 mm de largo (desviación estándar 0.028 error estándar 0.008). En cuanto al peso de las semillas, 45 semillas pesaron 2.79 mg, lo que indicó que el peso promedio de una semilla fue de 0.0558 mg. Esto coincide con lo reportado para otras especies del género *Aztekium* de acuerdo a la comparación que realizó Velazco y colaboradores en 2013 (Tabla 5). Esto se realizó con la intención de obtener más datos sobre el material inicial y para identificar anomalías en las semillas, como diferencias en el tamaño o forma.

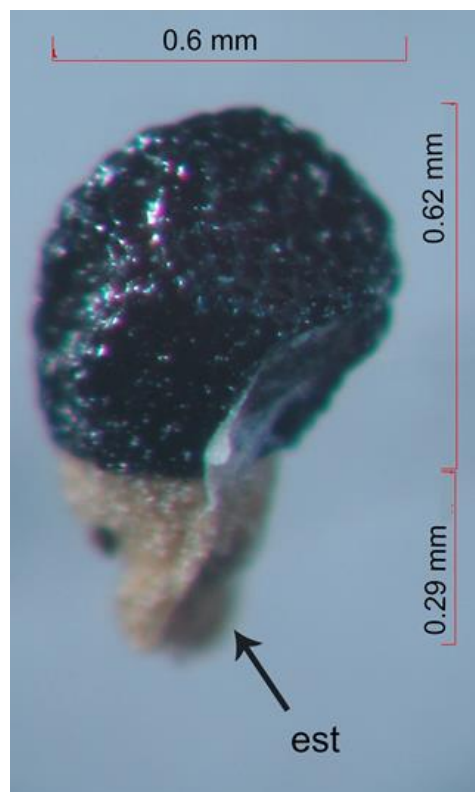


Figura 10. Semillas de *A. valdezii*, en donde se observa que la testa tiene una superficie rugosa y un estrofiolo desarrollado. est: estrofiolo

Tabla 5. Comparación morfológica de las semillas entre las especies de <i>Aztekium</i> (Modificado de Velazco et al., 2013).			
	<i>Aztekium hintonii</i>	<i>Aztekium ritteri</i>	<i>Aztekium valdezii</i>
Longitud (mm)	(0.59-) 0.70 (-0.82)	(0.41-) 0.67 (-0.81)	(0.37-) 0.57 (-0.69)
Grosor (mm)	(0.57-) 0.62 (-0.67)	(0.47-) 0.60 (-0.74)	(0.42-) 0.52 (-0.69)
Forma	Ovoide	Ovoide	Ovoide
Relieve	Convexo en domos bajos	Convexo en domos altos	Convexo en domos altos
Estrofiolo	Reducido	Reducido	Desarrollado

Desinfección de las semillas

El primer protocolo de desinfección empleado no resultó efectivo, ya que en los primeros 4 días se obtuvo un 50% de contaminación por hongos. Este resultado contrasta con el reportado por Félix (2011), en el que se logró la desinfección de las semillas de *Aztekium ritteri* utilizando Extran® al 2% v/v. Las semillas que fueron desinfectadas en el primer lote, al contaminarse por hongos se sometieron a un nuevo tratamiento de desinfección sin éxito, pues estas semillas se perdieron, ya que se volvieron a contaminar. Dado que el primer protocolo de desinfección no resultó efectivo, se consideró conveniente realizar la aplicación de un agente fungicida.

El segundo protocolo de desinfección resultó más efectivo al no presentar contaminación hasta el momento de la inducción de los brotes (4 meses), debido a que se incluyó otro desinfectante SoluVet®.

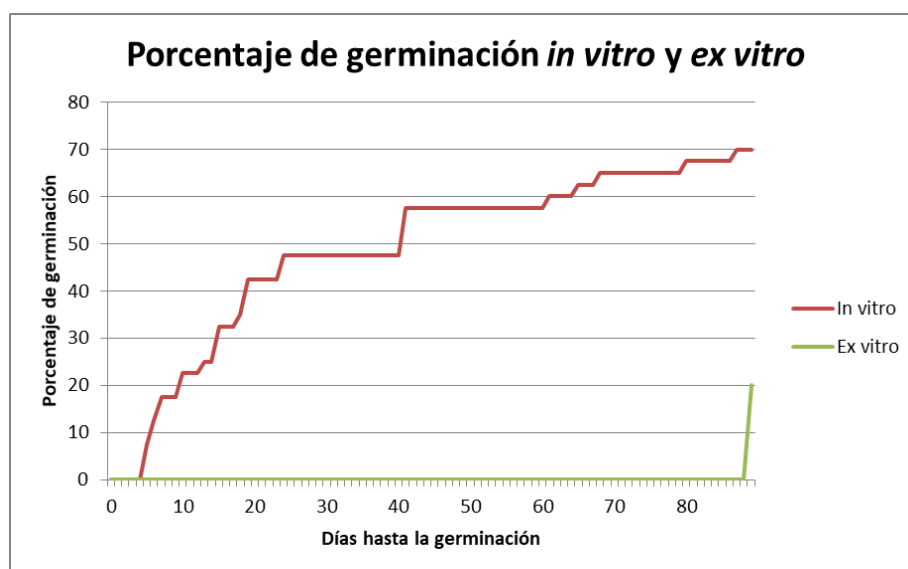
El desinfectante SoluVet® fue empleado por Vargas (2017) en la desinfección de semillas de *Agave guiengola* y por Gaona (2018) en

semillas de *Astrophytum asterias* obteniendo un 100% de asepsia.

La adición de SoluVet® y Captan al segundo protocolo de desinfección contribuyeron para lograr el 100% de asepsia en la siembra de las semillas, así como también el retirar la bolsa de té para la manipulación de estas, pues al estar en los tubos Eppendorf, las semillas, que tienen una superficie rugosa, estuvieron en contacto directo con las soluciones desinfectantes todo el tiempo. Es importante señalar que las semillas provenían de poblaciones naturales por lo que pudieron estar en contacto con un mayor número de agentes contaminantes, a diferencia de semillas obtenidas de plantas cultivadas en condiciones de invernadero.

Germinación *in vitro* y *ex vitro*

De las 5 semillas que se sembraron (*ex vitro*) en sustrato, solo una germinó después de 3 meses, en cuanto a las 30 semillas que se sembraron en medio de cultivo, germinaron 23, el 76%, las primeras semillas germinaron transcurridos 6 días y las últimas germinaron a los 88 días como se puede apreciar en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Comparación de la germinación en sustrato y en medio de cultivo.

Álvarez y colaboradores (2004) reportaron una baja tasa de germinación en *Strombocactus disciformis*, con un rango de 25-82% en semillas de diferentes poblaciones, completándose en un periodo de 12 días. Estos autores aplicaron un tratamiento de desinfección pre-germinativo, el cual pudo afectar la viabilidad de las semillas, desde la sobre-exposición (tiempo y concentración) de blanqueador comercial y otros desinfectantes que son conocidos por el daño que causa en tejidos como embriones y que afectan la germinación (Camacho *et al.*, 2018). En la presente investigación, para evitar la contaminación de los cultivos, se añadió fungicida Captan 1g/L durante 90 minutos y se aumentó el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio, lo que pudo afectar la tasa de germinación de las semillas.

La germinación *in vitro* de semillas puede estar limitada debido a que algunas especies de cactus presentan latencia (Lema-Ruminska y Kulus, 2014). La germinación *in vitro* fue asincrónica, esto quiere decir que las primeras semillas germinaron en la semana posterior a su siembra y hubo semillas que germinaron pasados 3 meses, esto pudo deberse a la dormancia de las semillas. Esta dormancia puede estar implicada en la formación de bancos de semillas. A pesar de que no existen estudios que avalen esta información, es posible que muchas especies muestren un tipo de dormancia que podría formar al menos un banco de semillas de corto plazo (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Silvius (1995) menciona que las semillas de *Stenocereus griseus* de una zona semi-árida de Venezuela permanecieron en el suelo por 4 meses antes de germinar. Bowers (2000) menciona que las semillas de *Ferocactus wislizeni* germinaron en un 87.5% después de estar enterradas por 17 meses, sugiriendo la existencia de un banco de semillas en el sitio de estudio. Flores

y colaboradores en 2008 realizaron un estudio en donde se encontró que semillas de 5 años de *Turbinicarpus lophophoroides* tuvieron 66% de germinación y en *T. pseudopectinatus* obtuvieron 48% de germinación en semillas de 1 año. Lo que implica que las semillas de estas especies presentan dormancia al momento de ser dispersadas.

En 2002, Quail reportó diferencias en el crecimiento y el cultivo de las especies de *Aztekium* en condiciones *in vivo*. En primer lugar encontró que el porcentaje de germinación de *A. hintonii* fue del 80%. En contraste, *A. ritteri* mostró solamente 10% de germinación. Además menciona que ambas especies tienen un crecimiento muy lento, pero que *A. hintonii* es ligeramente más rápida que *A. ritteri*.

En 2017, Fuentes reportó en un primer intento, 33% de germinación *in vitro* en *A. hintonii* y 66.6% en *A. valdezii*. Posteriormente, en otro ensayo reportó diferentes porcentajes de germinación en *A. valdezii* (11.8%) y en *A. hintonii* (68%). La baja tasa de germinación en el segundo ensayo se atribuyó a la pérdida de viabilidad de las semillas.

En la presente investigación se registró 76% de germinación, el cual fue mayor al reportado por Fuentes (2017) y similar al reportado en *Lophophora williamsi* (67.5-77.5%) así como en *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Cereus hildmannianus* (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Langer y Mergener, 2013).

Lo anterior nos indica que las semillas de *A. valdezii* pierden viabilidad con el tiempo. Los ensayos de germinación en este trabajo se realizaron con un mes de diferencia, mientras que Fuentes (2017) realizó los ensayos con 6 meses de diferencia. Para conocer el tiempo de viabilidad de las semillas

se podría realizar un estudio de germinación utilizando semillas con diferentes edades para así poder conocer la edad en la que tienen un mayor porcentaje de germinación y así poder aprovechar su capacidad de germinación. El crecimiento de la planta *ex vitro* fue muy lento, después de 4 meses de haber germinado, apenas rebasaba 1 mm de diámetro (Fig. 11).

En este trabajo encontramos que el crecimiento y desarrollo de las plantas de *A. valdezii* germinadas *in vitro* fue mayor y más eficiente que en condiciones *ex vitro* (Fig. 11). En condiciones *ex vitro*, después de 4 meses de la germinación no había aún presencia de aréolas, mientras que en las plantas cultivadas *in vitro* (Fig. 12), después de dos meses de haber germinado éstas presentaban aréolas bien definidas y una raíz ramificada. Asimismo, éstas presentaban el doble de longitud comparada con la planta *ex vitro*. *Mammillaria woodsii* crecida de semillas, requiere al menos un año o más para alcanzar el mismo tamaño que las plantas regeneradas *in vitro* después de unos pocos meses en cultivo (Vyskot y Jara, 1984).

Félix (2011) reportó que plantas de *A. ritteri* después de 37 días de su germinación medían 1 mm y pasados aproximadamente 121 días medían entre 2 y 3 mm, mismas medidas que fueron alcanzadas en 21 y 60 días respectivamente en ejemplares de *A. valdezii* en este estudio. Estos resultados indican que el género *Aztekium* presenta un lento crecimiento, aún en condiciones *in vitro*.

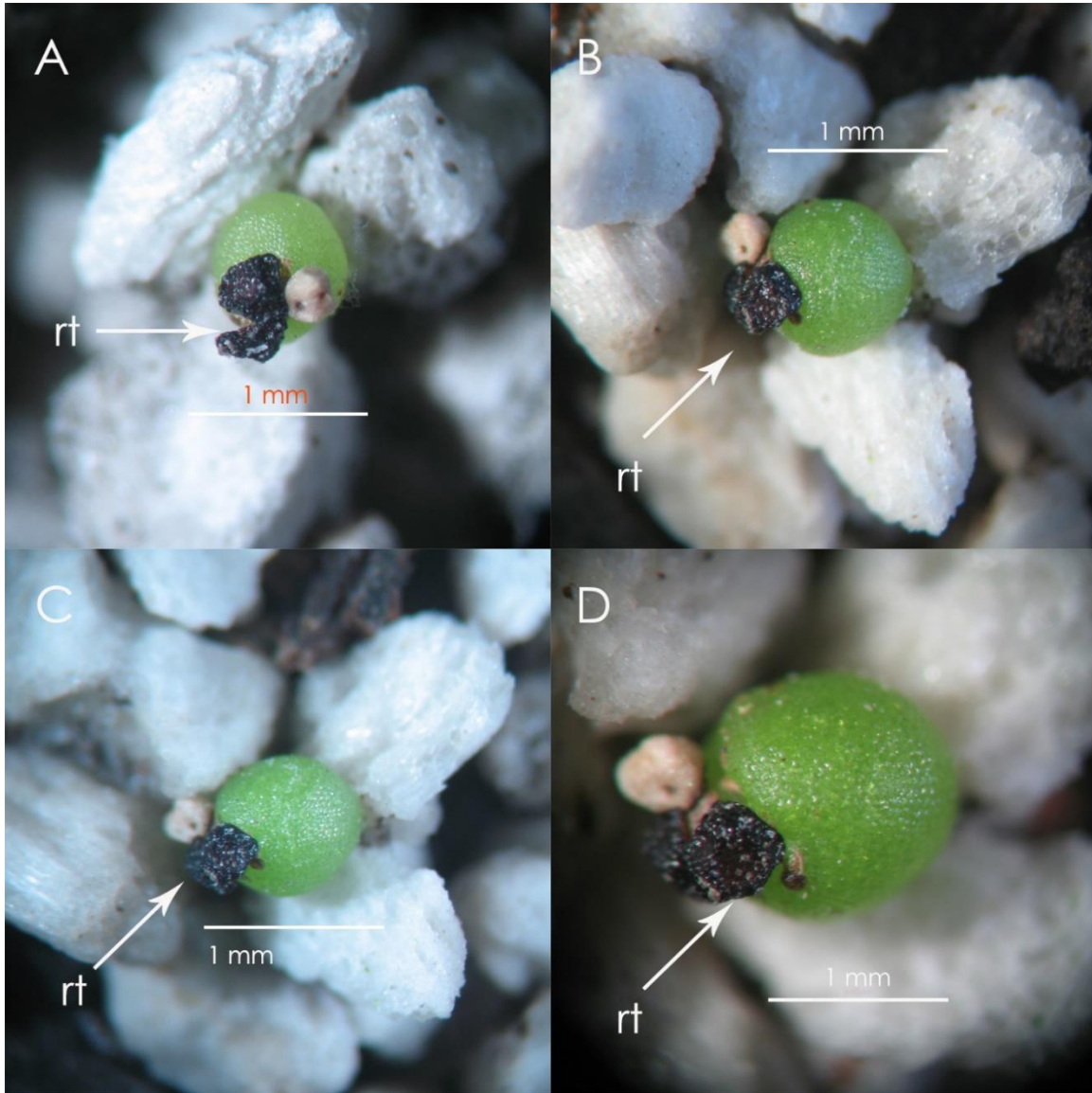


Figura 11. A) Planta de *A. valdezii* después de 15 días de germinada. B) Pasados 3 meses no se aprecia el crecimiento de aréolas C y D) Después de 4 meses de germinada la planta apenas rebasa 1 mm de diámetro. En todas las imágenes se aprecia los restos de la testa y la superficie de la plántula es lisa. rt: restos de la testa.

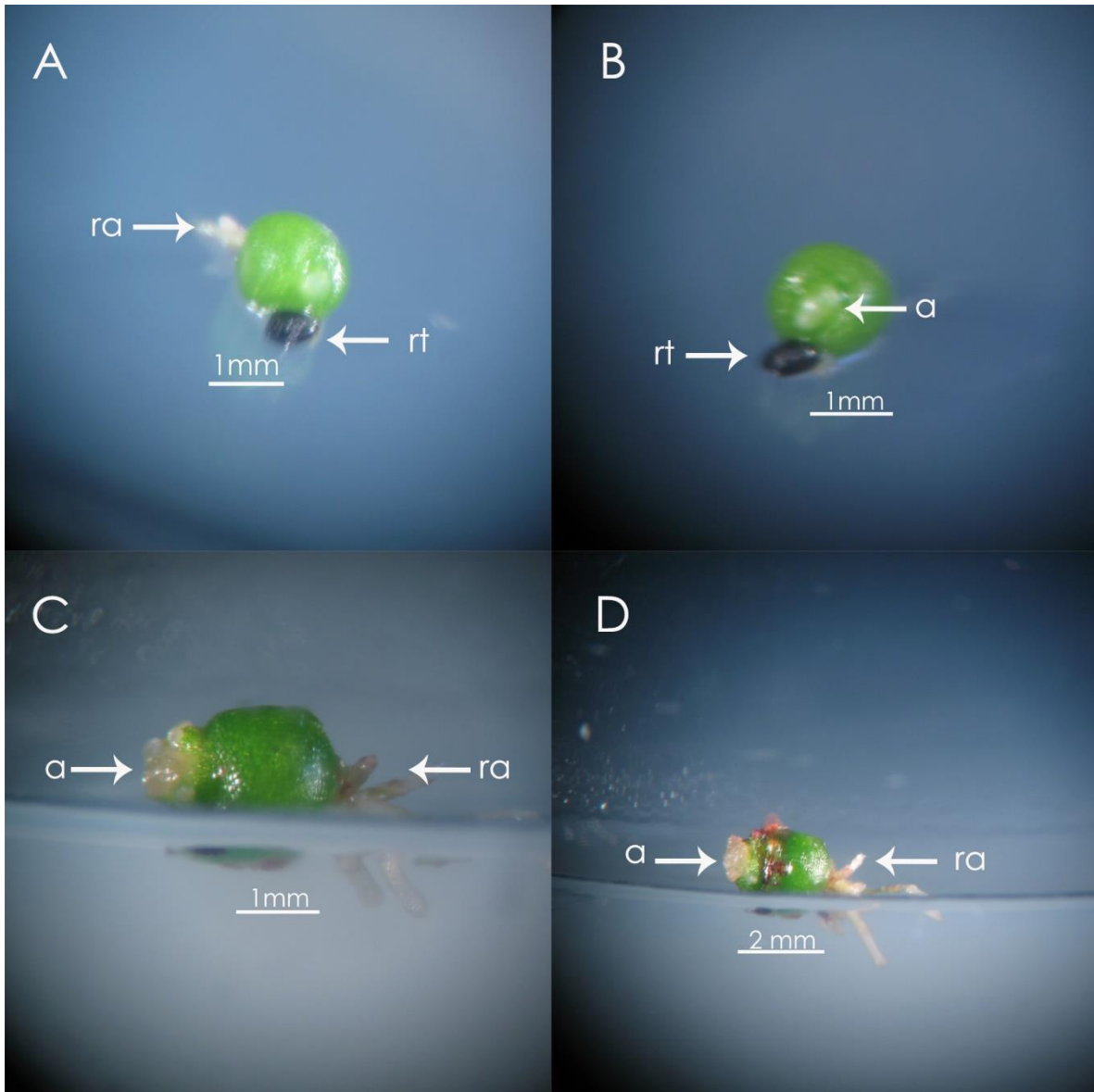


Figura 12. A) Plántula de *Aztekium valdezii* recién germinada se observan los restos de la testa y la raíz no ramificada B) Después de 3 semanas presentaba una aréola. C y D) la planta presentaba una raíz ramificada y aréolas bien definidas dos meses después de la germinación. a: aréolas, rt: restos de la testa, ra: raíces.

Inducción morfogénica de explantes

Los explantes comenzaron a responder a la semana de la inducción, presentando en el área del corte una coloración rojiza, que también se presentó cuando los explantes comenzaron a producir callo.

Esta coloración pudo deberse a la producción de betalaínas que son pigmentos de origen natural producidos por plantas de la familia Cactaceae y que se presentan en condiciones de estrés (Morones *et al.*, 1996). Por lo que se sugiere que los explantes sufrieron algún tipo de estrés durante el tratamiento.

Morones y colaboradores (1996) estudiaron la producción de betalaínas en cultivos *in vitro* en algunas especies del género *Mammillaria* y reportaron que el callo mostró la aparición espontánea de regiones intensamente pigmentadas de color rojo debido a la síntesis y acumulación de betalaínas.

El callo de *A. valdezii* mostró regiones pigmentadas de color rojo (Fig. 13), debido a la síntesis y acumulación de betalaínas, que está regulada por la luz, la temperatura, el ácido abscísico y las citocininas. La acumulación de betalaínas aumenta en presencia de las citocininas, y este efecto es mayor en presencia de luz que en obscuridad (Reznig, 1980).

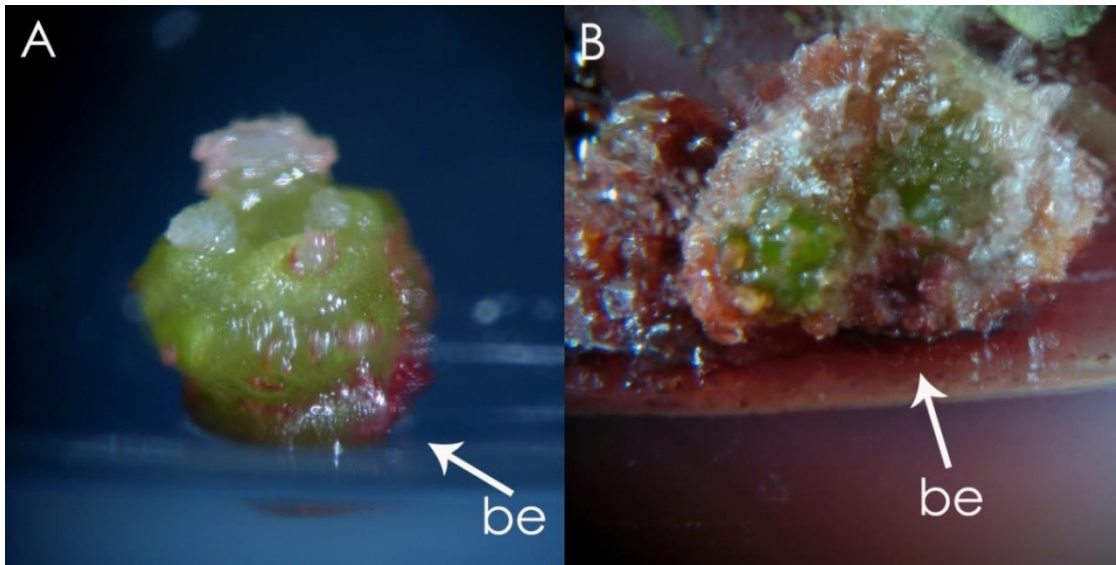


Figura 13. A) el área de corte se tornó en un color rojizo. B) Acercamiento de callo en donde es posible observar que en la base y en el callo presentaba una coloración rojo intenso. be: betalaínas

La producción de betalaínas en el callo de *Aztekium* puede deberse a que estos pigmentos están relacionados a la protección frente al estrés hídrico, estrés por salinidad o fotoestrés (Polturak y Aharoni, 2018). Los cultivos permanecieron en la cámara de incubación con luz directa por lo que es posible que esta condición se sumara a otros factores y el callo produjera una gran cantidad de betalaínas, en algunos casos abarcaba toda la superficie del callo que estaba en contacto con el medio de cultivo.

Tratamiento 1 BAP/ANA 1/0.2 mg/L

En el tratamiento 1 se observó la formación de callo y posteriormente 2 tipos de respuesta morfogénica: raíces y brotes (Tabla 6), los únicos explantes en los que se presentó esta respuesta fueron los tallos, ya que las raíces se tornaban de un color amarillento y terminaban oxidándose y posteriormente morían.

Tabla 6. Tipo de respuestas obtenidas en los explantes de ápice del Tratamiento 1, después de 9 meses de iniciada a inducción.			
	Callo (consistencia)	Raíz	Número de brotes formados en el callo
Ápice 1	Friable	0	4
Ápice 2	Compacto	0	1
Ápice 3	Friable	0	12
Ápice 4	Friable y Compacto	2	33
Ápice 5	Friable	13	26
Ápice 6	Friable	1	35
Ápice 7	No presentó formación de callo	0	0

Como se aprecia en la tabla 6, el 85.7% de los explantes, 6 de los 7 explantes de tallo del tratamiento 1 formaron callo, que se produce cuando las células se multiplican en una manera desorganizada y no existe diferenciación. Los callos que se obtuvieron de los explantes de tallo del tratamiento 1 no fueron uniformes; se observaron diferencias en apariencia, color y consistencia, el callo friable fue de un color verde claro y en algunas partes amarillento con apariencia hialina y se disgregó con facilidad; también se obtuvo callo compacto, que no se disgregó y su color variaba entre verde oscuro y café.

A pesar de que el callo permanece desorganizado mientras crece, algunos tipos de células especializadas se forman. Esta diferenciación se puede dar aleatoriamente y puede dar lugar a órganos como raíces, brotes y embriones (George *et al.*, 2008).

En general, la organogénesis indirecta ocurre cuando hay niveles altos de auxinas o citocininas presentes en el medio de cultivo durante el paso inicial que promueve la formación de callo. El callo puede retener por largos periodos de tiempo su capacidad regenerativa y las plantas regeneradas son morfológicamente similares a las de la planta donadora (Perez-Molphe *et al.*, 2015).

El callo en este tratamiento fue abundante, incluso en algunos casos el callo seguía proliferando hasta que los brotes quedaban embebidos en las masas desorganizadas. Esto puede deberse a que muchos cactus producen grandes cantidades de auxinas en condiciones *in vitro*, estimulando la proliferación de callo, lo cual puede representar una pérdida en el potencial de proliferación de brotes (Clayton 1990).

A los 4 meses de iniciada la inducción, en el callo se formaron raíces, de color crema de aproximadamente 1 mm y con pelos radiculares (Fig. 14). Mauseth (1977) realizó estudios en la formación de callo en diferentes especies de cactus, como *Coryphanta vivipera*, *Echinocereus pectinatus* y *Opuntia basilaris*, entre otras. Este autor observó que se formaban raíces ocasionalmente en varios cultivos de callo, pero brotes o masas proembriogénicas no se observaban.

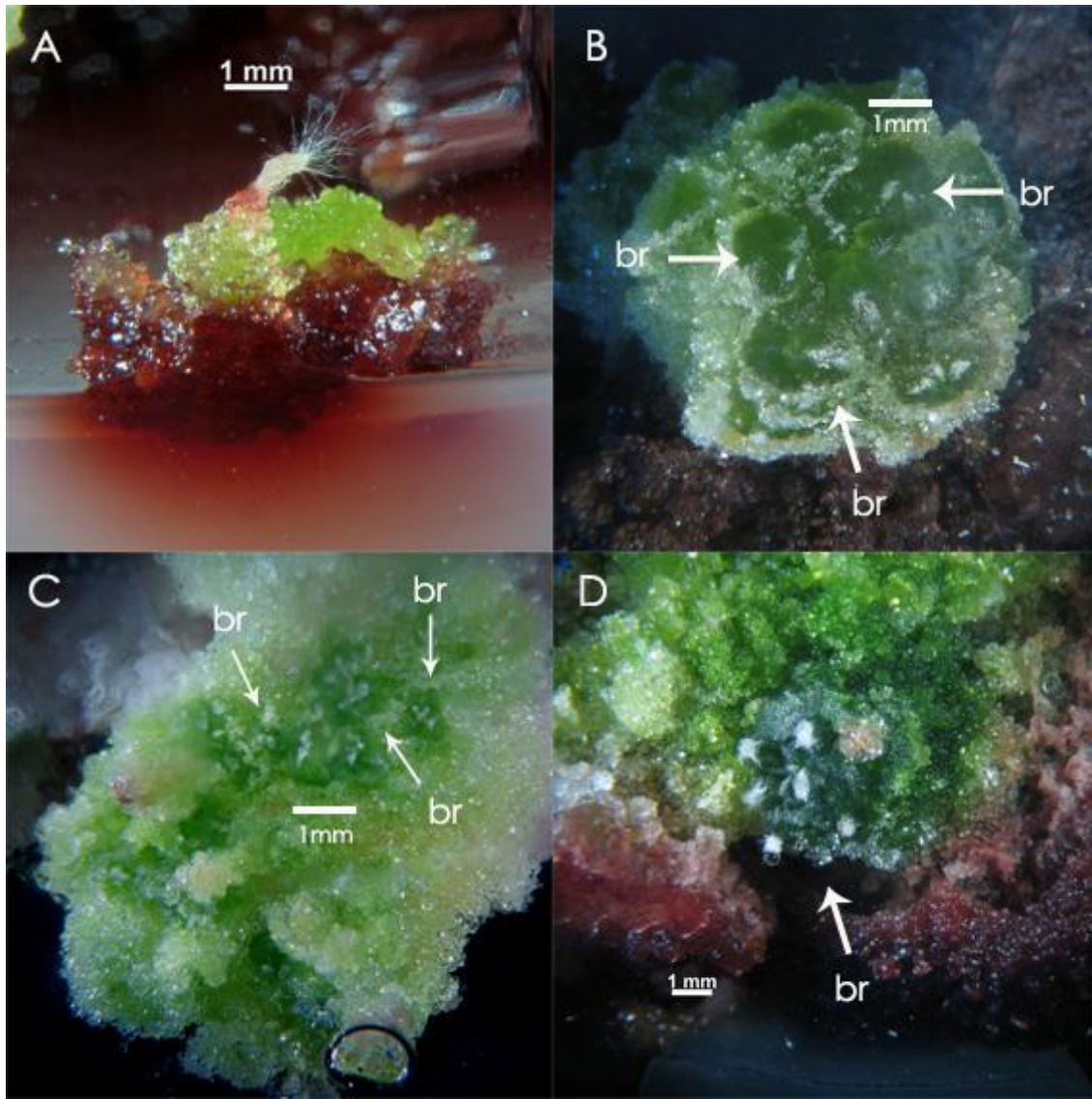


Figura 14. Respuestas morfogénicas en *A. valdezii* en tratamiento 1. A) En los primeros 5 meses se observó una raíz que se formó vía indirecta. B) Pasados 6 meses de iniciada la inducción, se observó en el callo una apariencia lisa y con forma esférica. C) A los 7 meses de la inducción, se observó la formación de aréolas y la presencia de lana. D) A los 12 meses de la inducción los brotes se encontraron un poco más consolidados y con aréolas bien definidas. br: brotes.

En un sistema de micropropagación, el número de brotes es la variable más importante, sin embargo, la presencia de callo puede aumentar la posibilidad para cambios genéticos en los regenerantes (Lee y Phillips,

1988). El inicio de los primeros brotes se dio a los 6 meses de iniciada la inducción (Fig. 14).

El tiempo de regeneración de los brotes depende de la especie. Por ejemplo, en *Mammillaria albicoma* los primeros brotes adventicios fueron visibles después de 3 semanas de iniciados los cultivos (Wyka *et al.*, 2006), mientras que en *Ariocarpus kotschoubeyanus* se observaron después de 6 semanas de cultivo (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003) y en *Astrophytum asterias* después de 3 meses (Gaona, 2018). Esto nos indica que *A. valdezii* puede ser considerada como una especie de muy lento crecimiento aún en condiciones *in vitro*. Sin embargo, el total de brotes fueron 111 y el promedio de brotes por explante fue de 15.8, todos ellos con aréolas, lo cual nos indica que *A. valdezii* tiene una gran capacidad regenerativa en comparación del promedio de brotes por explante en *A. Ritteri* que fue de 1.14-3.25 menor que en este trabajo (Félix, 2011).

Bhau y Wakhlu (2015) realizaron un protocolo de regeneración en *Coryphanta elephantidens* y su mayor porcentaje de brotes por explante fue de 12.4 en medio de cultivo adicionado con 1.5 mg/L de BAP, este resultado y la concentración inicial de BAP fue similar al obtenido en *A. valdezii*.

Tratamiento 2 BAP/ANA 0.5/0.025 mg/L

Las plantas utilizadas en este tratamiento, ya presentaban aréolas, costillas definidas y raíces bien desarrolladas. Ninguno de los explantes de tallo presentó formación de callo, se obtuvo regeneración de raíces y brotes por vía directa (Tabla 7).

Tabla 7. Tipo de respuestas obtenidas en los explantes de ápice del Tratamiento 2.		
	Regeneración de raíz	Brotes
Ápice 1	Raíces ramificadas, en dos extremos con coloración verde	5 (A 10 meses de la inducción)
Ápice 2	Raíces ramificadas	8 (Después de 12 meses)
Ápice 3	Raíces ramificadas	3(Después de 12 meses)
Ápice 4	Raíces ramificadas	No presentó
Ápice 5	Oxidación en la zona de corte	No presentó

El 80% de los explantes comenzaron a regenerar raíces ramificadas, de aproximadamente 2 cm después de 6 semanas de la inducción. Pasados 10 meses del inicio de la inducción, una de las plantas comenzó a presentar en dos extremos de sus raíces una coloración verde que fue aumentando de volumen hasta dar la apariencia de esferas verdes. Estas estructuras, solo se formaron en la raíz de una planta.

Continuaron su crecimiento hasta que transcurridos dos meses del inicio de su formación, se apreció que una era un brote que posteriormente formó raíces y la otra era una masa de callo verde que comenzó a formar brotes (4). Dos explantes de ápice también presentaron la formación de brotes provenientes de las aréolas al cabo de un año (Fig. 15).

Se pueden producir múltiples brotes a partir de una sola aréola (Mohamed-Yaseen, 2002), en este tratamiento se observó la formación de 16 brotes. La ausencia en la formación de callo puede deberse a la disminución en la concentración de auxinas en el medio de cultivo.

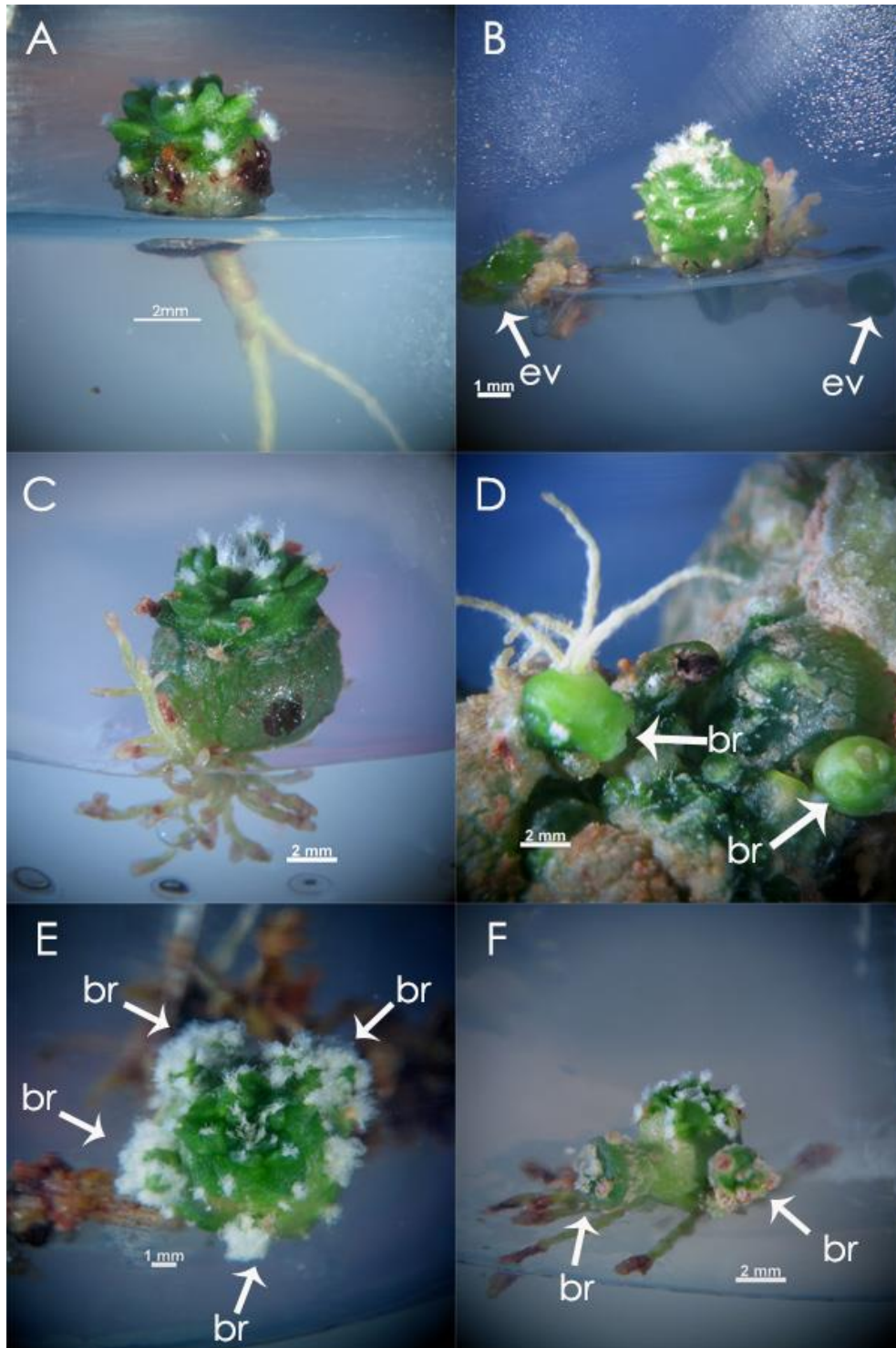


Figura 15. Respuestas morfogénicas de *A. valdezii* en tratamiento 2. A) Regeneración de raíces. B) Estructuras esféricas en raíces. C) Planta regenerada de raíz de Figura 15B. D) Callo formado a partir de raíz que presenta presencia de brotes. E y F) Brotes obtenidos a partir de organogénesis por vía directa. ev: esferas verdes, br: brotes.

Control

El control al igual que el tratamiento 2 no presentó la formación de callo; solo presentó una oxidación ligera en la zona de corte y posteriormente regeneró raíz en 3 explantes de tallo tras 6 semanas de cultivo (Figura 16). Asimismo, se observó la ramificación de las raíces y el tallo presentó la formación de aréolas. Sin embargo, a diferencia del tratamiento 2 no presentó la formación de brotes, esto pudo deberse a la falta de RCV en el medio de cultivo pero también a la dominancia apical.

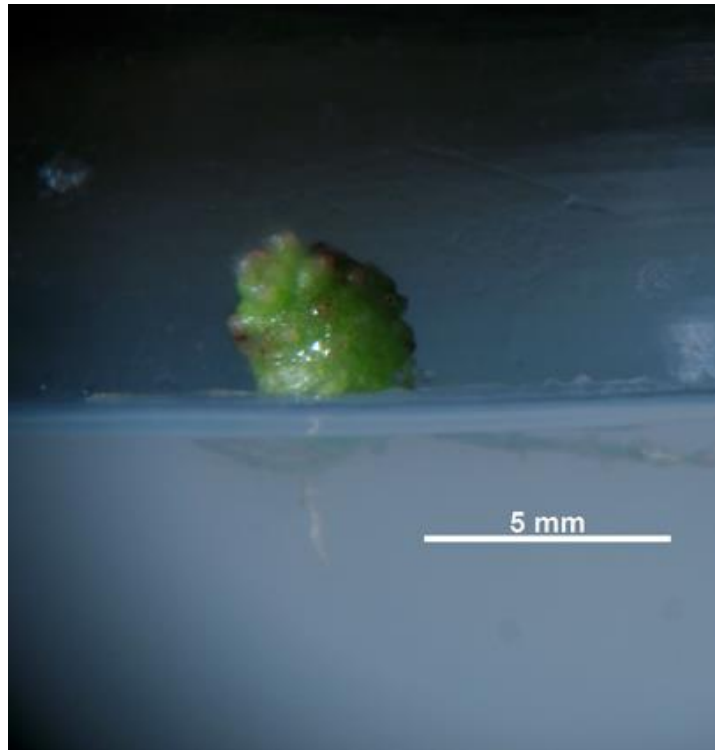


Figura 16. Explante de tallo de *A. valdezii* en Control que muestra que ocurrió la regeneración de raíces.

Vías de regeneración

El material limitado que se empleó en esta investigación restringió el número de tratamientos y repeticiones por tratamiento realizados. Sin embargo, se observaron respuestas interesantes en cada uno de los tratamientos como se discute a continuación.

Se han empleado muchos medios y RCV para la propagación de cactáceas, pero solo en algunos casos han probado ser útiles para más de una especie. Lo cual sugiere que cada especie de cactus podría requerir una combinación de RCV única (Giusti *et al.*, 2002). Bajo el estímulo de los RCV en medio de cultivo, el metabolismo de las células cambia de un estado quiescente a una activa división.

En esta investigación se obtuvo regeneración de brotes por vía organogénesis indirecta en el tratamiento 1 y directa en el tratamiento 2. En general, la organogénesis indirecta ocurre cuando en el medio de cultivo se encuentran presentes altos niveles de auxinas o citocininas (especialmente BAP), las cuales promueven la formación de callo en etapas iniciales (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015).

En *Ariocarpus kotschoubeyanus* se lograron regenerar brotes a partir de callo, usualmente amarillo o verdoso, que se formó al cortar la superficie del explante (Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Lema-Ruminska y Kulus, 2012). Esto coincide con lo reportado en esta investigación, pues el callo que presentó la mayor producción de brotes fue el callo friable, de color verdoso con 110 brotes a diferencia del callo compacto de color verde oscuro que presentó la formación de 1 solo brote.

Después de subcultivar el callo en medio de cultivo con ausencia de RCV se notó la aparición de brotes en el callo. Esto sugirió que el primer impulso

hormonal (BAP/ANA 1/0.2 mg/L) fue suficiente para la formación de brotes, que en promedio fue de 15.8 brotes por explante, lo que pareció indicar que los RCV fueron necesarios para la producción de brotes en *A. valdezii*.

En este tratamiento se empleó una concentración de BAP/ANA de 1/0.2 mg/L. La aparición de callo abundante y el hecho de que los brotes formados en el tratamiento 1 no lograron consolidarse, es decir, en ningún momento tomaron forma esférica ni lograron formar costillas, dieron pie a que en el tratamiento 2 se redujera la concentración de RCV a BAP/ANA 0.5/0.025 mg/L. Esto con el fin de observar si la cantidad de brotes o su grado de consolidación fueron diferentes. Al reducir la concentración de RCV en el tratamiento 2 se observó que la producción de callo prácticamente desapareció y se obtuvo organogénesis vía directa. El tratamiento 2 BAP/ANA 0.5/0.025 mg/L solamente tuvo 3.6 brotes por explante después de 12 meses de iniciada la inducción.

Rodriguez Garay y Rubluo (1992) reportaron que el proceso de morfogénesis en *A. ritteri* es tan complejo que se requiere la estructura completa de la planta para producir brotes, en este trabajo se notó que en el Tratamiento 2 las plantas eran mucho más grandes que en el Tratamiento 1 y más desarrolladas en cuanto a aréolas y formación de las costillas y ahí fue donde se obtuvieron brotes más consolidados.

En 2017, Fuentes realizó ensayos con *A. valdezii* y su explante inicial fueron costillas de una planta injertada *in vivo*. Este autor utilizó un medio de cultivo con 0.5 mg/L de BAP durante 12 semanas. Posteriormente aumentó la concentración a 1 mg/L por 7 semanas. Tras cinco meses de tratamiento, solo observó el crecimiento de los brotes adventicios que ya presentaba el explante al inicio del cultivo. La respuesta la obtuvo luego de que estos brotes los individualizó y añadió al medio de cultivo 4mg/L de

BAP y transcurridas 8 semanas notó la presencia de pequeños primordios de brotes en las aréolas de los segundos explantes.

Félix (2011), trabajó con explantes de aréolas de una planta adulta de *A. ritteri* y obtuvo organogénesis indirecta, su mayor promedio de brotes por explante fue con BAP/ANA 1.5/0.5 mg/L con 3.25 brotes por explante. Con estos datos se observó una tendencia en la respuesta de plantas del género *Aztekium*, pues la combinación de citocininas y auxinas son esenciales para promover la formación de callo, y la formación de brotes, ya sea por vía directa o indirecta.

En cuanto a los explantes utilizados, existieron diferencias en la respuesta de cada uno de ellos, en esta investigación se emplearon plantas jóvenes para el tratamiento 1 y la producción de callo fue abundante y el promedio de brotes por explante fue muy alto, esto puede atribuirse también a que son tejidos jóvenes y tuvieron un mayor potencial organogénico (Mata-Rosas *et al.*, 2001).

En el control no se obtuvieron brotes, solamente se observó la regeneración de raíces en los explantes de tallo, lo que indicó que para la regeneración de brotes de *A. valdezii* fue necesario añadir RCV al medio de cultivo. Esto concuerda con lo reportado en otros estudios sobre propagación *in vitro* de cactáceas en los que se reporta el uso de una alta o moderada concentración de citocininas y una baja o nula aplicación de auxinas para la proliferación de brotes, Lizalde-Viramontes y colaboradores encontraron que a concentraciones mayores a 1mg/L de BAP se obtenía un número alto de brotes regenerados. Para algunas cactáceas, las auxinas (especialmente ANA), sólo estimularon el crecimiento de callo de color verde (Lema-Ruminska y Kulus, 2012).

En algunas especies de cactáceas como *Coryphanta* y *Mammillaria*, las tasas de proliferación más altas se presentaron en medio adicionado solo con citocininas (BAP), mientras que algunas especies de géneros como *Echinocereus* y *Ferocactus*, requirieron la adición de citocininas (BAP) y auxinas (ANA), esto concuerda con reportes de algunos autores que aseguran que el medio de cultivo solo puede no ser adecuado para una adecuada proliferación de brotes en diferentes géneros y especies de cactáceas (Pérez-Molphe Balch *et al.*, 1998).

Al evaluar el promedio de brotes por explante en *A. valdezii* se notó que una alta concentración de RCV (Tratamiento 1 BAP/ANA 1/0.2 mg/L) fue más efectiva en la producción de brotes, sin embargo, al reducir la concentración de RCV (Tratamiento 2 BAP/ANA 0.5/0.025 mg/L) el promedio fue menor, pero los brotes obtenidos se encontraban mucho más consolidados. Estas diferencias podrían explicar que las concentraciones requeridas para estimular la regeneración en diferentes especies son casi únicas.

Rodriguez Garay y Rubluo (1992) después de 6-8 meses en cultivo de *A. ritteri* notaron que los brotes estaban bien desarrollados y mostraban las características 7-10 costillas de la especie; individualizaron estos brotes y los subcultivaron en medio para enraizar. Su enraizamiento fue extremadamente pobre y solo dos brotes de los 60 que obtuvieron presentaron raíces, es este estudio los brotes obtenidos en el Tratamiento 1 no se desarrollaron por completo y no se pudo llevar a cabo el enraizamiento de estos.

En el tratamiento 1 se obtuvieron en total 111 brotes y no se logró enraizar ninguno de ellos. Al momento de individualizarlos y subcultivarlos comenzaban a producir callo de color verde claro y muy abundante

durante la primer semana posterior al subcultivo, el callo era abundante pues los brotes pobremente desarrollados perdieron la forma y el callo proliferó.

Por otro lado, otros brotes aún no se encontraban completamente consolidados, pues al subcultivarlos se observó que aún estaban embebidos en grandes masas de callo, lo que probablemente propiciaba que éste siguiera produciéndose aún después de individualizarlos. Por este motivo se decidió probar con microinjertos sobre *Hylocereus undatus* para observar si estos lograban consolidarse al no estar en contacto con el medio de cultivo y estimular la formación de más brotes, pues los injertos *in vivo* han demostrado ser muy útiles para ayudar al crecimiento y desarrollo de especies de lento crecimiento.

Microinjertos

La organogénesis indirecta, como regla general tiene dos etapas involucradas en la regeneración: formación de brotes y el enraizamiento de estos brotes. Esta última etapa no se logró llevar a cabo en el presente estudio, ya que los brotes formados, al tiempo de individualizarlos, seguían produciendo callo. Por ello se decidió ensayar con microinjertos para poder consolidar los brotes obtenidos.

Una de las muchas metas en el injerto de cactus es producir un gran número de brotes bien desarrollados en un corto tiempo, los injertos ayudan a que plantas raras o de lento crecimiento crezcan más rápido de lo que usualmente crecen.

Las especies que se emplean más comúnmente como portainjerto son *H. undatus*, *Echinopsis pachanoi*, *E. brigdesii*, *E. macrogonus*, *E. peruvianus*, *E. multiplex*, *Trichocereus pachanoi*, *T. spachianus*, *T. macrogonus*, *T. fulvianus*

y *T. pasacana* (Toogood, 2002). En este caso se empleó *H. undatus*, con la finalidad de que ayudara al crecimiento y consolidación de los brotes obtenidos en el proceso de morfogénesis.

En cultivos *in vitro* de tamarindo, los brotes producidos formaron callo al tener contacto la parte herida y el medio de cultivo; además, el enraizamiento de los brotes fue pobre y requirió de tratamiento con auxinas (Mehta *et al.*, 2000). Técnicas de microinjertos *in vitro* han sido usadas previamente para mejorar la recuperación de brotes de tamarindo desarrollados en kinetina y BAP (Mehta, 2001). Los brotes de tamarindo microinjertados bajo condiciones *in vitro* mostraron 68% de unión en los cultivos, y estos injertos, tras ser trasplantados a suelo mostraron 50% de supervivencia (Mehta *et al.*, 2004).

En cactus no existen muchos reportes sobre microinjertos *in vitro*. Félix en 2011, microinjertó *A. ritteri* en *Mammillaria haageana*, *Coryphanta greenwoodii* y *Ferocactus recurvus* con la finalidad de disminuir su absorción de agua. No añadió ningún RCV al medio de cultivo y obtuvo 4.4 brotes por cada injerto que realizó.

En la presente investigación los microinjertos se ocuparon para la consolidación de brotes de *A. valdezii*, sin embargo no se descartó que se estimulara la proliferación de brotes (Figura 17). Se pudo corroborar la efectividad de los microinjertos después de 4 semanas, de 10 microinjertos que se realizaron, se obtuvo un 60% de sobrevivencia, se consideraron efectivos cuando el portainjerto aumentó su tamaño (de 2 a 4 mm) o su número de tubérculos, por lo que se puede considerar una buena opción en casos como *A. valdezii* en el que no es posible consolidar los brotes producidos.

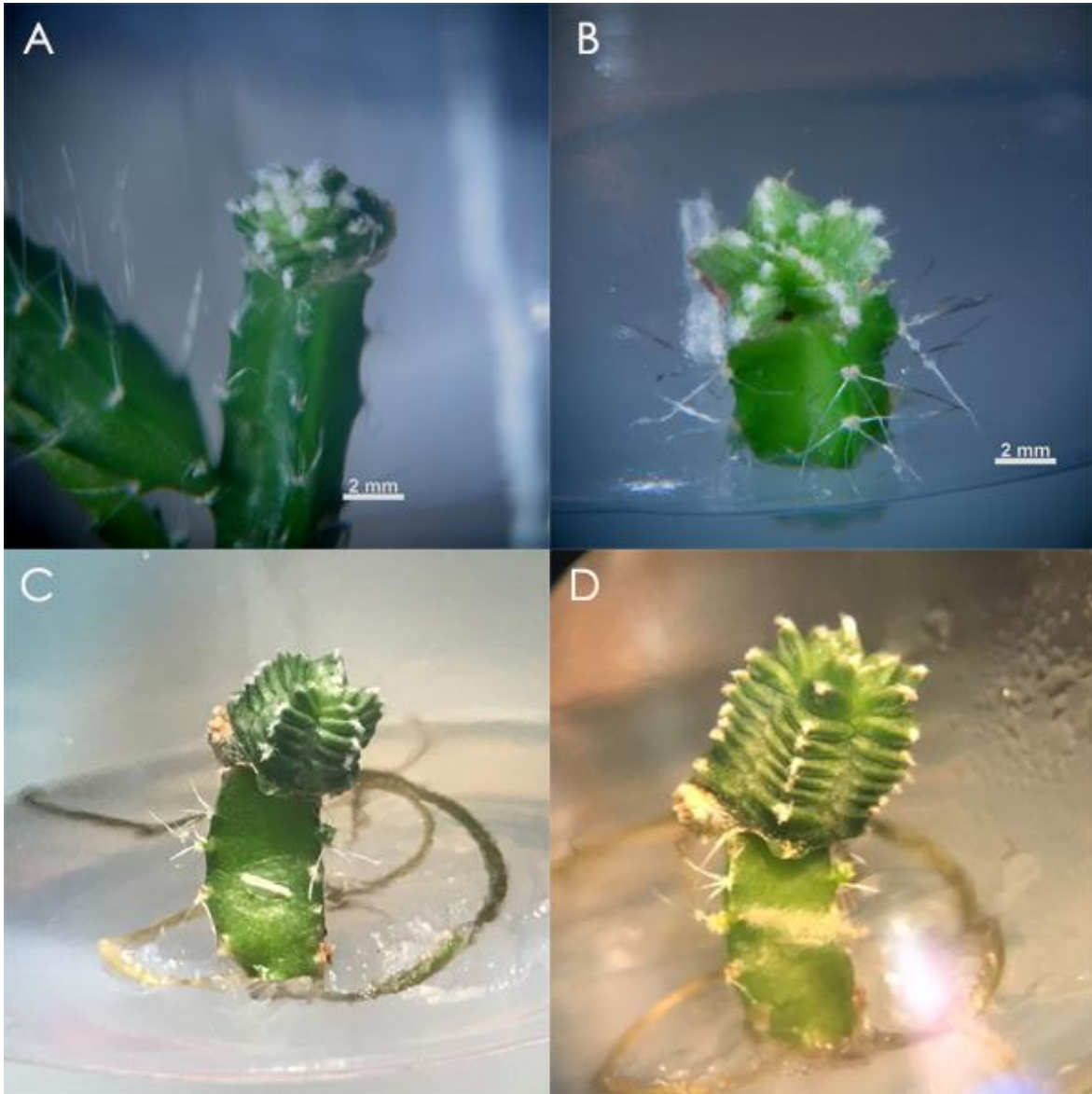


Figura 17. Microinjertos de *A. valdezii* sobre *Hylocereus undatus* A) El portainjerto presentaba el crecimiento de brotes laterales. B) Primer microinjerto realizado. C y D) Crecimiento de un brote, se puede observar la presencia de callo en la intersección.

En 2002, Estrada-Luna y colaboradores, realizaron microinjertos de 5 especies de *Opuntia*, realizando lo que denominaron heteroinjertos (combinando dos especies diferentes de *Opuntia*) y homoinjertos (donde utilizaron la misma especie de *Opuntia*). Además, realizaron dos tipos de corte: corte de cuña y corte horizontal.

Los mejores resultados en cuanto al tipo de corte fueron en corte horizontal con 90% de efectividad en los ensayos, en esta investigación se realizó el corte horizontal y de 10 ensayos, se obtuvo un 60% de sobrevivencia de los microinjertos. Asimismo, estos autores reportan que, los homoinjertos son mejores que los heteroinjertos en cuanto a la unión, ya que 90 días después, la altura de los injertos (homoinjertos) fue mayor que en los heteroinjertos. En *A. valdezii* no se trabajó con homoinjertos, ya que el crecimiento de estas plantas es muy lento, por lo que la obtención de portainjertos de *Aztekium* tomaría demasiado tiempo. Por esto, se escogieron plantas de *Hylocereus undatus*, que ya han sido reportadas previamente en injertos de cactáceas con buenos resultados.

En estudios previos de microinjertos, realizaron estudios de histología y observaron que existen algunas etapas durante la unión del injerto. En primer lugar se desarrolla una capa necrótica, seguido de proliferación de un puente de callo en la unión del injerto, diferenciación de nuevo cambium vascular, restauración de nuevo tejido vascular y la restauración de la continuidad de la epidermis (Estrada-Luna *et al.*, 2002). Por lo que sería interesante realizar más microinjertos en *A. valdezii* para poder observar cada etapa de unión de los injertos, y también explorar otras especies como portainjerto.

Los microinjertos jugaron un papel importante en esta investigación, dado que permitieron el crecimiento y desarrollo de plantas obtenidas *in vitro*. La

capacidad de seleccionar un portainjerto con un amplio rango de propiedades de resistencia, hace de esta técnica una estrategia atractiva para aumentar el rendimiento en la sobrevivencia de los brotes de *A. valdezii*.

Conclusiones

- Se logró establecer un protocolo de desinfección para semillas de *A. valdezii*, utilizando jabón antibacterial, etanol, SoluVet®, Captán® y cloro comercial.
- Se establecieron asépticamente semillas de *A. valdezii* (75% con el segundo protocolo de desinfección.)
- Se logró comparar la germinación *in vitro* y *ex vitro*. Las semillas en condiciones *in vitro* comenzaron a germinar en los primeros 6 días y obtuvieron un 76% de germinación, mientras que las semillas en condiciones *ex vitro* germinó un 20% y demoraron 90 días en germinar, debido a que en condiciones *in vitro* se favoreció la germinación gracias al medio de cultivo, humedad, luz y temperatura.
- El crecimiento y desarrollo de *A. valdezii* fue mayor en condiciones *in vitro*, ya que después de 2 meses de germinada, las plantas medían aproximadamente 2 mm y algunas ya presentaban la formación de aréolas, mientras que las plantas *ex vitro*, después del mismo tiempo solo medían 1 mm y no había formación de aréolas.
- *A. valdezii* en condiciones de estrés (por corte y exposición a la luz) produjo una gran cantidad de betalainas.
- Se obtuvieron los 2 tipos de organogénesis; la directa fue en el tratamiento 2 (BAP/ANA 0.5/0.025 mg/L), con 3.6 brotes por explante después de 12 meses de iniciada la inducción y la organogénesis indirecta en el tratamiento 1 (BAP/ANA 1/0.2 mg/L) con un promedio de 15.8 brotes por explante pasados 9 meses de iniciada la

inducción.

- El control solo regeneró raíces después de 6 semanas de cultivo, por lo que para la obtención de brotes fue necesaria la adición de RCV.
- El explante que tuvo una mejor respuesta morfogénica en ambos tratamientos fue el explante de tallo, pues las raíces se oxidaron y posteriormente morían.
- Los microinjertos fueron una alternativa para la consolidación de brotes con un 60% de efectividad, pues los injertos aumentaron en tamaño y número de aréolas y formaron más brotes.
- Se logró establecer un protocolo para la regeneración de brotes de *A. valdezii* a partir de plantas germinadas *in vitro*.
- *A. valdezii* es una especie de reciente descubrimiento que ha sido objeto de un intenso saqueo por su belleza y rareza, es importante seguir contribuyendo al conocimiento acerca de la especie para mejorar el protocolo de micropropagación y que permita satisfacer la demanda de estas plantas y evitar que las poblaciones naturales sigan disminuyendo.

Bibliografía

Abdelnour A. y Vincent J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Costa Rica. 38 p.

Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M. y UdupA, S. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. Africa. African Journal of Biotechnology 7: 997-1002.

Álvarez, R., Godínez-Álvarez, H, Guzmán, U, Dávila, P. 2004. Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. Bol. Soc. Bot. Méx. México. 75: 7-16.

Amiot, M., Forget, F. y Goupy, P. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. Polonia. HerbaPolonica 42: 237-247.

Anderson, E.F. 2001. The cactus family. Timber Press. E.U.A. 776 p.

Anderson, E. F., Montes Montes, S. y Taylor, N. P. 1994. Threatened cacti of Mexico. En: A new species of *Aztekium* (Cactaceae) from Nuevo León, México. Xerophilia. 2: 2-25

Arias, S. y Flores, J. 2013. La familia Cactaceae. En: Biología de las angiospermas, Facultad de Ciencias, UNAM. México, 492-504 p.

Ault, J.R. y Blackmon, W.J., 1987. In vitro propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). En: *In vitro* propagation of three endangered cactus species. Scientia Horticulturae 95: 319-332.

Bach, D. 2009. The Double-Cut Techniques for Grafting Cacti to *Trichocereus pachanoi* Rootstock. Desert Plants 25: 10-12.

Bárcenas, R. T. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. CONABIO. México. Biodiversitas 68:11-15.

Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. CONABIO. México. Biodiversitas 32:1-5.

Bhau, B. S. y Wakhlu, A. K. 2015. A highly efficient in vitro propagation protocol for elephant tusk cactus: *Coryphanta elephantidens* (Lem.) Lem. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 13(2): 215-219.

Boedeker, F. 1929. *Echinocactus ritterii* Böd. Monatschrift der Deutschen Kakteen-Gesellschaft. En: A new species of *Aztekium* (Cactaceae) from Nuevo León, México. Xerophilia. 2:2-20.

Bowers, J. E. 2000. Does *Ferocactus wislizenii* have a between-year seed bank?. Journal of Arid Environments 45:197-205
Bray, E., Bailey-Serres, J. y Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. En: Buchanan, B., Grissem, W. y Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1158-1203 p.

Bray, E., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. En: Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana 20: 153-175.

Burger, D. W., 1985. Micrografting: a tool for the plant propagator. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 34, 244-248.

Calderon, E. 2007. Morfogénesis *in vitro* de *Aztekium hintonii* Glass y F. Maurice, *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada, y *Mammillaria sanchez-mejoradae* González, cactáceas endémicas y en peligro de extinción. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 78 p.

Camacho-Velázquez, A., Arias, S., García-Campusano, F., Sánchez-Martínez, E., Vázquez-Santana, S. 2018. Seed development and germination of *Strombocactus* species (Cactaceae): A comparative morphological and anatomical study. Flora <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.03.006>

Chacón, G. y Gómez, L. 1996. Micropropagación de una variedad local de mora (*Rubus sp.*) En: Memoria X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, III Congreso Nacional de Fitopatología, II Congreso Nacional de Suelos. Volumen I. EUNED, EUNA. San José, Costa Rica. 303 p.

Choreño, J. 2002. Propagación in vitro de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas. Revista Chapingo. México. 8 (2): 183-196.

CITES. 2017. Apéndices I,II y III de la CITES <https://www.cites.org/esp/app/index.php>

CONABIO. 2006. Capital Natural y Bienestar Social. http://www.conabio.gob.mx/2ep/images/3/37/capital_natural_2EP.pdf

CONABIO. 2008. Capital natural de México, vol. I : Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 104 p.

CONANP. 2019. Región Noreste y Sierra Madre Oriental. Recuperado de: <https://www.gob.mx/conanp/documentos/region-noreste-y-sierra-madre-oriental?state=published>.

Clayton P., Hubstenberger J. F. y Phillips, G. C. 1990. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. U.S.A. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(2):337-343.

Crozier A., Kamiya Y., Bishop G. y Yokota T. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists, 850-929 p.

Cullmann, W., Göetz, E. y Gröener, G., 1986. The Encyclopedia of Cacti. Timber, Portland, OR. U.S.A. 340 p.

Da Costa P.S., Soares A.A. y Arnholdt-Schmitt B. 2001. Studies on the induction of embryogenic globular structures in *Opuntia ficus indica*. U.S.A. Journal of the Professional Association for Cactus Development 4:66-74.

Dahanayake N, y Ranawake A. L. 2011. Regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) plantlets from leaf and stem explants. Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research and Extension* 14: 85–89.

Debergh, P., y Zimmerman, H. 1991. Micropropagation: Technology and Application. 484 p.

Del Conde Juárez, H.S.A., Contreras-Medina R. y Luna-Vega, I. 2009. Biogeographic analysis of endemic cacti of the Sierra Madre Oriental, Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society*. Londres. 97; 373–389.

Doerner, P. 2000. Cell division regulation. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, 528-567 p.

Espinosa, D. y Ocegueda, S. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp 33-65.

Esteripharma. (2008). Soluvet.
<http://clientes.publicidadenlinea.com/Esteripharma/soluvet.php>

Estrada-Luna, A., López-Peralta, C., Cárdenas-Soriano, E. 2002. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia spp*). *Scientia Horticulturae* 92

FAO. 2017. Conservación de recursos genéticos.
<http://www.fao.org/docrep/006/AD111S/AD111S05.htm>

Félix Álvarez, A. 2011. Evaluación de tres métodos *in vitro* para la obtención de brotes de *Aztekium ritteri* (Boed). Tesis. Universidad Veracruzana. México. 37 p.

Fernández, A. 2014. Regeneración *in vitro* de *Backebergia militaris*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 103 p.

Flores-Palacios, A., y Valencia-Díaz S. 2007. Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation* 136: 372-387.

Flores, J., Jurado, E. y Jiménez-Bremont, F. 2008. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology*. Japan. 23 (1): 43-46

Fuentes, A. 2017. Propagación in vitro de cactáceas mexicanas amenazadas. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. 83 p.

Gaona, A. 2018. Regeneración in vitro de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. Cactácea en peligro de extinción. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 88 p.

George, E., Hall, M. y De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3er ed.) Volume 1. The Background. Dordrecht, Holanda, Springer. 501 p.

George, E. 1993. *Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology*. 2 ed. Exegetics Limited. England. 574 p.

George, E. 1996. *Plant propagation by tissue culture; part 2. In Practice*. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p.

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

Godínez-Alvarez, H., Ortega Baes, P. 2007. Mexican cactus diversity: Environmental correlates and conservation priorities. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 81: 81-87.

González Botello, M. A. 2004. Cactáceas del Estado de Nuevo León: riqueza, patrones de distribución y conservación. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Forestales, U.A.N.L. Linares, Nuevo León. 388 p.

Gonzalez, O., Juárez, W., Ronquillo, N., Estrada, B., Heredia, P., Jiménez, A., Mata, M. y Chávez, V. M. 2012. El cultivo de tejidos vegetales; alternativa de oportunidades para el desarrollo de México. *La vida en la sierra*. 3 (1): 59.

Guzmán U., Arias, S. y Dávila, P. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 315 p.

Harikrishnan, K., Martin, K., Anand, P. y Hariharan, M. 1997. Micropropagation of sweetflag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. India. 19: 427-429.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr., F. T. y Geneve, R. L., 1977. *Plant Propagation-Principles and Practices*, 6th Edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 662 p.

Hernández J. G., Chávez, R. J. y Sánchez, M. 2007. Diversidad y estrategias para la conservación de cactáceas en el semidesierto queretano. *CONABIO. Biodiversitas* 70:6-9.

IICA. 2010. Estrategia en recursos fitogenéticos para el Cono Sur. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), PROCISUR. [En línea] [<http://www.iica.int>]

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

IUCN. 2017. IUCN Red List versión 2017-3. Diciembre 2017.

Jambor-Benczur, E., Nemenyi, A., Szendrak, E. y Szafian, Z. 1997. In vitro propagation of *Ailanthus altissima* (Swingle) "Purple Dragon". *Horticultural Science* 29: 22-25.

Jiménez C.L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. 12 (1): 3-23.

Jimenez, C. L., Torres, R. y Corcuera, P. (2010) Biodiversidad. Una alerta. Difusión UAM [En línea] [http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/36 iv oct 2010/casa del tiempo el V num36 09 16.pdf](http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/36_iv_oct_2010/casa_del_tiempo_el_V_num36_09_16.pdf)

Jiménez-Sierra, C.L. y Eguiarte, L.E. 2010. Candy barrel cactus (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto: a traditional plant resource in Mexico subject to uncontrolled extraction and browsing. *Economic Botany*. U.S.A. 64: 99-108

King, RM. 1957. Studies in the tissue culture of cacti. *Cactus and Succulent Journal* 29: 102-104.

Langer, D. F. y Mergener R. A. 2013. Cultivo in vitro de *Cereus hildmannianus* K. Shum. *Unoesc & Ciência –ACBS – Joaçaba*. Brasil. 4: 7–14.

Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E. y Hohtola, A. 2000. Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology*. Reino Unido. 20: 467–475

Lee, M. y Phillips, R.L. 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* U.S.A. 39:413–437

Lema-Rumińska, 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, Hortorum Cultus*. Polonia. 11: 77–87.

Lema-Ruminska, J. y Kulus, D. 2014. *Micropropagation of Cacti-a Review*. *Haseltonia*. U.S.A. 19: 46-63.

López A. y Olguín, L. 2013. El cultivo de tejidos vegetales como un método de propagación, en *Biología de las angiospermas*, Facultad de Ciencias, UNAM. México, 521-527 p.

Maldonado, L.J. y Zapien, M. B. 1977. El nopal en México. Ed. Campo Experimental Forestal de Zonas Áridas "La Saucedá", Coahuila, México. 202 p.

Mandujano M.C., Montaña, C. y Rojas-Aréchiga M. 2005. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. *J Arid Environ. Países Bajos.* 62:15-21.

Martinez-Avalos 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. Países Bajos.* 71: 250–258.

Mata-Rosas, M., Monroy, M., Moebius-Goldammer, K. y Chávez, V. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant.U.S.A.* 37 (3): 400-404.

Mauseth, J.D. 1977. Cactus tissue culture: a potential method of propagation. *Cactus & Succ. J. (U.S.)* 49:80-81.

Mehta, U. J. 2001. Tissue culture studies in tamarind (*Tamarindus indica* L.), a leguminous tree species. PhD thesis, Pune University. India. 275 p.

Mehta, U. J., Krishnamurthy, K. V. y Hazra, S. 2000. Regeneration of plants via adventitious bud formation from mature zygotic embryo axis of tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Curr. Sci. India.* 78:1231–1234.

Mehta U. J., Barreto, S. y Hazra S. 2004. Effect of thidiazuron in germinating tamarind seedlings. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant U.S.A.* 40(3):279-284

Moebius-Goldammer K.G., Mata-Rosas, M., Chávez-Avila, V.M. 2003. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. U. S. A.* 39: 388–393.

Mohamed-Yasseen M. 2002. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. U.S.A.* 38: 427–429.

Morones, L., Flores, A., Pérez, M. E., Lizalde Viramontes, H. y Pérez Molphe Balch E. 1996. Estudio de la producción de betalainas en cultivos in vitro de cactáceas del género *Mammillaria*. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. México. 18:45-51.

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

Murkute, A. y Shanti-patil, M. 2003. Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest*. India. 23: 29-31.

Navarro, G., López, M. y Náder, B. 2009. Cultivo In vitro de dos especies de cactáceas: *Aztekium ritteri* (Boed.) Y *Coryphanta borwigii* (Purpus). Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México.

Niedz, R.P. y Bausher, M.G. 2002. In Vitro Cell. Dev Biol –Plant. 38: 468. <https://doi.org/10.1079/IVP2002316>

Ortega-Baes, P., Sührling, S., Sajama, J., Sotola, E., Alonso-Pedano, M., Bravo, S. y Godínez-Álvarez, H. 2010. Diversity and conservation in the cactus family. 157-173 p. En: Ramawat, K.C., ed. Desert plants. Springer, Berlin, Germany.

Pérez, J. N.1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara: Editorial GEO, Cuba. 390 p.

Pérez-Molphe-Balch, E., Pérez, M., Villalobos, E., Meza, E., Morones, L. y Lizalde, H. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. U.S.A. 34 p.

Pérez-Molphe-Balch, E. Pérez-Reyes, M.E., Dávila-Figueroa, C. A., Villalobos-Amador, E. 2002. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *HortScience*. U.S.A. 37: 693-696

Pérez-Molphe-Balch, E., Santos-Díaz, M., Ramírez-Malagón, R., y Ochoa-Alejo, N. 2015. Tissue culture of ornamental cacti. *Scientia Agricola*. Brasil. 72(6): 540-561.

Polturak G. y Aharoni A. 2018. La Vie en Rose: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. *Mol. Plant. China*. 11: 7–22.

Quail, D. 2002. Slow-growing cacti from seed - some further observations. *British Cactus & Succulent Journal*. Inglaterra. 20(2), 69-75.

Rehman, H.U. y Gill, MIS. 2015. Micrografting of Fruit Crops-A Review. *J Horticulture*. Japon. 2:151

Retes-Pruneda, J., Valadez-Aguilar, M., Pérez-Reyes, M., y Pérez-Molphe-Balch, E. 2017. Species in vitro propagation of *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Botanical Sciences*. México. 81: 9 - 16.

Reznig, H. 1980. Betalains. En: *Pigments in Plants*. Czygan, F. C. (ed). Gustav Fisher, Stuttgart. pp: 370-392.

Rodríguez-Garay, B. y Rubluo, A. 1992. In vitro morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal*. U.S.A. 64: 116-119.

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

Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. En: *A new species of Aztekium* (Cactaceae) from Nuevo León, México. *Xerophilia*. 2: 2-25.

Sánchez-Mejorada, H. 1982. Some prehispanic uses of cacti among the indians of Mexico" Gobierno del Estado de México, Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Dirección de Recursos Naturales. México. 42 p.

Sánchez J., Espinosa, A. y González, M. 2010. La Sociedad de cactáceas y Suculentas de Nuevo León, A. C. Ciencias UANL. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 13(3): 226-229.

Sánchez E., 1999. Avances en la propagación in vitro de cactáceas. CONCYTEQ. México. 39p.

Santos-Díaz, M.S., Mendez-Ontiveros, R., Arredondo-Gomez, A. 2003. In vitro organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In vitro celular and Developmental Biology-Plant* 39: 480-484

Sarukhán, J., et al. 2009. Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 104 p.

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.

Silvius, K.M. 1995. Avian consumers of cardon fruits (*Stenocereus griseus*: Cactaceae) on Margarita Island, Venezuela. *Biotropica*,27: 96–105

Smith, R. 2006. Plant Tissue Culture Techniques and Experiments. ELSEVIER. U.S.A. 190 p.

Sosa, V., y T. Platas. 1998. Extinction and persistence of rare orchids in Veracruz, México. *Conservation Biology*. U.S.A.12: 451-455.

Sotomayor, M., Arredondo-Gómez, A., Sánchez-Barra, F. y Martínez-Méndez, M. 2004. The Genus *Turbincarpus* in San Luis Potosí. *Cactus & Colibri*, Venegono, Italy. 147 p.

Steinhart, C.E. 1962. Tissue culture of a cactus, en *Micropropagation of Cacti- a Review*. 2014. *Haseltonia*. U.S.A. 18:46-63.

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

Tabiyeh, D., Bernard, F. y Shacker, H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in pistacia vera shoot tips culture. *Acta Horticulturae* 726: 201-204.

Tang, W. y Newton, R. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*. U.S.A. 167: 621-628

Taylor, N. 1997. Cactaceae. En: Oldfield S. (ed.) *Cactus and succulent plants – status survey and conservation action*. Plan IUC/SSCN Cactus and Succulent Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge. UK. pp. 1–2.

Toogood, A. 2002. *Propagating Plant a Darling Kinderley Book*. Royal Horticulture Society. Barcelona. España. 320 p.

Van Staden, J., Fennell, C. y Taylor, N. 2006. Plant stress in vitro: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*. U.S.A. 725: 55-62.

Vargas, A. 2017. *Micropropagación de Agave guiengola Gentry, especie endémica amenazada del estado de Oaxaca, México*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 86 p.

Velazco Macías, C.G. y Nevarez de los Reyes, M. 2002. Nuevo género de la familia Cactaceae en el estado de Nuevo León, México: *Digitostigma caput-medusae* Velazco et Nevarez sp. nov. *Cactáceas y suculentas mexicanas*. México. 46(4): 76-86.

Velazco, C., Alvarado, M. y Arias, S. 2013. A new species of *Aztekium* (Cactaceae) from Nuevo León, México. *Xerophilia*. U.S.A. ISSN 2285-3987

Villalobos V. M., Mejía, J. M. y Escobar, H. A. 1991. Micropropagación de opuntias y agaves. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (Eds.). Roca. W y Mroginski, Calí, Colombia: pp 643 - 662.

Vyskot, B. y Jara, Z. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds in vitro. *Journal of Horticultural Science*. Inglaterra. 59: 449–452.

Wain, R. L. 1980. El Control químico del crecimiento de las plantas. En: Ondarza N. R. (Ed.) *Los reguladores de las plantas y los insectos*. CONACyT, México, pp. 13-27

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

Zepeda, C. y Sagawa, Y. 1981. In vitro propagation of pineapple. *HortScience*. U.S.A. 16:495.