

9
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS EN
Mammillaria huitzilopochtli D.R. HUNT, ESPECIE
AMENAZADA DE EXTINCION.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ELIZABETH ARRIAGA DIAZ



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

**El presente trabajo fue realizado en
el Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Vegetales del Jardín Botánico del Ins-
tituto de Biología de la U.N.A.M.**

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Abraham Rubluo Islas por su acertada dirección y apoyo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Cristina Pérez Amador del Laboratorio de Química de la Fac. de Ciencias (UNAM) por su valiosa asesoría y ayuda brindada a lo largo de la investigación.

A la Dra. Elvira Santos y a la M. en C. Elba Rojas del Laboratorio de Química Orgánica de la Fac. de Química (UNAM) por su amable colaboración en este trabajo.

Al M. en C. Salvador Arias Montes del Laboratorio de Cactología del Jardín Botánico (UNAM) por su colaboración durante el desarrollo de este proyecto, así como por su revisión del mismo.

A los Sres. sinodales Biól. David Benavides Velázquez y Biól. Josefina Herrera Santoyo por sus valiosas sugerencias.

Al M. en C. Marco Antonio García Escalante y al Dr. Víctor Chávez Avila por sus valiosos consejos para la realización de este trabajo de Tesis.

También agradezco a la Biól. Enriqueta González Cervantes por su colaboración en esta investigación.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por su amistad y en especial a Paty, Ana Laura y Martín por su apoyo y sugerencias.

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología el facilitarme el uso de sus instalaciones durante el desarrollo de este trabajo.

**A mis padres:
Victor y Virginia con
amor y gratitud.**

**A mis hermanos:
Silvia, Leticia y Víctor,
por su apoyo y cariño.**

**A Fernando:
por su cariño y paciencia.**

**APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS EN *Mammillaria huitzilpochtli* D.R.HUNT,
ESPECIE AMENAZADA DE EXTINCION.**

C O N T E N I D O

I.- RESUMEN

II.- INTRODUCCION

III.- ANTECEDENTES

IV.- OBJETIVOS

V.- MATERIALES Y METODOS

VI.- RESULTADOS Y DISCUSION

VII.- CONCLUSION

VIII.- APENDICE

IX.- BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

AIA.- Acido Indolacético

ANA.- Acido Naftalenacético

BAP.- Benciladenina

2IP.- 2-Isopentenil-Adenina ó 6-Dimetil-Aminopurina

MS.- Murashige-Skoog (1962)

CP.- Cromatografía en papel

HPLC.- Cromatografía Líquida de Alta Presión

CITES.- "Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre".

IUCN.- "Union Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales".

UNAM.- Universidad Nacional Autónoma de México.

I.- RESUMEN

Mammillaria hutzilpochtili D.R.Hunt, es una especie endémica del estado de Oaxaca (Valle de Cuicatlán), está distribuida en una área aproximada de 80 Km² y se encuentra amenazada según la IUCN.

Dado que la especie tiene una distribución geográfica restringida, el desequilibrio de los factores ecológicos podría ocasionar problemas en la sobrevivencia de la especie.

Por lo antes expuesto los objetivos de este estudio fueron:

a.- Obtener la regeneración y la micropropagación de esta especie, así como lograr su adaptación al invernadero.

b.- Debido a la formación de una mezcla de pigmentos durante el cultivo de callo de la misma, se planteó como un objetivo secundario el realizar una identificación preliminar de los pigmentos sintetizados *in vitro*.

Los materiales y métodos utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

Semillas de *Mammillaria hutzilpochtili* donadas por el Laboratorio de Cactología del Jardín Botánico (Instituto de Biología, UNAM) fueron utilizadas como fuente de explantes, se germinaron *in vitro* usando como medio básico el medio MS con diferentes concentraciones de nutrientes y agar.

Posteriormente se efectuó el cultivo *in vitro* de estas plántulas en medio MS con diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento BAP/ANA y 2iP/AIA, empleando secciones apicales, laterales y transversales.

Se obtuvieron brotes múltiples en presencia de 2iP (10.0 mg/l) en combinación con AIA (1.0 mg/l). Las plántulas enraizaron en el medio MS con AIA (0.01 mg/l) y fueron posteriormente transferidas al invernadero.

Durante el cultivo *in-vitro* de esta especie se observaron callos que presentaban manchones de células con una coloración que variaba del rosado al púrpura por lo que se realizó un análisis químico a través de las técnicas de separación de cromatografía en papel y HPLC, para hacer una identificación primaria del tipo de pigmentos; para tal propósito se aislaron células de la muestra problema y se compararon con patrones ya establecidos de *Beta vulgaris* (betabel) y *Verbena sp.*; este trabajo fue desarrollado en los Laboratorios de Química (Facultad de Ciencias, UNAM) y Laboratorio de Química Orgánica (Facultad de Química, UNAM).

II.- INTRODUCCION

Los vegetales proveen los medios para que la energía del sol que alcanza la superficie de la tierra cierre los lazos químicos de los procesos que proporcionan la alimentación de los organismos heterótrofos (incluyendo al hombre); sin embargo, a pesar de ésta interdependencia entre la especie humana y otros organismos que habitan el planeta, las poblaciones humanas se han expandido alterando el ambiente natural, por lo que están reduciendo la diversidad biológica a su nivel más bajo, ejerciendo un efecto devastador sobre las diversas especies y provocando que la tasa de extinción por causas **no naturales** se acelere día a día (Wilson, 1989).

Raven (1976) propone que la extinción de una especie va acompañada por la pérdida de otros 10 a 30 organismos dependientes de ésta. Por lo tanto, la diversidad de las plantas es un factor que influye en la diversidad de otros organismos, dándose la estabilidad del ecosistema con lo cual se puede asegurar la sobrevivencia de la raza humana (Wochok, 1981).

Desde un punto de vista conservador, se puede asumir que de las 240, 000 especies de plantas con flores que habitan el mundo, 85,000 se encuentran distribuidas en las zonas templadas, de las cuales aproximadamente 4,050 se encuentran con algún grado de amenaza (Raven, 1976).

Las 150,000 especies restantes presentan una distribución tropical y son las que se encuentran en mayor peligro; un ejemplo de esta aseveración se puede constatar en la destrucción de las pluviselvas tropicales, en las que se ha reducido su extensión original en un 55% y siguen disminuyendo a un ritmo que supera los 100,000 Km² por año. Esta cifra supone un 1% de su extensión total, repercutiendo en una pérdida global del orden de 7,000 a 6,000 especies por año (Wilson, 1989).

Lamentablemente la situación en nuestro país, a pesar de su gran riqueza florística, no es la excepción, debido a factores ya conocidos, como la expansión ganadera, que equivale a la pérdida de vegetación natural de 2'000.000 de ha al año; adicionalmente la pérdida por incendios forestales, que se puede estimar en unas 2,000 ha al año y la expansión urbana con 1'000.000 ha al año. Estas cifras se ven incrementadas por la pérdida de especies con valor comercial, tal es el caso de las cactáceas, orquídeas y palmas. (Vázquez-Yanez, 1979; Oldfield, 1985).

Un factor adicional que contribuye a la pérdida de especies en nuestro país es la gran cantidad de endemismos presentes en la flora en donde el 50% de éstos pertenecen a las familias: Cactáceae, Compositae, Gramminae, Orchidaceae y Euphorbiaceae. Desafortunadamente las familias Cactáceae y Orquidaceae son de las más seriamente amenazadas en la flora mexicana, lo que las convierte en grupos que requieren de mayor atención.

Familia Cactaceae

Entre las plantas más notables que caracterizan el paisaje de las zonas áridas en México se distingue un fascinante grupo vegetal, la familia Cactaceae (Bravo y Sánchez-Mejorada 1978).

Las cactáceas son originarias del continente Americano, se encuentran distribuidas especialmente en zonas áridas y semiáridas y cuentan con aproximadamente entre 1,600 y 3,100 especies (Backeberg, 1976; Gibson y Nobel, 1986; citados por Arias, en prensa), de las cuales se encuentran reconocidas en el territorio mexicano 738 especies y de éstas aproximadamente 540 son endémicas, lo que significa que 3/4 partes de la cactoflora de nuestro país sea única, por lo que resulta preocupante que la mayoría de las especies mexicanas con algún grado de amenaza sean endémicas (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1978 y 1989; Arias, en prensa).

Estas plantas sorprenden por las formas de sus tallos y hermosura de sus flores, interesan también por la anatomía de sus estructuras y las modalidades de su fisiología, indicadoras ambas de su adaptación a la sequía (Bravo y Sánchez-Mejorada 1978).

Las cactáceas, por su aspecto peculiar, han sido motivo de atención desde tiempos remotos; la historia registra la importancia que adquirieron entre las tribus prehispánicas, según se deduce de sus tradiciones, teogonías, y códices antes de su destrucción y de los numerosos nombres con que las designaron y que aún persisten en nuestros días.

En la vida económica, social y religiosa de los Nahoas, las cactáceas desempeñaron un papel importante, a tal grado que el jeroglífico de la Gran Tenochtitlán, ostentaba airosamente un nopal, símbolo que conserva el escudo de nuestro México actual.

Intervinieron en prácticas religiosas, se usaron con frecuencia en la magia, pues varias de ellas eran consideradas como talismanes; también fueron empleadas en la herbolaria, influyeron determinando la fundación de poblados en regiones cactíferas, y se les tenía en gran estima como plantas de ornato. Las propiedades medicinales que se encuentran en las sustancias químicas de dichas plantas son tan diversas como las plantas mismas, ya que éstas son el vivo ejemplo de poderosos mecanismos de adaptación a un medio hostil. También las cactáceas proveen materiales para la construcción, y se utilizan como alimento y bebida (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1978; Sánchez-Mejorada 1982a).

A pesar de la riqueza de cactáceas en la flora mexicana éstas se enfrentan a graves problemas de conservación. Sánchez-Mejorada (1982b y c, 1986) y Anderson (1990) reconocieron que las principales causas que provocan la mengua continua de las poblaciones de varias especies de cactáceas en México se debe a la sobrecolecta de ejemplares, a la destrucción de sus hábitats y a factores naturales (Arias, en prensa).

La colecta de cactáceas con fines comerciales es la causa principal por la que han disminuido diversas poblaciones de éstas, incluyendo aquellas especies consignadas en el apéndice I del CITES especies con las que no se puede comerciar legalmente (IUCN, 1987). El comercio de cactáceas está controlado por diversos países europeos, Japón y los Estados Unidos, los cuales conocen el valor ornamental de las cactáceas. De acuerdo con los datos registrados por Anderson (1982), se estima que en 1979 entraron a Estados Unidos alrededor de 7,000,000 de ejemplares de cactáceas y otras suculentas; 1,200,000 procedían de México, colectadas individualmente en las zonas naturales que se desarrollaban (IUCN, 1987). Durante el período de 1980 a 1982 los Estados Unidos importaron 826,000 cactus de México, de éstos, 21,175 pertenecen al apéndice I (Campbell, 1984). En 1984 éste mismo país importó 80,000 cactus mexicanos. Otro de los países con una elevada demanda de cactus silvestres es Japón, en donde ciertos ejemplares se llegan a cotizar hasta en \$1,000 dólares cada uno (Fig. 1). Las implicaciones de la colecta son analizadas por Gibson en 1982 y reporta los posibles efectos que tendrá en el futuro:

- El agotamiento de los bancos de germoplasma.
- La reducción de ciertas edades o tallas de algunas plantas.
- El grave impacto sobre variabilidad genética.
- El problema para la investigación de poblaciones dinámicas y no perturbadas.
- El desconocimiento de especies que existen actualmente.
- El colapso de las poblaciones y la extinción de las mismas.

La alteración del hábitat, debido principalmente a la expansión de áreas urbanas y de cultivos, es el segundo factor causante de la merma de las poblaciones de cactáceas (Anderson, 1982; Arias, en prensa). Bravo (1991) reporta como principales factores causales los desmontes con fines agrícolas, sobrepastoreo, apertura de vías de comunicación y ductos, erosión del suelo e inundación de zonas por embalses.

Eguarte y Piñero (1990) reportan varias de las posibles causas de la extinción natural, una es la catastrófica (en la que una gran perturbación física destruye o cambia drásticamente el ambiente, como cuando suceden cambios climáticos causados por enormes incendios), otra posible causa es la generada por problemas genéticos (en poblaciones reducidas las cruza endogámicas pueden conducir a un incremento en la presencia de defectos genéticos).

Clasificación de la Familia Cactaceae

De acuerdo con la clasificación de Barthloth (1979) la familia de las Cactáceas pertenece al Orden de las Caryophyllales también conocido por el nombre descriptivo de Centrospermae (Cronquist, 1981), y cuenta con tres Subfamilias naturales, entre las cuales no existen formas transicionales;

- **Pereskioideae.**- a la que pertenecen las cactáceas primitivas, las cuales presentan hojas laminares.
- **Opuntioideae.**- al cual pertenecen los nopales, como característica diferencial presentan glóquidas en las areólas.
- **Cactoideae.**- la constituyen especies columnares, epífitas y de hábitos pequeños como ocurre en el género *Mammillaria*

El género *Mammillaria* se divide en seis subgéneros, los cuales presentan aproximadamente 250 especies con un rango de distribución desde el sur de Estados Unidos hasta Centroamérica pero predominantemente en México (Bravo y Sánchez-Mejorada 1991).

Mammillaria huitzilopochtli es una especie ornamental, con importancia taxonómica, está poco estudiada y pertenece al subgénero *Mammillaria*, cuya ubicación taxonómica de acuerdo a Guzmán y Arias (1989), es la siguiente:

Reino	Vegetal
División	Embryophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotyledonae
Orden	Centrospermae
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Cactoideae
Tribu	Cactaeae
Género	<i>Mammillaria</i>
Subgénero	<i>Mammillaria</i>
Especie	<i>Mammillaria huitzilopochtli</i>

Descripción Botánica

Planta simple o eventualmente ramificada; tallo esférico hasta claviforme-cilíndroide, c. de 13 cm de altura y 8-9 cm de diámetro, verde oscuro. Tubérculos dispuestos en 13 y 21 series espiraladas, de 6 mm de longitud y 5 mm de espesor en la base, obtusamente cónicos-cilíndricos, algo comprimidos lateralmente, con jugo acuoso. Axilas desnudas salvo las floríferas, éstas con densa lana blanquecina caduca. Aréolas elípticas, de 2 mm de longitud y 1.5 mm de anchura, al principio con lana corta, después desnudas. Espinas radiales 15-30, de 2.5 a 3.5 mm de largo; rara vez 2 espinas de 4 mm de longitud, finalmente aciculares, brotando del borde superior de la aréola, al principio de color castaño muy oscuro; los ejemplares maduros desarrollan una espina central adicional; sublobulada, de 1.5-3 ó hasta 5 cm de longitud, porrecta, desde castaño oscuro hasta negra. Flores tubular infundibuliformes, de 12-15 mm de longitud y de 7 mm de diámetro (no abren ampliamente), rojo carmesí o más o menos intenso. Fruto claviforme de cerca de 15 mm de longitud, rojo, conservando adheridos los restos del perianto. Semillas piriformes, de 1.4 mm de longitud por 0.75 mm de espesor, con el hilo muy pequeño (Hunt, 1979; Bravo y Sánchez-Mejorada, 1991).

Distribución Geográfica

Mamillaria huitzilopochtli es endémica del Valle de Cuicatlán, localizado al noroeste del estado de Oaxaca; su población cubre una área aproximada de 80 Km², la especie crece en lugares escarpados, en suelos de acrisol (rojo), con acumulación de arcilla, ácidos ó muy pobres en nutrientes. El tipo de vegetación es selva baja caducifolia mezclada con matorral micrófito (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1978; Arias, comunicación personal).

Esta especie está considerada como Vulnerable por la IUCN (1987); ésto significa que de seguir operando los factores que la amenazan puede pasar a la categoría de en peligro de extinción, en un futuro cercano (IUCN, Red Data Book Categories, 1978). Es aquí cuando el desarrollo de metodologías biotecnológicas encuentran un campo de aplicación de primordial importancia en nuestro país (Johnson y Emino, 1979b; Sanchez-Mejorada 1982b y c; Dabekaussen, 1991).

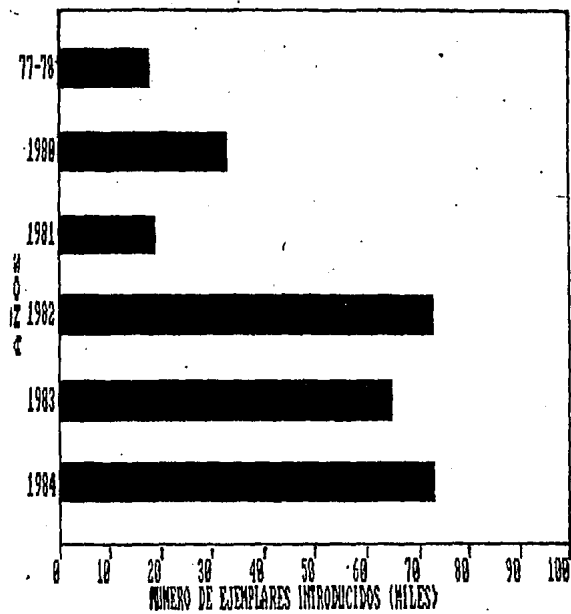


Fig 1.- Estimación sobre el mercado ilegal de cactáceas mexicanas en los Estados Unidos (Arias, en prensa).

III.- ANTECEDENTES

Metodologías Biotecnológicas

A través de la aplicación integral de los conocimientos y técnicas de la Bioquímica, Microbiología, Genética e Ingeniería Química, la biotecnología permite obtener beneficios a nivel tecnológico a través de las propiedades y capacidades de microorganismos y cultivos celulares (Mordejai, 1989). Entre los procesos utilizados en la biotecnología vegetal se encuentra el cultivo de células y tejidos vegetales; técnicas que pueden ser valiosos auxiliares para aplicarlas en innumerables aspectos. A continuación se describen dos de ellos :

I.- La micropropagación de especies de lento crecimiento, con semillas recalcitrantes o en peligro de extinción. Para obtener una acelerada multiplicación de plantas, se aplica principalmente en especies donde la reproducción por técnicas convencionales es muy lenta, o en poblaciones en peligro o amenaza por la destrucción de sus hábitats, o por su comercio ilícito (Mordejai, 1989; Lomell, 1987).

II.- La obtención de metabolitos secundarios útiles en la industria.

Para la obtención de beneficios económicos a partir de la biosíntesis o transformación de metabolitos secundarios por cultivos celulares *in vitro* (Robert y Loyola, 1985; Mantell, 1983).

Técnicas de Micropropagación

Murashige (1974), define a las técnicas de micropropagación como el cultivo en condiciones asépticas de células, protoplastos, tejidos especializados y órganos de plantas en un medio nutritivo artificial, complementado con vitaminas, hormonas y fuentes de carbono, en donde se logrará el desarrollo y producción de nuevas plantas en un ambiente controlado.

Las ventajas de éstas técnicas con respecto a las convencionales son:

- A partir de porciones muy pequeñas de cualquier órgano o tejido, se pueden obtener grandes cantidades de plantas en un lapso menor que con el método tradicional (George y Sherrington, 1984; Doods y Roberts, 1982).

- Permiten controlar las condiciones ambientales que rodean a la planta.
- Se pueden tener cantidades considerables de plantas en poco espacio.
- El material obtenido se puede almacenar durante largo tiempo sin deterioro de su calidad.

Procedimiento de la Micropropagación de Plantas

Obtención del Material Vegetativo

En principio se debe obtener un material vegetativo aséptico que es necesario mantener en ésta condición y en un ambiente que sea y pueda mantenerse estéril (George y Sherrington, 1984).

Procedimiento en Laboratorio.

Todas las plantas que crecen naturalmente deben ser consideradas como contaminadas exteriormente, ya que varios microorganismos (bacterias, hongos, etc.) están invariablemente presentes sobre la superficie de las partes de la planta.

Para eliminar la futura contaminación del medio por estos microorganismos es esencial que el material vegetativo sea lavado y desinfectado o esterilizado; ésto se debe hacer por medio de procedimientos que implican el uso de detergentes biológicos y sustancias esterilizantes como agua clorada, hipoclorito de sodio, etc.

Una vez logrado lo anterior el material debe mantenerse bajo condiciones asépticas (Doods y Roberts, 1982; George y Sherrington, 1984).

Es necesario que los medios de cultivo, el material de cristalería y de disección sean esterilizados en una autoclave a una presión de 1.5 Kg/cm^2 a 121°C de temperatura.

Medio de Cultivo

Cualquier deficiencia en algún elemento clasificado como esencial para la planta (que tiene un papel importante en los procesos vitales) resultaría, ya sea, en un lento crecimiento o en la ausencia de diferenciación de los tejidos e incluso la muerte de los mismos. Así es necesario suplir dichos componentes vitales, tanto inorgánicos como orgánicos, en el medio de cultivo (Hu y Wang, 1983; George y Sherrington, 1984).

Varias formulaciones de medios han sido satisfactorios para uso específico de determinadas especies, pero la elección de un medio particular depende principalmente de la especie de planta, el tejido u órgano que va a ser cultivado y el propósito del experimento.

Todos los elementos esenciales requeridos para el crecimiento de las plantas son usualmente incluidos en el medio de cultivo; sales inorgánicas, compuestos orgánicos (carbohidratos, vitaminas, aminoácidos), reguladores de crecimiento y accesoriamente suplementos de complejos nutritivos naturales, como agua de coco y extractos de frutas.

Sales Inorgánicas

En el desarrollo de las plantas se requieren ciertos elementos en cantidades relativamente grandes, por lo que se han llamado macroelementos, siendo éstos y algunas de sus fuentes habituales de suministro en cultivo de tejidos el Sulfato de magnesio, el nitrógeno en forma de ión Amonio ó Nitrate, el Fósforo, Potasio y Calcio, adicionalmente a los macronutrientes, las células de las plantas necesitan elementos que por requerirse en pequeñas cantidades o trazas, se denominan microelementos y son: Cobre, Zinc, Magnesio, Fierro, Boro y Molibdeno (George y Sherrington, 1984).

Compuestos Orgánicos

Carbohidratos.- todos los medios requieren la presencia de azúcar como fuente de carbón y energía.

Vitaminas.- tienen funciones catalíticas en sistemas enzimáticos y se requieren en pequeñas cantidades.

Aminoácidos.- si se considera necesaria una mezcla de nitrógeno orgánico el medio puede ser enriquecido con aminoácidos o mezclas de éstos, ya que alguno puede ser necesario para inducir o dar una respuesta fisiológica determinada.

Fitorreguladores

El crecimiento, la diferenciación, el desarrollo y algunos otros procesos, están gobernados por 5 tipos fundamentales de reguladores : Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Etileno y Acido Abscisico.

Las auxinas y citocininas están involucradas en una amplia variedad de actividades bioquímicas y fisiológicas, por lo que se requieren en el medio aún en pequeñas concentraciones para la división, el alargamiento, la diferenciación celular, etc; sin embargo también es importante considerar que existen interacciones de los fitorreguladores, por lo que pueden adicionarse diferentes combinaciones al medio, para obtener una respuesta específica en los tejidos (Doods y Roberts, 1982; George y Sherrington, 1984).

Incubación

Una vez que los explantes se siembran asepticamente en los medios de cultivo, es indispensable mantenerlos en cámaras de incubación, a una temperatura y fotoperiodos controlados para mantener

las condiciones requeridas de los explantes; generalmente a una temperatura de 24-30 °C y fotoperiodos de 16 h/luz 8 oscuridad.

El papel de las Técnicas de Micropropagación en la preservación de especies amenazadas

Como se ha mencionado en apartados anteriores, es prioritaria la recuperación de comunidades de plantas que han sido alteradas, de aquí la importancia de disponer de esa tecnología, que puede ser aplicada para ayudar a renovar estos recursos y reestablecer sus poblaciones (Wochok, 1981).

La aplicación de éstas técnicas en la familia de las cactáceas es de vital importancia, principalmente en las especies amenazadas o dañadas, o en aquellas que sus semillas son de disponibilidad cíclica, escasas o de lento crecimiento. Las técnicas son útiles también para la propagación rápida de nuevas variedades o para la regeneración de formas cristatas o monstruosas, y para fines comerciales (Johnson y Emimo, 1979; Dabekaussen, 1991).

Micropropagación en Cactáceas.

Un limitado grupo de investigadores ha estudiado el potencial para la propagación por técnicas de micropropagación en cactáceas. Algunos de éstos estudios han tenido objetivos específicos tales como la investigación en la biosíntesis de alcaloides (Steinhart, 1962) o morfogénesis en cactáceas (Sachar y Iyer, 1959; Mauseth y Halperin, 1975; Mauseth, 1979). Otros estudios se han concentrado en la obtención de crecimiento de callo (King, 1957; Steinhart, 1962; Colomas, 1978), y en optimizar la producción de callo (Nitsch, 1951; Minocha y Mehra, 1974).

Trabajos recientes han demostrado que la micropropagación de cactáceas es posible, incluso en especies amenazadas, listadas en el apéndice I del CITES, tal es el caso de *Mammillaria san-angelensis*, por Martínez-Vázquez y Rubiño (1989), y *Pelecypora* sp. por Krulik (1980); Vyskot y Jara (1984) propagaron *Mammillaria carmenae*, *M. prolifera*, *Astrophytum myriostigma* y *Trichocereus spachionus*; Starling (1985), propagó *Leuchtenbergia principis*.

Las especies de cactus que sólo han demostrado la multiplicación de brotes y aquellas que han sido exitosamente reintroducidas a suelo han sido compiladas por Starling y Doods (1983) y por Philips (en prensa).

Cabe señalar que la facilidad de éstas técnicas de propagación puede ser muy variable aún en especies muy cercanas; *Mammillaria woodsii* y *M. elongata* pueden inducir brotación en cultivo y enraizar en suelo, mientras que en *M. prolifera* sólo se ha logrado el crecimiento de callo (Johnson y Emimo, 1979).

Aplicaciones de las metodologías biotecnológicas en la Industria Química

Paralelamente a los avances hechos en la tecnología de cultivos celulares; particularmente desde inicios de la década de 1970 ha llegado a un punto en donde somos capaces de responder una pregunta general ¿es el cultivo de células vegetales una tecnología potencial para la explotación futura para originar productos químicos?. Efectivamente, se ha encontrado que durante las últimas décadas una amplia variedad de plantas han sido cultivadas en un medio químicamente definido y muchos productos de interés se han detectado a través de su cultivo (Staba, 1980).

El desarrollo de cultivos de plantas, como una alternativa para la formación de metabolitos específicos, ha sido motivado por numerosos factores, los cuales incluyen:

- Independencia de variaciones estacionales, plagas y enfermedades.
- Un sistema de producción definida con productos disponibles cuando y donde se quiera.
- Una consistente calidad y cantidad de productos.
- Se ha estimado que tales productos representan un elevado valor económico, (Mantell, 1983).

-Además, el cultivo de células vegetales puede contribuir por lo menos en cuatro rutas para la formación de productos naturales:

- a) Como una ruta de síntesis para la obtención de productos, ejemplo: codeína, quinina, piretróides.
- b) Como una ruta de síntesis de productos de vegetales de establecimiento o crecimiento difícil, ejem: teraina de *Paper bracteatum*.
- c) Como origen de productos químicos, ejemplo ruta cultiva de cultivos de *Ruta* sp.
- d) Como sistemas de síntesis, o como parte de un gran proceso químico, por ejemplo la síntesis de digoxina.

Productos químicos especiales en Cactáceas

Algunas especies de cactáceas producen sustancias químicas en sus tejidos u órganos; en pocas de éstas son notorios, como el peyote (*Lophophora williamsii*), el cual contiene la mescalina que es un potente alcaloide alucinógeno; Otras presentan latex, pigmentos en flores y frutos u otros metabolitos específicos que se presentan naturalmente y son a menudo únicos en estos organismos, como la aurona (cephalocercrona, que presenta actividad bactericida) inducida en cultivos líquidos de *Cephalocereus senilis* (Pare, 1991). Sin embargo pocos son los estudios referentes a los productos que encontramos en esta familia.

El rojo brillante y amarillo encontrado en las flores y frutos de las cactáceas son producidos por una clase de pigmentos conocidos como betalafnas, éstos a menudo están presentes también en raíces, tallos y brácteas de algunas plantas como el betabel, en donde encontramos abundantes betalafnas en las raíces frescas (Mabry y Dreyding, 1968; Piatelli, 1981).

La presencia de betalafnas en las cactáceas representa una fuente potencial de recursos hasta ahora no estudiados, pudiendo ser su utilización y aprovechamiento una alternativa futura en la industria química, por lo que es necesario no desaprovechar éstos recursos y esforzarse para su conservación.

Las propiedades de las betalafnas se definen hasta la década de 1960, cuando se discute su estructura y se revisa su sistemática e implicaciones filogenéticas (Mabry, 1963).

Betalafnas

Las betalafnas comprenden todos aquellos pigmentos rojo violeta llamados betacianinas y amarillos llamados betaxantinas; compuestos en los cuales su estructura está basada en I y por lo tanto son derivados del ácido betalámico II, (Fig.2).

Estructura y Biosíntesis de las Betalafnas

Las betalafnas son moléculas orgánicas complejas y tienen dos o más átomos de nitrógeno por lo que inicialmente fueron consideradas "antocianinas nitrogenadas".

La presencia de átomos de nitrógeno en las moléculas de la betalafna las coloca en otra clase de pigmentos, no relacionados con los flavonoides y antocianinas (Fig.3; Piatelli, 1964).

Betacianinas.- La estructura de la betacianina del betabel, llamada betanina, fue elucidada por Wilcox en 1965, encontrando que constituye el 75 %- 95 % del total del contenido de pigmentos del betabel. Dos agliconas de la betanina, llamadas Betanidina e Isobetanidina fueron descritas por Wilder y Dreyding en 1959. En algunos casos las betalafnas se consideraron estar relacionadas cercanamente con los alcaloides, llamándosele también "cromo alcaloide".

La mayoría de los reportes describen 42 diferentes betacianinas glicosidas de 37 especies de 7 familias de Caryophyllales o Centrospermae (Piatelli y Minalle, 1964). La espectroscopía aplicada a éstos compuestos ha mostrado un máximo de absorción entre 534 y 552 nm (Mabry y Dreyding, 1968; citado por Piatelli, 1981).

Betaxantinas

Son pigmentos amarillos inicialmente llamados flavocianinas y después betaxantinas, y en general son poco atractivas de estudiar, ya que son difíciles de purificar debido a su sensibilidad ante agentes químicos (Singer y Von Elbe, 1968)

El compuesto que representa a las betaxantinas, es la indicaxantina, pigmento amarillo aislado de *Opuntia ficus-indica* (Piatelli, 1981). En el betabel se han aislado dos betaxantinas llamadas Vulgaxantina I y II.

Las propiedades electroforéticas de las betaxantinas son similares a las betacianinas, pero muestran una máxima absorción en el visible en el rango de 474 a 486 nm (Mabry y Dreiding, 1968; citado por Piatelli, 1981).

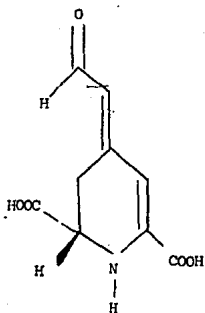


Fig.2.-Estructura del ácido betalámico .

BETALAINAS

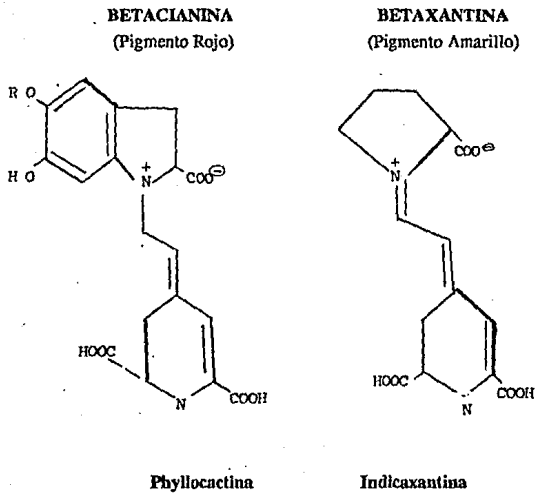


Fig.3.- Estructura molecular de las betalainas; betacianinas, pigmento rojo y betaxantinas, pigmentos amarillos.

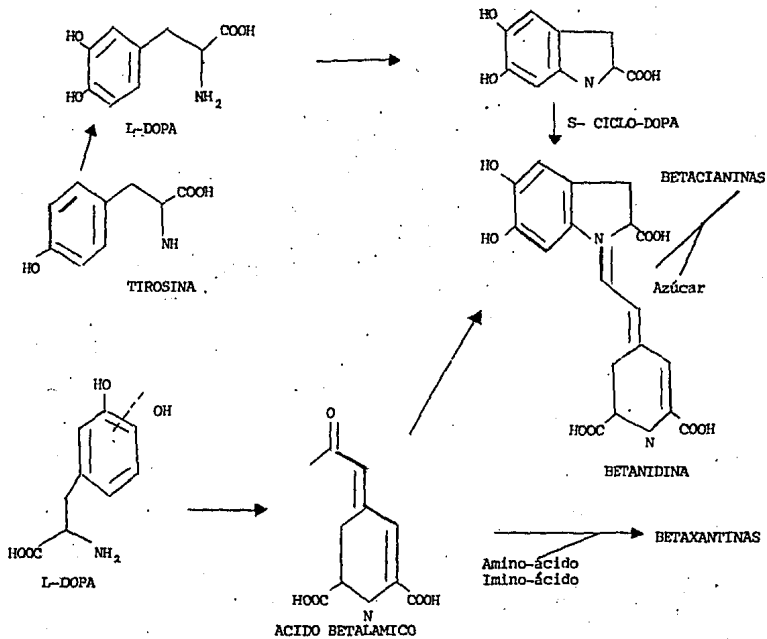


Fig.4.- Síntesis de las betalafnas.

Regulación de la síntesis de las betalainas

Control Genético

Los estudios genéticos más importantes referentes a las betalainas se han llevado a cabo por genetistas japoneses desde la década de 1920 (Yasui, 1920; Ikeno, de 1921 a 1928; Ootami y Hagiwara, 1969: citado por Piatelli, 1981) y se ha encontrado que la presencia de las betacianinas es generalmente dominante sobre la presencia de betaxantinas y, en híbridos F1, el contenido de betacianinas en formas púrpura es dominante sobre el contenido de formas rosas, mientras que el contenido más elevado de formas amarillas-anaranjadas es recesivo al contenido más bajo de formas rosas.

Factores Externos

Luz.- Al parecer el fitocromo está involucrado en la biosíntesis de betalainas, como ha sido demostrado en plántulas de *Amaranthus caudatus* (French, 1973). Este autor cita que en investigaciones previas realizadas por diversos investigadores se ha encontrado que la biosíntesis de betacianinas en *Amaranthus* está bajo el control del fitocromo.

Al parecer, los efectos de la luz sobre la síntesis de pigmentos varía considerablemente de acuerdo con las especies, y en otras no hay síntesis en ausencia de luz.

También se ha reportado que la edad de la plántula afecta la síntesis de pigmentos.

Factores Químicos

Existen reportes de que el ácido giberélico exógeno inhibe el efecto de la luz en la síntesis de amarantina en *A. caudatus*.

El ácido abscísico inhibe la síntesis de betacianinas estimuladas por la luz en plántulas de *A. tricolor* (Stobart, 1970) y ambas (luz y kinetina) inducen la síntesis en *A. caudatus*.

Otros Inductores Químicos.- Precursores tales como DOPA Y Tyrosina incrementan la acumulación de betalainas cuando son administradas a plántulas de *Amaranthus* (Piatelli, 1981), sin embargo, no hay tal incremento en la síntesis de betanina en cultivo de callo (Constabel y Nassiff-Makki, 1971; citado por Piatelli, 1981).

Función de las Betalafnas.

No se ha podido definir o asignar un papel o función de las betalafnas en los organismos que las producen.

Pueden ser vectores atrayentes para asegurar la polinización efectiva cuando se presenta en flores y frutos, o puede ser un mecanismo de defensa contra una infección viral (Sosnova, 1970; citado por Piatelli, 1981).

Stenlid (1976), reporta que las betalafnas pueden considerarse como modificadores potenciales del metabolismo de las auxinas (citado por Piatelli, 1981).

Significado Filogenético de las Betalafnas.

Las betalafnas están restringidas a 10 Familias del Orden Caryophyllales: Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Portulacaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, Stegnospermaceae, Aizoaceae, Bacellaceae, Cactáceae y Didiereaceae. Todas éstas Familias contienen betacianinas y sólo tres de ellas (Bacellaceae, Didiereaceae y Stegnospermaceae) contienen también betaxantinas. Posiblemente más estudios sobre betaxantinas revelen su presencia en todas las familias que contienen betacianinas (Mabry y Dreiding, 1968).

Aunque no se han revisado la mayoría de las especies de las diez familias, los resultados obtenidos con algunas de ellas sugieren que las plantas que contienen estos pigmentos están cercanamente relacionadas (Mabry y Dreiding, 1968).

Utilización de las Betalafnas en la Industria

Química

En la producción de alimentos es necesario agregar sustancias no nutritivas, generalmente en pequeñas cantidades, para mejorar su apariencia, textura, gusto o propiedades de almacenamiento. A estas sustancias se les llama aditivos alimentarios. Un colorante es aquella sustancia que se agrega a los comestibles y bebidas a fin de proporcionar o intensificar su color; existen dos tipos de colorantes: colorantes orgánicos naturales (de origen animal o vegetal) y orgánicos sintéticos (aquellos cuya materia colorante están constituidos por derivados de alquitrán de hulla; Villegas, 1979). Como resultado de la prohibición y escasez de colorantes rojos (sintéticos) se ha mostrado gran interés en los pigmentos naturales que no tienen riesgo como colorantes de alimentos, tal es el caso de las betalafnas. Villegas (1979), reporta la utilización de los colorantes del betabel en:

- Mezclas de alimentos secos: sopas secas, especias, proteínas de soya.
- Alimentos enlatados: salsa de tomate, frutas y vegetales enlatados, cerezas y fresas.
- Productos de carne: salchichas y hamburguesas.
- Productos de mayonesa.
- Productos de leche: helados, cremas para sandwich, chocolates con crema y frutas.
- Postres y Dulces: jaleas de frutas, mermeladas y gelatinas.

Producción de Betacianinas por cultivos celulares

La producción de betacianinas por cultivos celulares puede ser una interesante alternativa para los sistemas de plantas intactos, ya sea para el estudio de la bioquímica de la síntesis de betacianinas o para la producción biotecnológica de éstos pigmentos.

Investigadores japoneses han estudiado la acumulación de betacianinas en *Phytolacca americana*, *Beta vulgaris*, *Chenopodium album*, y *Spinachia oleraceae*, pero la información detallada no se puede obtener de las patentes japonesas. De acuerdo a Misawa (1980), hay dificultades en la producción económica de éstos pigmentos por cultivos celulares, debido a que tales pigmentos aparecen sorpresivamente en algunos cultivos, por lo que se ha publicado poco de ellos, además de que la técnica para la cuantificación y separación de betalafnas individuales ha sido introducida recientemente por el desarrollo del sistema HPLC. fase reversa.

Un análisis definido de las betalafnas individuales o betacianinas en cultivos celulares no se ha dado. A diferencia de las antocianinas, las betacianinas han sido escasamente estudiadas.

IV.- OBJETIVOS

a) Obtener la regeneración y la micropropagación de la *Mammillaria huitzilopochtli* D.R.Hunt (especie Vulnerable y endémica del Valle de Cuicatlán en el estado de Oaxaca), así como lograr su adaptación a invernadero.

METAS

1.- Obtención de la germinación *in vitro* de semillas de *M.huitzilopochtli*.

2.- Obtención de la metodología para la regeneración y la micropropagación de esta cactácea.

3.- Enraizamiento de las plántulas obtenidas por el cultivo *in vitro*.

4.- Adaptación a invernadero.

b) Debido a la aparición de cúmulos de células con una coloración rosado-púrpura durante el cultivo de callo de esta cactácea, realizar la identificación primaria a través del análisis químico de la mezcla de pigmentos presentes en las células, como posibles colorantes de interés para la industria.

V.- MATERIALES Y METODOS.

Material Biológico

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron semillas de *Mammillaria huizilopochuli* provenientes de frutos de una misma planta. Estas semillas se emplearon para generar el material biológico necesario para la obtención de explantes.

Esterilización y siembra del Material Vegetativo

La esterilización superficial se realizó lavando las semillas en un vaso de precipitados de 250 ml, con 100 ml de agua destilada y tres gotas de detergente biológico Tween 80, en agitación lenta en una parrilla Corning Stirrer (PC-353) durante cinco minutos; sumergiéndose posteriormente en etanol al 70% durante 1 minuto; a continuación se agitaron durante 10 minutos en una solución de cloro comercial Cloralex diluido al 0.1% v/v.

Para eliminar el exceso de cloro se lavaron tres veces con agua destilada estéril en condiciones de asepsia.

Las semillas se sembraron en tubos de ensayo de 125 x 25 mm conteniendo 25 ml de medio de cultivo, colocando una semilla por tubo (con el objeto de evitar contaminación de más de una semilla en caso de presentarse).

Todo lo anteriormente descrito se realizó en una campana de flujo laminar (VECO).

Incubación

Las semillas cultivadas *in vitro* se incubaron en una cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Intensidad Luminosa 2000 lux.
- Fotoperiodo 16 h/ 8 oscuridad.

Germinación

Se realizaron tres tratamientos con la finalidad de evaluar la respuesta en la germinación y el desarrollo posterior de las plántulas:

- 1.- Se utilizó el medio MS (1962) como medio basal, sin reguladores del crecimiento (concentración normal).
- 2.- Se utilizó el medio MS (1962), al 25% de su concentración normal, con 8 g/l de agar bacteriológico.
- 3.- Se utilizó el medio MS (1962) al 25 % de su concentración normal con 10 g/l de agar bacteriológico.

Los medios de cultivo y el material utilizado fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.5 Kg/cm².

Obtención de explantes

Una vez que las plántulas germinaban *in vitro*, y alcanzaban aproximadamente 4 a 10 mm de longitud, se procedía a disectarlas con ayuda de pinzas delgadas, bisturí y un microscopio de disección a 10x (Zeiss, Modelo 4750).

Se realizaron dos tipos de corte:

Transversal y Lateral, en ambos se eliminó la radícula, se utilizaron también los ápices como inóculo (denominado explante apical). Para el corte transversal, el segmento localizado abajo de la parte superior (apical) y el localizado junto a la radícula presentaba una longitud aproximada de entre 0.1 a 0.3 cm (Figura 5a). Para el corte lateral (Figura 5b) una vez separadas las partes apical y radicular, se practicó un corte longitudinal que dividió a la plántula en dos secciones laterales de 0.4-0.6 cm de longitud.

Tratamientos experimentales para la Regeneración de Brotes

Para la obtención y desarrollo de brotes se emplearon como medios basales el medio MS (1962) suplementado con diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento BAP/ANA y 2iP/AIA, solos y en diferentes concentraciones (Tablas 1 y 3 respectivamente). Adicionalmente se estimó la respuesta de los explantes en algunas combinaciones de BA/ANA con 10 g/l de agar (Tabla 2).

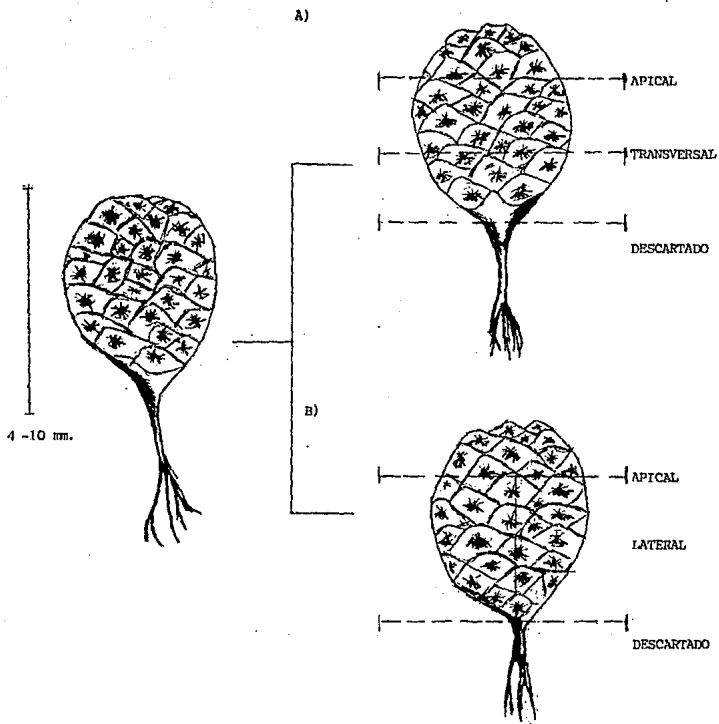


Fig. 5.- Corte apical, lateral y transversal de plántulas de *Manmillaria huitzilopochtli* D.R.Hunt, germinadas *in vitro*.

Tabla 1.- Tratamientos experimentales ensayados para la obtención de brotes a partir de explantes apicales, transversales y laterales de plántulas de *Mammillaria huitzilopochtli* en medio MS (1962).

		BAP (mg/l)			
		0	1.0	5.0	10.0
ANA (mg/l)	0	1	2	3	4
	0.01	5	6	7	8

Tabla 2.- Tratamientos experimentales ensayados con explantes de *Mammillaria huitzilopochtli* (cortes apicales, transversales y laterales) cultivados en medio MS enriquecido con BAP/ANA y adicionado con 10.0 g/l de agar bacteriológico.

		BAP (mg/l)			
		0	1.0	5.0	10.0
ANA (mg/l)	0	1	2	3	4
	0.01	5	6	7	8
	0.1	9	10	11	12
	1.0	13	14	15	16

Tabla 3.- Tratamientos experimentales para el cultivo *in vitro* de segmentos de callo de *Mammillaria hutzilopochilli* en medio MS con 8 g/l de agar, utilizando los reguladores del crecimiento 2iP/AIA en diferentes concentraciones .

		2iP (mg/l)					
		1.0	5.0	10.0	11.0	13.0	15.0
AIA (mg/l)	1.0	1	2	3	4	5	6
	5.0	7	8	9	10	11	12
	10.0	13	14	15	16	17	18

Las observaciones de los cultivos *in vitro* se efectuaban cada semana y la lectura final fue a las 12 semanas.

Las condiciones de incubación en todos los tratamientos para la inducción de brotes fueron las mismas que para la germinación de las semillas.

Enraizamiento *in vitro*

Para obtener el desarrollo de raíces en los brotes que alcanzaron una talla aproximada de 0.5-1.0 cm se procedió a individualizarlos con ayuda de pinzas de disección y a subcultivarlos en condiciones asépticas en medio MS (1962), con AIA (0.01 mg/l) en frascos de vidrio de 125 ml; usando las mismas condiciones de cultivo que se utilizaron para el desarrollo de brotes

Adaptación y Establecimiento en Invernadero

Con la finalidad de lograr una exitosa adaptación y establecimiento de las plantas desarrolladas *in vitro* se siguieron los pasos que a continuación se describen:

- Inicialmente se llevó a cabo el lavado de las plantas en agua corriente, para quitar el exceso de agar y así poder impregnar la raíz con un enraizador comercial (Raizone).
- Con ayuda de pinzas de disección, las plantas se sembraron cuidadosamente en vasos de unicel de 75 x 90 cm en una mezcla de suelo esterilizado por 30 minutos con vapor húmedo en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.5 Kg/ cm² (ver Apéndice 1).
- Los vasos se cubrieron con bolsas transparentes de poliestireno de 15 x 20 cm para asegurar una elevada humedad en las plantas, éstas permanecieron durante 16 a 20 semanas en invernadero.

Análisis Químico del Compuesto Sintetizado *in-vitro*

A través del cultivo de callo de *Mammillaria hutzilopochli* se detectaron pequeños cúmulos de células pigmentadas de coloración rosa y púrpura en diferentes tonalidades, que de acuerdo a las condiciones del cultivo se incrementaban o disminuían en volumen y extensión. Para su estudio se realizaron ensayos inicialmente en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias (UNAM) y posteriormente en el Laboratorio de Química Orgánica de la División de Posgrado de la Facultad de Química (UNAM).

Preparación de Concentrados de colorante como mezcla por extracción metanólica y acuosa.

Se seleccionó para el análisis a través de la cromatografía en papel la extracción metanólica (de acuerdo al método de extracción sugerido por Harborne, 1984), para diferenciar antocianinas y betacianinas de la mezcla de pigmento en las células, y para lo cual se dispuso de una variedad comercial de betabel (*Beta vulgaris*) que sirvió como control para betacianinas; y de pétalos de *Verbena* sp.(adquiridas en el mercado de Xochimilco), como controles para la identificación de antocianinas; aunque las dos clases de pigmentos son mutuamente excluyentes en su presencia, se realizó con la finalidad de reforzar la presencia de betalainas y la ausencia de antocianinas en el Orden Caryophyllales (Centrospermas).

Para el análisis de HPLC la extracción de la mezcla de pigmentos para callo y para betabel se realizó en medio acuoso, debido a que esta clase de pigmento es soluble en agua (Harborne, 1984).

Para la separación de los componentes de la mezcla de pigmentos se utilizaron (como se mencionó anteriormente) la Cromatografía en Papel y la Cromatografía Líquida de Alta Presión.

Cromatografía en papel

Concentrado de colorante por extracción metanólica de tejidos crudos.

a.- Controles.

Se escogieron betabeles de 6 cm de diámetro del mercado (variedad desconocida), se lavaron con agua corriente se secaron y se pesaron 250 g de ellos; de éstos se tomó una muestra de aproximadamente 1.0 g y se licuaron con 25 ml de metanol que contenía HCl concentrado (1%), el concentrado se centrifugó a 2000 rpm en una centrífuga Beckman TJ-6 durante 30 minutos, la cual se decantó posteriormente.

El método de extracción para *Verbena* sp. se realizó macerando en un mortero aproximadamente 1.0 g de pétalos frescos de esta especie, se mezcló con metanol que contenía un 1% de HCl concentrado, el macerado se centrifugó a 2000 rpm. por 30 minutos. Alícuotas de 1.0 ml se tomaron del sobrenadante (con capilares de 5.0 cm) y se aplicaron en papel Whatman (41-44 μ) para correr la CP durante 12 horas a temperatura ambiente.

b.- Células con Coloración.

Se aislaron cúmulos de células con la mezcla de pigmentos con ayuda de un microscopio de disección Zeiss (Modelo 4750) a 10x diámetros. La extracción de la mezcla de colorantes se inició separando visualmente (con ayuda de agujas de disección) las células coloridas en tubos de ensaye de 10.0 ml . Una vez obtenido el peso fresco de la muestra en una balanza marca Sauter (aproximadamente 1.0 g) se trituró en un mortero, vertiéndose inmediatamente en ampolletas ámbar de 5.0 ml de capacidad con 2.0 ml de metanol con 1% de HCl . La muestra se centrifugó en un aparato Beckman TJ-6 a 3000 rpm. durante 10 minutos, recuperándose el sobrenadante del cual se tomaron alícuotas de 1.0 ml y se aplicaron en papel Whatman 41-44 μ con capilares de 5.0 cm permitiendo correr la cromatografía durante 12 h a temperatura ambiente. Los eluyentes utilizados fueron BAW (BuOH-HOAc-H₂O 4:1:5) en un caso y FORESTAL (HCl -HOAc-H₂O 3:30:10) en el otro.

Cromatografía Líquida de Alta Presión

Extractos acuosos de células coloreadas y tejido intacto de betabel se inyectaron en un cromatógrafo de alta resolución Marca Waters, Modelo Varian 9050 con bomba modular, inyector 6K, módulo REM 100 y con detector de Ultra violeta visible. Se utilizó una columna C₁₈ Radial Pack de 10 μ m. de diámetro y 10 cm de longitud, se usó como eluyente una mezcla de H₃PO₄ 0.05 M y MeOH (9:1) a un pH de 2.75. Se leyó la absorbancia a 478 y 538 nm. La muestra no se cuantificó pues esa determinación se realizó específicamente para tratar de conocer y comparar cualitativamente los pigmentos de la muestra problema para poder determinar si se trataba de pigmentos semejantes a los del testigo.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSION

Germinación

Para la propagación de plantas a través de las técnicas de cultivo de tejidos se ha recomendado seguir una secuencia de pasos explorando sistemáticamente los requerimientos específicos en cada etapa del desarrollo, ya sean requerimientos nutricionales, hormonales o de condiciones ambientales.

En el presente trabajo se modificaron los medios básicos utilizados en la germinación de semillas en trabajos anteriores (Martínez y Rubluo, 1989), combinando tanto la disminución de la concentración de nutrientes como el incremento de agar, para observar su efecto en el desarrollo de plántulas que sirvieron como fuente de explantes para su utilización en ensayos posteriores, los cuales tenían que adquirir una buena talla y consistencia compacta en un corto tiempo.

La respuesta en la germinación se registró cada tercer día, y se consideraban como germinadas aquellas semillas en las que la radícula había emergido por lo menos 2 mm (Sumano, 1983). Los resultados se evaluaron en cada uno de los medios probados cada 2, 4, 8 y 12 semanas.

El primer medio utilizado en nuestros ensayos fue el medio Murashige-Skoog 1962, con la concentración y componentes usualmente utilizados para el cultivo *in vitro* de cactáceas (Johnson y Emino, 1979a; Martínez y Rubluo, 1989).

Los valores de los resultados que se obtuvieron en la germinación en el medio MS fueron muy bajos; de 20 semillas 13 germinaron después de doce semanas de cultivo, representando un porcentaje de 65%, adicionalmente se observó que la respuesta en el crecimiento de las plántulas fue muy lenta (Tabla 4). También se observó en este tratamiento una elevada pérdida de plántulas después de 16 semanas *in vitro*, debido principalmente a un cambio en la morfología del tallo y los tubérculos, los cuales se tornaban muy turgentes y presentaban una apariencia transparente, debido al incremento de volumen, lo cual las conducía finalmente a formar callo, provocando una elevada pérdida de material (50%).

Por las características antes mencionadas se supuso se podía tratar del fenómeno conocido como vitrificación y con base en diferentes reportes (Debergh, 1983 y 1991; Bötcher, 1988; Zimmerman, 1989; Kevers, 1990; Castro-Concha, 1990; Singha, 1990; Steven, 1990; Ziv, 1990) y como medida preventiva de la incidencia de la aparición del fenómeno mencionado se probó el medio MS (25%) y se incrementó la concentración de agar a 10 g/l. (Tabla 4).

En este tratamiento (MS 25% con 10 g/l de agar; figura 6) se presentó a las dos primeras semanas de cultivo un 31.25% de germinación seguida por una etapa de estancamiento de la cuarta a la octava semana *in vitro*, originándose a la décimo segunda semana un 81.25% de germinación (Tabla 4). Las pérdidas por vitrificación en éste cultivo fueron 40% a las 16 semanas.

La disminución de la concentración de nutrientes mejora la germinación y desarrollo de las plántulas, Simerda (1990) reporta que el mejor medio para la germinación de semillas de cactáceas es agar puro, y que el aumento en la concentración de agar disminuye la vitrificación, por lo que se esperaba que aunado a la baja concentración de nutrientes en el medio MS (25%) con 10.0 g/l de agar, la germinación aumentara, se presentara un sano desarrollo y una menor pérdida del material vegetativo; sin embargo la germinación fue menor, el desarrollo más lento y se perdió casi la mitad de el material.

Esto se pudo deber posiblemente a un decremento en la disponibilidad del agua y nutrientes influenciado por la solidificación de los geles, ya que la disponibilidad del agua no sólo afecta a las plantas en condiciones naturales, sino también en cultivo *in vitro* (Ziv, 1990; Debergh, 1991).

La mejor respuesta en lo que respecta a la germinación de semillas y el posterior desarrollo de las plántulas se presentó en el medio MS al 25% de su concentración con 8 g/l de agar, al manifestarse a la cuarta semana de cultivo, con un porcentaje de 93.75%, permaneciendo constantes las siguientes 8 y 12 semanas. A las 16 semanas *in vitro*, el 35% de las semillas germinadas se perdieron por la vitrificación (Fig. 6).

Es importante tomar en cuenta que las semillas de las cactáceas a menudo no germinan a pesar de las condiciones favorables, por los mecanismos naturales de dormancia debido a los hábitats con climas extremos de los que provienen, incluso en algunos casos en una misma planta se puede producir diferencias en el grado de dormancia en semillas exhibiendo una germinación con una distribución discontinua sobre el tiempo (Fearn, 1981; Rabenda 1990). Por lo que hasta cierto punto era de esperarse que si no se había aplicado ningún tipo de mecanismo para romper la testa en la semilla el porcentaje de germinación que se hubiese esperado sería menor al obtenido.

Regeneración de Brotes

Debido a la poca disponibilidad de material vegetativo por la pérdida de material por vitrificación y la lentitud inicial del crecimiento de las plántulas, se realizaron experimentos puntuales para tratar de establecer un rango de respuesta en referencia al tipo de reguladores de crecimiento y concentraciones a utilizar.

a) Explantes cultivados en MS (8 g/l de agar) adicionado de BAP/ANA

Los resultados obtenidos de los explantes cultivados en ocho tratamientos iniciales en medio MS con BAP y ANA y 8 g/l de agar, sólo respondieron formando callo en el mejor de los casos (Tabla 5), sin presentarse organogénesis en ninguno de los tratamientos ensayados. Más aún, los resultados observados no fueron homogéneos en el tiempo, ya que, la formación de callo se presentó desde las primeras cuatro semanas de cultivo

Como se puede apreciar en la tabla 5, después de permanecer 12 semanas en cultivo, el mayor porcentaje de respuesta se presentó en los explantes apicales; en explantes laterales y transversales, se manifestó una respuesta escasa y lenta, lo cual pudo deberse a que en explantes apicales hay un mayor número de partes meristemáticas y por lo tanto centros de diferenciación (Hu y Wang., 1983). Otro factor que pudo influir en la respuesta fue la talla de los explantes ya que ésta determina en muchos casos la sobrevivencia del cultivo (Subash, 1974; Mauseth, 1979; Hu y Wang, 1983; Georgé y Sherrington, 1984).

El efecto de la aplicación de auxinas en combinación con citocininas es evidente en los tratamientos con un mayor porcentaje de callo, y en donde las respuestas son, tanto en explantes apicales, como en explantes transversales y laterales (tratamientos 1.0, 5.0 y 10.0 mg/l de BAP con 0.1 mg/l de ANA (Tabla 5). Es probable que la presencia de ANA en el medio haya estimulado una respuesta homogénea en la formación de callo, la cual se presentó en todos los tratamientos antes mencionados.

La cantidad de callo fue variable y esta variabilidad se presentó aún en diferentes explantes del mismo tratamiento: hubo explantes que formaban callo abundante, y otros en que lo formaron de manera regular (Tabla 5), debido posiblemente a la capacidad de dediferenciación en cada uno de los explantes que respondieron.

Callo friable se presentó en los tratamientos sin reguladores de crecimiento y en 1.0/0 mg/l de BAP/ANA respectivamente; y combinado callos friable y compacto, en los tratamientos 1.0, 5.0 10.0 mg/l de BAP con 0.1 mg/l de ANA.

La coloración en la mayoría de los casos fue verde, aunque la presencia de células en manchones color rosa y púrpura fue notoria en algunos tratamientos (Tabla 5).

De acuerdo con las primeras evaluaciones realizadas en la etapa de desarrollo de brotes, se detectó que al adicionar BAP/ANA en las concentraciones probadas inicialmente (con base en reportes bibliográficos: Sterling y Doods, 1983; Lazarte, 1987; Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989), no se

presentaron los resultados esperados , es decir no hubo una respuesta relevante en la morfogénesis sino por el contrario sólo se formaba callo en todos los tratamientos.

En los tratamientos en los que no hay respuesta (ni callo ni brotes), el problema se debió a que los explantes presentaron una oxidación severa en el tejido desde la primera semana de cultivo, lo cual les daba primero una coloración café y posteriormente les causaba la muerte tal vez como otra consecuencia del tamaño de los explantes (Subash, 1974; Mauseth, 1979; George y Sherrington, 1984).

b) Explantes cultivados en MS (10.0 g/l de agar) adicionado de BAP/ANA

De los 16 tratamientos ensayados, los explantes de 5 tratamientos desarrollaron callo a la séptima semana de cultivo *in vitro* (tabla 6, sólo se presentan los tratamientos iniciales) y la organogénesis aunque muy escasa se presentó a la decimo segunda semana de cultivo (Tabla 7).

El efecto de auxinas es evidente en los explantes que respondieron formando callo *in vitro*, y fue notoria en los tratamientos 0.1/0.01; 0.1/0.1; 0.1/1.0; 1.0/1.0, con excepción de 0.01/0 mg/l de BAP/ANA (Tabla 6); la formación de callo fue mas tardada en todos los tratamientos en relación a los ensayos con 8 g/l de agar, lo cual se pudo deber a la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento por la solidificación del gel (Debergh, 1981,1983; Zimmerman, 1989; Castro-Concha, 1990; Simerda, 1990; Ziv, 1990).

A diferencia de los explantes cultivados en 8% de agar, en donde el callo se presentó friable y con coloración, las características del callo formado a la séptima semana *in vitro* fueron las siguientes: consistencia compacta y de color verde, sin células pigmentadas; formación abundante de callo en los tratamientos 0.1/0.01 mg/l y en 1.0/1.0 mg/l de BAP/ANA (Tabla 6). Después de 10 a 12 semanas de cultivo (Tabla 7), todos los explantes formaron callo verde y compacto en todos los tratamientos.

La formación de brotes se manifestó después de aproximadamente 12 semanas sólo en los tratamientos: 0.01/0; 0.01/0.01; 0.01/0.1; 0.01/1.0; 0.1/0; 0.1/0.01; 1.0/0.01; 1.0/0.1 y 1.0/1.0 mg/l de BAP/ANA (Tabla 7).

Como se observa en la figura 7, sólo en los explantes de nueve tratamientos se formaron brotes en los tratamientos que no presentaron brotes continuo formándose callo o en su defecto los explantes se oxidaban y permanecían en el mismo estado que se habían sembrado.

En explantes apicales, el mayor número de brotes se regeneró en una concentración de 0.1 mg/l de BAP; se obtuvieron 4 brotes de 6 explantes, lo cual significa que en total se tenían 0.6 brotes por explante (Figura 8); es importante hacer notar que, en algunos tratamientos, a medida que se incrementa la concentración de las auxinas, se disminuye la morfogénesis. Por ejemplo: en la tabla 7

se observa que con las concentraciones 0.1/0; 0.1/0.01; 1.0/0.1 mg/l de BAP/ANA, en explantes apicales, la respuesta va disminuyendo de 0.6 brotes por explante a 0.5 y posteriormente a 0.16 brotes.

La mejor respuesta considerada hasta ese momento se presentó en explantes con cortes laterales; el mayor número de brotes se obtuvo en el tratamiento 0.01 mg/l de BAP en el que se desarrollaban 2 brotes por explante (Fig. 8). Con este resultado podemos observar que esta respuesta se manifestó sin la presencia de auxinas; es probable que éstas estuvieran jugando un papel inhibitorio en la morfogénesis, o que la auxina se esté sintetizando endógenamente. También se observó que sólo los explantes apicales y laterales dieron una respuesta morfogenética, no así los explantes transversales, los cuales no generaron respuesta alguna.

La formación de raíces fue evidente, presentándose en mayor número en el tratamiento 0.01 mg/l de BAP sin auxinas (Tabla 7).

De acuerdo con los resultados anteriores, con este grupo de tratamientos (MS con BAP/ANA y con 10 g/l de agar, para evitar al máximo la aparición del fenómeno de vitrificación y la desintegración del material) no se logró la respuesta esperada, sólo se volvió a obtener callo y brotes escasos que permanecieron aparentemente sanos y relativamente vigorosos durante unas semanas, pero después de la décimo sexta semana de cultivo se dediferenciaban a callo aún con el incremento de la concentración de agar (lo cual, en apariencia, lo único que causó fue un retraso en la formación de callo con respecto al ensayo con 8 g/l de agar).

La falta de organogénesis pudo ser consecuencia de la complementación inicial del medio de cultivo con las concentraciones y reguladores del crecimiento no adecuados, ya que se conoce que la actividad de las hormonas incluye tanto la estimulación como la inhibición del crecimiento por incidir directamente en actividades enzimáticas específicas o en transformaciones bioquímicas, pudiendo exhibir respuestas opuestas dependiendo del origen y concentración de las mismas, por lo que es importante elegir el, o los reguladores adecuados para el cultivo (Hu y Wang, 1983; George y Sherrington, 1984).

c) Explantes cultivados en MS (8 g/l de agar) adicionado de 2IP y AIA

El efecto de las citocininas sobre el cultivo puede variar de acuerdo con el compuesto particular utilizado; el tipo de cultivo, y la variedad de plantas de las cuales se ha derivado (George y Sherrington, 1984). De acuerdo con los resultados anteriores parece ser que la aplicación de BAP (citocinina sintética) lo único que propició en los cultivos fue el incremento en la división celular y no en la morfogénesis, pudiendo ser la causa el origen de ésta citocinina.

Mauseth (1979) reporta que el BAP en combinación con ANA son inefectivos en la formación de brotes en *Opuntia polyacantha*; en tanto que Martínez-Vázquez y Rubluo (1989), encuentran una buena respuesta en presencia de BAP en *M. san-angelensis*; Fannesbech (1979), descubrió que las citocininas naturales 2iP y zcatina fueron las mejores para promover el crecimiento y sobrevivencia de ápices de cultivos de *Asparagus plumosus*, y cultivos de *Browallia viscosa*, requirieron de 2iP para la promoción de brotes adventicios directos o indirectos.

En lo referente a las auxinas se ha encontrado que las de origen sintético, en elevadas concentraciones, son fitotóxicas para el crecimiento de las plantas. Una de las distinciones más importantes entre las auxinas sintéticas y naturales es que los componentes sintéticos son más estables, y quizás por ser compuestos no naturales hay pocos sistemas enzimáticos que los atacan con facilidad, por lo que se acumulan más fácilmente e intoxican a la planta (Bidwell, 1990).

Debido a que la formación de brotes no se había presentado como se esperaba en los tratamientos ensayados previamente y debido también a la escasez de material disponible, e infiriendo que por ser reguladores de crecimiento de origen sintético BAP/ANA (que son más activos) pudieran estar bloqueando la morfogénesis *in vitro*; se decidió cambiarlos por reguladores naturales (2iP/AIA), que son más reconocibles por el sistema metabólico celular y, por lo tanto, menos agresivos que los sintéticos (Devlin, 1976; George y Sherrington, 1984; Bidwell, 1990; Kamineck, 1992). Obteniéndose los siguientes resultados:

El incremento del callo fue evidente durante las primeras 2 semanas de cultivo en el 100% de los explantes (Tabla 8); la cantidad total de callo después de 12 semanas de cultivo fue de 3 a 4.5 cm³ por frasco; se formó callo friable principalmente con elevadas concentraciones de auxinas (5.0 y 10.0 mg/l de AIA, tabla 8).

La mayoría de los tratamientos exhibieron callo de color verde con células en manchones color blanco y rosa (Tabla 8).

La presencia de 3 a 6 raíces fue notoria en 8 de los 18 tratamientos realizados, y de 7 o más raíces en otros tres tratamientos 11.0, 13.0 y 15.0 mg/l de 2iP con 10.0 mg/l de AIA (Tabla 8).

Una buena respuesta se presentó durante el cultivo, ya que todos los tratamientos regeneraron brotes entre la cuarta y decimo segunda semana *in vitro* (Tabla 8 y Fig. 9); el mayor porcentaje se desarrolló en los tratamientos 1.0, 10.0 y 13.0 mg/l de 2iP con 1.0 mg/l de AIA (Fig. 9).

El mayor número de brotes se manifestó en una combinación de 10.0/1.0 mg/l de 2iP/AIA con la formación de 204 brotes en 16 frascos (cada frasco contenía 5 segmentos de callo de

aproximadamente 0.5 cm^3 y cada tratamiento se inició con 5 frascos) y un promedio de 12.8 brotes por frasco (Tabla 8 y Fig.10).

Cabe mencionar que las respuestas en la formación y desarrollo de los brotes en todos los ensayos (BAP/ANA y 2iP/AIA) se registraron cada semana, realizándose la última observación a la décimo segunda semana de cultivo; los subcultivos de los explantes se efectuaron cuando se agotaban los medios de cultivo, lo cual generalmente ocurría entre la cuarta y sexta semana de transplante.

Debe subrayarse que en estos ensayos en los cuales se combinaron las citocininas y auxinas naturales, se favoreció el desarrollo de brotes vigorosos, con tejido muy compacto; lográndose la mejor respuesta con la obtención de 204 brotes (Tabla 8). Fue aparente el uso del 2iP (citocinina natural más activa y componente del RNAt) con AIA (auxina natural mayormente usada en cultivo de tejidos porque tiene pocos efectos adversos sobre organogénesis; Staba, 1980).

Enraizamiento

Se formaron raíces en 8 lotes (con brotes individualizados previamente) en medio MS adicionado con AIA 0.01 mg/l , después de tres a cuatro semanas de cultivo *in vitro* (los lotes se conformaron de acuerdo con la fecha de su individualización).

El mayor porcentaje de enraizamiento fue de 73.3% en un lote en donde 22 brotes individualizados de un total de 30 enraizaron.

En promedio se desarrollaron dos raíces por brote con una longitud de 0.2 a 1.0 cm (Tabla 9).

A pesar de que la etapa de enraizamiento fue planteada en un medio de cultivo sin citocininas y con la presencia de una auxina natural (con lo cual se esperaba que los brotes una vez que pasaran por este medio presentarán raíces bien formadas), los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que, en seis lotes, las raíces formadas emergían de una película de callo que se desarrollaba en la base de los explantes; esto pudo ser consecuencia de la presencia de citocininas en elevadas concentraciones en el medio de inducción de brotes, ya que algunas veces los residuos de citocinina en el medio de enraizamiento son suficientes para suprimir la formación de raíces (Hu y Wang, 1983; George y Sherrington, 1984). Sólo en dos lotes, raíces de 0.5 hasta 1.5 cm de longitud emergieron directamente del tejido.

Después de que los brotes enraizados permanecían aproximadamente de 6 a 8 semanas *in vitro*, se procedía a pasarlas a una mezcla de suelo (Apéndice 1) en vasos de unicel de 10.0 cm de longitud por 8 cm de diámetro; permaneciendo en el laboratorio por 1 ó 2 semanas a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C constante), para favorecer su adaptación al invernadero, procurando que este cambio fuera gradual, por lo que se cubrían con bolsas de poliestireno con pequeñas

perforaciones que se iban incrementando en diámetro cada tercer día, durante aproximadamente 2 semanas, y posteriormente se trasladaban al invernadero.

Establecimiento de plantas en el Invernadero.

Después de permanecer de 12 a 16 semanas en el invernadero, a una temperatura de $28 \pm 10^{\circ}\text{C}$, sobrevivieron el 50 y 90% de plantas (Tabla 9) de dos lotes de 12 y 20 individuos respectivamente en donde el origen de las raíces fue directo (que emerge directamente del tejido del tallo) y un 60 y 87% de 5 y 15 individuos respectivamente (Tabla 9), de dos lotes en donde el origen de las raíces fue indirecto (que emerge de la película de callo formado en la base del explante).

Aunque se realizaron diversos ensayos para el trasplante, establecimiento y permanencia de plántulas a partir de brotes enraizados al invernadero se presentó una gran pérdida de explantes, siendo producto de diversos factores posibles, como la presencia de callo en la base de los explantes, con lo cual se pudieron presentar raíces poco funcionales; adicionalmente se conoce de antemano que plantas que han crecido *in vitro*, han sido expuestas continuamente a un microambiente que ha sido seleccionado para proveer la mínima tensión desarrollándolas con las condiciones óptimas de nutrición, temperatura, humedad relativa, etc, contribuyendo todos éstos factores a que un individuo no sobreviva en ambientes normales ya que las características anatómicas y fisiológicas de las plántulas desarrolladas *in vitro* difieren de las desarrolladas *in vivo* (George y Sherrington, 1984; Preece y Sutter, 1991).

Un lote de 15 individuos permanece en el invernadero el cual se encuentra en buenas condiciones, presentando individuos con una longitud variable de 1.5 a 6.0 cm, estas plantas se encuentran en observación y cuidados extremos dadas las características y la importancia que revisten (Fig. 11).

Cabe mencionar que del material inicial se han originado aproximadamente 250 plántulas, que han sido transplantadas al invernadero en varios lotes (Fig. 11).

Análisis Químico de Pigmentos de Cultivo de Callo

Los tejidos de las Caryophyllales se colorean intensamente por pigmentos violeta. Constan este fenómeno el cultivo de frutos y callos de diferentes especies, como *Myrtillocactus geometrisans* (Colomas, 1977). Siendo *Mammillaria huiquizilpochtili* una especie que pertenece a una familia de este Orden y debido a la presencia de cúmulos de células pigmentadas de color rosa y púrpura durante el cultivo *in vitro* de esta especie, y de acuerdo a la inquietud de saber que compuesto se encontraba en dichos cultivos, se realizó un análisis químico para la identificación preliminar de la mezcla de pigmentos problema.

Cromatografía en Papel

En la figura 12, se presentan dos diagramas de las CP realizadas en donde se muestra la extrapolación de las mismas.

Los resultados obtenidos en extractos melanólicos de callo con células pigmentadas son las siguientes:

a.- Eluía con BAW

Se observan tres manchas con fluorescencia azul pálido brillante y R_f s = 1.65, 4.3 y 8.0.

b.- Eluía con Forestal

Se observan dos manchas con fluorescencia azul pálido brillante y R_f s de la muestra problema de 3.6 y 6.0.

Los R_f s obtenidos no concordaron con los de los patrones *Verbena sp.* y *Beta vulgaris*.

Cromatografía Líquida de Alta Presión.

La figura 13a. muestra los resultados del HPLC con detector a 478 nm, observándose que en el extracto acuoso de las muestras problema se obtuvieron dos bandas con tiempos de retención de 7.12 y 13.12 y en el betabel tuvo dos bandas con un tiempo de retención de 4.18 y 8.94, se asume que el porcentaje de área relativo de estos compuestos es de 7.632 y 4.796 para callo; y de 54.0 y 31.522 para betabel.

La figura 13b. muestra los resultados de la HPLC con detector a 538 nm, observándose que en el extracto acuoso de células pigmentadas de callo se obtuvieron dos bandas con tiempos de retención de 6.97 y 12.69; en el extracto acuoso con ácido ascórbico de tejidos crudos del betabel (testigo) tuvo un tiempo de retención de 8.74; por lo que se asume que el porcentaje de área relativo de estos compuestos es de 23.8 y 18.2 para la muestra problema y en el testigo es de 56.4.

De acuerdo con las observaciones realizadas, la manifestación de islotes de células pigmentadas en los cultivos se pudo deber a las presencia de citocininas en una elevada concentración, éstas muestran un efecto estimulante sobre la biosíntesis de betalainas (Piatelli, 1981; Bohm y Rink, 1988).

Al realizar los ensayos preliminares que orientaron a determinar el tipo de pigmentos que se estaban sintetizando dentro de las células, se dedujo que los productos aislados del callo pudieran ser dos posibles betacianinas diferentes a las del betabel, las cuales se encontraron en proporciones que difieren, siendo el producto menos polar el que se encuentra en mayor cantidad. Cabe mencionar que para la identificación precisa de éstos pigmentos se deben realizar estudios más profundos con un mayor número de patrones ya establecidos que permitan determinar con certeza la clase de pigmentos se están sintetizando en el cultivo de esta cactácea.

Tabla 4.- Germinación *in-vitro*¹ de semillas de *Mammillaria hulzilapochuli* en medio MS y MS al 25% con distinto grado de gelificación².

Tratamiento Núm. de ⁴ Semillas		Tiempo (semanas)			
		2	4	8	12
		S.G. (%)	S.G. (%)	S.G. (%)	S.G. (%)
MS	20	3 (15)	6 (30)	8 (40)	13 (65)
MS 25 8%	16	11(68.75)	15(93.75)	15(93.75)	15(93.75)
MS 25 10%	16	5(31.25)	11(68.75)	11(68.75)	13(81.25)

(1) 27 ± 2°C; Fotoper. 16 h.; 2000 lux

(2) Bactoagar 8 y 10 g/l

(3) %- Concentración de agar

(4) Número total de semillas en estos tratamientos

SG -Semillas Germinadas

TABLE 5.- Formación de callo en ápices y secciones de plántulas de *Mammillaria huiztopochtli*, cultivadas en medio MS (1) con agar 8% (Resultados después de 12 semanas)

R. C. E X P L A N T E S C O N R E S P U E S T A						
BAP/ANA mg/l	Tipo de Explanle (2)	CALLO	%	Cantidad (3)	Tipo (4)	Color
0/0	A	3/6	50	+	F	Verde
	L	0/6	—	—	—	—
	T	0/6	—	—	—	—
1.0/0	A	3/6	50	+++	F	Verde/Púrpura
	L	0/6	—	—	—	—
	T	0/6	—	—	—	—
5.0/0	A	0/6	—	—	—	—
	L	0/6	—	—	—	—
	T	0/6	—	—	—	—
10.0/0	A	0/6	—	—	—	—
	L	0/6	—	—	—	—
	T	0/6	—	—	—	—
0/0.1	A	0/6	—	—	—	—
	L	0/6	—	—	—	—
	T	0/6	—	—	—	—
1.0/0.1	A	4/6	66.6	+++	C	Verde/Púrpura
	L	0/6	—	—	—	—
	T	2/6	33.3	+++	F	Verde
5.0/0.1	A	4/6	66.6	+++	C	Verde/Púrpura
	L	2/6	33.3	++	F/C	Verde
	T	0/6	—	—	—	—
10.0/0.1	A	4/6	66.6	+++	F/C	Verde/Rosa
	L	1/6	16.6	++	F	Verde
	T	0/6	—	—	—	—

(1) 27 ± 2 C; Fotoper. 16 h; 2000 lux.

(2) A= Apices 0.2-0.3 cm. L= Lateral T= Transversal

(3) - Nulo; + Escaso(0.5-1.5 cm³); ++ Regular(1.5-3 cm³); +++ Abundante (3-4.5cm³).

(4) F= Friable C= Compacto

— Tratamientos sin respuesta.

R.C. Reguladores de crecimiento

TABLA 6.- FORMACION DE CALLO EN APICES Y SECCIONES DE PLANTULAS DE
Mammillaria huitzilopochtli, CULTIVADAS EN MEDIO MS (1) CON AGAR 10 g/l
(RESULTADOS DESPUES DE 7 SEMANAS)

R C		EXPLANTES CON RESPUESTA				
RAP/ANA mg/l	(2)Tipo de Explantante	CALLO	%	Cantidad (3)	Tipo (4)	Color
0.01/0.0	A	2/6	33.3	+	C	VERDE
	L	—	—	—	—	—
	T	2/6	33.3	+	C	VERDE
0.01/0.01	A	—	—	—	—	—
	L	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—
0.01/0.1	A	—	—	—	—	—
	L	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—
0.01/1.0	A	—	—	—	—	—
	L	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—
0.1/0.0	A	—	—	—	—	—
	L	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—
0.1/0.01	A	2/6	33.3	+++	C	VERDE
	L	3/6	50.0	+++	C	VERDE
	T	1/6	16.6	+++	C	VERDE
0.1/0.1	A	1/6	16.6	+	C	VERDE
	L	2/6	33.3	+	C	VERDE
	T	2/6	33.3	+	C	VERDE
0.1/1.0	A	2/6	33.3	++	C	VERDE
	L	3/6	50.0	++	C	VERDE
	T	2/6	33.3	++	C	VERDE
1.0/0.0	A	—	—	—	—	—
	L	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—
1.0/0.01	A	—	—	—	—	—
	L	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—
1.0/0.1	A	—	—	—	—	—
	L	—	—	—	—	—
	T	—	—	—	—	—
1.0/1.0	A	—	—	—	—	—
	L	1/6	16.6	+++	C	VERDE
	T	1/6	16.6	+++	C	VERDE

(1) 27 ± 2 G; Fotoper. 16 h; 2000 lux.

(2) A= Apices 0.2-0.3 cm L= Laterales T= Transversales

(3)-Nulo+Escaso(0.5-1.5 cm³)+Regular(1.5-3 cm³)+Abundante (3-4.5 cm³)

(4) F = Friable C = Compacto

(-) Tratamientos realizados sin respuesta.

R.C.- Reguladores de Crecimiento

TABLA 7.- RESPUESTA DE APICES Y SECCIONES DE PLANTULAS DE Mammillaria huitzilpochtli CULTIVADAS EN MEDIO MS (1) CON AGAR 10g/L

(RESULTADOS DESPUES DE 12 SEMANAS)

R C		E X P L A N T E S C O N R E S P U E S T A						
BAP/ANA mg/l	(2)Tipo de Explanite	CALLO %	Tipo Color (3)	Explant c/Brotos(4)	(%)	No. de Brotos	X	RAIZ (5)
0.01/0.0	A	30	C Verde	1/6	(16.6)	1/6	0.16	***
	L	30	C Verde	5/6	(83.3)	12/6	2.0	***
	T	30	C Verde	—	—	—	—	***
0.01/0.01	A	40	C Verde	2/6	(33.3)	2/6	0.33	**
	L	40	C Verde	—	—	—	—	**
	T	40	C Verde	—	—	—	—	**
0.01/0.1	A	5	C Verde	2/6	(33.3)	2/6	0.33	**
	L	5	C Verde	—	—	—	—	**
	T	5	C Verde	—	—	—	—	**
0.01/1.0	A	15	C Verde	—	—	—	—	**
	L	15	C Verde	3/6	(50.0)	4/6	0.66	**
	T	15	C Verde	—	—	—	—	**
0.1/0.0	A	25	C Verde	4/6	(66.6)	4/6	0.66	**
	L	25	C Verde	—	—	—	—	**
	T	25	C Verde	—	—	—	—	**
0.1/0.01	A	60	C Verde	3/6	(50.0)	3/6	0.5	**
	L	60	C Verde	—	—	—	—	**
	T	60	C Verde	—	—	—	—	**
0.1/0.1	A	60	C Verde	—	—	—	—	—
	L	60	C Verde	—	—	—	—	—
	T	60	C Verde	—	—	—	—	—
0.1/1.0	A	60	C Verde	—	—	—	—	—
	L	60	C Verde	—	—	—	—	—
	T	60	C Verde	—	—	—	—	—
1.0/0.0	A	60	C Verde	—	—	—	—	—
	L	60	C Verde	—	—	—	—	—
	T	60	C Verde	—	—	—	—	—
1.0/0.01	A	60	C Verde	—	—	—	—	—
	L	60	C Verde	1/6	(16.6)	1/6	0.16	—
	T	60	C Verde	—	—	—	—	—
1.0/0.1	A	60	C Verde	1/6	(16.6)	1/6	0.16	*
	L	60	C Verde	—	—	—	—	*
	T	60	C Verde	—	—	—	—	*
1.0/1.0	A	60	C Verde	1/6	(16.6)	1/6	0.16	*
	L	60	C Verde	1/6	(16.6)	1/6	0.16	*
	T	60	C Verde	—	—	—	—	*

(1) 27 ± 2 G; Fotoper. 16 h; 2000 lux.

(2) A = Apices 0.2-0.3cm L= Laterales T = Transversales

(3) C = Compacto.

(4) 6 explantes por tratamiento.

(5) - = Nulo; * = Escaso(1-3); ** = Regular(3-6); *** = Abundante(7 ó más).

(—) = Tratamientos sin respuesta.

RC- Reguladores de Crecimiento

TABLA 8.- EFECTO DE 2IF y AIA EN EL CRECIMIENTO DE CALLO Y MORFOGENESIS IN VITRO DE Mammillaria luitziopochtili, EN EXPLANTES CULTIVADOS EN MEDIO MS (1)

(RESULTADOS OBTENIDOS DESPUES DE 12 SEMANAS)

R C		EXPLANTES CON RESPUESTA								
2IF/AIA mg/l	(2) CALLO	%	Cantidad (3)	Tipo (4)	Color (5)	Inóculos BROTÉS %	No. de Brotés(2)	\bar{X}	RACES (6)	
1.0/1.0	5/5	100	++	C	VE/RO	3/5	60.0	43/5	8.6	-
5.0/1.0	5/5	100	++	C	VE/RO	3/7	42.8	34/7	4.8	-
10.0/1.0	5/5	100	+++	C	VE/BL/RO	10/16	62.5	204/16	12.8	-
11.0/1.0	5/5	100	+++	F	VE/RO	2/7	28.5	26/7	3.7	**
13.0/1.0	5/5	100	+++	C	VE/BL	4/10	40.0	62/10	6.2	**
15.0/1.0	5/5	100	+++	C	VE/BL	4/9	44.4	34/9	3.7	-
1.0/5.0	5/5	100	+++	C	VE/BL/RO	2/8	25.0	25/8	3.1	-
5.0/5.0	5/5	100	+++	C	VE/BL	2/8	25.0	24/8	3.0	-
10.0/5.0	5/5	100	+++	C	VE/RO	1/10	10.0	10/10	1.0	-
11.0/5.0	5/5	100	+++	F	VE/RO	1/10	10.0	17/10	1.7	-
13.0/5.0	5/5	100	+++	F	VE/BL/RO	2/10	20.0	13/10	1.3	**
15.0/5.0	5/5	100	+++	F	VE/RO	3/10	30.0	39/10	3.9	**
1.0/10.0	5/5	100	+++	F	VE/RO	2/10	20.0	5/10	0.5	**
5.0/10.0	5/5	100	+++	F	VE/RO	2/10	20.0	18/10	1.8	**
10.0/10.0	5/5	100	+++	F	VE/RO	3/10	30.0	15/10	1.5	**
11.0/10.0	5/5	100	++	F	VE/RO	1/10	10.0	7/10	0.7	***
13.0/10.0	5/5	100	++	F	VE/RO	1/10	10.0	23/10	2.3	***
15.0/10.0	5/5	100	++	F	VE/RO	1/10	10.0	5/10	0.5	***

(1) 27 ± 2 C; Fotoper. 16 h; 2000 lux.

(2) Inóculo inicial 0.5 cm³, 5 inóculos/frasco, 5 frascos/tratamiento.

(3)- Nulo; + Escaso(0.5-1.5cm³);++ Regular(1.5-3 cm³);+++ Abundante(3-4.5cm³).

(4) C = Compacto F = Friable

(5) VR = verde; BL = blanco; RO = rosa

(6) - Nulo; * (1-3) Escaso; ** (3-6) Regular; *** (7 ó más) Abundante.

R.C.- Reguladores de Crecimiento

TABLA 9. Efecto de AIA (0.01 mg/l) en el enraizamiento de brotes in vitro (1) de Mammillaria huitzilpochili y sobrevivencia de plántulas en invernadero.

EXPLANTES CON RESPUESTA							
LOTE	Brotes		Raíces/ Brote	RAIZ		Plántulas (4) a invernadero	Sobrevivencia (5) en invernadero %
	Enraizados (2)	%		Longitud (cm)	Origen (3)		
1	9/40	22.5	2	0.2 - 0.4	I	9	0
2	6/40	15.0	2	0.2 - 0.4	I	6	0
3	12/40	30.0	2	0.2 - 0.4	I	12	0
4	19/40	47.5	2	0.2 - 0.4	I	19	0
5	15/40	37.5	2	0.2 - 0.4	I	15	87
6	12/40	30.0	1	0.5 - 1.0	D	12	50
7	22/30	73.3	2	0.5 - 1.5	D	20	90
8	5/15	33.3	-	-	I	5	60

(1) Bacto Agar 8 gr/l, 27 + 2° C, Fotoperiodo 16h; 2000 lux

(2) Brotes con 0.5 a 1.0 cm. de altura; N° de brotes con raíces/ N° de brotes cultivados

(3) I = Indirecto

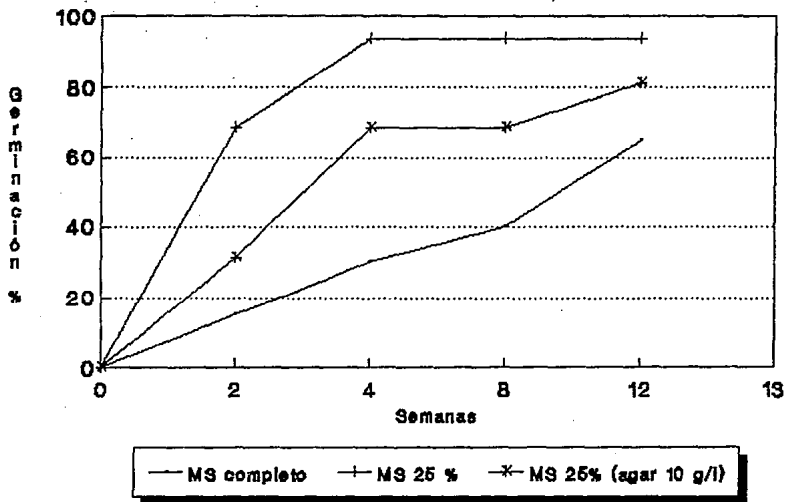
D = Directo

(4) Brotes enraizados de 0.5 a 2.0 cm. de longitud

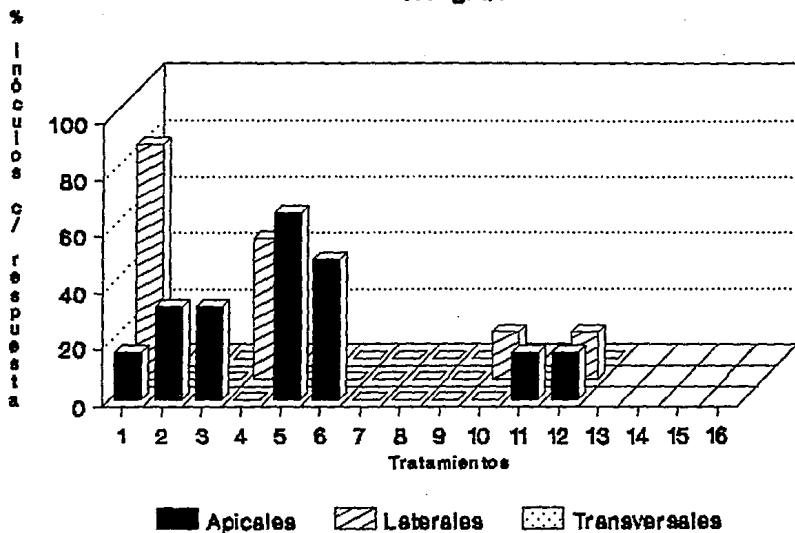
(5) Después de 16 - 20 semanas

(28 + 10° C, Fotoperiodo natural Cd. de México, 1 riego c/2 semanas)

Fig 6. Germinación de semillas de *Mammillaria huitzilpochtli*, in vitro.

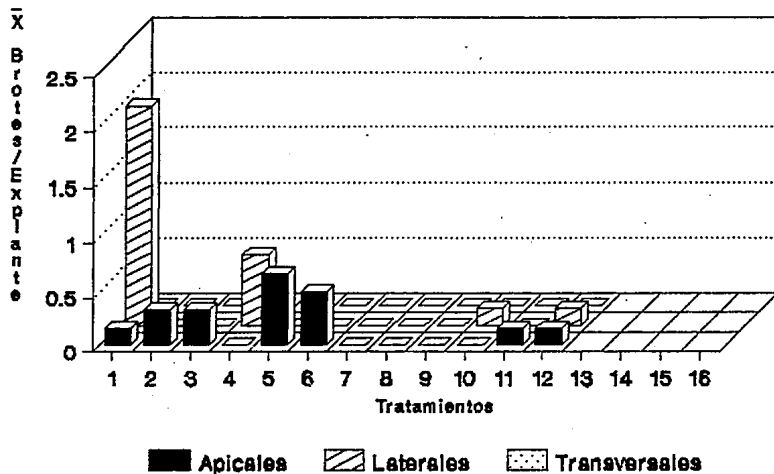


**Fig 7. Explantes con brotes en MS
adicionado de BAP/ANA*, con agar
(10 g/l).**



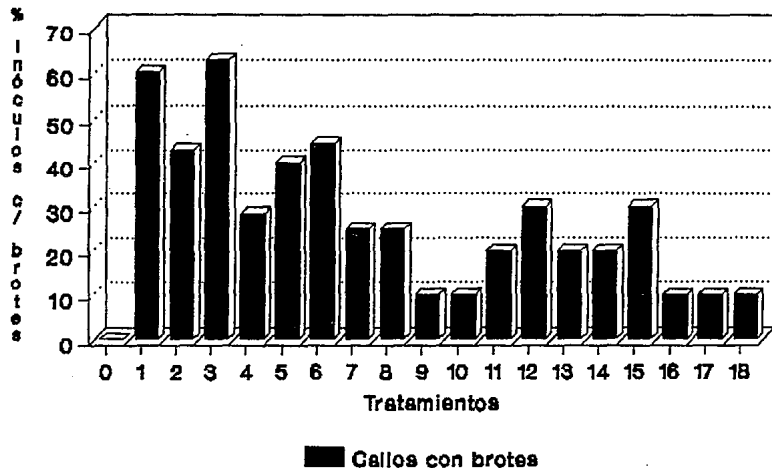
* Ver tabla 7 para detalles

Fig 8. Número de brotes en ápices y secciones de plántulas en MS adicionado de BAP/ANA+, con agar (10 g/l).



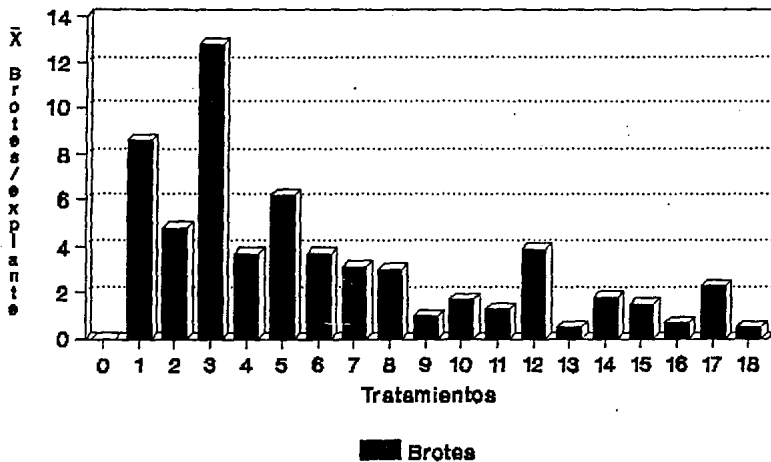
-Ver tabla 7 para detalles

Fig 9. Porcentaje de inóculos que formaron brotes, cultivados en medio MS con 2IP/AIA, a diferentes concentraciones*.



* Ver tabla 8 para detalles

Fig 10. Brotes obtenidos en callos cultivados in vitro en MS con 2iP/AIA, a diferentes concentraciones*.



* Ver tabla 8 para detalles



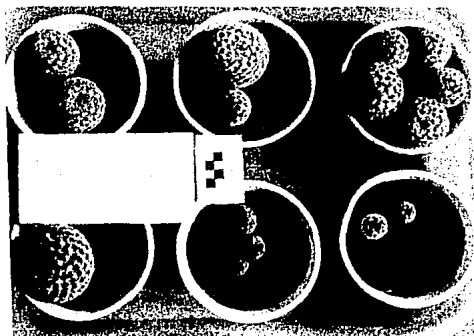
a



c



b



d

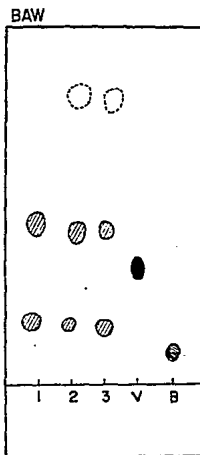


e

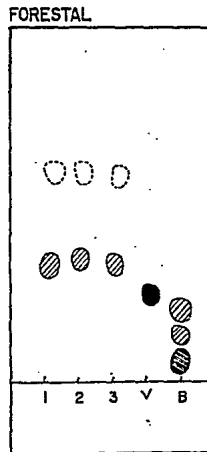
Fig.11.- Propagación *in vitro* de *M. huizilopochtli*. (a) Individuo silvestre de esta especie. (b) Plántulas de *M. huizilopochtli* provenientes de semillas germinadas *in vitro* utilizadas para generar el material que sirvió como explantes (c) Brotes regenerados a partir de cultivos de callos de esta especie en medio MS adicionado con 2iP/AIA. (d) Población de 15 individuos pertenecientes al primer lote que fue trasplantado al invernadero. (e) Cultivo de callos con pigmentación púrpura en el 90% de su superficie. (cp) Callo pigmentado.

FIG.12.- ANALISIS QUIMICO DE CELULAS PIGMENTADAS DE CALLO DE Mammillaria huitzilopochtli Y DE EXTRACTOS DE TEJIDOS CRUDOS DE Beta vulgaris Y DE verbena sp. EN CROMATOGRAFIA EN PAPER.

55



$R_f=1.65$
 $R_f=4.3$
 $R_f=8.0$

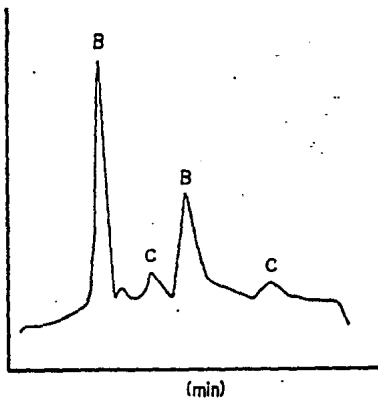


$R_f=3.6$
 $R_f=6.0$

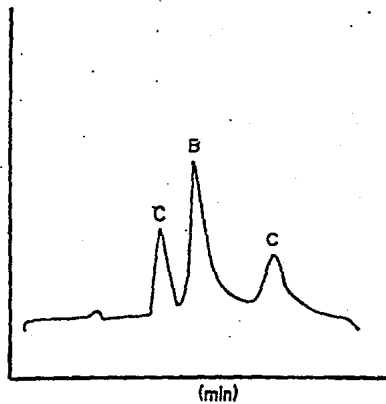
1. 2. 3. EXTRACTOS METANOLICOS DE CULTIVOS DE CALLOS
 B. EXTRACTOS METANOLICOS DE TEJIDOS CRUDOS DE Beta vulgaris
 V. EXTRACTOS METANOLICOS DE TEJIDOS CRUDOS DE Verbena sp.

FIG.13.- ANALISIS QUIMICO DE CELULAS PIGMENTADAS DE CALLO DE Mammillaria huitzilopochtli
Y DE EXTRACTOS DE TEJIDOS CRUDOS DE Beta vulgaris EN HPLC.

a) 478 nm.



b) 538 nm.



VII.-CONCLUSION

Siendo el objetivo principal del presente trabajo obtener la metodología para desarrollar *in vitro* a *Mammillaria huitzilopochtli*. Los resultados obtenidos nos permiten concluir lo siguiente:

- 1.- Se estableció un método para la germinación de las semillas de esta especie, a través de su cultivo en medio MS al 25% de su concentración, adicionado con 8 g/l de agar.
- 2.- Se encontró que explantes (laterales, apicales y transversales) creciendo en MS, adicionado con los reguladores de crecimiento 2iP/AIA (10.0/1.0 mg/l) dieron los mejores resultados para obtener el desarrollo y la multiplicación de brotes.
- 3.- Se ha obtenido un medio (MS con 0.01 mg/l de AIA) en el que se formaron las raíces necesarias para el establecimiento de esta especie en el invernadero y la permanencia de lotes de individuos que han sido obtenidos a través de las técnicas de cultivo *in vitro*.

Lo anterior nos permite concluir que se ha encontrado una metodología a través del cultivo *in vitro* para la regeneración, la micropropagación, así como su adaptación a invernadero de *Mammillaria huitzilopochtli* y queda asentado que las mejoras futuras de la técnica permitan su reintroducción en áreas restringidas así como su distribución en jardines botánicos.

Aunque se presentó como un objetivo secundario dentro de este trabajo de tesis, se han sentado las bases para que la mezcla de pigmentos encontrados en las células de esta especie puedan ser analizados con más detalle y precisión con ayuda de técnicas especializadas en el futuro.

VIII.- APENDICE

-1-

Mezcla de suelo utilizada como sustrato para el trasplante de plántulas cultivadas *in vitro*.

Tierra lama	1 parte
Tierra de hoja (molido ó cernido)	1/2 parte
Arena de río	1 1/2 parte
Tezontle cernido	1/2 parte
Harina de hueso	1/4 parte
Tierra caliza cernida	1/4 parte

APENDICE 2

Medios de Cultivo.

Medio Basal MS (1962)

Preparación de soluciones stock*

Stock 1	MS MODIFICADO	MS NORMAL	
Macronutrientes	mg/l	mg/l	
g/l ¹			
(NH ₄) ₂ NO ₃	412.5	1650.0	
16.5			
K NO ₃	475.0	1900.0	
19.0			
Mg SO ₄ .7H ₂ O	92.5	370.0	
3.7			
KH ₂ PO ₄	42.5	170.0	
1.7			
CaCL ₂ .2H ₂ O	110.0	440.0	
4.4			
Stock 2			
Micronutrientes			
Mn SO ₄ .4H ₂ O	5.575	22.3	0.223
Zn SO ₄ .7H ₂ O	2.15	8.6	0.086
H ₃ BO ₃	1.55	6.20	0.062
KI	0.207	0.83	0.0083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.062	0.25	0.0025
Cu SO ₄ .5H ₂ O	0.006	0.025	
0.0025			
Co CL ₂ .6H ₂ O	0.006	0.025	0.00025
Stock 3			
Solución de Hierro			
Fe SO ₄ .7H ₂ O	6.25	27.8	
0.278			
Na ₂ EDTA	9.32	37.3	
0.373			

* 10 Veces la concentración original (g/10 l)

Stock 4

Vitaminas	
Tiamina	0.10
0.001	
Acido Nicotínico	0.50
0.005	
Piridoxina	0.50
0.005	
Inositol	100.0
1.0	
Glicina	2.0
0.02	
Sacarosa	30,000.0

Se ajusta a un pH entre 5.6 y 5.8.

Los componentes de cada stock son diez veces la concentración original y se pesan por separado, mezclándose uno a uno para obtener la solución stock.

El cloruro de calcio se elabora por separado para evitar que se precipite el inositol y la glicina se preparan en soluciones individuales y en frascos por separado, de preferencia de color ámbar.

La sacarosa se pesa y se agrega al final, antes de agregar el agar bacteriológico (Merck) al medio nutritivo.

Para preparar la solución de fierro se disuelven por separado los componentes en agua destilada tibia, se mezclan y se aforan.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- Anderson, E.F. 1982. A meeting on the cactus trade. *Cact.Suc.Journal.(U.S.)*54:82-85 pp.
- Anderson, E.F. (ed.) 1990. Succulent plant conservation studies and training in México: Stage 1 part 2, and Stage 2. World Wildlife Found-U.S. Reporte interno.
- Barthlott, W. 1979. *Cacti*. Stanley Thomcs Ltd.,Cheltenham.249 pp.
- Bidwell. 1990. *Fisiología Vegetal*. A.G.T.(eds).
- Böhm, H. y Rink, E. 1988. *Betalains*. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol.5. Academic Press.Inc.
- Bravo, H. y Sánchez-Mejorada H.1978. *Las cactáceas de México*. 2a. ed. Vol. I, UNAM, México . 734 pp.
- Bravo, H. y Sánchez-Mejorada. H. 1989. Claves para la identificación de las cactáceas de México. Guzmán, L.U. y A. S. Arias (Comp.),Sociedad Mexicana de Cactología, A.C. 92 pp.
- Bravo, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1991. *Las cactáceas de México*. Vols.II y III.
- Campbell, F. 1984. Trade in cacti and succulents regulated by CITES. *Cact. Succ. Journal (U.S.)* 56 pp.
- Castro-Concha, L. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber, propagated in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 22:147-151 pp. The Netherlands.
- Colomas, J. 1978. Separation and characterization of some betalains synthesized by *Myrtillocactus geometrizans* stem tissues cultivated in vitro. *Z. Pflanzenphysiol*. Bd. 87 S. 341-346 pp.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press. New York. 236-285 pp.

- Dabekaussen, R.L.1991. Factors affecting arcole activation *in vitro* in the Cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. *Scientia Horticulturae*, 46:283-294 pp.
- Debergh, P. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physio. Plant.* 53:181-187 pp.
- Debergh, P.1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59:270-276 pp.
- Devlin, R. 1976. *Fisiología Vegetal*. Omega (eds). Barcelona. 517 pp.
- Doods, J. y Roberts, L. 1982. *Experiments in Plant tissue Culture*. Cambridge University Press. 178 pp.
- Eguiarte, L.E. y Piñeiro D. 1990. Genética de la conservación: leoncs vemos, genes no sabemos. *Ciencias*, núm. especial 4:34-47 pp.
- Fearn, B. 1979. *50 Choice Mammillarias*. Chesterfield, Great Britain: Abbey Book Cactus Nursey.
- Fearn, B. 1981. Seed germination: the modern approach. *The Cactus and Succulent Journal of Great Britain*. 43(1):13-16 pp.
- George, E.F. y Sherrington, P.D. 1984. *Plant propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Comercial Laboratories*. Exegetics, England 709 pp.
- Gibson, A.C. 1982. Phylogenetic relationships of *Pachycereeae*. En: *Ecological genetics and evolution*. Barker J.S.F. y W.T. Starmer (eds.), Academic Press, Sydney. 3-16 pp.
- Hu, C.Y. y Wang, P.J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud culture. *Handbook of Plant Cell Culture*. Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Amirato, P.V.; Yamada, Y. (eds.), 1:177-228 pp.
- Harborne, J.B. 1984. *Phytochemical Methods*. Chapman y Hall (eds.).London.

- Hunt, D.R. 1967. Cactaceae. En: The genera of flowering plant. Vol 2. Hutchinson, J. (eds.), Oxford University Press, Oxford.
- Hunt, D.R. y Taylor N.P. 1986. The genera of the Cactaceae: towards a new consensus. *Bradleya* 4:65-78 pp.
- Hunt, D.R. y Taylor N.P. 1990. The genera of the Cactaceae: progress towards a new consensus. *Bradleya* 8:85-107 pp.
- IUCN. 1973. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. IUCN. Bulletin 4 (3):1-12 pp.
- IUCN. 1987. Threatened Plants Newsletter. 18:4-21 pp.
- Johnson, J.L. y Emino, E.R. 1979a. *In vitro* propagation of *Mammillaria elongata*. *HortScience* 14(5):605-606 pp.
- Johnson, J.L. y Emino, E.R. 1979b. Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cact.Succ.Journal (U.S.)*, 51:275-276 pp.
- Johnson, J.L. y Emino, E.R. 1981. Axillary meristem development in *Mammillaria elongata* D.C (Cactaceae). *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 106(1):110-113 pp.
- Kaminek, M. 1992. Progress in cytokinin research. *Tibtech*, May (Vol.10).
- Kevers, C. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol.Plant.* 61:69-74 pp.
- King, R.M. 1957. Studies in the tissue culture of cacti. *Cact. Succ. Journal (U.S.)*29:102-104 pp.
- Krulik, G. 1980. Tissue culture of succulent plants. *Nat. Cact. and Succ. Journal.*35(1)14-17 pp.
- Lomelí, A. (ed.). 1987. La voz del consumidor. Vol.V.N°4. Organó para la difusión para Latinoamérica de la IOCU. México.

- Lucas, G. 1978. The IUCN Plant Red Data Book. IUCN. Unwin Brothers limited, The gresham Press, Old Woking, Surrey, England.
- Mantell, S.H. y Smith, H. 1983. Plant Biotechnology. Cambridge University Press. 3-39 pp.
- Martínez-Vázquez y Rubluo, A. 1989. *In vitro* mass propagation of the extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. Journal of Hort. Science.64(1):99-105 pp.
- Mauseth, D.J. y Halpering. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). Amer.J.Bot. 62(8):869-867 pp.
- Mauseth, D.J. 1977. Cytokinin and Giberellic Acid induced effects on tre determination and morphogenesis of leaf primordia in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). Amer.J.Bot. 64(3):337-346 pp.
- Mauseth, D.J. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. Cact.Suc.Journal (U.S.) 51:186-187 pp.
- Minocha, S.C. y Mehra, P.N. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). Amer.J Bot. 61(2):168-173 pp.
- Mordejai, M. 1989. Historia de la Biotecnología. Ciencia y Desarrollo. Vol XIV. N° 84.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. Physiol.Plant. 15:473-497 pp.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annu. Rev. Plant. Physiol. 25:135-166 pp.
- Oldfield, S. 1985. Wrhither international trade in plants. New Scientist. 2(106).
- Oldfield, S. 1985. The western European trade in cacti and other succulents. Traffic Bolletin. 7(3)(4).
- Pare, P. y Dmitrieva, N. Mabry J.1991. Phytoalexin Aurone induced in *Cephalocereus senilis* liquid suspension culture. Phytochemistry,30(4):1133-1135 pp.

- Piattelli, M. y Minale, L. 1964. Pigments of Centrospermae-II. *Phytochemistry*, 3:547-557 pp.
- Piattelli, M. 1981. The Betalains: Structure, Biosynthesis and Chemical Taxonomy. En: *The Biochemistry of Plants*. Vol.7. Academic Press, New York.
- Preece, J.E. y Sutter, E.G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En: *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Ravenda, I. 1990. Breaking dormancy in cactus seed. *Cact. Succ. Journal*. (U.S.), 62(2).
- Raven, P. 1976. Ethics and attitudes. En: *Conservation of threatened plants*. Simmons, J.B. (ed.). New York.
- Robert, M. y Loyola, V.M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CICY). México.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa (ed). México. 57-96 pp.
- Sachar, R.C. y Iyer, R.D. 1959. Effect of auxin, kinetin and gibberellin on the placental tissue of *Opuntia dillenii* Haw. cultured *in vitro* Haw. cultured *in vitro*. *Phytomorph.* 9:1-3 pp.
- Sánchez-Mejorada, H. 1982a. Algunos usos prehispánicos de las cactáceas entre los indígenas de México. Comisión Botánica Exploradora del Estado de Toluca. México.
- Sánchez-Mejorada, H. 1982b. Problemas en el control del comercio de las cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* 27:27-31 pp.
- Sánchez-Mejorada, H. 1982c. Informe sobre la Reunión de Tucson para analizar el comercio de cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* 27:90-95 pp.
- Sánchez-Mejorada, H. 1987. Observaciones sobre el estado de conservación de 12 especies de cactáceas del Noreste de México. *Cact. Suc. Mex.* 32:61-71 pp.
- Singha, S. 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cidonia oblonga* Mill) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. The Netherlands. 22:135-142 pp.

- Simerda, B. 1990. Effective ways of propagating endangered cacti. *British Cactus and Succulent Journal*.1(8):9-12 pp.
- Singer, J.W. 1980. Degradation rates of Vulgaxanthine. *I.J.Food Sci.*, 43(3):489-491 pp.
- Staba, E.J. 1980. *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*. CRC Press, Inc. Florida.
- Starling, R.J. y Doods J.H. 1983. Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. *Bradleya*, 1:84-90 pp.
- Starling, R.J. 1985. *In vitro* propagation of *Leuchtenbergia principis*. *Cact. Succ.Journal (U.S.)* 57:114-115 pp.
- Steinhart, C.E. 1962. Tissue cultures of a cactus. *Science* 137:545-546 pp.
- Steven, R. y Singha, S. 1990. Glutamate Dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber. propagated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22:147-151 pp.
- Subash, C. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller. (Cactaceae). *Amer.J.Bot.* 61(2):168-173 pp.
- . Sumano, M.G. 1983. Efecto del Metil Metasulfonato (MMS) sobre la geminación de semillas de cebada (*Horneum vulgare*, Var. común). En el Octavo Congreso Nacional de Fitogenética . Fac. de Agrobiología. Uruapan, Mich.107-125 pp.
- Traffic.(U.S.).1986. Special Report on México.6(4).
- Vázquez-Yanes, C. 1979. Whither international trade in plants. *New Scientist*, 2(106).
- Villegas, L. 1979. Estudio de los colorantes del betabel (*Beta vulgaris*). Tesis de Licenciatura, Fac. de Química.UNAM.
- Vyskot, B. y Jára, Z. 1984.. Clonal propagation of Cacti through axillary buds *in vitro*.*Journal of Hort. Sci.*59(3)449-452 pp.
- Wilhelm, B. 1979. Cacti. Form and Diversity Stanley Thornes (eds.).1-14 pp.

- Wilson, E. 1989. La biodiversidad amenazada. *Investigación y Ciencia*. 158:65-71 pp.
- Wochok, Z. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biological Conservation*.20:80-83 pp.
- Zimmerman, T. 1989. Vitrification and soluble carbohydrate levels in *Petunia* leaves as influenced by media gelrite and sucrosa concentrations. *Plant Cell.Reports*. 8:358-360 pp.
- Ziv, M. 1990. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.