



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Control de la **H**iperhidricidad y consolidación de  
brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria luethyi*

T E S I S

Para obtener el título de

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A

**R**eyes **H**ernández **A**na **M**aría de **J**esús

Director de Tesis

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del Alumno

Reyes Hernández Ana María de Jesús

5585635705

Universidad Nacional Autónoma de  
México

Facultad de Ciencias

Biología

313208737

### 2. Datos del tutor

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

### 3. Datos del sinodal 1

Dra. Eva Aguirre Hernández

### 4. Datos del sinodal 2

Dr. Héctor Javier Tapia Salcido

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C. Octavio González Caballero

### 6. Datos del sinodal 4

Dra. Sonia Vázquez Santana

### 7. Datos del trabajo escrito

Control de la Hiperhidricidad y  
consolidación de brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria luethyi*

87 pp.

2021.

*Esta investigación se llevó a cabo en Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila.*

*Agradecimiento:*

*Agradezco el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA, UNAM por el financiamiento al Proyecto PAPIIT IT201020 “Cultivo in vitro de agaves de interés comercial como alternativa para su conservación y aprovechamiento”; ya que con los recursos aportados hicieron posible la disponibilidad de diversos materiales, reactivos y servicios que no habían en el laboratorio para el desarrollo de la presente tesis.*

## *Agradecimientos*

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser gratuita y abrir un espacio donde se entrelaza una diversidad increíble de pensamientos, vivires y saberes que habitan latentemente en personas y que en conjunto generan cambio.

A la Facultad de Ciencias que siempre ha sido Territorio Libre y Rebelde, donde el Prometeo nos regaló el fuego que guardan los corazones de quienes se aventuran a tener una cosmovisión de una ciencia comunitaria no elitista. Donde conocí a personas que marcaron mi vida, mi corazón y mi alma.

Al Dr. *Víctor* por ser tan humano, revoltoso, amable y comprensivo, por traspasar el nivel de la enseñanza que muchas veces se encapsula a un conocimiento lineal y escrito. Por el interés que conjunta en el conocimiento de la vida adecuado a las necesidades de un laboratorio. Gracias por todas las enseñanzas y consejos, al final es con lo que nos quedamos.

A mis sinodales por tener la paciencia, el tiempo y el interés de revisar mi manuscrito y guiarme con sus consejos, pero aún más importante por seguir aportando parte de su vida a la ciencia y al sueño de que podemos generar algo. A la Dra. Sonia Vázquez Santana.

Dra. *Eva Aguirre Hernández*, desde que la conocí mi admiración hacia Ud. fue muy grande, considero es una de las mejores profesoras que pude tener en toda la carrera.

M. en C. *Octavio González Caballero*, gracias por compartir toda su experiencia y consejos en el CTV pero sobre todo por saber escuchar y ser más que un profesor, un gran amigo.

Dr. *Héctor Javier Tapia Salcido*, gracias por ser tan interesante y vanguardista en las nuevas ideas y pensamientos que claramente revolucionan la forma de ver la vida.

A *Gabriel Olalde* por ser esa lucecita en mi camino, que me mostró las maravillas de las cactáceas y el amor por el campo, nunca olvidaré tu gran apoyo como profesor pero sobre todo como persona solidaria y revolucionaria que eres, gracias por darme los recuerdos más bonitos. En mi mente quedan los recuerdos de ese río y el sentimiento más fuerte de serenidad en mi vida.

A mis compañeras del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, *Emmanuel* por ser incondicional, atento, divertido, confidente y de mis mejores amigos, muchas gracias!, *Adri* por ser tan divertida y solidaria, *Auri* por tu ternura y nobleza, *Barbarita* por tu compañerismo, *Alo* y *Ale* por su nobleza y ayuda desinteresada, sus consejos y su amabilidad. Gracias por ser parte de mi equipo.

A mis amigas de la Facultad; *Katy* conocerte fue de las mejores cosas que pudieron pasarme en la Facultad, eres parte importante en mi vida, gracias por todos los aprendizajes y por compartir nuevas experiencias, *Frida* fuiste la primer chica a la que le hable, gracias por ser tan sencilla y divertida, no sé qué habría hecho sin ti, *Eran* gracias por tu amistad, por tu honestidad y apoyo en momentos grises, fuiste fundamental en mi crecimiento personal, por

ello siempre estás en mi corazón, *Anna* fue tan sencillo hablarte que pareciera lleváramos años juntas, gracias por tu amistad y por abrirme las puertas de tu casa en los momentos más complicados y también de los más felices, *Jazy* gracias por tu dulzura y comprensión, por ser oídos y por acompañarme en momentos que jamás olvidaré, gracias por tu amistad, *Edwin* agradezco tu apoyo y confianza incondicional, gracias por todo el tiempo que pasamos entrenando, platicando o simplemente estando, gracias amigo y *Alex* la niña más loca e intensa en mi vida, he aprendido tantas cosas de ti que me cuesta pensar que ya no estas en mi vida, sin embargo, soy optimista y agradezco por todo lo que me diste y espero en un futuro reencontrarnos.

A mi papá y mamá, por todo el esfuerzo que han hecho al darme estudios, les doy gracias por que siempre han estado para mí y porque su amor y cariño han hecho que sea una persona ejemplar. Gracias mamá porque he aprendido a ser fuerte y a saber resolver mis problemas de una forma certera, gracias por ser tan cariñosa, honesta, empática solidaria y muy fuerte, eres una mujer ejemplar y sí definitivamente quiero seguir tu ejemplo.

Gracias papá por ser tan sensato, loco y gracioso! Porque de ti aprendí a ser comprensible, solidaria, amable, respetuosa y optimista, gracias por tanto y gracias por seguirme apoyando hasta el final. Eres el mejor papá que pude tener y siempre doy gracias por eso.

A mi hermana por ser mi mano derecha, mi mejor amiga, porque jamás me sentí sola bajo tu resguardo, gracias por todo el tiempo, las risas, los buenos momentos y por su puesto por acompañarme en mis tormentas, por subirme a una nube donde me sentí tan segura y amamachada, gracias por ser mi compañera de lucha, gracias por ser tan tú, tan revolucionaria e intensa, gracias *Dany*, *Maui*, *Mauita* por ti he aprendido a ser fuerte y luchar por lo que amo, sin ti jamás habría logrado lo que ahora tengo y soy ¡GRACIAS!

A mis amigas; *Alma* gracias por tu apoyo incondicional, siempre estuviste para escuchar las ideas más locas y descabelladas, para consolarme y disfrutar de nuestra tiempo juntas, *Lau* eres la gorda más más loca y extraña en mi vida, gracias por darle color y experiencia, por más años jugando juntas! *Ari*, gracias por acompañarme desde los años más remotos de mi vida, por todas las aventuras que vivimos cuando éramos más morritas, por acompañarme tantos felices y locos años, gracias por seguir y por no dejar que se pierda esto tan bonito que hemos y seguimos construyendo. *Aldiño* simplemente el hombre más extravagante, loco y divertido que ha estado en mi vida, gracias por llenar los momentos de tantas risas, desde que te conocí supe que eras una persona muy tierna y cariñosa y también muy noble, gracias por darme tantos consejos y aprendizajes. *Italoch* quiero agradecerte por la amistad tan sincera y bella que tenemos, gracias por todo, especialmente por las reflexiones y los pensamientos filosóficos que hemos planteado, gracias por las risas y gracias por siempre darme tranquilidad.

A Ale por ser mi compañero de aventuras, por seguir la travesía a mi lado y no soltarme, por ser un sostén, confidente y amigo. Por todas las enseñanzas y experiencias vividas. Por ser un refugio, por tu calidez, amor y paciencia.

“*Nobody IJU-M*”

*“Una generación sucede a la otra, y cada una repite los actos de la anterior. Sólo un instante antes de morir descubren que era posible soñar y dibujar el mundo a su manera, para luego despertar y empezar un dibujo diferente. Y descubren también que hubo un tiempo en que pudieron poseer el viaje inmóvil de los árboles y la navegación de las estrellas, y recuerdan el lenguaje cifrado de los animales y las ciudades abiertas en el aire por los pájaros. Durante unos segundos vuelven a las horas que guardan su infancia y el olor de las hierbas, pero ya es tarde y tienen que decir adiós y descubren que en un rincón está su vida esperándoles y sus ojos se abren al paisaje sombrío de sus disputas y sus crímenes y se van asombrados del dibujo que hicieron con sus años. Y viven otras generaciones a repetir sus mismos gestos y su mismo asombro final”*

*-Elena Garro*

# Índice

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
Biodiversidad .....	3
Estado actual de la Biodiversidad .....	4
Diversidad en plantas vasculares.....	6
Diversidad de la Familia Cactaceae .....	6
Generalidades de la Familia Cactaceae.....	7
Estatus de conservación de la familia Cactaceae .....	9
Marcos legales para protección y aprovechamiento de las cactáceas .....	10
Descripción morfológica de <i>Mammillaria luethyi</i> .....	11
Distribución geográfica de <i>M. luethyi</i> .....	13
Descubrimiento de <i>M. luethyi</i> .....	14
Estatus de conservación de <i>M. luethyi</i> .....	15
Cultivo de Tejidos Vegetales .....	16
Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales.....	16
Etapas de la Micropropagación .....	21
Medio de cultivo .....	22
Medio de cultivo Murashige y Skoog .....	23
Hormonas y reguladores de crecimiento vegetal .....	24
Desordenes fisiológicos en el cultivo <i>in vitro</i> .....	26
<i>Variación somaclonal</i> .....	26
<i>Oxidación</i> .....	26
<i>Hiperhidricidad</i> .....	27
Cultivo de tejidos vegetales en la familia <i>Cactaceae</i> .....	32
Cultivo de tejidos vegetales en <i>M. luethyi</i> .....	36
<b>Justificación</b> .....	<b>37</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>38</b>
Objetivo general.....	38
Objetivos particulares .....	38
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>39</b>
<b>Resultados y Discusión</b> .....	<b>42</b>
Respuestas morfogénicas en <i>M. luethyi</i> .....	42

<i>Oxidación por osmorreguladores</i> .....	47
Cultivo de callo adicionado con osmorreguladores .....	48
<i>Sun caps</i> ® .....	52
<i>Oxidación por sun caps</i> ®.....	53
Modificación de la fuente de Nitrógeno .....	54
Regeneración de Brotes .....	57
<b>Conclusiones</b> .....	<b>65</b>
Implicaciones para la conservación de <i>M. luethyi</i> y Perspectivas.....	67
<b>Bibliografía</b> .....	<b>69</b>

## Figuras

Figura	Páginas
<u>Figura 1.</u> Amenazas a la naturaleza, y motores y presiones detrás de ellas. ....	5
<u>Figura 2.</u> Familias de plantas vasculares con una alta proporción de endemismos (CAT-CONABIO, 2017). ....	6
<u>Figura 3.</u> Algunas especies de cactáceas utilizadas en alimentación, medicina y ceremonias culturales. ....	8
<u>Figura 4.</u> Distribución geográfica de los tres procesos de amenaza más comunes. ....	9
<u>Figura 5.</u> Una comparación de un espécimen <i>Mammillaria luethyi</i> . ....	11
<u>Figura 6.</u> Ejemplares adultos de <i>Mammillaria luethyi</i> que muestra los caracteres morfológicos. ....	12
<u>Figura 7.</u> A) Vista del hábitat de <i>Mammillaria luethyi</i> . ....	13
<u>Figura 8.</u> Las diversas vías de diferenciación que puede seguir una célula vegetal y la terminología utilizada para describirlas. ....	18
<u>Figura 9.</u> Esquema de las vías organogénicas <i>in vitro</i> (A) Modo de ramificación axilar, por meristemos preformados. ....	20
<u>Figura 10.</u> Hormonas y reguladores de Crecimiento Vegetal. ....	24
<u>Figura 11.</u> Estructura química del D-manitol ....	31
<u>Figura 12.</u> Explantes de callo friable de <i>M. luethyi</i> , organizados en cúmulos y subcultivados en Medio MS reducido al 25% componentes inorgánicos y orgánicos. ....	39
<u>Figura 13.</u> Explante de callo friable de <i>M. luethyi</i> . ....	39
<u>Figura 14.</u> Diagrama general de la metodología experimental realizada en callo de <i>M. luethyi</i> . ....	41
<u>Figura 15.</u> Morfogénesis indirecta en <i>M. luethyi</i> en cultivos adicionados con el osmorregulador manitol (g/L). ....	43

<u>Figura 16.</u> Morfogénesis indirecta en <i>M. luethyi</i> en cultivos adicionados con el osmorregulador sorbitol.	.....44
<u>Figura 17.</u> Morfogénesis indirecta en <i>M. luethyi</i> en cultivos adicionados ambos osmorreguladores.	.....46
<u>Figura 18.</u> Oxidación en callo de <i>M. luethyi</i> , la cual se observa en la base del callo, de color blanco, café y rojizo.	.....47
<u>Figura 19.</u> Organogénesis indirecta en <i>M. luethyi</i> utilizando <i>sun caps</i> ® sin osmorreguladores.	.....53
<u>Figura 20.</u> Principales desordenes fisiológicos en la consolidación de brotes.	.....60
<u>Figura 21.</u> Etapas de la desdiferenciación por hiperhidratación en brotes consolidados.	.....60
<u>Figura 22.</u> Brotes de diferentes tratamientos consolidados después de 6 y 8 semanas de su individualización.	.....61
<u>Figura 23.</u> Plántulas en medio MS 25%, después de 4 semanas de su individualización.	.....63
<u>Figura 24.</u> Formación y consolidación de la raíz en <i>M. luethyi</i> .	.....64

## Cuadros

Cuadro	Página
<u>Cuadro 1.</u> Especies de la Familia Cactaceae propagadas por Cultivo de Tejidos Vegetales. Obtenida de Pérez <i>et al.</i> , 2015. ....	34
<u>Cuadro 2.</u> Estudios realizados en <i>M. luethyi</i> para su propagación y conservación por cultivo de tejidos vegetales. ....	36
<u>Cuadro 3.</u> Tratamientos y concentraciones para la organogénesis indirecta en callo de <i>Mammillaria. luethyi</i> . ....	40
<u>Cuadro 4.</u> Cultivo de callo de <i>M. luethyi</i> , hiperhidricidad y morfogénesis. Resultados a 12 semanas de iniciados los tratamientos. ....	58

## Gráficos

Gráfico	Página
<u>Gráfico 1.</u> Box plot de peso fresco total de callo (g) de <i>M. luethyi</i> , desde inicio hasta finalizar el tiempo de aplicación, en medio de cultivo adicionado con osmorreguladores. ....	49
<u>Gráfico 2.</u> Promedio de peso fresco de callo de <i>M. luethyi</i> , al finalizar el tiempo de tratamiento. Los dos tratamientos manitol y sorbitol en tres concentraciones diferentes (4, 8 y 12 g/L). ....	49
<u>Gráfico 3.</u> Concentraciones del osmorregulador manitol y su producción de callo después de 2 meses de aplicación. ....	50
<u>Gráfico 4.</u> Reducción porcentual de la hiperhidricidad en los tratamientos con osmorreguladores ....	51
<u>Gráfico 5.</u> Regeneración y número de brotes por tratamiento en <i>M. luethyi</i> . No. de brotes totales por explante después de 12 semanas. Brotes formados vs brotes consolidados. ....	59

## Abreviaturas

<b>2,4-D:</b> Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético	<b>IBA:</b> Ácido indol-3-butírico
<b>2-IP:</b> 2-Isopenteniladenina	<b>KIN:</b> Kinetina
<b>ADE:</b> Hemisulfato de adenina	<b>LGDFS:</b> Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable
<b>BA:</b> N6-benciladenina	<b>LGEEPA:</b> Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.
<b>BABI:</b> Medio BDS modificado	<b>LGVS:</b> Ley General de Vida Silvestre
<b>BDS:</b> Medio B5 modificado	<b>mg/L:</b> Miligramos por litro
<b>CITES:</b> Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora	<b>MS 50%:</b> Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración
<b>CTV:</b> Cultivo de Tejidos Vegetales	<b>NOM-059-SEMARNAT-2010:</b> Norma Oficial Mexicana
<b>DCA:</b> Dicamba	<b>RCV:</b> Reguladores de Crecimiento Vegetal
<b>HE:</b> Huella Ecológica	<b>RNS:</b> Especies reactivas de nitrógeno
<b>IAA:</b> Ácido Indol-3-acético	<b>ROS:</b> Especies reactivas de oxígeno
<b>MS:</b> Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)	<b>SEMARNAT:</b> Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
<b>NAA:</b> Ácido $\alpha$ -naftalenacético	<b>TDZ:</b> Tidiazurón
<b>NOM:</b> Norma Oficial Mexicana	<b>UICN:</b> Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
<b>P:</b> En peligro de extinción	<b>VU:</b> Vulnerable
<b>PC:</b> Per cápita	<b>ZEA:</b> Zeatina
<b>PFNM:</b> Producto Forestal No Maderable	
<b>PIB:</b> Producto Interno Bruto	
<b>PIC:</b> Picloram	
<b>PPO:</b> Polifenol oxidasa	

## Resumen

*Mammillaria luethyi* se distribuye naturalmente en los desiertos áridos del Norte de Coahuila, México. Sus características morfológicas la hacen ser muy codiciada entre coleccionistas, lo cual ha propiciado el saqueo, la venta ilegal y pérdida del hábitat. Es considerada como vulnerable por la UICN; se encuentra en peligro de extinción según la NOM-059-SEMARNAT 2010 y está en el Apéndice II de CITES. Su establecimiento en cultivo *in vitro* como estrategia para su conservación ha demostrado su viabilidad, sin embargo, la hiperhidricidad en los regenerantes ha impedido la consolidación de los brotes y su posterior aclimatización. Este estudio tuvo como objetivos promover la inducción de brotes vía organogénesis indirecta, así como reducir la hiperhidratación, propiciar la consolidación y enraizamiento de brotes. Para ello se emplearon diferentes osmorreguladores (manitol/sorbitol), se modificó y sustituyó por caseína hidrolizada la concentración de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en el medio de cultivo, y se generó un recambio de atmósfera en los contenedores de cultivo por medio de *Sun caps*®. Al término de ocho semanas de iniciados los cultivos tratados con osmorreguladores se determinó que la concentración de manitol 12 g/L obtuvieron los mejores resultados ya que redujo la hiperhidratación en 85.63%, formó 0.96 g de callo en dos meses y regeneró en promedio 13.88 brotes por explante (4 meses). Al sustituir el Nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) por hidrolizado de caseína, no se disminuyó la hiperhidricidad, al contrario, propició la proliferación masiva de callo formando hasta 11.6 g de callo en dos meses, sin embargo, fue el tratamiento con mayor número promedio de brotes con 19.5 brotes por explante (máximo 40 brotes por explante), y con una apariencia más consolidada, también mostró el valor más bajo en oxidación (4%). El uso de *sun caps*® mejoró la consolidación de brotes (grupo control: 11.06 g de callo; 11.25 brotes por explante) y redujo la hiperhidricidad, sin embargo, cuando se adicionaron los osmorreguladores en concentraciones mayores a 4 g/L se observó oxidación en los cultivos debido a un estrés osmótico provocado por la combinación de *suncaps*® con osmorreguladores. La formación de raíces se observó después de 1 semana de la individualización de los brotes, sin la adición de carbón activado o RCV. Se lograron controlar los problemas de hiperhidricidad y la consolidación de brotes vía organogénesis indirecta gracias a una estricta regulación en los componentes del medio de cultivo, esto permitirá continuar con el estudio y conservación de *M. luethyi*.

Palabras clave: *Propagación, conservación, hiperhidratación, oxidación, cultivo de tejidos vegetales.*

## Introducción

“La sociedad humana está inmersa en una crisis ambiental de proporciones alarmantes. A pesar de las políticas y acuerdos internacionales por revertir la situación, existen fuerzas socio económicas que reproducen continuamente la degradación y depredación del medio ambiente externo; pero también que degradan a la propia naturaleza humana. Esto causado por relaciones propiamente capitalistas” (Foladori, 2007).

El grupo de las cactáceas al tener múltiples funciones en la naturaleza ha tenido graves afectaciones, al ser un producto forestal no maderable (PFNM), la regulación de su extracción es competencia (responsabilidad) directa de dos leyes federales: la Ley General de Vida Silvestre (LGVS) y la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable (LGDFS), así como de 11 normas oficiales mexicanas (NOM). Indirectamente, la LGDFS plantea modalidades particulares para los aprovechamientos de PFNM en bosques tropicales, en áreas protegidas o para las especies en peligro de extinción, amenazadas, raras o con protección especial (Ahumada, 2003; Anta Fonseca y Carabjas, 2008).

La Familia Cactaceae es de las más diversas y con mayor importancia, ecológica, económica y cultural, cuenta con aproximadamente 1,800 spp en 100-150 géneros (Arias y Flores, 2013). La NOM-059-SEMARNAT-2010, enlista 270 taxones, el Libro Rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) incluye 66 y la Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora (CITES), enlista 41 taxones (Apéndice I), y el resto de las cactáceas están consideradas dentro del Apéndice II.

*Mammillaria luethyi* G. S. Hinton es una cactácea endémica del norte de México y se encuentra únicamente en un afloramiento de fluoruro asociado a lajas de roca calcárea (Hinton, 1996); es debido a su morfología de atractivo para coleccionistas, su restringida distribución y su pequeño tamaño poblacional que la ponen en severo riesgo de desaparecer. Según la UICN es considerada vulnerable (VU), en la NOM-059: P (Peligro de extinción) y CITES la coloca en el apartado II.

Ante la situación de riesgo en la que se encuentran al menos el 30 por ciento de las especies de cactáceas mexicanas, es necesario tomar medidas de protección urgentemente. Entre éstas se han sugerido la colecta y la preservación de semillas; el cultivo de plantas en invernaderos con el fin de propiciar la investigación; la introducción de plantas a sus hábitats naturales, y fomentar un comercio legal. También se ha sugerido el establecimiento de áreas de exclusión, tanto al daño ocasionado por el ganado, como para evitar la extracción de ejemplares de sus ambientes naturales (Jiménez, 2011).

*M. luethyi* se cultiva como una planta ornamental, a menudo por medio de injertos (Lüthy, 2007), sin embargo, es necesario recurrir a otros métodos para poder cubrir su demanda comercial y para su conservación. Se han implementado herramientas de biotecnología vegetal, por ejemplo, la utilización del cultivo de tejidos vegetales (CTV) o cultivo *in vitro*, en virtud de la gran cantidad de plantas que se obtienen una vez superada la fase experimental, al reducido material vegetal que se requiere, además de que se realiza en

condiciones libres de patógenos y en un espacio reducido (Quiala *et al.*, 2004; Téllez y Casanova, 2014).

El CTV de células, tejidos, órganos o plantas completas se realiza en condiciones nutricionales y ambientales controladas (Thorpe, 2007) a menudo para producir clones de esa planta. El cultivo *in vitro* de células y órganos ofrece una opción para la conservación de genotipos en peligro (Sengar *et al.*, 2010). Los protocolos de cultivo de tejidos se pueden usar para diversos propósitos, entre ellos, la preservación de los tejidos vegetativos cuando los objetivos para la conservación son clones y/o en situaciones extremas como con *M. luethyi* para la que no se cuentan con semillas, ni suficientes individuos. El CTV se lleva a cabo bajo condiciones controladas en recintos donde es posible el trabajo de investigación de manera continua, se reducen riesgos de pérdida de recursos genéticos por desastres naturales bióticos o abióticos (Hussain *et al.*, 2012).

La regeneración de plantas *in vitro* de *M. luethyi* ha sido estudiada por Escobedo *et al.*, (2004), Gracidas *et al.*, (2010) y Camargo (2017), quienes lograron su establecimiento aséptico *in vitro* e indujeron mediante reguladores de crecimiento vegetal respuestas de morfogénesis directa e indirecta. Sin embargo, también reportaron en altas concentraciones y/o por tiempos prolongados que se promovieron desordenes fisiológicos en esta especie, como la hiperhidricidad, la cual provoca la pérdida de organización en órganos y tejidos que llevó a la conversión de plantas completas en callo sin poder recuperar una respuesta morfogénica. Camargo (2017), mencionó que los cultivos tenían procesos de pérdida de la capacidad regenerativa debido a largos ciclos de cultivo *in vitro*, esta situación se vio agravada por el limitado número de plantas y de explantes, el lento crecimiento que se observó y altos porcentajes de oxidación extendida en brotes.

Para *M. luethyi*, especie endémica, con escasos individuos y en peligro de extinción, poder estudiar y tratar de resolver la hiperhidricidad de los tejidos es una tarea obligada para alcanzar la consolidación de las plantas y lograr su permanencia en la biodiversidad. El empleo de osmorreguladores, reguladores de crecimiento se plantean para mejorar las condiciones fisiológicas *in vitro* y su efecto en el desarrollo de brotes y plántulas completas (Bello *et al.*, 2014). El propósito del presente estudio fue probar estas alternativas para resolver los problemas de hiperhidratación, oxidación, enraizamiento que hagan posible continuar con su propagación y conservación.

## *Antecedentes*

### **Biodiversidad**

“La biodiversidad que vemos hoy es el fruto de miles de millones de años de evolución, moldeada por procesos naturales y, cada vez más, por la influencia de las actividades humanas. Forma la red de la vida de la cual somos parte integral y de la cual dependemos en su totalidad” (CBD, 2000).

La biodiversidad está distribuida de forma irregular alrededor de la tierra, se encuentra con una marcada distribución en lugares que no han sido afectados por efectos físicos como cataclismos, actividad volcánica, glaciaciones, así como los lugares donde no ha llegado el ser humano, pues cierto grado de aislamiento favorece la evolución y aparición de nuevas especies. Según la organización Conservation International definió 34 lugares considerados ‘hot-spots’ terrestres – que representan el 2.3% de la superficie terrestre total. En ellos se encuentra más del 50% de las especies de plantas del mundo y el 42% de las especies de vertebrados son endémicas de estas áreas (Badii *et al.*, 2015).

Los países “Megadiversos” distribuidos por todo el orbe, en conjunto albergan entre el 60% y 70% de la diversidad biológica conocida del planeta (en el cual se conocen actualmente entre 1.8 y 2.3 millones de especies animales, vegetales, de hongos y de microorganismos de un total estimado conservadoramente en casi 11 millones de especies (Hinchliff *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2011). México, junto con Australia, Brasil, Costa Rica, Colombia, China, Ecuador, Nueva Guinea, Indonesia, Kenia, Papúa y Perú son los países en donde residen los mayores índices de biodiversidad (CONABIO, 2006; Sarukhán *et al.*, 2012).

Somos el cuarto país en cuanto a riqueza de especies, además de combinar esa elevada diversidad biológica con una gran riqueza cultural (Sarukhán *et al.*, 2017). Esta se debe por la gran complejidad fisiográfica y por su intrincada historia geológica y climática, la flora y fauna mexicanas muestran patrones geográficos correlacionados con el comportamiento del medio físico (Espinosa *et al.*, 2008). El territorio nacional presenta casi todos los climas del planeta (exceptuando tundra) lo cual permite que se desarrollen prácticamente todos los ecosistemas terrestres presentes en el mundo. Concentrados en poco menos de dos millones de kilómetros cuadrados y representando sólo el 1.4% de la superficie de la Tierra, México alberga entre el 10% y el 12% de todas las especies del planeta (Jiménez *et al.*, 2014). Los grupos mejor conocidos son los vertebrados terrestres. En lo que se refiere a mamíferos, en México habitan 564 especies, de las cuales 514 son terrestres y 50 son marinas (Ceballos, 2014; Bravo y Sánchez, 1991). Con una superficie territorial 3.5 veces mayor que la de México, Australia posee 917 especies de reptiles (Chapman, 2009), mientras que en nuestro territorio se han descrito 908 especies, por lo que México ocupa el segundo lugar en el número de especies de este grupo. Se han descrito 2,224 especies de peces marinos (Espinosa, 2014). En lo que se refiere a insectos, el grupo de animales más numeroso, se han descrito

de México hasta el presente 66 275 especies, pero se estima que pueden existir cerca de 100 000 (Cat-Conabio, 2017).

## Estado actual de la Biodiversidad

El consumo descontrolado del ser humano es un factor detrás de los cambios ambientales, sin precedentes que estamos presenciando, debido al aumento en la demanda de energía, tierra y agua. Cuando los humanos explotan la naturaleza a una tasa mayor de la que ésta se regenera y se producen residuos a una tasa superior de los que la naturaleza puede absorber, se está ejerciendo un sobreuso y explotación del “capital natural”.

Otro factor del deterioro ambiental radica en el aumento poblacional, pero debemos tomar en cuenta que existen claras diferencias (desigualdades) en el reparto en el consumo de recursos, ya que no todos los habitantes han contribuido por igual a ese déficit ecológico y no todo el mundo podría seguir los estándares de vida de países “desarrollados” (Pérez *et al.*, 2015). Podemos decir que en medida que el PIB de una nación se incrementa también lo hace su huella ecológica (HE) (indicador de consumo y estimado del uso general de recursos; WWF, 2018). Por lo que existe una relación directa entre el crecimiento económico y el deterioro ecológico a pesar de los “supuestos” avances en términos de eficiencia ambiental (Carpintero, 2005). Los países con altos ingresos tienen una HEpc (*per cápita*) media de 6.1 ha, mientras que la de los países de bajos ingresos es tan solo de 1.2 ha. En el caso de México, entre 1961 y 2006 su huella ecológica aumentó cinco veces, pasando de 1.9 a 3.4 ha (Amen, 2011).

La utilización de los recursos naturales y la biodiversidad están estrechamente relacionadas, el aumento en el consumo de recursos naturales trae como consecuencia la pérdida de biodiversidad, la cual es ocasionada principalmente por los humanos. Los principales factores son la transformación, degradación y fragmentación de los ecosistemas naturales, en particular por la expansión de la agricultura y la ganadería, la urbanización, la construcción de infraestructura (como carreteras, muelles y presas) y por la apertura de minas y canteras (*Fig. 1*) (PNUMA, 2012). A ello debe sumarse la sobreexplotación de las poblaciones silvestres de muchas especies (por la pesca, la caza y la recolección), la introducción de especies exóticas invasoras y el cambio climático global. En México, de según las Cartas de Uso del Suelo y Vegetación del INEGI, la expansión de la agricultura hasta los años setenta había alcanzado, a costa de ecosistemas naturales, más de 26 millones ha, esto es, el 13.3% de la superficie total del país. Para 2011 avanzó hasta alcanzar cerca de 31 millones de ha, principalmente sobre superficies ocupadas originalmente por selvas (13 millones de ha), matorrales (7.4 millones de ha), bosques templados (6.3 millones de ha) y pastizales (5 millones de ha).

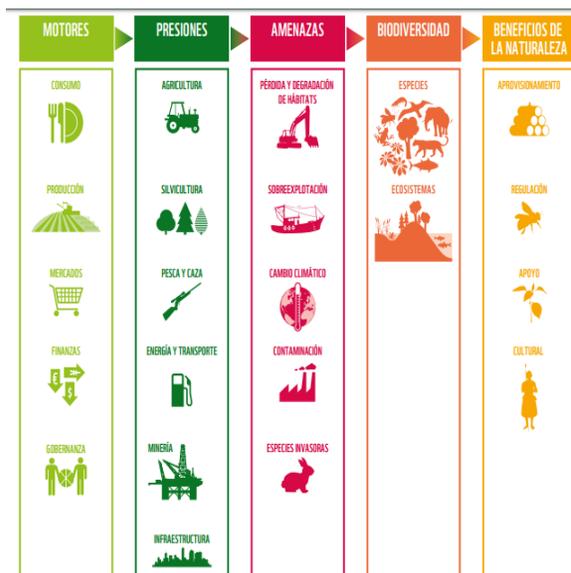
Si se consideran en conjunto a los terrenos agrícolas y ganaderos, entre la década de los años setenta y 2011, crecieron 11.4 millones ha, con lo cual, su presencia se amplió del 20.5 al

26.3% del territorio nacional. No obstante, la tasa de expansión anual de la frontera agropecuaria ha disminuido gradualmente: en el periodo 2002-2007 alcanzó 296 mil ha (0.59% anual) y entre 2007 y 2011 fue de 123 mil ha.

Las proyecciones indican que la biodiversidad del planeta habrá disminuido a sólo una décima parte en el año 2050 (WWF, 2018).

Toda actividad económica depende de los servicios que proporciona la naturaleza, por lo que debe ser reconocida, valorada, conservada y aprovechada de manera sostenible como el componente esencial y fuente de recursos aprovechables para la riqueza (biológica, cultural, económica) de un país. Se calcula que mundialmente, la naturaleza provee servicios valorados en unos US \$125 billones al año (Costanza., 2014). Se requiere valorar la naturaleza más allá de asignarle una cifra en dólares, es necesario reconocer otros sistemas de conocimiento, por ejemplo, los de las comunidades locales y los pueblos indígenas.

Salvaguardar la naturaleza ahora es de las actividades más peligrosas, sólo en México a mediados del 2019, 13 personas murieron por su labor valiente en la protección de la naturaleza y en 2018, según el Centro Mexicano de Derecho Ambiental, 21 personas fueron asesinadas por defender el medioambiente, el 39% de las agresiones registradas vinieron de autoridades. Las personas que están en la primera línea de defensa del patrimonio natural mexicano viven bajo constante amenaza. Si en México se continúa asediando, desapareciendo y matando con absoluta impunidad a los activistas, ¿quién protegerá a la naturaleza? Se debe garantizar la libertad de expresión y la seguridad de los ambientalistas y respetar sus acciones, hacer cumplir las leyes y llevar a la justicia a los criminales, aun cuando éstos sean parte del gobierno (Aridjis, 2020).



*Figura 1.* Amenazas a la naturaleza, y motores y presiones detrás de ellas. La pérdida de hábitats debida a la agricultura y la sobreexplotación siguen siendo la mayor amenaza a la biodiversidad y los ecosistemas (WWF, 2018).

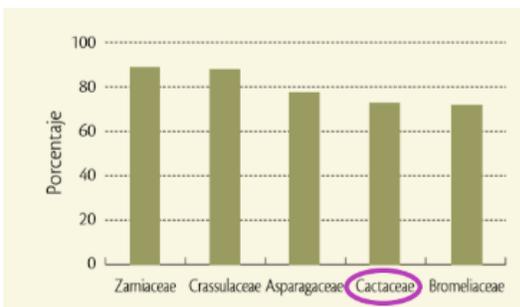
## Diversidad en plantas vasculares

Se estima un aproximado de 383,671 especies de plantas en el mundo. En el continente americano hay un registro de 124,993 especies, 6,227 géneros, y 355 familias. Esto corresponde al 33% del total de especies de plantas vasculares conocidas. En escala continental, 51,241 especies se encuentran en el norte del continente Americano (42,941 endémicas) y 82,052 en Sudamérica (73,552 endémicas), con sólo 8,300 especies en Centroamérica (Nic *et al.*, 2016; Ulloa *et al.*, 2017).

Nuestro país se encuentra entre los cuatro con el mayor número de plantas vasculares. Se han descrito hasta ahora poco más de 25,000 de un total que se estima entre 27,000 y 30,000, de las cuales una alta proporción es endémica del país (Sarukhán *et al.*, 2017).

Villaseñor (2016) registra un listado de plantas vasculares nativas de México donde enumera 23,314 especies distribuidas en 2,854 géneros, 297 familias y 73 órdenes. Entre los países continentales ocupa el segundo por el número de especies endémicas (alrededor del 50%), sólo por debajo de Sudáfrica. Es decir, la mitad o más de nuestra flora no se encuentra en ninguna otra parte del mundo. Si una de estas especies se extingue en México, desaparece del planeta (Sarukhán *et al.*, 2017). Las familias con mayor número de géneros, destacan en los primeros lugares *Asteraceae* (362 géneros), *Poaceae* (166), *Orchidaceae* (157), *Fabaceae* (92), *Rubiaceae* (92) y *Cactaceae* (72) (Villaseñor, 2004).

## Diversidad de la Familia Cactaceae



*Figura 2.* Familias de plantas vasculares con una alta proporción de endemismos (cat-CONABIO, 2017). Véase fuentes en el

importante centro de diversificación de esta familia al presentar un alto índice de endemismo a nivel genérico (73%) y específico (87%) (*Figura 2*) (Palacios, 2010), cuenta con 913 taxones (80% endémicos) y 677 especies, de las cuales el 84 % son endémicas. (Jiménez, 2011).

La máxima ocurrencia de especies de cactáceas se presenta en la porción sureste del desierto Chihuahuense, particularmente en los estados de Coahuila, San Luis Potosí, Tamaulipas y

Nuevo León, constituyendo el núcleo de concentración y diversidad genética de cactáceas amenazadas más importante del continente americano. La diversidad de cactus se da a nivel de género y especies, en géneros Oaxaca y San Luis Potosí tienen la mayor diversidad, pero en cuanto al número de especies; San Luis Potosí ocupa el primer lugar con 151 especies y Coahuila el segundo con 128 especies (Villaseñor, 2016; Villavicencio et al., 2010).

## Generalidades de la Familia Cactaceae

Las cactáceas son plantas del orden Caryophyllales/clase Magnoliopsida, que presentan una forma de crecimiento y estructuras anatómicas de adaptación altamente especializados, dándoles una fisonomía particular. Estas estructuras son responsables de las adaptaciones al medio árido y desértico en que la mayoría crece, diferentes formas de vida: criptófita, geófito, epífita o terrestre, lo cual depende en gran medida del ecosistema donde se distribuyen. Posiblemente, también los diversos tipos de polinización que experimentan, principalmente por medio de los insectos y aves.

Las aréolas son los órganos más característicos de las cactáceas, se les considera como yemas homólogas a las yemas axilares de las otras Magnoliopsidas. Las yemas de las dicotiledóneas, debido a su meristemo dan origen a hojas, nuevos tallos y flores; las yemas de las cactáceas, o aréolas, forman también hojas reducidas, flores, tallos espinas, glóquidas incluso raíces adventicias. En casi todas las especies existe al centro de las aréolas, un meristemo de crecimiento integrado por dos porciones, la abaxial o externa, que forma las espinas, y la adaxial, que origina las flores. La abaxial entra primero en actividad una vez formadas las espinas se activa la parte adaxial productora de flores.

Los tallos como adaptación morfológica en relación con la aridez permiten almacenar y conservar agua en sus tejidos. Presentan, entre otras adaptaciones: gran desarrollo de los parénquimas, responsables de la succulencia; la reducción de la superficie transpiratoria al adquirir formas globosas; la atrofia hasta estados vestigiales del limbo de las hojas o su transformación en escamas, espinas y glóquidas; el engrosamiento de la cutícula y de las membranas celulósicas de los tegumentos; la pruinosidad o las excrescencias cerosas de las células epidérmicas; la disminución y disposición hundida de los estomas, etcétera. Hay que agregar que estas adaptaciones facilitan la absorción rápida del agua como la gran longitud que adquieren algunas raíces.

Las espinas son órganos característicos de las cactáceas. Sin embargo, en diversas especies se encuentran ausentes, como sucede en *Lophophora*, *Aztekium*, *Astrophytum myriostigma*, *A. asterias*, *Epiphyllum*, *Opuntia* y *Rhipsalis*. Las espinas se forman a expensas de los tejidos meristemáticos de las aréolas, de la misma manera que las hojas; su crecimiento se debe a un meristemo que existe en su base, y el endurecimiento a un proceso de lignificación. Las espinas aparecen en la aréola casi al mismo tiempo (que las hojas), pero sucesivamente, acaban por presentar una disposición bilateral (Bravo, 1978).

## Importancia biológica y usos de las cactáceas”

Las cactáceas tienen un papel fundamental en la naturaleza, cumplen múltiples funciones en sus ecosistemas ya que son fijadoras de suelo para evitar la erosión, ha sido utilizadas como fuente de forraje son convenientes, sobre todo en épocas de sequía en las zonas áridas y semiáridas del país, son fuente de mucílagos, gomas y pectinas (Flores y Velazco, 2008; Gurvich, 2010), sirven de fuente de alimento en la gastronomía humana, ofrecen diferentes usos etnobotánicos (Schulze, 2004). En la India se han utilizado como vegetación perenne para proteger la tierra de la erosión. Los cactus parecen ser una opción para mantener los medios de vida, reducir la pobreza y generar oportunidades de empleo (Shetty *et. al.*, 2012).

Los tallos, raíces, flores, frutos y semillas de diversas cactáceas han sido usados desde la época prehispánica hasta la actualidad, en la alimentación, en medicina y en ceremonias religiosas (Fig. 3). Algunos ejemplos son *Opuntia ficus-indica* que se cultiva ampliamente por sus tallos y frutos comestibles (Inglese *et al.*, 2002). En la actualidad varios países de América y de la región del Mediterráneo son productores de estas magnificas plantas, algunas son cultivadas en viveros para consumo humano, por ejemplo algunos frutos de *Hylocereus* spp., *Pereskia lychnidiflora*, *Selenicereus setaceus* y *Stenocereus* spp. (Nerd *et al.*, 2002).



*Pereskia lychnidiflora*



*Echinocactus grusonii*



*Opuntia robusta*



*Lophophora williamsii*



*Hylocereus undatus*



*Mammillaria herrerae*

**Figura 3.** Algunas especies de cactáceas utilizadas en alimentación, medicina y ceremonias culturales.

En México también se emplean como cercos vivos para delimitar terrenos, tal es el caso de *Acanthocereus tetragonus*, *Stenocereus eichlamii*, *S. pruinosus* y *Pachycereus lepidanthus* en las regiones cálidas y secas, así como varias especies de los géneros *Nopalea* y *Opuntia* en el altiplano (Anzueto y MacVean, 2000; Véliz, obs. Pers.). Las flores de *Disocactus flagelliformis* (junco) en infusión, se utilizan en el centro de México para controlar problemas cardíacos. *Lophophora williamsii* (peyote) y *Echinopsis pachanoi* (cactus de San Pedro) son

los ejemplos más representativos de especies utilizadas en rituales por varios grupos de México y Perú respectivamente, aunque ambos son usados también en la medicina tradicional (Anderson, 2001). Los extractos de peyote también se han asociado con la estimulación del sistema nervioso central y la regulación de la presión arterial, el sueño, el hambre y la sed (Franco *et al.*, 2012 ). Sobre algunas especies de *Opuntia* se cultiva un insecto, *Dactylopius coccus* Costa (*Homoptera: Coccoidea*), conocida como cochinilla de la grana, la cual parasita la planta y produce ácido carmínico que se utiliza como colorante natural para teñir tejidos y alimentos (Arias y Véliz, 2006).

### Estatus de conservación de la familia Cactaceae



Los cactus experimentan una amplia gama de amenazas, los procesos predominantes responsables de la degradación, destrucción y/o deterioro de la biodiversidad; son la conversión de la tierra a la agricultura y la acuicultura, la recolección como recursos biológicos y el desarrollo residencial y comercial. La agricultura es la amenaza más extendida para los cactus, que afecta a especies en grandes partes del norte de México, Mesoamérica y la parte sur de Sudamérica. Los cactus en las costas áreas, como la península de Baja California en México y el Caribe, se ven afectados principalmente por el desarrollo residencial y comercial. Áreas donde los tres procesos de amenaza actúan juntas son a menudo regiones que albergan las concentraciones más altas de especies amenazadas, como el centro de México y el este de Brasil (Fig. 4).

*Figura 4.* Distribución geográfica de los tres procesos de amenaza más comunes. Verde, agricultura/acuicultura; rojo, sobreexplotación; y azul, desarrollo residencial/comercial. Estos colores cambian a medida que las amenazas se combinan, volviéndose blancas cuando existen los tres. Cuanto más brillante sea el color, mayor será el número de especies afectadas por esa amenaza en particular. El negro corresponde a áreas donde los tres valores de amenaza son bajos. Imagen por: Goettsch *et al.*, 2015.

Los impulsores inmediatos son la recolección sin escrúpulos de plantas y semillas vivas para el comercio hortícola y para colecciones ornamentales privadas (que afectan al 47% de los cactus amenazados), ganadería en pequeña escala (31%) y agricultura anual en pequeña escala (24%) (Goettsch *et al.*, 2015; Salafsky *et al.*, 2008). Su desaparición conlleva a un

proceso de empobrecimiento biológico y a la pérdida de recursos útiles para las poblaciones humanas (Arias *et al.*, 2005).

### Marcos legales para protección y aprovechamiento de las cactáceas

Las cactáceas y la regulación de su extracción es competencia directa de dos leyes federales: la Ley General de Vida Silvestre (LGVS) y la Ley General de Desarrollo Forestal Sustentable (LGDFS), así como de 11 normas oficiales mexicanas (NOM). Indirectamente, la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) plantea modalidades particulares para los aprovechamientos de PFNM en bosques tropicales, en áreas protegidas o para las especies en peligro de extinción, amenazadas, raras o con protección especial (Ahumada, 2003; Anta Fonseca y Carabias, 2008).

Estas leyes y catálogos ofrecen un marco legal para la protección, el aprovechamiento y el comercio de la flora silvestre nativa. Según la NOM-059-SEMARNAT-2010 para cactáceas, enlista 270 taxones, la Convención sobre Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre, enlista 41 taxones en el Apéndice I (especies sobre las que se cierne el mayor grado de peligro entre las especies de fauna y de flora) y el resto de ellas están consideradas dentro del Apéndice II (especies que no están necesariamente amenazadas de extinción pero que podrían llegar a estarlo a menos que se contrale estrictamente su comercio) y el Libro Rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza incluye 66 taxones, con 415 especies en alguna categoría de riesgo; 139 en la categoría Vulnerable (9.4%), 177 en la categoría de Peligro de Extinción (11.98%), 99 en la categoría de Peligro Crítico (6.7%) y 2 (0.1%) como posiblemente extintas en la naturaleza. Esto quiere decir que ya no se podrían recuperar y que el ser humano perderá oportunidades de obtener recursos naturales además del desbalance en el equilibrio ecológico que sufrirá su hábitat.

Un género seriamente afectado y nombrado por la SEMARNAT (2010) es *Mammillaria* Haw., el cual enlista 57 especies en alguna categoría de riesgo. Este se compone de aproximadamente 163 especies de las cuales el 90% son endémicas de México. Hernández y Gómez (2011) reportaron que dentro del género *Mammillaria* el 31% de las especies se encuentran bajo alguna categoría de amenaza, el 9% críticamente amenazadas, 11.6% amenazadas y 10.3% son vulnerables.

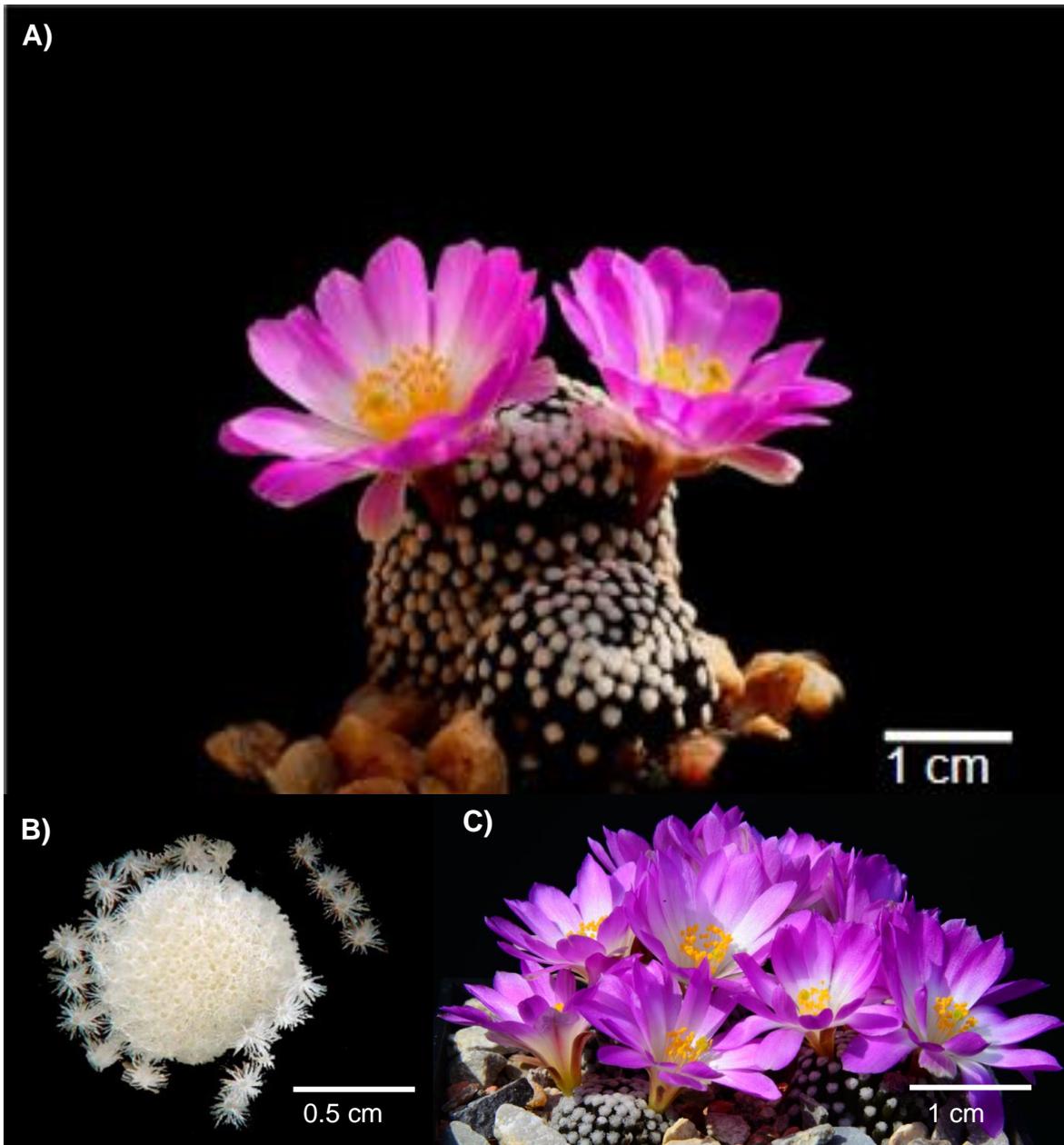
El género *Mammillaria* tiene una amplia distribución abarcando países como Estados Unidos, México, Guatemala, Honduras, Colombia, Venezuela y las Antillas (Flores y Medina, 2010). Según Bracamonte (2015) es uno de los géneros de cactáceas más llamativos por la forma de sus tallos y sus flores conspicuas. Estas características han sido un factor para que la especie como *Mammillaria pectinifera*, *M. herrerae*, *M. bocasana*, *M. mathildae* y entre ellas *Mammillaria luethyi* se encuentren en grave riesgo de extinción.

## Descripción morfológica de *Mammillaria luethyi*

Los tallos son simples o ramificados, con hasta aproximadamente 7 u 8 individuos, que forman racimos planos en el sustrato a poca profundidad. El ápice es redondeado a aplanado, ca. 1.5 cm de diámetro como máximo (Fig. 5). La raíz es tuberosa, con forma afilada y succulenta que se originan en su base, y tienen un diámetro de ca. 6 mm en su origen. Los podarios ascendentes son densos, muy delgados, cilíndricos, de hasta 5.5 mm de largo y 1.3 mm de diámetro, de color verde oscuro con una base rojiza o blanquecina, volviéndose caducifolios en la parte subterránea del tallo. Las axilas están desnudas. Las aréolas contienen algunas espinas hialinas y hasta 80 (hasta 100 según Cutak, 1952) espinas blancas diminutas (Fig. 6B). Este carácter de “columna vertebral”, único en *Cactaceae*, en microscopio la aréola parece un conjunto de estrellas. Las flores son de hasta 3 cm de largo y ancho, el doble del diámetro del tallo, color magenta (Fig. 6A) y se han reportado flores blancas (Janeba, 2017). El fruto está casi completamente hundido en el tallo, es seco y globular, de 4.5 mm de diámetro, de color verde amarillento a verde rojizo, y contiene hasta 15 semillas. Las semillas son negras, globulares, ca. 1 mm de largo y ancho, con una testa finamente picada. El hilo basal está ligeramente separado por un cuello débil, la región del hilio y el micropilo es irregularmente ovalada, de 0.8 mm de largo y 0.4 mm de ancho (Cutak, 1952; Hinton, 1996; Luthy y Hinton, 1998; Janeba, 2017)..



*Figura 5.* Una comparación de un espécimen *Mammillaria luethyi* A) más grande que la moneda de 25 centavos, (quarter) de EE. UU. Que mide 25 mm (1 pulgada). Fotografía por: Janeba (2017); B) PH914.06 con una moneda de 1 peso 21 mm de diámetro de escala. Fotografía por: Hoxey, 2012.

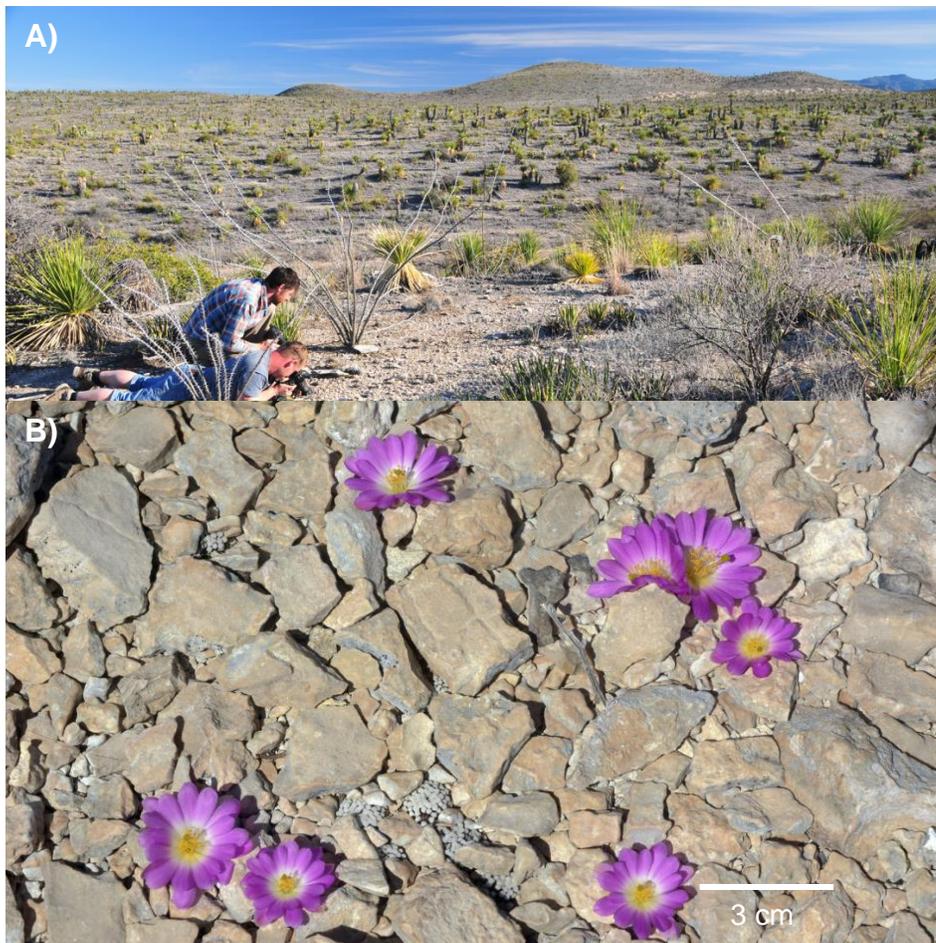


*Figura 6.* Ejemplares adultos de *Mammillaria luethyi* que muestra los caracteres morfológicos. A) planta completa, B) Aréola; fotografía por: <http://www.nelocactus.org/luethyi.html> C) Ejemplares de *M. luethyi* formando una colonia.

## Distribución geográfica de *M. luethyi*

Su hábitat natural es el desierto árido de Coahuila de Zaragoza, México de donde es endémica (Figura 7) (Guzmán *et al.*, 2003). Crece en una capa superficial de sustrato en losas planas de piedra caliza entre la grava caliza gruesa de caliche (una palabra española, originaria del latín *calx*, que significa cal), se refiere a una corteza secundaria endurecida de carbonato de calcio dentro o sobre suelo pedregoso, las cuales carecen de vegetación más alta y solo cactus como *Epithelantha micromeris* y *Neolloydia conoidea* a menudo se puede ver creciendo junto a *M. luethyi* (Janeba, 2017).

Las plantas crecen casi completamente hundidas en un sustrato de solo 1.5-2.0 cm de profundidad, de arcilla arenosa y grava fina, junto con *Selaginella wrightii*, *Neolloydia conoidea*, *Bouteloua gracilis* y líquenes. Los microhábitats están rodeados de vegetación típica del desierto chihuahuense, dominada por *Agave lechuguilla*, *Dasylyrion* sp., *Yucca elata*, *Yucca* sp., *Fouquieria splendens*, *Escobaria tuberculosa* y *Glandulicactus uncinatus* (Lüthy y Hinton, 1998). La imagen no está citada en el texto



*Figura 7.* A) Vista del hábitat de *Mammillaria luethyi*. Uno tiene que bajar al suelo para observar los diminutos cactus, fotografía por Janeba, 2017, B) Acercamiento a flores que pertenecen a *M. luethyi* en su hábitat natural. Foto Richard Kalas.

## Descubrimiento de *M. luethyi*

*M. luethyi* fue descrita por George S. Hinton y Jonas Lüthy en 1996, sin embargo, la historia de esta especie comienza en algún lugar del norte de Coahuila, México, a principios de la década de 1950. Un buscador de minas nativo encontró las pequeñas plantas y llevó algunas de ellas a Ciudad Acuña, ciudad fronteriza ubicada justo al lado del Río Bravo. Donde se las dio a una señora que operaba el Hotel Crosby, ella las guardaba en una lata de café junto a una ventana del hotel. Más tarde, Norman H. Boke (1913-1996), un histólogo especializado en la morfología de las *Cactaceae* tomó varias fotos Kodachrome de estas plantas y las envió para su identificación a su amigo Ladislaus Cutak del Jardín Botánico de Missouri en St. Louis (Janeba, 2017).

Cutak (1952) fue el primero en publicar una breve descripción de las plantas, en la que informó algunos de los detalles mencionados anteriormente. No colocó este enigmático cactus en ningún género conocido, sino que lo comparó con *Turbincarpus valdezianus*, al que se parece superficialmente. Cutak describió con precisión los caracteres únicos de la “columna vertebral”, vio debajo de la lente un patrón de encaje centelleante y llamó a la planta uno de los cactus más pequeños y delicados que existen.

Backeberg (1959) publicó primero unas fotografías, tanto de Boke como de Cutak. Nombró la planta provisionalmente bajo *Neogomesia* debido a sus tubérculos delgados con puntas de lana, que interpretó a partir de las imágenes.

Glass y Foster (1978) fueron los primeros en suponer correctamente la identidad de la planta como *Mammillaria*. Para ese momento, se habían descrito varias especies enanas nuevas y similares de *Mammillaria*: *M. saboae* (1966), *M. theresae* (1967) y *M. goldii* (1968).

Bravo y Sánchez (1991) al girar la imagen 90° “convirtieron” la desconocida *Mammillaria* en *Normanbokea valdeziana* en su hábitat cerca de Ciudad Acuña, Coahuila. Böcker (1995) comparó las ilustraciones de Backeberg (1961) con *Mammillaria sanchez mejoradae* González, una nueva especie descrita en Nuevo León (González, 1992). Encontró similitudes cercanas y sospechó que las dos plantas podrían ser los mismos taxones. Brächet y Lacoste (1995) estuvieron más cerca, señalando diferencias entre la descripción proporcionada por Cutak (1952) y la descripción de *Mammillaria sanchez-mejoradae* y concluyendo que dos especies estaban involucradas.

En mayo de 1996 George S. Hinton y Jonas Lüthy emprendieron en busca de *M. luethyi*. Jonas estudió el mapa de Coahuila para buscar Ciudad Acuña. *Encontramos en su hábitat natural la planta que se había visto crecer por primera vez en la lata de café en el Hotel Crosby en Ciudad Acuña, una Mammillaria realmente extraordinaria y pequeña con brillantes aréolas blancas, que se correspondía perfectamente con las fotografías de Boke y Cutak*” (Lüthy y Hinton, 1998).

## Estatus de conservación de *M. luethyi*

*Mammillaria luethyi* se encuentra en peligro de extinción, una de las principales causas es la colecta ilegal de individuos, la fragmentación de su hábitat vista en la disminución de los matorrales y áreas rocosas, el bajo número de individuos en sus poblaciones (aunque se ha especulado que existen poblaciones grandes con más de miles (Lüthy 2007), no existe un estudio ecológico formal que verifique esto), su lento crecimiento y su distribución restringida a los desiertos de Coahuila. Según la UICN es nombrada VU (vulnerable), en la NOM-059: P (Peligro de extinción) y CITES la coloca en el apéndice II.

Cabe recalcar que *M. luethyi* al ser tan codiciada por coleccionistas, llegó a alcanzar un precio máximo por individuo en el mercado negro de cactáceas mexicanas de 1000 dólares y el precio por individuo en viveros comerciales de Estados Unidos, Alemania, Inglaterra, Italia y Tailandia anunciado en sitios de internet en el año 2005, fue de 8-25 euros (Hernández, 2006). Actualmente su precio oscila entre los 300-660 MXN (UHLIG, 2019) y su demanda ha disminuido.

Las primeras plantas extraídas de *M. luethyi* que llegaron a colecciones europeas como en República Checa, se han propagado por medio de injertos (Lüthy, 2007; Janeba, 2017), a pesar de que es un método lento y que no siempre es exitoso ha sido el más utilizado dado que la propagación artificial de la semilla es difícil debido a la incompatibilidad entre individuos, ya que muchas de las plantas obtenidas fueron propagadas a partir de clones. Varios viveros en México han intentado hacer arreglos para exportar plantas cultivadas y semillas de *M. luethyi* al Reino Unido. Sin embargo, la importación ha sido imposible de aprobar sugiriendo que han sido obtenidas en México sin licencias válidas de la CITES (Fitz y Fitz, 2000).

A pesar del esfuerzo de conservación y propagación por métodos convencionales *M. luethyi* continua bajo amenaza constante. Por ello es necesario tomar esfuerzos para la conservación *ex situ* e *in situ* de *M. luethyi*. Un método más prometedor para su crecimiento y desarrollo es la propagación de la especie por medio de herramientas biotecnológicas como el Cultivo de Tejidos Vegetales, el cual podría producir suficientes individuos para cubrir la demanda de una especie tan cotizada y con demanda doméstica e internacional (Robbins, 2003)

El Cultivo de Tejidos Vegetales recientemente se ha utilizado como una excelente herramienta para la propagación de especies comerciales económicamente demandantes, conservación de especies amenazadas y como alternativa para el aprovechamiento de especies agrícolas en sectores industriales (Pérez *et al.*, 1998). Por ello es una alternativa viable para el estudio y la conservación de *M. luethyi*.

## Cultivo de Tejidos Vegetales

Cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un término amplio que se refiere al cultivo de cualquier parte de una planta (células, tejidos u órganos) en medios artificiales, en condiciones asépticas y en entornos controlados. Este conjunto de técnicas surgió como un enfoque experimental para demostrar la teoría celular, donde se establece que todos los organismos vivos están constituidos por células, las unidades básicas de estructura y reproducción, además de ilustrar el concepto de totipotencialidad, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul, 2000; Haberlandt, 1902).

### Algunas aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales

El CTV es un componente esencial de la biotecnología vegetal, es ampliamente utilizado en: la obtención de plantas libres de enfermedades, por ejemplo, el cultivo de meristemos apicales para obtener plantas libres de patógenos, cabe resaltar que en la mayoría de los casos el porcentaje de plantas libres del problema en cuestión fluctúa entre 20 y 80%, al obtener una sola planta “limpia” es suficiente, pues ésta se puede propagar. Knauss (1976) utilizó yemas de 1 mm y obtuvo plantas de *Dieffenbachia picta* libres de hongos y bacterias. Herramientas como la termoterapia, inhibición viral natural e inducida son herramientas del cultivo *in vitro* adicionales para lograr plantas libres de patógenos (Hernández *et al.*, 2010). La propagación rápida de plantas que son difíciles de propagar, por ejemplo, especies forestales leñosas tales como: Acacias (*Acacia mangium*), algarrobo indio (*Ceratonia siliqua* L.), cedros (*Cedrela odorata* L.), pino de Mayarí (*Pinus cubensis* Griseb.) y caobas (*Khaya nyasica*) (Jiménez y Agramonte, 2013). Otro gran uso es la hibridación somática que ha sido ampliamente utilizada en la mejora genética de las plantas comerciales y más aún en el caso de los cítricos como la mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.), el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) y el Limón (*Citrus limon* L.) (Hernández *et al.*, 2010).

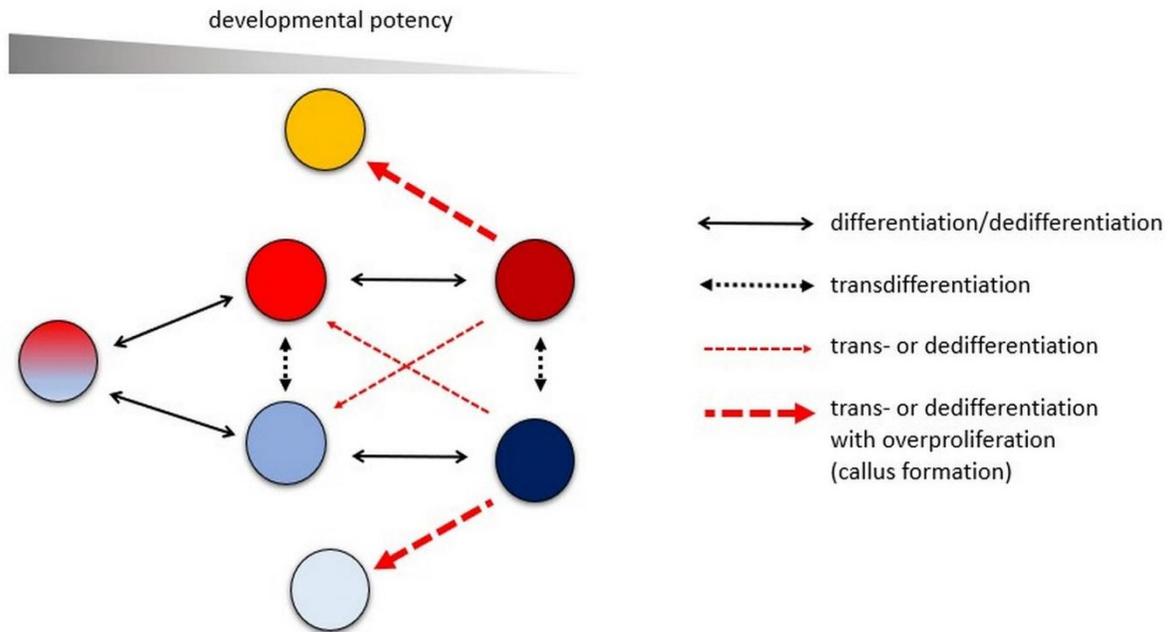
El cultivo *in vitro* de células y órganos vegetales ofrece alternativas para tratar de lograr la conservación de genotipos en peligro (Sengar *et al.*, 2010), como el grupo de las cícadas por ejemplo *Dioon merolae*, *Zamia incognita*, el grupo de las cactáceas *Astrophytum asterias*, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Echinocactus grusonii* entre otras (Cabrera *et al.*, 2008; Gaona, 2018; González, 2006; Mohemius, 2003; Urrea y Naranjo, 2012). Los protocolos de cultivo de tejidos pueden usarse para la preservación de los tejidos vegetativos cuando los objetivos para la conservación son clones en lugar de semillas, para mantener el fondo genético de un cultivo y evitar la pérdida del patrimonio conservado debido a desastres naturales, ya sea estrés biótico o abiótico (Tyagi *et al.*, 2007). Las especies de plantas que no producen semillas (plantas estériles) o que tienen semillas recalcitrantes como el aguacate (*Persea americana*), mango (*Mangifera indica*), cacao (*Theobroma cacao*), algunos árboles

hortícolas, plantas acuáticas, como *Nymphaea caerulea* y varias plantas utilizadas en medicina tradicional, como especies de *Viola* y *Pentaclethra* que no pueden almacenarse durante un largo período de tiempo pueden conservarse con éxito mediante técnicas *in vitro* para el mantenimiento de bancos de genes. La criopreservación desempeña un papel vital en la conservación *in vitro* a largo plazo de material biológico esencial y recursos genéticos (Hussain *et al.*, 2012).

## Morfogénesis

El Cultivo de Tejidos Vegetales se ha convertido desde hace décadas en una alternativa para la propagación vegetativa de las plantas. Para poder llevarlo a cabo es necesario un cambio en el proceso morfogénico habitual. Este proceso se realiza en el material vegetal llamado explante y consiste en generar células competentes que sean capaces de responder ante condiciones ya sea de luz, humedad, temperatura, nutrientes en el medio de cultivo o en especial a Reguladores de Crecimiento Vegetal y así poder inducir a estas células a la formación de alguna estructura vegetal. Estas dos fases son conocidas como desdiferenciación y rediferenciación (*Fig. 8*). En la primera, la célula vegetal debe revertir su estado celular y volverse competente para expresar su potencial organogénico. Hay dos patrones para la etapa inicial de diferenciación, en el patrón directo las células específicas del explante se vuelven directamente competentes para la formación de órganos. En el patrón indirecto hay una etapa intermedia de división celular (callo) en la que estas nuevas células se vuelven competentes. Las células competentes pueden entonces responder a un tratamiento de inducción y progresar hacia la formación de un órgano. Una vez que se adquiere el destino específico de este órgano las células se consideran determinadas para pasar a la fase de re diferenciación de la organogénesis u embriogénesis somática y producir el nuevo órgano o embrión somático respectivamente. Si bien, es cierto que todas las células son totipotenciales, no todas las células son competentes para seguir alguna vía de desarrollo (Geneve, 2010).

Klerk (2009) menciona que las células somáticas diferenciadas que se encuentran en una etapa avanzada del ciclo ontogenético pueden reiniciar el programa de desarrollo y dar lugar a brotes, raíces o embriones adventicios. Este fenómeno se llama regeneración y se refiere a la formación de nuevos órganos a partir de células somáticas. La formación de brotes adventicios (caulogénesis) y raíces (rizogénesis) se especifica con el término organogénesis adventicia, mientras que la embriogénesis somática se refiere a la formación de embriones adventicios (somáticos). La regeneración ocurre con frecuencia durante la vida natural de las plantas, pero se puede lograr con frecuencias muy altas en el cultivo de tejidos.



**Figura 8.** Las diversas vías de diferenciación que puede seguir una célula vegetal y la terminología utilizada para describirlas. La diferenciación generalmente se asocia con una desdiferenciación disminuida con una mayor potencia de desarrollo. En sentido estricto, la desdiferenciación solo puede tener lugar dentro del mismo linaje evolutivo y puede considerarse como la reversión de la diferenciación. La transdiferenciación se utiliza para describir los cambios en el destino celular independientemente de la potencia del desarrollo. Sin embargo, en biología vegetal, la transdiferenciación que conduce a una mayor potencia de desarrollo a menudo se denomina desdiferenciación, especialmente durante la formación de callos. La formación de callos no es un paso atrás en el linaje de desarrollo, sino el resultado de la sobreproliferación / transdiferenciación de células diferenciadas. Obtenido de Fehér (2019).

Haberlandt (1854-1945), pionero en el CTV reconoció la importancia de los RCV como auxinas y citocininas para la proliferación celular *in vitro* ya que la proporción de RCV determinará la vía morfogénica que el cultivo *in vitro* seguirá. Proporciones altas y bajas de citocinina a auxina favorecen la regeneración de brotes y raíces, respectivamente, mientras que concentraciones más equilibradas dieron como resultado un crecimiento desorganizado de callo (Skoog y Miller, 1957).

La morfogénesis y los fenómenos relacionados al desarrollo y diferenciación para propagar plantas vegetativamente pueden seguir tres vías, que son ampliamente utilizadas en el cultivo de tejidos (*Fig.9*):

□ Organogénesis:

Se refiere a la formación de órganos vegetales, es decir, brotes, hojas, flores y raíces, a partir de un determinado tejido con el fin de formar plantas completas, caracterizadas por ser polares, es decir, que solo se emite un órgano aéreo o raíz y de éste se regenera una nueva planta completa.

La organogénesis puede ser *directa* cuando el brote organogénico se obtiene directamente de los explantes o puede ser *indirecta* en caso de que el órgano generado surja a partir de un conjunto de células previamente formadas llamadas *callo*. La cual se ha descrito como una masa celular no organizada e indiferenciada de células proliferativas a partir de células vegetales, tejidos u órganos aislados. Un concepto más reciente afirma que las células vegetales no se vuelven a desdiferenciar, sino que el callo se forma a partir de células madre preexistentes (Efferth, 2018).

En las plantas, la desdiferenciación (*Fig. 8*) está fuertemente asociada con la formación de callo, ya que el callo se considera ampliamente como una masa en proliferación de células desdiferenciadas (indiferenciadas). El término “desdiferenciación” está profundamente arraigado en la terminología de la ciencia vegetal. En el contexto de la biología vegetal, se puede definir como un tipo de transdiferenciación que conduce a una mayor potencia de desarrollo y/o proliferación celular. La desdiferenciación en sentido estricto es la reversión de la diferenciación, pero la formación de callo no lo es, ya que la célula diferenciada no se formó a partir de un callo. La formación de callos puede considerarse más bien como un tipo de transdiferenciación (Fehér, 2019; Sugimoto *et al.*, 2011).

El callo es el resultado de la reprogramación celular-tisular debido a condiciones que prevalecen sobre las limitaciones de diferenciación celular-tisular (gradientes hormonales, regulación de la cromatina, bloqueo de la división celular, etc.). El callo solo se puede considerar como células “desdiferenciadas” si se considera la definición específica anterior para la desdiferenciación. Los callos de diversos orígenes pueden expresar una amplia variedad de genes que los discriminan, especialmente en las primeras fases de su desarrollo. A pesar de que los callos se pueden formar a través de varias vías iniciales, estos parecen estar establecidos y caracterizados por una red de factores de transcripción que facilitan el cambio y la regeneración del destino celular. En base a esto, el callo son células transitorias, similares al blastema de los animales, pero puede mantenerse durante mucho tiempo en condiciones artificiales (Sugimoto *et al.*, 2011; Fehér, 2019).

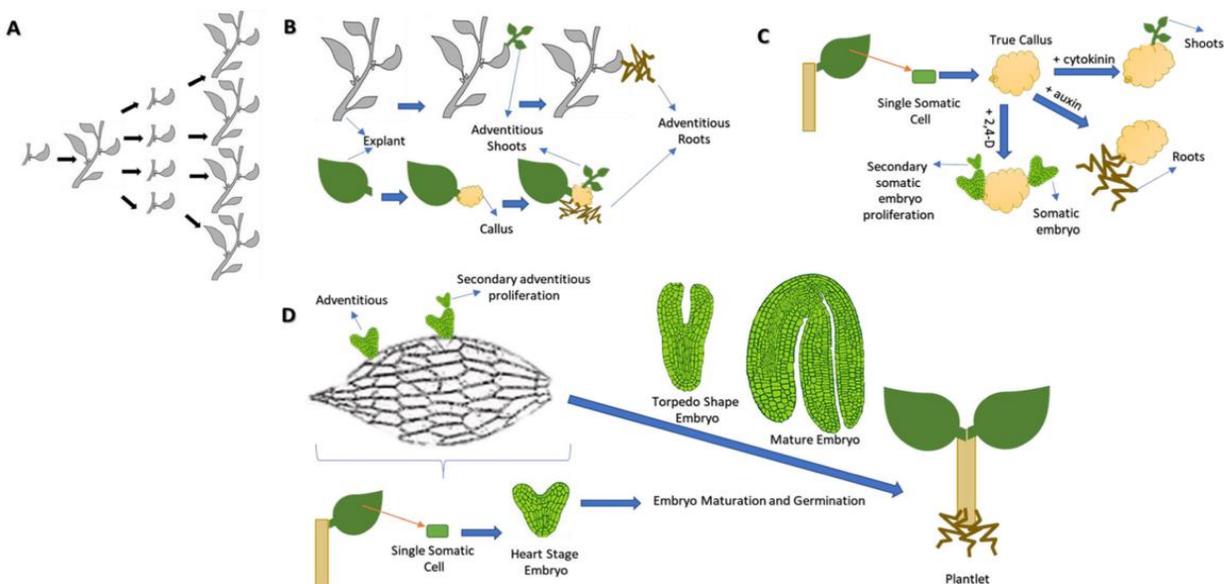
La regeneración de las plantas a través de la organogénesis implica la producción de callos y la diferenciación de meristemos adventicios en órganos al alterar las condiciones del cultivo como por ejemplo, la concentración de reguladores de crecimiento vegetal en el medio nutritivo. Skoog y Miller (1957) fueron los primeros en demostrar que una alta proporción de citocinina a auxina estimulaba la formación de brotes en el callo del tabaco, mientras que una alta proporción de auxina a citocinina inducía la regeneración de la raíz (García *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2012; Phillips y Garda, 2019; Vijaya y Giri, 2003).

#### □ *Multiplicación por activación de yemas preformadas*

Las yemas axilares están presentes en el eje de las hojas. En el cultivo de tejidos, mediante el balance en la concentración de citocinina o una combinación de citoquinina y auxina, se

puede romper la latencia de los brotes axilares. Una vez que se rompe la latencia, se convierten en brotes (Sharma *et al.*, 2015).

Dependiendo del tejido de la planta que se cultive, podemos referirlos como cultivo celular (células gaméticas, suspensión celular y cultivo de protoplastos), cultivo de tejidos (callos y tejidos diferenciados) y cultivo de órganos (cualquier órgano como embriones cigóticos, raíces, brotes y anteras, entre otros). Cada tipo de cultivo se utiliza para diferentes aplicaciones básicas y biotecnológicas (Loyola y Ochoa 2018).



*Figura 9.* Esquema de las vías organogénicas *in vitro* (A) Modo de ramificación axilar, por meristemos preformados; (B) Organogénesis indirecta, origen a órganos de brotes o raíz; (C) Organogénesis indirecta partir de callo, ilustrado para el modo de organogénesis (brotes, raíces) y para el modo de embriogénesis somática a través del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (no entiendo a qué se refiere con el “modo” organogénesis y “modo” embriogénesis); (D) Origen adventicio del modo de embriogénesis somática.

□ *Embriogénesis somática:*

Es la producción de embriones a partir de células vegetales somáticas (cualquier célula no sexual) para obtener una planta completa. En comparación de la organogénesis, es un proceso bipolar, donde los órganos aéreos y las raíces de las plantas se obtienen del mismo embrión somático. El proceso de embriogénesis somática también puede ser directo o indirecto, si el proceso se origina en los explantes iniciales o en un callo previamente inducido. La embriogénesis somática consta de cuatro etapas fundamentales: A) Inducción de callos; B) Formación y proliferación de embriones; C) Maduración del embrión; y D) Germinación de embriones. Al mismo tiempo, existen cuatro etapas de desarrollo morfológico empezando por la forma globular, la forma del corazón, el torpedo y las formas cotiledonarias. Cada una de las etapas de la embriogénesis somática, al igual que las diferentes etapas del desarrollo normal del embrión, dependen de la especie y de los genotipos que se estén cultivando (Ammirato, 1983; García *et al.*, 2010). La diferencia entre la embriogénesis cigótica y la

embriogénesis somática radica en que en ésta son clones genéticamente idénticos al explante del que provienen (Lema y Kulus, 2014).

## **Etapas de la Micropropagación**

La micropropagación es una de las técnicas más populares de CTV. Consiste en multiplicar rápidamente el material vegetal para producir una gran cantidad de plantas de progenie, utilizando el CTV. Este proceso consta de cinco etapas que son fundamentales para asegurar la micropropagación del material vegetal.

### Etapa 0: Selección de las plantas madres

Requiere un mantenimiento adecuado de las plantas madres en el invernadero en condiciones libres organismos patógenos que puedan afectar a la planta madre. Las condiciones de invernadero deben ser cerradas y limpias, para proporcionar a las plantas una alta calidad con una infección mínima. La recolección de explantes se realiza después del pretratamiento apropiado de las plantas madre con fungicidas y pesticidas para minimizar la contaminación en los cultivos *in vitro*. Esto mejora las tasas de crecimiento y multiplicación, sin embargo esta etapa no es obligatoria. La elección del explante depende de los objetivos del estudio, el estado de desarrollo del explante, el medio de cultivo y los RCV (González *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2015).

### Etapa I: Establecimiento aséptico de los cultivos.

El explante se desinfecta superficialmente y se transfiere a un medio nutritivo. En general, se sugiere la aplicación combinada de productos bactericidas como antibióticos y fungicidas. La selección de productos depende del tipo de explante a introducir. La desinfección superficial del explante en soluciones químicas (desinfectantes) es un paso clave para eliminar contaminantes con un daño mínimo a las células vegetales (Husain y Anis, 2009). Los cultivos se incuban en la cámara de crecimiento en condiciones de luz u oscuridad de acuerdo con el método de propagación.

### Etapa II: Multiplicación del tejido

En esta etapa se realiza la propagación a partir de los explantes ya establecidos asépticamente en la etapa 1. Se elige la vía morfogénica a seguir ya sea, organogénesis, embriogénesis somática o a partir de yemas preformadas. Una vez iniciada se aumenta la tasa de multiplicación y se obtiene un gran número de plantas. Para favorecer la multiplicación del tejido se emplean medios nutritivos con RCV principalmente auxinas y citocininas. Periódicamente se realizan subcultivos para renovar el medio de cultivo y propiciar el recambio de atmósfera. El número de plantas que se obtiene por CTV permite alcanzar incrementos exponenciales si se optimizan factores que afectan el crecimiento como luz, temperatura, pH, potencial osmótico etc.

### Etapa III: Elongación y enraizamiento

Consiste en lograr la individualización los brotes previamente obtenidos, para ello es necesario la elongación y la formación de raíz ya que esto da paso a la constitución de una plántula la cual favorecerá su posterior aclimatización a las condiciones *ex vitro*. La etapa de enraizamiento puede ocurrir simultáneamente en los mismos medios de cultivo utilizados para la multiplicación de los explantes. Sin embargo, en algunos casos se puede cambiar la combinación, concentración y/o tiempo de inducción del medio de cultivo y de los reguladores de crecimiento vegetal. Existen especies que generan raíces en el mismo medio donde se desarrollan sin necesidad de alguna inducción.

### Etapa IV: Endurecimiento y aclimatización de plántulas

Fisiológicamente las plantas *in vitro* tienen características diferentes a las plantas habituadas a un ambiente *ex vitro*. Las plantas producidas en cultivo de tejidos son mixotróficas puesto que a pesar de tener cloroplastos, no llevan a cabo el proceso completo de fotosíntesis, tienen una cutícula semidesarrollada con ceras reducidas y estomas poco funcionales. Por ello en esta etapa se requiere un manejo cuidadoso de las plantas, el trasplante de condiciones completamente controladas debe ser gradual para que las plantas puedan sobrevivir en las condiciones del campo y puedan aclimatizarse. Dentro de los recipientes de cultivo, la humedad es muy alta, por lo tanto, inmediatamente después de la transferencia, las plantas se deben mantener bajo alta humedad y deben colocarse en un sustrato estéril que permita su desarrollo (González *et al.*, 2012; Hussain *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2015).

## **Medio de cultivo**

Los medios utilizados en el cultivo de tejidos vegetales son de vital importancia, ya que contienen componentes nutricionales, que son esenciales para el crecimiento y desarrollo del tejido cultivado. El funcionamiento del cultivo de tejidos depende en gran parte de los tipos de medios de cultivo utilizados (Datta, 2019).

En la actualidad existen innumerables formulaciones, en cada una se encuentran entre 15 y 35 compuestos químicos que se suministran. La fuente de carbono se adiciona debido a que pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, por lo que es necesario agregar al medio una fuente de carbono. Comúnmente se utiliza sacarosa (2% a 5%) y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructosa. Los nutrientes minerales tales como macronutrientes (N, P, K, Mg y S) y micronutrientes (Fe, Na, Cl, Mn, Cu, Zn, I, B y Mo) son subministrados para el crecimiento y desarrollo de células, tejidos y órganos en las plantas. En los medios de desarrollo reciente (B5, N6) es destacable las variables relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno se suministra en forma de nitrato y amonio (Inorgánico) y otras fuentes de nitrógeno incluyen glutamina, urea y caseína hidrolizada (orgánico). Los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre en compuestos de 1 a 3 mM. La adición

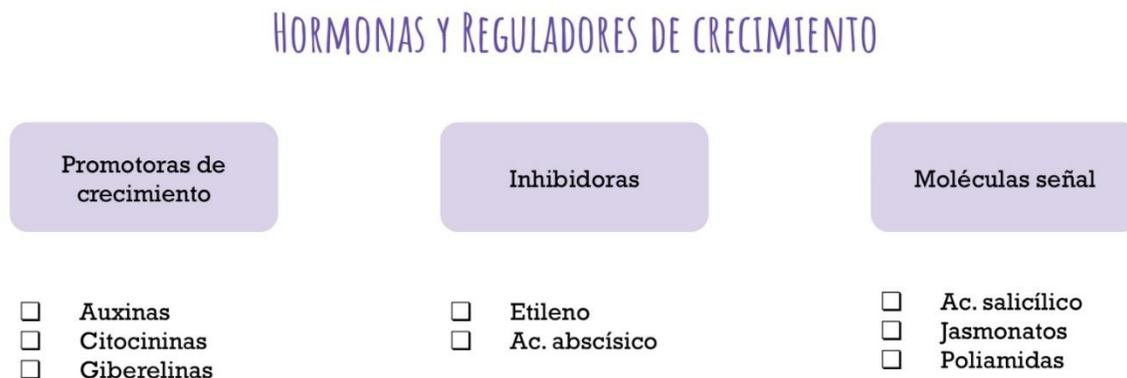
de hierro con un agente quelante (Na, EDTA) lo hace disponible aunque puede que otros elementos no lo estén. Si bien los medios de cultivo contienen varias vitaminas, en general sólo es esencial la incorporación de tiamina, aunque también se adicionan piridoxina, ácido nicotínico y mioinositol. Los agentes gelificantes, como los diferentes tipos de agares, agarosa, goma gellan o alginato de calcio, tienen efectos distintos sobre las respuestas de los cultivos de tejidos vegetales. Cuando se trata de una preparación media, el principio más importante es la consistencia, se adiciona de 0.6% a 1.0%. En algunos casos se encuentran en los cultivos *in vitro* las respuestas deseadas mediante el empleo del Medio Basal sin reguladores de crecimiento. Scholten y Pierik (1998) Mencionan que el estrés hídrico se encuentra muy relacionado con la concentración de agentes gelificantes. Una alta concentración de agente gelificante provoca un alto estrés hídrico que conduce a la dificultad de absorber agua y elementos del medio de cultivo. Tanto el tipo como la calidad de los agentes gelificantes también producen problemas relacionados con la hiperhidricidad y necrosis del tejido. Pueden producirse diferencias en la calidad de los agentes gelificantes de una marca a otra y de un lote a otro. No se sabe si se pueden seleccionar agentes gelificantes que tengan un buen comportamiento con todas las especies de plantas (T-chato, *et al.*, 2005). Sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario agregar al medio de cultivo sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o las citocininas (Mroginski y Roca, 1993; Phillips y Garda, 2019).

### **Medio de cultivo Murashige y Skoog**

El medio Murashige y Skoog Medium (MS) fue formulado originalmente por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962, durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal, para optimizar el sistema de bioensayo de callos de tabaco y para facilitar el estudio de citocininas. No es sorprendente que el medio basal de cultivo de tejidos vegetales más ampliamente utilizado sea el MS (ver apéndice 1) y modificaciones del mismo, como MS de concentración media. Sus aplicaciones van desde la micropropagación, cultivo de órganos, cultivo de callos y cultivo en suspensión. Su formulación es una mezcla de nutrientes de sales inorgánicas, vitaminas y aminoácidos. Murashige y Skoog (MS) adicionaron todos los macroelementos y microelementos esenciales. Por ejemplo, dihidrogenofosfato de potasio sirve como fuente de fosfato. Los microelementos como el boro, manganeso, molibdeno, cobre y zinc juegan un papel vital en el metabolismo de las plantas. El boro juega un papel clave en el metabolismo de los carbohidratos. La glicina sirve como fuente de aminoácidos. La tiamina, el ácido nicotínico, la piridoxina y el inositol actúan como cofactores enzimáticos en vías universales que incluyen la glucólisis y el ciclo del TCA junto con el metabolismo primario y secundario en las plantas (Phillips y Garda, 2019; Plantigen Himedia, 2017).

## Hormonas y reguladores de crecimiento vegetal

Una vez añadidos los nutrientes del medio de cultivo se pueden estimular nuevas respuestas de desarrollo mediante RCV tales como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno o ácido abscísico (Fig. 10). Para la mayoría de las aplicaciones, las auxinas y las citocininas son los reguladores de crecimiento más importantes (Datta, 2019).



*Figura 10.* Hormonas y reguladores de Crecimiento Vegetal. y los RCV de origen sintético y comúnmente producidos en laboratorios.

*Auxinas:* son hormonas producidas naturalmente en las plantas. Se sintetizan en ápices de tallos jóvenes, por lo tanto tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos. Presentan un movimiento basipétalo (descendente), estimulan la división y alargamiento celular tanto en yemas existentes como en la emergencia de yemas adventicias, también promueven el enraizamiento. En el CTV son ampliamente utilizadas como RCV (origen sintético) para estimular el crecimiento de callo, órganos, suspensión de células y para regular la morfogénesis (CENTA, 2018). El conjunto de citas de medios en 5 años (Herman, 2015) indicó que el NAA (15% de las citas) y el IBA (9% de las citas) son las auxinas más utilizadas, seguidas del 2, 4-D, IAA y PIC. La auxina natural, IAA, es sensible a la luz y se degrada fácilmente, mientras que las otras auxinas mencionadas son sintéticas, son más potentes en 10 a 1000 veces que las naturales y químicamente más estables. Comúnmente, NAA, IBA e IAA se usan en cultivos de multiplicación de brotes y en cultivos de enraizamiento. DCA, 2,4-D y PIC son herbicidas auxínicos y tienden a exhibir actividad a concentraciones más bajas que IAA, IBA y NAA. Cualquiera de estas auxinas puede usarse para estimular la proliferación de callos o células. Para la inducción de la embriogénesis somática, el 2,4-D se ha utilizado en muchas especies; sin embargo, en algunas especies, DCA y PIC también pueden usarse para inducir embriogénesis somática. El rango de aplicación de las auxinas es amplio, va desde concentraciones de 0.1 mg/l hasta 26 mg/L. El tiempo de inducción depende en gran medida del tipo de explante y su respuesta. En promedio se utiliza un periodo que va de 1 a 2 meses (CENTA, 2018).

*Citocininas:* Su biosíntesis se da principalmente en las raíces de las plantas de ahí son traslocadas hacia los brotes y hojas, tienen movimiento acropétalo (ascendente) y un efecto

en la citocinesis o división celular, de allí el nombre de citocininas. En el CTV promueven la división y la diferenciación celular, así como la modificación del dominio apical y diferenciación de brotes. También interactúan con auxinas en la formación de órganos como la floración; retarda, la senescencia, el rompimiento de la dominancia apical estimulando el desarrollo de tallos laterales y en el movimiento de nutrientes. Constituyen parte del ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) y de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y tienen interacción sinérgica con las auxinas. Cuando la proporción citoquinina/auxina es alta favorece la formación de tallos y si es baja favorece la formación de raíces (CENTA, 2018).

El conjunto de citas de medios en 5 años (Herman 2015) indicó que BA es la citocinina más utilizada (31% de las citas), seguida de la KIN (7.5% de las citas) ambas usadas en un rango de 1-10  $\mu\text{M}$ /0.1-2 mg/L (Beyl, 2011). El TDZ y 2-IP, se citaron con menos frecuencia (4% de las citas cada una). Las citocininas naturales como la ZEA son caras y químicamente menos estables que las versiones sintéticas, como la BA. TDZ se usa con más frecuencia en aplicaciones de plantas leñosas (Huetteman y Preece 1993); parece tener propiedades en común con las auxinas y las citocininas y se desarrolló originalmente como herbicida en virtud de su inhibición de la citoquinina oxidasa. El hemisulfato de adenina (ADE) se usa como un precursor de citoquinina y tiene una actividad débil de citocinina (Phillips y Garda, 2019).

*Etileno:* este gas ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ) se encuentra presente en la atmósfera y es considerado una molécula inhibidora ya que puede causar anomalías en el crecimiento de las plantas. Se reporta que es producido naturalmente y también puede actuar como una sustancia de crecimiento con algunas funciones reguladoras. Varias sustancias químicas relacionadas al etileno han sido sintetizadas. La más utilizada en cultivo de tejidos es el etefon (2-CEPA o ácido 2-cloroetilfosfónico). El etileno es producido por las células, tejidos y órganos. Alcanzan mayor proporción en medios sólidos que en medios líquidos o en agitación. Su producción es la misma tanto en la oscuridad como con iluminación. Cantidades de este gas son producidas por las plantas y se acumulan en el cuello de los frascos. La acumulación de esta molécula es suficiente para modificar la morfogénesis o desarrollo del explante (CENTA, 2018).

## Desordenes fisiológicos en el cultivo *in vitro*

Las plantas cultivadas *in vitro* son susceptibles al subcultivo y a las condiciones *ex vitro*, donde existe una alta mortalidad durante la etapa final de la micropropagación. Las plántulas se desarrollaron dentro de los recipientes de cultivo a bajos niveles de luz, condiciones asépticas, en un medio que contiene abundante azúcar y nutrientes para permitir el crecimiento heterotrófico y en una atmósfera con alta humedad relativa. En consecuencia a estas condiciones, las plántulas *in vitro* pueden desarrollar ciertas anomalías que son inconsistentes con el desarrollo en condiciones de invernadero o campo (Hazarika, 2006).

### *Variación somaclonal*

Se manifiesta como anomalías citológicas, mutación fenotípica cualitativa y cuantitativa frecuente, cambio de secuencia y activación y silenciamiento de genes. La activación de elementos transponibles quiescentes y retrotransposones indica que los cambios epigenéticos ocurren a través del proceso de cultivo. La activación epigenética de elementos de ADN sugiere además que los cambios epigenéticos también pueden estar involucrados en la inestabilidad citogenética a través de la modificación de la heterocromatina, y como base de la variación fenotípica a través de la modulación de la función génica. La observación de que los patrones de metilación del ADN son muy variables entre las plantas regeneradas y su progenie proporciona evidencia de que las modificaciones del ADN son menos estables en el cultivo que en las plantas cultivadas con semillas (Mohan, 2001).

### *Oxidación*

Se presenta en tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Es el daño generado por radicales libres resultado de un metabolismo y distintos componentes celulares, donde la oxidación se produce por la enzima Polifenol Oxidasa que cataliza compuestos fenólicos y produce quinonas, las cuales son altamente reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.*, 1996; Bray *et al.*, 2000). Esto puede crear un desbalance entre las reacciones pro-oxidación (generando un exceso de ROS y, o RNS o de naturaleza enzimática). Aunque no todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir (George, 1996; Ogita, 2005). Factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo y nitrosativo (Bray *et al.*, 2000; Pompeu *et al.*, 2008). Las afecciones morfológicas se pueden observar en el tejido vegetal como manchas de oscurecimiento.

Para su control se ha recomendado tomar medidas en etapas de establecimiento, disminuyendo la concentración de los agentes del desinfectante y el tiempo de inmersión. La aplicación de antioxidantes es una alternativa, ya que en su mayoría tiene un efecto positivo en la supervivencia de los explantes. Sánchez y Salaverría (2004) realizaron estudios para el control de la oxidación en cultivos de fresa, mostrando los mejores porcentajes de

supervivencia cuando utilizaron cisteína (4 g/L) en presencia de luz, seguido por el control sin luz y la mezcla de cisteína con ácido ascórbico y ácido cítrico.

### *Hiperhidricidad*

La hiperhidricidad anteriormente llamada vitrificación, es un trastorno morfológico y fisiológico de plantas propagadas por CTV. Las plantas hiperhídricas tienen una apariencia vítrea (Hazarika, 2006), los haces vasculares se encuentran abiertos en comparación a haces *ex vitro* que generalmente están cerrados para evitar o reducir la evaporación y mantener los cultivos asépticos, el ambiente *in vitro* crea condiciones químicas que afectan los procesos morfológicos y fisiológicos (Ogasawara, 2003).

Varios estudios demostraron que la hiperhidricidad depende de la disponibilidad de agua, el contenido de micronutrientes y el desequilibrio hormonal en el medio de cultivo (Doneso, 1987; Kataeva *et al.*, 1991). Por lo que entre las principales causas de la hiperhidratación está el potencial osmótico y la concentración de los componentes del medio de cultivo, por ejemplo, la concentración de agar (Cárdenas y Villegas, 2002). Aunque también el microambiente del recipiente de cultivo y la concentración de etileno dentro de éste, tienen un efecto prolongado sobre la hiperhidricidad (Hazarika, 2006).

El potencial osmótico es uno de los componentes del potencial de agua y su determinación se basa principalmente en el cambio de las propiedades físicas y químicas de éste, por la presencia de solutos. Al aumentar la concentración de la solución, la presión osmótica también aumenta, el punto de congelación desciende, la presión de vapor disminuye y el punto de ebullición aumenta (Larqué y Trejo, 1990). Según Pierik y Steegmans (1975), el crecimiento y organogénesis del cultivo *in vitro* se detienen si el potencial osmótico es más negativo que aproximadamente  $-3 \times 10^5$  Pa = -3 bar (= -0.3 MPa), porque se impide la absorción de agua. El medio de cultivo más empleado debido a su potencial osmótico es el Murashige y Skoog (1962), éste presenta potencial osmótico de -0.23 MPa de los macronutrientes y de -0.22 MPa de la sacarosa (Yoshida *et al.*, 1973), por lo que el potencial osmótico del medio combinado sería -0.45 MPa, que es uno de los más negativos comparado con el de White (1943) que es de -0.19 MPa.

Se ha estudiado que también la concentración total de las sales de un medio de cultivo puede determinar el potencial osmótico del medio (Pierik, 1990). Cardenas y Villegas (2002) demostraron que el potencial osmótico se hizo más negativo (-0.49 MPa) al aumentar la concentración de solutos en el medio, por ejemplo, las sales de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , (10 mM), demostrando así el impacto de estos macronutrientes sobre este factor en el medio y con ello su posible influencia en la hiperhidratación.

Los RCV también pueden inducir la formación de hiperhidricidad en cultivos de tejidos de varias especies. En *Ficus carica*, la adición de BA o  $\text{GA}_3$  en el medio de cultivo promovió la formación y el alargamiento de los brotes hiperhidratados (Fraguas *et al.*, 2004; Fraguas *et*

*al.*, 2009; Toth *et al.*, 2004; Ziv, 1991). Sin embargo, los autores informaron que era posible evitar esta respuesta complementando los medios con carbón activado. El cual se ha reportado, tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas ya que puede atrapar diferentes tipos de moléculas, sustancias químicas en exceso, entre estos los inhibidores de crecimiento. El carbón activado tiene una fina red de poros con una área interna amplia que permite la adsorción, lo cual permite favorecer a diferentes procesos de morfogénesis (Weatherhead *et al.*, 1978 y Vaca *et al.*, 2018).

Gaspar (1986) encontró que el nivel de etileno tenía un papel en la hiperhidricidad y describió la secuencia hipotética de reacciones que condujeron a este fenómeno. La inhibición del etileno de la organogénesis del brote se puede controlar agregando nitrato de plata, un inhibidor de la acción del etileno, a los medios de cultivo. Esto ha demostrado ser útil para reducir la hiperhidricidad en el cultivo de tejido de girasol.

Dependiendo del tipo de agente gelificante se puede inducir o disminuir la hiperhidricidad en el tejido vegetal (Debergh y Harbaoui, 1981). En principio, las propiedades físicas y químicas de los geles forman cadenas poliméricas que se acortan, se vuelven filamentosas, se entrecruzan, entrelazan, (proceso dinámico) que aumentan la viscosidad del sistema, reteniendo o disminuyendo en partículas de agua. Los geles forman una red de partículas atrapadas en la fase líquida donde el pH juega un papel fundamental, ya que a bajos valores de pH se disocia una pequeña proporción de grupos carboxílicos del polímero, formando una espiral flexible (más gelatinoso) o la adición de una base que produce la disociación de grupos carboxílicos, ionizándose y creando repulsiones electrostáticas, expandiéndose la molécula generando un gel más rígido (FQUNAM, 2019). De esta forma le confiere diferentes particularidades en el potencial hídrico que permitirán una mayor o menor toma de agua y nutrimentos al tejido, que se reflejará en las características fisiológicas y morfológicas del explante, causando hiperhidratación y necrosis (Chacón *et al.*, 2000; Cárdenas y Villegas 2002; Dobránszki *et al.*, 2011; Veitía *et al.*, 2012).

Ascencio *et al.* (2008) para disminuir la hiperhidricidad de los embriones somáticos de *Carica papaya* modificó la concentración de agar en el medio de germinación y la exposición de los embriones a diferentes fuentes de luz, y adicionó floridzina lo cual mejoró la recuperación de la planta. La adición de ciertos agentes osmóticos comerciales como el extracto de pectina o polisacáridos, fue eficaz para evitar la inducción de brotes hiperhídricos en *Eucalyptus* sp. híbridos (Whitehouse *et al.*, 2002).

## *Anatomía y Fisiología de plantas hiperhidratadas*

Los cambios anatómicos y fisiológicos por hiperhidricidad reportan que las hojas no tienen tejidos de empalizada, sino que solo tienen un mesófilo esponjoso y en gran medida vacuolado con grandes espacios intercelulares (Vieitez *et al.*, 1985). También los tejidos hiperhídricos tienen una mayor concentración de células epidérmicas, así como células estomáticas más grandes, un estudio en *Scrophularia yoshimurae* demostró que solo el 7% de las plantas hiperhídricas sobrevivieron en el paso *ex vitro*, mientras que el 67% de la supervivencia se obtuvo de las plantas normales (Chen *et al.*, 2006). Olmos y Hellin (1998) encontraron que las hojas hiperhidratadas de *Dianthus caryophyllus* tenían grandes células mesofílicas vacuoladas, que mostraban hipertrofia de las células y evitaban la formación de espacios intercelulares más grandes, además, la falta de cera cuticular y cloroplastos impidió la formación de plastoglobulina. Las pectinas son grupos heterogéneos de polímeros que controlan la adhesión celular, la arquitectura de la pared celular y la resistencia mecánica de la pared celular. El grado de esterificación de las pectinas está controlado por la actividad de las pectinas metil esterases de la pared celular; sus diferentes acciones pueden afectar las propiedades de la pared celular, por lo que se han considerado importantes con respecto al control del desarrollo de la hiperhidricidad (Saher *et al.*, 2005).

Estudios en brotes de *Prunus avium* hiperhidratados reportaron una producción mayor de cantidades de etileno, poliaminas y prolina que son sustancias consideradas como marcadores de estrés (Frank *et al.*, 2004). Piqueras *et al.*, (2002) estudiaron los cambios en los niveles y patrones de poliaminas en respuesta a la hiperhidricidad en plantas de clavel. Las hojas de clavel hiperhídrico mostraron alta actividad peroxidasa, baja lignificación y alto contenido de malondialdehído, sugiriendo daño oxidativo. Estas moléculas provocaron un porcentaje de hasta 80% de brotes revertidos.

Toth *et al.*, (2004) encontraron una optimización integrada de la composición de sal, antioxidante y regulador del crecimiento y la estabilización del pH mediada por tampón (buffer) de fosfato de potasio de los medios de cultivo, dio como resultado un sistema eficaz de CTV que evitó la hiperhidricidad indeseable de los cultivos de tejidos *Ramonda myconi*.

Shetty y col. (1996) desarrollaron un enfoque mediado por *Pseudomonas* spp. para controlar la hiperhidricidad en la planta de orégano. Esta prevención de la hiperhidricidad inducida por bacterias ayudó al establecimiento de plantas clonales en el invernadero sin aclimatización excesiva. La prevención de la hiperhidricidad y específicamente relacionado con *Pseudomonas* spp. se caracterizó por un alto contenido de clorofila y bajo contenido de agua en los brotes de orégano. La reducción de la hiperhidricidad mediada por *Pseudomonas* spp. en el orégano se debe en parte a su polisacárido extracelular.

Fisiológicamente los tejidos hiperhidratados se caracterizan por una disminución en el contenido de proteínas y clorofila, bajo contenido de fenoles, un mayor contenido de agua y

con alteración en la composición iónica (Frank *et al.*, 2004; Phan y Letouze, 1983). Estudios histoquímicos mostraron en las células hiperhidratadas niveles más bajos de ligninas, celulosa, pectinas y cutina (Kevers y Gaspar, 1985; Marin *et al.*, 1988; Ziv y Ariel, 1988). Los defectos estructurales en las células de guarda están asociados con el desarrollo de hojas hiperhidratadas, que carecen o han perdido componentes de la pared celular (Gaspar *et al.*, 1987). Esto afecta directamente el tamaño del aparato estomatal está controlado por estas células que regulan la turgencia junto con las células protectoras, que regulan el potencial osmótico vacuolar y del agua (Zeiger, 1983). Los estudios microscópicos indican que el poro rodeado por las células protectoras en las hojas hiperhídricas es más redondeado en contraste con el poro elíptico en las hojas normales (Ziv *et al.*, 1987). También las paredes celulares adyacentes al poro están rotas y dañadas. Esto podría haber resultado del fracaso del proceso de división celular durante la formación de la placa celular, así como de la deficiencia de sustancias pécticas y celulosa durante la formación de la pared secundaria (Ziv y Ariel, 1992).

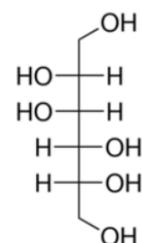
La hiperhidricidad también provoca alteraciones enzimáticas, por ejemplo en la 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintasa (ACC-sintasa, AN), fenilalanina amonioliasa (PAL, UN) y peroxidases. La ACC-sintasa convierte la S-adenosilmetionina (SAM, AK) en ACC, que se oxida a etileno. PAL (I), por su parte, es una enzima clave en la síntesis de lignina (S), lo que explica la aparición de fallos en la biosíntesis de este polímero en tejidos hiperhídricos (Piqueiras *et al.*, 2002). El agua que forma una capa alrededor de las células puede limitar la difusión de oxígeno hacia ellas, causando hipoxia la cual induce la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a niveles tóxicos, lo que resulta en estrés oxidativo (Saher *et al.*, 2004). La hipoxia, al afectar el proceso respiratorio, reduce la disponibilidad de ATP producido en las mitocondrias a través de la fosforilación oxidativa (Saher *et al.*, 2005). La evaluación del metabolismo energético de las partes aéreas hiperhídricas también ha mostrado una disminución en la producción de energía química en forma de nucleótidos de piridina, NADPH y NADH, además de ATP. Esta disminución en el metabolismo energético se asocia con un menor contenido de clorofila y una menor actividad enzimática en la vía oxidativa de la pentosa-fosfato (OPP) y la glucólisis. Las mediciones de fluorescencia de clorofila mostraron una ligera reducción en el proceso fotoquímico del fotosistema II (FS-II) de las hojas hiperhídricas, en comparación con las hojas normales, lo que indica que la menor capacidad fotosintética se debe más propiamente al menor contenido de clorofila que a una disfunción de la aparato fotosintético (Frank *et al.*, 2004; Saher *et al.*, 2005). El contenido reducido de celulosa (Gaspar, 1991; Majada *et al.*, 2001) se debe a la baja relación C / N - que favorece la síntesis de aminoácidos sobre la síntesis de polisacáridos - y la alta actividad de las peroxidases básicas, que está relacionada con una alta auxina. catabolismo (Joyce *et al.*, 2003). La hiperhidricidad se caracteriza por un bajo contenido de proteínas (Fraguas *et al.*, 2009), un alto contenido de citoquininas y una composición iónica alterada (Kataeva *et al.*, 1991; Picoli, 2001; Kevers *et al.*, 2004), este último debido a la capacidad reducida de absorción de nutrientes, como se observa en explantes b de clavo hiperhídrico (Dantas *et al.*, 2001).

En las vacuolas ocurre el ajuste osmótico y ahí se acumulan los iones. Debido a esta repartición de los iones, se deben acumular otros solutos en el citoplasma para mantener en equilibrio el potencial hídrico intracelular. Estos otros solutos, que reciben el nombre de solutos compatibles u osmolitos compatibles, son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que no afectan negativamente las funciones enzimáticas. Entre los osmolitos se incluye el aminoácido prolina, azúcares alcohólicos (como por ejemplo sorbitol y manitol) y una amina cuaternaria, llamada glicina betaína (Lincoln, 2006).

### *Osmorreguladores*

Conocidos como solutos compatibles (osmolitos, citosolutos) son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol y otros metabolitos de bajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo normal de las células. Estos se acumulan en el citoplasma y en la vacuola en altas concentraciones bajo condiciones de estrés osmótico, tienen un papel primario en el mantenimiento de la disminución del potencial osmótico en el citosol (Chen y Murata, 2002).

Sinónimo: re-Manitol, manita



*Figura 11.* Estructura química del D-manitol

El manitol, sorbitol y mioinositol han sido ampliamente utilizados para controlar la hiperhidricidad de un cultivo. El compuesto D-mannitol es un alcohol de azúcar, los cuales a menudo se han usado por su acción osmótica metabólicamente inerte. Su estructura (*Fig. 11*) en ausencia de un sistema de transporte específico, deben cruzar la membrana citoplasmática muy lentamente, satisfaciendo el requisito para un osmorregulador adecuado (Cram, 1984). También se ha utilizado para disminuir la tasa de crecimiento tisular *in vitro*, sin afectar la viabilidad, se puede aplicar estrés osmótico controlado utilizando compuestos químicos en el medio de crecimiento, como manitol o sorbitol o con mayor frecuencia alta concentración de sacarosa, que reducen el potencial osmótico sin alterar el equilibrio bioquímico de células vegetales (Pérez *et al.*, 2015).

Brown y col. (1979) estudiaron los efectos del manitol en la formación de brotes a partir de callos del tabaco. Postularon que el suministro normal de sacarosa en el medio solo se usaba parcialmente para las necesidades de carbono y energía, y que el resto, que podría ser reemplazado por manitol, que cumplía una función osmótica, éste se usaba porque no apoyaba el crecimiento de un híbrido de callo de tabaco (Hildebrandt y Riker 1949), después Trip *et al.* (1964) informaron que el manitol fue absorbido, pero no metabolizado, por las hojas de tabaco (Thompson *et al.*, 1986).

## *Sun caps*®

Los materiales de cierre de los contenedores de los cultivos pueden tener una influencia significativa en las respuestas de los explantes hiperhídricos durante el cultivo *in vitro*. Cuando las plantas se colocan en recipientes sellados, muestran un crecimiento reducido, una mayor ramificación y un alargamiento menor (Bairu *et al.*, 2009; Sha *et al.*, 1985). Se ha encontrado que las plantas derivadas de recipientes con diferentes tasas de ventilación mostraron una producción diferente de tejidos hiperhidratados, principalmente cambios morfológicos asociados, como: densidad y tamaño de las células epidérmicas y estomas, tamaño de las células protectoras y apertura de los estomas (Chen *et al.*, 2006). Un útil ejemplo de los materiales de cierre son los *Sun caps*® utilizados ampliamente en trabajos para una aclimatización *in vitro*. Tichá (1996) demostró el mantenimiento de una alta concentración de dióxido de carbono durante el cultivo *in vitro* de plántulas de tabaco con *Sun caps*® (Sigma) aumentó dramáticamente el crecimiento de las plántulas, medido como la acumulación total de materia seca y la producción total de área foliar. El efecto se mejoró con la duración del cultivo. Los cierres transparentes de los *Sun caps*® también pueden tener la ventaja de una mejor irradiación de las plántulas en comparación con los cierres de papel de aluminio o plástico. Por lo general, los vasos diseñados para mantener la asepsia de los cultivos de tejidos vegetales pueden restringir la difusión de gases, generando atmósferas anormales (por ejemplo, acumulación de etileno) que podrían interferir con el crecimiento y el desarrollo (Buddendorf y Woltering 1994; Jackson *et al.*, 1987). En los recipientes cubiertos con *sun caps*®, esto podría evitarse debido al buen intercambio de gases con el medio ambiente (Kozai, 1991; Tichá, 1996).

Es necesario aumentar el estudio de los desórdenes fisiológicos generados por el ambiente *in vitro* dentro de la familia Cactaceae ya que éstos son más comunes de lo habitual. Por ejemplo la hiperhidratación de los tejidos es un problema grave y frecuente, ocasionado por las condiciones físicas y químicas del cultivo *in vitro*; es decir, alta humedad, exceso de carbohidratos y minerales, altos niveles de reguladores del crecimiento de las plantas y baja intensidad de luz (Ziv, 1991).

## Cultivo de tejidos vegetales en la familia *Cactaceae*

La propagación de cactus nativos generalmente se realiza con semillas e hijuelos enraizados; sin embargo, los métodos de propagación convencionales son inadecuados para aquellas especies que presentan pocas o pocas ramificaciones, latencia de las semillas, bajas tasas de germinación, autoesterilidad, crecimiento lento o que requieren muchos años para madurar. Estas dificultades se ven agravadas por la disponibilidad limitada de especies en peligro de extinción. (Clayton *et al.*, 1990) La micropropagación puede ser una herramienta útil para la conservación de cactáceas y resolver o superar estos problemas porque la propagación sexual es reemplazada por ciclos de propagación vegetativa, que generalmente mantienen la

fidelidad genética del material de partida (clonación) y acortan el período de propagación (generalmente de varios meses a algunas semanas) (Malda *et al.*, 1999).

El establecimiento de cultivos *in vitro* para la conservación del germoplasma en especies vulnerables de la familia *Cactaceae* ha sido una alternativa eficiente. Existen numerosos ejemplos de cactáceas mexicanas regeneradas por CTV (Cuadro 1). Sin duda, la propagación masiva ha sido el objetivo más importante del cultivo de cactus *in vitro*. Sin embargo, existen algunas otras aplicaciones de esta tecnología que también podrían contribuir significativamente a la mejora, conservación y uso racional de estas plantas. Por ejemplo, la conservación de cactus ornamentales utiliza el cultivo *in vitro* para la preservación de tejidos vivos para colecciones de germoplasma (Pérez *et al.*, 2015).

En los últimos 20 años se han propagado *in vitro* al menos 300 especies de cactus (Lema y Kulus, 2014), los cactus más propagados son los ornamentales, debido a su de gran demanda comercial, así como los cactus usados en actividades agrícolas e industriales (De Medeiros *et al.*, 2006; Civatti *et al.*, 2017; Zoghلامي *et al.*, 2012). Se han propagado *in vitro* al menos 33 especies del género *Mammillaria* (Cuadro 2) (Ramírez *et al.*, 2007). Las citocininas y auxinas tiene una proporción específica para la regulación de los procesos morfológicos en cactáceas, donde la respuesta más común es la activación del meristemo axilar (Lázaro *et al.*, 2018).

Según Pérez *et al.* (2015), las citocininas más utilizadas en el cultivo de cactáceas son zeatina, benciladenina y kinetina, mientras que las auxinas más utilizadas incluyen IAA y NAA. Sin embargo como se ha mencionado, en algunas ocasiones los RCV pueden desencadenar desórdenes fisiológicos como la hiperhidratación, tal es el caso de *Pilosocereus robinii*, donde altas concentraciones de citocininas (BAP, 13.32 $\mu$ M) generaron la hiperhidratación de los explantes (Quiala *et al.*, 2009). Otras especies de cactáceas que han presentado problemas fisiológicos con hiperhidricidad asociado a RCV son *Turbincarpus valdezianus* (García, 2008) *M. luehtyi* (Camargo, 2017), *Escobaria minima*, *M. pectinifera*, *Pelecypora aselliformis* (Giusti *et al.*, 2002). Otros factores que propician los hiperhidricidad en cactáceas la alta humedad relativa y la naturaleza de la especie donde los agentes gelificantes juegan un papel clave, tal es el caso de *E. platyacanthus* (López *et al.*, 2016), *Astrophytum asterias* (Gaona, 2018), *M. voburnensis* (Ordóñez, 2003) entre otras.

*Cuadro 1.* Especies de la Familia *Cactaceae* propagadas por Cultivo de Tejidos Vegetales. Obtenida y modificada de Pérez *et al.* 2015.

Especies	Medio de cultivo	Reguladores de Crecimiento vegetal	Resultados (brotes por explante)	Autor
<i>Astrophytum myriostigma</i>	MS	BA (22.2 $\mu$ M) + 1-NAA (5.4 $\mu$ M)	2.0	Vyscot y Jára 1984
<i>Mammillaria carmenae</i>	MS	BA (8.9 $\mu$ M) + NAA (5.4 $\mu$ M)	2.8	
<i>M. prolifera</i>	MS	BA (2.2 $\mu$ M) + NAA (5.4 $\mu$ M)	2.1	
<i>Trichocereus spachianus</i>	MS	BA (22.2 $\mu$ M) + NAA (5.4 $\mu$ M)	3.0	
<i>Opuntia amyclaea</i>	MS	BA (10 $\mu$ M)	15.0	Escobar <i>et al.</i> 1986
<i>Mammillaria haageana subsp. san-angelensis</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M)	9.0	Martínez y Rubluo 1989
<i>E. robbinsorum</i>	MS	Zeatin (45.6 $\mu$ M) + Picloram (0.8 $\mu$ M)	4.3	Clayton <i>et al.</i> 1990
<i>Mammillaria wrightii</i>	MS	Zeatin (22.8 $\mu$ M) + NAA (1.1 $\mu$ M)	3.8	
<i>Pediocactus bradyi</i>	MS	Zeatin (22.8 $\mu$ M)	7.1	
<i>P. despaini</i>	MS	Zeatin (22.8 $\mu$ M)	6.9	
<i>P. knowltonii</i>	MS	Zeatin (22.8 $\mu$ M)	3.9	
<i>P. winkleri</i>	MS	Zeatin (45.6 $\mu$ M) + Picloram (0.8 $\mu$ M)	9.8	
<i>Sclerocactus mesae-verdae</i>	MS	Kinetin (Kin) (46.4 $\mu$ M) + Picloram (0.8 $\mu$ M)	4.3	
<i>S. spinosior</i>	MS	Zeatin (22.8 $\mu$ M)	2.3	
<i>Toumeyia papyracantha</i>	MS	Zeatin (22.8 $\mu$ M)	3.6	
<i>Mediocactus coccineus</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M) + NAA (0.27 $\mu$ M)	7.8	
<i>Cereus peruvianus</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M) + indole-3-acetic acid (IAA) (5.71 $\mu$ M)	1.0	Machado y Prioli 1996

<i>Astrophytum myriostigma</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M) + NAA (0.54 $\mu$ M)	9.2	Pérez <i>et al.</i> 1998
<i>Cephalocereus senilis</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M) + NAA (0.54 $\mu$ M)	2.8	
<i>Coryphantha clavata</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M)	4.7	
<i>C. durangensis</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M) + NAA (0.54 $\mu$ M)	4.4	
<i>C. radians</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M)	4.1	
<i>Echinocactus platyacanthus</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M)	9.0	
<i>Echinocereus dubius</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M) + NAA (0.54 $\mu$ M)	4.9	
<i>E. pectinatus</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M) + NAA (0.54 $\mu$ M)	3.9	
<i>Echinofossulocactus sp.</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M)	12.0	
<i>Ferocactus hamatacanthus</i>	MS	BA (4.4 $\mu$ M) + NAA (5.4 $\mu$ M)	5.8	

## Cultivo de tejidos vegetales en *M. luethyi*

*M. luethyi* se estableció *in vitro* por Escobedo *et al.* (2004) y reportó 2.16 brotes por explante en su mejor tratamiento sin mencionar el total de brotes obtenidos, después Gracidas *et al.*, (2010) obtuvo 745 brotes totales y Camargo (2017) obtuvo 168, en un periodo de 12 meses (Cuadro 2). Sin embargo, aunque lograron el establecimiento aséptico *in vitro* e indujeron, mediante RCV respuestas de morfogénesis directa e indirecta, los problemas recurrentes en el cultivo como la hiperhidricidad en los regenerantes ha impedido la consolidación de los brotes y su posterior aclimatización. Especies de cactáceas como *Astrophytum asterias* (Gaona, 2018), *Turbincarpus valdezianus* (García, 20008), *Pelecyphora aselliformis* (Santos *et al.*, 2003), *Mammillaria pectinifera* (Giusti *et al.*, 2002) también han presentado problemas morfofisiológicos que han afectado el desarrollo *in vitro* de las plántulas y su posterior aclimatización. Los altos porcentajes de hiperhidricidad y oxidación se han aminorado utilizando diferentes estrategias como el empleo de osmorreguladores, antioxidantes, contenedores especiales, entre otros. Mejorar las condiciones fisiológicas *in vitro* y su incidencia en el desarrollo de las plántulas es de vital importancia en el establecimiento de cultivos *in vitro* de diferentes especies de plantas incluyendo plantas suculentas como las cactáceas.

Cuadro 2. Estudios realizados en *M. luethyi* para su propagación y conservación por Cultivo de Tejidos Vegetales.

Especie	Medio de Cultivo	RCV	Resultados	Autor
<i>Mamillaria luethyi</i>	MS	1 mg/l BAP, 3 mgL <sup>-1</sup> BAP y 1 mgL <sup>-1</sup> K	brotes por explante 2.16, 1.83 y 1.58	Escobedo, <i>et al.</i> 2004
<i>M. luethyi</i>	MS	BA/ANA	745 brotes después de 12 meses	Gracidas <i>et al.</i> 2010
<i>M. luethyi</i>	MS	ANA, 2,4-D, BA, NAA	168 brotes en 12 meses, 5 brotes individualizados	Camargo 2017

## ***Justificación***

*Mammillaria luethyi* G. S. Hinton es una cactácea endémica de Coahuila de Zaragoza, México. Su morfología de atractivo para coleccionistas, su restringida distribución además de la fragmentación de su hábitat, el comercio y colecta ilegal han provocado que sus poblaciones se encuentren en peligro de extinción. Al desarrollarse únicamente en un afloramiento de fluoruro asociado a lajas de roca calcárea (Hinton, 1996), su pequeño tamaño poblacional, baja tasa de germinación, o la supervivencia en las primeras etapas del desarrollo y el lento crecimiento y desarrollo han limitado las opciones de su conservación.

Una de las estrategias para su conservación ha sido el Cultivo de Tejidos Vegetales, el cual ha demostrado ser una alternativa viable, mediante la multiplicación y conservación de especies de alto consumo y aquellas escasas en la naturaleza. Escobedo *et al.* (2004), Gracidias *et al.* (2010) y Camargo (2017), lograron el establecimiento *in vitro* de *M. luethyi*, sin embargo, problemas fisiológicos como la hiperhidricidad han impedido la consolidación y formación de plantas completas, por lo que es necesario su estudio a partir del Cultivo de Tejidos Vegetales.

El propósito del presente estudio fue dar alternativas ante los problemas fisiológicos de esta especie, es decir, controlar los problemas de hiperhidratación en los brotes regenerados de *M. luethyi*, para que sea posible continuar con su propagación y conservación. Esto traería ventajas como el almacenamiento del germoplasma y el estudio de la especie fisiológica y morfológicamente. La propagación de esta especie podría establecer condiciones para llegar a reducir la colecta ilegal de las poblaciones silvestres al cubrir en parte la demanda comercial.

## ***Objetivos***

### **Objetivo general**

Controlar la hiperhidricidad del cultivo *in vitro* de *M. luethyi*, que haga posible la regeneración, consolidación y enraizamiento de brotes.

### **Objetivos particulares**

- Determinar la concentración de osmorregulador (Manitol y Sorbitol) que reduzca la hiperhidratación y consolide los brotes regenerados.
- Cambiar y reducir la concentración de Nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en el medio de cultivo como estrategia para la regeneración y consolidación de brotes..
- Analizar los efectos de los contenedores con *sun caps*<sup>®</sup> para la regeneración y consolidación de brotes.
- Inducir la formación de brotes vía organogénesis indirecta.
- Inducir la formación de raíces en brotes individualizados y consolidados.

## ***Materiales y métodos***

### *Material vegetal*

Se emplearon cultivos de callo (30 frascos; aproximadamente 40 g por frasco) de *M. luethyi*, provenientes de explantes de tallo y podarios, procedentes de la investigación de Camargo (2017) presentaron un aspecto friable con colores blanquecinos que predominaron en la base, seguidos de un verde intenso o verde claro (zonas con un nivel alto de hiperhidratación). En la parte superior de cultivos envejecidos, fueron notables algunas zonas con colores rosados y degradados claros amarillentos, esto debido a la acumulación de betalaínas. Según Contreras (2019) estos pigmentos son comúnmente producidos en la familia *Cactaceae* (*Turbinicarpus laui*, *Turbinicarpus lophophoroides*, *Turbinicarpus pseudopectinatus*), las betacianina y betaxantinas brindan colores violetas rojizos y amarillos respectivamente (Fig. 13). Los cultivos además se encontraban en medio MS basal adicionado con carbón activado (0.5 g/L) y gelificado con agar bacteriológico (8g/L) sin RCV ni osmorreguladores o antioxidantes. Los fragmentos subcultivados medían *ca.*  $\pm 1.5 \text{ cm}^3$ . Pesaban *ca.*  $\pm 3.77 \text{ g}$ . Todos los contenedores fueron subcultivados con tres explantes *ca.* (Fig. 12).

### *Cultivo de callo adicionado con osmorreguladores*

El callo se dividió y colocó en tres partes iguales por contenedor siendo 100 frascos en total en este ensayo. El medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) se modificó reduciendo la concentración de sales al 25% en sus componentes orgánicos e inorgánicos (MS 25%). Para este ensayo se adicionó la citocinina BAP (0.225 mg/L) y se añadieron dos osmorreguladores (Cuadro 3). La cantidad de agar agregada fue de 9.5 g/L. El tiempo de cultivo fue de 8 semanas.

### *Cultivo de callo con sun caps®*

Paralelamente se realizó otro ensayo con las condiciones del medio de cultivo anterior (MS 25%). Se añadieron dos osmorreguladores en diferentes concentraciones (Cuadro 3) y se gelificó con agar 9.5 g/L. La tapa de los contenedores fue sustituida durante el subcultivo por *sun caps*® con disco de filtro con poro de 0.02  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12.** Explantes de callo friable de *M. luethyi*, organizados en cúmulos *ca.*  $\pm 1.5 \text{ cm}^3$



**Figura 13.** Explante de callo friable de *M. luethyi*. Donde se observan colores rosados en la parte superior y células muy hialinas, en la parte media basal colores verdes y blanquecinos con zonas rojas debido a la oxidación del cultivo. Medio MS 25% componentes inorgánicos y orgánicos.

### *Modificación de la fuente de Nitrógeno en el cultivo de callo*

Para este ensayo se utilizó medio MS y se sustituyó el Nitrato de Amonio (NH<sub>4</sub>)NO<sub>3</sub> (fuente inorgánica) por hidrolizado de caseína (4.4 y 2.2 g/L) (fuente orgánica) (*Cuadro 3*) para igualar la primera cantidad equivalente de nitrógeno total comparable a la formulación estándar de MS (Reyes *et al.*, 2008), las demás sales no fueron modificadas. El medio se gelificó con 10 g/L de agar.

### *Subcultivo de todo el material vegetal*

Después del periodo de aplicación e inducción (8 semanas) se realizó el subcultivo de todos los tratamientos, la mitad de los frascos (5) se pasaron a la mitad de la concentración de la que venían, la otra mitad se subcultivó a medio MS 25%. En este subcultivo se aumentó la cantidad de agar a 10 g/L.

### *Individualización de brotes*

Al realizar el subcultivo de todos los tratamientos incluido el control, se individualizaron los brotes (mayores a 5 mm de altura) regenerados vía indirecta del callo.

### *Consolidación de brotes*

Una vez individualizados los brotes se realizó el subcultivo cada semana, colocando 4-5 brotes por frasco en los siguientes medios:

- MS (MS 25%) sin osmorreguladores
- MS (MS 25%) con 12 g/L de Manitol
- MS (MS 25%) con 15 g/L de Manitol
- MS (MS 25%) sin osmorreguladores + carbón activado (0.5 g/L)

En todos los medios se utilizó agar como gelificante en una concentración de 10 g/L

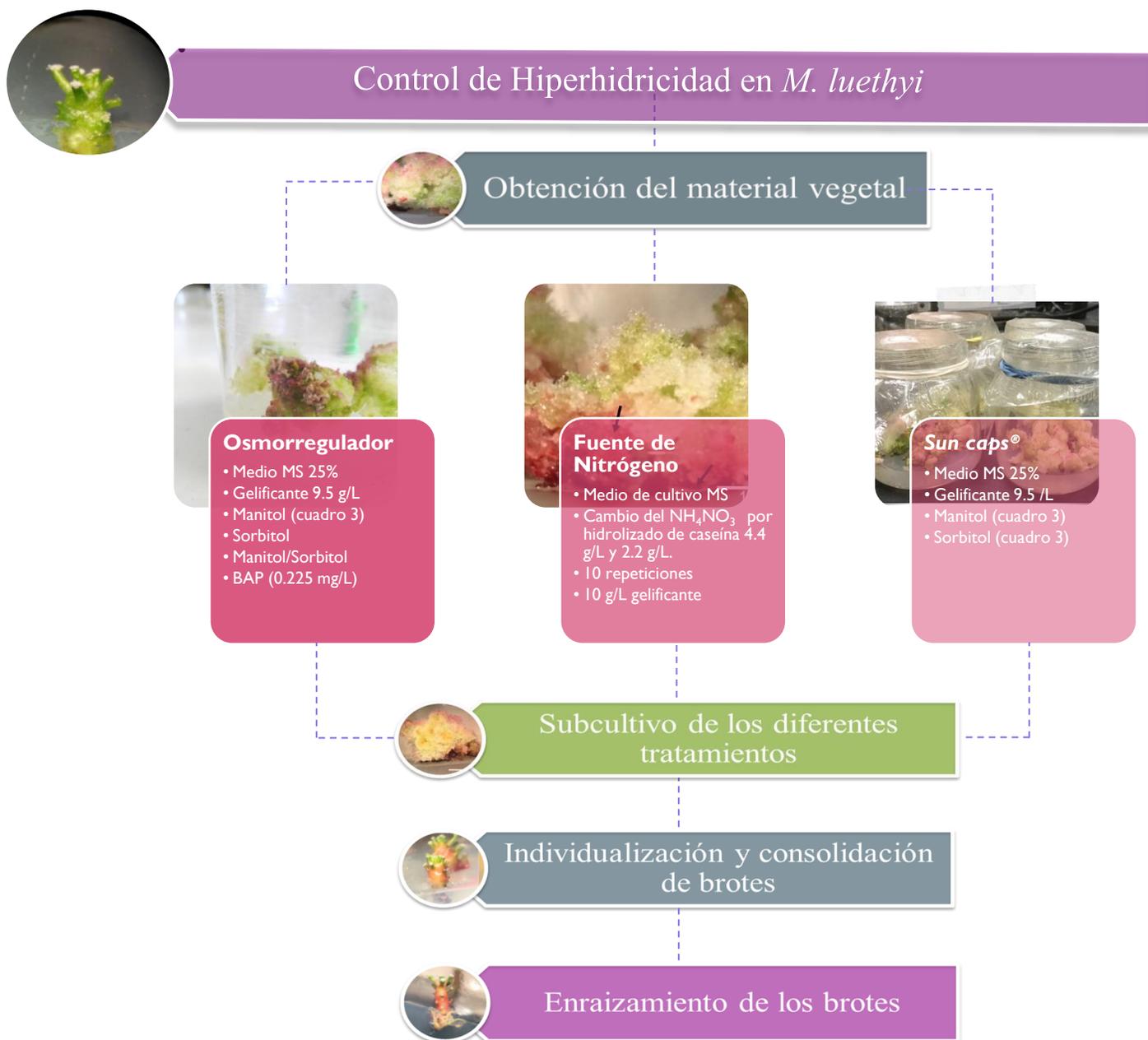
### *Evaluación del material vegetal y análisis de datos*

Para todos los ensayos con osmorreguladores se realizó una prueba de normalidad ( $p > 0.05$ ), que fue seguido de un análisis estadístico con la prueba paramétrica t-student, ( $p < 0.05$ ) y no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). La representación gráfica (box plot) y estadística fue realizada mediante los programas Statistica 7 de StatSoft y Past 4.03. La evaluación de la hiperhidratación se evaluó en cuanto a la producción de masa de callo hiperhidratado así como la visualización de brotes claramente hiperhidratados. En el cambio y sustitución en la

*Cuadro 3.* Tratamientos y concentraciones para la organogénesis indirecta en callo de *Mammillaria luethyi*.

Tratamiento	Manitol (g/L)	Sorbitol (g/L)	Hidrolizado de caseína (g/L)
<i>Osmorreguladores</i>			
Testigo	-	-	-
1	4	-	-
2	8	-	-
3	12	-	-
4	24	-	-
5	-	4	-
6	-	8	-
7	-	12	-
8	-	24	-
9	4	4	-
10	8	8	-
<i>Suncaps®</i>			
11	-	-	-
12	12	-	-
13	24	-	-
14	-	12	-
15	-	24	-
<i>Modificación de la fuente de Nitrógeno</i>			
Testigo	-	-	-
16	-	-	2.2
17	-	-	4.4

fuente de Nitrógeno así como los ensayos realizados con *sun caps*® se generaron los promedios del peso fresco de callo producido en el tiempo de aplicación. Así mismo, la respuesta morfogénica de brotes y raíces se evaluó mediante la observación directa y conteo de brotes.



*Figura 14.* Diagrama general de la metodología experimental realizada en callo de *M. luethyi*.

## **Resultados y Discusión**

### **Respuestas morfogénicas en *M. luethyi***

Las primeras respuestas morfogénicas en el cultivo *in vitro* de *M. luethyi* comenzaron a partir de la segunda semana de aplicación con osmorregulador, contrario a esto Camargo (2017) reportó la regeneración de brotes vía indirecta a las 14 semanas de iniciada su inducción. Escobedo *et al.* (2004) y Gracidas *et al.* (2010) no reportaron a que tiempo comenzó la organogénesis en los cultivos, pero mencionaron que dentro del estudio con RCV para la inducción organogénica, las altas concentraciones (BAP 1-2.5 mg para Gracidas *et al.*, 2010 y la adición de 2,4-D para Escobedo *et al.*, 2004) provocaron la proliferación de callo sin respuesta morfológica, lo cual atribuyeron a largos ciclos de cultivo *in vitro*. Camargo (2017), retomó el estudio de *M. luethyi* y también mencionó la posibilidad de que los cultivos pudieran tener procesos de pérdida en la capacidad regenerativa, ya que los pocos explantes en los que obtuvo regeneración, éstos tuvieron un lento crecimiento y un alto porcentaje de oxidación.

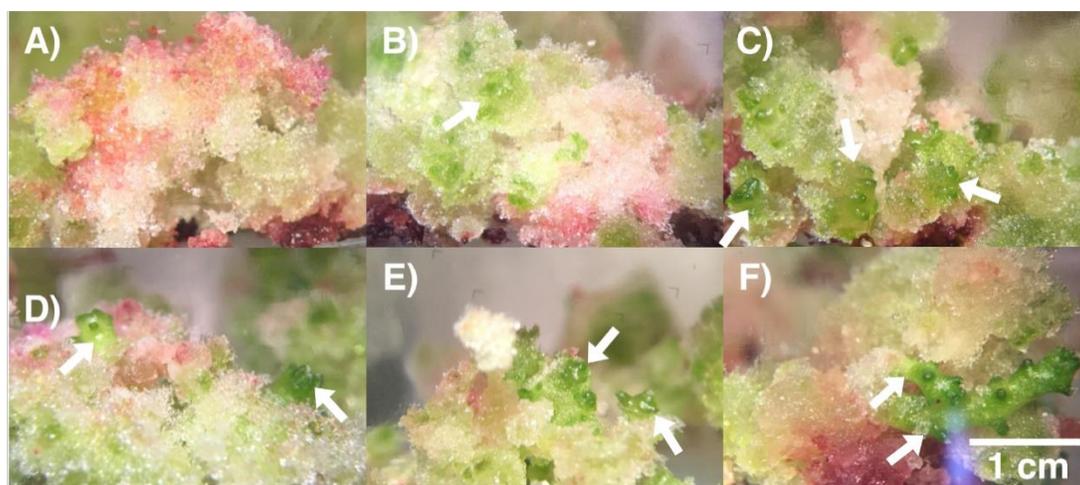
En el presente estudio la regeneración de brotes vía indirecta se presentó en todos los tratamientos (*Cuadro 3*), lo cual sugirió que el callo aún mantenía su capacidad proliferativa y ésta se pudo potenciar en la regeneración de plántulas, al controlarse los problemas (hiperhidratación) fisiológicos presentes en el cultivo de *M. luethyi*. Es importante conocer qué influye en desordenes fisiológicos y procesos de diferenciación *in vitro*. Mauseth (2004) mencionó en su estudio que la naturaleza de cada especie es distinta y las respuestas llegan a ser particulares, incluso dependen más del hábitat del que provienen que del balance de auxinas y citocininas, ya que como mencionó Han *et al.* (2009) y Molinier *et al.* (2006), el hábitat afecta los procesos de biosíntesis, metabolismo y transporte de auxinas y citocininas.

En los ensayos realizados en el presente estudio sólo se adicionó una citocinina (BAP) en una concentración de 0.225 mg/L, relativamente baja en comparación con otros estudios en cactáceas donde se ha observado el desarrollo de brotes cuando se agrega directamente al medio de cultivo cantidades relativamente altas de citocininas y bajas o nulas cantidades de auxinas (George, 1993). En este trabajo el que se adicionara sólo BAP en combinación de los osmorreguladores y sin auxinas, sí tuvo un efecto significativo ya que la organogénesis indirecta empezaba rápidamente (2 semanas) en comparación del Testigo y en subcultivos donde no se adicionó BAP (3-4 semanas). Mancilla (2014) obtuvo en *Mammillaria bombycina* mejores resultados al adicionar RCV en bajas concentraciones (ANA-BAP 0.1/1.0 mg/L), también Clayton *et al.*, (1990) reportó en *Escobaria missouriensis*, *E. robbinsorum*, *Mammillaria wrightii*, *Sclerocactus spinosior*, *S. mesae-verdae*, *Pediocactus painii*, *P. paradinei*, *P. winklerii*, *P. bradyi*, *P. knowltonii* y *Toumeyia papyracantha*, que la presencia de niveles bajos o nulos de auxina (rango de 2.0-0.2 mg/L Picloram, NAA, IBA, IAA) y con citocininas (0.2, 5.0, 10 mg/L 2iP, BAP, KIN) aumentó notablemente la

producción de brotes axilares. Además observó que en las 11 especies algunos brotes enraizaron espontáneamente en un medio libre de hormonas; lo cual sugirió un nivel elevado de auxinas. Un ejemplo semejante ocurrió con *Mammillaria gracillis*, que tuvo la capacidad de formar callos en condiciones *in vitro* sin necesidad de reguladores de crecimiento (Poljuha *et al.*, 2003; Shiskova *et al.*, 2006). En este estudio la formación de brotes también incremento por la combinación de BAP y osmorreguladores dando formación de brotes consolidados (Cuadro 4), lo cual se abordará más adelante.

### *Organogénesis indirecta*

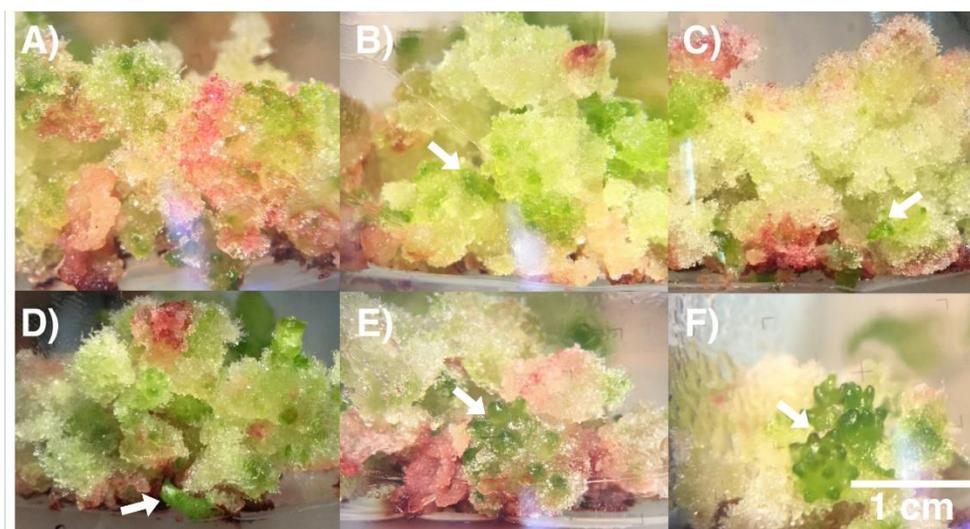
Iniciados los cultivos, el callo se mostró friable y sin diferenciación morfológica alguna (Fig. 15A). Después de 2-3 semanas de aplicación en todos los tratamientos, la masa de callo desarrolló cúmulos color verde fuerte que se formaron en la parte superior y base del callo. Camargo (2017) los llamó cúmulos meristemoides (Fig. 15B). Los cuales tomaron formas estrelladas (~2.5mm) de color verde translúcido que podría indicar una aparente hiperhidricidad (Fig. 15C-E). Transcurridas 5 semanas aumentó el número de brotes (Fig.



**Figura 15.** Morfogénesis indirecta en *M. luethyi* en cultivos adicionados con el osmorregulador manitol (g/L). (A) callo friable indiferenciado con coloraciones rosadas, amarillas y blanquecinas (manitol 4 g/L) (1 semana), (B) callo friable señalando la formación de los cúmulos meristemoides color verde claro-fuerte (8 g/L) (2-3 semanas), (C) callo friable señalando un mayor número en protobrotes color verde claro-fuerte y formación de los primeros indicios de podarios (12 g/L) (4-5 semanas). (D) callo friable donde se señala la formación de brotes de apariencia más consolidada (4 g/L), (E) callo friable donde se observan brotes hialinos y con forma estrellada en concentración (8 g/L), (F) callo friable señalado con brotes consolidados y una forma más desarrollada (12 g/L). Tiempo de aplicación para D/E/F 8 semanas iniciada la aplicación.

15C) con un tamaño aproximado de 5 mm y con coloración verde fuerte y verde claro, con menor apariencia hiperhidratada. Pasadas 7-8 semanas comenzaron a formarse las primeras estructuras morfológicas como tallos y podarios (Fig. 15F) posteriormente la formación de aréolas con espinas en brotes con un avanzado desarrollo (>8 semanas).

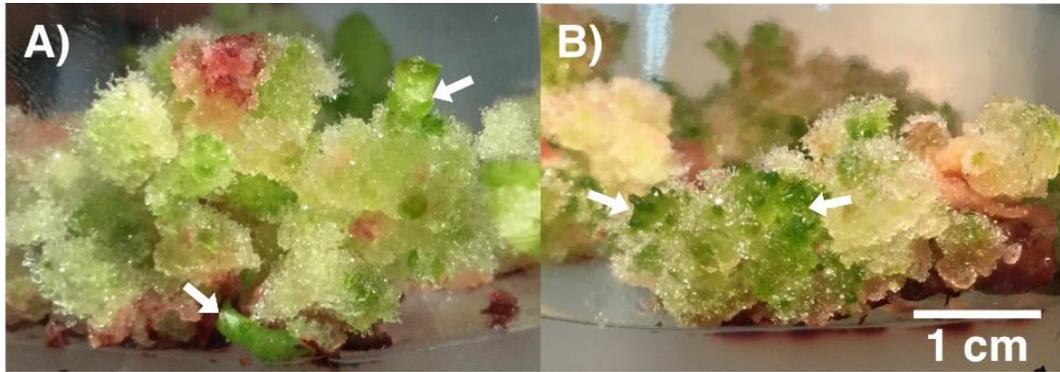
De manera general la organogénesis en cultivos de *M. luethyi* adicionados con osmorreguladores más BAP 0.225 mg/L se alcanzó en un periodo de 16 semanas. Cabe mencionar que no todos los brotes lograron llegar a una consolidación y menos aún a la individualización de éstos. El testigo regeneró 7.01 brotes por explante, de los cuales sólo se consolidaron 3. El T1 (4 g/L) regeneró 11.22 con 7 consolidados, el T3 (12 g/L) regeneró un promedio de 13.88 brotes por explante con 10 consolidados y el T4 (24 g/L) 4.75 brotes por explantes con 3 consolidados (*Cuadro 4*). El aumento en la concentración de osmorregulador favoreció la morfogénesis, la consolidación y disminución de la proliferación celular en brotes, como se muestra en la *Fig. 15* después de 8 semanas hubo un incremento en la formación de brotes lo cual provocó la reducción en el volumen de callo. Mientras que la presencia de BAP fue notable cuando al comparar subcultivos que contenían osmorregulador pero no RCV el número de brotes disminuyó o en la organogénesis indirecta los brotes se revertían a callo, por ello sí es recomendable la adición de BAP en pequeñas concentraciones. Giusti *et al.* 2002, mencionó que la tasa de proliferación de brotes axilares en *M. pectinifera*, *E. minima* y *P. aselliformis* fue mayor con TDZ (0.5- 0.05 mg/L), sin embargo si mostraron hiperhidratación contrario a BAP (0.09 - 0.009 mg/L), donde los brotes axilares no mostraron características de hiperhidricidad y se consolidaron y propagaron más.



**Figura 16.** Morfogénesis indirecta en *M. luethyi* en cultivos adicionados con el osmorregulador sorbitol. (A) callo friable indiferenciado con coloraciones rosadas, amarillas y verdes con algunas zonas hialinas (4 g/L) (1 semana), (B) callo friable con zonas hialinas y señalados con flechas los primeros indicios a la formación de cúmulos meristemoides color verde-amarillo claro (8 g/L) (2-3 semanas), (C) callo friable donde se señalan los primeros brotes color verde claro (12 g/L) (5-6 semanas). (D) callo friable donde se muestra la formación de algunos brotes de apariencia más consolidada y algunos hiperhidratados (4 g/L), (E) callo friable con brotes hialinos donde se señalan los podarios con forma estrellada en concentración (8 g/L), (F) callo friable con presencia de brotes semi-consolidados y una forma más desarrollada con podarios (12 g/L). Tiempo de aplicación para D/E/F 8 semanas iniciada la aplicación.

La organogénesis indirecta de *M. luethyi* fue de forma asincrónica, ya que se pudo observar simultáneamente diferentes etapas de desarrollo en un mismo cultivo. Por ejemplo los brotes del T1 (4 g/L) mostraron una apariencia consolidada (coloración verde fuerte con algunas zonas claras sin zonas hialinas, tamaño mayor a 5 mm y se desarrollaron los primeros podarios) en 8 semanas, en comparación con el T2 (8 g/L) donde los brotes en este mismo tiempo presentaron una apariencia hiperhidratada, con color verde cristalino, un tamaño menor de 3 mm y con pocos podarios (*Fig. 15 D-E*). Podemos decir que estos brotes se encuentran en la etapa anterior a la consolidación. Por lo tanto, en *M. luethyi* hay una organogénesis asincrónica, ya que se pueden observar simultáneamente diferentes etapas. Al adicionar un osmorregulador, dependiendo de la concentración, se puede acelerar el desarrollo y consolidación de brotes. En los tratamientos adicionados con sorbitol, al igual que con manitol, el callo primeramente era friable con coloración verde-blanco con algunas zonas rosadas y sin ninguna diferenciación morfológica (*Fig. 16A*). Después de 2-3 semanas comenzaron a notarse los brotes en la parte media y superior del callo. Mismos que después de 5-6 semanas comenzaron a diferenciarse en brotes (*Fig. 16D*), los cuales eran pequeños (3 mm), color verde claro con ciertas zonas translúcidas (*Fig. 16C*). En la octava semana comenzó el desarrollo de los brotes, éstos con características de hiperhidratación y algunas irregularidades en su morfología, ya que los brotes no se consolidaron completamente y presentaban formas amorfas (*Fig. 16 E-F*). Fue hasta la semana 12 cuando algunos brotes terminaron su consolidación y se pudieron individualizar. Por ello, la organogénesis indirecta en los tratamientos adicionados con sorbitol fue más lenta (18 semanas). El T5 (4 g/L) tuvo una formación promedio de 7 brotes por explante de los cuales se consolidaron 4, el T6 (8 g/L) obtuvo 9.85 brotes por explantes y se consolidaron 8, el T7 (12g/L) formó 12.12 brotes por explante y se consolidaron 8 y por último el T8 (24 g/L) formó 19.75, de los cuales no se consolidó ninguno (ver *Cuadro 4* y *Gráfico 5*). Se observó al igual que con el manitol, una tendencia al incremento en la formación y consolidación de brotes, conforme se aumentó la concentración de sorbitol, sin embargo, aunque el T8 regeneró el mayor número de brotes, éstos mostraron una apariencia pequeña (4 mm) e hiperhidratada, lo que ocasionó que al final de 18 semanas ningún brote se consolidara. Este tratamiento también fue de los más altos en oxidación (65%), el callo presentó colores rojos-marrones (*Fig. 18B*), lo que indicó un alto nivel de estrés en el tejido. Esta respuesta no se había observado en ningún tratamiento.

En cuando a tratamientos donde se combinaron ambos osmorreguladores, la apariencia del callo se mostró inicialmente friable con colores verdes, con algunas coloraciones rosas en la parte superior y con formación de brotes. Después de 2-3 semanas comenzaron a formarse los cúmulos meristemoides seguido de brotes con formas estrelladas (4-5 semanas). Después de 25 días de aplicación con osmorreguladores se observó el inicio de la formación de brotes y al igual que con el sorbitol, a las 12 semanas los brotes terminaron de consolidarse. Después de la semana 13 los brotes presentaron colores claros-pálidos para terminar siendo blancos y



**Figura 17.** Morfogénesis indirecta en *M. luethyi* en cultivos adicionados ambos osmorreguladores. (A) callo friable con zonas hiperhidratadas y señalados con flechas la formación de brotes en la parte basal y apical que muestran una ligera hiperhidratación, éstos con algunas partes hiperhidratadas (4 g/L de manitol y 4 g/L de sorbitol), (B) callo friable donde se señala la presencia de brotes agrupados en partes apicales y laterales, algunos con formas estrelladas (8 g/L de manitol y 8 g/L de sorbitol). Tiempo de aplicación para A/B de 8 semanas iniciada la aplicación.

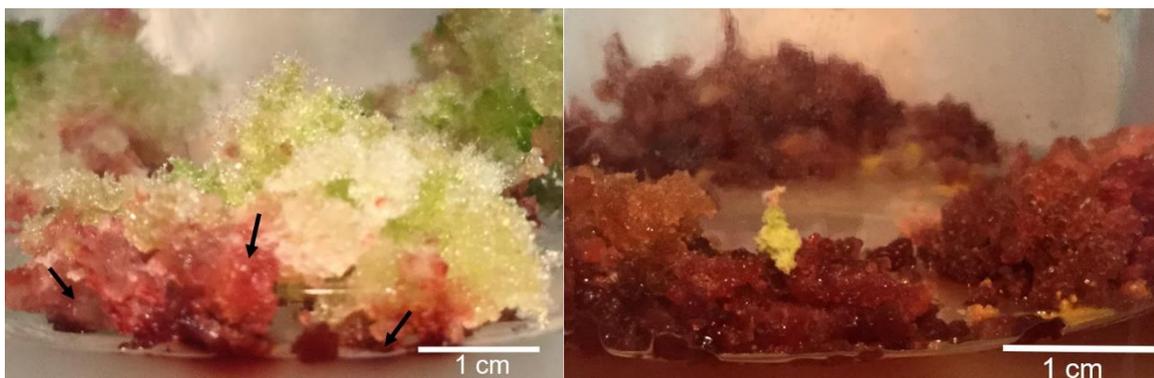
café, el callo que no presentó brotes comenzó a presentar colores marrones-café. En los brotes, al igual que en el callo se observó una textura compacta y seca (Fig. 17B). Esto indicó que la combinación de ambos osmorreguladores afectaron de manera negativa la morfogénesis indirecta, además, estos tratamientos fueron los que menor número de brotes formaron, con un promedio de 4.2 (T9; manitol/sorbitol 4 g/L) y 2.85 (T10; manitol/sorbitol 8 g/L).

De los osmorreguladores utilizados en el cultivo *in vitro* de *M. luethyi* para controlar el problema de hiperhidricidad, el manitol fue el osmorregulador que mejores respuestas morfogénicas mostró. El T3 (manitol 12 g/L) fue el que mayor número de brotes regeneró (13.88 brotes por explantes), además de que tuvo la menor producción de callo (0.96 g) y mayor reducción en hiperhidricidad (85.63%) al finalizar las 8 semanas de aplicación. Como se ha mencionado anteriormente, el manitol es un osmorregulador con mayor acción osmolítica, por ello es que pudo reducir en mayor cantidad la formación de callo, sin embargo, por los resultados obtenidos, no fue recomendable su adición en cantidades superiores a 20 g/L, al igual que con el sorbitol y la combinación manitol-sorbitol. Por otra parte, el sorbitol tuvo una menor eficacia, ya que el tiempo que llevó la formación y consolidación de brotes fue mayor (18 semanas), además de que se mostraron más anomalías morfológicas, como la elongación y deformación de los tallos, el poco desarrollo de nodos y aréolas o la presencia de raíces amorfas. Esto probablemente fue resultado de la hiperhidricidad en los cultivos. Dentro de estos ensayos el T8 (sorbitol 24 g/L) regeneró 19.75 brotes por explante con lo que superó al T3, estos brotes presentaron un aspecto hiperhidratado con color verde translúcido, además se formaron encima de un callo completamente oxidado que presentó colores rojizos marrones muy intensos. Al final del tiempo de aplicación estos brotes murieron a causa de la oxidación. Los tratamientos que fueron adicionados con ambos reguladores tampoco tuvieron las mejores respuestas

morfológicas, por lo que el rango de aplicación de osmorreguladores se sugiere sea de 10-20 g/L. para esta especie.

#### *Oxidación por osmorreguladores*

La oxidación generada por osmorreguladores no fue un problema recurrente en el cultivo *in vitro* de *M. luethyi*. En las observaciones morfológicas de la organogénesis indirecta, la oxidación se presentó en la primera semana del subcultivo, como se muestra en la *Figura 18A-B*, ésta comenzó a desarrollarse en la parte basal del callo (zona de corte), y mostró colores rojizos-marrones, aunque como se mencionó anteriormente probablemente también pudieran ser pigmentos naturales como las betalainas producidas en un ambiente de estrés. Al terminar el tiempo de aplicación en este caso para el T3 (manitol 12 g/L), el tejido se observó friable y con colores verdes que regularmente tiene cuando no hay estrés oxidativo, esto coincide con Azofeita (2009) quien observó el daño que provocaron los exudados iniciados los cultivos, el cual fue usualmente más severo durante los estados iniciales y que tendió a cesar cuando el explante inició su crecimiento. Díaz *et al.* (2015), en su estudio con ñame (*Dioscorea alata*) encontraron que la combinación de manitol y sorbitol en bajas concentraciones (<5 g/L) no promovió la oxidación en los tejidos, tampoco la aparición de tejido celular desorganizado (callo) en el explante. El T4 (manitol 24 g/L) y T8 (sorbitol 24



**Figura 18.** Oxidación en callo de *M. luethyi*, la cual se observa en la base del callo, de color blanco, café y rojizo. (A) Oxidación en la zona de corte del callo (12g/L manitol), se señala la coloración en los cultivos por estrés osmótico, (B) callo oxidado mostrando colores completamente rojizos y marrones (24 g/L sorbitol) a 2 semanas iniciada la aplicación.

g/L) fueron los dos tratamientos con mayor porcentaje de oxidación (65%), la cual pasado el tiempo de aplicación provocó la compactación y oscurecimiento del callo, además del cese en la morfogénesis indirecta, ya que también obtuvieron la menor consolidación en brotes (4 y 0 brotes consolidados respectivamente).

En *M. luethyi* el uso de osmorreguladores en concentraciones bajas (<20 g/L) no propiciaron la muerte del tejido vegetal. Sin embargo, al adicionar una concentración más alta de osmorregulador el callo se oxidó completamente y resultó morfológicamente en un callo compacto color blanco que demostró la pérdida de los cultivos, ya que a partir de ese punto no hubo regeneración o respuesta morfológica alguna. Esto se pudo deber a la saturación del

medio de cultivo con los osmorreguladores, limitando la disponibilidad de nutriente para las células vegetales, propiciando un sistema estático donde no hubo absorción de nutrientes y por lo tanto, generación de nuevos tejidos y órganos.

En cactáceas la oxidación puede llegar a representar un verdadero problema en la regeneración de plantas. Rocha (2013) reportó un 86.2% de oxidación en *Aporocactus flagelliformis*, Camargo (2017) con *Astrophytum caput-medusae* que presentó un 87.3% de oxidación severa y Huanca (2019), mencionó en su trabajo con *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* un porcentaje de oxidación de hasta 91.6%.

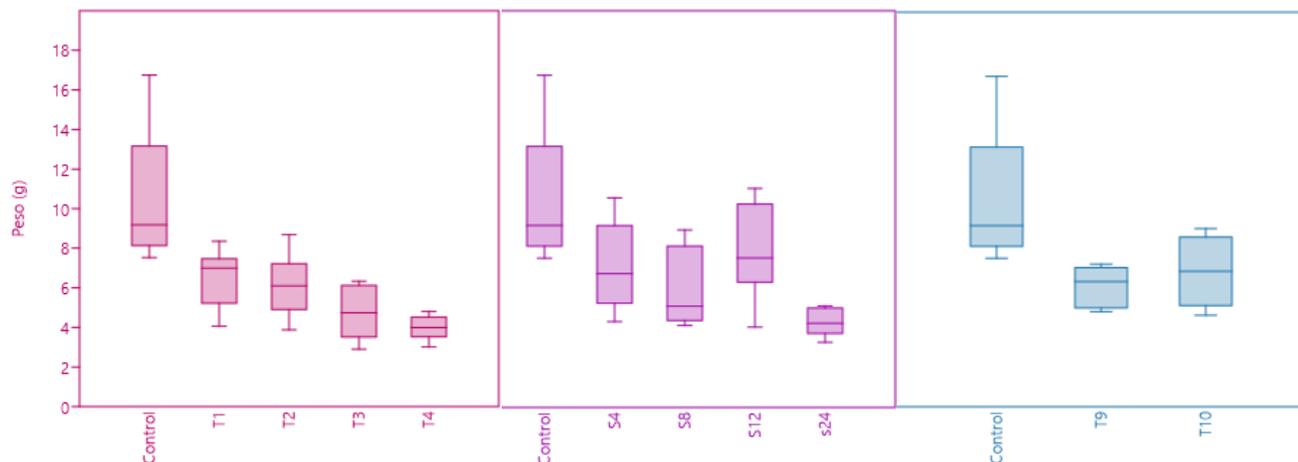
La oxidación puede incrementar con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry 2001, Van Staden *et al.*, 2006).

## Cultivo de callo adicionado con osmorreguladores

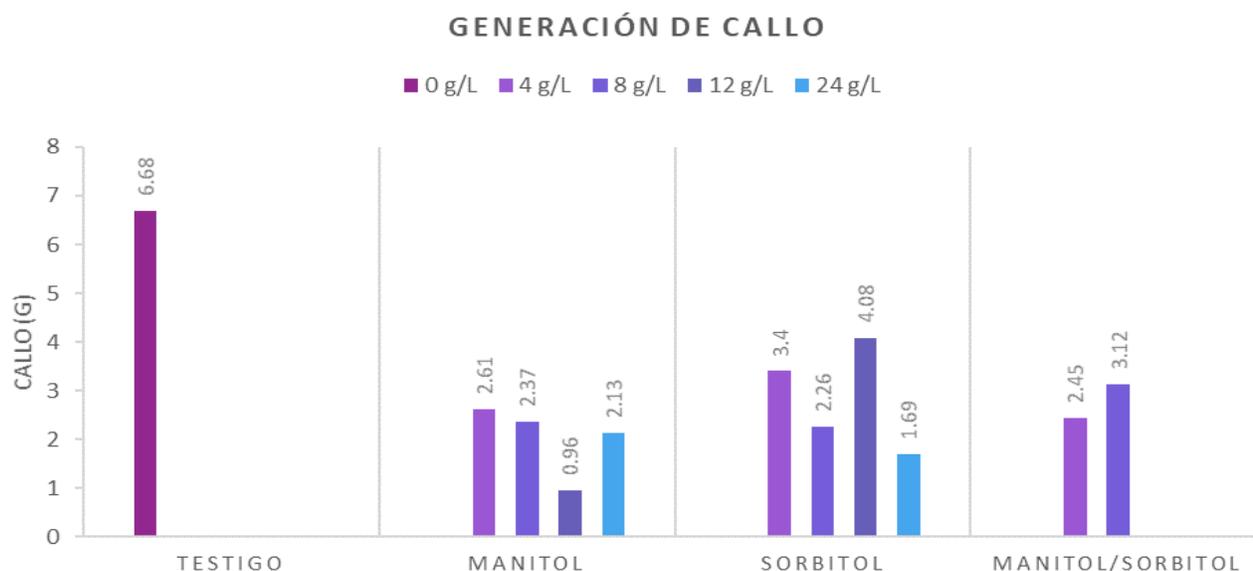
### *Formación de callo*

Se partió de callo como explante, con un peso promedio inicial de 3.77 g en todos los tratamientos. Después del subcultivo, pasado el tiempo de aplicación (8 semanas en incubación), el callo regeneró en el Testigo un peso máximo de 16.74 g, lo cual es 3 veces su peso inicial. Como se observa en el *Gráfico 1* el Testigo tuvo una mayor proliferación celular, Rodríguez *et al.*, (2014) mencionaron que la inducción de callo representa un proceso de desdiferenciación y división celular intensiva, lo cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento como también su concentración y combinación, por lo cual, es probable que en este tratamiento al no tener ningún osmorregulador ni RCV tuviera la mayor proliferación celular. El testigo también mostró la mayor proliferación celular promedio con 6.68 g de callo (*ver Gráfico 2*). En el análisis estadístico de Kruskal Wallis (KW) los resultados obtenidos señalaron que al adicionar un osmorregulador el peso del callo generado disminuyó, al comparar todos los tratamientos *vs* el testigo se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), lo cual indica que el adicionar un osmorregulador puede influir y regular la producción de callo generado en los cultivos, visto como la disminución en la producción excesiva de células de callo, además de la formación y consolidación de brotes. Los tratamientos adicionados únicamente con manitol formaron 2.61 g (T1), 2.37 g (T2), 0.96 g (T3) y 2.13 g (T4) de callo (*Gráfico 2*). El T3 (manitol 12 g/L) tuvo la menor formación promedio de masa callosa con 0.96 g, es decir, que se redujo la formación de células hiperhidratadas en un 85.63% en comparación con el testigo (*Gráfico 4*). En el cultivo de *M. luethyi* la reducción de la hiperhidratación fue evidente cuando la proliferación celular masiva de células hiperhidratadas se minimizó, el callo se mostró friable sin colores translúcidos y se comenzó una organogénesis indirecta donde hubo formación y consolidación de tejidos nuevos que posteriormente formaron brotes consolidados o no. También hubo diferencias significativas entre el T3 y T2 ( $t \text{ value} = 0.02$ ),

T3 y T4 ( $t$  value = 0.05). Otras diferencias que hubo fueron el T2 y T5 ( $t$  value = 0.0002), T4 y T5 ( $t$  value = 0.001). El T3 y T5 no tuvieron diferencias significativas ( $t$  value = 0.13), sin embargo, si hubo grandes diferencias morfológicas.

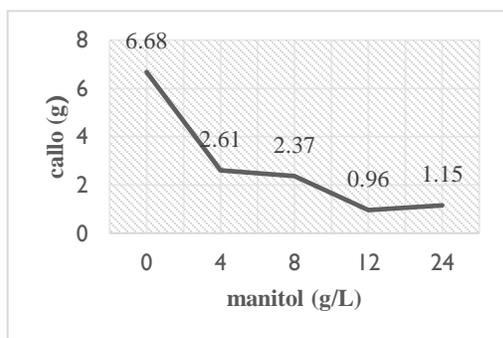


**Gráfico 1.** Peso fresco total de callo (g) de *M. luethyi*, después de 8 semanas, en medio de cultivo adicionado con osmorreguladores. Los tratamientos de manitol y sorbitol en tres concentraciones diferentes (4, 8 y 12 g/L). El tratamiento manitol/sorbitol en dos concentraciones (4 y 8 g/L). Se observa en los tres casos la comparación entre el Testigo y los 10 tratamientos y los valores atípicos de éste.



**Gráfico 2.** Resultados del promedio de peso fresco de callo de *M. luethyi*, al finalizar el tiempo de aplicación (8 semanas). Los dos tratamientos manitol y sorbitol en tres concentraciones diferentes (4, 8 y 12 g/L). El tratamiento manitol/sorbitol en dos concentraciones (4 y 8 g/L). La menor producción de callo fue con Manitol 12 g/L (0.96 g) seguido de sorbitol 24 g/L (1.69 g).

Como se observó en el *Gráfico 3* cuando se aumentó la concentración de manitol (4-12 g/L) se redujo la proliferación celular y disminuyó la hiperhidratación. Concentraciones más grandes como el T4 (24 g/L) mostraron una baja proliferación celular (1.15 g de callo) (*Gráfico 2*), y una alta reducción en la hiperhidricidad (82.78%) (*Gráfico 4*), sin embargo estos cultivos no presentaron formación de tejidos u órganos vegetales. La formación de biomasa en los dos diferentes tratamientos mostraron grandes diferencias estadísticas y morfológicas. Cárdenas y Villegas (2002) realizaron ensayos con sorbitol y manitol en concentraciones iguales (7.28, 10.93 y 14.57 g/L), y demostraron que los potenciales osmóticos obtenidos con manitol fueron más negativos que los de sorbitol, (-0.26 y -0.23 respectivamente) mostrando diferencias significativas entre ambos osmorreguladores (Tukey, 0.05). Según Pierik y Steegmans (1975), los medios que presentaron un potencial osmótico de aproximadamente -0.3 MPa permitieron el crecimiento y organogénesis *in vitro*; tal fue el caso de manitol (14.57 g/L) (-0.3 MPa).



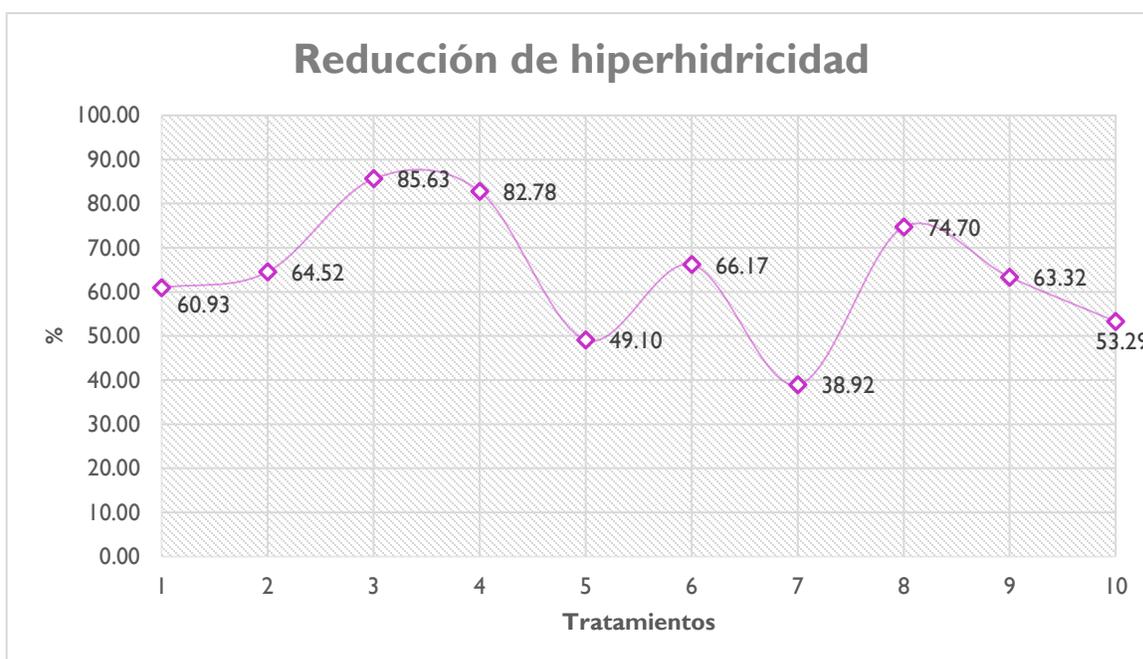
*Gráfico 3.* Concentraciones del osmorregulador manitol y su producción de callo después de 2 meses de aplicación. Se puede observar la disminución en la proliferación de callo en el T3 (12 g/L). Así como el incremento en la proliferación de callo.

Por lo mismo, es probable que en *M. luethyi*, el manitol haya reducido de manera importante los niveles de hiperhidricidad y generación en el callo (T3; 12g/L 0.96 g; 85.63% después de 8 semanas). Diaz *et al.* (2015) mencionan que el sorbitol es un osmorregulador con capacidad para generar un estrés osmótico menos severo que otros osmorreguladores (manitol y mioinositol) además

de su utilidad como fuente de energía para los explantes. En el presente estudio el sorbitol mostró una tendencia irregular en los datos obtenidos, sin embargo, en T8 (24 g/L) tuvo uno de los menores porcentajes en la reducción de hiperhidricidad (74.70%) (*Gráfico 4*) y producción de callo (1.69 g) (*Gráfico 2*), sin embargo los demás tratamientos no tuvieron éxito al detener la formación de biomasa de callo, tal es el caso del T7 (12 g/L) que tuvo una formación de 4.08 g y una reducción de 66.17%, contrario al T3 (manitol 12 g/L), mostrando la diferencia entre ambos osmorreguladores en la formación de callo, podemos suponer que esto se debe a que el Sorbitol no tiene un efecto tan severo como el manitol y el mioinositol. De los tratamientos en los que se combinaron los osmorreguladores, el T9 (manitol/sorbitol 4 g/L) formó 2.45 g, y aunque retuvo la proliferación celular un 63.32%, al término del tiempo de aplicación el callo se mostró seco, compacto y comenzaron a dominar colores blancos y verdes claros característicos del inicio de oxidación en el tejido vegetal. Sólo hubo diferencias significativas con el testigo (testigo vs T9:  $KW = 0.005$ ; Testigo vs T10:  $KW=0.01$ ).

Bello *et al.* (2014) describieron en caña de azúcar (*Saccharum sp.*) que el uso combinado de los dos osmorreguladores (manitol y sorbitol) afectaron negativamente supervivencia y crecimiento de plántulas, al aumentar las concentraciones de estos compuestos (15, 30 y 45

g/L). Retomando el estudio de Diaz *et al.*, (2015), cuando usaron el sorbitol (3%-1.5 g/L) o la combinación manitol-sorbitol (1.5-2%), alcanzaron las mayores tasas de supervivencia. Este contraste en la combinación manitol/sorbitol en ambos estudios, estuvo directamente relacionado con la concentración añadida al medio de cultivo y la especie en cuestión. En el cultivo de *M. luethyi* concentraciones bajas en la combinación de dichos osmorreguladores (T9) mostraron resultados más favorables que al aumentar las concentraciones (T10), ya que a pesar de que se disminuyó la producción de callo, las respuestas morfogenéticas no fueron positivas. Cuando se utilizó la misma concentración de los dos osmorreguladores se duplicaron los solutos y de cierta forma se saturó el medio de cultivo. Esto podría explicar las alteraciones morfológicas que se mostraron en estos tratamientos donde la concentración rebasó los 15 g/L de osmorregulador.



*Gráfico 4.* Reducción de hiperhidricidad porcentual en los tratamientos con osmorreguladores (sorbitol y manitol). Resultados a 8 semanas después de iniciados los tratamientos.

## *Sun caps*®

El uso de *sun caps*® en contenedores favoreció el intercambio gaseoso, evitando una alta humedad relativa en los cultivos. Jackson *et al.* (1987) y Buddendorf y Woltering (1994) mencionan que por lo general, los vasos diseñados para mantener la esterilidad de los cultivos de tejidos vegetales pueden restringir la difusión de gases, generando atmósferas anormales (por ejemplo, acumulación de etileno, el cual se ha asociado a la hiperhidricidad) que podrían interferir con el crecimiento y el desarrollo. En este estudio el uso de *sun caps*® favoreció la disminución de la hiperhidratación del callo (T11, T12 y T14), observado en producción de biomasa (g) y la morfología del mismo, la cual fue friable en la parte basal pero con aspecto seco en la parte superior, la cual, además presentó una pigmentación rosa muy marcada en zonas apicales. En comparación el T11 (testigo con *sun caps*®) obtuvo una formación de callo de 4.57 g, y formó 11.25 brotes por explante (*Cuadro 4*), de los cuales se consolidaron e individualizaron 8 brotes. Los brotes regenerados sin osmorreguladores mostraron una apariencia consolidada, sin señales de hiperhidratación y un tamaño >5 mm. Los dos siguientes tratamientos a los que se adicionó el osmorregulador manitol tuvieron una proliferación celular menor. El T12 (12 g/L) formó 2.24 g y generó 2.1 brotes por explante, resultado muy semejante con el T14 (sorbitol 24 g/L) que formó 2.09 g, y 3 brotes por explante. Pasadas 8 semanas en los tratamientos T13 y T15 aumentó la oxidación del callo y ninguno de estos tratamientos tuvo una consolidación en los brotes, ya que sufrieron un fuerte choque osmótico que provocó la oxidación completa de los cultivos. Esto puede ser debido a la alta concentración de osmorregulador y el uso de *sun caps*®.

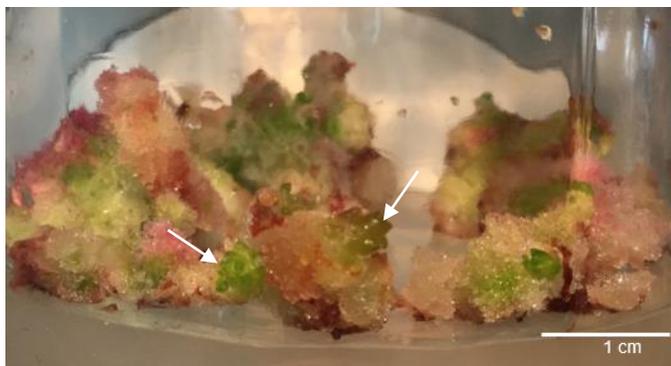
Kozai (1991) menciona cubrir los recipientes con *sun caps*®, puede evitar desordenes fisiológicos debido al buen intercambio de gases con el medio ambiente. Gaona (2018) utilizó *sun caps*® para una pre-aclimatización de brotes de *Astrophytum asterias* y observó una mejor consolidación en sus brotes (4 semanas), eliminando la hiperhidricidad y aumentando la supervivencia *ex vitro*. Esto coincide con los resultados obtenidos en los brotes generados en el control, ya estos se mostraron sólidos con un color verde, con formación de podarios y aréolas, además de no presentar formación de callo en sus estructuras. Reyes *et al.* (2008) en su estudio con *Atriplex canescens* encontró que el medio de cultivo modificado con tapas eventiladas (*sun caps*) fue consistentemente el mejor tratamiento, ya que obtuvo una frecuencia acumulada total de brotes revertidos del 39.7% (73 brotes revertidos de 184 brotes revertidos totales), en comparación con una frecuencia acumulada total de brotes revertidos del 7,1% (13 brotes revertidos de 184 brotes revertidos totales) observados en el medio de control estándar, tratamiento sin ventilación (periodo 150 días).

Aunque los tratamientos adicionados con osmorregulador no tuvieron respuestas morfológicas positivas, el testigo sí disminuyó la hiperhidratación, se propició la organogénesis indirecta, pero al final del tiempo de aplicación presentó una severa deshidratación, la cual propició la pérdida de los cultivos. Pospíšilova *et al.* (1999) reportaron que estos procedimientos pueden llevar al secado más rápido del medio de cultivo (4

semanas) y a una incapacidad en el crecimiento de las plántulas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Los dos tratamientos adicionados con osmorregulador, tuvieron un fuerte choque osmótico en las 2 primeras semanas, mostrando altos niveles de oxidación y al igual que el control provocó la muerte de los cultivos, por lo que se recomienda reducir el tiempo de aplicación a 1 mes máximo sin agregar osmorregulador (>4 g/L) o algún regulador de crecimiento vegetal en altas concentraciones.

#### *Oxidación por sun caps®*

La oxidación que se presentó por el uso de *suncaps*® obtuvo un 20% en el T11 (testigo con *suncaps*®), 85% y 90% en los T13-T15 (24 g/L manitol y 24 g/L sorbitol) respectivamente. La oxidación aumentó a medida que se incrementó la concentración de osmorregulador, esto por el gran choque osmótico que pueden provocar una alta concentración de osmorregulador, sumado a esto, el uso del *suncaps*® en el contenedor, el cual aumenta el intercambio gaseoso con el medio que provoca un estrés oxidativo.



*Figura 19.* Organogénesis indirecta en *M. luethyi* utilizando *suncaps*® sin osmorreguladores, en Medio MS 25% (8 semanas iniciada la aplicación). Se observan los primeros brotes de forma estrellada y con una morfología consolidada.

## Modificación de la fuente de Nitrógeno

El empleo de suplementos naturales ha sido una opción cuando los medios de cultivo definidos no dieron los resultados deseados, estos han tenido efectos beneficiosos en el CTV (Bhatia, 2015). En dos tratamientos (T16 y T17) se modificó la fuente de Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) por hidrolizado de caseína. Reyes (2018) mencionó que las células pueden metabolizar los aminoácidos de las fuentes de nitrógeno orgánico para obtener energía, por lo cual el hidrolizado de caseína es una fuente de calcio, fósforo, varios microelementos, vitaminas y aporta hasta 18 aminoácidos, incluso ha llegado a ser más eficaz para el CTV que la adición de los principales aminoácidos (Bhatia, 2015).

Al finalizar el tiempo de aplicación (2 meses), el T16 (2.2 g/L hidrolizado de caseína) obtuvo una formación de 9.89 g en promedio de callo y una formación de 14.8 brotes por explante con 12 brotes consolidados. Así mismo, el T17 (4.4 g/L hidrolizado de caseína) obtuvo una mayor formación de callo a 11.06 g y se formaron 19.5 brotes, de los cuales 16 se consolidaron (*Cuadro 4*). Ambos resultados fueron los que obtuvieron una mayor formación de brotes en comparación con todos los ensayos. La concentración del T17 fue la equivalente a la cantidad de Nitrato de amonio total comparable en la formulación estándar del medio MS, por lo cual es probable que esto fuera decisivo en la formación y consolidación de brotes. Sin embargo, esto abre la posibilidad a intentar nuevas formulaciones con concentraciones más altas de hidrolizado de caseína.

El hidrolizado de caseína también propició un crecimiento acelerado en la proliferación de callo, saturando los contenedores. Murashige y Skoog (1962) y Gamborg *et al.*, (1968) señalan que la adición de la caseína hidrolizada puede incrementar la división celular. En *M. luethyi* el T16 y T17 superaron al tratamiento testigo, el cual formó 6.68 g de callo y 7.1 brotes por explante con 3 brotes consolidados. El callo que se obtuvo no mostró hiperhidratación, era friable y con abundantes brotes en la parte basal y apical, éstos sin signos de hiperhidratación. Cárdenas y Villegas (2002) mencionaron que a medida que aumentaron la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , (1.01-2.02 g) el potencial osmótico se hizo más negativo (-0.44 y -0.43 MPa), demostrando así el impacto de estos macronutrientes en el medio de cultivo y con ello su posible influencia en la hiperhidratación.

Reyes (1992), incrementó la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1.21 g) en cultivos de *Malus robusta* y observó un aumento en el contenido de agua en los tejidos que provocó desórdenes fisiológicos en el desarrollo de los brotes. Contrario a este estudio en *M. luethyi* hubo gran proliferación celular, sin embargo esto no afectó el desarrollo de los brotes. Estos fueron los dos tratamientos que más brotes regeneraron y consolidaron. Dentro de sus características se presentó un tamaño >5 mm, con órganos consolidados (podarios y aréolas) y una morfología definida como los obtenidos de ensayos adicionados con osmorreguladores.

Gaona (2018) y Reyes *et al.* (2008) observaron en *Astrophytum asterias* y *Atriplex canescens* respectivamente, que al agregar hidrolizado de caseína (3 meses; 4.4 g/L) hubo un efecto positivo en la consolidación de brotes y en la reducción de la hiperhidratación. En el caso de *Astrophytum asterias* hubo un 100% de reducción de hiperhidratación de los explantes, además su coloración cambió del verde claro a verde oscuro, se observaron más sólidos y en algunos casos se vio un crecimiento muy ligero ( $\leq 2$  mm) de callo en la base. En *Atriplex canescens* con la eliminación de amonio de la formulación del medio, hubo un aumento del doble en las tasas de reversión total con 121 (66%) y 63 (34%) brotes revertidos totales de 184 respectivamente.

Tacoronte *et al.* (2017) mencionaron que hubo importantes respuestas morfológicas cuando se modificó el medio MS y aumentaron las concentraciones de nitrato de amonio (1.98 g/L) y nitrato de potasio (2.28 g/L) en tres cultivares de papa (*Solanum tuberosum* spp. *andígena*), ya que después de 12 semanas observaron un acelerado crecimiento en los segmentos nodales, las plantas desarrollaron un aumento en tamaño de vástagos vigorosos con longitud promedio de 5.82 cm, hasta con 18 hojas extendidas de color verde intenso y con presencia de un sistema radical desarrollado. Concluyeron que el aumento en las fuentes nitrogenadas así como la reducción en la concentración de sacarosa (10-15 g/L), tuvo como resultado un mayor alargamiento del vástago de la papa nativa, aumentó el número de sus nudos, hojas y desarrollo de raíces, llegando a la formación de vitroplántulas. Molinos *et al.* (2004) y Segovia (1987), explican que las bajas concentraciones de sacarosa pueden generar un potencial osmótico más positivo ( $> -0.22$  MPa) favoreciendo probablemente la disponibilidad y asimilación de las altas concentraciones de fuentes nitrogenadas y demás nutrientes componentes del medio de cultivo. Sin embargo, recordamos que cuando más positivo sea el potencial osmótico del medio, mayor será la absorción de agua y de los nutrientes.

Los problemas fisiológicos de hiperhidricidad en el cultivo de callo de *M. luethyi* hicieron que la reducción en la concentración de sacarosa (30 g/L) no fuera una opción viable a pesar de que pudo haber favorecido la absorción de la fuente nitrogenada (hidrolizado de caseína). En los ensayos (T16 y T17) donde se modificó el Nitrato de amonio, hubo una gran proliferación celular y la mayor formación de callo (11.06 g de callo), por lo que hacer disponible una mayor absorción de agua, podría provocar la hiperhidratación en el callo y los brotes y aumentaría aún más la proliferación celular.

Finalmente, la oxidación observada en los T16 y T17 fue de 4% en ambos tratamientos, que al término del tiempo de aplicación, por el alto nivel proliferativo del callo disminuyó a 2%, Azofeita (2009) quien observó el daño que provocaron los exudados iniciados los cultivos, el cual fue usualmente más severo durante los estados iniciales y que tendió a cesar cuando el explante inició su crecimiento. Esto indica que la adición de hidrolizado de caseína (2-5 g/L) al cultivo de *M. luethyi* no provocó una oxidación severa.

Además de que se eliminó el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  del medio de cultivo, cuando se utilizaron osmorreguladores y *sun caps*® se modificó el medio MS reduciendo todas las sales al 25% para evitar la producción masiva de callo, ya que se supuso las células tenían una división celular muy rápida debido al alto valor nutricional en el medio de cultivo. Como menciona Pierik (1990) la concentración total de las sales de un medio de cultivo determina el potencial osmótico del medio. Éste se obtiene de la suma de los potenciales osmóticos de sus componentes, donde influyen no sólo los pesos sino también el grado de disociación de las sales que lo constituyen. El medio MS es uno de los más negativos (-0.45 MPa), comparado con el de White (1943) (-0.19 MPa) debido a la composición de sus sales (Yoshida *et al.*, 1973). Éstas también pueden modificar el potencial osmótico de las plantas y ayudarlas a la reducción en la hiperhidricidad, es decir, propiciar la consolidación de estructuras regulatorias en la absorción de agua e intercambio gaseoso. En este estudio se optó por no reducir la concentración de sales en el medio de cultivo que bien pudo propiciar una disminución en el potencial osmótico y por lo tanto en la capacidad de reducir la hiperhidratación, sin embargo, se ha demostrado que el manitol puede aportar nutrientes que ayudan a la consolidación de brotes y aparte tener una función osmorreguladora en los tratamientos (Lipavska *et al.*, 1996) por lo cual se le apostó a la reducción de sales y la implementación de osmorreguladores.

También al reducir las sales ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) se modificó el potencial osmótico de este componente y se propició un potencial osmótico negativo. Recordando que mientras más negativo sea y se cambia el potencial matricial del medio, la hiperhidratación disminuye como consecuencia de una menor absorción de agua, que dificulta la multiplicación de vástagos axilares. Además, el explante tiene un contacto menos eficiente con el medio, lo que dificulta la disponibilidad de los macro y micronutrientes del medio, dependiendo de la concentración del agar (George, 1993).

En este ensayo, simultáneamente se modificó la concentración de agar, ya que se agregó hasta 10 g/L, esto para compensar que no se redujeron las sales en el medio MS a 25% y que no se adicionaron osmorreguladores. Como se mencionó anteriormente, en los tratamientos T17 y T18 se mostró la mayor producción de callo (9.89 y 11.06 g respectivamente), podríamos suponer que en este caso el adicionar 10 g/L de agar, no tuvo influencia en la retención de agua de los cultivos o bien ésta fue muy poca y habría que probar con concentraciones más elevadas (12, 14, 16 g/L) como mencionó Deberg (1983) quien analizó el efecto del agar en diferentes concentraciones en cultivos de la alcachofa de globo (*Cynara scolymus* L.) la cual presentó señales de hiperhidratación en los tejidos, y concluyó que ésta sólo se pudo superar aumentando la concentración de agar (8 a 15 g/L). Por otra parte Brand (1993) afirma que la hiperhidratación en tejidos se puede reducir en concentraciones altas de agar, pero como mencionan Cárdenas (1999) el agar sólo actuó reteniendo agua y afectó el potencial matricial, pero no tuvo efecto como osmorregulador a las concentraciones regularmente empleadas (5-8 g/L). Una de las ventajas en los ensayos con osmorreguladores

es que su uso resultará siendo más viable económicamente, ya que el agar es uno de los componentes más caros en el medio de cultivo, además de que proporcionan nutrientes que aportan a la consolidación de los brotes.

## **R**egeneración de Brotes

Téllez *et al.* (2017) realizaron estudios en *Mammillaria plumosa* y mencionaron que “En todo proceso morfogénico, el número de brotes producido está determinado genéticamente y se considera el principal indicador del potencial de multiplicación de una especie. La cantidad de brotes refleja el número de plantas potenciales adultas”, en este caso la cantidad promedio de brotes que pudieron regenerar a partir de un explante de *M. plumosa* fue de 537 después de 120 días de cultivo.

En *M. luethyi* la morfogénesis y el número de brotes obtenidos en los diferentes estudios ha sido variable dependiendo de la vía morfogenética utilizada. Camargo (2017) reportó que la formación de brotes vía organogénesis directa se presentó en menos de 10% de los tratamientos que utilizó (ANA/BAP; 0.1/0, 2/0.1, 0.1/0.1, 1/1 y 2/0.1 mg/L). También observó que la tendencia a formar brotes estaba en las concentraciones intermedias-bajas. En estos ensayos la regeneración de brotes inicio a las 5 semanas y obtuvo un máximo de 7 y un promedio de 2.75 brotes por explante y mencionó que por medio de esta vía hubo una baja proliferación en los regenerantes, lo cual también fue reportado por Escobedo *et al.* (2004), donde su promedio más alto fue de 2.16 brotes por explante en su mejor tratamiento (1 mg/L de BAP). Contrario a esto, Gracidas *et al.* (2010) obtuvo un promedio de 13.19 brotes por explante, sin decir de que parte provenían. En conjunto, estos autores mencionaron que los bajos promedios de regeneración en los brotes, posiblemente se debió a que el callo pudo haber perdido su capacidad regenerativa debido a largos ciclos en ambiente *in vitro*.

En la organogénesis indirecta, Camargo (2017) observó la presencia de brotes a partir de la semana 14 y obtuvo un máximo de 11 brotes por explante y un mínimo de 1 (0.0-1.0 mg/L ANA/BAP). La morfología de estos brotes fue normal, con podarios y aréolas desarrolladas, el tamaño y el crecimiento de éstos fue variable en tamaño y desarrollo. Al finalizar su estudio se formaron 59 brotes en 9 meses y un promedio de 5.9 brotes por explante donde individualizó 5 brotes (promedio) de un tamaño mayor a 2 cm (1mg/L BAP).

Gracidas *et al.*, (2010) obtuvieron por morfogénesis indirecta 12 brotes por explante, después realizaron una segunda inducción utilizando ANA (0.5 mg/L) y BAP (1.0-3.5 mg/L) y obtuvieron 270 brotes por organogénesis indirecta después de 12 meses de cultivo. En el presente estudio, la organogénesis indirecta se presentó después de la primera semana de aplicación, la cual fue inducida por diferentes tratamientos en los que se aplicaron osmorreguladores con una citocinina (0.225 mg/L BAP) (T1-T10), *sun caps*® combinados con osmorreguladores (T11-T15) y el uso de hidrolizado de caseína (T16-T17), los cuales ayudaron en parte a solucionar problemas de hiperhidricidad y a la morfogénesis indirecta de brotes. De todos los tratamientos el T17 (4.4 g/L de hidrolizado de caseína) obtuvo los valores

más altos en la regeneración de brotes, teniendo como máximo 40 brotes por explante y un promedio de 19.5 brotes (32 brotes consolidados). El segundo tratamiento con mayor número en regenerantes fue el T3 (manitol 12 g/L) que formó un promedio de 13.88 brotes por explante (12 semanas) en promedio. Estos resultados fueron mayores a los ya reportados, lo cual indicó que el callo aún mantiene cierta capacidad regenerativa si se controlan los problemas osmóticos. Los brotes formados fueron resultado del balance donde se consideraron todas las condiciones, como elementos que conforman el medio de cultivo y el contenedor donde se establecen.

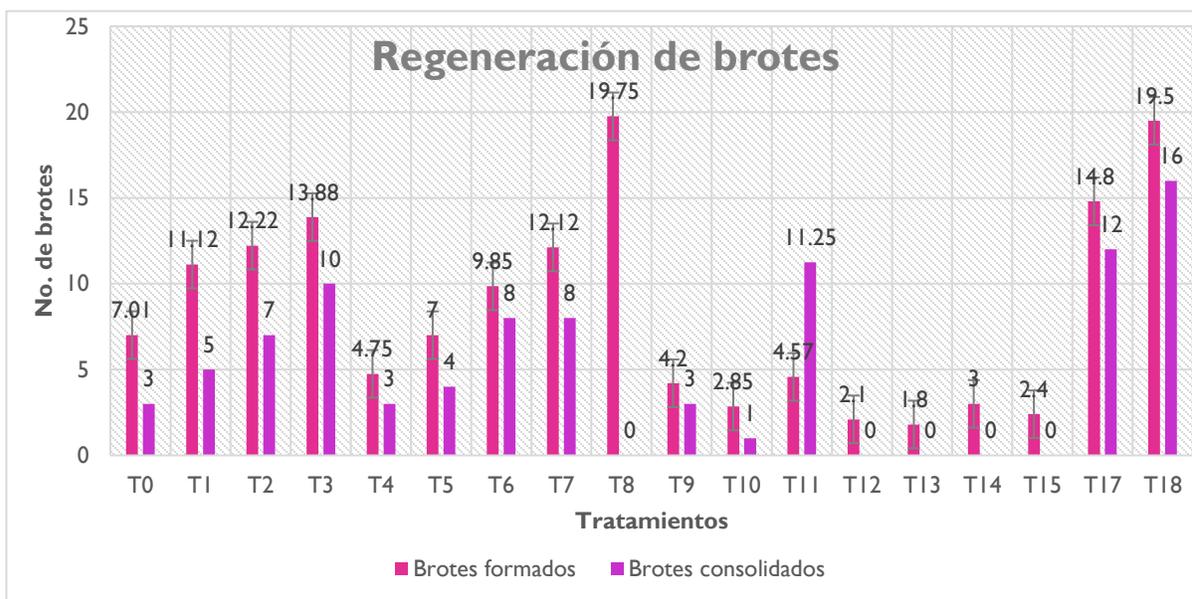
*Cuadro 4.* Cultivo de callo de *M. luethyi*, hiperhidricidad y morfogénesis. Resultados a 12 semanas de iniciados los cultivos. *Sun caps*® + Manitol (S+M), *Sun caps*® + Sorbitol (S+S).

Tratamiento	Abreviatura	Concentración (g/L)	Callo formado (g)*	No. Brotes formados**	No. Brotes consolidados	Oxidación %	
<b>Manitol</b>	T0	0	6.68 ±3.22	7.01 ±2.5	3	5	
	T1	4	2.61 ±1.34	11.12 ±1.37	5	7	
	T2	8	2.37 ±1.43	12.22 ±0.67	7	8.7	
	T3	12	0.96 ±1.22	13.88 ±1.21	10	9	
	T4	24	1.15 ±0.55	4.75 ±0.70	3	65	
<b>Sorbitol</b>	T5	4	3.4 ±2.00	7 ±3.50	4	7	
	T6	8	2.26 ±1.82	9.85 ±2.85	8	9	
	T7	12	4.08 ±2.17	12.12 ±2.10	8	9	
	T8	24	1.69 ±1.16	19.75 ±4.2	0	65	
<b>Manitol/Sorbitol</b>	T9	4	2.45 ±0.90	4.2 ±1.39	3	15	
	T10	8	3.12 ±1.64	2.85 ±0.90	1	13	
<b><i>Sun caps</i>®</b>	T11	0	0	4.57 ±1.06	11	20	
	<b>S+M</b>	T12	12	2.24 ±0.98	2.1 ±4.5	0	85
		T13	24	1.71 ±0.63	1.8 ±0.9	0	90
<b>S+S</b>	T14	12	2.09 ±1.25	3 ±2.60	0	80	
	T15	24	1.83 ±1.60	2.4 ±2.58	0	90	
<b>Hidrolizado de caseína</b>	T17	2.2	9.89 ±1.06	14.8 ± 4.21	12	4	
	T18	4.4	11.06 ±0.85	19.5 ±4.61	16	4	

\*Peso fresco

\*\*Por explante de callo: 3.77 g

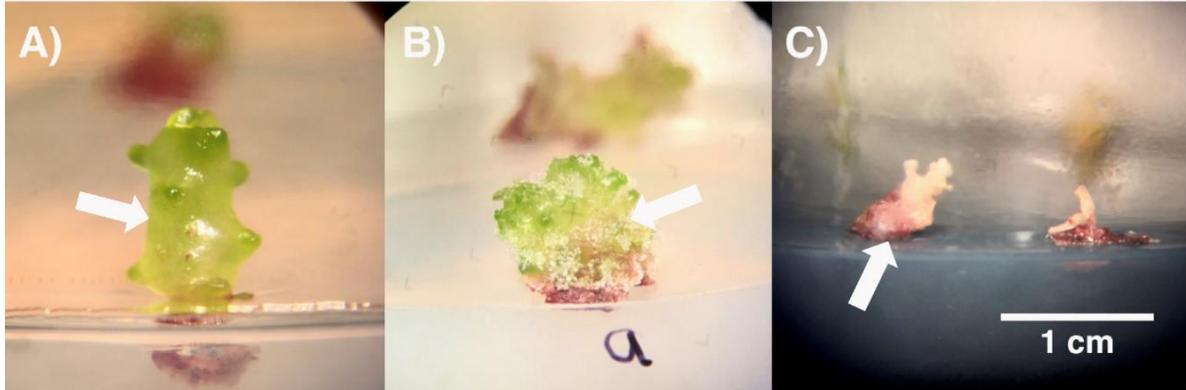
En el cultivo *in vitro* de *M. luethyi* cuando se formuló una combinación específica del medio de cultivo, añadido con osmorreguladores que atiende las necesidades fisiológicas de las plantas, se verá reflejado en la capacidad regenerativa. Ya que cada especie tiene un funcionamiento diferente con necesidades distintas. La concentración de cada elemento tiene un papel fundamental en el desarrollo de las plantas.



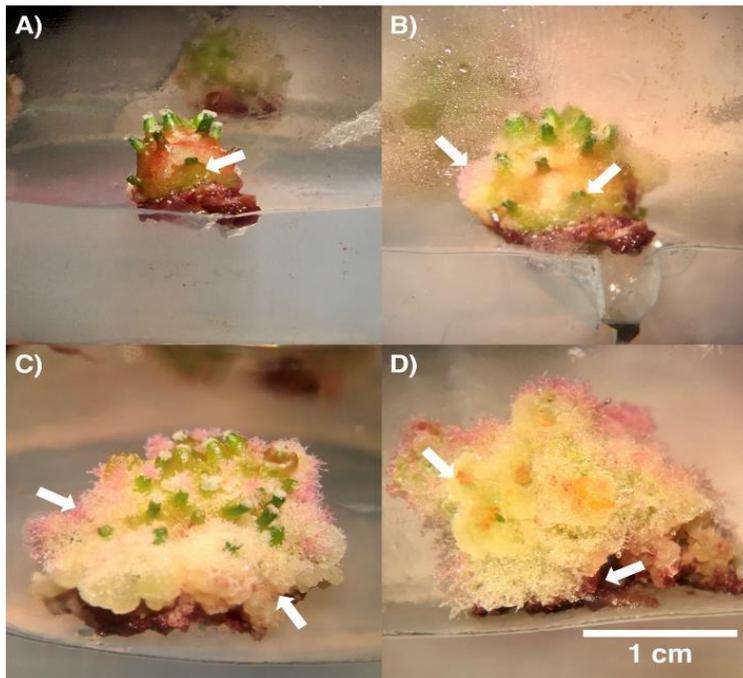
*Gráfico 5.* Regeneración y número de brotes por tratamiento en *M. luethyi*. No. de brotes totales por explante después de 12 semanas. Brotos formados vs brotes consolidados.

### Consolidación de brotes

En *M. luethyi* la oxidación, la hiperhidratación y por consecuencia de ésta, la formación de callo (*Fig.20*) fueron problemas que impedían la diferenciación y consolidación de brotes.

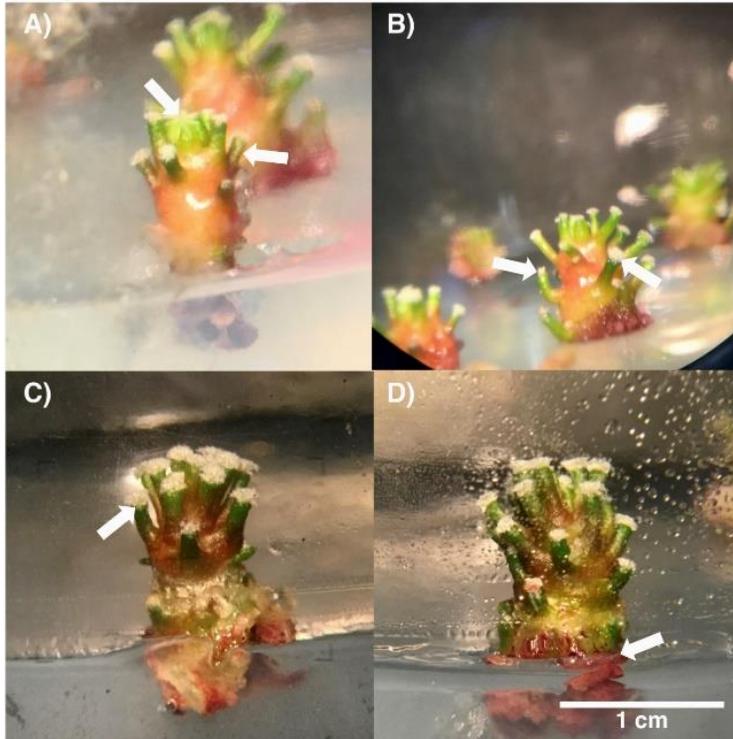


**Figura 20.** Principales desordenes fisiológicos en la consolidación de brotes. A) Brote hiperhidratado, con morfología elongada, pocos podarios sin aréolas donde se muestra un color verde hialino. Brote en medio de cultivo MS sin osmorreguladores. B) Brote hiperhidratado, donde se señala una gran formación de callo en la base y entre los podarios, sin la presencia de aréolas (medio MS con Manitol; 12 g/L), C) Brotes oxidados, los cuales como se observaba marcado perdieron la morfología, y presentaron colores rojizos posteriormente blanquecinos en la parte basal. medio de cultivo MS adicionado con carbón activado.



**Figura 21.** Etapas de la desdiferenciación por hiperhidratación en brotes consolidados. A) Brote consolidado donde se observa una proliferación interna de callo, B) Brote con callo interno, se observa la pérdida de estructuras morfológicas como los podarios (3 semanas), C) Brote amorfo con pérdida de estructuras donde se muestra la formación masiva de callo (4 semanas), D) Vestigios de los órganos principales, señalados los que antes eran podarios (8 semanas). Medio MS + manitol 8 g/L.

La hiperhidratación no sólo se presentó en el cultivo de callo *in vitro*, prosiguió en los brotes individualizados de todos los tratamientos anteriores. Las principales características que se observaron fueron la elongación de los brotes, las coloraciones blancas-verdes translúcidas (*Fig. 20A*), el callo generado en los órganos de los brotes (tallos y podarios) (*20B*), la presencia de oxidación en las partes basales (*19C*).



**Figura 22.** Brotes de diferentes tratamientos consolidados después de 6 y 8 semanas de su individualización. Se observa una morfología desarrollada con presencia de podarios con aréolas que surgen del ápice. A y B) Podarios en primeras etapas de desarrollo con colores más tenues, donde se señalan los podarios con sus aréolas, brotes subcultivados en medio MS 25% (6 semanas) C y D) Brotes consolidados sin formación de raíz, brotes en medio MS con Manitol 12 g/L (8 semanas). C) Podario donde se ubica una aréola con un nivel de desarrollo más avanzado, señalando espinas en la parte superior. D) Podarios más alargados y con color sólido donde se muestra la presencia de oxidación en la parte basal.

Como se observa en la *Figura 21*, la desdiferenciación de los brotes fue escalonada. La hiperhidratación asociada a la generación de callo y su proliferación causó en los brotes un aumento en masa celular que comenzó internamente y provocó su hinchamiento (2-3 semanas; *Fig. 21 A-B*) lo cual provocó su ruptura y un cambio en la coloración del callo a colores más claros, como naranja y amarillo con zonas rosadas (3 semanas; *Fig. 21 C-D*). La aparición más temprana de callo se detectó desde la primera semana a partir de que se individualizó un brote. Cuando comenzó la proliferación celular de callo, en menos de 8 semanas los brotes detuvieron su morfogénesis y continuaron con la proliferación de células indiferenciadas hasta que se

perdió completamente la morfología inicial (*Fig. 21-D*). En este proceso se generaron dos tipos de callos, en la parte basal, un callo compacto con colores blanquecinos y rojizos, mientras que en la zona media-apical, se produjo callo friable con colores translúcidos y remanentes de órganos (podarios).

En todos los ensayos realizados en *M. luethyi*, hubo organogénesis indirecta y los brotes formados presentaron algunas anomalías morfológicas. Por ejemplo, la forma y disposición de los podarios, que comúnmente presentan un arreglo helicoidal. Los tallos elongados generaron brotes que alcanzaron una altura de 3 cm, cuando generalmente miden 1.5 cm. Estas características pudieron deberse a la falta de luz, a la hiperhidratación como desorden fisiológico o bien a la variación somaclonal. Sala y Labra (2003) en su revisión bibliográfica mencionan que en el proceso de organogénesis indirecta, a menudo existe variación somaclonal y ésta permite exponer características diferentes que no están expresadas normalmente en la naturaleza.

A pesar del gran número de brotes formados, sólo algunos por tratamiento se consolidaron (*Cuadro 4*). Al ser expuestos a un ambiente proliferativo, hubo una desdiferenciación lo que provocó que regresaran a formar callo. Esto ya había sido señalado anteriormente por Camargo (2017) quien reportó que en los regenerantes de *M. luethyi* que logró establecer *in vitro* a pesar de que tuvieron una morfología normal, tuvieron un escaso desarrollo y después de 6 meses de tratamiento no rebasaron los 3 mm de altura, además de que fueron perdiendo coloración hasta que se oxidaron completamente. Los brotes de *M. luethyi* que se subcultivaron en osmorregulador mostraron una menor formación de callo o bien un retraso en la formación de éste (2 semanas), sin embargo, hubo brotes subcultivados en el tratamiento testigo, que no mostraron formación de callo, lo que sugiere que hay una regulación genética que evita la regresión o desdiferenciación cuando un brote ya se consolidó.

Cabe mencionar que al momento del subcultivo no todos los brotes estaban consolidados, también se tomaron brotes hiperhidratados (*Fig. 20A*), los cuales al ser individualizados comenzaron su consolidación.

Como se observa en la *Figura 22*, los brotes individualizados después de 6 semanas muestran una apariencia consolidada (*Fig. 22 A-B*), es decir, que del meristemo apical se desarrollaron los principales órganos que son podarios y aréolas que tuvieron una coloración más tenue. Después de 8 semanas, los brotes adquirieron una forma estructurada, con colores más sólidos y característicos de la especie, además las aréolas aumentaron en tamaño y hubo un gran desarrollo de espinas, en la base de todos los brotes se presentó oxidación (*Fig 22 C-D*). El tiempo de desarrollo de los brotes puede variar, sin embargo, después de 8 semanas de haber sido individualizados las plántulas tuvieron una talla aproximada de 1 cm de ancho y 1.5 cm de alto

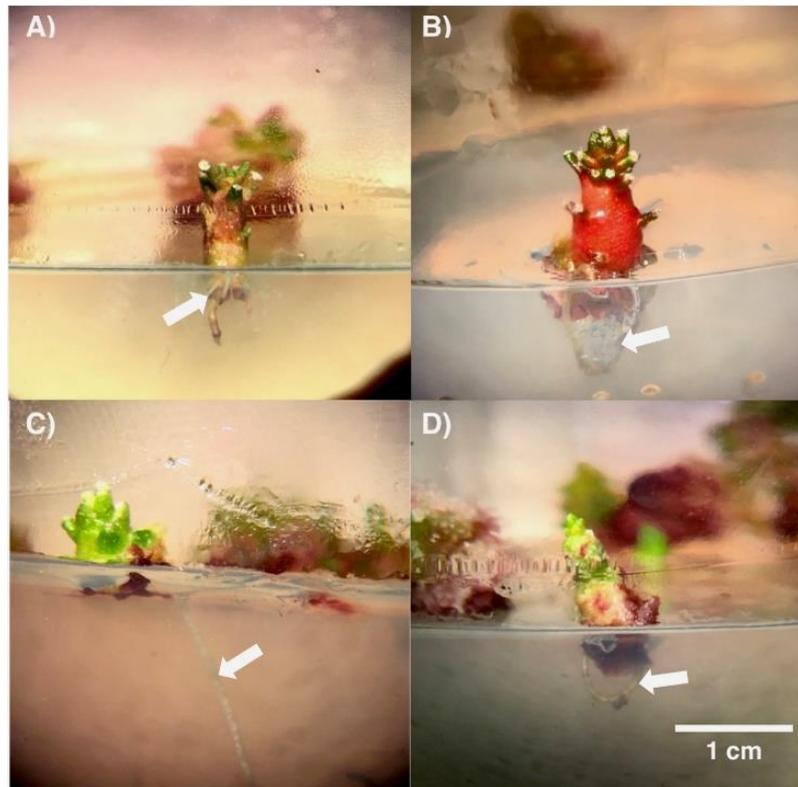
### Enraizamiento de brotes

La formación de raíces se observó después de 1 semana de la individualización. Las raíces se formaron de manera espontánea sin necesidad de ningún inductor como carbón activado o RCV. Moreira y Sánchez (2017) en su estudio con *Hylocereus ocamponis* menciona que el surgimiento espontáneo de la raíz es típico de especies de ecosistemas secos que están programadas genéticamente para formar una mayor masa radicular como estrategia de sobrevivencia. Camargo (2017) regeneró raíces de *M. luethyi*, provenientes de explantes apicales y podarios en presencia de RCV.

Como se observó en la *Figura. 23*, las plántulas anómalas tuvieron órganos poco desarrollados, los podarios fueron pocos o nulos (*Fig. 23 D*), la presencia de aréolas fue escasa (*Fig. 23 C-D*) y la raíz tuvo un escaso desarrollo, fue pequeña y delgada y surgió directamente del brote, su formación se dio a partir de las 4 semanas de que el brote fue individualizado. Camargo (2017) también describió la aparición de raíces espontáneas en *M. luethyi*, las cuales mencionó ya han sido reportadas para el género *Mammillaria* y *Notocactus*.

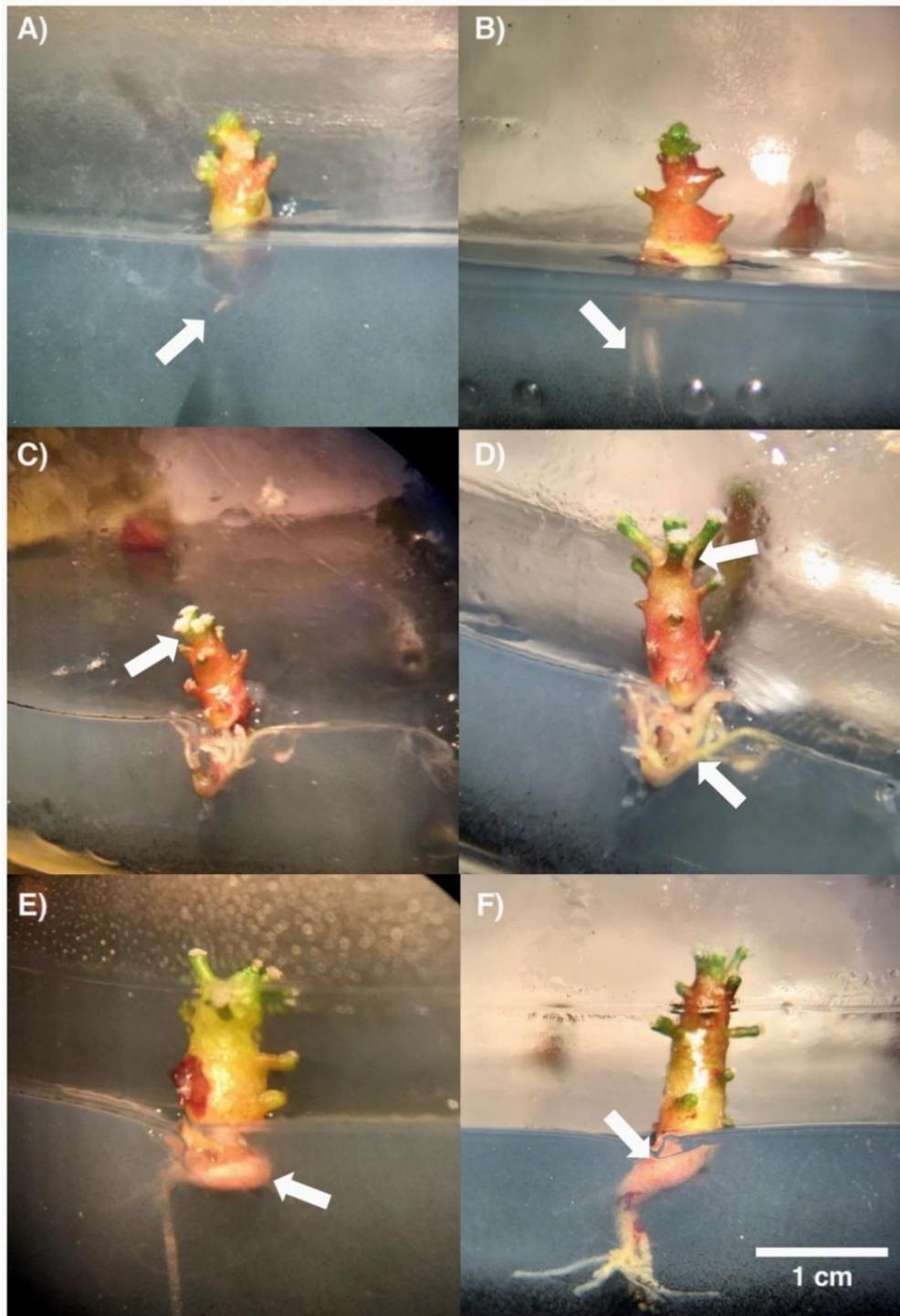
A diferencia de estas raíces espontáneas de morfología

anormal hubo brotes con una morfología normal que tuvieron un desarrollo en la raíz más homogéneo (*Fig. 24*). Estas raíces después de 4 semanas de que el brote fue individualizado, adquirieron una forma tuberosa con colores marrones rojizos y blanquecinos (*Fig. 24 A-C-*



*Figura 23.* Plántulas en medio MS 25%, después de 4 semanas de su individualización. A) Raíz poco desarrollada donde se señalan otras raíces pequeñas que no se desarrollaron. B) Plántula consolidada donde se muestra una raíz en forma de gancho con poco desarrollo. C) Plántula poco desarrollada con una raíz elongada (2.5 cm) con colores blanquecinos. D) Plántula con morfología amorfa señalando el poco desarrollo en la raíz.

E). Después de 8 semanas de desarrollo, la raíz se elongó y engrosó. Este tipo de desarrollo no había sido descrito para el estudio *in vitro* de esta especie.



**Figura 24.** Formación y consolidación de la raíz en *M. luethyi*. A-C-E) Plántulas con presencia de una raíz poco desarrollada (4 semanas después de su individualización), coloración rojiza-café con presencia de raíz y podarios poco desarrollados; señalado en C) una plántula con poco desarrollo en los órganos de podarios y aréolas. B-D-F) Plántulas en un estadio morfológico más avanzado (8 semanas), donde se señalan podarios con aréolas y una raíz de mayor tamaño (5 mm) y forma tuberosa. Medio de cultivo MS 25% + carbón activado.

## *Conclusiones*

- ❖ Se controló el problema fisiológico de hiperhidratación del cultivo *in vitro* de *M. luethyi*, por lo que fue posible la regeneración, consolidación y enraizamiento de brotes.
- ❖ El medio MS 25% adicionado con osmorreguladores, fue adecuado para la consolidación y formación de brotes ya que, disminuyeron la hiperhidratación debido a que el manitol y el sorbitol funcionaron como osmolitos y a su vez como fuente de energía para los cultivos.
- ❖ La adición de BAP 0.225 mg/L en ensayos con osmorreguladores fue fundamental para el comienzo de la organogénesis indirecta ya que, el tiempo de respuesta fue menor (2 semanas) en comparación con el testigo (>3 semanas).
- ❖ La primeras respuestas morfogenéticas en los cultivos de callos se dieron a las 2 semanas iniciada la aplicación de los diferentes tratamientos.
- ❖ Existieron diferencias significativas en los ensayos con osmorreguladores, se llegó a la determinación de que la concentración de osmorregulador que mejores resultados promovió fue la de manitol 12 g/L. La cual redujo la hiperhidratación en 85.63%, se formaron 0.96 g de callo en dos meses y se generaron en promedio 13.88 brotes por explante (4 meses) (*Cuadro 4*).
- ❖ Los brotes obtenidos en tratamientos con manitol, fueron homogéneos en su morfología y en el desarrollo de órganos que los brotes adicionados con sorbitol.
- ❖ Al sustituir la fuente de Nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) por hidrolizado de caseína, no se disminuyó la hiperhidricidad, al contrario, propició la proliferación masiva de callo formando hasta 11.6 g de callo (2 meses).

- ❖ Los ensayos con hidrolizado de caseína fueron los tratamientos con mayor número promedio de brotes formados (19.5 brotes por explante y 32 brotes consolidados en promedio) (*Cuadro 4*).
- ❖ El hidrolizado de caseína no propició la oxidación de los cultivos ya que obtuvo el porcentaje más bajo (4%).
- ❖ Los brotes regenerados con hidrolizado de caseína en comparación con los osmorreguladores y *sun caps*® fueron lo que mostraron una mejor consolidación y desarrollo.
- ❖ El uso de *sun caps*® mejoró la consolidación de brotes sobre todo en el testigo, el cual generó 11.06 g de callo y regeneró 11.25 brotes por explante (2 meses). Los cuales no presentaron signos de hiperhidratación y tuvieron un desarrollo homogéneo.
- ❖ A pesar de que los *sun caps*® redujeron la hiperhidricidad no fue recomendable adicionar osmorreguladores en concentraciones altas (>4 g/L), ya que esto produjo un fuerte choque osmótico que provocó la pérdida de los cultivos.
- ❖ El aumento en la concentración de agar (9.5-10 g/L) ayudó en la consolidación de brotes y la disminución de la hiperhidricidad de todos los cultivos.
- ❖ La primera observación de la formación de raíces se observó después de una semana de la individualización de todos los brotes (>10 mm tamaño) de los diferentes tratamientos. No fue necesario adicionar ningún tipo de inductor como carbón activado o RCV.
- ❖ La raíz mostró una morfología tuberosa la cual no se había reportado *in vitro*.
- ❖ Se lograron superar los problemas de hiperhidratación y consolidación de brotes en los cultivos gracias a la combinación de osmorreguladores con una citocinina (0.225

mg/L BAP), *sun caps*®, el uso de hidrolizado de caseína y al sustituir la fuente de Nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) por hidrolizado de caseína.

### Implicaciones para la conservación de *M. luethyi* y Perspectivas

*M. luethyi*, es una especie que en los estudios reportados se ha observado propicia a desórdenes fisiológicos como la hiperhidratación de sus tejidos. Los niveles elevados de hiperhidricidad han propiciado que el cultivo de *M. luethyi* se limite en gran parte al cultivo de callos. La hiperhidricidad también ha limitado el establecimiento (consolidación de los regenerantes *in vitro*) de la especie, debido a que la formación de brotes llega a ser escasa y muchas veces inconclusa. El callo llega a permanecer indiferenciado y los largos ciclos de cultivo, reducen la organogénesis indirecta y se cree reduce la potencialidad de la especie. Esto tiene implicaciones en el desarrollo de un protocolo funcional que permita obtener plántulas para su posterior aclimatización y seguimiento en su conservación. Al igual que otras cactáceas en alguna categoría de riesgo y que padecen de este desorden fisiológico, el estudio y control de la hiperhidricidad, es fundamental para continuar con su conservación y preservación, así como para cubrir la demanda comercial de la especie en cuestión y reducir el impacto que tiene el comercio ilegal de cactáceas.

El uso de osmorreguladores, contenedores con *Sun caps*® y el cambio de la fuente de Nitrógeno pueden llegar a ser alternativas para el control de este desorden fisiológico. Por ello es importante dar una continuidad a estos ensayos y tomar en consideración lo siguiente:

- ✓ Es recomendable el uso de osmorreguladores (se sugiere el manitol) en concentraciones mayores a 10 g/L y se podría experimentar en conjunto con el uso de hidrolizado de caseína para contener la hiperhidricidad.
- ✓ El elevar las concentraciones de agar a >10 g/L en la individualización de brotes da un efecto positivo por lo cual ,se podrían probar concentraciones más altas e incluso añadir algún enraizador acompañado con carbón activado.
- ✓ Las citocininas en concentraciones bajas (0.225 mg/L) mostraron buenos resultados por lo cual se podría experimentar quizá con otras como KIN, 2iP o mTp en bajas concentraciones (<0.1 mg/L) y sin auxinas.
- ✓ El uso de *Sun caps*® fue efectivo con concentraciones bajas de osmorreguladores (<4 g/L), por lo cual se podría experimentar su uso en cultivos con hidrolizado de caseína o cultivos adicionados con concentraciones más elevadas de citocininas (>0.1 mg/L).
- ✓ Se sugiere explorar cultivos en Sistemas de inmersión Temporal (SIT), el empleo de estos biorreactores permitiría aplicar períodos cortos y espaciados del medio de cultivo

para someter al inóculo por períodos extendidos con baja nutrición, humedad que pudieran llevar a la consolidación de brotes, plántulas y a su aclimatización previa al paso a suelo en una condición autótrofa (más) funcional.

Los esfuerzos por estudiar, propagar y conservar a ésta y otras especies deben ser notados, reconocidos, apoyados y multiplicados, se debe priorizar la protección de la vida de flora y fauna silvestre, no sólo como un objetivo académico sino también por una realidad en la que está comprometida nuestra propia seguridad y existencia como especie. En el presente estudio, con *M. luethyi*, se establecieron condiciones de cultivo *in vitro* en las que se trató de reducir de manera controlada el agua y humedad disponible en el ambiente de cultivo; a mayor cantidad de agua, más hiperhidratación, más desorden fisiológico, menos plantas. Los efectos del Cambio Climático están llevando al Planeta, a nuestro hogar, a ambientes extremos, de una severa sequía a lluvias torrenciales con inundaciones que duran semanas o más tiempo y el arrastre con la desaparición del suelo en el que la flora existe, cultivada o silvestre, de la que dependen nuestros alimentos, control del clima, el aire que respiramos. No obstante la degradación de los ecosistemas, se prevé que la demanda mundial de productos vegetales incrementará en los próximos años así como las necesidades ecológicas de reforestación, lo que hace necesario producir plantas en suficiente cantidad y con las características que respondan a tal demanda.

## ***Bibliografía***

- Ahumada, M. (2003). Agroecología: necesidad e imperativo productivo para la agricultura latinoamericana. *Boletín de la Asociación Vida Sana Verano*. 13(4): 14-17.
- Amen, T. (2011). ¿Un pie grande en un planeta pequeño? Haciendo cuentas con la huella ecológica. Colección La sostenibilidad tiene muchos rostros. Alemania: Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ). Global Footprint Network. 177-189.
- Ammirato, P. V. (1983). Embriogénesis. En: Evans, DA, Sharp, W. R., Ammirato, P. V. y Yamada, Y., Eds., *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 1, Macmillan Publishing Co., Nueva York, 82-123.
- Amiot, M., Forget y F.; Goupy, P. (1996). Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba Polonica* 42: 237-247.
- Anderson, E. F. (2001). *The Cactus Family*. Timber Press, Estados Unidos de América. 86-98.
- Anta, F. y Carabias, S. J. (2008). Consecuencias de las políticas públicas en el uso de los ecosistemas y la biodiversidad, en *Capital natural de México*, vol. III: Políticas públicas y perspectivas de sustentabilidad. Conabio, México, pp. 87-153.
- Anzueto, A., y A. L. de MacVean. (2000). Los cercos vivos en Guatemala. *Revista, Universidad del Valle de Guatemala*. 9:12-17.
- Arias, S., G. Ulises, M.C. Mandujano, M. Soto y J. Golubov. (2005). Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-12001 (México), La Lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 50(4): 100-125.
- Arias, S., y Flores, J. (2013). La familia Cactaceae, páginas 492-504. En Márquez-Guzmán J, Collazo-Ortega M, Martínez-Gordillo M, Orozco-Segovia A y Vázquez-Santana S (Eds). *Biología de Angiospermas*. Prensas de la Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Arias, S., y Véliz, P. M. E. (2006). Diversidad y distribución de las Cactaceae en Guatemala. *Biodiversidad de Guatemala* 1: 229-238. Recuperado de <https://pdfslide.net/documents/diversidad-y-distribucion-de-las-230-biodiversidad-de-guatemala-volumen.html>
- Aridjis, H. (2020). En México te matan por defender la naturaleza. Recuperado 23 de mayo de 2020, de <https://www.nytimes.com/es/2020/01/31/espanol/opinion/homero-gomez-mexico.html>

- Ascencio, C. A., H. Gutiérrez, P., B. Rodríguez G., y A. Gutiérrez M. (2008). Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Scientia Horticulturae* 118:155–160.
- Azofeifa, D. Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153.  
<https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Backeberg, C. (1959) Notes on *Neogomesia*, *Pediocactus*, *Utahia*, *Navajoa* and *Pilocanthus* (*Cactaceae*). *Nat. Cact. Succ. Journ.* 14(4): 63
- Backeberg, C. (1961). *Die Cactaceae: Handbuch der Kakteenkunde Band V (Cereoideae)*. G. Fischer, Jena. pp. 2631–3543.
- Badii, M. H., Guillen, A., Rodríguez, C. E., Lugo, O., Aguilar, J., y Acuña, M. (2015). Biodiversity Loss: Causes and factors. *Biodiversity Loss: Causes and Factors*, 10(2), 156-174. Recuperado de <https://www.britannica.com/science/biodiversity-loss>
- Bairu, M.W., N. Jain, W.A. Stirk, K. Dolezal, y J. Van Staden. (2009). Solving the problem of shoottip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany* 75:122–127.
- Bhatia, S. (2015). Cultivo de tejidos vegetales. Aplicaciones modernas de la biotecnología vegetal en las ciencias farmacéuticas, 31-107. [doi: 10.1016 / b978-0-12-802221-4.00002-9](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802221-4.00002-9)
- Bello, B., J. Poot P., W., Iglesias A., L. Caamal V., H, y de la Cruz Diaz, S., M. (2014). Comparación del efecto de osmorreguladores e inhibidores del crecimiento en la conservación *in vitro* de caña de azúcar. *Agrociencia*, 48(4), 439-446. Recuperado en 01 de mayo de 2020, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952014000400008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952014000400008&lng=es&tlng=es).
- Beyl, C. (2011). Getting Started with Tissue Culture-Media Preparation, Sterile Technique, and Laboratory Equipment. En: Trigiano, R.N. y Gray, D.J. (Eds.), *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Florida, E.U.A.: CRC Press. 11-26
- Böcker, A. (1995). *Mammillaria sanchez-mejoradae* Gonzalez – Neufund, order schon 30 Jahre bekannt? - *Mitteilungsbl. Arbeitskr. Mam.* 19(2): 84-89.
- Bracamonte, J. (2015). El Género *Mammillaria*. *Nuestra Tierra. UNAM*, 23 (4): 5-18
- Brächet, C. y M. Lacoste (1995). *Mammillaria sanchez-mejoradae* Gonzalez und ihre Heimat. *Mitteilungsbl. Arbeitskr. Mam.* 19(2):58-63.

- Brand, M. H. (1993). Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 35: 203-209.
- Bravo, H., H. (1978). *Las Cactáceas de México* (2ª ed.). D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria.
- Bravo, H., H. y Sánchez, H. (1991). *Las Cactáceas de México* (2da Ed.). UNAM, D.F., México: Biblioteca de Ciencias. Vol II.
- Bray, E., Bailey S., J; Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.
- Brown, D. C. W., Leung, D. W. M, y Thorpe, T, A. (1979). Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant*, 46: 36-41.
- Buddendorf, J., J.M.C., Woltering, E.J. (1994). Components of the gaseous environment and their effects on plant growth development *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 15: 1-16.
- Cabrera, H. S. L., Chávez, Á., V. M., Sandoval Z., E., L., Richard E, y Cruz, S., F. (2008). Morfogénesis *in vitro* de *Dioon merolae* de Luca, Sabato y Vázquez-Torres (zamiaceae, cycadales) a partir de megagametofitos y embriones cigóticos. *Interciencia*, 33(12): 929-934. Recuperado en 15 de enero de 2021, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442008001200013&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008001200013&lng=es&tlng=es).
- Camargo, S. A. (2017). Cultivo *in vitro*, como estrategia de conservación de *Astrophytum caput-medusae* y de *Mammillaria luethy* (Cactaceae), especies amenazadas. Tesis de maestría, en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Camargo, S. A. (2017). Cultivo *in vitro*, como estrategia de conservación de *Astrophytum caput-medusae* y de *Mammillaria luethyi* (Cactaceae), especies amenazadas. Tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cárdenas, L. M. A. (1999). Osmorreguladores en el cultivo *in vitro* de portainjertos de cítricos. Tesis Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo. de México, México. 94 p.
- Cárdenas, L., y Villegas, A. (2002). Osmotic potential of culture medium with different compounds for the *in vitro* propagation. *Fitotec*, 25(2), 213–217.
- Carpintero, O. (2005). El Metabolismo de la Economía Española. Recursos Naturales y Huella Ecológica (1955 – 2000). En la Colección Economía y Naturaleza, Fundación Cesar Manrique.

- Cassells, A. y Curry, R. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145-157.
- Cat-Conabio. (2017). Catálogos de autoridades taxonómicas. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*, en (consultada en mayo de 2020).
- CBD. (2000). Sustaining life on Earth: How the Convention on Biological Diversity promotes nature and human well-being. (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Canada).
- Chapman, A. (2009). Numbers of Living Species in Australia and the World 2nd edn. 85 pp.
- Ceballos, G. (2014). Mammals of Mexico. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 5(19): 4, 223 p.
- CENTA. (2018). Reguladores de Crecimiento *in vitro*. Recuperado 28 de enero de 2021, de <http://centa.gob.sv/upload/laboratorios/biotecnologia/2018/Reguladores%20de%20Crecimiento.pdf>
- Chacón, A.G.; F. Saborio, L. Gómez, S. Torres, y R. Valverde. (2000). El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de Yampi (*Dioscorea trifida*) y Ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Costarricense*, 24: 57-64.
- Chen, T. H. Y Murata, N. (2002). Mejora de la tolerancia al estrés abiótico mediante ingeniería metabólica de betaínas y otros solutos compatibles. *Opinión actual en biología vegetal*, 5 (3), 250-257. [doi: 10.1016/s1369-5266\(02\)00255-8](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00255-8)
- Chen, U. C., Ch., N. Hsia, D.C. Agrawal, and H.S. Tsay. (2006). Influence of ventilation closures on plant growth parameters, acclimation and anatomy of leaf surface in *Scrophularia yoshimurae* Yamazaki - a medicinal plant native to Taiwan. *Botanical Studies* 47(3):259-266.
- Civatti, L., Marchi, M., Schnadelbach, A., Bellintani, M. (2017). *In vitro* multiplication and genetic stability of two species of *Micranthocereus* Backeb. (Cactaceae) endemic to Bahia, Brazil. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 131:537–545.
- Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F., Phillips, G. C., y Butler-Nance, S. A. (1990). Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(2), 337–343. <https://doi.org/10.21273/jashs.115.2.337>
- Conabio. (2006). Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, México.

- Contreras, O. N., Jauregui, R. J., Santos, D., M., Balch, E. (2020). Efecto of culture media on the production of betalains from hairy root cultures of four cacti species. *Agrociencia*. 53. 681-696.
- Costanza, R. (2014). Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change* 26: 152-158, doi:[10.1016/j.gloenvcha.2014.04.002](https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2014.04.002)
- Cram, W. J. (1984). Mannitol transport and suitability as an osmoticum in root cells. - *Physiol. Plant*, 61: 396-104.
- Cutak, L. (1952). Spine chacts. *Cact. Succ. J. (US)* 24(5) 159.
- Dantas, A. K., Majada, J. P., Fernández, B. y Cañal, M. J. (2001). Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions, 33 (3), 237–243. doi: [10.1023 / a: 1017542106252](https://doi.org/10.1023/a:1017542106252)
- Das, D., Reddy M., Upadhyaya K. y Sopory, S. K. (2002). An efficient leaf-dise culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 991-1005.
- Datta, S. (2019). Composition of Plant tissue Culture medium. DOI: [10.13140/RG.2.2.36498.91844](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36498.91844).
- De Medeiros, L., De Ribeiro, R., Gallo, L., De Oliveira y E., Dematte, M. (2006). *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 84:165–169.
- Debergh, P. C. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, 59(2), 270–276. doi:[10.1111/j.1399-3054.1983.tb00770.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb00770.x)
- Debergh, P.C. y Harbaoui, Y. (1981). Mass propagation of globe actichoke (*Synara scolymus*): evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53, 181–187.
- Díaz, N., L. Candelaria, y C. Wilches, O. E., y Beltrán, H., J. D. (2015). Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea* spp por crecimiento mínimo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVII(1),32-39.[fecha de Consulta 1 de Mayo de 2020]. ISSN: 0123-3475. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=776/77639196005>
- Dobránszki, J.; K. Magyan, T., y E. Tombácz. (2011). Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. *Plant Biotechnol Rep.*, 5: 345-352.
- Doneso, I. (1987). Factors influencing vitrification of carnation and conifers. *Acta Hortic.* 212, 67–176.
- Efferth, T. (2018). *Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. Engineering.* doi:[10.1016/j.eng.2018.11.006](https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006)

- Escobedo, B.L., O.H.T. García, M.R. Rojas y G.F. Ramírez. (2004). Propagación *in vitro* de *Mammillaria luethyi* G.S. Hinton 27-31. En Avances y Resultados de proyectos de Investigación 2004, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila. 452p.
- Espinosa, D., Ocegueda, S., Aguilar, C., Flores, O. y Llorente, J. (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.
- Espinosa, P., H. (2014). Biodiversidad de peces en México. Revista Mexicana de Biodiversidad 85 : 450-459.
- Fay, M. F. (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservations? Biodiversity & Conservation, 3(2): 176-183.
- Fehér, A. (2019). Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? Frontiers in Plant Science, 10. Published. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Ferl, R. y Paul A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists, 312-357.
- Fitz, M., W. A. y Fitz M. B. (2000). Action 72. Indigenous plant propagation. Cactus and Succulent Conservation Newsletter 8:6.
- Fitz, M.,W.A, y Fitz M. B. (1998). Fieldnotes: *Mammillaria luethyi*, a new species has been described and an old mystery solved. Cact. Succ. J. (US), 70 (1): 23–26
- Martínez, A.F., y Medina, G. (2010). El género *Mammillaria* en Oaxaca: Relación entre filogenia y la distribución geográfica. Cactáceas y suculentas mexicanas, 55(4): 100-101.
- Flores, G. y Velazco, M. C. (2008). Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. CIENCIA-UANL, [ISSN 1405-9177](https://doi.org/10.1016/S1405-9177(08)00011-1), 11(1): 256
- Foladori, G. (2007). La reedición capitalista de las crisis ambientales. POLIS, Revista Latinoamericana, 6(17), .[fecha de Consulta 17 de Mayo de 2020]. ISSN: 0717-6554. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305/30501718>
- Fraguas, C.B., C.M.D. Dornelles, y G.P.P. Lima. (2009). *In vitro* bud induction and multiplication of cv. ‘IAC Gomo-de-mel’ pineapple fruit with benzyl amino purine and naphthalene acetic. Ciencia Rural 39(6):1682-1687.
- Fraguas, C.B., M. Pasqual, L.F. Dutra, y J.O. Cazetta. (2004). Micropropagation of fig (*Ficus carica* L.) ‘Roxo de Valinhos’ plants. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 40(5):471-474.

- Franco, M. M., Gómez, F. R., Tamez, G. P, Castillo, L. L., Rodriguez, P. C. (2012). *In vitro* immunopotentiating properties and tumour cell toxicity induced by *Lophophora williamsii* (peyote) cactus methanolic extract. *Phytotherapy Res.*2003; 17:1076-1081. [doi: 10.1002/ptr.1313](https://doi.org/10.1002/ptr.1313).
- Frank, T., Kavers, C., Gaspar, T., Dommès, J., Deby, C., Greimess, R., Didier, S., Duspont, G.D. (2004). Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelreite: a controlled stress response. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 519– 527.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., y Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [doi:10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gaona, D., A. (2018). Regeneración *in vitro* de *Atrophytum asterias* (Zucc.) Lem. Cactácea en peligro de extinción. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX. México.
- García, G. R., Quiroz, K., Carrasco, B., y Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e investigación agraria*, 37(3), 5-30. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202010000300001>
- García, O., H. T. (2008). Control de Hiperhidricidad en Brotes de cultivo *in vitro* por promotores de edurecimiento fisiológico en *Turbinicarpus valdezianus* (Moller) G y F. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buena vista, Saltillo, Coahuila, México.
- Gaspar, T. (1986) Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: Greppin H, Penel C y Gaspar Th (eds) *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University of Geneva, Switzerland. 455–468.
- Gaspar, T. (1991). Vitrification in micropropagation. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: High-tech and micropropagation I*. Berlin: Springer, 116-126.
- Gaspar, T., Kevers, C., Debergh, P. C., Maene, L., Paques, M. y Boxus, P. (1987). Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bonga, J.M., Durzan, D.J. (Eds.), *Cells and Tissue Culture in Forestry*, vol. I. Martinus Nijhoff Publication. 152–166.
- Geneve, R. L (2010). Propagation from non-meristematic tissues. Organogenesis. In: *Plant Cell Culture, Development and Biotechnology*. R.N. Trigiano and D. J. Gray (eds.). CRC Press, LLC, Boca Raton, Florida. pp. 243-256.
- George, E. (1996). Plant propagation by tissue culture; part 2. In *Practice*. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361.

- George, E. F. (1993). Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Exergetics Ltd. Edington, Wilts. England. 574.
- 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(4), 319–332. [doi:10.1016/s0304-4238\(02\)00031-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(02)00031-6)
- Glass, C. y R. Foster (1978). Whats new. *Cact. Succ. J. (US)* 50(2): 60.
- Goettsch, B., Hilton, T., C., Cruz, P., G., Duffy, J. P., Frances, A., Hernández, H. M. y Gaston, K. J. (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*, 1(10), 1-7. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.142>
- González, L. (2006). Propagación *in vitro* de *Echinocactus grusonii* HILD. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- González, R. (1992). *Mammillaria sanchez-mejoradae* una especie nueva de la familia *Cactaceae*. *Cact. Suc. Méx.* 37(3): 55.
- González, O., Juárez, P., W. R., Ronquillo, N., Estrada, G. B., Heredia, G. P., Jiménez, R. A. y Chávez, A. V. M. (2012). El Cultivo de Tejidos Vegetales; alternativa de oportunidades para el desarrollo de México. UNISIERRA.
- Gracidias, D. P., C.O. González, A.V.M. Chávez y M. Mata, R. (2010). Regeneración de *Mammillaria luethyi* G.S. Hinton. VIII Simposio Internacional sobre Flora Silvestre en Zonas Áridas Memorias en extenso. Biotecnología Vegetal. Hermosillo Sonora.
- Gurvich, D. E. (2010). Registro de herbivoría de guanaco, *Lama guanicoe*, sobre *Tephrocactus alexanderi* (Cactaceae, Opuntioideae) en el Parque Provincial Ischigualasto (Prov. San Juan, Argentina). *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 7(3):7-9.
- Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila. (2003). Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM, CONABIO, México.
- Haberlandt, G. (1902) Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Sber Akad Wiss Wein* 111:69–92.
- Han, H, Zhang, S. y Sun, X. (2009). A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. *African J Biotechnol.*;8: 348–353 6870.
- Hazarika, B.N. (2006). Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*. 108. 105-120. Doi: [10.1016/j.scienta.2006.01.038](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038)

- Herman, E. B. (2015). Recent advances in plant tissue culture XXI. Media and techniques for growth, regeneration and storage: 2011–2015. Agritech Consultants Inc., Shrub Oak, NY 148.
- Hernández, H. M. (2006). La vida en los desiertos mexicanos. Fondo de cultura económica. México, CDMX. 188 pp
- Hernández, H. M. y Gómez, H., C. (2011). Mapping the cacti of Mexico. Succulent plant research (7) Milborne Port, England: dh Books.
- Hernández, R., M, Diosdado, E., Coll, F, y Cabrera, J. C. (2010). Efecto de los biorreguladores del crecimiento en la embriogénesis somática demandarina Cleopatra(Citrus reshni Hort. ex Tan.). *Cultivos Tropicales*, 31(3), 00. Recuperado en 15 de enero de 2021, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000300015&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000300015&lng=es&tlng=es).
- Hildebrandt, A. C. y Riker, A. J. (1949). The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, parisdaisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue *in vitro*, Am. J. Bot. 36: 74-85.
- Hinchliff, C. E., S.A. Smith, J.F. Allman, J.G. Burleigh y R. Chaudhary. (2015). Synthesis of phylogeny and taxonomy into a comprehensive tree of life. Proceedings of the National Academy of Sciences 112: 12764-12769.
- Hinton, G. S. (1996). *Mammillaria luethyi* (Cactaceae), a new species from Coahuila, Mexico. *Phytologia* 80 (1): 58–61. [dated Jan 1996 but published 27 Sep 1996].
- Hollis, H. y H. Sánchez M. (1991) Las Cactaceas de Mexico. Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad México, México.
- Hoxey, P. (2012). *Mammillaria luethyi*. In search of a botanical jewel from Mexico. The Cactus Explorer 3: 30–36.
- Huanca, P. M. (2019). Establecimiento y propagación *in vitro* de *Neowerdermannia chilensis* subsp. *peruviana* (Ritter) Ostolaza (Cactaceae) a partir del tejido areolar. (tesis de licenciatura). Universidad Nacional del Altiplano de Puno. Perú. Disponible en: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/11555/Huanca\\_Percca\\_Maritz\\_a.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/11555/Huanca_Percca_Maritz_a.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Huetteman, C. A, Preece, J. E. (1993). Thidiazurn: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:105–109.
- Husain, M. K. y Anis, M. (2009). Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiologiae Plantarum*. 31(4): 765-772.

- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., y Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 9. <https://doi.org/10.5772/50568>
- Inglese, P., F. Basile y M. Schirra. (2002). Cactus pear fruit production. En: P.S. Nobel (ed.). *Cacti biology and uses*. University of California Press, California. 163-183.
- Jackson, M. B., Abbott, A. J., Belcher, A. R., Hall, K.C. (1987). Gas exchange in plant tissue cultures. In: Jackson, M.B., Mantell, S.H., Blake, J. (ed.): *Advances in the Chemical Manipulation of Plant Tissue Cultures*. Pp. 57-71. British Plant Growth Regulator Group, Bristol.
- Jackson, M. B., Abbott, A. J., Belcher, A. R., Hall, K. C. (1987). Gas exchange in plant tissue cultures. In: Jackson, M.B., Mantell, S.H., Blake, J. (ed.): *Advances in the Chemical Manipulation of Plant Tissue Cultures*. Pp. 57-71. British Plant Growth Regulator Group, Bristol.
- Janeba, Z. (2017). From the Mysterious Plant to the Most Common Mammillaria: the Story of *Mammillaria luethyi*. *Cactus and Succulent Journal*, 89(6), 248-255. <https://doi.org/10.2985/015.089.0602>
- Jiménez S., C. y Sosa R., J., Cortés, C., P., Breceda S. C., A., y Íñiguez D., L., y Ortega, R., A. (2014). México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. *Investigación y Ciencia*, 22 (60), 16-22.
- Jiménez, S., C. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria* 12 (1). <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num1/art04/index.htm>
- Jiménez, T., F. y Agramonte, D. (2013). *In vitro* culture and macropropagation as way of sustainability of forest species propagation. *Biotecnología Vegetal*, 13(1), 8-21. Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/89/456>
- Joyce, S. M., Cassells, A. C. y Mohan J., S. (2003). Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 103-121.
- Kataeva, N. V., Alexanandrova, I. G., Butenko, R. S., Dragavtsera, E.V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 14, 31-40.
- Kevers, C., Franck, T., Strasser, R. J. (2004). Hiperhidricidad de los brotes micropropagados: un cambio de estado fisiológico típicamente inducido por el estrés. *Cultivo de células, tejidos y órganos vegetales*. 77:181-191. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016825.18930.e4>
- Kevers, C., Gaspar, T. (1985). Vitrification of carnation *in vitro*: changes to ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 4, 215-223.

- Klerk, G. J. (2009). *Adventitious Organogenesis*. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. doi:10.1002/9780470054581.eib009
- Knauss, J. F. (1976). A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* cv. "perfection" free of fungi and bacteria. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 89:293-296.
- Kozai, T. (1991). Autotrophic micropropagation. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.): *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, New York. 17: 313-343.
- Larqué, S., A. y C. Trejo. L. (1990). *El Agua en las Plantas*. Edit. Trillas. México. 88 p.
- Lázaro, C., J. O., Mata, R., M., González, D. y Reverchon, F. (2018). *In vitro* propagation of endangered *Mammillaria* genus (Cactaceae) species and genetic stability assessment using SSR markers. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 54: 518–529 <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9908-z>
- Lema, R., J. y Kulus, D. (2014). Micropropagation of Cacti. A review. *Haseltonia*, 19:46-63.
- Lincoln, Z. (2006). *Plant Tissue Culture*. *Fisiología Vegetal*. Universitat Jaume. 2:1338.
- Lipavska, H. y D. Vreugdenhil, D. (1996). Utake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45 (2):103-107.
- López, E., A.L., López, H. M., y Loaiza, A., C. (2016). Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* link et otto (cactaceae). *Polibotánica*, (42), 153-166. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.42.8>
- Loyola, V., V. y Ochoa A., N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. [10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)
- Lüthy, J. (2007). Una nueva localidad para *Mammillaria luethyi* GS Hinton. *Cactus mundo* 25 (suplemento): 7-10. Pilbeam, J. 1999. *Mammillaria*. Cirio Servicio de Publicaciones, de Southampton.
- Lüthy, J. y Hinton, G. (1998). The discovery of *Mammillaria luethyi* BCSJ 16(1):39-42
- Malda, G., H. Suzan, y R. Backhaus. (1999). *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Sci. Hort.* 81:71–87.
- Majada, J. P., Sierra, M., Sánchez, R. (2001). Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Science Horticulturae*, 87, p.121-130.
- Mancilla, P. L. V. (2014). Regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. Y *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. UNAM. 59p.
- Marin, A., Gella, R. y Herrero, M. (1988). Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. *Ann. Bot.* 62, 663–670.

- Mauseth, J. D. (2004). Giant Shoot Apical Meristems in Cacti Have Ordinary Leaf Primordia but Altered Phyllotaxy and Shoot Diameter. *Annals of Botany*, 94(1), 145–153. [doi:10.1093/aob/mch121](https://doi.org/10.1093/aob/mch121)
- Mohan, J., S. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118, 153–166. <https://doi.org/10.1023/A:1004124519479>
- Mohemius, G. (2003). Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus kotschoubeyanus*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 85p.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., y Hohn, B. (2006). Transgeneration memory of stress in plants. *Nature*, 442(7106), 1046-1049. <https://doi.org/10.1038/nature05022>
- Molinos, C., Villegas, A., Sánchez, P., Alcántar, G., Rodruguez, M., y Ruiz, L. (2004). Efecto del potencial osmótico y contenido de CA en el medio en el cultivo sobre la distribución de CA<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>, producción de biomasa y necrosis apical de vid “R110”. *Interciencia*, 29 (7): 384-388.
- Mora, C., D. P. Tittensor, S. Adl, A. G. Simpson y B. Worm. (2011). How many species are there on Earth and in the ocean?. [PLoS biology 9 : e1001127.](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127)
- Moreira, P. M., y Sánchez, R, A. (2017). Estudio comparativo *in vitro* de estrategias adaptativas en especies de *Hylocereus*, Cactaceae, con distribución ecológica contrastada. *Bionatura*, 2(3), 348-356. <https://doi.org/10.21931/rb/2017.02.03.3>
- Mroginski, L. A. y Roca, W.M. (1993). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En: WM Roca, LA Mroginski, editores. *Cultivo de Tejidos en la agricultura*, Cali: CIAT, 19-40.
- Murashige, T., Skoog, F.C. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Nerd, A., N. Tel, Z. y Y. Mizrahi. (2002). Fruit of vine and columnar cacti. En: P.S. Nobel (ed.). *Cacti biology and uses*. University of California Press, California. Pp. 185-197.
- Nic L., E., Govaerts, R., Belyaeva, I., Black, N., Lindon, H., Allkin, R., Magill, R. y Nicolson, N. (2016). Counting counts: Revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. *Phytotaxa*. 272. 82. [10.11646/phytotaxa.272.1.5.](https://doi.org/10.11646/phytotaxa.272.1.5)
- Ogasawara, N. (2003). Ventilation and light intensity during *in vitro* culture affect relative growth rate and photosynthate partitioning of *Caladium plantlets* after transplanting to *ex vitro*. *Acta Horticulturae* 616:143–149.
- Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology*. 22. 119-125. [10.5511/plantbiotechnology.22.119.](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.22.119)
- Olmos, E.; Hellin, E. (1998). Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. *Scientia Hort.* 75:91-101.

- Ordóñez, M. M. A. (2003). Propagación *in vitro* de *Mammillaria voburnesis* Scheer. (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Palacios, R. M. P. (2010). Efectos del cambio climático sobre la distribución de nopales (género *Opuntia* y *Nopalea*: Cactaceae) en la región central de México. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México, D.F.
- Pérez, N., D., D. M. Larrauri, O., y Álvarez Muñoz, P. (2015). La huella ecológica de las naciones. Reflexiones globales, particularidades ecuatorianas/The ecological footprint of nations. Overall thoughts and the ecuadorian context. *Ciencia Unemi*, 8(14), 93. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol8iss14.2015pp93-103p>
- Pérez, P. M. E. M., Pérez E. A., Villalobos E. R., Meza L. R. R. Mornones y Lizalde H. J. V. (1998). Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by auxiliary proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 34:131-135.
- Phan, C. T., Letouze, R. (1983). A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and hydroxycinnamate. CoA ligase activity. *Plant Science. Lett.* 36, 323–327.
- Phillips, G. C., Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 55, 242–257 <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Picoli, E. A. T. (2001). Hyperhydricity *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*. 160: 857-868.
- Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Edic. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Pierik, R. L. M. y H. H. M. Steegmans. (1975). Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of rhododendrom. *Scientia Hort.* 3:1-20.
- Piqueras, A., Cortina, M., Serna, M. D., Casas, J. L. (2002). Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. *Plant Science*. 162, 671– 678.
- Plantigen Himedia. (2017). Murashige and Skoog Medium. Recuperado 2021, de <https://www.himedialabs.com/TD/PT021.pdf>
- PNUMA. (2012). Perspectivas del medio ambiente mundial (GEO5). Colombia.
- PNUMA-CMCM (Comps.). (2014). Lista de especies CITES. Secretaría CITES, Ginebra, Suiza, y PNUMACMCM, Cambridge, Reino Unido. Consultado el [17 de mayo 2020].
- Poljuha D, Balen B., Bauer A., Ljubescic N., Krsnik R. M. (2003) Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*75: 117–123.

- Pompeu, G, Gratão, P; Vitorello, V; Azevedo, R. (2008). Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. *Scientia Agricola* 65: 548-552.
- Pospíšilova, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D. y Plzáková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42 (4), 481-497.
- Quiala, E., G. Montalvo y J. Matos. (2004). “Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas”, *Biología Vegetal* 4: 195-199.
- Quiala, M., E., Matos, J., Montalvo, G., De Feria, M., Chávez, M., Pérez, A., Pérez, A., Naivy, L., Barbón, R. y Kowalski, B. (2009). *In Vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 11.
- Ramírez, M. R, Aguilar, R. I, Borodanenko A, Pérez, M. L, Barrera, G., J, Nuñez, P. y H, Ochoa, A. N (2007). *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cell Dev Plant* 43:660–665
- Reyes, D., J. I., Arzate, F, A. M., y Piña, E. J. L. (2018). Fuentes de sacarosa y nitrógeno orgánico influyen en la embriogénesis somática de *Agave angustifolia*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(7), 1508-1513. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.1676>
- Reyes, S. M. I. (1992). Efecto de la fuente y concentración de amonio sobre la proliferación *in vitro* de portainjertos de manzano. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Edo de México. 73 p.
- Reyes, V., I., Potenza, C., y Barrow, J. (2008). Hyperhydricity reversal and clonal propagation of four-wing saltbush (*Atriplex canescens*, Chenopodiaceae) cultivated *in vitro*. *Australian Journal of Botany*, 56(4), 358. [doi:10.1071/bt07116](https://doi.org/10.1071/bt07116)
- Robbins, C. S. (2003). *Prickly Trade: Trade and Conservation of Chihuahuan Desert Cacti, Norteamérica*. Washington D.C.: Fondo Mundial para la Naturaleza.
- Rocha, M. (2013). Micropropagación *in vitro* de cactus cola de rata *Aporocactus flagelliformis* (L). Universidad de Colima, 58.
- Rodríguez, B., M. M, Latsague, V., M. I., Chacón, F., M. A., y A. Brevis, P. K. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 21-22. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002014000100011>
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E. y Olmos, E. (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 120: 152- 161.
- Saher, S., Garcia, N.F., Piqueras, A., Hellin, E. y Olmos, E. (2005). Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured *in vitro*: a hypoxia stress. *Plant Physiol. Biochem*. 43: 573–582.

- Sala, F. y M. Labra. (2003). Somaclonal variation. In Thomas B, DJ Murphy, B Murray eds. Encyclopedia Appl. Plant Sci. Oxford, UK. Academic Press Elsevier. 1417–1422.
- Salafsky, N., Salzer, D., Stattersfield, A., Hilton T., C., Neugarten, R., Butchart, S., Collen, B., Cox, N., Master, L., O'Connor, S. y Wilkie, D. (2008). A standard lexicon for biodiversity conservation: unified classifications of threats and actions. *Conserv. Biol.* 22, 897–911.
- Santos, D., M. D. S., Méndez, O., R., Arredondo, G., A., y Santos, D., M. D. L. (2003). *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular y Developmental Biology. Plant*, 39(5), 480–484. [doi:10.1079/ivp2003456](https://doi.org/10.1079/ivp2003456)
- Sánchez, C. y M; Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *UDO Agrícola* 4: 21-26.
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón, J., Dirzo, R., Llorente, J., González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S., Maza, J., Pisanty, I., Urquizas, T., Gonzalez, S. y Méndez, G. (2017). Capital natural de México. Síntesis: evaluación del conocimiento y tendencias de cambio, perspectivas de sustentabilidad, capacidades humanas e institucionales. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Sarukhán, J., J. Carabias, P. Koleff y T. Urquiza, H. (2012). Capital natural de México: Acciones estratégicas para su valoración, preservación y recuperación. Conabio, México.
- Schulze, R. J. P. (2004). Elaboración de una guía ilustrada de Cactáceas en Honduras. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. Tesis de pregrado. 80p.
- Scholten, H., Pierik, R. (1998). Agar como agente gelificante: análisis químico y físico. *Plant Cell Reports* 17:230-235. <https://doi.org/10.1007/s002990050384>
- Segovia, A. (1987). Efecto del Potencial osmótico y la concentración de P en el agua de riego sobre el crecimiento de la caña de azúcar. *Revista Científica Caña de azúcar INIA-CENIAP*, 05(1): 5-16.
- 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. México. 5p.
- SEMARNAT. (2012). Cuadernos de divulgación ambiental. En *Huella ecológica, datos y rostros*. cdmx, México: entro de Educación y Capacitación para el Desarrollo Sustentable. 02(1):1-28.
- Sengar, R. S., Chaudhary R. y Tyagi, S. K. (2010). Present status and scope of floriculture developed through different biological tools. *Res J. of Agri. Sci.* 1(4): 306-314.

- Sha L, B. H. McCown, y L. A. Peterson. (1985). Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110:631–634.
- Sharma, G., Jagetiya, S. y Dashora, R. (2015). *General Techniques of Plant Tissue Culture*.
- Shetty, A., Rana, K. M. M. y Preetham, S. (2012). Cactus: A medicinal food. *Journal of food science and technology*. 49. 530-536. [10.1007/s13197-011-0462-5](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0462-5).
- Shetty, S., Thomas, L., Carpenter, O.F.C. y Potter, T.L. (1996). Reduction of hyperhydricity in tissue cultures of Oregano (*Origanum vulgare*) by extracellular polysaccharide isolated from *Pseudomonas* spp. *Plant Sci*. 120, 175–183.
- Shiskova, S., Moreno N., Castillo, D., V., Arellano J, Dubrovsky, J. (2006). Variabilidad genotípica de cactáceas con crecimiento determinado de la raíz en la regeneración de raíces a partir de callos. *Zo Áridas*. 10: 41–58.
- Skoog, F. y Miller, C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol*. 11: 118-131.
- Sugimoto, K., Gordon, S. P., y Meyerowitz, E. M. (2011). Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol*. 21, 212–218. [doi: 10.1016/j.tcb.2010.12.004](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.12.004)
- Tacoronte, M., Vielma A., M., Olivo, A., y Chacín, N. (2017). Efectos de nitratos y sacarosa en la propagación *in vitro* de tres variedades de papa nativa. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 63-73. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70160>
- Téllez, M., D. y L. Casanova P. (2014). El cultivo de tejidos vegetales: herramienta para la conservación de orquídeas amenazadas. *CONABIO. Biodiversitas*, 117:13-16.
- Téllez, R. J., López P., M. C. Guadalupe, Hernández M., E., Estrada L., A. A., Zavaleta, M, H. A., y Livera M., M.. (2017). *In vitro* morphogenesis of *Mammillaria plumosa* Weber. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(4), 863-876. <https://dx.doi.org/10.29312/remexca.v8i4.13>
- Thompson, M. R., Douglas, T. J., Obata S., H., y Thorpe, T. A. (1986). Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiologia Plantarum*, 67(3), 365-369. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb05749.x>
- Thorpe, T. (2007). History of plant tissue culture. *J. Mol. Microbial Biotechnol*. 37: 169-180.
- Tichá, I. (1996). Optimization of photoautotrophic tobacco *in vitro* culture: effect of suncaps closures on plantlet growth. *Photosynthetica*. 32: 475–479.
- Toth, S., P. Scott, S. Sorvari, y O. Toldi. (2004). Effective and reproducible protocols for *in vitro* culturing and plant regeneration of the physiological model plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. *Plant Science* 166(4):1027-1034

- Trip, P., Krotkov, G. y Nelson, C. D. (1964). Metabolism of mannitol in higher plants. *Am. J. Bot.* 51: 828-835. - , Nelson, C. D. y Krotkov, G. 1965. Selective and preferential translocation of <sup>14</sup>C-labelled sugars in white ash and iliac. *Plant Physiol.* 40: 740-747.
- Tyagi, R. K., Agrawal A, Mahalakshmi C, Hussain Z y Tyagi H. (2007). Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 43: 51-58.
- UICN. (2017). La Lista Roja de especies amenazadas de la UICN. Versión 2017-3. Consultado el [17 de mayo 2020]. Disponible en: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Ulloa, U., C., Acevedo, R., P., Beck, S., Belgrano, M. J., Bernal, R., Berry, P. E. y Jørgensen, P. M. (2017). An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science*, 358(6370):1614-1617. <https://doi.org/10.1126/science.aao0398>
- Urrea, A., Gomez, S., y Naranjo, E. J. (2012). Respuesta de *Zamia incognita* L. al cultivo *in vitro*, una alternativa para su conservación. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2): 121-133. Obtenido el 25 de junio de 2021 de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752012000200013&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000200013&lng=en&tlng=es).
- Vaca, I., Marulanda, M., Verdesoto, J., Núñez, A., Acurio, R. D., & Chiluisa-Utreras, V. (2018). Efecto del carbón activado en la germinación y brotación *in vitro* de *Citrus limon* (L.) y su dinámica de crecimiento. *Bionatura*, 3(3). <https://doi.org/10.21931/rb/2018.03.03.5>
- Van, S., J., Fennell, C. y Taylor, N. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Veitía, N., R. Collado, L.R. García, I. Bermúdez, C. D. Torres D., y C. Romero. (2012). Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. *Biotecnología Vegetal*. 12(3): 143-148.
- Vieitez, A. M., Balleston, A., San-ose, M.C., Vieitez, E. (1985). Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. *Physiol. Plant.* 65, 177–184.
- Vijaya, L. G. y Giri, C. C. (2003). Plant Regeneration via Organogenesis and Somatic Embryogenesis, *Curr, Science* 85(11):1624-1629
- Villaseñor, J. (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. (75), 105-135.
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87(3), 559–902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Villavicencio, G., E. E., A. Arredondo G., M. A. Carranza P., O. Mares A., S. Comparan S., y A. González C. (2010). Cactáceas Ornamentales del Desierto Chihuahuense que se

- distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México. INIFAP. México. 344.
- Weatherhead, M., Burdon, J., y Henshaw, G. (1978). Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 89(2), 141–147. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(78\)80054-3](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(78)80054-3)
- Whitehouse, A. B., T. R. Marks y G. A. Edwards. (2002). Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. *Plant Cell Tissue And Organ Culture*. 71(3):245- 252
- WWF. (2018). Informe Planeta Vivo, Apuntando más alto. Grooten, M. y Almond, R.E.A.(Eds). WWF, Gland, Suiza.
- Yoshida, F., T. Kobayashi, T. Yoshida. (1973). The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco I. Effects of salts, sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cells. *Plant Cell Physiol*. 14:329-339.
- Zeiger, E. (1983). The biology of stomatal guard cells. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 34, 441–475.
- Ziv, M. (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh P.C., Zimmerman R.H. (eds) *Micropropagation*. Springer, Dordrecht
- Ziv, M. y Ariel, T. (1988). The relationship between cell wall deformity and stomatal malfunction in the leaves of carnation *in vitro*. In: *Proceedings of the International Society Congress on Plant Molecular Biology*, Jerusalem, p. 425.
- Ziv, M., Ariel, T. (1992). On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. *Acta Hortic*. 314, 121–129.
- Ziv, M., Schwartz, A., Fleminger, D. (1987). Malfunctioning stomata *in vitro* us leaves of carnation plants propagated *in vitro*: implication for hardening. *Plant Sci*. 52, 127–134.
- Zoghlami, N., Bouamama, B., Khammassi, M., Ghorbel, A. (2012) Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: perspectives for *in vitro* conservation. *Ind Crop Prod* 36:59–56.

## Apéndice I

*Apéndice I:* Las concentraciones de nutrientes de los medios basales de cultivo de tejidos vegetales de uso común. Obtenido de Phillips y Garda 2019.

Basal medium	B5	BDS	BABI	MS	MMS	WPM	DKW
Macronutrient components (mg L <sup>-1</sup> )							
KNO <sub>3</sub>	2500	2500	2500	1900	950	–	–
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	–	–	–	990	1559
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	–	320	320	1650	825	400	1416
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	–	–	–	–	–	556	1948
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	230	230	–	–	–	–
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150	150	150	–	–	–	–
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	134	134	–	–	–	–
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250	250	250	370	185	370	740
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	–	–	170	85	170	265
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150	150	440	440	220	96	149
Micronutrient components (mg L <sup>-1</sup> )							
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	3	3	6.2	6.2	6.2	4.8
KI	0.75	0.75	0.75	0.83	0.83	–	–
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10	10	10	16.9	16.9	22.3	33.5
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2	2	2	10.6	10.6	8.6	–
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	–	–	–	–	–	–	17
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.039	0.039	0.039	0.025	0.025	0.25	0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.39
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	–	–
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	–	–	–	–	–	–	0.005
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	33.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	45.4
Vitamins and organics (mg L <sup>-1</sup> )							
<i>Myo</i> -inositol	100	100	100	100	100	100	100
Nicotinic acid	1	1	1	0.5	1	0.5	1
Pyridoxine HCl	1	1	1	0.5	1	–	0.5
Thiamine HCl	10	10	10	0.1	10	1.6	2
Glycine	–	–	–	2	–	–	20
L-Glutamine	–	–	–	–	–	–	250
Sucrose (g/L)	20	30	30	30	30	20	30
pH	5.5	5.8	5.8	5.8	5.8	5.6	5.5